

Zajednica izvršitelja



Naručitelj



Krajnji korisnik



STUDIJA OCJENE I PRAĆENJA UČINKOVITOSTI PROVEDBE PROJEKTA
IZGRADNJE KANALIZACIJSKE MREŽE I ANALIZA UČINKOVITOSTI RADA UREĐAJA
ZA PROČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA U GRADU POREČU – STUDIJA POREČ



IZVJEŠĆE 9 Smjernice za sprovođenje eksperimentalnih procedura na UPOV-ima
studeni 2021



STUDIJA OCJENE I PRAĆENJA UČINKOVITOSTI PROVEDBE PROJEKTA
IZGRADNJE KANALIZACIJSKE MREŽE I ANALIZA UČINKOVITOSTI RADA
UREĐAJA ZA PROČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA U GRADU POREČU –
STUDIJA POREČ

IZVJEŠĆE 9

SMJERNICE ZA PROVOĐENJE EKSPERIMENTALNIH PROCEDURA NA UPOV-ima

Siječanj 2019

Zajednica izvršitelja



Naručitelj



Krajnji korisnik



STUDIJA OCJENE I PRAĆENJA UČINKOVITOSTI PROVEDBE PROJEKTA
IZGRADNJE KANALIZACIJSKE MREŽE I ANALIZA UČINKOVITOSTI RADA
UREĐAJA ZA PROČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA U GRADU POREČU –
STUDIJA POREČ


IZVJEŠĆE 9

SMJERNICE ZA PROVOĐENJE EKSPERIMENTALNIH PROCEDURA NA UPOV-ima

7 siječanj 2018

30 studeni 2018

mr.sc. Božidar Deduš, dipl. ing.
Ovlaštenik Zajednice izvršitelja
Proning DHI d.o.o.


United Nations
Institute for
IHE
DELFT
Cultural Organization
under the auspices
of UNESCO

prof. dr. sc. Dario Brejanovic, dipl. ing.
Voditelj stručnog tima
IHE Delft

SADRŽAJ

1. Experimentalni program Studije Poreč
2. Smjernice za provođenje laboratorijskih eksperimenata za biološko uklanjanje fosfora (P) iz otpadnih voda
3. Smjernice za provođenje laboratorijskih eksperimenata za biološko uklanjanje dušika (N) iz otpadnih voda
4. Smjernice za provođenje laboratorijskih eksperimenata za biološko uklanjanje organske tvari (KPK) iz otpadnih voda
5. Smjernice za provođenje respirometrije

1. Experimentalni program Studije Poreč

Ugovor o Uslugama između Naručitelja Hrvatske Vode i Zajednice izvršitelja (opunomoćeni zastupnik Proning DHI d.o.o.) o provedbi STUDIJE OCJENE I PRAĆENJA UČINKOVITOSTI PROVEDBE PROJEKTA IZGRADNJE KANALIZACIJSKE MREŽE I ANALIZE UČINKOVITOSTI RADA UREĐAJA ZA PROČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA U GRADU POREČU (STUDIJE POREČ) sklopljen je u Zagrebu na dan 19. srpnja 2018. Po Projektnom zadatku je planirano da Zajednica izvršitelja pripremi 18 izvješća (na prvom sastanku između Naručitelja i predstavnika Zajednice izvršitelja, te uz nazočnost Krajnjeng korisnika Odvodnje Poreč d.o.o., dogovoreno je da će Zajednica izvršitelja pripremiti još jedno izvješće, Pred-izvješće). SMJERNICE ZA PROVOĐENJE EKSPERIMENTALNIH PROCEDURA NA UPOV-ima su Izvješće br. 9 u Projektnom zadatku. Eksperimentalne procedure opisane u ovom izvješću odabrane su na temelju Projektnog zadatka te kakvoćom otpadne vode i odabirom tehnoloških procesa u Projektu Poreč na UPOV-ima Poreč Sjever, Poreč Jug, Lanterna i Vrsar. Tehnološki procesi na sva 4 uređaja su isti tako da su odabrane eksperimentalne procedure jednako primjenjive na svaki od 4 spomenuta uređaja.

Eksperimentalni program je za Studiju Poreč dizajniran po naputcima iz Projektnog zadatka kojim se nalaže provođenje eksperimenata u centralnoj laboratoriji UPOV-a Poreč Jug sa muljem iz sva 4 UPOV-a (Poreč Sjever, Poreč Jug, Lanterna i Vrsar). Dio Projektnog zadatka koji opisuje eksperimentalni program prikazan je ovdje u cijelosti:

"Kao što je već rečeno, u sklopu Projekta Poreč izgradit će se četiri nova UPOV-a, od kojih će se u svakom koristiti biološko pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem i razdvajanjem krutih od tekućih tvari pomoću membranske tehnologije. Takvi MBR su projektirani za visoku učinkovitost pročišćavanja u čitavom rasponu opterećenja. Model s aktivnim muljem (ASM) korišten za simulaciju projektiranja i rada svakog od četiri UPOV-a se temelji na zadanim parametrima dobivenima iz proučavanja brojnih konvencionalnih uređaja s aktivnim muljem u Europi na temperaturi od 10 °C i 20 °C. Budući da je Poreština popularno turističko odredište s velikom razlikom u opterećenjima između ljetnih mjeseci i ostatka godine, rad uređaja će trebati prilagoditi tijekom godine kako bi mogao prihvatiti sezonske varijacije u količinama i opterećenjima. Uz to, ovisno o hidrološkim uvjetima i fizičkom stanju kanalizacijske mreže, može se očekivati prodor slane (bočate) podzemne vode u mrežu, što može negativno djelovati na zajednicu mikroba u membranskim bioreaktorima. Zbog takvih je okolnosti odlučeno da će se uspostaviti eksperimentalna laboratorijska struktura za praćenje i optimizaciju rada četiri predmetna UPOV-a. Zbog toga se od Izvršitelja traži da provede sljedeće aktivnosti:

- *Osmisliti temeljni koncept eksperimentalne strukture za provođenje testova aktivnosti pomoću aktivnog mulja iz svakog od četiri UPOV-a. Struktura bi trebala uključivati reaktorske spremnike zapremine barem 3 litre za miješanje, aeraciju, kontrolu pH, kontrolu temperature i mjerenje otopljenog kisika i REDOX potencijala, kao i svaki drugi hardware neophodan za provođenje eksperimenata. Eksperimentalnim sustavom bi trebalo moći upravljati i kontinuirano pa bilo bi poželjno da bude softverski kontroliran. Izvršitelj je obavezan u dijelu tijeka Studije Poreč osigurati najam potrebne opreme za edukaciju i prikaz rezultata. Privremeni najam i postavljanje eksperimentalne opreme je u laboratoriju po izboru Naručitelja u jednom od UPOV-a. Oprema za edukaciju treba biti zadovoljavajuće kvalitete i sa osobenostima opreme obično korištene za slične potrebe u državama EU (npr. Applikon iz Nizozemske ili Sartorius iz Njemačke).*
- *Planiranje eksperimentalnog programa za svaki od četiri UPOV-a koji obuhvaća ekstremne uvjete kao što su razdoblja maksimalnih i minimalnih protoka i opterećenja, maksimalne i minimalne radne temperature, različite koncentracije biomase u MBR-ima, različite razine saliniteta u ulaznoj otpadnoj vodi i bilo koji drugi skup uvjeta koje Izvršitelj smatra važnim. Trajanje testova treba pokrivati kratkoročna razdoblja (par sati) i treba koristiti mulj (i otpadnu vodu) iz četiri predmetna UPOV-a. Testovi trebaju uključivati, ali ne biti ograničeni na, testove aktivnosti uklanjanja organske tvari, te nitrifikacije i denitrifikacije, ispitivanja sposobnosti uređaja za biološko uklanjanje fosfora provođenjem testova anaerobnog otpuštanja fosfora i aerobne i anoksične apsorpcije fosfora, testova biološkog utroška kisika (respirometrija) i bilo kojeg drugog testa koji Izvršitelj smatra prikladnim. Izvršitelj treba osigurati protokol na hrvatskom jeziku za izvođenje svakog testa uključujući plan programa eksperimentalnog uzorkovanja i popis kinetičkih i stehiometrijskih parametara koji se mogu dobiti iz svakog testa kako bi se mogli koristiti za zamjenu standardnih (zadanih) parametara u modelu s aktivnim muljem ili kako bi se koristili za kontrolu/optimizaciju rada i procesa pročišćavanja uređaja u različitim uvjetima rada. Testovi bi trebali odražavati stvarne uvjete u*

ljetnom i zimskom razdoblju u najvećoj mogućoj mjeri po pitanju temperature i pH otpadne vode, kao i ekstremna (niska i visoka) opterećenja, a trebalo bi istražiti i utjecaj različitih razina saliniteta (u rasponu izmjenom u sustavu odvodnje grada Poreč) na ponašanje različitih relevantnih populacija mikroorganizama u aktivnom mulju dobivenom iz četiri predmetna UPOV-a.

- *Provesti svaki od planiranih testova iz gornje točke dvaput: jednom tijekom niske sezone (zimi) i jednom tijekom visoke sezone (ljeti) za svaki od četiri UPOV-a.*
- *Provesti uzorkovanje prema planu koji proizlazi iz gornjih točki. Provesti analitički dio i predstaviti i elaborirati rezultate na način opisan eksperimentalnim protokolom. Za odabir analitičkih parametara i učestalosti uzorkovanja i provedbu analitičkog dijela zadatka odgovoran je Izvršitelj.*
- *Rezultate eksperimenata izvijestiti u dobro uređenom i detaljnom pisanom izvješću koje će uključivati sve potrebne informacije i upute.*
- *Na temelju rezultata izvršenih eksperimenata, Izvršitelj treba dati preporuke o tome kako koristiti eksperimente za daljnje praćenje aktivnosti aktivnog mulja u četiri UPOV-a i eventualno o tome kako prilagoditi i optimizirati rad uređaja, bilo uz pomoć modeliranja ili izravnom prilagodbom parametara procesa u uređaju.”*

Odabrana oprema za provedbu eksperimenata (Applikon BV iz Nizozemske, slika 1.1) je vrhunske kvalitete i sa osobenostima je opreme obično korištene za slične potrebe u državama EU. Uključuje hardware, mjerne sonde te kontrolu temperature i pH vrijednosti, navedene Projektnim zadatkom.



Slika 1.1 Provedba EBPR testa s aktivnim muljem iz UPOV-a Koprivnica pri Prehrambeno biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Ovaj će eksperimentalni sustav biti rabljen u Studiji Poreč.

Sukladno Projektnom zadatku, za svaki UPOV uradiće se jedan kombinirani anaerobni-aerobni test za ocjenu uklanjanja fosfora, jedan aerobni i jedan anoksični test za ocjenu uklanjanja dušika, te jedan aerobni test za ocjenu uklanjanja organske tvari (sa testom respiracije mulja) i to dva puta, jednom u ljetnom periodu i jednom u zimskom periodu po planu prikazanom u tablici 1.1.

Tablica 1.1 Plan provedbe testova aktivnosti mulja sa 4 UPOV-a Projekta Poreč

UPOV	Uklanjanje P	Uklanjanje N (NIT)	Uklanjanje N (DEN)	Uklanjanje KPK
Lanterna	■+■	■+■	■+■	■+■
Poreč Sjever	■+■	■+■	■+■	■+■
Poreč Jug	■+■	■+■	■+■	■+■
Vrsar	■+■	■+■	■+■	■+■

■ Ljetni uvjeti ■ Zimski uvjeti

Detaljan plan provedbe svakog od gore navedenih testova je zasnovan na tablici 2.10 i prikazan je tablicama 1.2, 1.3, 1.4. i 1.5. Slijed tablica i opis eksperimentalnih procedura odabran je na temelju složenosti bioloških procesa: od najsloženijeg uklanjanja fosfora, preko uklanjanja dušika do uklanjanja organske tvari (P, N i KPK). Pošto je koncentracija biomase parametar koji bi trebalo biti relativno stabilan kod UPOV-a s MBR tehnologijom, nema potrebe da se ovaj tehnološki parametar mijenja u testovima te, shodno tome, koncentracija biomase u testovima će biti točno ona koja je zatečena na UPOV-u momentu uzorkovanja. Glede saliniteta, Zajednici izvršitelja je rečeno tijekom prvog obilaska terena u listopadu 2018. godine da je Projektom Poreč sustav odvodnje doveden u takvo stanje da se ne očekuje prodor slane (morske) vode u sustav, a tome pogoduje i činjenica da je sustav odvodnje Poreštine velikim dijelom iznad nivo mora, te da nije koncipiran na priobalnim kolektorima koji su podložni infiltraciji morske vode. Temeljem ovih razmatranja Zajednica izvršitelja nije planirala provedbu testova sa slanom otpadnom vodom. Međutim, konačna će odluka o provedbi ovog testa biti donešena na temelju mjerenja slanosti otpadne vode na 4 lokacije koje su već odabrane tijekom obilaska terena u listopadu 2018. godine.

Ovo izvješće sadrži prilagođene dijelove nedavno publiciranih standardnih smjernica za provođenje procesa biološkog uklanjanja fosfora (P), dušika (N - nitrifikacija i denitrifikacija) i organske tvari (KPK), te respirometrije, u laboratorijskim uvjetima iz knjige *Experimental Methods for Wastewater Treatment* (van Loosdrecht i sur., 2016). Opis provedbe laboratorijskih analiza parametara koji su od interesa nije uključen u ovo izvješće zbog činjenice da su iste prihvaćene u Hrvatskoj praksi kao standard već godinama i temelje se na knjizi *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA i WEF, 2018).

U tablicama 1.2, 1.3, 1.4 i 1.5 označeni su plavom bojom parametri čije će vrijednosti biti određene u svakom planiranom uzorku na licu mjesta u laboratoriji UPOV-a Poreč Jug i u laboratoriji Zajednice izvršitelja (IHE Delft). Zelenom bojom označene se vrijednosti koje se daju izračunati na osnovu izmjerenih vrijednosti (označenih plavom bojom). Na temelju datog plana moguće je odrediti ukupan broj analiza po svakom parametru, za svaki od 4 UPOV-a. U prikazanom slučaju će broj analiza biti jednak za sva 4 UPOV-a i u ljetnom i u zimskom periodu provedbe.

Tablica 1.3 Primjer eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje kombiniranog anaerobno-aerobnog šaržnog testa aktivnosti mulja glede uklanjanja fosfora (test tipa br. EBPR.AER.2/UPOV PS) s aktivnim muljem iz UPOV-a Poreč Sjever koristeći sintetički supstrat pri pH 7,0 i T 20°C. Napomena: i pH vrijednost i temperatura se trebaju podesiti na onu koja je izmjerena na UPOV-u na mjestu i u momentu uzimanja uzorka aktivnog mulja i u zimskom i u ljetnom periodu.

Kombinirani anaerobno-aerobni šaržni testovi EBPR - UPOV Poreč Sjever							Oznaka: EBPR.AER.2/UPOV PS				
Datum:	Ponedjeljak 15.07.2019. 9:00 h			Eksperimentalna procedura u kratkim crtama:				Vrijeme (h:min)			
Opis:	Testovi pri 20 °C, pH 7, s umjetnim supstratom i aktivnim muljem s UPOV-a			1. Pripremiti 1.25L svježeg aktivnog mulja iz uređaja				8:00			
Test br.:	1 od 4			2. Potvrditi kalibriranost i funkcionalnost sustava, mjerača i senzora				8:10			
Trajanje:	4,5 h (270 min)			3. Prebaciti 1,25 L aktivnog mulja u šaržni reaktor				8:20			
Supstrat:	Sintetički: Acetat (350 mg L ⁻¹) + minerali			4. Održavati aerobne uvjete pomoću nježnog miješanja i upuhivanja plina pri zadanoj T i pH				8:40			
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u			5. 20 min prije početka uzeti uzorak radi određivanja početnog stanja				8:40			
Uzorci br.:	EBPR.AER.2/UPOV PS (1-20)			6. Zaustaviti aeraciju i početi upuhivati plin N ₂				8:50			
Ukupni volumen uzorka:	305 mL			7. Započeti ciklus, dodati 1,25 L sintetičkog medija (0 min)				9:00			
	(10 mL za MLVSS, 12 mL za PHA, 4,5 mL za glikogen, 6 mL za ostale uzorke)			8. Nastaviti s programom uzorkovanja u skladu s planom provođenja (5 min)				9:05			
Volumen reaktora:	2,5 L			9. Zaustaviti upuhivanje plina N ₂ , započeti s dodavanjem zraka (135 min)				11:15			
				10. Zaustaviti uzorkovanje i aeraciju (nakon 270 min)				13:30			
				11. Organizirati uzorke i očistiti eksperimentalnu opremu i prostor				13:45			
				12. Pobrinuti se da je sva oprema isključena i da su uzorci propisno zbrinuti				14:00			
Plan provođenja uzorkovanja											
Vrijeme (min)	-20	0	5	10	15	20	30	45	60	90	135
Vrijeme (h)	-0.33	0.00	0.08	0.17	0.25	0.33	0.50	0.75	1.00	1.50	2.25
Uzorak br.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Parametar	ANAEROBNA FAZA										
HAc (C-mmol L ⁻¹)	1										
PO ₄ -P (P-mmol L ⁻¹)	1										
NH ₄ -N (N-mmol L ⁻¹)	1										
PHA (C-mmol)	2										2
Glikogen (C-mmol)	2										2
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)	Vidi tablicu										Vidi tablicu
¹ Prosječna vrijednost koncentracije prisutne u sintetičkom supstratu i tekućoj fazi uzorka mulja prije početka testa											
² Koncentracija PHA i glikogena će biti određena analitičku u laboratoriji Zajednice izvršitelja (IHE Delft), ostale analize uraditi će se u laboratoriji UPOV-a											
Plan provođenja uzorkovanja (nastavak)											
Vrijeme (min)	140	145	150	155	160	175	200	235	270		
Vrijeme (h)	2.33	2.42	2.50	2.58	2.67	2.92	3.33	3.92	4.50		
Uzorak br.	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Parametar	AEROBNA FAZA										
HAc (C-mmol L ⁻¹)											
PO ₄ (P-mmol L ⁻¹)											
NH ₄ (N-mmol L ⁻¹)											
PHA (C-mmol)											2
Glikogen (C-mmol)											2
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)											Vidi tablicu
² Koncentracija PHA i glikogena će biti određena analitičku u laboratoriji Zajednice izvršitelja (IHE Delft), ostale analize uraditi će se u laboratoriji UPOV-a											
Mjerenja MLSS i MLVSS											
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer		
Početak anaerobne faze ³	1										
	2										
	3										
							Prosjek				
Kraj anaerobne/Početak aerobne faze	4										
	5										
	6										
							Prosjek				
Kraj aerobne faze	7										
	8										
	9										
							Prosjek				
³ Uzorak uzet prije dodavanja supstrata											
Sastav biomase											
Točka uzorkovanja	Početak an.	Kraj an.	Kraj aer.								
MLSS (mg L ⁻¹)											
MLVSS (mg L ⁻¹)											
Omjer											
Pepeo (mg L ⁻¹)											
PHB (mg L ⁻¹)											
PHV (mg L ⁻¹)											
PHA (mg L ⁻¹)											
Glikogen (mg L ⁻¹)											
% (PHA+Gii) MLVSS ⁻¹											
Aktivna biomasa (mg L ⁻¹)											
Aktivna biomasa (Cmmol L ⁻¹)											
Napomena:											
Acetat (CH ₂ O) 30.03 mg C-mmol ⁻¹											
Ortofosfat (PO ₄ -P) 31.00 mg P-mmol ⁻¹											
Amonij (NH ₄ -N) 14.00 mg N-mmol ⁻¹											
PHB (CH _{1.5} O _{0.5}) 21.52 mg C-mmol ⁻¹											
PHV (CH _{1.6} O _{0.4}) 20.02 mg C-mmol ⁻¹											
Glikogen (CH _{10/6} O _{5/6}) 27.00 mg C-mmol ⁻¹											
Biomasa (CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20}) 26.00 mg C-mmol ⁻¹											

Tablica 1.4 Primjer eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje aerobnog šaržnog testa aktivnosti mulja glede uklanjanja dušika - nitrifikacije (test tipa br. NIT.CHE.1/UPOV PS) s aktivnim muljem iz UPOV-a Poreč Sjever koristeći sintetički supstrat pri pH 7,0 i T 20°C. Napomena: i pH vrijednost i temperatura se trebaju podesiti na onu koja je izmjerena na UPOV-u na mjestu i u momentu uzimanja uzorka aktivnog mulja i u zimskom i u ljetnom periodu.

Nitrifikacijski šaržni test aktivnosti - NIT: UPOV Poreč Sjever		Oznaka: NIT.CHE.1/UPOV PS							
Datum:	Srijeda 17.07.2019. 10:00 h	Eksperimentalna procedura u kratkim crtama:	Vrijeme (h:min)						
Opis:	Nitrifikacijski test pri 20 °C s aktivnim muljem	1. Potvrditi dostupnost materijala za uzorkovanje i potrebne opreme.	8:00						
Test br.:	1	2. Potvrditi kalibriranost i funkcionalnost sustava, mjerača i senzora.	8:10						
Trajanje	3 h (180 min)	3. Prebaciti 2,0 L mulja u šaržni reaktor.	8:30						
Supstrat:	Sintetički: amonij i nitrit (1.000 mg L ⁻¹) + minerali	4. Pokrenuti aerobne uvjete pomoću nježnog miješanja i upuhivanja plina pri zadanoj T i pH.	8:40						
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u	5. 15 min prije početka uzeti uzorak radi određivanja početnog stanja.	9:40						
Uzorci br.:	NIT.CHE/UPOV PS (1-8)	7. Započeti šaržni test: dodati 0,05 L sintetičkog influenta.	9:55						
Ukupan volumen uzorka:	80 mL (5 mL normalni uzorak, 20 mL za MLVSS)	8. Uzeti prvi uzorak radi određivanja početnog stanja (nulta minuta)	10:00						
Volumen reaktora:	2,5 L	9. 30. minuta: nastaviti s programom uzorkovanja u skladu s planom provođenja	10:30						
		10. 180. minuta: zaustaviti aeraciju i miješanje.	13:00						
		11. Organizirati uzorke i očistiti sustav.	13:10						
		12. Provjeriti jesu li svi sustavi isključeni.	13:20						
Plan provođenja uzorkovanja									
Vrijeme (min)	-15	-5	0	30	60	90	120	150	180
Vrijeme (h)	-0.25	-0.08	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00
Uzorak br.	1	2	3	4	5	6	7	8	
Parametar	AEROBNA FAZA								
NH ₄ -N (mg N L ⁻¹)									
NO ₂ -N (mg N L ⁻¹)									
NO ₃ -N (mg N L ⁻¹)									
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)	Vidi tablicu								Vidi tablicu
¹ Prosječna vrijednost koncentracije prisutne u sintetičkom supstratu i tekućoj fazi uzorka mulja prije početka testa									
Mjerenja MLSS i MLVSS									
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer
Početak testa ²	1								
	2								
	3								
						Prosjek			
Kraj testa	4								
	5								
	6								
						Prosjek			
² Koncentracije su korigirane u odnosu na razrjeđenje zbog dodavanja sintetičkog medija.									
Sastav biomase									
Točka uzorkovanja	Početak testa	Kraj testa							
MLSS (mg L ⁻¹)									
MLVSS (mg L ⁻¹)									
Omjer									
Pepeo (mg L ⁻¹)									

Tablica 1.5 Primjer eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje anoksičnog šaržnog testa aktivnosti mulja glede uklanjanja dušika - denitrifikacije (test tipa br. DEN.CHE.1/UPOV PS) s aktivnim muljem iz UPOV-a Poreč Sjever koristeći sintetički supstrat pri pH 7,0 i T 20°C. Napomena: i pH vrijednost i temperatura se trebaju podesiti na onu koja je izmjerena na UPOV-u na mjestu i u momentu uzimanja uzorka aktivnog mulja i u zimskom i u ljetnom periodu.

Denitrifikacijski šaržni test aktivnosti - DEN: UPOV Poreč Sjever							Oznaka: DEN.CHE.1/UPOV PS					
Datum:	Utorak 16.07.2019. 9:00 h						Eksperimentalna procedura u kratkim crtama:					
Opis:	Test pri 20 °C, pH 7, s umjetnim supstratom i aktivnim muljem sa UPOV-a Poreč Sjever						Vrijeme (h:min)					
Test br.:	1						1. Dan prije testiranja provjereni instrumenti, kalibrirane sonde, pripremljen plan rada, radne otopine, spremnici za prikupljanje uzoraka i svi ostali materijali.					
Trajanje	3,5 h (210 min)						2. Uzet mulj iz UPOV-a i prebačen u reakcijsku posudu. 9:00					
Supstrat:	Sintetički: Acetat (200 mgCOD/L) + nitrat (20 mgN/L)						3. Pokretanje otplinjanja plinom N ₂ . 9:05					
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u						4. Dodavanje nitrata, uzet prvi uzorak. 9:10					
Uzorci br.:	DEN.CHE.1/UPOV PS (1-18)						5. Ostalih 5 uzoraka uzeto u razmacima od 20 min.					
Ukupan volumen uzorka:	240 mL						6. Dodavanje acetata i uzorkovanje. 10:30					
	(10 mL za MLVSS te 10 mL za svaki uzorak)						7. Ostalih 13 uzoraka uzeto u razmacima 5/10 min.					
Volumen reaktora:	2,5 L						8. Test zaustavljen. 11:35					
							9. Uzet uzorak za mjerenje MLVSS, procjena ukupnog volumena. 11:40					
							10. Provjeriti jesu li svi uzorci ispravno uskladišteni i isključiti sustav. 11:50					
Plan provođenja uzorkovanja												
Vrijeme (min)	0	20	40	60	80	85	90	95	100	105	110	120
Vrijeme (h)	0.00	0.33	0.67	1.00	1.33	1.42	1.50	1.58	1.67	1.75	1.83	2.00
Uzorak br.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parametar	ANOKSIČNA FAZA											
NO ₃ -N (mg N L ⁻¹)												
NO ₂ -N (mg N L ⁻¹)												
COD _{soluble} (mg COD L ⁻¹)												
MLSS (g L ⁻¹)	Vidi tablicu											
Plan provođenja uzorkovanja (nastavak)												
Vrijeme (min)	130	140	150	160	180	185						
Vrijeme (h)	2.17	2.33	2.50	2.67	3.00	3.08						
Uzorak br.	13	14	15	16	17	18						
Parametar	ANOKSIČNA FAZA											
NO ₃ -N (mg N L ⁻¹)												
NO ₂ -N (mg N L ⁻¹)												
COD _{soluble} (mg COD L ⁻¹)												
MLSS (g L ⁻¹)						Vidi tablicu						
Mjerenja MLSS i MLVSS												
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer			
Početak testa ²	1											
	2											
	3											
							Prosjek					
Kraj testa	4											
	5											
	6											
							Prosjek					
² Koncentracije su korigirane u odnosu na razrjeđenje zbog dodavanja sintetičkog medija.												
Sastav biomase												
Točka uzorkovanja	Početak testa	Kraj testa										
MLSS (mg L ⁻¹)												
MLVSS (mg L ⁻¹)												
Omjer												
Pepeo (mg L ⁻¹)												
Ukupna biomasa (gVSS)												
r _{D, end} (mg N L ⁻¹ min ⁻¹)												
r _{D, exog} (mg N L ⁻¹ min ⁻¹)												
r _{CO_D} (mg COD L ⁻¹ min ⁻¹)												
Anoksični prirast												
Brzina denitrifikacije (mg N g MLVSS ⁻¹ h ⁻¹)												

Tablica 1.6 Primjer eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje kombiniranog anaerobno-aerobnog šaržnog testa aktivnosti mulja glede uklanjanja KPK (test tipa br. OHO.AER.1/UPOV PS) s aktivnim muljem iz UPOV-a Poreč Sjever koristeći sintetički supstrat pri pH 7,0 i T 20°C. Napomena: i pH vrijednost i temperatura se trebaju podesiti na onu koja je izmjerena na UPOV-u na mjestu i u momentu uzimanja uzorka aktivnog mulja i u zimskom i u ljetnom periodu.

Aerobni šaržni testovi uklanjanja COD - UPOV Poreč Sjever				Oznaka: OHO.AER.1/UPOV PS								
Datum:	Četvrtak	18.07.2019.	10:00 h	Ekperimentalna procedura u kratkim crtama:				Vrijeme (h:min)				
Opis:	Testovi pri 25 °C, pH 7, sintetički supstrat i uzorak aktivnog mulja iz UPOV-a Poreč Sjever			1. Potvrditi dostupnost materijala za uzorkovanje i potrebne opreme.				8:00				
Test br.:	1 od 6			2. Potvrditi kalibriranost i funkcionalnost sustava, mjerača i senzora.				8:10				
Trajanje:	4,0 h (240 min)			3. Prebaciti 1,25 L mulja u šaržni reaktor.				8:30				
Supstrat:	Sintetički: Acetat (350 mg L ⁻¹) + mineralna otopina s N i P			4. Započeti s nježnim miješanjem i upuhivanjem plina pri zadanoj T i pH.				8:40				
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u			5. 20 min prije početka uzeti uzorak radi određivanja početnog stanja.				9:40				
Uzorki br.:	OHO.AER.1(1-22)			7. Započeti test: dodati 1,25 L sintetičkog influenta (nulta minuta).				10:00				
Ukupan volumen uzorka:	222 mL (10 mL za MLVSS, 6 mL za ostale uzorke)			8. 5. minuta: nastaviti s programom uzorkovanja u skladu s planom provođenja				10:05				
Volumen reaktora:	2,5 L			9. 240. minuta: zaustaviti aeraciju i miješanje.				14:00				
				11. Organizirati uzorke i očistiti sustav.				14:15				
				12. Provjeriti jesu li svi sustavi isključeni.				14:20				
Plan provođenja uzorkovanja												
Vrijeme (min)	-20	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	75
Vrijeme (h)	-0.33	0.00	0.08	0.17	0.25	0.33	0.42	0.50	0.67	0.83	1.00	1.25
Uzorak br.	1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Parametar	AEROBNA FAZA											
HAc (mg L ⁻¹)	1											
PO ₄ -P (mg L ⁻¹)	1											
NH ₄ -N (mg L ⁻¹)	1											
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)	Vidi tablicu											See table
¹ Prosječna vrijednost koncentracije prisutne u sintetičkom supstratu i tekućoj fazi uzorka mulja prije početka testa.												
Plan provođenja uzorkovanja (nastavak)												
Vrijeme (min)	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	
Vrijeme (h)	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75	3.00	3.25	3.50	3.75	4.00	
Uzorak br.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Parametar	AEROBNA FAZA											
HAc (mg L ⁻¹)												
PO ₄ -P (mg L ⁻¹)												
NH ₄ -N (mg L ⁻¹)												
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)											Vidi tablicu	
Mjerenja MLSS i MLVSS												
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer			
Početak aerobne faze ²	1											
	2											
	3											
							Prosjek					
Kraj aerobne faze	4											
	5											
	6											
							Prosjek					
² Uzorak uzet prije dodavanja supstrata.												
Sastav biomase												
Točka uzorkovanja	Početak aer.	Kraj aer.										
MLSS (mg L ⁻¹)												
MLVSS (mg L ⁻¹)												
Omjer												
Pepeo (mg L ⁻¹)												
			Napomena:									
			Acetat (CH ₃ COO) 30.03 mg C·mmol ⁻¹									
			Ortofosfat (PO ₄ ³⁻ -P) 31.00 mg P·mmol ⁻¹									
			Amonij (NH ₄ ⁺ -N) 14.00 mg N·mmol ⁻¹									

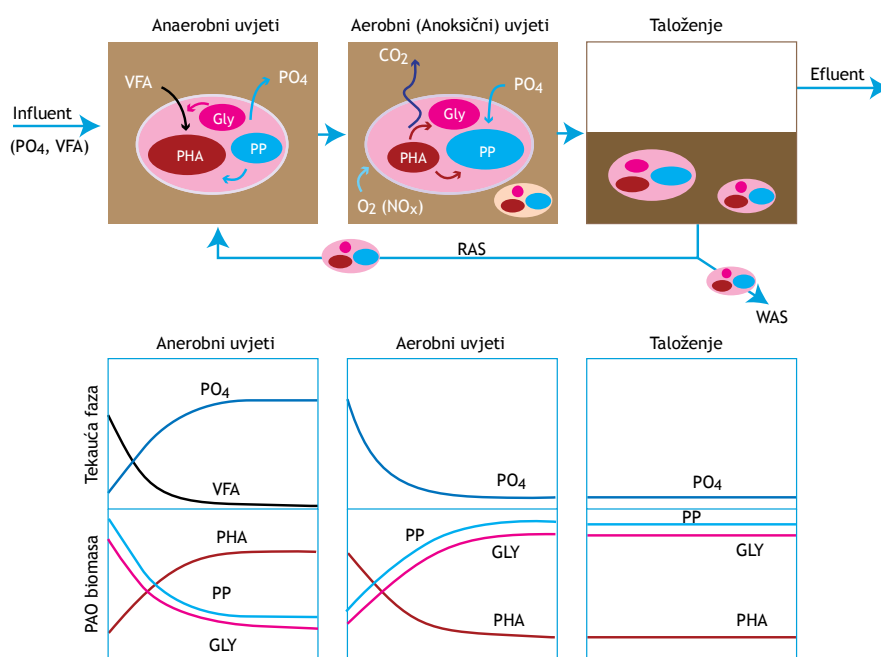
Napomena: test aerobne respirometrije OHO će biti proveden paralelno s testom uklanjanja COD uz uporabu automatskog uređaja nazvanog BOM (Biological Oxygen Monitor) koji automatski prikuplja mjerene podatke tako da nije potrebno praviti tablcu uzorkovanja jer se radi samo o direktnom online mjerenju koncentracije rastvorenog kisika u smjesi aktivnog mulja i vode. Međutim, respirometrija je detaljno prikazana u poglavlju 5 ovog izvješća zbog cjelovitosti.

2. Smjernice za provođenje laboratorijskih eksperimenata za biološko uklanjanje fosfora (P) iz otpadnih voda

2.1 Opis procesa

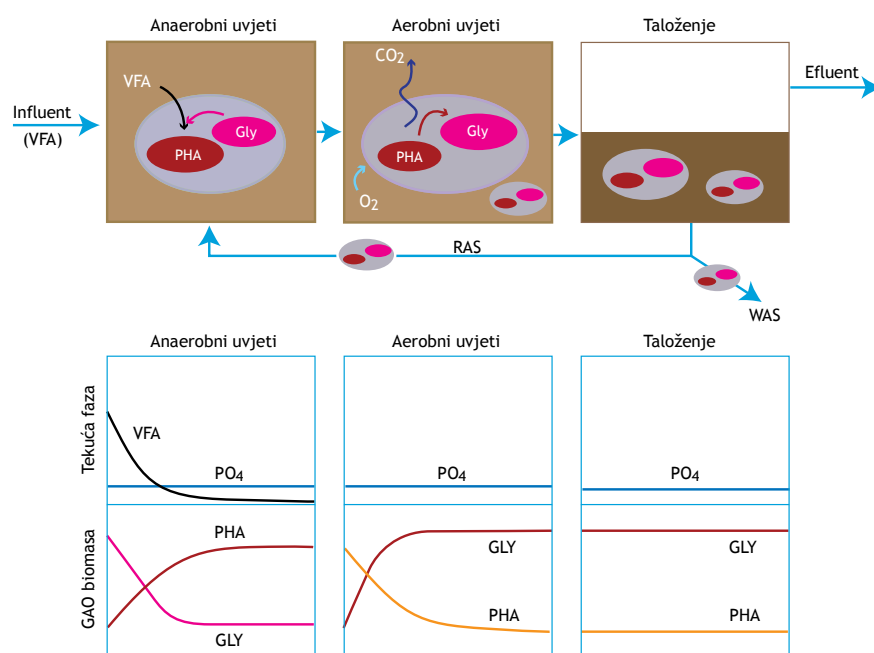
Poboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR) može se provesti u sustavima obrade otpadne vode s aktivnim muljem uvođenjem anaerobne faze na početku linije obrade otpadne vode. Visoka učinkovitost uklanjanja P, niži operativni troškovi, manja proizvodnja mulja i potencijalni povrat fosfora pridonijeli su primjeni i popularnosti tog procesa (Mino i sur., 1998; Henze i sur., 2008; Oehmen i sur., 2007). EBPR provode organizmi koji akumuliraju fosfor (polifosfat) (PAO) (Comeau i sur., 1987; Mino i sur., 1998) koji, unutarstaničnom akumulacijom polifosfata (poli-P), mogu ukloniti veće količine fosfora (0,35-0,38 g P g VSS⁻¹ PAO) nego obični heterotrofni organizmi (OHO) (0,03 g P g VSS⁻¹ OHO) (Wentzel i sur., 2008). Znanstvene, mikrobiološke i tehničke karakteristike procesa EBPR su u fokusu istraživanja koja su u zadnjih nekoliko desetljeća provodile različite istraživačke skupine (Wentzel i sur., 1986, 1987; Comeau i sur., 1986, 1987; Smolders i sur., 1994a,b; Mino i sur., 1987, 1998; Oehmen i sur., 2005a, 2005c, 20i306, 2007; Nielsen i sur., 2010). Konkretno, naponi su usmjereni na razvijanje boljeg razumijevanja stvarnih metaboličkih mehanizama EBPR kako bi se utvrdio mikrobnii identitet uključenih organizama i optimizirale potrebne konfiguracije procesa, a sve kako bi se unaprijedila i povećala učinkovitost i pouzdanost procesa EBPR.

PAO su heterotrofni organizmi. Međutim, za razliku od OHO, PAO posjeduju jedinstvenu sposobnost korištenja unutarstanično pohranjenog poli-P za proizvodnju potrebne energije (adenozin trifosfat, ATP) u anaerobnim uvjetima radi pohrane biološki lako razgradive organske tvari (RBCOD), kao što su hlapive masne kiseline (VFA) poput acetata (Ac) i propionata (Pr), kao unutarstanične poli-β-hidroksi-alkanoate (PHA). Pohranjeni PHA se kasnije koriste u anoksičnim ili aerobnim uvjetima za poboljšano apsorpiranje fosfora, sintezu glikogena, rast i održavanje biomase. Zbog takvog svojstva PAO imaju prednost pred ostalim mikrobnim populacijama od značaja. Na taj se način PAO mogu namnožiti kako bi se postiglo EBPR recikliranjem aktivnog mulja kroz izmjenu anaerobne i anoksične ili aerobne faze, uz istovremeno usmjeravanje influenta koji je obično bogat hlapivim masnim kiselinama prema anaerobnoj fazi. Shematski prikaz metabolizma PAO nalazi se na slici 2.1.



Slika 2.1 Konceptualna shema uređaja za obradu otpadne vode s aktivnim muljem koji izvodi EBPR, s ilustracijom aktivnosti PAO (Lopez-Vazquez, 2009; prilagođeno iz Meijer, 2004).

U anaerobnoj fazi, PAO unutar stanica pohranjuju biološki lako razgradive organske tvari prisutne u sirovom influentu ili istaloženoj otpadnoj vodi (većinom hlapive masne kiseline) kao PHA pomoću dva druga unutarstanična polimera koja sudjeluju u gore spomenutom metabolizmu: poli-P i glikogen (polimer glukoze). PAO hidroliziraju i koriste poli-P za osiguravanje potrebne energije (kao ATP) za transport i pohranjivanje VFA kao PHA (Wentzel i sur., 1986), dok se glikogen koristi za dobavu potrebne reducirajuće snage za konverziju VFA u PHA, kao i za osiguravanje dodatne potrebne energije (kao ATP) (Comeau i sur., 1986, 1987; Smolders i sur., 1994a; Mino i sur., 1998). Na taj način, anaerobna apsorpcija VFA od strane PAO rezultira pohranjivanjem PHA i istovremenom hidrolizom poli-P i glikogena. Najčešći polimeri PHA koje pohranjuju PAO su poli- β -hidroksibutirat (PHB), poli-hidroksivalerat (PHV) i poli- β -hidroksi-2-metilvalerat (PH₂MV). Njihova pojavnost i količina ovise o sastavu VFA (Ac ili Pr). Kada je Ac najobilnija VFA u mediju, PAO pohranjuju uglavnom PHB (do 90 % pohranjenih PHA) (Smolders i sur., 1994a), ali kada je Pr dominantna VFA, tada PHA postoje većinom kao PHV i PH₂MV (Oehmen i sur., 2007).



Slika 2.2 Konceptualna shema mikrobne aktivnosti GAO (prilagođeno iz Lopez-Vazquez, 2009).

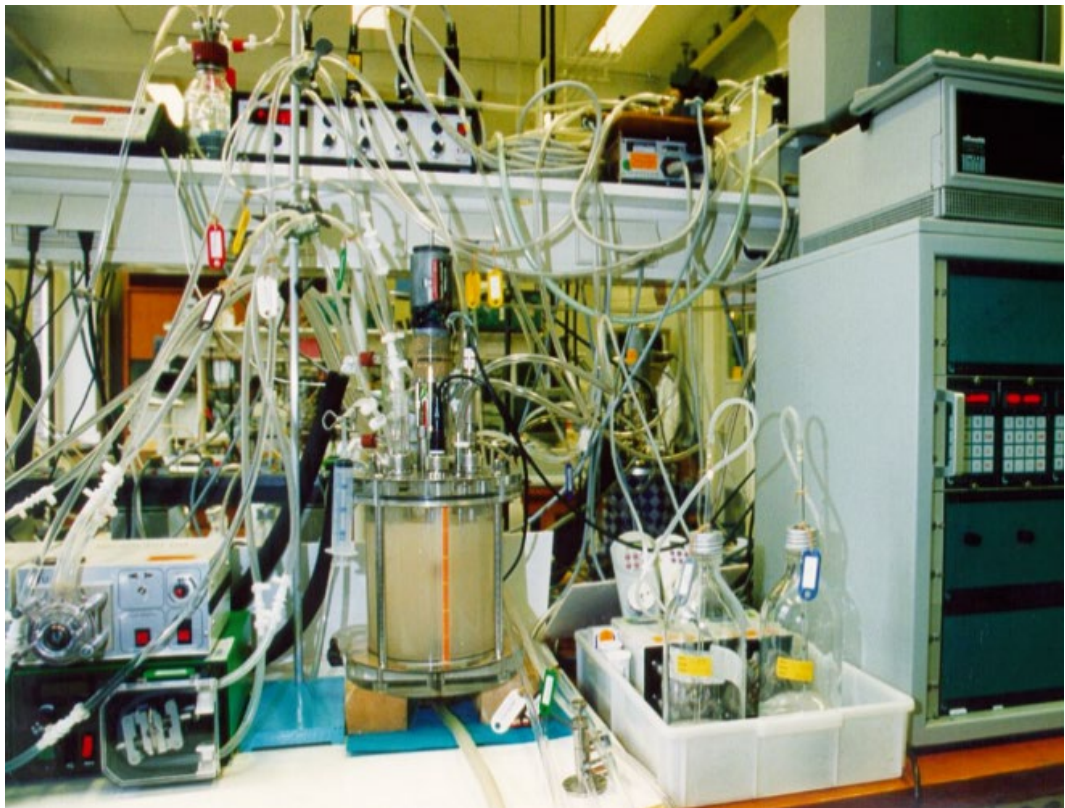
Osim apsorpcije VFA, anaerobna hidroliza poli-P i glikogena također osigurava energiju koju PAO trebaju da zadovolje svoje potrebe anaerobnog održanja bez apsorpcije ugljika. Slijedom toga, hidroliza poli-P dovodi do ispuštanja ortofosfata (PO_4) u tekući dio suspenzije što se odražava u povećanju koncentracije ortofosfata tijekom anaerobne faze (slika 2.1). Osim apsorpcije VFA prisutnih u influentu otpadne vode u sustavu aktivnog mulja, PAO mogu pohraniti i VFA koje proizvode organizmi koji provode fermentaciju u anaerobnoj fazi iz organskih tvari prisutnih u influentu. Jednom kada PAO dospiju u aerobnu fazu, iskorištavaju PHA pohranjene u anaerobnoj fazi kao izvor ugljika i energije koristeći kisik kao akceptor elektrona. Energija iz ove reakcije se koristi za apsorpciju i pohranjivanje veće količine PO_4 od količine prethodno ispuštene u anaerobnoj fazi (slika 2.1). To dovodi do aerobne apsorpcije i uklanjanja fosfora iz tekuće faze. U aerobnoj fazi, PHA se koriste i za: (i) obnovu unutarstanične zalihe glikogena, (ii) rast biomase te (iii) zadovoljavanje energetske potrebe PAO za aerobni metabolizam (Smolders i sur., 1994b). Neto uklanjanje P iz otpadne vode postiže se izdvajanjem viška aktivnog mulja (WAS) na kraju aerobne faze, kada mulj sadrži visok sadržaj poli-P (slika 2.1). Alternativno, postoje denitrificirajući organizmi koji akumuliraju fosfor (DPAO) koji također mogu absorbirati PO_4 u anoksičnim uvjetima koristeći nitrat ili nitrit kao akceptore elektrona (Vlekke i sur., 1988; Kuba i sur., 1993; Hu i sur., 2002; Kerr-Jespersen i sur., 1993; Guisasola i sur., 2009). Isto tako, PAO, budući da su heterotrofni organizmi, mogu absorbirati izvore ugljika u aerobnim uvjetima, otpuštajući ortofosfat dok je izvor ugljika dostupan i kasnije uklanjajući PO_4 (Guisasola i sur., 2004; Ahn i sur., 2007). Međutim, PAO na kraju mogu biti anulirani od OHO zbog njihove metaboličke prilagodbe na trajne aerobne uvjete

(Pijuan i sur., 2006). Radi boljeg razumijevanja metabolizma i faktora koji djeluju na proces EBPR, čitatelja se upućuje na drugdje objavljene materijale (Comeau i sur., 1986; Mino i sur., 1998; Oehmen i sur., 2007). U sustavu EBPR u određenim je uvjetima (npr. kad je acetat ili propionat prisutan kao jedini izvor ugljika, temperatura iznad 20 °C, pH niži od 7,0, i/ili pri koncentracijama otopljenog kisika (DO) iznad 2 mg L⁻¹) zapažena proliferacija organizama koji akumuliraju glikogen (GAO) (Oehmen i sur., 2007; Lopez-Vazquez i sur., 2009a,b; Carvalheira i sur., 2014). GAO imaju metabolizam prividno sličan metabolizmu PAO, ali oslanjaju se isključivo na svoje unutarstanično pohranjene zalihe glikogena kao izvor energije i reducirajuće ekvivalente koji pokreću anaerobno pohranjivanje VFA kao PHA bez ikakvog doprinosa od poli-P (slika 2.2). Njihova se prisutnost često povezuje s uspjehom EBPR manjim od optimalnog, budući da ne pridonose uklanjanju fosfora, već se nadmeću s PAO za supstrat u anaerobnim uvjetima, što dovodi do slabije učinkovitosti sustava EBPR (Saunders i sur., 2003; Thomas i sur., 2003). Stoga se za GAO pretpostavlja da su neželjena populacija u sustavima EBPR.

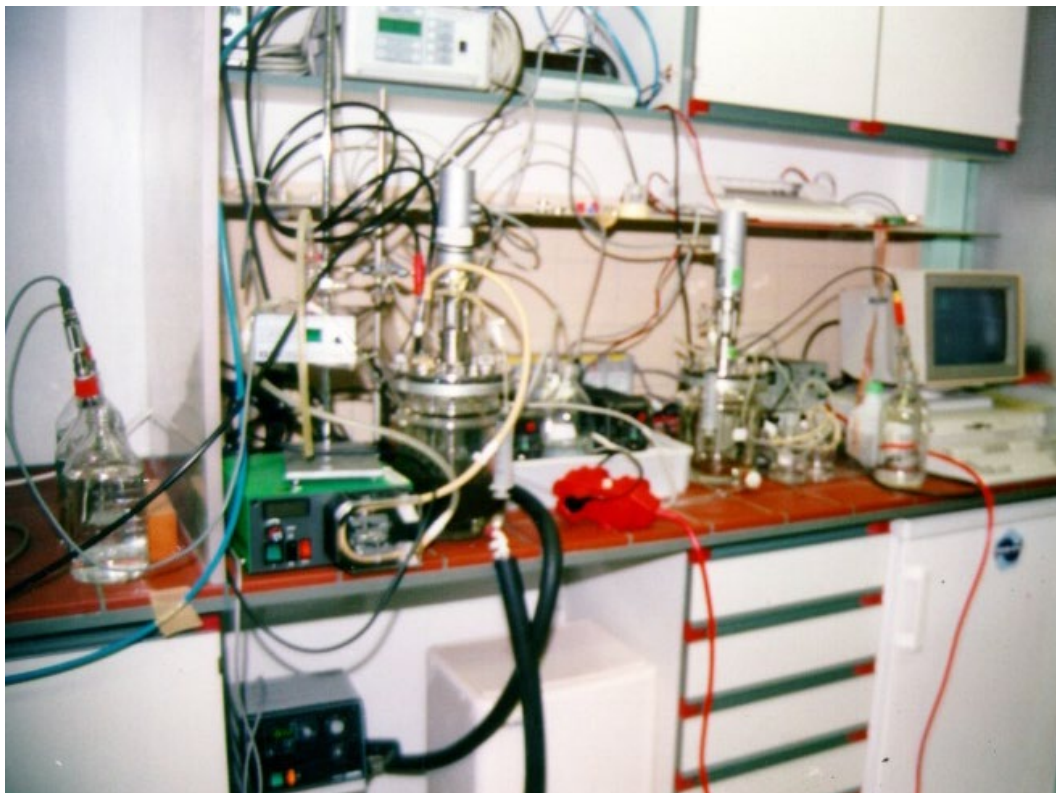
2.2 Eksperimentalna struktura

2.2.1 Reaktori

U svrhu ocjene uspješnosti procesa EBPR, šaržni testovi aktivnosti mogu se provesti u anaerobnim, aerobnim i anoksičnim uvjetima ovisno o parametrima od interesa i prirodi istraživanja. U svakom slučaju, bioreaktori korišteni za izvođenje testova moraju: (i) onemogućavati prodor kisika u anaerobnim i anoksičnim uvjetima, (ii) osigurati dovoljan kapacitet aeracije za održavanje koncentracija otopljenog kisika viših od 2 mg L⁻¹ u aerobnim uvjetima, (iii) osigurati uvjete potpunog miješanja, (iv) omogućiti kontrolu temperature, (v) omogućiti kontrolu pH te (vi) imati otvore za prikupljanje uzoraka i dodavanje influenta, otopina, plinova i svih drugih tekućih medija ili supstrata korištenog u testu (slike 2.4 i 2.5).



Slika 2.3 Starinska eksperimentalna struktura EBPR s karakterističnom žučkastom bojom biomase jako obogaćene organizmima koji akumuliraju fosfate korištena na Tehničkom sveučilištu u Delftu početkom 90-ih godina 20. stoljeća za razvoj metaboličkog modela TUDelft bio-P (Smolders i sur., 1994a, 1994b; Murnleitner i sur., 1997) i pionirsko istraživanje utjecaja temperature na EBPR (Brdjanovic i sur., 1998a) (fotografija: Brdjanovic, 1994).



Slika 2.4 Privremena eksperimentalna struktura korištena za izvođenje šaržnih testova s aktivnim muljem u uređaju za obradu otpadnih voda Haarlem Waarderpolder u Nizozemskoj. To je bilo prvo istraživanje (Brdjanovic i sur., 2000) u kojemu je provedena zasebna validacija metaboličkog modela TUDelft bio-P pomoću različitih šaržnih testova s biomasom miješanih kultura iz gradskih uređaja (fotografija: Brdjanovic, 1997).

Anaerobni uvjeti

Eksperimentalna struktura korištena za testove šaržne aktivnosti kod EBPR mora biti u mogućnosti stvoriti i održati stroge anaerobne uvjete. To znači da biomasi za vrijeme anaerobne faze ne smiju biti dostupni akceptori elektrona (tj. kisik, nitrat ili nitrit).

Redoks sonda se može koristiti za praćenje stvaranja anaerobnih uvjeta kad su redoks vrijednosti manje od -300 mV. Laboratorijska oprema treba biti zrakonepropusna i opremljena izlazom za plinove spojenim na poklopac bioreaktora. Obično postoje tri neželjena izvora kisika: (i) kisik otopljen u influentu, (ii) preostali kisik prisutan u samom aktivnom mulju te (iii) prodor kisika iz plinske faze iznad suspenzije u bioreaktoru. Kako bi se uklonila prva dva navedena izvora kisika, plinovitim N_2 otpliniti kisik uz miješanje tekuće faze upuhivanjem na dno bioreaktora u trajanju od 5 do 10 minuta prije početka testa te za vrijeme dodavanja influenta. Trajanje otplinjavanja će ovisiti o svojstvima masenog prijenosa na dodirnoj površini plina i tekućine, što ovisi o nizu faktora uključujući: dimenzije bioreaktora, prisutnost i lokacija pregrada, dimenzije i brzina okretanja lopatica za miješanje, konfiguracija difuzora i brzina protoka plina, te sastav medija. Kako bi se izbjegao prodor kisika u tekuću fazu, plinska faza u bioreaktoru se može zamijeniti ili plinom N_2 već raspršenim na dnu bioreaktora u aktivni mulj ili otplinjavanjem plinske faze bioreaktora u trajanju od 5 do 10 minuta, ovisno o zapremini plinske faze i brzini protoka plina. Brzina protoka plina N_2 od oko 30 L h^{-1} se obično koristi u laboratorijskim fermentatorima radnog volumena do 3 L, dok se manja brzina protoka od oko 6 L h^{-1} preporučuje za šaržne reaktore radnog volumena od oko 0,5-1,0 L. Upuhivanje N_2 s dna bioreaktora je uobičajena praksa i može se koristiti prije, na početku i za vrijeme izvođenja testova aktivnosti, dok se uklanjanje kisika iz plinske faze bioreaktora često koristi za vrijeme izvođenja testa kako bi se izbjegao prodor kisika iz atmosfere prilikom miješanja aktivnog mulja. Kombiniranje ta dva pristupa je i neuobičajeno i nepotrebno.

Kako bi se izbjegla difuzija kisika u bioreaktor, na liniju za izlazne plinove treba spojiti jednosmjerni povratni ventil ili sifon (koji sadrži određenu tvar za vezanje kisika, kao što je NaSO_2). Alternativno, ako se u bioreaktor kontinuirano propušta plinoviti N_2 , što rezultira pozitivnim tlakom unutar bioreaktora i kontinuiranim protokom izlaznog plina, tada povratni ventil ili sifon nisu neophodni za osiguravanje anaerobnih uvjeta. Ako plinoviti N_2 nije dostupan ili se ne može kontinuirano dobavljati zbog ograničenja opreme, aktivni mulj treba nježno ali ujedno potpuno miješati nižom brzinom (puno nižom od 300 rpm) u zrakonepropusnim uvjetima sve dok koncentracija otopljenog kisika ne padne ispod granice detekcije (praktički nula), a redoks vrijednosti budu niže od -300 mV. Uz to, volumen plina iznad tekuće faze treba smanjiti kako bi se minimizirao rizik prodora kisika punjenjem bioreaktora do maksimalnog radnog volumena i/ili smanjivanjem dodirne površine plin-tekućina dodavanjem nereaktivne, plutajuće poliuretanske pjene ili kuglica spužve. Za stvaranje zrakonepropusnih uvjeta obično se, među ostalim materijalima, koriste silikonski gumeni zaustavljivači i čepovi te plastična i aluminijska folija.

Pored izbjegavanja prodora kisika, mora se spriječiti i prisutnost i dostupnost ostalih akceptora elektrona (poput nitrata ili nitrita) kako bi se zadržali strogi anaerobni uvjeti tijekom čitavog testa. Njihovo sprečavanje nije tako jednostavno kao uklanjanje kisika. To često zahtijeva odgovarajuće postupanje s uzorkom aktivnog mulja prije izvođenja testa. To može uključivati kontrolirano dodavanje nitrificirajućih inhibitora u ne-aeriranim i aeriranim uvjetima, ili 'pranje' mulja, što je objašnjeno kasnije u dijelu 2.3.5.

Anoksični uvjeti

Stvaranje strogih anaerobnih uvjeta znači da unutar bioreaktora ne smiju biti prisutni akceptori elektrona. Stvaranje anoksičnih uvjeta ukazuje na to da premda ne mora biti prisutan otopljeni kisik, ostali akceptori elektrona, kao što su nitrit ili nitrat, moraju biti dostupni. To također znači da se stvaranjem anoksičnih uvjeta mora smanjiti ili eliminirati prodor kisika kao što se radi za anaerobne faze. Eksperimentalna struktura treba omogućiti (kontroliranu) dostupnost (prisutnost) akceptora elektrona od interesa. Željeni akceptori elektrona mogu se proizvesti bilo u samom sustavu, pomoću prethodne nitrifikacije, ili se mogu dodati izvana kao otopine nitrata – ili nitrita – u definiranim koncentracijama na početku šaržnog testa ili za vrijeme testa. Ako su mjerenja DO i redoks potencijala dostupna, koncentracije DO ispod granice detekcije zajedno s redoks vrijednostima između -200 i 0 mV mogu ukazivati na to da su postignuti potrebni anoksični uvjeti. Ovo potonje je obično najčešća praksa jer se eksperimentalna konfiguracija na taj način može pojednostaviti, a i bolja je kontrola potrebnog trajanja i koncentracije doziranja. Ipak, može se napraviti kombinacija nekoliko reaktora i eksperimentalnih faza kako bi se između anaerobne i anoksične faze ugradila nitrifikacija kako bi se osigurali potrebni akceptori elektrona koji će pokrenuti anoksični metabolizam kultura EBPR (Kuba i sur., 1993). Kad se izvana dodaju donori elektrona, sustav mora imati odgovarajući otvor za doziranje i put za ispuštanje viška pritiska nastalog injektiranjem tekućeg volumena.

Aerobni uvjeti

Kod većine komercijalno dostupnih bioreaktora difuzori za raspršivanje plina su obično smješteni na dnu bioreaktora, odmah ispod lopatica mješalice. Pri dobavi komprimiranog zraka (npr. bilo iz centralnog ili lokalnog/prijenosnog kompresora zraka), takvo uređenje može osigurati zadovoljavajuću dobavu kisika što će dovesti do koncentracija DO koje uvelike premašuju ograničavajuće uvjete mikrobni procesa. U pravilu, koncentracije DO od najmanje 2 mg L^{-1} se smatraju prikladnima za većinu primjena. Za šaržne reaktore radnog volumena od oko 3 L, brzina protoka komprimiranog zraka od oko 60 L h^{-1} (1 L min^{-1}) obično može osigurati potrebnu aeraciju. Međutim, sastav i koncentracija biomase, karakteristike otpadne vode, sadržaj organske tvari i unutarstaničnog PHA (u slučaju EBPR) mogu povećati potrebu za DO. U takvim uvjetima, brzinu protoka zraka treba povećati kako bi se tijekom čitavog testa koncentracija DO održala iznad 2 mg L^{-1} . Alternativno, umjesto komprimiranog zraka može se koristiti dobava čistog kisika kako bi se povećala dostupnost DO u specifičnim uvjetima (npr. u industrijskim primjenama).

U naprednijim primjenama, može biti potrebno ili poželjno izvesti aerobne testove šaržne aktivnosti pri konstantnoj (određenoj) koncentraciji otopljenog kisika. Kod takve primjene, može se koristiti dvosmjerna kontrola DO da se definira zadana vrijednost DO i održi ga se stabilnim tijekom čitavog aerobnog šaržnog testa. Većina naprednih bioreaktora je opremljena takvom dvosmjernom kontrolom kojom upravljaju najmanje dva solenoida s funkcijom uključivanja/isključivanja čime se naizmjenično dobavlja zrak ili plinoviti N_2 , ovisno o stvarno izmjerenom otopljenom kisiku u tekućoj fazi.

Manje napredni bioreaktori korišteni za izvođenje aerobnih šaržnih testova aktivnosti mogu biti opremljeni prijenosnim kompresorom zraka koji osigurava odgovarajuću brzinu protoka zraka. Na dno bioreaktora u liniji sa sustavom miješanja mogu se postaviti kamenčići za akvarij radi distribucije mjehurića u svrhu dobrog prijenosa kisika. Kao što je ranije spomenuto, dobavljeni zrak bi trebao moći proizvesti i održati koncentraciju DO u tekućoj fazi od najmanje 2 mg L⁻¹ u prvih 10 minuta.

Dvije najčešće komercijalno dostupne sonde za DO su one membranskog i optičkog tipa. Prije korištenja (a poželjno je i nakon korištenja), sonde treba kalibrirati u skladu s uputama proizvođača ili dobavljača. Uz to, treba provjeriti sve spojeve. U slučaju sonde za DO membranskog tipa, membrana treba biti čista, ne smije biti oštećena, a sondu treba dobro napuniti svježim elektrolitima. Nadalje, na površini membrane ne smiju se nakupljati ili uhvatiti mjehurići. I površinu optičkih sondi treba povremeno čistiti, a membranu treba mijenjati svake godine.

Miješanje

Sadržaj bioreaktora treba snažno miješati radi homogene distribucije aktivnog mulja (mješavina tekuće faze i biomase) i otpadne vode kao i drugih tvari (npr. otopina ortofosfata, nitrata ili nitrita). Obično se u većini bioreaktora od 3 L može koristiti brzina miješanja do 500 rpm, dok se niže brzine miješanja od oko 100 rpm koriste u većim bioreaktorima (od 10 L i veći). Pretjerano miješanje može dovesti do pucanja flokule, čime se smanjuje otpor pri prijenosu mase kroz flokule i svojstva taloženja. S druge strane, nedovoljno miješanje može dovesti do mrtvih zona, velikih flokula, raslojavanja mulja, ograničene difuzije supstrata i kisika te, u ekstremnim slučajevima, taloženja. Niže brzine miješanja mogu se koristiti sve dok je suspenzija dobro izmiješana i dok nije opažena niti raslojavanje niti akumuliranje krutina. Napredni bioreaktori mogu imati automatsku kontrolu za vremensko reguliranje brzine miješanja pomoću vertikalne osi s lopatičastim propelerima. Nadalje, korištenjem i ugradnjom vertikalnih lopatica ili pregrada spojenih na unutarnju stranu poklopca fermentatora ili odabirom učinkovitijeg radnog kola mogu se dodatno poboljšati uvjeti miješanja. U manje sofisticiranim sustavima, miješanje se može osigurati postavljanjem bioreaktora na elektromagnetnu mješalicu. Kako je ranije spomenuto, kako bi se smanjio potencijalni prodor kisika u anaerobnim šaržnim testovima, brzina miješanja se može smanjivati sve dok ne ugrozi dobre uvjete miješanja.

Kontrola temperature

Temperatura ima snažan učinak na metabolizam PAO i njihove konkurente (npr. GAO) (Brdjanovic i sur., 1997; Lopez-Vazquez i sur., 2009a,b). Stoga su prikladni i stabilni uvjeti kontrolirane temperature preporučljivi za izvođenje šaržnih testova aktivnosti. Napredni bioreaktori su obično opremljeni dvostrukim staklenim stjenkama (reaktori s dvostrukom stjenkom), a voda (temperature slične ciljanoj temperaturi u bioreaktoru) obično recirkulira kroz dvostruku stjenku. Temperatura vode se prilagođava na kontrolno-operativnoj konzoli bioreaktora (kroz interne grijače, izmjenjivače topline i kondenzatore) ili pomoću vanjskih grijaćih obloga ili vodene kupelji i uređaja za recirkulaciju. Ovisno o željenoj radnoj temperaturi, mogu se preporučiti druge tekućine osim vode (npr. otopine protiv smrzavanja za temperature niže od 5 °C ili ulja za temperature više od 30 °C). Napredni sustavi mogu automatski mjeriti temperaturu vode u suspenziji unutar bioreaktora i prilagoditi je kako bi se održala stabilna temperatura. Međutim, važno je imati na umu da se temperatura tekućine za hlađenje/grijanje često razlikuje (za nekoliko stupnjeva celzijusa) od stvarne temperature izmjerene u aktivnom mulju. Do tih razlika dolazi zbog učinkovitosti razmjene topline i razmjene topline između recirkulirane tekućine i zraka tijekom njegovog transporta od kontrolne jedinice do fermentatora, naročito kad se radna temperatura znatno razlikuje od ambijentne (sobne) temperature. U takvim uvjetima, preporučuje se da se temperatura tekućine u kontrolnoj jedinici prilagođava sve dok se ne postigne i ostane stabilna ciljana temperatura u tekućoj fazi.

Pored kontrole individualne temperature koju fermentator može imati, čitava eksperimentalna struktura može biti smještena unutar prostorije s kontroliranom temperaturom postavljenom na ciljanoj temperaturi. Ipak, ako temperatura nije problem i šaržni se testovi mogu provesti na sobnoj ili ambijentnoj temperaturi na definiranoj lokaciji, trebala bi postojati sigurnost da temperature neće značajnije fluktuirati (manje od ± 1-2 °C) od pripreme do završetka testa. U svakom slučaju, temperatura izvođenja uvijek mora biti zabilježena i prijavljena.

Zadnje ali ne manje važno, bitno je spomenuti da i aktivni mulj i otpadna voda ili sintetičan medij istraživanja (kad god je primjenjivo) moraju imati istu temperaturu prije izvođenja testova aktivnosti kako bi se izbjegli temperaturni šokovi i fluktuacije koje mogu ugroziti ishode testova. U takvim okolnostima,

sav aktivni mulj, otpadna voda i otopine moraju biti izloženi radnoj temperaturi, a njihovu stvarnu temperaturu treba pratiti dok ne postignu ciljanu temperaturu. Prilagodbu temperature aktivnog mulja treba provesti bez prisutnosti donora elektrona (odnosno bez vanjskog izvora ugljika). Obično je potrebna tek kratka izloženost biomase željenoj temperaturi od najviše 1 do 2 sata. Kad je to potrebno, uzorci se mogu i aklimatizirati duže vrijeme (do 3-4 h) dok se ne postigne ciljana temperatura, ali posebnu pažnju treba posvetiti tome da se izbjegne ugrožavanje metaboličke aktivnosti PAO (npr. što bi dovelo do potrošnje unutarstaničnih spojeva). Ako je temperaturna razlika između aktivnog mulja i supstratnog medija ili otpadne vode visoka ili ako su temperaturni učinci od interesa (npr. viši od 5 °C kako bi se ocijenio potencijalni temperaturni šok), testovi se moraju provesti čim se postigne ciljana temperatura.

Obično se većina testova provodi pri temperaturi od oko 20 °C, no može iznositi i svega 5 °C (kako bi se ocijenila aktivnost biomase u zimskim/hladnim klimatskim uvjetima) (Brdjanovic i sur., 1997) ili čak 30 - 35 °C za tropske uvjete ili industrijske primjene (Cao i sur., 2009; Ong i sur., 2014), a čak i do 55 °C za termofilne uvjete (Lopez-Vazquez i sur., 2014). Testovi se rijetko provode pri temperaturi nižoj od 5 °C budući da je u praksi temperatura komunalne otpadne vode rijetko hladnija i obično se kreće oko 7 - 12 °C.

Kontrola pH

pH je važan operativni parametar za process EBPR (i mnoge druge procese). Tome je naročito tako jer će metabolizam PAO tijekom anaerobne apsorbicije ugljika (VFA) rezulirati većim razinama otpuštanja P pri višem pH, odnosno manjim otpuštanjem P pri nižem pH (Smolders i sur., 1994a). Isto tako, miješanjem i snažnim raspršivanjem plinovitog N₂ ili komprimiranog zraka, otopljeni se CO₂ može ukloniti iz otopine i povećati pH na više od 7,0 (npr. u rasponu 7,8-8,5), što djeluje na niz bioloških i fizikalnih procesa.

S druge strane, biološkim uklanjanjem sastavnica, kao što je fosfat pomoću PAO, smanjuje se puferski kapacitet tekućine i mijenja pH za vrijeme eksperimenta. Alkalitet otpadne vode ili drugih dodanih otapala može povećati puferski kapacitet suspenzije u bioreaktoru i smanjiti fluktuacije. Raspršivanjem CO₂ može se nadoknaditi CO₂ koji se ukloni kad se miješa ili propuhuje komprimirani zrak ili N₂. Prema tome, slično kao i temperatura, pH mora biti stabilan prije, za vrijeme i do kraja šaržnog testa EBPR.

Pod određenim okolnostima, različite vrijednosti pH mogu se koristiti tijekom različitih eksperimentalnih faza (npr. pH od 7,5 u anaerobnim uvjetima, nakon čega slijedi pH od 7,0 u aerobnoj fazi). Kao prihvatljiv raspon fluktuacije pH pretpostavlja se $\pm 0,1$. S tim u vezi, preporučuje se korištenje dvosmjernog kontrolora pH (za dodavanje kiseline, kao što je HCl, odnosno za dodavanje baze, kao što je NaOH).

Napredni bioreaktorski sustavi obično imaju kontrolne postavke pH, no mogu se koristiti i jednostavniji ali pouzdani vanjski kontrolori pH. U manje naprednim sustavima, razine pH se mogu kontrolirati ručnim dodavanjem kisele i bazne otopine. Uobičajeni molaritet kiselih i baznih otopina za kontrolu pH je obično od 0,2 do 0,4 M. Ako se koristi ručna kontrola pH, koncentracije mogu biti niže (npr. 0,1 M). Ovisno o aktivnosti mulja, mogu se koristiti različiti molariteti. Ako je molaritet otopina previsok, to može dovesti do iznenadnih promjena pH, pri čemu vrijednosti pH mogu drastično pasti ili porasti oko zadane vrijednosti, prekoračiti donju ili gornju granicu kontrolnih postavki pH i čak oscilirati ispod i iznad zadane vrijednosti pH. Niži molariteti mogu dovesti do spore reakcije na prilagodbu pH željenoj kontrolnoj točki pH, što se u ekstremnim slučajevima može ne postignuti, čime se znatno razrjeđuje aktivni mulj u bioreaktoru.

Zbog brze početne brzine mikrobnih konverzija, potencijalna potrošnja kiseline ili baze će biti veća na početku testova ili kad se prelazi iz jedne faze u drugu (npr. iz anaerobne u aerobnu), no obično će se stabilizirati do kraja testa. U svakom slučaju, znatno odstupanje od zadane vrijednosti pH (npr. za više od $\pm 0,10$) se mora ispraviti, po mogućnosti unutar 5-10 sec. Uvijek treba prijaviti stvarni pH izmjeren u tekućoj fazi za vrijeme eksperimenta.

Određeni kontrolni mehanizmi održavanja pH imaju specifične postavke koje treba prilagoditi kako bi se održao stabilan pH, poput volumena kiseline i baze pri jednom dodavanju i vremena reakcije između dva dodavanja kiseline i baze. Vrijeme između dodavanja kiseline i baze treba prilagoditi vremenu koje je potrebno sustavu da dobije homogenu pomiješanu uvjete nakon dodavanja kiseline ili baze.

Slično temperaturi, ako će se istraživati pH šokovi, šaržni testovi aktivnosti EBPR moraju započeti čim pH aktivnog mulja dosegne ciljani pH istraživanja. Svaku potrebnu prilagodbu pH mora se po mogućnosti izvršiti u manje od 5 minuta prije početka testa kako bi se izbjegli preuranjeni učinci ili nuspojave na metabolizam PAO (što npr. dovodi do određenog otpuštanja P ili potrošnje unutarstaničnih polimera). Mora se izbjegavati korištenje sumporne kiseline te alkalnih, fosfatnih pufer otopina i otopina tris(hidroksimetil)aminometana. Tome je većinom tako jer oni mogu dovesti do interferencija kao što je davanje prednosti bakterijama koje reduciraju sulfate (SRB) pred PAO (Saad i sur., 2013, Rubio-Rincon i sur., 2016), taloženje P pomoću karbonata (kemijska precipitacija P) (Barat i sur., 2008) ili povećavanje razina saliniteta iznad onih koje PAO mogu podnijeti (Welles i sur., 2014). Nije potrebno reći da je kvalitetna kontrola pH neophodna za uspjeh eksperimenata budući da će čak i vrlo kratka izloženost biomase ekstremnoj pH vrijednosti (niska ili visoka) prilično sigurno nepovratno djelovati na biomasu.

Sve mjerače i senzore pH treba odmah kalibrirati (i poželjno naknadno provjeriti) u skladu s uputama proizvođača ili dobavljača i treba provjeriti sve spojeve. Posebnu pažnju treba posvetiti odabiru i korištenju senzora pH koji mogu izdržati posebne karakteristike istraživane otpadne vode i mulja iz EBPR. Na primjer, visok salinitet, visoke koncentracije klorida ili H₂S mogu dovesti do interferencija ako senzori pH ne mogu podnijeti više koncentracije. Čitatelj treba uvijek provjeriti u priručnicima, knjižicama i/ili s dobavljačima jesu li senzori i mjerači pH koji će se koristiti prikladni za određene karakteristike otpadne vode koja će se testirati.

Otvori za uzorkovanje i doziranje

Bioreaktori korišteni za izvođenje testova šaržne aktivnosti trebali bi imati i prikladno smještene otvore za uzorkovanje i doziranje kako bi se osiguralo prikupljanje reprezentativnih uzoraka iz tekuće faze kao i pogodovalo brzom disperziji ili miješanju bilo koje tvari ili otopine dodane u suspenziju. Otvori za uzorkovanje se mogu sastojati od fleksibilnih (gumenih ili plastičnih) cijevi s unutarnjim promjerom koji omogućuje spajanje različitih štrcaljki volumena 5, 10 ili 20 mL, ali i manjeg ili većeg volumena (npr. od 1 ili čak 50 mL). Otvor za uzorkovanje unutar bioreaktora mora dosegnuti pogodnu dubinu i mjesto koje će omogućiti zadovoljavajuće uzorkovanje prije, za vrijeme i na kraju testa. Otvor za uzorkovanje obično može biti smješten na srednjoj razini najniže trećine ili četvrtine radnog volumena bioreaktora, pod uvjetom da su osigurani dobri uvjeti miješanja. Najvažniji zahtjev je dobiti reprezentativni uzorak iz bioreaktora s dobrim miješanjem.

Po pitanju otvora za doziranje, oni moraju biti smješteni i postavljeni tako da omogućuju brzu disperziju otopina ili tvari dodanih u bioreaktor. To mogu biti dobro definirani otvori za injektiranje smješteni na poklopcu bioreaktora ili fleksibilni otvori (npr. kroz gumenu dijafragmu). Formalna i strukturirana lokacija i integracija otvora za uzorkovanje na bioreaktoru većinom je potrebna kad se radi sa zrakonepropusnim bioreaktorima kako bi se izbjegao prodor kisika. Povrh toga, preporučuje se korištenje laboratorijskih štipaljki (ili sličnih naprava) kako bi se zatvorile cijevi otvora za uzorkovanje ili privremeno nekorišteni otvori za doziranje i izbjegla izlijevanja i pljuskanja uzrokovana mogućim porastom unutarnjeg pritiska u bioreaktoru. Kako bi se regulirao neželjeni nastanak podtlaka ili nadtlaka, može se umetnuti igla kroz gumenu dijafragmu na poklopcu bioreaktora, Tedlar[®] vrećica (ili sličan fleksibilni spremnik napunjen inertnim plinom - npr. dušikom) može se spojiti na iglu kako bi se plinovita faza iznad suspenzije u bioreaktoru povezala s inertnim plinom.

2.2.2 Uzimanje uzoraka aktivnog mulja

Suprotno nekim procesima obrade otpadne vode, vrijeme uzorkovanja i lokacija uzorka aktivnog mulja iz EBPR snažno ovise o vrsti šaržnog testa aktivnosti koji će se provesti. Ovo potonje se temelji na izmjeničnim anaerobno-(anoksično)-aerobnim uvjetima koje zahtijeva fiziologija PAO. Prema tome, po mogućnosti bi trebalo uzeti svježi uzorak na kraju prethodne reakcijske faze. Pri tome, za anaerobni šaržni test, uzorak aktivnog mulja treba uzeti na kraju aerobne faze kod gradskih uređaja za obradu otpadnih voda ili pokusnom uređaju za obradu otpadne vode ili 'matičnom' laboratorijskom bioreaktoru, dok se, za aerobni šaržni test, uzorak može uzeti na kraju anaerobne ili anoksične faze ovisno o konfiguraciji sustava. Za izvođenje anoksičnih testova, mulj se može uzorkovati na kraju anaerobne faze. Alternativno, uzorci sakupljeni u aerobnoj fazi mogu se koristiti za izvođenje sekvencijskih anaerobno-aerobnih, anaerobno-anoksičnih ili anaerobno-anoksično-aerobnih šaržnih testova.

Mjesto uzorkovanja će nesumnjivo ovisiti o konfiguraciji sustava. Kod gradskih uređaja za obradu otpadnih voda i pokusnih uređaja za obradu otpadne vode, fizičke granice između faza moraju biti

definirane prije uzorkovanja. U ekstremnim slučajevima, gdje faze nisu (fizički) dobro definirane, treba odrediti redoks granice pomoću mjerača DO, mjerača redoksa i/ili određivanjem koncentracije nitrata i nitrita. U laboratorijskim sustavima (koji obično rade ovisno o vremenskom ciklusu), sakupljanje uzoraka može biti relativno lakše, budući da vrijeme reakcije određuje dužinu faza. Kako bi se dobili homogeni i reprezentativni uzorci, uzorci mulja moraju se prikupljati na točkama uzorkovanja gdje postoje dobri uvjeti miješanja. U idealnom slučaju, testovi šaržne aktivnosti moraju se provesti čim je prije moguće nakon uzorkovanja (u manje od 1-2 sata za testove koji će se provoditi s muljem prikupljenim na kraju aeracijskog bazena/faze ili u nekoliko minuta (2-3 min) za mulj prikupljen na kraju anaerobne ili anoksične faze). U laboratorijskim sustavima, to, u pravilu, ne bi trebao biti problem ako se šaržni testovi aktivnosti provode u istom laboratoriju i njihovo izvođenje se koordinira i sinkronizira s radnim ciklusom laboratorijskog bioreaktora. Isto tako, u gradskim uređajima za obradu otpadne vode i pokusnim uređajima za obradu otpadne vode, testovi šaržne aktivnosti mogu se provoditi *in situ* nedugo nakon uzorkovanja aktivnog mulja ako je laboratorij uređaja za obradu otpadne vode opremljen potrebnom eksperimentalnom i analitičkom opremom (slika 2.4).

Ako se testovi šaržne aktivnosti ne mogu provesti *in situ* istoga dana, uzorak aktivnog mulja može se uzeti na kraju aerobne faze. Nakon toga, uzorak se mora propisno uskladištiti i transportirati u hladnjaku ispod ili blizu 4 °C u neaeriranim uvjetima, a testove aktivnosti treba provesti najkasnije 24 h nakon uzorkovanja. Uzimanje uzoraka na kraju aerobne faze i skladištenje u ne-aeriranim uvjetima pri nižoj temperaturi može pomoći očuvati originalno stanje biomase usporavanjem metabolizma mikroorganizama. Stoga se u načelu preporučuje da se uzorci aktivnog mulja ne aeriraju budući da to može dovesti do otpuštanja P i oksidacije unutarstaničnih spojeva (kao što su PHA, glikogen i čak poli-P). To također sugerira da biomasu prisutnu u uzorku aktivnog mulja prije provođenja šaržnih testova aktivnosti treba 'reaktivirati' i aklimatizirati pri ciljanoj pH i temperaturi. U svakom slučaju, preferirano je *in situ* izvođenje testova šaržne aktivnosti. Ukupna količina aktivnog mulja koju treba sakupiti ovisi o broju testova, volumenu bioreaktora i ukupnom volumenu uzoraka koje treba sakupiti kako bi se procijenila aktivnost biomase. Često se iz gradskih uređaja za obradu otpadnih voda može prikupiti 10-20 L aktivnog mulja. S druge strane, uzorci prikupljeni iz laboratorijskih reaktora rijetko sadrže više od 1 L zato što su laboratorijski sustavi obično manji (od 0,5 do 2,2 L, a u određenim slučajevima do 8-10 L) i najveća količina koja se može povući iz laboratorijskih reaktora je često određena dnevnim izvlačenjem viška mulja iz sustava (što je izravno povezano sa starošću mulja (engl. *sludge retention time*, SRT) i, slijedom toga, određeno brzinom rasta organizama).

2.2.3 Priprema uzoraka aktivnog mulja

Za šaržne testove aktivnosti koji se provode *in situ*, mulj će se u pravilu tek prebaciti iz matičnog bioreaktora (u slučaju mulja obogaćenog u laboratoriju) ili reakcijskog bazena (u slučaju pokusnog ili gradskog uređaja) do bioreaktora gdje će se odvijati testovi aktivnosti. Obično do prebacivanja mulja mora doći prije kraja reakcijske faze koja prethodi reakcijskoj fazi od interesa. Onda šaržni test aktivnosti može krenuti čim se prilagode željeni pH, redoks uvjeti i temperatura. Za vrijeme prilagodbe do početka testa, treba održavati uvjete iste ili slične onima koji su prevladavali kad su prikupljeni uzorci mulja. To znači da uzorke mulja prikupljene na kraju anaerobne faze treba čuvati u anaerobnim uvjetima, što znači da ih se ne smije aerirati ili izlagati oksidacijskim sredstvima. Slično tome, uzorci prikupljeni u aerobnoj fazi moraju biti aerirani, a uzorci mulja prikupljeni u anoksičnoj fazi ne smiju biti aerirani. Ako se tako želi, uzorcima aktivnog mulja prikupljenima u anoksičnim bazenima može se dodati nekoliko miligrama nitrata (do konačne koncentracije od ~5 mg NO₃-N L⁻¹) kako bi se održali anoksični uvjeti onoliko dugo koliko je to potrebno.

Ako će se jedino provoditi testovi EBPR, a testovi nitrifikacije nisu od interesa, tada se inhibitor nitrifikacije može dodati uzorku mulja neposredno nakon inokulacije mulja u bioreaktor (npr. Alil-N-tiourea: ATU do konačne koncentracije od 20 mg L⁻¹). Time će se spriječiti nitrifikacija i slijedom toga (i) izbjeći veća potrošnja kisika u aerobnim šaržnim testovima EBPR i (ii) ograničiti akumuliranje nitrata (ili nitrita) ako se uzorci aeriraju prije izvođenja anaerobnih testova. Ako treba ocijeniti realne i stvarne uvjete, tada odgovarajuće šaržne testove aktivnosti treba provesti odmah nakon prikupljanja mulja uz minimalne prilagodbe i propisane stabilne uvjete (npr. za pH i temperaturu). Mora se provesti sveobuhvatna procedura uzorkovanja prije, za vrijeme i nakon testova kako bi se dokumentirali dobiveni rezultati. Međutim, uz to, uvijek se preporuča izvođenje šaržnih testova aktivnosti u povoljnim uvjetima za PAO. To može pomoći u (i) ocjeni potencijala za EBPR koji sustav može imati, (ii) uspoređivanju

aktivnosti uređaja s EBPR, (ii) otkrivanju interferencija te (iv) pridonijeti definiranju strategija poboljšanja.

Kako je drugdje opisano, interferencije za PAO mogu biti (ali nisu ograničene na) prisutnost nitrata ili nitrita u uzorcima aerobnog mulja prikupljenima za izvođenje šaržnih anaerobnih testova, postojanje RBCOD u anaerobnim uzorcima za izvođenje aerobnih ili anoksičnih testova ili otkrivanje nitrita u anoksičnim uzorcima namijenjenima za izvođenje aerobnih šaržnih testova. Prema tome, ako su testovi osmišljeni za izvođenje u uvjetima povoljnima za PAO, tada takve interferencije treba izbjegavati. Nakon toga, uzorci mogu kratko vrijeme (1 ili najviše 2 h) biti izloženi predobradi ili pripremi kao strategija za rješavanje problema. Na primjer, kako bi se uklonio nitrat prisutan u aerobnom uzorku predviđenom za anaerobni šaržni test ($\sim 5\text{-}10\text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$), mulj se nakon prikupljanja može prebaciti u zrakonepropusni šaržni bioreaktor i sporo miješati u neaeriranim uvjetima. Koncentracija nitrata (i nitrita) se može pratiti dok ne padne ispod granica detekcije. Pri tome mogu biti prilično korisne tehnike brze detekcije, poput papirnatih indikatora za detekciju nitrata i/ili nitrita (npr. Sigma-Aldrich). Kad se nitrat više ne opaža, može započeti odgovarajući anaerobni šaržni test. Ako se u uzorku uzetom iz anaerobnog bazena otkrije RBCOD, anaerobni uvjeti se mogu produžiti nakon što se mulj prebaci u zrakonepropusni bioreaktor sve dok se više ne opaža RBCOD, a prije nego što započne anoksični ili aerobni test. Anoksični uzorci za izvođenje aerobnih testova u kojima se opazi nitrat ne zahtijevaju predobradu budući da nitrat u aerobnim uvjetima nije štetan za PAO. Ipak, ako se otkrije nitrit, mora ga se ukloniti zato jer je dokazano da je prilično inhibitoran i čak toksičan za PAO u određenim aerobnim uvjetima (Pijuan i sur., 2010; Zhou i sur., 2012; Yoshida i sur., 2006; Saito i sur., 2004; Zeng i sur., 2014). Kako bi se izbjegao nitrit, može se koristiti pristup sličan onom prethodno opisanom za uklanjanje nitrata.

Kada se šaržni testovi ne mogu provesti *in situ* a uzorci mulja se čuvaju u hladnim uvjetima (na oko $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), uzorci mulja moraju biti 'reaktivirani' zato što hladna temperatura osjetno usporava metabolizam mikroorganizama. Zbog posebne fiziologije PAO, kako bi se mulj reaktivirao mora ga se aerirati 1-2 h pri pH i, naročito, temperaturi izvođenja šaržnih testova aktivnosti. Taj će postupak pomoći ukloniti preostale biorazgradive organske tvari. Ako će se izvoditi jedino testovi aktivnosti EBPR, prije aeracije treba dodati inhibitor nitrifikacije (npr. ATU pri konačnoj koncentraciji u bioreaktoru od 20 mg L^{-1}). Ako se prije razdoblja aeracije od 1-2 h otkrije potencijalna interferencija (npr. nitrat, nitrit ili RBCOD), reaktivacija mulja može započeti predobradom pri temperaturi i pH od interesa. Kasnije, čak i ako je cilj jedino ocijeniti anoksičnu ili aerobnu aktivnost PAO, testovi aktivnosti EBPR trebaju započeti fazom anaerobne inkubacije koristeći pritom sintetičku ili pravu otpadnu vodu kao supstrat. Ovakva praksa će osigurati da će PAO imati unutarstanično pohranjene PHA za svoj aerobni ili anoksični metabolizam.

Ipak, općenito, cilj eksperimentalnog plana trebao bi biti da se u najvećoj mogućoj mjeri na minimum svedu potrebe za transportom, hlađenjem, skladištenjem i reaktivacijom mulja (među ostalim potencijalnim koracima). Kad god je to moguće, najbolje je uvijek koristiti 'svježi' mulj (i supstrat/medij).

2.2.4 Supstrat

Kada se za izvođenje testova aktivnosti koristi prava otpadna voda (bilo sirova ili istaložena), može je se na relativno jednostavan način dodati u bioreaktor. Za normalne (redovne) uvjete, dodavanje se odvija na početku anaerobne faze kako bi se pogodovalo apsorpciji VFA sa strane PAO i unutarstaničnoj dostupnosti PHA. Ako se to smatra potrebnim, može se koristiti gruba filtracija (pomoću filtera s otvorima veličine $10\text{ }\mu\text{m}$) za uklanjanje preostalih čestica prisutnih u sirovoj otpadnoj vodi. Ako testove aktivnosti treba izvesti pri različitim koncentracijama biomase, obrađeni efluent iz uređaja može se prikupiti i koristiti za razrjeđivanje (pod pretpostavkom da su koncentracije krutina u efluentu relativno niske, npr. $20\text{-}30\text{ mg TSS L}^{-1}$). Ako će se istraživati različiti izvori i koncentracije ugljika ili fosfora, efluent iz uređaja se također može koristiti za pripremu polu-sintetičkog medija koji sadrži koncentraciju RBCOD između $50\text{ i }100\text{ mg COD L}^{-1}$.

Šaržni testovi aktivnosti se često provode sa sintetičkom otpadnom vodom: (i) kako bi se osigurala bolja kontrola eksperimentalnih uvjeta, (ii) kako bi se stvorili željeni redoks uvjeti, (iii) kako bi se istražili i procijenili učinci različitog sastava otpadne vode ili (iv) kako bi se ocijenili inhibitorni ili toksični učinci određenih otapala ili spojeva. Međutim, takva praksa može biti skupa zbog potencijalno velike količine potrebnih kemikalija.

Ovisno o prirodi, svrsi i slijedu testova aktivnosti (anaerobni, anoksični ili aerobni), koncentracije ugljika i fosfora prisutnih u sintetičkoj otpadnoj vodi mogu varirati, budući da su obično predmet uklanjanja i istraživanja. Povrh toga, koncentracije se mogu prilagođavati proporcionalno duljini ili trajanju testa. Obično se koncentracije do 50 i 100 mg RBCOD L⁻¹ koriste kad su uzorci aktivnog mulja dobiveni iz gradskog uređaja, a one do 400 mg L⁻¹ u slučaju kultura obogaćenih u laboratoriju (premda se ponekad koriste veće koncentracije). Vezano uz koncentracije fosfora, sintetičke otopine mogu sadržavati nikakvu ili niske koncentracije P kad se procjenjuje anaerobno otpuštanje P ili do 100-120 mg PO₄-P L⁻¹ kada se testiraju aktivnosti maksimalne aerobne apsorpcije P. Međutim, neovisno o prirodi testa aktivnosti, sintetička otpadna voda mora sadržavati potrebne makro- i mikro-elemente (naročito kalij i magnezij, ali i kalcij, željezo, cink i kobalt) u dovoljnoj količini i odgovarajuće vrste koje su potrebne za PAO kako bi se izbjeglo svako metaboličko ograničenje koje može ugroziti rezultate šaržnih testova aktivnosti (Brdjanovic i sur., 1996). Predloženi recept za sintetičku otpadnu vodu s početnom koncentracijom ortofosfata od 20 mg P L⁻¹ može po litri sadržavati (Smolders i sur., 1994a): 107 mg NH₄Cl, 90 mg MgSO₄·7H₂O, 14 mg CaCl₂·2H₂O, 36 mg KCl, 1 mg ekstrakta kvasca i 0,3 mL otopine elemenata u tragovima (koja uključuje po litri 10 g EDTA, 1,5 g FeCl₃·6H₂O, 0,15 g H₃BO₃, 0,03 g CuSO₄·5H₂O, 0,12 g MnCl₂·4H₂O, 0,06 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,12 g ZnSO₄·7H₂O, 0,18 g KI i 0,15 g CoCl₂·6H₂O). Sve u svemu, važno je naglasiti da minimalne koncentracije K i Mg moraju biti proporcionalne koncentraciji fosfora u skladu s molarnim omjerom Mg:K:P od 1:1:3. To je većinom zbog toga što su Mg i K neophodni za formiranje poli-P budući da služe kao protuioni u poli-P. Ako se to želi, sintetička otpadna voda može biti koncentrirana, sterilizirana u autoklavu (1 h pri 110 °C) i korištena kao koncentrirana otopina ako će se nekoliko testova provesti u definiranom vremenskom razdoblju. Ipak, otopinu treba baciti ako se opazi precipitacija ili gubitak transparentnosti.

Za eksperimente koji se provode s laboratorijski obogaćenim kulturama, najbolje je provesti testove s istom (sintetičkom) otpadnom vodom korištenom za kultivaciju u skladu s koncentracijama ugljika ili fosfora. Alternativno i slično uzorcima iz gradskog uređaja, efluent iz bioreaktora se može prikupiti, filtrirati kroz grube filtere radi uklanjanja čestica i koristiti za pripremu potrebnog medija sa željenim koncentracijama ugljika i fosfora za izvođenje testova aktivnosti.

Za izvođenje (konvencionalnih) anoksičnih testova, mogu se pripremiti otopine nitrata i nitrita kako bi se stvorili potrebni anoksični redoks uvjeti. U tu se svrhu mogu pripremiti različite koncentrirane otopine pomoću nitratnih i nitritnih soli. Ipak, za praktične primjene, preporuča se da se slijedi postupni pristup i pažljivo prati njihovo dodavanje kako njihove koncentracije u vodenoj suspenziji ne bi premašile više od 10 mg L⁻¹ u slučaju nitrita, odnosno 20 mg L⁻¹ za nitrat. Time će se izbjeći potencijalan inhibični učinak uslijed akumuliranja nitrata ili nitrita kako je drugdje opisano (Saito i sur., 2004; Yoshida i sur., 2006; Pijuan i sur., 2010; Zhou i sur., 2007, 2012). Štoviše, razine pH niže od 7,0, u kombinaciji s većim koncentracijama nitrita, mogu biti razmjerno više inhibirajuće za PAO zato što nitrit može biti prisutan kao slobodna dušična kiselina (FNA) - 'protonirana' vrsta nitrita. Pri pH 7,0, Zhou i sur. (2007) i Pijuan i sur. (2010) su opazili 50 % inhibiciju anoksičnog i aerobnog metabolizma PAO pri koncentracijama FNA od 0,01 odnosno 0,0005 mg HNO₂-N L⁻¹ (ekvivalentno 45 i 2 mg NO₂-N L⁻¹ pri pH 7,0). Stoga, kako bi se osigurala njihova dostupnost tijekom izvođenja anoksičnih testova, tijekom testova treba pratiti koncentracije nitrita ili nitrata i ovisno o njihovim koncentracijama, u različitim će koracima trebati dodati otopine nitrita ili nitrata.

Kada se testovi provode kako bi se procijenili potencijalni inhibični ili toksični učinci određenih spojeva pri različitim koncentracijama, mogu se pripremiti koncentrirane otopine i dodati tijekom testa pri koncentracijama od interesa. Testovi provedeni kako bi se procijenilo jesu li inhibični ili toksični učinci reverzibilni moraju se provesti nakon 'pranja' biomase radi uklanjanja inhibirajućih ili toksičnih spojeva. Pranje se često provodi uzastopnim taloženjem i ponovnim miješanjem uzorka mulja u mediju bez ugljika (ili potpuno sintetički ili korištenjem obrađenog efluenta nakon filtracije) u redoks uvjetima od interesa. Slično tome, kada treba provesti testove održavanja, mediji bez ugljika i fosfora mogu se koristiti u redoks uvjetima i radnim uvjetima istraživanja.

2.2.5 Analitički postupci

Većinu potrebnih analitičkih postupaka (za određivanje, među ostalim, ukupnog P, PO₄, NH₄, NO₂, NO₃, MLSS, MLVSS) treba provesti slijedeći standardizirane i uobičajeno korištene analitičke protokole detaljno opisane u Standardnim metodama (APHA i sur., 2012). Određivanje VFA (za acetat, propionat

i čak ostale hlapive masne kiseline) može se provesti pomoću plinske kromatografije (GC), tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) ili primjenom standardnih protokola analitičkog određivanja. Međutim, suprotno većini analitičkih parametara od interesa, određivanje PHA i glikogena traži zahtjevniju pripremu uzorka i sofisticiranu opremu i postupke, a osim toga, postupci njihovog određivanja se mogu pronaći tek u specijaliziranoj znanstvenoj literaturi. Stoga su analitički postupci za određivanje PHA i glikogena detaljnije opisani u nastavku ovog dijela izvješća.

- PHA

Kako je ranije navedeno, najčešći polimeri PHA koje pohranjuju PAO su poli- β -hidroksi-butarat (PHB), poli- β -hidroksi-valerat (PHV) i poli- β -hidroksi-2-metil-valerat (PH₂MV). Njihova relativna prisutnost i pohranjena količina ovise o sastavu VFA (Ac ili Pr) i vrsti metabolizma uključenog u pohranu (metabolizam PAO ili GAO). Za obogaćene laboratorijske kulture koje provode EBPR (gdje su PAO dominantni organizmi sastavljeni od više od 90 % ukupne biomase) i kad je Ac najraširenija VFA, PAO pohranjuju VFA većinom kao PHB (do 90 % PHA) (Smolders i sur., 1994a). Međutim, kada je Pr dominantna VFA, tada se PHV može sastojati od do 45 % ukupno pohranjenih PHA, a PH₂MV se može sastojati od do 53 % ukupno pohranjenih PHA (Oehmen i sur., 2005c). Kada su u sustavima EBPR prisutni GAO, i u mulju se pohranjuju veće količine PHV. Na primjer, laboratorijski obogaćene kulture GAO (koje se sastoje od više od 90 % ukupne biomase) kultivirane s Ac kao VFA dovode do akumuliranja PHB od oko 73 %, odnosno akumuliranja PHV od oko 26 % (Zeng i sur., 2003a, Lopez-Vazquez i sur., 2007, 2009a), dok obogaćena kultura PAO kultivirana u sličnim uvjetima sadrži većinom PHB i manje od 10 % PHV (Smolders i sur., 1994a). U međuvremenu, laboratorijski sustavi s GAO u koje se upušta Pr rezultiraju s praktički nikakvim akumuliranjem PHB, ali s do 43 % PHV i 54 % PH₂MV (Oehmen i sur., 2006). Važno je naglasiti da tehnika analitičkog određivanja PHA prilično točno daje sadržaj PHA u MLSS. To ukazuje na to da je precizno određivanje MLSS jednako važno za dobivanje točnih koncentracija PHA i za točno određivanje neto konverzija tijekom biokemijske faze.

U usporedbi s gradskim uređajima koji provode EBPR, određivanje PHA u laboratorijski obogaćenim sustavima EBPR je obično lakše, budući da su laboratorijski sustavi manji i, što je važnije, kulture EBPR su obogaćene s PAO (> 90 %) (Oehmen i sur., 2004, 2006; Lopez-Vazquez i sur., 2007) te, slijedom toga, unutarstanični sadržaj PHA može dosegnuti do 10 % ukupne koncentracije MLSS ovisno o dostupnom tipu VFA (Lopez-Vazquez i sur., 2009a). S druge strane, u najboljem slučaju, sadržaj PHA akumuliran u miješanoj biomasi iz gradskih uređaja doseže između 1 i 2 % ukupne koncentracije MLSS, budući da PAO (i GAO) teško čine više od 15 % ukupne populacije bakterija (Lopez-Vazquez i sur., 2008a). To podrazumijeva da analitičko određivanje PHA iz uzoraka iz gradskih uređaja ne mora uvijek biti prikladno, pouzdano ili stoga reprezentativno za izravno uzimanje trenutnih ili kompozitnih uzoraka. U ekstremnim slučajevima, sadržaj PHA može pasti ispod granice detekcije. S ekonomskog gledišta i po pitanju potrebnih resursa (u smislu analitičke opreme, troškova potrošnih kemikalija i visoko kvalificiranog laboratorijskog osoblja), određivanje PHA vjerojatno neće biti (troškovno) isplativo kad se provodi na uzorcima iz gradskih uređaja. Alternativno, kako bi se procijenilo potencijalno akumuliranje PHA u uređajima, stvarni uzorci mulja iz gradskih uređaja mogu se koristiti za provedbu testova šaržne aktivnosti u povoljnijim i kontroliranim uvjetima za EBPR kojima se može maksimizirati akumuliranje PHA i olakšati njihovo analitičko određivanje (Lanham i sur., 2014). Ipak, ovaj potonji pristup još uvijek zahtijeva da se analitičko određivanje PHA provede s velikom preciznošću. Vezano uz analitičko određivanje različitih polimera PHA, to je pitanje predmet rasprava i poboljšanja od kraja 1990-ih godina (Baetens i sur., 2002). Zasad, najpouzdanija metoda uključuje dva neznatno različita postupka (Oehmen i sur., 2005b): (i) jedan za određivanje polimera PHB i PHV i (ii) jedan za određivanje PHV i PH₂MV.

Za oba postupka određivanja, uzorci aktivnog mulja moraju se prikupiti *in situ* u kivetama za centrifugiranje (15 mL). Količina uzorka treba biti dovoljna da se dobije oko 20 mg TSS. Kako bi se uzorak sačuvao, u plastičnu kivetu za centrifugiranje (u digestoru) prije uzimanja uzorka treba dodati 4-5 kapi formaldehida (37 % koncentracija), a nakon što se uzme uzorak, treba ga oko 2 h privremeno pohraniti pri temperaturi od 0-4 °C. Kako bi se uklonio preostali poliformaldehid i suspendirane tvari u tekućoj fazi, uzorke treba dvaput isprati vodovodnom vodom. Pranje uključuje sljedeće korake: (i) centrifugiranje (10 min brzinom od 4.500 rpm), (ii) pažljivo izvlačenje supernatanta dekantiranjem (ako se formira kruti talog) ili na drugi način pipetom, pri čemu treba izbjeći uklanjanje čestica ili krutina, (iii) dodavanje vodovodne vode (10 mL) te (iv) resuspenzija snažnim miješanjem. Nakon drugog koraka pranja, uzorak treba još jednom centrifugirati i supernatant se mora odbaciti. Nakon toga, uzorak se mora čuvati na temperaturi od -20 °C i potom sušiti smrzavanjem u liofilizatoru pri -80 °C, 0,1 mbar tijekom

48 h (ili duže), sve dok se uzorak u cijelosti ne osuši. Nakon što je uzorak osušen zamrzavanjem mogu početi postupci digestije, esterifikacije i ekstrakcije.

Kako je opisao Oehmen i sur. (2005b), za određivanje PHB i PHV, 20 mg uzorka osušenog zamrzavanjem može se prebaciti u kivetu za digestiju i dodati u 2 mL zakiseljene otopine metanola koja sadrži 3-postotnu koncentraciju sumporne kiseline (H_2SO_4) i oko 100 mg L^{-1} natrijevog benzoata. Nakon toga, uzorci se digestiraju i esterificiraju 2 h na 100 °C. Nakon digestije i esterifikacije, uzorci se hlade do sobne temperature; dodaje se destilirana voda i žustro se miješa. Kako bi se postiglo fazno odvajanje, treba osigurati vrijeme taloženja od 1 h. Kloroformna faza može se prebaciti u bočicu, osušiti s 0,5-1,0 g granula natrijevog sulfata i odvojiti od krute faze. Istovremeno se mogu pripremiti standardne otopine pri definiranim koncentracijama koristeći komercijalne kopolimere R-3-hidroksibutirične kiseline (3HB) i kopolimer R-3-hidroksivalerične kiseline (3HV) (7:3). Nakon ekstrakcije i esterifikacije, 3 μL tekuće faze može se injektirati u kromatograf. Neke preporučene karakteristike i radni uvjeti kromatografa su: (i) treba biti opremljen kolonom DB-5 (dužina 30 m \times unutarnji promjer 0,25 mm \times film 0,25 μm), (ii) koristiti *split* injektiranje s omjerom od 1:15, (iii) koristiti helij (He) kao plin nositelj sa brzinom protoka od 1,5 mL min^{-1} , (iv) treba biti opremljen plameno-ionizacijskim detektorom (FID) koji radi pri temperaturi od 300 °C s otvorom za injektiranje pri 250 °C te (v) postepenom povećanju temperature pećnice počevši s 80 °C u trajanju od 1 min, pa povećati za 10 °C min^{-1} do 120 °C, a onda dalje povećavati temperaturu od 45 °C min^{-1} do 270 °C, te je onda održavati na 270 °C u trajanju od 3 min. Kada se slijede ove upute i uvjeti, maksimumi PHB i PHV će se pojaviti nakon 2. i 3. min analize.

Alternativno, za određivanje PHB i PHV, jedan drugi postupak koji slijede Smolders i sur. (1994a) uključuje dodavanje 20 mg smrzavanjem osušene biomase u 1,5 mL dikloretana, 1,5 mL koncentriranog HCl kao i 1-propanola 1:4 (u volumenu). 1 mg benzoidne kiseline u otopini 1-propanola dodaje se kao interni standard. Uzorci se digestiraju i esterificiraju 2 h pri 100 °C, a najmanje svakih 30 min, uzorci se snažno vrtložno miješaju. Nakon hlađenja, dodaju se 3 mL destilirane vode. Sadržaji se žustro miješaju na laboratorijskoj mješalici, nakon čega se centrifugiraju nekoliko minuta kako bi se dobilo zadovoljavajuće i dobro definirano fazno odvajanje. Oko 1 mL niže (organske) faze se odlijeva i filtrira kroz kolonu osušenog bezvodnog natrijevog sulfata u bočice za uzorke. Kao preporuka, trebaju se provesti 3 standarda za svaku seriju od 15 uzoraka. Pri korištenju ove metode, 1 μL niže tekuće faze iz otopine može se injektirati u plinski kromatograf koji je opremljen i radi kako slijedi: (i) koristi se kolona HP Innowax (dužina 30 m \times unutarnji promjer 0,32 mm \times film 0,25 μm), (ii) *split* injektiranja s omjerom 1:10, (iii) korištenje He kao plina nositelja (pri brzini protoka od 6,3 mL min^{-1}), (iv) rad plameno-ionizacijskog detektora (FID) pri 250 °C, uz temperaturu injektiranja od 200 °C, (v) početna temperatura peći od 80 °C drži se 1 min, povećava se na 130 °C pri tempu od 25 °C min^{-1} , a potom na 210 °C po 15 °C min^{-1} , da bi se na kraju održavala na 210 °C 12 min. Ovakvo dugačko završno vrijeme se preporuča kako bi se sasvim eluirali propilesteri koji nisu od interesa (npr. iz sastavnica stanične stijenke). Na kraju, ali ne manje važno, PHA sadržaj biomase se prijavljuje kao postotak koncentracija MLSS, koji se koristi za izračun koncentracija PHA.

Ako uzorci aktivnog mulja sadrže visoke koncentracije soli, umjesto vodovodne vode treba koristiti slanu otopinu za pranje čiji je osmotski tlak sličan onom originalnog uzorka. Time bi se izbjegla citoliza stanica i očuvali unutarstanični spojevi (kao što su PHA i glikogen), čime bi se izbjeglo njihovo otapanje i potencijalni gubitak kroz supernatant. Međutim, kad se koristi slana otopina za pranje, visoka koncentracija ukupnih otopljenih krutina (TDS) u preostaloj tekućini (nakon centrifugiranja) može se taložiti i dovesti do prividnih odstupanja u koncentracijama MLSS originalnog uzorka, iz čega će se odrediti sadržaji PHA. Kako bi se to kompenziralo, bit će potreban korekcijski faktor kako bi se u obzir uzeo potencijalni učinak TDS na završni uzorak krutina kad se određuju koncentracije PHA.

Premda dva prethodna analitička postupka mogu biti prilično točna za određivanje PHB i PHV, niti jedan od njih ne može se, bez dodatne modifikacije, zadovoljavajuće koristiti za određivanje PH₂MV (od posebne važnosti kad je propionat prisutan kao izvor ugljika u kulturama EBPR). Zbog toga, kako bi se unaprijedila ekstrakcija PH₂MV, Oehmen i sur. (2005b) preporučuju primjenu istog postupka opisanog za određivanje PHB i PHV, ali korištenjem otopine metanola koja sadrži 10 % H_2SO_4 (umjesto 3 % H_2SO_4) i produživanjem faze digestije pri 100 °C na 20 h. Budući da komercijalni proizvod koji bi se koristio kao izravni standard za određivanje PH₂MV nije dostupan, Oehmen i sur. (2005b) su preporučili korištenje 2-hidroksikapronske kiseline za koju se pretpostavlja da ima relativnu reakciju sličnu onoj PH₂MV (na temelju činjenice da su te dvije molekule izomeri). Ovaj se postupak pokazao korisnim za istovremeno određivanje PHV i PH₂MV, ali ne za PHB. Slijedom toga, ako treba odrediti tri polimera

(PHB, PHV i PH₂MV), moraju se provesti dva različita postupka određivanja. Daljnji detalji o tehnikama analitičkog određivanja PHA mogu se pronaći u originalnim izvorima (Baetens i sur., 2002; Oehmen i sur., 2005b). S gledišta mikroskopske vizualizacije, za kvalitativnu vizualizaciju PHA može se koristiti nilsko plavilo A, a za poli-P Neisserova boja (Mino i sur., 1998; Mesquita i sur., 2013).

- Glikogen

Kulture EBPR koriste glikogen kao izvor energije i reducenspri pohranjivanju PHA. Glikogen (C₆H₁₀O₅) je razgranat polisaharid glukoze (C₆H₁₂O₆) sličan škrobu i celulozi, ali s različitom glikozidnom vezom i geometrijom između molekula (Dircks i sur., 2001; Wentzel i sur., 2008). Njegova relativna prisutnost i unutarstanično pohranjivanje od strane kultura EBPR ovisi o sastavu VFA (Ac ili Pr), omjeru P/C u influentu te dominantnim organizmima (ili PAO ili GAO) (Schuler i Jenkins, 2003; Oehmen i sur., 2007). U obogaćenim laboratorijskim PAO kulturama kultiviranim s Ac kao izvorom ugljika (gdje PAO čine više od 90 % ukupne biomase), pri omjeru P/C u influentu nižem od 0,04 mol mol⁻¹, frakcije glikogena mogu dosegnuti do 20 % ukupne koncentracije MLVSS, dok pri omjerima P/C u influentu višima od 0,04, frakcije glikogena su obično manje od 15 % (Smolders i sur., 1995; Schuler i Jenkins, 2003; Welles i sur., 2016). Slično tome, laboratorijski obogaćene kulture PAO kultivirane s Pr kao izvorom ugljika pohranjuju manje unutarstaničnog glikogena koji često ne doseže više od 15 % MLVSS budući da anaerobni metabolizam PAO na Pr zahtijeva manju hidrolizu glikogena za anaerobno otpuštanje P i unutarstanično pohranjivanje PHA (Oehmen i sur., 2005c). Nasuprot tome, kulture GAO obogaćene u laboratoriju koje koriste Ac ili Pr kao izvor ugljika mogu imati frakcije glikogena sa čak 30 % MLVSS neovisno o izvoru ugljika (Filipe i sur., 2001b; Zeng et al., 2003a; Oehmen i sur., 2005a,c; Dai i sur., 2007; Lopez-Vazquez i sur., 2009a). Slično određivanju PHA, određivanje sadržaja unutarstaničnog glikogena može biti lakše procijenjeno u laboratorijskim sustavima (gdje kulture EBPR mogu činiti više od 90 % ukupne mikrobne populacije), ali neće biti tako jednostavno u gradskim uređajima budući da PAO (i GAO) jedva da čine više od 15 % ukupne populacije mikroorganizama (Lopez-Vazquez i sur., 2008a). Slijedom toga, frakcije glikogena prisutne u gradskim EBPR uređajima teško mogu dosegnuti više od 5 % ukupnih koncentracija MLVSS, zbog čega je njegovo određivanje teže i izazovnije u usporedbi s laboratorijskim sustavima. Ipak, to i dalje može biti izvedivo, ali zahtijeva analitičko određivanje velike preciznosti (Lanham i sur., 2014). Glikogen je razgranat polisaharid te ga treba hidrolizirati i ekstrahirati prije određivanja. Za analitičko određivanje glikogena predložene su različite metode, u rasponu od testova enzimatske hidrolize (Parrou i Francois, 1997) do biokemijskih metoda (Brdjanovic i sur., 1997) i kroz njegovo neizravno određivanje pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) kao glukozu nakon kiselinske hidrolize i ekstrakcije (Smolders i sur., 1994a; Lanham i sur., 2012). Nažalost, još uvijek nije dostupna izravna metoda. Iz praktičnih razloga i nakon nekoliko poboljšanja tijekom godina, metoda HPLC nakon kiselinske hidrolize i ekstrakcije je jedan od najčešće korištenih postupaka. Metoda HPLC, nakon kiselinske hidrolize i ekstrakcije za određivanje glikogena se sastoji od digestije uzorka aktivnog mulja razrijeđenog sa 6 M HCl, što dovodi do konačne koncentracije HCl od 0,6 M HCl te digestiranog 5 h na 100 °C. Nakon digestije, uzorak se ostavlja u mirovanju da se ohladi do sobne temperature, a supernatant se filtrira kroz filter s otvorom pora veličine 0,2 ili 0,45 μm. Filtrirani supernatant se ulijeva u bočicu i glikogen se može kvantificirati pomoću HPLC kao glukoza (Smolders i sur., 1994a). Ovo potonje je stoga što glikogen (C₆H₁₀O₅) dijeli isti sadržaj ugljika kao glukoza (C₆H₁₂O₆) (na temelju mola ugljika). Međutim, određivanje glikogena kao sadržaja glukoze ekstrahiranog iz biomase nije u cijelosti točno budući da će biomasa (stanice) koja ne sadrži glikogen, ali sadrži glukozu također biti dio ekstrahiranog materijala, a isto će raditi i glikogen ostalih populacija, bez EBPR (npr. GAO), koje sadrže glikogen. Nedavno su Lanham i sur. (2012) unaprijedili tehniku ekstrakcije glikogena. Mogu se koristiti zamrzavanjem osušeni uzorci pripremljeni poput onih za određivanje PHA: aktivni mulj se može prikupiti *in situ*, dodati u kivetu za centrifugiranje od 15 mL koja sadrži 4-5 kapljica formaldehida (37 % koncentracija), pohraniti na 0-4 °C oko 2 h, oprati vodovodnom vodom i osušiti zamrzavanjem. Oni preporučuju omjer od 1 mg zamrzavanjem osušenog mulja na 1 mL 0,9 M otopine HCl radi poboljšanja kiselinske hidrolize i ekstrakcije za daljnje određivanje glikogena kao glukoze. Potom, ovisno o agregatnom stanju mulja, uzroci mulja se mogu digestirati 2 h u slučaju mulja u obliku flokula, 5 h u slučaju granularnog mulja i 3 h ako agregatno stanje nije poznato ili ako varira. Kasnije, 5 mg zamrzavanjem osušenog uzorka može se dodati u 5 mL 0,9 M otopine HCl, digestirati 5 h na 100 °C, supernatant se filtrira kroz filtere veličine pora 0,2 μm i glikogen se mjeri kao glukoza pomoću HPLC. Ako se koristi potonji postupak, tada 5 mg zamrzavanjem osušenog uzorka treba pažljivo i točno izvagati, a rezultati će se prijaviti kao postotak MLSS. Ranija tehnika određivanja pomoću HPLC se pokazala dovoljno točnom i pouzdanom u laboratorijski obogaćenim kulturama gdje su populacije EBPR dominantne. Međutim, kako je već ranije rečeno, njihovo određivanje u uzorcima mulja iz gradskih

uređaja ne mora biti dovoljno točno. Provizorno, može se koristiti metoda bojenja perjodatnom kiselinom po Schiffu za dobivanje grube mikroskopske kvalitativne procjene glikogena i ostalih granula ugljikohidrata prisutnih u stanicama (Mesquita i sur., 2013).

2.2.6 Parametri od interesa

Kako bi se odredile i ocijenile metaboličke aktivnosti PAO, različiti stehiometrijski omjeri i kinetičke brzine za anaerobnu, anoksičnu i aerobnu fazu mogu se procijeniti na temelju podataka prikupljenih iz provođenja šaržnih testova aktivnosti. U tablici 2.1 opisani su očekivani parametri od interesa.

2.3 Šaržni testovi aktivnosti EBPR: priprema

U ovom se odjeljku opisuju ne samo različiti koraci već i karakteristike opreme i materijali potrebni za provođenje šaržnih testova aktivnosti.

2.3.1 Oprema

1. (Zrakonepropustan) šaržni bioreaktor ili fermentoropremeljen sustavom za miješanje i odgovarajućim otvorima za uzorkovanje (kako je opisano u dijelu 2.2.1).
2. Dobava plina dušika (preporučeno).
3. Dobava kisika (izvori komprimiranog zraka ili čistog kisika).
4. pH elektroda (ako nije uključena/ugrađena u strukturu šaržnog bioreaktora).
5. Dvosmjerni kontrolor pH uz dodavanje HCl i NaOH (alternativno jednosmjerna kontrola – općenito za dodavanje HCl – ili se može koristiti ručna kontrola pH kroz ručno dodavanje HCl i NaOH).
6. Termometar (preporučeni radni raspon temperature od 0 do 40 °C).
7. Sustav za kontrolu temperature (ako nije uključen u strukturu šaržnog bioreaktora).
8. Mjerač DO s elektrodom (ako nije uključen/ugrađen u strukturu šaržnog bioreaktora).
9. Automatski dvosmjerni kontrolor otopljenog kisika kroz dobavu plina dušika i kisika (ako nije uključen u strukturu šaržnog bioreaktora i ako se testovi moraju provesti pri definiranoj koncentraciji otopljenog kisika).
10. Potvrditi da su sve elektrode i mjerači (pH, temperatura i DO) kalibrirani manje od 24 h prije izvođenja šaržnih testova aktivnosti u skladu sa smjernicama i preporukama proizvođača i/ili dobavljača.
11. Centrifuga s kapacitetom radnog volumena od najmanje 250 mL za izvođenje postupka pranja mulja (ako je potrebno).
12. Zaporni sat.

Tablica 2.1 Stehiometrijski i kinetički parametri od interesa za uzorke aktivnog mulja koji provode EBPR.

Parametar	Simbol	Tipična jedinica na temelju mola	Tipična jedinica na temelju mg ili g
ANAEROBNI PARAMETRI			
Stehiometrijski			
Omjer anaerobnog otpuštanja ortofosfata i apsorpcije VFA	$Y_{VFA_PO4,An}$	P-mol C-mol ⁻¹	mg P mg VFA ⁻¹
Omjer anaerobnog korištenja glikogena i apsorpcije VFA	$Y_{Gly/VFA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg VFA ⁻¹
Omjer anaerobne proizvodnje PHA i apsorpcije VFA	$Y_{VFA_PHA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg VFA ⁻¹
Omjer anaerobnog nastajanja PHB i apsorpcije VFA	$Y_{VFA_PHB,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg VFA ⁻¹
Omjer anaerobnog nastajanja PHV i apsorpcije VFA	$Y_{VFA_PHV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg VFA ⁻¹
Omjer anaerobnog nastajanja PH ₂ MV i apsorpcije VFA	$Y_{VFA_PH2MV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg VFA ⁻¹
Omjer anaerobnog nastajanja PHV i formiranja PHB	$Y_{PHV/PHB,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg C ⁻¹
Kinetički			
Maksimalna specifična brzina anaerobne apsorpcije VFA	$q_{VFA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg VFA mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina anaerobnog otpuštanja PO ₄	$q_{PP_PO4,An}$	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg P mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina anaerobne proizvodnje PHA	$q_{PP_PHA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg PHA mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Brzina anaerobnog endogenog otpuštanje PO ₄	$m_{PP_PO4,An}$	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg P mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Koeficijent anaerobnog održavanja ATP	$m_{ATP,An}$	mol ATP C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg ATP mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Brzina naknadnog anaerobnog otpuštanja PO ₄	$m_{PP_PO4,Sec,An}$	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg P mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹

ANOKSIČNI PARAMETRI

Stehiometrijski

Omjer anoksične razgradnje PHA i potrošnje NO _x	Y _{NO_x_PHA,Ax}	C-mol N-mol ⁻¹	mg C mg NO _x ⁻¹
Omjer anoksičnog nastajanja glikogena i potrošnje NO _x	Y _{NO_x_Gly,Ax}	C-mol N-mol ⁻¹	mg C mg NO _x ⁻¹
Omjer anoksičnog nastajanja poli-P i potrošnje NO _x	Y _{NO_x_PP,Ax}	P-mol N-mol ⁻¹	mg P mg NO _x ⁻¹
Omjer anoksičnog rasta biomase i potrošnje NO _x	Y _{NO_x_Bio,Ax}	C-mol N-mol ⁻¹	mg C mg NO _x ⁻¹
Omjer anoksičnog nastajanja glikogena i potrošnje PHA	Y _{PHA_Gly,Ax}	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg C ⁻¹
Omjer anoksičnog nastajanja poli-P i potrošnje PHA	Y _{PHA_PP,Ax}	P-mol C-mol ⁻¹	mg P mg C ⁻¹
Omjer anoksičnog rasta biomase i potrošnje PHA	Y _{PHA_Bio,Ax}	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg C ⁻¹

Kinetički

Maksimalna specifična brzina anoksične razgradnje PHA	q _{PHA,Ax}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg PHA mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina anoksičnog nastajanja glikogena	q _{PHA_Gly,Ax}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg Gly mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina anoksičnog nastajanja poli-P	q _{PO4_PP,Ax}	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg PP mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina anoksičnog rasta biomase	q _{Bio,Ax}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg aktivne biomase mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Koeficijent anoksičnog održavanja ATP	m _{ATP,Ax}	mol ATP C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg ATP mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Brzina anoksične endogene respiracije	m _{NO_x}	N-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg NO _x mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹

AEROBNI PARAMETRI

Stehiometrijski

Omjer aerobne razgradnje PHA i potrošnje O ₂	Y _{PHA}	C-mol mol O ₂ ⁻¹	mg C mg O ₂ ⁻¹
Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje O ₂	Y _{Gly}	C-mol mol O ₂ ⁻¹	mg C mg O ₂ ⁻¹
Omjer aerobnog nastajanja poli-P i potrošnje O ₂	Y _{PP}	P-mol mol O ₂ ⁻¹	mg P mg O ₂ ⁻¹
Omjer aerobnog rasta biomase PAO i potrošnje O ₂	Y _{PAO}	C-mol mol O ₂ ⁻¹	mg C mg O ₂ ⁻¹
Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje PHA	Y _{PHA_Gly,O₂}	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg C ⁻¹
Omjer aerobnog nastajanja poli-P i potrošnje PHA	Y _{PHA_PP,O₂}	P-mol C-mol ⁻¹	mg P mg C ⁻¹
Omjer aerobnog rasta biomase i potrošnje PHA	Y _{PHA_Bio,O₂}	C-mol C-mol ⁻¹	mg C mg C ⁻¹

Kinetički

Maksimalna specifična brzina aerobne razgradnje PHA	q _{PHA,O₂}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg PHA mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina aerobnog nastajanja glikogena	q _{PHA_Gly,O₂}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg Gly mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina aerobnog nastajanja poli-P	q _{PO4_PP,O₂}	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg PP mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Maksimalna specifična brzina aerobnog rasta biomase	q _{Bio,O₂}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg aktivne biomase mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Koeficijent aerobnog održavanja ATP	m _{ATP,O₂}	mol ATP C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg ATP mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹
Brzina aerobne endogene respiracije kulture	m _{O₂}	mol O ₂ C-mol ⁻¹ h ⁻¹	mg O ₂ mg aktivne biomase ⁻¹ h ⁻¹

2.3.2 Materijali

1. Dvije menzure od 1 ili 2 L (ovisno o korištenim količinama mulja) za čuvanje aktivnog mulja i pranje mulja ako je potrebno.
2. Najmanje 2 plastične štrcaljke (po mogućnosti od 20 mL ili najmanje 10 mL) za prikupljanje i određivanje topivih spojeva (nakon filtracije).
3. Najmanje 3 plastične štrcaljke (po mogućnosti od 20 mL) za prikupljanje krutina, čestica ili unutarstaničnih spojeva (bez filtracije).
4. Filtri s porama veličine 0,45 μm. Po mogućnosti ne od celuloznog acetata, zato što mogu otpustiti tragove celuloze ili acetata u prikupljene uzorke vode. Najbolje pripremiti najmanje dvostruko više filtera od broja uzoraka koje treba filtrirati za određivanje topivih spojeva.
5. Prozirne plastične čašice od 10 ili 20 mL za prikupljanje uzoraka za određivanje topivih spojeva (npr. topivi COD, acetat, propionat, ortofosfat, nitrat, nitrit).
6. Prozirne plastične čašice od 10 ili 20 mL za prikupljanje uzoraka za određivanje koncentracije aktivnog mulja i organskih suspendiranih krutina (MLSS odnosno MLVSS). Razmotriti prikupljanje trostrukog broja uzoraka zbog varijabilnosti analitičke tehnike.
7. Plastične kivete od 15 mL za centrifugiranje za određivanje PHA i/ili glikogena.
8. Plastična kutija ili kutija za suhi led napunjena ledom s potrebnom zapreminom za privremenu pohranu (u trajanju do 1-2 h nakon završetka šaržnog testa aktivnosti) plastičnih čašica i plastičnih kiveta za centrifugiranje nakon prikupljanja uzoraka.
9. Plastične rukavice i zaštitne naočale.
10. Pasteurove ili plastične pipete za dodavanje HCl i/ili NaOH (kad se kontrola pH provodi ručno).

11. Metalne laboratorijske štipaljke za zatvaranje gumenih cijevi korištene kao otvor za uzorkovanje kad se uzorci ne uzimaju iz bioreaktora.

2.3.3 Priprema medija

- Prava otpadna voda

Ako će se za šaržni test aktivnosti koristiti prava otpadna voda, uzorak se mora uzeti na ulazu odgovarajućeg uređaja za obradu otpadne vode, a šaržni test aktivnosti treba provesti što je prije moguće nakon uzimanja uzorka. Ovisno o prirodi testa, istraživač treba odlučiti hoće li uzeti uzorak sirove otpadne vode ili istaložene otpadne vode (ako se u uređaju koristi prethodno taloženje). Ako se zbog lokacije, problema u transportu ili ostalih logističkih pitanja testovi ne mogu provesti u manje od 1 ili 2 h neposredno nakon uzimanja uzorka, tada uzorak otpadne vode treba čuvati na hladnom dok se test ne provede (npr. stavljanjem posude ili spremnika u hladnjak na temperaturu od 4 °C). Ipak, prije izvođenja testa, temperaturu otpadne vode treba prilagoditi ciljanoj temperaturi na kojoj će se izvoditi šaržni test aktivnosti (po mogućnosti dosegnutoj u manje od 1 h). U tu se svrhu može koristiti vodena kupelj ili prostorija s kontroliranom temperaturom, kako je opisano u odjeljku 2.2.1.

- Medij ili supstrat sintetičkog influenta

Ako se testovi mogu ili ih se želi provesti sa sintetičkom otpadnom vodom, ovisno o vrsti testova (anaerobni, anoksični ili aerobni), medij sintetičkog influenta može sadržavati mješavinu izvora ugljika i ortofosfata plus potrebne (makro- i mikro-) nutrijente. Općenito, može ih se pomiješati sve zajedno u istom mediju (za anaerobne-(anoksične)-aerobne testove); podijeliti u dvije otopine (*i*) izvor C i (*ii*) izvor P (plus otopina nutrijenata); ili pripremiti odvojeno ako ih treba dodati u različitim fazama ili trenucima. Uobičajeni sastavi i koncentracije su:

- a. **Otopina izvora ugljika:** Obično se sastoji od izvora RBCOD, po mogućnosti hlapivih masnih kiselina, kao što su acetat ili propionat, ovisno o prirodi i cilju testa i odgovarajućim istraživačkim pitanjima. Ponekad se koriste složeniji supstrati koji sadrže mješavinu RBCOD i biološki sporo razgrađivi COD (SBCOD); međutim, oni se ne koriste u testovima opisanima u ovom izvješću, zbog čega se izostavljaju. Za anaerobne šaržne testove aktivnosti, koncentraciju COD u ulaznoj vodi treba postaviti na razinu koja osigurava da će se unutar anaerobne faze potrošiti sav COD. Za šaržne testove aktivnosti koji se provode s aktivnim muljem uzetim iz gradskih uređaja, obično se preporučuju koncentracije COD koje nisu više od 100 mg L⁻¹. Za laboratorijske uzorke aktivnog mulja, koncentracije COD mogu biti jednako visoke kao i koncentracija ulaznog COD u laboratorijskom sustavu (a ponekad čak 2 do 3 puta više) sve dok je RBCOD u cijelosti uklonjen u anaerobnoj fazi i nije toksičan ili inhibitoran za PAO.
- b. **Otopina izvora ortofosfata:** Koncentracije ortofosfata mogu se prilagoditi prema želji ovisno o svrsi eksperimenta. Za eksperimente sa samo anaerobnim šaržnim testom, koncentracije ortofosfata mogu iznositi svega 2-3 mg PO₄-P L⁻¹ ili čak mogu biti isključene, dok se koncentracije od čak 75 mg PO₄-P L⁻¹ za uzorke iz gradskih uređaja ili više od 120 mg PO₄-P L⁻¹ za laboratorijski obogaćene kulture (Wentzel i sur., 1987) mogu dodati da se ocijeni maksimalni kapacitet mulja za apsorpciju P u anoksičnim ili aerobnim uvjetima (kad anaerobna faza prethodi anoksičnom ili aerobnom testu).
- c. **Otopina nutrijenata:** Sadrži sve potrebne makro- (amonij, magnezij, sulfat, kalcij, kalij) i mikro-nutrijente (željezo, bor, bakar, mangan, molibden, cink, jod, kobalt) kako bi se osiguralo da stanice nisu ograničene njihovim izostankom i izbjeglo dobivanje krivih rezultata te, u ekstremnim slučajevima, neuspjeh testa. Stoga, unatoč činjenici da njihove koncentracije mogu djelovati vrlo niske, nužno je osigurati da se u otopinu dodaju sve sastavnice u potrebnim količinama. Preporučeni je sljedeći sastav (količine po litri otopine nutrijenata) (na temelju Smolders i sur., 1994a): 107 mg NH₄Cl, 90 mg MgSO₄·7H₂O, 14 mg CaCl₂·2H₂O, 36 mg KCl, 1 mg ekstrakta kvasca i 0,3 mL otopine elementa u tragovima (koja po litri uključuje 10 g EDTA, 1,5 g FeCl₃·6H₂O, 0,15 g H₃BO₃, 0,03 g CuSO₄·5H₂O, 0,12 g MnCl₂·4H₂O, 0,06 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,12 g ZnSO₄·7H₂O, 0,18 g KI i 0,15 g CoCl₂·6H₂O). Slične otopine nutrijenata mogu se koristiti tako dugo dok sadrže sve prethodno navedene potrebne nutrijente.

- Otopina nitrata ili nitrita

Kada šaržni testovi uključuju anoksičnu fazu, mogu se koristiti otopine nitrata ili nitrita (prema potrebi) za stvaranje anoksičnih uvjeta u šaržnim testovima aktivnosti (odjeljak 2.2.4). U tu se svrhu mogu koristiti nitratne i nitritne soli (npr. KNO₃ odnosno NaNO₂). Ipak, njihovo dodavanje se mora

pažljivo nadzirati kako bi se osigurala njihova prisutnost i dostupnost bez stvaranja inhibitornog ili čak toksičnog učinka na biomasu. Stoga se preporučuje da se njihove koncentracije drže ispod 20 mg $\text{NO}_3\text{-N L}^{-1}$ i 10 mg $\text{NO}_2\text{-N L}^{-1}$ (pri pH 7,0).

- **Medij za pranje**

Ako se uzorak mulja mora 'oprati' kako bi se uklonio neželjeni spoj (koji čak može biti inhibitoran ili toksičan), potrebno je pripremiti otopinu nutrijenata za pranje mulja koja po litri sadrži (Smolders i sur., 1994a): 107 mg NH_4Cl , 90 mg $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 36 mg KCl , 1 mg ekstrakta kvasca i 0,3 mL otopine elementa u tragovima (koja po litri uključuje 10 g EDTA, 1,5 g $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g H_3BO_3 , 0,03 g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g KI i 0,15 g $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Proces pranja se može ponoviti dva ili tri puta. Nakon toga, mogu se poduzeti sljedeći koraci pripreme šaržnih testova aktivnosti. U posebnim slučajevima kad se koristi mulj iz gradskih uređaja, za pranje se može koristiti efluent iz uređaja (pod uvjetom da njegov kemijski sastav to dopušta).

- **Otopina formaldehida**

Za pripremu i čuvanje uzoraka za analitičko određivanje PHA i glikogena, potrebna je komercijalna otopina formaldehida (37-postotna koncentracija).

- **Otopina ATU (Alil-N-tiourea)**

Kako bi se spriječila nitrifikacija, može se pripremiti otopina ATU kako bi se dosegla početna koncentracija od oko 20 mg L^{-1} (nakon dodavanja mulju). Otopinu ATU treba dodati prije izlaganja mulja aerobnim uvjetima (uključujući pripremu ili aklimatizaciju uzorka mulja).

- **Kisele i bazne otopine**

To trebaju biti otopine 0.2 M HCl volumena 100-250 mL i 0.2 M NaOH volumena 100-250 mL za automatsku ili ručnu kontrolu pH te otopine 1 M HCl , 10-50 mL i 1 M NaOH , 10-50 mL za početnu korekciju pH, ako se željeni radni pH jako razlikuje od pKa vrijednosti puferkog agensa.

- **Radne i koncentrirane otopine potrebne za određivanje analitičkih parametara od interesa također moraju biti pripremljene u skladu sa Standardnim metodama (APHA i sur., 2012) i odgovarajućim protokolima.**

- **Preporuča se da se uzme uzorak medija prije izvođenja eksperimenta kako bi se potvrdila/provjerila početna (željena) koncentracija paramet(a)ra od interesa (npr. COD, ortofosfat itd.).**

2.3.4 Priprema materijala

- **Broj uzoraka (i njihovu količinu) koje treba prikupiti treba definirati u skladu s vrstom analize, količinama potrebnima za analitičko određivanje i brojem ponavljanja otopljenih parametara od interesa:**

a. Npr. treba uzeti uzorak od 3 mL ako je to minimalna količina potrebna za određivanje koncentracije acetata u tom uzorku s dva ponavljanja.

b. Kad će se određivati dva ili više parametara pomoću istog uzetog uzorka, tada potrebne količine treba zbrojiti: npr. ako su za određivanje Ac potrebne 3 mL, za amonijak 5 mL a za ortofosfat 6 mL, tada treba uzeti uzorak od najmanje 14 mL.

U dobro izmiješanom sustavu, tekući uzorci se uzimaju samo jednom (premda se analiza može ponoviti) zato što samo uzorkovanje obično ne djeluje na kvalitetu uzorka (osim ako uzorci nisu omaškom filtrirani).

- **Isto tako, broj uzoraka (i njihovu količinu) koje treba prikupiti treba definirati u skladu s vrstom analize, količinama ili masama potrebnima za analitičko određivanje pojedinih parametara od interesa i brojem ponavljanja po analizi (npr. po 3 uzorka od 10 mL za određivanje MLSS/MLVSS u tri ponavljanja, 20 mg TSS po svakoj analizi PHA i 5 mg TSS za svaku analizu glikogena). U slučaju uzoraka fokusiranih na koncentracije krutina, postoji odstupanje u koncentracijama krutina od uzorka do uzorka zbog prirode postupaka uzorkovanja. Stoga uzorkovanje i analizu po mogućnosti treba provesti s tri ponavljanja.**

- **Učestalost uzimanja uzoraka:**

a. Ako treba odrediti maksimalne specifične (početne) brzine (npr. maksimalna specifična brzina apsorpcije acetata ili maksimalna brzina apsorpcije ortofosfata), tada treba uzeti veći broj uzoraka na početku odgovarajuće faze (anaerobna, anoksična ili aerobna). Konkretno, uzorke može biti

potrebno uzimati svakih 5 min tijekom prvih 30-40 min trajanja šaržnog testa aktivnosti. Razdoblje od 5 min je minimalno praktično razdoblje potrebno za uzimanje i postupanje s jednim uzorkom (skupom uzoraka).

- b. Ako treba procijeniti jedino stehiometrijske parametre, a ne kinetičke (npr. omjer anaerobnog otpuštanja P i apsorpcije Ac ili omjer anaerobnog formiranja PHB i apsorpcije Ac), tada se uzorci mogu uzeti samo na početku i na kraju svake faze kako bi se odredile ukupne konverzije od interesa.
 - Kako bi se povećala pouzdanost podataka i znalo početno stanje mulja, preporuča se da se uzme serija uzoraka mulja prije nego što se doda bilo kakav medij. Naročito za PHA i glikogen, koji zahtijevaju duže vrijeme uzorkovanja, zbog brze konverzije biomase slično analizi MLSS i MLVSS, uzorci se često uzimaju triput zajedno s uzorcima MLSS i MLVSS.
 - Pažljivo definirati maksimalni i minimalni radni volumen bioreaktora:
 - a. Procjenom minimalnog konačnog volumena na kraju testa (nakon prikupljanja svih uzoraka) izbjeci će se problemi s uzorkovanjem (npr. kad je visina konačnog volumena niža od visine otvora/cijevi za uzorkovanje) i kontrolom radnih uvjeta (npr. doći će do nekontroliranog dodavanja kiseline i lužine ako vrh pH elektrode nije uronjen, što će dovesti do pH šoka, bez uočavanja problema u očitavanju mjerača pH). Time se također može spriječiti neodgovarajuća ili nedovoljna aeracija i miješanje (ekstremno mali volumeni mogu dovesti do snažnog prodora kisika, mrtvih količina i gubitaka biomase ako zapljusne stijenke bioreaktora).
 - b. Kako bi se procijenio minimalni početni volumen na početku testa na temelju minimalnog konačnog volumena i volumen potreban za uzorkovanje (vodeći računa o početnom volumenu aktivnog mulja i dodavanju medija i ostalih otopina) i kako bi se potvrdilo da taj volumen ne premašuje maksimalni radni volumen bioreaktora, što će omogućiti da se izbjegnju izlivanje i plavljenje. Također, treba razmotriti potencijalno povećanje volumena zbog upuhivanja plina (npr. dušik ili komprimirani zrak) kako bi se definirao maksimalni radni volumen.
 - Nakon što se definira broj i učestalost uzimanja uzoraka, označite sve plastične čašice. Po mogućnosti, definirajte nomenklaturu i/ili kraticu koja će vam omogućiti da lako identificirate i prepoznate šaržni test, vrijeme uzorkovanja i parametar (parametre) od interesa koji (koje) treba odrediti pomoću tog uzorka. Označavanje i plastičnih čašica i poklopca pomoći će u lakšem identificiranju uzorka.
 - Kod izvođenja i praćenja uzorkovanja i izvođenja šaržnog testa može biti prilično koristan jednostavan radni list izrađen u obliku tablice na računalu. Uz to, može se koristiti i za vođenje baze podataka o različitim provedenim šaržnim testovima. Tablica 2.10 sadrži primjer takve tablice.
 - Organizirajte sav potreban materijal u relativno uskom krugu rada oko bioreaktora za provođenje šaržnog testa kako bi se izbjeglo kašnjenje u postupanju i pripremi uzoraka. U protivnom, bit će teško poštovati početnu petominutnu učestalost uzorkovanja.
 - Ako treba uzeti uzorke za određivanje PHA i glikogena, pažljivo dodajte 4-5 kapljica 37-postotne otopine formaldehida pomoću plastične Pasteurove pipete. Otopinu formaldehida dodajte unutar digestora ili barem unutar prostora s dobrom ventilacijom. Nakon dodavanja, odmah zatvorite cijevi i držite ih zatvorenima dok se ne dodaju uzorci. Uvijek nosite plastične rukavice i postupajte s korištenim materijalima kontaminiranim formaldehidom kao s kemijskim otpadom u skladu s vašim lokalnim laboratorijskim propisima.
 - Kalibrirajte sve mjerače (pH, DO i termometar) najmanje 24 h prije izvođenja testova i čuvajte elektrodu/senzore u odgovarajućim otopinama do izvođenja testova, slijedeći pritom posebne preporuke odgovarajućeg proizvođača ili dobavljača i potvrdite da su očitavanja pouzdana.
 - Treba imati na umu da svaki uzeti uzorak zahtijeva trenutnu pažnju, postupanje i odgovarajuću pohranu prije uzimanja idućeg uzorka (Tablica 2.2).

Tablica 2.2 Prijedlozi za pohranu i čuvanje uzoraka u funkciji analitičkog određivanja parametra od interesa.

Parametar od interesa povezan s EBPR-om	Materijal posude za uzorak	Metoda čuvanja	Maksimalno preporučeno vrijeme između uzorkovanja, postupak čuvanja i analiza
Ukupni BOD	Plastika ili staklo	Ohladiti na 1-5 °C; ili zamrznuti na -20 °C i čuvati na tamnom mjestu.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; do 1 mjesec za zamrznute uzorke.
Topivi/otopljeni BOD	Plastika ili staklo	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm i ohladiti na 1-5 °C; ili zamrznuti na -20 °C i čuvati na tamnom mjestu.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; do 1 mjesec za zamrznute uzorke.

Ukupni COD	Plastika ili staklo	Ohladiti na 1-5 °C; ili dodati koncentrirani H ₂ SO ₄ kako bi se pH smanjio na 1-2, zamrznuti na -20 °C i čuvati na tamnom mjestu.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; do 6 mjeseci za zakiseljene uzorke koji su zamrznuti i čuvaju se na tamnom mjestu.
Topivi/otopljeni COD	Plastika ili staklo	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm, ohladiti na 1-5 °C.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; do 6 mjeseci za zakiseljenje uzorke koji su zamrznuti i čuvaju se na tamnom mjestu.
VFA	Plastika ili staklo	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm, ohladiti na 1-5 °C; ili dodati koncentrirani H ₂ SO ₄ kako bi se pH smanjio na 1-2, zamrznuti na -20 °C i čuvati na tamnom mjestu.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; do 6 mjeseci za zakiseljene uzorke koji su zamrznuti i čuvaju se na tamnom mjestu.
Ukupni P	Plastika ili staklo oprano kiselinom (0,1 M HCl)	Dodati koncentrirani H ₂ SO ₄ kako bi se pH smanjio na 1-2 i zamrznuti na -20 °C.	6 mjeseci.
PO ₄	Plastika ili staklo oprano kiselinom (0,1 M HCl)	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm i ohladiti na 1-5 °C.	24 h.
NH ₄	Plastika ili staklo	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm, ohladiti na 1-5 °C; ili dodati koncentrirani H ₂ SO ₄ kako bi se pH smanjio na 1-2, zamrznuti na -20 °C i čuvati na tamnom mjestu.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; do 21 dan za zakiseljene uzorke koji su zamrznuti i čuvaju se na tamnom mjestu.
NO ₂	Plastika ili staklo	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm, ohladiti na 1-5 °C.	24 h.
NO ₃	Plastika ili staklo	Filtrirati odmah nakon prikupljanja kroz filter papir veličine pora 0,45 µm, ohladiti na 1-5 °C; ili dodati koncentrirani H ₂ SO ₄ kako bi se pH smanjio na 1-2, zamrznuti na -20 °C i čuvati na tamnom mjestu.	24 h za uzorke pohranjene na 1-5 °C; 7 dana za acidifirane uzorke koji su zamrznuti i čuvaju se na tamnom mjestu.
PHAs	Plastika	Nakon odgovarajućeg postupka uzorkovanja i pripreme (vidi odjeljak 2.2.5) čuvati na -20 °C ili -80 °C; i zamrzavanjem osušeni uzorci mogu se čuvati na -20 ili -80 °C.	Do 6 mjeseci.
Glikogen	Plastika ili staklo	Nakon odgovarajućeg postupka uzorkovanja i pripreme (vidi odjeljak 2.2.5) čuvati na -20 °C; i nakon digestije čuvati na -20 °C.	Do 6 mjeseci.
MLSS	Plastika ili staklo	Ohladiti na 1-5 °C.	2 dana.
MLVSS	Plastika ili staklo	Ohladiti na 1-5 °C.	24 h.

2.3.5 Priprema aktivnog mulja

Ove procedure smatraju da se šaržni testovi aktivnosti mogu provesti što je prije moguće nakon uzimanja uzoraka iz gradskih uređaja ili laboratorijskih sustava ili, u najgorem slučaju, unutar 24 h nakon uzorkovanja. Izvođenje šaržnih testova 24 h nakon uzimanja uzoraka aktivnog mulja se ne preporučuje zbog potencijalnih promjena koje kultura EBPR može doživjeti prilikom rukovanja (osim ako vrijeme izloženosti nakon uzorkovanja nije od posebnog interesa za izvođenje testova). Imajući na umu prethodne komentare, preporučuju se sljedeće tri procedure za pripremu uzoraka aktivnog mulja za izvođenje šaržnih testova aktivnosti:

- Ako se šaržni testovi aktivnosti mogu provesti u manje od 1 h nakon uzimanja uzorka mulja i ako uzorak mulja ne treba oprati:
 - a. Temperaturu šaržnog bioreaktora gdje će se odvijati testovi prilagodite ciljanoj temperaturi istraživanja.
 - b. Uzmite uzorak mulja:
 - i. Na kraju aerobnog bazena ili faze kako bi se proveli anaerobni šaržni testovi.
 - ii. Na kraju anaerobne faze ili bazena kako bi se proveli anoksični ili aerobni šaržni testovi.
 - c. Prebacite uzorak mulja u bioreaktor gdje će se odvijati šaržni testovi aktivnosti.
 - d. Dodajte otopinu ATU (ako je primjenjivo za cilj testa) do konačne koncentracije od 20 mg L⁻¹ (vidi odjeljak 2.3.3).
 - e. Započnite s nježnim miješanjem (50 - 100 rpm) i pratite temperaturu uzorka mulja tako da unutar bioreaktora postavite eksterni termometar (ako u strukturu nije ugrađen termometar).
 - f. Nastavite s miješanjem sve dok mulj ne postigne ciljanu temperaturu istraživanja.

- g. Održavajte iste redoks uvjete koji su prevladavali tijekom uzorkovanja sve dok šaržni testovi aktivnosti nisu spremni krenuti:
 - i. Izbjegavajte aeraciju uzoraka uzetih u anaerobnim uvjetima. Ako je dostupan, koristite zrakonepropustan bioreaktor i upuhujte plin dušik kako bi se izbjegao/smanjio prodor kisika.
 - ii. Izbjegavajte aeraciju uzoraka uzetih u anoksičnim uvjetima i po mogućnosti konačnoj koncentraciji dodajte otopinu nitrata od oko 10 mg NO₃-N L⁻¹ kako bi se održalo anoksično okruženje za vrijeme miješanja.
 - iii. Aerirajte uzorke mulja uzete u aerobnom bazenu ili u aerobnim uvjetima, održavajući koncentraciju otopljenog kisika većom od 2 mg L⁻¹.
- h. Mulj za izvođenje anaerobnih šaržnih testova: ako se u aerobnim uzorcima uzetima za izvođenje ovih testova (vidi odjeljak 2.2.3) otkrije nitrat, aeracija se mora zaustaviti, a uzorak mulja treba nježno miješati sve dok se nitrati više ne opažaju. Čim se nitrati više ne opažaju, mulj se odmah može koristiti za izvođenje anaerobnih šaržnih testova aktivnosti. Za brzu procjenu prisutnosti ovih spojeva mogu se koristiti indikatorski test papirići za otkrivanje nitrata ili nitrita (Sigma-Aldrich).
- i. Mulj za izvođenje anoksičnih i aerobnih šaržnih testova aktivnosti se onda može koristiti za provedbu testova unutar 1 h od uzorkovanja.
- Ako se šaržni testovi aktivnosti mogu provesti u manje od 1 h nakon uzimanja uzorka mulja uzorak aktivnog mulja treba oprati:
 - a. Temperaturu šaržnog bioraktora gdje će se odvijati testovi prilagodite ciljanoj temperaturi istraživanja. Uzmite uzorak mulja na kraju aerobnog bazena ili faze.
 - b. Operite mulj u otopinu nutrijenata (vidi odjeljak 2.3.3) na sljedeći način:
 - i. Odvojite biomasu taloženjem ili blagim centrifugiranjem (2.000-3.000 rpm u trajanju od 5 min) i pažljivo uklonite supernatant, pazeći pritom da se ne izgubi biomasa.
 - ii. Zamijenite volumen supernatanta istim volumenom otopine nutrijenata i nježno miješajte 5 min.
 - iii. Ponovite prethodnu proceduru pranja barem još jednom.
 - iv. Nakon zadnjeg ciklusa pranja, odvojite biomasu taloženjem ili blagim centrifugiranjem (2.000-3.000 rpm u trajanju od 5 min) i resuspendirajte mulj u istoj količini prethodno dodane otopine za pranje.
 - v. Oprani uzorak treba imati istu koncentraciju MLSS kao i u laboratorijskom sustavu ili gradskom uređaju sustavu u kojemu je uzet. Prema tome, definirajte i prilagodite volumen otopine nutrijenata dodane da se resuspendira oprani mulj kako bi se postigla ista koncentracija MLSS kao u originalnom izvoru.
 - c. Prebacite oprani uzorak mulja u bioreaktor gdje će se odvijati testovi šaržne aktivnosti.
 - d. Dodajte otopinu ATU (ako je primjenjivo za cilj testova) do konačne koncentracije od 20 mg L⁻¹ (vidi odjeljak 2.3.3).
 - e. Započnite s nježnim miješanjem (50 - 100 rpm) i pratite temperaturu uzorka mulja tako da unutar bioreaktora postavite eksterni termometar (ako u strukturu nije ugrađen termometar).
 - f. Nastavite s miješanjem sve dok mulj ne bude izložen ciljanoj temperaturi istraživanja najmanje 30 min.
 - g. Počnite aerirati uzorak mulja, održavajući koncentraciju otopljenog kisika višom od 2 mg L⁻¹, uz nježno miješanje dok ne započnu šaržni testovi aktivnosti.
 - h. Zbog izlaganja mulja aeriranim i neaeriranim uvjetima, preporučuje se jedino da se taj mulj koristi za izvođenje šaržnih testova aktivnosti koji počinju anaerobnom fazom (anaerobna-(anoksična)-aerobna). Izvođenje šaržnih testova aktivnosti koji počinju anoksičnom ili aerobnom fazom nije preporučljivo zato što koraci pranja mogu smanjiti unutarstanični sadržaj PHA i sadržaj poli-P zbog postupanja tijekom pranja.
- Ako se zbog lokacije i udaljenosti testovi ne mogu provesti unutar 1 ili 2 h nakon uzorkovanja (već unutar 24 h):
 - a. Temperaturu bioraktora prilagodite ciljanoj temperaturi istraživanja.
 - b. Uzorak mulja čuvajte na hladnom sve dok se test ne provede (npr. stavljanjem posude ili spremnika u hladnjak na temperaturu od 4 °C), pritom pazeći da se uzorak mulja ne aerira.
 - c. Prije izvođenja testa, uzorak mulja izvadite iz hladnjaka, hladnog spremnika ili hladne prostorije.
 - d. Sadržaj nježno promiješajte kako bi se dobio homogeni i reprezentativni uzorak s koncentracijom MLSS sličnom onoj u originalnom laboratorijskom ili u gradskom uređaju iz kojega je uzet.
 - e. Ako uzorak treba oprati, operite mulj u otopini nutrijenata (vidi odjeljak 2.3.3) na sljedeći način (u protivnom, preskočite korak pranja):

- i. Odvojite biomasu taloženjem ili blagim centrifugiranjem (2.000-3.000 rpm u trajanju od 5 min) i pažljivo uklonite supernatant, pazeći pritom da se ne izgubi biomasa.
- ii. Zamijenite volumen supernatanta istim volumenom otopine nutrijenata i nježno miješajte 5 min.
- iii. Ponovite prethodnu proceduru pranja barem još jednom.
- iv. Nakon zadnjeg ciklusa pranja, odvojite biomasu taloženjem ili blagim centrifugiranjem (2.000-3.000 rpm u trajanju od 5 min) i resuspendirajte mulj u istom volumenu prethodno dodane otopine nutrijenata.
- v. Budući da bi oprani uzorak trebao imati istu koncentraciju MLSS kao i u laboratorijskom ili gradskom uređaju u kojemu je uzet, definirajte i prilagodite volumen otopine nutrijenata kako bi se postigla ista koncentracija MLSS kao u originalnom izvoru.
- f. Prebacite oprani uzorak mulja u bioreaktor gdje će se odvijati šaržni test aktivnosti.
- g. Dodajte otopinu ATU do konačne koncentracije od 20 mg L⁻¹ (vidi odjeljak 2.3.3).
- h. Počnite aerirati uzorak mulja, održavajući koncentraciju otopljenog kisika višom od 2 mg L⁻¹, uz nježno miješanje.
- i. Pratite temperaturu uzorka mulja tako da unutar bioreaktora postavite eksterni termometar (ako u strukturu nije ugrađen termometar).
- j. Nastavite s aeriranjem i miješanjem najmanje 1 h (najviše 2 h), ali osigurajte da mulj bude izložen ciljanoj temperaturi istraživanja najmanje 30 min.
- k. Ako se otkrije nitrat nakon procedure za prilagodavanje temperature (vidi odjeljak 2.2.3 o pripremi uzorka aktivnog mulja), aeracija se mora zaustaviti. Nježno miješajte sve dok se nitrat više ne opaža. Nakon toga, mulj se može odmah koristiti za pokretanje i izvođenje testa anaerobne faze.
- l. Ako je uzorak 'opran', preporučuje se jedino da se taj mulj koristi za izvođenje šaržnih testova aktivnosti koji počinju anaerobnom fazom (npr. anaerobna-(anoksična)-aerobna), zato što koraci pranja mogu smanjiti unutarstanični sadržaj PHA i sadržaj poli-P zbog postupanja tijekom pranja. Prema tome, anaerobna je faza uvijek potrebna za nadopunu PHA sadržaja biomase.

2.4 Šaržni testovi aktivnosti: izvođenje

Jednom kada su eksperimentalna struktura, materijali, otopine i aktivni mulj spremni, može se provesti odgovarajući šaržni test aktivnosti. Radi lakšeg izvođenja i za potrebe evidentiranja i arhiviranja podataka, unaprijed treba pripremiti eksperimentalni plan provedbe. Tablica 2.10 sadrži predložak za eksperimentalni plan provedbe koji se može koristiti uz nužne izmjene za izvođenje svakog od šaržnih testova aktivnosti opisanih u odjeljcima koji slijede. Zbog posebnog metabolizma EBPR kultura, šaržni testovi aktivnosti EBPR mogu se kretati od anaerobnih do anoksičnih i aerobnih testova, uključujući njihove različite kombinacije, ovisno o svrsi ili cilju testa. Prema tome, u ovom se izvješću predstavljaju sljedeći šaržni testovi aktivnosti EBPR:

Oznaka testa	Redoks uvjeti	Kratak opis i svrha
EBPR.ANA.1	Anaerobni	Izvode se bezvanjskog izvora ugljika kako bi se procijenila endogena anaerobna aktivnost EBPR kultura.
EBPR.ANA.2	Anaerobni	Izvode se nakon dodavanja definirane koncentracije ugljika kako bi se odredila maksimalna anaerobna aktivnost EBPR kultura.
EBPR.ANA.3	Anaerobni	Izvode se nakon dodavanja viška izvora ugljika kako bi se procijenila maksimalna aktivnost EBPR kultura u uvjetima kad izvor ugljika nije limitirajući faktor
EBPR.ANOX.1	Anoksični	Izvode se s uzorcima aktivnog mulja uzetim na kraju anaerobne faze.
EBPR.ANOX.2	Kombinirani anaerobno-anoksični	Anaerobno-anoksični test proveden s muljem uzetim na kraju aerobne faze.
EBPR.AER.1	Aerobni	Izvodi se s muljem uzetim na kraju anaerobne ili anoksične faze kako bi se ocijenila aerobna aktivnost EBPR.
EBPR.AER.2	Kombinirani anaerobno-aerobni	Anaerobno-aerobni test proveden s muljem uzetim na kraju aerobne faze.
EBPR.AER.3	Kombinirani anaerobno-anoksično-aerobni u nizu	Anaerobno-anoksično-aerobni test proveden s muljem uzetim na kraju aerobne faze kako bi se ocijenile sekvencijske anaerobne, anoksične i aerobne aktivnosti EBPR.
EBPR.AER.4	Kombinirani istovremeni anaerobno-anoksično-aerobni	Nakon provođenja zajedničke anaerobne faze, paralelno se izvodi jedan anoksični test i jedan aerobni test s istim muljem kako bi se ocijenila anoksična i aerobna aktivnost EBPR za potrebe usporedbe.

2.4.1 Anaerobni šaržni testovi aktivnosti EBPR

Anaerobni šaržni test aktivnosti može trajati od 1 h do više od 8 h. Biomasa je osjetljiva na pH i temperaturu, tako da testove treba provesti pri temperaturi i pH od interesa, a fluktuacije treba izbjegavati. Testove treba izvoditi u odsutnosti akceptora elektrona (molekularni kisik, nitrat ili nitrit) (npr. pravi anaerobni uvjeti). Kako bi se izbjegao ili minimizirao prodor kisika, preporučuje se korištenje zrakonepropusnih reaktora/bioreaktora i, ako je dostupno, kontinuirano upuhivanje plinovitog N₂ tijekom čitavog izvođenja testa. Kako bi se uklonio nitrat prisutan u uzorku, tijekom pripreme uzorka (prije nego što se uzorak aerira) treba dodati ATU i mulj se može nježno miješati nekoliko minuta kako bi se uklonio sav preostali nitrat. Ovisno o svrsi anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, raspoloživost i prisutnost donora elektrona može varirati. Uvelike se provode sljedeći anaerobni testovi:

1. **Test EBPR.ANA.1.** Izvodi se u izostanku vanjskog izvora ugljika kako bi se procijenila endogena anaerobna aktivnost održavanja EBPR kultura.
2. **Test EBPR.ANA.2** Izvodi se nakon dodavanja definirane koncentracije ugljika (koji treba u cijelosti potrošiti tijekom trajanja anaerobnog testa): kako bi se odredila maksimalna brzina apsorpcije ugljika, maksimalna brzina otpuštanja P, konstanta polu-zasićenja za apsorpciju ugljika te povezana anaerobna stehiometrija kao što je omjer otpuštenog P i potrošenog ugljika.
3. **Test EBPR.ANA.3** Provodi se nakon dodavanja izvora ugljika koji premašuje koncentraciju koju bi EBPR kultura mogla potrošiti tijekom trajanja testa: kako bi se procijenila maksimalna koncentracija fosfora koji se može otpustiti i maksimalna koncentracija ugljika koju EBPR kulture mogu potrošiti u uvjetima kad izvor ugljika nije limitirajući faktor.

Budući da prisutnost i vrsta izvora ugljika ima glavnu ulogu u procesima EBPR, sakupljanje i priprema mulja su od velike važnosti. Te je testove poželjno provesti s aktivnim muljem uzetim na kraju aerobne faze (kako bi se minimizirala prisutnost originalno prisutnog izvora ugljika) i/ili nakon što se provede procedura pranja mulja. Prema tome, sljedeći protokoli za izvođenje anaerobnih šaržnih testova predlažu se ovisno o prisutnosti i dostupnosti vanjskog izvora ugljika:

Test EBPR.ANA.1 Anaerobni šaržni testovi EBPR koji se provode u izostanku donora elektrona

- a. Nakon što je mulj prikupljen, pripremljen i prenesen u šaržni bioreaktor (vidi odjeljak 2.3.5), uzorak držite aeriranim najmanje 30 min, uz istovremenu potvrdu da su pH i temperatura na ciljanoj vrijednosti od interesa. U protivnom, postavite odgovarajuće zadane vrijednosti (ako se koriste automatski kontrolori pH i temperature) ili ih podesite ručno. Pričekajte dok se ne postignu stabilni uvjeti.
- b. Kada se postignu stabilni operativni uvjeti, nekih 20 min prije početka testa uzmite prve uzorke vodene faze i biomase kako bi se odredile početne koncentracije parametara od interesa: izvor C, ukupni P, PO₄ i koncentracije MLSS i MLVSS. Mogu se prikupiti i uzorci za određivanje PHA i glikogena kako bi se ocijenile anaerobne stehiometrijske konverzije. Preporučuje se da se uzmu i uzorci medija kako bi se provjerile i potvrdile početne koncentracije.
- c. Za uzorkovanje, spojite štrcaljku, otvorite ili otpustite laboratorijsku stezaljku koja zatvara otvor za uzorkovanje te gurajte i vucite štrcaljku nekoliko puta dok se ne prikupi homogeni uzorak (obično je potrebno oko 5 puta). Zatim, kada je štrcaljka puna, zatvorite stezaljku i uklonite štrcaljku.
- d. Uzorke za određivanje topivih tvari treba smjestiti filtrirati (kroz filtar s veličinom pora 0,45 μm). Ostale uzorke (npr. PHA, glikogen) treba pripremiti u skladu s odgovarajućim protokolima opisanim ranije u ovom izvješću.
- e. Za vrijeme izvođenja testa, privremeno pohranite uzorke na temperaturi od 4 °C u hladnjaku ili po mogućnosti u hladnom spremniku s ledom.
- f. 10 min prije početka testa zaustavite aeraciju i zatvorite bioreaktor.
- g. Ako je dostupno, počnite upuhivati plinoviti N₂ i nastavite s upuhivanjem do kraja šaržnog testa. Osigurajte odgovarajući izlaz kojim će se omogućiti izlaz plina N₂ i izbjeći nakupljanje nadtlaka (koji može dovesti do plavljenja i gubitka biomase). Ako nije izvedivo kontinuirano upuhivanje plina N₂ tijekom čitavog šaržnog testa, upuhujte plinoviti N₂ 10 min (alternativno bi se mogao koristiti neki drugi prikladni plin za uklanjanje prisutnog kisika i izbjegavanje njegovog prodora), nakon čega držite bioreaktor u zrakonepropusnim uvjetima.
- h. Počnite s izvođenjem anaerobnog testa s početnim vremenom nula. Pratite vrijeme izvođenja pomoću zapornog sata.

- i. Trajanje i uzorkovanje:
 - i. Ako treba odrediti jedino brzinu otpuštanja P za anaerobno endogeno održavanje P, test može trajati 1 h ili najviše 2 h uz kontinuirano uzorkovanje svakih 15 min za određivanje PO_4 koji je otpustila biomasa (PAO) u izostanku vanjskog ugljika.
 - ii. Ako su od interesa i brzina konverzije glikogena pri anaerobnom endogenom održavanju te stehiometrijske konverzije, anaerobne testove se mora produžiti za do 6 odnosno 8 h (preporučeno). Uzorci za određivanje PO_4 se mogu prikupljati svakih 30 min zajedno s uzorcima za određivanje PHA i glikogena.
 - iii. Anaerobni test zaključite uzimanjem uzoraka za određivanje COD, ukupnog P, PO_4 i koncentracija MLSS i MLVSS, kao i za PHA i glikogen (ako je primjenjivo).
- j. Osigurajte da tijekom izvođenja šaržnog testa ne dođe do značajnijih varijacija u temperaturi i pH (viša od $1\text{ }^\circ\text{C}$ za temperaturu, odnosno $\pm 0,1$ za pH) i da očitavanja DO ostanu ispod granica detekcije. Pobrinite se da su sve korištene elektrode kalibrirane nedugo prije izvođenja testa.
- k. Organizirajte uzorke i osigurajte da su svi uzorci cjeloviti i propisno obilježeni kako bi se izbjeglo miješanje uzoraka i ostale trivijalne pogreške.
- l. Dok se prikupljeni uzorci ne analiziraju, čuvajte i pohranite ih kako je preporučeno odgovarajućim analitičkim procedurama.
- m. Očistite opremu i poduzmite odgovarajuće mjere kako bi se sačuvali i očuvali različiti senzori, oprema i materijali.
- n. Zadržite mulj (dio) korišten u testu za moguće kasnije korištenje (npr. za identifikaciju mikroba).

Test EBPR.ANA.2 Anaerobni šaržni testovi EBPR koji se provode uz definirano dodavanje donora elektrona

- a. Ponoviti korake od 'a' do 'g' iz testa EBPR.ANA.1.
- b. Za anaerobne testove koji se izvode uz prisutnost vanjskog izvora ugljika (donor elektrona), testovi počinju s početnim vremenom nula uz dodavanje prave ili sintetičke otpadne vode (kao otopina izvora ugljika).
- c. Za izvođenje testova, preporučuju se sljedeće koncentracije MLVSS i RBCOD ovisno o porijeklu uzoraka mulja:
 - i. Uzorci mulja iz gradskog uređaja s aktivnim muljem: dodajte izvor RBCOD kako bi se postigao početni omjer RBCOD-MLVSS u bioreaktoru od između $0,025$ i $0,050\text{ mg COD mg VSS}^{-1}$. Na primjer, pomiješajte izvor RBCOD sa svježim aktivnim muljem tako da početna koncentracija RBCOD u bioreaktoru iznosi između 50 i 100 mg COD L^{-1} , a početna koncentracija MLVSS oko $2.000\text{ mg VSS L}^{-1}$. Nizak omjer RBCOD-MLVSS je poželjan kako bi se osigurala potrošnja RBCOD tijekom trajanja anaerobnog testa.
 - ii. Uzorci mulja iz laboratorijskih sustava s aktivnim muljem: izvor RBCOD se može dodati kako bi se postigao početni omjer RBCOD-MLVSS u bioreaktoru između $0,05$ i $0,10\text{ mg COD mg VSS}^{-1}$. Na primjer, nakon miješanja početna koncentracija RBCOD može se kretati između 100 i 300 mg COD L^{-1} , a MLVSS između 2.000 i $3.000\text{ mg VSS L}^{-1}$. Mogu biti prihvatljive i više koncentracije sve dok se COD u potpunosti ne potroši tijekom trajanja anaerobne faze. Ipak, treba izbjegavati koncentracije COD više od 800 mg COD L^{-1} zato što to može biti inhibitorno za biomasu (osobna opažanja autora).
- d. Nakon dodavanja otpadne vode, pratite vrijeme izvođenja i uzorkovanja pomoću zapornog sata.
- e. Trajanje i uzorkovanje:
 - i. Testovi mogu trajati između 2 i 4 h .
 - ii. Kako bi se odredili anaerobni kinetički parametri, uzorke za određivanje topivog COD i PO_4 treba uzimati svakih 5 min u prvih $30\text{--}40\text{ min}$ izvođenja testa. Nakon tog razdoblja, učestalost uzorkovanja se može smanjiti na svakih 10 ili 15 min tijekom prvog sata, a kasnije na svakih 15 ili 30 min dok test ne završi.
 - iii. Ako je od interesa anaerobna kinetička konverzija PHA i glikogena, uzorke treba uzeti u isto vrijeme kao i uzorke za određivanje COD i PO_4 .
 - iv. Za stehiometrijske konverzije, uzorke za određivanje PHA i glikogena se mora uzeti na početku i kraju testa.
 - v. Zaključite anaerobni test uzimanjem uzoraka za određivanje izvora C i/ili COD (ovisno o parametrima od interesa), ukupnog P, PO_4 i koncentracija MLSS i MLVSS, kao i za PHA i glikogen (ako je primjenjivo).
- f. Ponovite korake od 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

Test EBPR.ANA.3 Anaerobni šaržni EBPR testovi koji se izvode nakon dodavanja viška donora elektrona

- a. Ponoviti korake od 'a' do 'g' iz testa EBPR.ANA.1.
- b. Za anaerobne testove koji se izvode uz prisutnost vanjskog izvora ugljika (donor elektrona), testovi počinju s početnim vremenom nula uz dodavanje prave ili sintetičke otpadne vode (kao otopina izvora ugljika).
- c. Za izvođenje testova, preporučuju se sljedeće koncentracije MLVSS i RBCOD ovisno o porijeklu uzoraka mulja:
 - i. Uzorci mulja iz gradskog uređaja s aktivnim muljem: Provedite anaerobne testove uz početni omjer RBCOD-MLVSS u bioreaktoru viši od 0,15 mg COD mg VSS⁻¹ nakon miješanja izvora RBCOD i mulja. Na primjer, za uzorke mulja s koncentracijama MLVSS od oko 2.000, dodajte 300 mg COD L⁻¹ izvora RBCOD od interesa. Mogu se dodati veće koncentracije, ali treba izbjegavati dodavanje više od 800 mg COD L⁻¹ budući da se pokazalo da je to inhibitorno za EBPR kulture (osobno opažanje autora). Ako se potroši sav RBCOD, može se dodati još RBCOD sve dok se skroz ne potroši. Praćenje profila koncentracije PO₄ tijekom izvođenja testa može se koristiti kao neizravna metoda ocjene je li mulj dosegnuo svoj maksimalni kapacitet uklanjanja/apsorpcije RBCOD. To se može primijeniti ako nakon dodatne doze izvora RBCOD nema značajnijeg povećanja u koncentracijama PO₄ (npr. manje od 2-3 mg PO₄-P L⁻¹ tijekom 30-60 min, što odgovara anaerobnom endogenom otpuštanju P).
 - ii. Uzorci mulja iz laboratorijskih sustava s aktivnim muljem: slično uzorcima mulja iz gradskog sustava, primijenite početni omjer RBCOD-MLVSS u bioreaktoru veći od 0,2 mg COD mg VSS⁻¹ (nakon miješanja izvora COD i mulja). Laboratorijske kulture, naročito iz sustava EBPR, imaju prilično velik kapacitet uklanjanja RBCOD, što može zahtijevati ponavljanje dodavanja COD više od dva puta sve dok se više ne opaža daljnja apsorpcija COD. Na primjer, za uzorke mulja s koncentracijama MLVSS od između 2.000 i 3.000 mg L⁻¹, dodajte barem 400 mg COD L⁻¹ izvora RBCOD od interesa, ali izbjegavajte dodavanje više od 800 mg COD L⁻¹ (zbog potencijalno inhibitornog djelovanja na EBPR kulture). Ako se potroši sav RBCOD, može se dodati još RBCOD sve dok se ne opazi preostali COD. Praćenje profila koncentracije PO₄ tijekom izvođenja testa može se koristiti kao neizravna metoda ocjene je li mulj dosegnuo svoj maksimalni kapacitet uklanjanja RBCOD. Ovaj se pristup može primijeniti ako nakon dodatne doze izvora RBCOD nema značajnijeg povećanja u koncentracijama PO₄ (npr. manje od 2-3 mg PO₄-P L⁻¹ tijekom 30-60 min).
- d. Odmah nakon dodavanja otpadne vode, počnite pratiti vrijeme izvođenja pomoću zapornog sata.
- e. Trajanje i uzorkovanje:
 - i. Testovi mogu trajati više od 2-4 h za uzorke iz gradskog uređaja, a čak još i dulje za laboratorijske sustave ovisno o sadržaju poli-P i glikogena u biomasi.
 - ii. Kako bi se odredili anaerobni kinetički parametri, uzorke za određivanje izvora C i/ili COD (ovisno o paramterima od interesa) i PO₄ treba uzimati svakih 5 min u prvih 30-40 min izvođenja testa. Nakon tog razdoblja, učestalost uzorkovanja se može smanjiti na svakih 10 ili 15 min tijekom prvog sata, a kasnije na svakih 15 ili 30 min dok test ne završi.
 - iii. Ako je od interesa anaerobna kinetička konverzija PHA i glikogena, uzorci se mogu uzimati u isto vrijeme kao i uzorci za određivanje izvora C i/ili COD i PO₄.
 - iv. Za stehiometrijske konverzije, uzorke za određivanje PHA i glikogena se mora uzeti na početku i kraju testa.
 - v. Prije završetka testova, dodajte dodatnu koncentraciju COD. Pričekajte 10-15 min i uzmite zadnji uzorak za određivanje COD i PO₄. Ako se ne opazi dodatna apsorpcija COD i otpuštanje P, to će pomoći potvrditi je li test zaista proveden u uvjetima kad COD nije limitirajući faktor.
 - vi. Zaključite anaerobni test uzimanjem uzoraka za određivanje izvora C i/ili COD, ukupnog P, PO₄ i koncentracija MLSS i MLVSS, kao i za PHA i glikogen (ako je primjenjivo).
- f. Ponovite korake od 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

2.4.2 Anoksični šaržni testovi EBPR

Anoksični šaržni testovi EBPR provode se kako bi se procijenilo simultano uklanjanje ortofosfata i nitrata (ili nitrita) od strane PAO. Može ih se provoditi s uzorcima aktivnog mulja iz gradskog uređaja ili laboratorijskih sustava, korištenjem prave ili sintetičke otpadne vode. Važno je da biomasa EBPR kad je izložena anoksičnim uvjetima ima dovoljno dostupnih unutarstanično pohranjenih PHA kao izvora ugljika i energije za apsorpciju P, formiranje glikogena, rast i održavanje biomase (slika 2.1). U svakom

slučaju, ne dodaje se nikakav vanjski izvor ugljika. Uzorci mulja se mogu uzeti na kraju anaerobne faze, sve dok je RBCOD u cijelosti potrošen (i stoga odsutan iz aktivnog mulja). Kako bi se osigurala dostupnost PHA, preporučuje se izbjegavanje pranja aktivnog mulja ili biomase između prikupljanja mulja i baratiranja muljem na kraju anaerobne faze i početka anoksičnog šaržnog testa. U iznimnim okolnostima (npr. kad se sumnja na prisutnost toksičnih spojeva), uzorci aktivnog mulja se mogu prati sve dok se strogi anaerobni uvjeti mogu stvarati tijekom procedure pranja (komplicirana procedura u praksi). Umjesto toga, mulj se može prikupiti na kraju aerobne faze, a anoksični test EBPR može početi prethodnim anaerobnim šaržnim testom uz definirano dodavanje donora elektrona (slično testu EBPR.ANA.2, opisanom u odjeljku 2.4.1). Prema tome, predlažu se sljedeći anoksični šaržni testovi aktivnosti:

1. **Test EBPR.ANOX.1** Pojedinačan anoksični test EBPR koji se provodi s uzorcima aktivnog mulja uzetima na kraju anaerobne faze.
2. **Test EBPR.ANOX.2** Kombiniran anaerobno-anoksični šaržni test EBPR. Anoksični šaržni test EBPR se provodi nakon prethodne anaerobne faze s muljem prikupljenim na kraju aerobne faze.

Svaki test opisan je u nastavku:

Test EBPR.ANOX.1 Pojedinačni anoksični šaržni testovi EBPR

- a. Uzmite uzorak aktivnog mulja u gradskom uređaju ili laboratorijskom uređaju na kraju anaerobne faze. Pripremite ga i prebacite u šaržni bioreaktor kako je opisano u odjeljku 2.3.5. Držite uzorak u anaerobnim uvjetima najmanje 30 min, uz istovremenu potvrdu da su pH, DO i temperatura na ciljanim vrijednostima od interesa (u protivnom ih korigirajte i pričekajte dok se ne postignu stabilni uvjeti).
- b. Ponovite korake 'b' do 'e' iz testa EBPR.ANA.1.
- c. Ako je dostupno, upuhajte plinoviti N_2 kontinuirano do kraja šaržnog testa. Osigurajte odgovarajući izlaz za plinoviti N_2 i izbjegavajte nadtlak. Ako se ne može primijeniti kontinuirano upuhivanje plina N_2 tijekom čitavog šaržnog testa, upuhajte plinoviti N_2 10 min (alternativno se može koristiti neki drugi prikladni plin za uklanjanje prisutnog kisika i izbjegavanje njegovog prodora), nakon čega bioreaktor treba ostati zrakonepropustan.
- d. Počnite s izvođenjem anoksičnog EBPR testa s početnim vremenom nula uz dodavanje nitrata ili nitrita (ovisno o konačnom akceptoru elektrona od interesa). Treba koristiti iste operativne uvjete poput onih korištenih za anaerobne testove kako bi se izbjegao prodor kisika (vidi test EBPR.ANA.1).
- e. Trajanje i uzorkovanje anoksičnog šaržnog testa EBPR:
 - i. Anoksični test EBPR može trajati između 2 i 4 h.
 - ii. Ovisno o konačnom akceptoru elektrona od interesa:
 - Anoksični testovi EBPR s nitratom (NO_3^-) kao konačnim akceptorom elektrona:

Za uzorke aktivnog mulja izložene prisutnosti nitrata, na početku anoksične faze može se dodati do $20 \text{ mg } NO_3\text{-N L}^{-1}$. S druge strane, ne preporučuje se dodavanje više od $20 \text{ mg } NO_3\text{-N L}^{-1}$ uzrocima aktivnog mulja koji nisu redovno izloženi visokim koncentracijama nitrata. Ipak, ako se potroši sav nitrat, može se dodati dodatnih $20 \text{ mg } NO_3\text{-N L}^{-1}$ kako bi se produžilo trajanje anoksične faze sve dok se više ne opaža daljnja anoksična apsorpcija P.
 - Anoksični testovi EBPR s nitritom (NO_2^-) kao konačnim akceptorom elektrona:

Uzorci aktivnog mulja obično nisu izloženi velikim koncentracijama nitrita, osim ako nisu aklimatizirani na prisustvo ovog akceptora elektrona (u iznimnim/posebnim slučajevima). Prema tome, za uzorke aktivnog mulja izložene prisutnosti nitrita, na početku anoksične faze može se dodati do $20 \text{ mg } NO_2\text{-N L}^{-1}$. S druge strane, ne preporučuje se dodavanje više od $10 \text{ mg } NO_2\text{-N L}^{-1}$ uzrocima aktivnog mulja koji nisu redovno izloženi visokim koncentracijama nitrita. U potonjem slučaju, ako se potroši sav nitrit, može se dodati dodatnih $10 \text{ mg } NO_2\text{-N L}^{-1}$ kako bi se osigurala dostupnost akceptora elektrona i anoksična faza se može produžiti sve dok se više ne opaža daljnja anoksična apsorpcija P.
 - iii. Budući da se analitičko određivanje nitrata ili nitrita ne može odrediti onoliko brzo koliko je potrebno za praćenje njihove prisutnosti tijekom testa, indikatorski test papirići za detekciju nitrata i/ili nitrita (Sigma-Aldrich) mogu se koristiti za brzu procjenu njihove prisutnosti i u određenoj mjeri točnosti njihove koncentracije, kao i za ocjenu jesu li još uvijek prisutni anoksični uvjeti ili se mora dozirati dodatni nitrat ili nitrit.

- iv. Za procjenu anoksičnih kinetičkih parametara, uzorke za određivanje izvora C (ili topivog COD ovisno o analitičkom parametru od interesa) i PO_4 treba uzimati svakih 5 min u prvih 30 min izvođenja testa. Nakon tog razdoblja, učestalost uzorkovanja se može smanjiti na svakih 10 ili 15 min tijekom prvog sata, a kasnije na svakih 15 ili 30 min dok test ne završi.
- v. Ako su od interesa anoksične kinetičke konverzije PHA i glikogena, uzorci se mogu uzeti u isto vrijeme kad i uzorci za određivanje PO_4 .
- vi. Kako bi se procijenile anoksične stehiometrijske konverzije, uzorke za analitičko određivanje ukupnog P, PO_4 , NO_3 (ili NO_2 , i koncentracija MLSS i MLVSS, kao i za PHA i glikogen (ako je primjenjivo), treba uzeti i na početku i na kraju anoksične faze.
- f. Zaključite anoksični test uzimanjem zadnjih uzoraka potrebnih za procjenu anoksičnih stehiometrijskih konverzija.
- g. Ponovite korake od 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

Test EBPR.ANOX.2 Kombinirani anaerobno-anoksični šaržni testovi EBPR

- a. Ponovite korake 'a' do 'g' iz testa EBPR.ANA.1 i korake 'b' do 'f' iz testa EBPR.ANA.2. Nakon toga, nastavite s izvođenjem anoksične faze.
- b. Odmah nakon što završi anaerobna faza, anoksični šaržni test EBPR može odmah započeti dodavanjem nitrata ili nitrita (test EBPR.ANOX.1, korak 'd'). Kako bi se izbjegao prodor kisika moraju se koristiti isti operativni uvjeti poput onih korištenih za anaerobne testove (npr. test EBPR.ANA.1).
- c. Trajanje i uzorkovanje anoksičnog šaržnog testa EBPR: ponovite korak 'e' iz testa EBPR.ANOX.1.
- d. Ponovite korake 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

2.4.3 Aerobni šaržni testovi EBPR

Aerobni šaržni testovi EBPR se mogu provoditi kako bi se ocijenila apsorpcija ortofosfata od strane PAO u sustavima aktivnog mulja. Može ih se provoditi s uzorcima aktivnog mulja iz gradskog sustava ili laboratorijskih sustava pomoću prave ili sintetičke otpadne vode/otopina. Slično anoksičnim testovima EBPR, važno je da EBPR biomasa kad je izložena aerobnim uvjetima ima dovoljno dostupnih unutarstanično pohranjenih PHA kao izvor ugljika i energije za apsorpciju P, formiranje glikogena, rast i održavanje biomase (slika 2.1). Kako bi se osigurala dostupnost unutarstanično pohranjenih PHA, aerobni šaržni testovi moraju biti (i) provedeni s uzorcima aktivnog mulja uzetim na kraju anaerobne ili anoksične faze (ovisno o konfiguraciji uređaja za obradu otpadne vode) ili (ii) provedeni nakon anaerobnog šaržnog testa, a prije provođenja aerobnog testa. U svakom slučaju, tijekom aerobne faze ne dodaje se nikakav vanjski izvor ugljika. Prema tome, uzorci se mogu uzimati na kraju anaerobne faze tako dugo dok nije prisutan RBCOD. Alternativno, aerobni se test može provesti u nizu nakon anaerobno-anoksičnog testa (Test EBPR.ANOX.1) što rezultira anaerobno-anoksično-aerobnim testom ili paralelno s anoksičnim testom nakon izvođenja anaerobnog testa (Test EBPR.ANA.2) (Wachtmeister i sur., 1997). Preporučuje se izbjegavanje pranja aktivnog mulja ili biomase između prikupljanja mulja i baratanja muljem iz anaerobne ili anoksične faze i početka aerobnog šaržnog testa kako bi se smanjila potencijalna oksidacija PHA. Ako biomasu treba oprati (npr. kad se sumnja na prisutnost toksičnih spojeva), tada anaerobni test uvijek treba provesti prije aerobnog šaržnog testa uz definiranu prisutnost donora elektrona (Test EBPR.ANA.2). Prema tome, mogu se predložiti sljedeći aerobni šaržni testovi EBPR (s i bez prethodne anaerobne ili anoksične faze):

1. **Test EBPR.AER.1** Pojedinačni aerobni test EBPR koji se provodi s muljem prikupljenim na kraju anaerobne ili anoksične faze kako bi se ocijenila aerobna aktivnost EBPR na unutarstaničnim polimerima pohranjenima u originalnom izvoru mulja.
2. **Test EBPR.AER.2** Kombinirani anaerobno-aerobni šaržni testovi EBPR koji se provode kako bi se osigurala definirana koncentracija unutarstaničnih PHA da se zadovolje aerobne metaboličke potrebe pomoću mulja prikupljenog na kraju aerobne faze.
3. **Test EBPR.AER.3** Kombinirani anaerobno-anoksično-aerobni šaržni testovi EBPR u nizu koji se provode s muljem prikupljenim na kraju aerobne faze kako bi se ocijenila sekvencijska anaerobna, anoksična i aerobna aktivnost EBPR nakon što se osigurala definirana koncentracija unutarstanično pohranjenih PHA.
4. **Test EBPR.AER.4** Kombinirani paralelni anaerobno-anoksično-aerobni šaržni testovi EBPR koji se provode s muljem prikupljenim na kraju aerobne faze kako bi se ocijenila paralelna anoksična i

aerobna aktivnost EBPR nakon anaerobne faze. Budući da je anaerobni test zajednički, mulj ima isti sadržaj unutarstanično pohranjenih polimera na početku anoksičnog i aerobnog testa, tako da se i anoksična i aerobna aktivnost EBPR mogu usporediti jedna s drugom i u nekim se slučajevima čak mogu provoditi paralelno (obično privilegija iskusnijih eksperimentatora).

U nastavku slijedi opis različitih koraka uključenih u izvođenje aerobnih testova EBPR:

Test EBPR.AER.1 Pojedinačan aerobni EBPR test

- a. Prikupite mulj u anaerobnoj fazi ili anoksičnoj fazi u skladu s preporukama za uzorkovanje i pripremu aktivnog mulja opisanima u odjeljku 2.3.5. Važno je napomenuti da se pojedinačni aerobni testovi mogu provoditi jedino kad se testovi mogu provesti odmah nakon prikupljanja (i po mogućnosti uz izbjegavanje procedure pranja).
- b. Nakon što prebacite aktivni mulj, održavajte redoks uvjete jednake onima koji su prevladavali u spremniku iz kojega je uzet mulj (npr. anaerobni ili anoksični) kako je opisano u odjeljku 2.3.5 najmanje 30 min, uz istovremenu potvrdu da su pH i temperatura na ciljanim vrijednostima od interesa (u protivnom ih korigirajte i pričekajte dok se ne postignu stabilni uvjeti). Nemojte početi s aeriranjem uzorka i, ako je dostupno, upuhujte plinoviti N₂ (ili neki drugi dostupni plin) kako bi se izbjegao prodor kisika.
- c. Ponovite korake 'b' do 'e' iz testa EBPR.ANA.1.
- d. Test počinje s početnim vremenom nula dobavom zraka (ili čistog kisika), pri čemu treba osigurati da koncentracija DO u odnosu na koncentraciju zasićenosti DO u lokalnim uvjetima dosegne barem 2,0 mg DO L⁻¹ u prvih 10 min izvođenja aerobnog testa i oko 4-5 mg DO L⁻¹ nakon toga.
- e. Nakon što započne dobava zraka, pratite vrijeme izvođenja i uzorkovanja pomoću zapornog sata.
- f. Trajanje i uzorkovanje aerobne faze:
 - i. Aerobni test EBPR može trajati između 2 - 4 h.
 - ii. Koncentracija DO u tekućem dijelu suspenzije može se pratiti tijekom čitavog testa pomoću sonde za otopljeni kisik.
 - iii. Za procjenu aerobnih kinetičkih parametara, uzorci za određivanje PO₄ se moraju uzimati svakih 5 min u prvih 30-40 min izvođenja testa. Nakon tog razdoblja, učestalost uzorkovanja se može smanjiti na svakih 10 ili 15 min tijekom prvog sata, a kasnije na svih 15 ili 30 min dok test ne završi.
 - iv. Ako su od interesa aerobne kinetičke konverzije PHA i glikogena, uzorci se mogu uzimati u isto vrijeme kad i uzorci za određivanje PO₄.
 - v. Kako bi se procijenile aerobne stehiometrijske konverzije, uzorci za analitičko određivanje ukupnog P, PO₄, i koncentracija MLSS i MLVSS, kao i za PHA i glikogen (ako je primjenjivo), se moraju uzeti i na početku i na kraju aerobne faze. Međutim, ukupnu potrošnju kisika mora se odrediti respirometrijom.
- g. Zaključite aerobni test EBPR uzimanjem zadnjih uzoraka potrebnih za procjenu anoksičnih stehiometrijskih konverzija.
- h. Ponovite korake 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

Test EBPR.AER.2 Kombinirani anaerobno-aerobni šaržni testovi EBPR

- a. Provedite anaerobni test kako slijedi:
 - i. Ponovite korake 'a' do 'g' iz testa EBPR.ANA.1.
 - ii. Nakon toga, provedite korake 'b' do 'e' iz testa EBPR.ANA.2.
- b. Odmah nakon provođenja anaerobnog testa, može početi aerobni šaržni test EBPR upuhivanjem zraka ili čistog kisika, pri čemu treba osigurati da koncentracija DO u odnosu na koncentraciju zasićenosti DO u lokalnim uvjetima dosegne barem 2,0 mg DO L⁻¹ u prvih 10 min izvođenja aerobnog testa i oko 4-5 mg DO L⁻¹ nakon toga.
- c. Ponovite korak 'f' iz testa EBPR.AER.1.
- d. Ponovite korake 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

Test EBPR.AER.3 Kombinirani anaerobno-anoksično-aerobni šaržni testovi EBPR u nizu

- a. Provedite anaerobni test kako slijedi:
 - i. Ponovite korake 'a' do 'g' iz testa EBPR.ANA.1.
 - ii. Nakon toga, provedite korake 'b' do 'e' iz testa EBPR.ANA.2.

- b. Odmah nastavite s izvođenjem anoksičnog testa ponavljanjem koraka 'd' i 'e' iz testa EBPR.ANOX.1.
- c. Nakon anoksičnog testa, nastavite s izvođenjem aerobne faze ponavljanjem koraka 'd' do 'g' iz testa EBPR.AER.1.
- d. Ponovite korake 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

Test EBPR.AER.4 Kombinirani paralelni anaerobno-anoksično-aerobni šaržni testovi EBPR

- a. Ovaj test zahtijeva dva (po mogućnosti identična) reaktora: jedan za izvođenje anaerobno-anoksične faze, a drugi za izvođenje pojedinačnog aerobnog testa. To se postiže tako da se, na kraju anaerobnog testa, određeni volumen (obično 50 %) prebaci iz bioreaktora gdje će se odvijati anaerobno-anoksični test u drugi bioreaktor gdje će se provesti aerobni test. U tu svrhu, preporučuju se koraci opisani u nastavku.
- b. Provedite anaerobni test kako slijedi:
 - i. Ponovite korake 'a' do 'g' iz testa EBPR.ANA.1.
 - ii. Nakon toga, provedite korake 'b' do 'e' iz testa EBPR.ANA.2.
- c. Kada završi anaerobna faza, prebacite 50 % aktivnog mulja prisutnog u anaerobnom bioreaktoru u prazni bioreaktor (aerobni bioreaktor).
- d. Nastavite s izvođenjem anoksičnog testa u istom bioreaktoru gdje se odvijao anaerobni test ponavljanjem koraka 'd' i 'e' iz testa EBPR.ANOX.1.
- e. U isto vrijeme, provedite aerobni test u drugom bioreaktoru (u koji je prebačen mulj) ponavljanjem koraka 'd' do 'g' iz testa EBPR.AER.1. Napominjemo da izvođenje dva (anoksični i aerobni) paralelna testa zahtijeva naprednije vještine rukovanja. Dva alternativna pristupa su da ili dvije osobe provedu testove ili da se testovi provedu jedan iza drugog.
- f. Ponovite korake 'j' do 'n' iz testa EBPR.ANA.1.

2.5 Analiza podataka

2.5.1 Procjena stehiometrijskih parametara

Prije procjene stehiometrijskih i kinetičkih parametara, trebalo bi napraviti bilancu COD kako bi se validirali rezultati i potvrdila njihova kvaliteta i pouzdanost (Barker i Dold, 1995). Prilično važan alat za procjenu pouzdanosti podataka je bilanca COD. U teoriji, COD se mora očuvati u pravom anaerobnom sustavu tako da ukupni COD koji ulazi u anaerobnu fazu mora biti jednak ukupnom COD koji izlazi iz anaerobne faze (Wentzel i sur., 2008). Prema tome, pod pretpostavkom da su topivi COD, unutarstanični PHA i glikogen jedine sastavnice ugljika uključene u kemijske transformacije, bilanca COD se može provesti kako slijedi:

$$\text{COD}_{\text{B,cons}} + \text{COD}_{\text{GLY,cons}} = \text{COD}_{\text{PHA,prod}} \quad 2.1$$

gdje je:

$\text{COD}_{\text{B,cons}}$ koncentracija biološki razgradivog supstrata, kao COD, potrošenog tijekom trajanja anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, u mg COD L⁻¹.

$\text{COD}_{\text{GLY,cons}}$ koncentracija unutarstaničnog glikogena potrošenog tijekom trajanja anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, u mg COD L⁻¹.

$\text{COD}_{\text{PHA,prod}}$ koncentracija unutarstaničnih PHA formiranih ili pohranjenih tijekom trajanja anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, u mg COD L⁻¹.

Isto tako, postotak pogreške za zatvaranje bilance COD (ΔCOD (%)) može se procijeniti kao:

% bilance COD = [1 –

$$\frac{\text{COD}_{\text{B,cons}} + \text{COD}_{\text{GLY,cons}} - \text{COD}_{\text{PHA,prod}}}{\text{COD}_{\text{B,cons}} + \text{COD}_{\text{GLY,cons}} + \text{COD}_{\text{PHA,prod}}}] \cdot 100 \quad 2.2$$

U idealnom slučaju, ΔCOD (%) bi trebao biti niži od 1-5 %, no vrijednosti od čak 15 % se često prijavljuju i smatraju se prihvatljivima u pogledu, i ovisno o, kvaliteti podataka i nesigurnosti koju stvara određivanje određenih parametara (naročito glikogena).

Slično anaerobnim transformacijama, bilanca COD može biti važan alat za procjenu pouzdanosti podataka dobivenih u anoksičnim i aerobnim šaržnim testovima aktivnosti (Ekama i Wentzel, 2008a,b). Prema tome, ukupna količina potrošenih konačnih akceptora elektrona bi trebala biti jednaka ukupnoj količini oksidiranih donora elektrona. Za aerobne transformacije koje se odvijaju tijekom aerobnog testa EBPR, bilanca COD se može provesti na sljedeći način:

$$\Delta\text{COD}_{\text{cons}} = \text{COD}_{\text{input}} - \text{COD}_{\text{output}} = \Delta\text{O}_{2,\text{cons}} \quad 2.3$$

Pod pretpostavkom da su PHA, glikogen (GLY) i biomasa (Bio) jedine sastavnice COD koje se mijenjaju za vrijeme anoksične ili aerobne faze, neto potrošnja COD može se izračunati na sljedeći način:

$$\text{COD}_{\text{PHA,cons}} - \text{COD}_{\text{GLY,prod}} - \text{COD}_{\text{Bio,prod}} = \Delta\text{O}_{2,\text{cons}} \quad 2.4$$

gdje je:

$\text{COD}_{\text{PHA,cons}}$ ukupna koncentracija potrošnje PHA tijekom anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, u mg COD L⁻¹.

$\text{COD}_{\text{GLY,prod}}$ ukupna koncentracija proizvedenog glikogena tijekom anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, u mg COD L⁻¹.

$\text{COD}_{\text{Bio,prod}}$ ukupna koncentracija proizvedene biomase tijekom anaerobnog šaržnog testa aktivnosti, u mg COD L⁻¹.

$\Delta\text{O}_{2,\text{cons}}$ ukupna koncentracija kisika potrošenog u aerobnom šaržnom testu aktivnosti procijenjena na temelju brzine respirometrije i apsorpcije kisika u mg COD L⁻¹.

Postotak pogreške za zatvaranje bilance COD (ΔCOD (%)) može se procijeniti kao:

% bilance COD = [1 –

$$\frac{\text{COD}_{\text{PHA,cons}} - \text{COD}_{\text{GLY,prod}} - \text{COD}_{\text{Bio,prod}} - \Delta\text{O}_{2,\text{cons}}}{\text{COD}_{\text{PHA,cons}} + \text{COD}_{\text{GLY,prod}} + \text{COD}_{\text{Bio,prod}} + \Delta\text{O}_{2,\text{cons}}}] \cdot 100 \quad 2.5$$

U idealnom slučaju, slično određivanju bilanci COD za anaerobnu fazu šaržnih testova aktivnosti EBPR, ΔCOD (%) bi trebao biti niži od 1-5 %, no vrijednosti od čak 10 % se mogu smatrati prihvatljivima.

Bilance COD se također mogu odrediti i primijeniti na anoksične testove aktivnosti EBPR gdje, na primjer, nitrat ili nitrit djeluje kao konačni akceptor elektrona. Kad se bilanca COD primjenjuje na šaržne testove aktivnosti EBPR provedene s konačnim akceptorom elektrona koji nije kisik, pristup bi bio sličan, ali: (i) ekvivalentne koncentracije COD konačnog akceptora elektrona treba odrediti i iskazati u jedinicama COD na temelju njegovog kapaciteta prihvatanja elektrona i (ii) treba poznavati odgovarajuće maksimalne stehiometrijske prinose (Y) metaboličkih konverzija na konačnom akceptoru elektrona od interesa (na primjer, nitrat ili nitrit). Za testove koji se provode s nitratom kao konačnim akceptorom elektrona, mogu se koristiti maksimalni stehiometrijski prinosi koje su procijenili Kuba i sur. (1996). Zadnje, ali ne manje važno, ukupnu potrošnju konačnog akceptora elektrona tijekom izvođenja anoksičnog šaržnog testa EBPR treba procijeniti na temelju respirometrije.

Nakon što se potvrdi i validira kvaliteta i pouzdanost podataka, mogu se izračunati stehiometrijski i kinetički parametri. Često su neto otpušteni P, konverzija glikogena te proizvedeni PHA po potrošenom organskom ugljiku ili COD (omjeri $Y_{\text{VFA_PO}_4,\text{An}}$, $Y_{\text{Gly/VFA,An}}$, $Y_{\text{VFA_PHA,An}}$, $Y_{\text{VFA_PHB,An}}$ i $Y_{\text{VFA_PHV,An}}$) su stehiometrijski parametri od interesa za ocjenu anaerobne stehiometrije procesa EBPR (tablica 2.1).

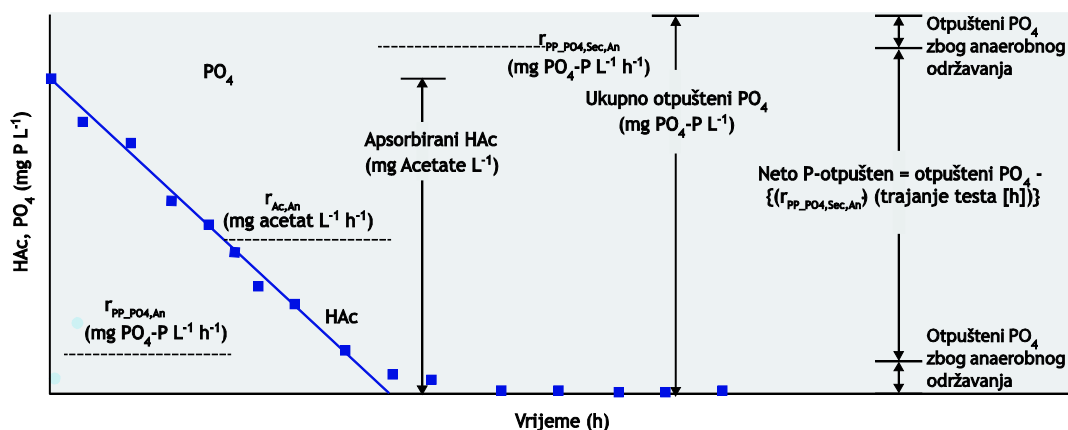
Vežano uz anaerobne stehiometrijske parametre, često je acetat (Ac) najuobičajeniji izvor ugljika korišten za izvođenje šaržnih testova aktivnosti. EBPR Slika 2.5 sadrži grafički prikaz određivanja i stehiometrijskih i kinetičkih parametara za Ac potrošen i ortofosfat ispušten u anaerobnom testu šaržne aktivnosti. Treba primijetiti da neto P otpušten (P_{released}) zbog apsorpcije Ac treba procijeniti nakon isključivanja naknadnog otpuštanja PO_4 ($r_{\text{PP_PO}_4,\text{Sec,An}}$). Međutim, budući da do naknadnog otpuštanja PO_4 dolazi kontinuirano tijekom čitavog anaerobnog testa kao posljedica potreba stanica za anaerobnim održavanjem (premda se to obično može opaziti jedino nakon iscrpljivanja izvora ugljika), akumulirani PO_4 otpušten zbog anaerobnog održavanja treba isključiti iz ukupno opaženog otpuštanja PO_4 . Prema tome, neto otpušteni P se može procijeniti na sljedeći način:

$$\text{Net } P_{\text{released}} = [(\text{Total } \text{PO}_4\text{-P}_{\text{released}})] - [(r_{\text{PP_PO}_4,\text{Sec,An}}) \cdot (\text{trajanje testa})] \quad 2.6$$

gdje:

Net P_{released} je PO_4 otpušten jedino zbog apsorpcije Ac, $\text{mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

$r_{\text{PP_PO}_4,\text{Sec,An}}$ odgovara brzini otpuštanja PO_4 zbog potreba biomase za anaerobnim održavanjem, $\text{mg PO}_4\text{-P L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.



Slika 2.5 Primjer određivanja maksimalnih anaerobnih volumetrijskih kinetičkih brzina za potrošnju acetata (Ac) i ortofosfat otpušten (PO_4) u anaerobnom šaržnom testu aktivnosti gdje je sav ugljik potrošen. Za procjenu neto otpuštenog P, naknadno otpuštanje P ($r_{\text{PP_PO}_4,\text{Sec,An}}$) (odgovara potrebama anaerobnog endogenog održavanja koje se javljaju tijekom čitavog anaerobnog testa) se mora isključiti ($\text{Net } P_{\text{released}} = [(\text{Total } \text{PO}_4 \text{ released})] - [(r_{\text{PP_PO}_4,\text{Sec,An}}) \cdot (\text{duration of the test})]$). Neto otpušteno P bi trebalo koristiti za određivanje anaerobnog stehiometrijskog omjera PO_4/Ac ($Y_{\text{Ac_PO}_4,\text{An}}$).

Neto oslobođeni P bi trebalo koristi za određivanje anaerobnog stehiometrijskog omjera PO_4/Ac ($Y_{\text{Ac_PO}_4,\text{An}}$). Tako se, na primjer, ako je u šaržnom testu aktivnosti ugljik u cijelosti potrošen, omjer anaerobnog neto oslobođenog P i potrošenog Ac (koji se može zvati i omjer P/C) određene kulture može izračunati na sljedeći način:

$$Y_{\text{AcPO}_4,\text{An}} = \frac{\text{Net } P_{\text{released}}}{S_{\text{Ac,cons}}} = \frac{S_{\text{PO}_4,\text{ini}} - S_{\text{PO}_4,\text{final}}}{S_{\text{Ac,ini}} - S_{\text{Ac,final}}} \quad 2.7$$

gdje je:

$S_{\text{Ac,cons}}$ koncentracija acetata potrošenog u šaržnom testu aktivnosti, mg L^{-1} .

$S_{\text{PO}_4,\text{ini}}$ koncentracija ortofosfata u tekućem dijelu suspenzije na početku šaržnog testa aktivnosti, $\text{mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

$S_{\text{PO}_4,\text{P,final}}$ koncentracija ortofosfata u tekućem dijelu suspenzije u trenutku kad je potrošena koncentracija acetata ili na kraju anaerobnih šaržnih testova aktivnosti ako nije potrošen sav acetat, $\text{mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

$S_{\text{Ac,ini}}$ koncentracija acetata u tekućem dijelu suspenzije na početku šaržnog testa aktivnosti, mg L^{-1} .

$S_{\text{Ac,final}}$ koncentracija acetata u tekućem dijelu suspenzije na kraju šaržnog testa aktivnosti, mg L^{-1} .

Međutim, ako ugljik nije potrošen (npr. kada se dodaje višak ugljika ili je trajanje testa relativno prekratko da se omogući puna potrošnja izvora ugljika), tada se razlika između početne i završne koncentracije spojeva može podijeliti s razlikom između početne i završne koncentracije ugljika (neto potrošen ugljik). Sličan se pristup može primijeniti za određivanje ostalih anaerobnih stehiometrijskih omjera od interesa (poput anaerobne hidrolize glikogena i proizvedenih PHA po potrošenom izvoru C). Često se u znanstvenim publikacijama koriste različite jedinice za prikazivanje stehiometrije anaerobnih konverzija, poput korištenja C-mola ili P-mola umjesto mg Ac ili $\text{mg PO}_4\text{-P}$. U tu svrhu, Prilog I sadrži niz koeficijenata za konverziju jedinica određenih spojeva od interesa (npr. za pretvaranje jedinica ortofosfata iz $\text{g PO}_4\text{-P}$ u P-mmol). Za razliku od anaerobnih stehiometrijskih parametara, anoksični i aerobni stehiometrijski parametri se ne mogu odrediti na sličan jednostavan način. Budući da EBPR kulture imaju različite unutarstanične metaboličke konverzije koje se dešavaju istovremeno u anoksičnim ili aerobnim uvjetima (apsorpcija poli-P, nadopunjavanje, rast i održavanje glikogena) (tablica 2.1), neto potrošnja donora elektrona (PHA) i konačnih akceptora elektrona (kisik, nitrat ili nitrit) je kombinirani

rezultat te četiri metaboličke aktivnosti koje se preklapaju (Smolders i sur., 1994b). Ipak, Smolders i sur. (1994b) i Kuba i sur. (1993, 1996) su dokazali da korištenjem metaboličkog modeliranja, četiri aerobna ili anoksična metabolička procesa ovise o omjeru između ATP proizvedenog po NADH potrošenom tijekom aerobne ili anoksične respiracije, tzv. 'δ-omjer' ili 'δ-vrijednost' (Smolders i sur., 1994b; Kuba i sur., 1996). To znači da se za EBPR kulture, aerobna ili anoksična vrijednost δ može odrediti da se dosljedno procijene vrijednosti različitih aerobnih ili anoksičnih stehiometrijskih parametara. Nadalje, unatoč tome što su u literaturi navedene različite δ vrijednosti za različite mikrobne populacije (u rasponu od 1,3 do 2,2) (Lopez-Vazquez i sur., 2009a), za EBPR kulture učinak δ-vrijednosti je prilično neosjetljiv na aerobne i anoksične stehiometrijske omjere unutar ovog raspona δ vrijednosti. Ovo potonje sugerira da su aerobni i anoksični stehiometrijski parametri također neosjetljivi i da ne mora postojati potreba za njihovim određivanjem ako uređaj ili laboratorijski sustav radi u normalnim radnim i okolišnim uvjetima. Međutim, ako je potrebno određivanje δ vrijednosti, mogu se provesti dva testa s i bez prisutnosti ortofosfata u tekućem dijelu suspenzije i mjerenjem brzine apsorpcije kisika (engl. *oxygen uptake rate*, OUR) pomoću respirometrije. Izračunom razlika u brzini apsorpcije P i brzini apsorpcije kisika između testova provedenih s i bez prisutnosti ortofosfata u tekućem dijelu suspenzije, δ vrijednost se može procijeniti kako su opisali Smolders i sur. (1994b). Alternativno, može se koristiti matematičko modeliranje za procjenu δ vrijednosti na temelju anoksičnog i/ili aerobnog profila PHA, glikogena, ortofosfata, brzine rasta i potreba održavanja (Lopez-Vazquez i sur., 2009a). U slučaju interesa za određivanje δ za EBPR kulture, čitatelj će možda morati pregledati citirane reference, budući da je ta procedura van opsega ove knjige. Kao referenca i vodič, tablica 2.3 prikazuje različite parametre od interesa za laboratorijske EBPR kulture obogaćene u različitim radnim uvjetima (npr. izvor ugljika) i kojima dominiraju ili PAO ili GAO.

Tablica 2.3 Tipični stehiometrijski parametri od interesa za laboratorijski obogaćene EBPR kulture kultivirane u standardnim uvjetima (20 °C, pH 7, starost mulja 7-8 dana).

Stehiometrijski parametar		Uobičajena oznaka	Jedinice	Tipične vrijednosti	Referenca
Laboratorijska kultura PAO obogaćena acetatom					
ANAEROBNO	Omjer anaerobnog otpuštanja ortofosfata i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PO4,An}$	P-mol C-mol ⁻¹	0,50	Smolders i sur. (1994a)
	Omjer anaerobnog korištenja glikogena i apsorpcije acetata	$Y_{Gly/Ac,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,50	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHA i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,22	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHB i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHB,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,10	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHV i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,12	
	Omjer anaerobnog nastajanja PH ₂ MV i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PH2MV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	N/P	
AEROBNO	Omjer aerobnog nastajanja poli-P i potrošnje PHA	$Y_{PHA_PP,Ox}$	P-mol C-mol ⁻¹	3,68	Smolders i sur. (1994b)
	Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje PHA	$Y_{PHA_Gly,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,90	
	Omjer aerobnog rasta biomase PAO i potrošnje PHA	$Y_{PHA_PAO,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,74	
	Brzina aerobnog održavanja PAO	$m_{PAO,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	4x10 ⁻³	
	Omjer aerobnog nastajanja poli-P i potrošnje kisika	Y_{PP}	P-mol C-mol ⁻¹	3,27	
	Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje kisika PAO	$Y_{Gly,PAO}$	C-mol mol-O ₂ ⁻¹	3,92	
	Omjer aerobnog rasta biomase PAO i potrošnje kisika	Y_{PAO}	C-mol mol-O ₂ ⁻¹	2,44	
	Brzina aerobne endogene respiracije PAO	$m_{PAO,O2}$	mol-O ₂ C-mol ⁻¹ h ⁻¹	4,5x10 ⁻³	
Laboratorijska kultura PAO obogaćena propionatom					
ANAEROBNO	Omjer anaerobnog otpuštanja ortofosfata i apsorpcije propionata	$Y_{Pr_PO4,An}$	P-mol C-mol ⁻¹	0,42	Oehmen i sur. (2005c)
	Omjer anaerobnog korištenja glikogena i apsorpcije propionata	$Y_{Pr_Gly,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,32	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHA i apsorpcije propionata	$Y_{Pr_PHA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,23	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHB i apsorpcije propionata	$Y_{Pr_PHB,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,04	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHV i apsorpcije propionata	$Y_{Pr_PHV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,55	
	Omjer anaerobnog nastajanja PH ₂ MV i apsorpcije propionata	$Y_{Pr_PH2MV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,65	
AEROBNO	Omjer aerobnog nastajanja poli-P i potrošnje PHA	$Y_{PHA_PP,Ox}$	P-mol C-mol ⁻¹	3,34	Oehmen i sur. (2007)
	Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje PHA	$Y_{PHA_Gly,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,06	
	Omjer aerobnog rasta biomase PAO i potrošnje PHA	$Y_{PHA_PAO,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,80	
	Brzina aerobnog održavanja PAO	$m_{PAO,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	4x10 ⁻³	
	Omjer aerobnog nastajanja poli-P i potrošnje kisika	Y_{PP}	P-mol C-mol ⁻¹	3,34	
	Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje kisika PAO	$Y_{Gly,PAO}$	C-mol mol-O ₂ ⁻¹	6,16	
	Omjer aerobnog rasta biomase i potrošnje kisika	Y_{PAO}	C-mol mol-O ₂ ⁻¹	2,03	
	Brzina aerobne endogene respiracije PAO	$m_{PAO,O2}$	mol-O ₂ C-mol ⁻¹ h ⁻¹	4,5x10 ⁻³	

Laboratorijska DPAO kultura obogaćena acetatom					
ANAEROBNO	Omjer anaerobnog otpuštanja ortofosfata i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PO4,An}$	P-mol C-mol ⁻¹	0,50	Smolders i sur. (1994a), Kuba i sur. (1996)
	Omjer anaerobnog korištenja glikogena i apsorpcije acetata	$Y_{Gly/Ac,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,50	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHA i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,22	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHB i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHB,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,10	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHV i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,12	
	Omjer anaerobnog nastajanja PH ₂ MV i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PH2MV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	N/P	
ANOKSIČNO	Omjer anoksičnog nastajanja poli-P i potrošnje PHA	$Y_{PHA_PP,Ax}$	P-mol C-mol ⁻¹	0,46	Kuba i sur. (1996)
	Omjer anoksičnog nastajanja glikogena i potrošnje PHA	$Y_{PHA_Gly,Ax}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,27	
	Omjer anoksičnog rasta biomase PAO i potrošnje PHA	$Y_{PHA_PAO,Ax}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,63	
	Brzina anoksičnog održavanja PAO	$m_{PAO,Ax}$	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$3,64 \times 10^{-3}$	
	Omjer anoksičnog nastajanja poli-P i potrošnje NO ₃	$Y_{NO3_PP,Ax}$	P-mol N-mol ⁻¹	0,414	
	Omjer anoksičnog nastajanja glikogena i potrošnje NO ₃	$Y_{NO3_Gly,Ax}$	C-mol N-mol ⁻¹	0,35	
	Omjer anoksičnog rasta biomase PAO i potrošnje NO ₃	$Y_{NO3_PAO,Ax}$	C-mol N-mol ⁻¹	0,57	
	Brzina anoksične endogene respiracije PAO na NO ₃	$m_{PAO,NO3}$	N-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$3,27 \times 10^{-3}$	
Laboratorijska GAO kultura obogaćena acetatom					
ANAEROBNO	Omjer anaerobnog korištenja glikogena i apsorpcije acetata	$Y_{Gly/Ac,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,12	Zeng i sur. (2003a)
	Omjer anaerobnog nastajanja PHA i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHA,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,86	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHB i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHB,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	1,36	
	Omjer anaerobnog nastajanja PHV i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PHV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,46	
	Omjer anaerobnog nastajanja PH ₂ MV i apsorpcije acetata	$Y_{Ac_PH2MV,An}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,04	
AEROBNO	Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje PHA	$Y_{PHA_Gly,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,95	Zeng i sur. (2003a)
	Omjer aerobnog rasta biomase GAO i potrošnje PHA	$Y_{PHA_GAO,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹	0,75	
	Brzina aerobnog održavanja GAO	$m_{GAO,Ox}$	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$3,06 \times 10^{-3}$	
	Omjer aerobnog nastajanja glikogena i potrošnje kisika	Y_{Gly}	C-mol mol-O ₂ ⁻¹	4,89	
	Omjer aerobne razgradnje PHA i potrošnje kisika GAO	$Y_{PHA,GAO}$	C-mol mol-O ₂ ⁻¹	2,18	
	Brzina aerobne endogene respiracije GAO	$m_{GAO,O2}$	mol-O ₂ C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$3,51 \times 10^{-3}$	

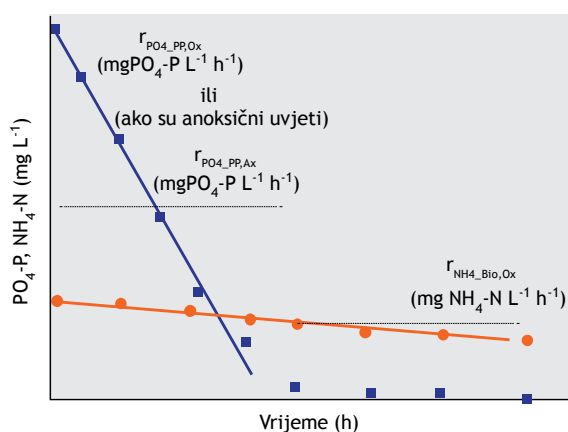
2.5.2 Procjena kinetičkih parametara

Vezano uz anaerobnu kinetiku, najvažniji parametri su maksimalna specifična brzina potrošnje izvora ugljika ili VFA ($q_{VFA,An}$), maksimalna specifična brzina otpuštanja P ($q_{PP_PO4,An}$), brzina formiranja PHA ($q_{VFA_PHA,An}$) i koeficijent endogenog održavanja ATP ($m_{ATP,An}$) (tablica 2.1). Može ih se izračunati tako da se na grafikonu prikažu eksperimentalni podaci (os y) nasuprot vremena (os x) i podese eksperimentalni podaci dobiveni u anaerobnim šaržnim testovima aktivnosti pomoću linearne regresije. Budući da nas zanimaju maksimalne brzine, može se primijeniti pristup linearne regresije tako da se podese sam prvi skup ili skupina eksperimentalnih podatkovnih točaka dobivenih na početku testa šaržne aktivnosti. To je glavni razlog zašto je učestalost uzorkovanja u prvih 30-40 min izvođenja testova šaržne aktivnosti postavljena na 5 min. Po mogućnosti linearnu regresiju se mora provesti tako da se koncentracije prikažu na grafikonu i pomoću linearne regresije podese više od 4-5 eksperimentalnih podatkovnih točaka, u isto vrijeme ostvarujući statistički koeficijent determinacije (R^2) koji nije manji od 0,90. Uz procjenu jednadžbe linearne regresije (oblika: 'y = Ax + B'), maksimalne volumetrijske kinetičke brzine parametara od interesa mogu se odrediti koeficijentom 'A' izraza linearne regresije koji odgovara 'nagibu' skupa podatkovnih točaka. To će rezultirati određivanjem maksimalnih volumetrijskih brzina (obično se iskazuju u jedinicama kao što su mg L⁻¹ h⁻¹ ili g m⁻³ d⁻¹). Slika 2.5 prikazuje procjenu maksimalnih anaerobnih kinetičkih brzina za EBPR kulturu. Za uzorke aktivnog mulja iz gradskog uređaja, brzine se mogu iskazati kao maksimalne specifične kinetičke brzine tako da se volumetrijske količine (ili vrijednosti nagiba) podijele s koncentracijom organskih suspendiranih krutina (VSS) u aktivnom mulju. Međutim, zbog posebnog dinamičkog ponašanja unutarstaničnih spojeva prisutnih u EBPR kulturama, maksimalne specifične kinetičke brzine se često izražavaju u smislu aktivne frakcije biomase (bez prisustva unutarstaničnih spojeva) približno kvantificirane u skladu sa sljedećim izrazom:

$$\text{Aktivna frakcija biomase} = \text{MLVSS} - \text{PHA} - \text{glikogen} \quad 2.8$$

S mikrobiološkog gledišta, gornja jednadžba nije točan izraz zbog potencijalnog akumuliranja biološki nerazgradivih organskih tvari istvarne metaboličke aktivnosti svake pojedine stanice. Ipak, to je obično prihvaćena procjena za eksperimentalne potrebe u praksi obrade otpadne vode. Slično spojevima ugljika i fosfora (naročito za kulture kultivirane u laboratorijima), aktivna frakcija biomase može se izraziti i u jedinicama C-mol umjesto u mg VSS. U tu se svrhu koristi elementarni sastav biomase (vidi Prilog I s odgovarajućim jediničnim faktorima konverzije za različite spojeve). Obično, nakon što se utvrde maksimalne specifične brzine, može ih se navesti za spoj od interesa kao mg g VSS⁻¹ h⁻¹ ili mg g

VSS⁻¹ d⁻¹. Slično tome, koeficijent anaerobnog endogenog održavanja ATP ($m_{ATP,An}$) može se odrediti na temelju profila koncentracije ortofosfata određene za vrijeme izvođenja anaerobnog šaržnog testa aktivnosti EBPR provedenog bez izvora ugljika (odjeljak 2.4.1). Ta maksimalna volumetrijska količina sliči ili odgovara brzini endogenog otpuštanja P ($m_{PP,PO_4,Sec,An}$) opaženoj u anaerobnim testovima nakon što je potrošen izvor ugljika (slika 2.6). Tada je $m_{ATP,An}$ ekvivalentan $m_{PP,PO_4,Sec,An}$ (Wentzel i sur., 1989a; Smolders i sur., 1994a). Sličan pristup linearne regresije može se koristiti za određivanje maksimalnih specifičnih kinetičkih brzina za aerobne i anoksične testove šaržne aktivnosti (tablica 2.2 i 2.3). Obično su apsorpcija ortofosfata, rast biomase, razgradnja PHA, formiranje glikogena i potrebe za aerobnim održavanjem kinetički parametri od interesa ovisni o dostupnom konačnom akceptoru elektrona. Na slici 2.6 prikazan je primjer koji ilustrira određivanje maksimalnih kinetičkih brzina u aerobnom (ili anoksičnom) šaržnom testu aktivnosti.



Slika 2.6 Primjer određivanja maksimalnih aerobnih (ili anoksičnih) volumetrijskih brzina za apsorpciju ortofosfata (PO_4) i potrošnju amonijaka (NH_4) u aerobnom (ili anoksičnom) šaržnom testu.

Važno je spomenuti da se maksimalna specifična brzina rasta biomase ($q_{PHA,Bio,Ox}$) ne može jednostavno izračunati praćenjem povećanja koncentracija biomase tijekom ciklusa. Umjesto toga, može se koristiti maksimalna specifična brzina potrošnje ($q_{NH_4,Bio,Ox}$) amonijaka (NH_4) podijeljena sa sastavom dušika u aktivnoj frakciji biomase (0,20 N-mol po C-mol biomase) (Smolders i sur., 1995; Zeng i sur., 2003a; Lopez-Vazquez i sur., 2007; Welles i sur., 2014). Međutim, potonji pristup može biti valjan sve dok nema nitrifikacije, ne dođe do kemijske precipitacije ili adsorpcije NH_4 i relativno male razlike omogućuju zadovoljavajuće određivanje NH_4 . Razlike u koncentracijama NH_4 često mogu biti zanemarive ili potpasti pod standardnu pogrešku analitičke tehnike. To može komplicirati proces determinacije.

Ekspirimenti predstavljeni u ovom izvješću su fokusirani na relativne konverzije unutarstaničnih i topivih spojeva prisutnih u vodnoj fazi. Ovdje nisu obuhvaćeni ili riješeni profili potrošnje niti analiza konačnih akceptora elektrona (kao što je potrošnja kisika, brzine apsorpcije kisika ili brzine apsorpcije nitrata).

Od velike je važnosti određivanje koeficijenta aerobnog održavanja EBPR kultura. Za određivanje ovog parametra, moraju se provesti testovi produžene aeracije (u pravilu u trajanju od najmanje 24 h) u odsustvu vanjskog izvora ugljika. Nakon 24 h, mogu se odrediti aerobne potrebe za ATP ($m_{ATP,Ox}$) na temelju brzine potrošnje ili apsorpcije kisika (kao mol potrošenog O_2 po molu aktivne biomase po satu), a potrebe aerobnog održavanja mogu se izračunati pomoću sljedećeg izraza kao funkcije δ (uz prosječnu tipičnu vrijednost od oko 1,75-1,80 za obogaćene EBPR kulture):

$$m_{O_2} = \frac{1.125 m_{ATP,Ox}}{2.25\delta + 0.5} \quad 2.2.9$$

2.6 Rasprava i tumačenje podataka

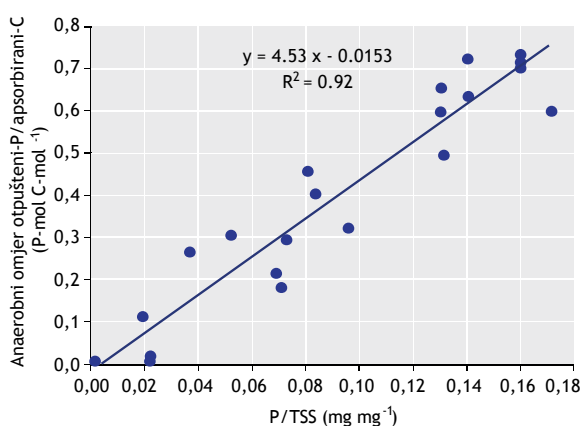
Rezultati šaržnih testova aktivnosti EBPR će dati važne informacije, ne samo o aktivnosti biomase u različitim radnim i okolišnim uvjetima, već i o općem stanju biomase, kao i određene smjernice o dominantnim mikrobnim populacijama prisutnima u uzorku mulja. Nadalje, identificiranje dominantnih mikrobnih vrsta je važna nadopuna za bolje razumijevanje aktivnosti procesa EBPR.

2.6.1 Anaerobni šaržni testovi aktivnosti

Budući da su PAO jedini organizmi za koje se zna da otpuštaju fosfat za vrijeme anaerobne apsorpcije hlapivih masnih kiselina, anaerobni omjeri otpušteni P/apsorbirani C ili otpušteni P/COD, $Y_{C_PO4,An}$ poput $Y_{VFA_PO4,An}$, $Y_{Ac_PO4,An}$ ili $Y_{Pr_PO4,An}$, se mogu smatrati jednim od najprikladnijih pokazatelja za ocjenu aktivnosti organizama koji akumuliraju fosfate i glikogen u EBPR kulturama. Visok omjer otpušteni P/apsorbirani C se smatra pokazateljem prisutnosti PAO, dok se njihov niski omjer smatra pokazateljem značajne prisutnosti GAO. Ipak, takvo je razmatranje predmet proturječja (Schuler i Jenkins, 2003; Oehmen i sur., 2007; Lopez-Vazquez i sur., 2008b; Welles i sur., 2015b). Do takvog proturječja dolazi zbog čitavog raspona omjera navedenih u literaturi, od niskih 0,025 do čak 0,75 P-mol C-mol⁻¹ ili više (Schuler i Jenkins, 2003). Nekoliko istraživanja s jako obogaćenim PAO kulturama otkrilo je da na anaerobni omjer otpuštenog P i apsorbiranog C djeluju i drugi faktori osim prisutnosti GAO. Na primjer, pokazalo se da na omjer otpušteni P/apsorbirani C djeluje izvor ugljika, pH i sadržaj poli-P u organizmima koji akumuliraju fosfate i specifične podgrupe PAO obogaćene u istraživanju (Smolders i sur., 1994a; Filipe i sur., 2001a; Zhou i sur., 2008; Acevedo i sur., 2012). Slijedom toga, nije preporučljivo koristiti jedino taj omjer kao izravan i jedini pokazatelj za ocjenu EBPR aktivnosti aktivnog mulja. Ipak, može se koristiti kako bi se dobila gruba procjena dominantnih metabolizama koji prevladavaju u aktivnom mulju. Ako ga podržavaju molekularne tehnike može ponuditi prikladan i cjelovitiji pregled aktivnosti biomase. Prema tome, na temelju opažanja izvedenih iz ranijih istraživanja, različiti omjeri P/C izvedeni u standardnim uvjetima (20 °C, pH 7,0) uz dodatak acetata mogu ukazivati na (Schuler i Jenkins, 2003):

Omjer P/C (P-mol C-mol ⁻¹)	Dominantni metabolizam
< 0,25	Metabolizam kojim dominiraju GAO
0,25-0,50	Prijelazni metabolizam PAO-GAO
> 0,50	Metabolizam kojim dominiraju PAO

Slika 2.7 prikazuje različite anaerobne omjere otpušteni P/apsorbirani C navedene u literaturi kao funkciju količine fosfora nakupljenog u mulju na temelju koncentracije TSS iskazane kao omjer P/TSS u mulju. Zanimljivo, pokazalo se da je sadržaj fosfora u mulju (u smislu mg P g VSS⁻¹) snažno povezan s anaerobnim omjerom otpušteni P/apsorbirani C.



Slika 2.7 Anaerobni omjer otpušteni P/apsorbirani C kao funkcija omjera P/TSS u biomasi naveden u literaturi (prilagođeno iz Schuler i Jenkins, 2003; i Welles i sur., 2015b).

Kako je prikazano na slici 2.7, anaerobni omjer P/C viši od 0,50 se obično opaža kada je sadržaj P/TSS u mulju obogaćenom PAO veći od 0,10 g P g TSS⁻¹. Prema tome, sustav s aktivnim muljem će vjerojatno imati zadovoljavajuću aktivnost EBPR kad anaerobni omjer otpušteni P/apsorbirani C iznosi oko ili više od 0,50 P-mol C-mol⁻¹, a omjer P/TSS u mulju oko ili više od 0,10 mg P mg TSS⁻¹. Niže vrijednosti bi mogle ukazivati na to da aktivnost EBPR u sustavu može biti ograničena određenim radnim ili okolišnim faktorima kao što su (i) relativno obilna prisutnost GAO umjesto PAO, (ii) prodor akceptora elektrona u anaerobnu fazu (kao što su kisik, NO₃, NO₂), (iii) dodavanje soli Al ili Fe radi kemijskog uklanjanja P, ili povremeno (iv) prisutnost inhibitornih ili toksičnih spojeva. U takvim okolnostima, sustav s aktivnim muljem treba pažljivo preispitati kako bi se provele odgovarajuće korektivne mjere.

U određenim okolnostima, testovi aktivnosti EBPR mogu se provesti u nestandardnim uvjetima (pH različit od 7,0) korištenjem prave otpadne vode ili drugih izvora ugljika umjesto acetata. Za potrebe usporedbe i mjerenja, omjer P/C se može korigirati pomoću izraza koje su razvili Smolders i sur. (1994a) odnosno Filipe i sur. (2001a) za kulture uz korištenje aceta:

$$Y_{Ac_PO4,An} = 0.19 \cdot pH - 0.85 \quad 2.10$$

$$Y_{Ac_PO4,An} = 0.16 \cdot pH - 0.55 \quad 2.11$$

Isto tako, korištenje prave otpadne vode ili drugih izvora C umjesto acetata (poput propionata, butirata ili glukoze) će dovesti do nižeg anaerobnog omjera P/C od onih navedenih za EBPR kulture gdje je metabolizam PAO (ili i PAO) dominantan. Takvi niži omjeri P/C mogu, pored niskog sadržaja P/TSS o čemu se ranije raspravljalo, biti posljedica manje energije potrebne za pohranjivanje PHA ili veće uključenosti metabolizma GAO (moguće uzrokovano prisutnošću GAO). Ako se omjer potrošnje glikogena i apsorpcije C ne poveća i ostane unutar obično navedenog omjera od 0,35-0,50 C-mol C-mol⁻¹ za sustave kojima dominiraju PAO (Smolders i sur., 1994b; Schuler i Jenkins, 2003), može se pretpostaviti da je sustav snažan i stabilan, naročito ako unutarstanični omjer P/TSS nije znatno niži od 0,10 u obogaćenim kulturama. Međutim, ako se u takvim okolnostima omjer potrošnje glikogena i apsorpcije C, $Y_{GLY/Ac,An}$, poveća iznad 0,35-0,50 C-mol C-mol⁻¹, tada metabolizam GAO (ili samo prisustvo GAO) može početi dominirati sustavom i u konačnici dovesti do pogoršanja procesa sve dok taj omjer nastavi rasti (na kraju može dosegnuti $Y_{GLY/Ac,An}$ od 1,12 C-mol C-mol⁻¹) u kombinaciji sa smanjivanjem sadržaja P/TSS ispod 0,10 mg P mg TSS⁻¹.

Paralelno s time, omjeri sinteze PHA i apsorpcije C veći od 1,33 C-mol C-mol⁻¹ će se opaziti kao posljedica veće sinteze PHV i PH₂MV. Omjeri PHV i apsorpcije C veći od 0,10 i do 0,25-0,30 mogu se opaziti zajedno s formiranjem PH₂MV. Te vrijednosti vjerojatno upućuju na potencijalno pogoršanje aktivnosti i učinkovitosti EBPR. Vezano uz anaerobne kinetičke brzine, naročito početnu maksimalnu anaerobnu brzinu apsorpcije izvora ugljika, različite vrijednosti su predstavljene za laboratorijske kulture kojima dominiraju PAO i GAO (uglavnom sekvencijski šaržni reaktori, SBR) i gradske uređaje kao što su modificirani UCT (engleska kratica za Sveučilište u Cape Townu, JAR), Phoredox (od engl. *phosphorus reduction oxidation*, odnosno redukcija oksidacija fosfora), i PhoStrip (od engl. *phosphorus stripping*, odnosno uklanjanje fosfora) (Wentzel i sur., 2008) (tablica 2.4).

Slično omjeru otpuštenog P i apsorbiranog C, izgleda da kinetičke brzine ovise o sadržaju poli-P u mulju (Schuler i Jenkins 2003, Welles i sur., 2016), a kreću se u rasponu od 0,02 do 0,20 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹. Međutim, u većini istraživanja provedenih sa srednjim sadržajem poli-P i omjerima P/Ac od oko 0,5 P-mol C-mol⁻¹, opažene brzine apsorpcije konvergiraju oko 0,20 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹.

Slično tome, brzine opažene u testovima provedenima s uzorcima aktivnog mulja iz gradskih EBPR uređaja kreću se u rasponu između 17 i 22 mg Ac g VSS⁻¹ h⁻¹ (Lopez-Vazquez i sur., 2008a).

Temperatura ima veliku ulogu u različitim mikrobnim procesima EBPR (Brdjanovic i sur., 1997, 1998c, Tablica 2.5).

Tablica 2.4 Maksimalne početne specifične anaerobne brzine apsorpcije izvora C predstavljene u literaturi za laboratorijske i velike EBPR uređaje.

Laboratorijski EBPR uređaji		
Dominantni mikroorganizam/metabolizam i sustav	$q_{VFA,An}$ u C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	Referenca
PAO - SBR	0,27	Smolders i sur. (1994a)
	0,20	Filipe i sur. (2001b)
	0,20	Kuba i sur. (1996)
	0,20	Brdjanovic i sur. (1997)
	0,20	Lopez-Vazquez i sur. (2007)
GAO - SBR	0,24	Filipe i sur. (2001a)
	0,16-0,18	Zeng i sur. (2003a,b)
	0,20	Lopez-Vazquez i sur. (2007)
	0,19	Lopez-Vazquez i sur. (2009a)
Veliki EBPR uređaji		
Dominantni mikroorganizam/metabolizam	$q_{VFA,An}$ u mg Ac g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Referenca
PAO - Modificirani UCT	22	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	19	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	47	Kuba i sur. (1997a,b)
	7-31	Kuba i sur. (1997b)
PAO - Phoredox	14	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	21	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	11	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	14	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
PAO - Sidestream PhoStrip	9	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	23	Brdjanovic i sur. (2000)

Tablica 2.5 Arrheniusovi temperaturni koeficijenti (θ) predstavljeni u literaturi kako bi se opisale maksimalne specifične kinetičke brzine različitih EBPR metaboličkih procesa koji se javljaju u laboratorijskim i gradskim EBPR sustavima (Meijer, 2004).

Parametar	θ	Referenca
$q_{VFA,An}$	1,094 ($e^{0.090}$)	Brdjanovic i sur. (1998c); Meijer (2004)
$m_{ATP,An}$	1,071 ($e^{0.069}$)	Smolders i sur. (1995); Murnleitner i sur. (1997)
$q_{PHA,Ox}$	1,129 ($e^{0.121}$)	Brdjanovic i sur. (1998); Meijer (2004)
$q_{PHA_Gly,Ox}$	1,125 ($e^{0.118}$)	Meijer (2004)
$q_{PO4_PP,Ox}$	1,031 ($e^{0.031}$)	Murnleitner i sur. (1997); Brdjanovic i sur. (1998c)
$q_{PAO,Ox}$	1,081 ($e^{0.078}$)	Brdjanovic i sur. (1997)
$m_{ATP,Ax}$	1,071 ($e^{0.090}$)	Murnleitner i sur. (1997)
$m_{ATP,Ox}$	1,071 ($e^{0.090}$)	Murnleitner i sur. (1997)

* Broj u zagradama označava vrijednost Arrheniusovog temperaturnog koeficijenta (θ) u smislu Eulerovog broja.

2.6.2 Aerobni šaržni testovi aktivnosti

Radi usporedbe, opažene maksimalne kinetičke brzine moraju se standardizirati pomoću Arrheniusovih koeficijenata. Na temelju opažanja Brdjanovic i sur. (1997, 1998) i drugih autora (Smolders i sur., 1995, i Murnleitner i sur., 1997), Meijer (2004) jekroz razvoj modela TUDelft i provedbu nekoliko studija modeliranja, odredio prikladne Arrheniusove temperaturne koeficijente koji će najbolje pristajati maksimalnim kinetičkim brzinama EBPR kultura za različite operativne laboratorijske i gradske uređaje. Premda su aerobne kinetičke brzine navedene u literaturi za laboratorijske EBPR sustave dosljedne (tablica 2.6), vrijednosti opažene u gradskim EBPR uređajima mogu navelike varirati (od modificiranih UCT sustava do uređaja BIODENIPHO - biološka denitrifikacija, nitrifikacija i uklanjanje fosfora) (tablica 2.7).

Tablica 2.6 Maksimalne aerobne kinetičke brzine predstavljene u literaturi za obogaćene EBPR kulture.

Kultura ili sustav	$q_{PO_4, PP, Ox}$ P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$q_{PHA, Gly, Ox}$ C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$q_{PAO, Ox}$ C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$m_{ATP, Ox}$ mol ATP C-mol ⁻¹ h ⁻¹	Referenca
SBR	0,055	0,080	0,014-0,016	$1,9 \times 10^{-3}$	Smolders i sur. (1994b)
SBR	0,046	-	0,13	$1,2 \times 10^{-3}$	Brdjanovic i sur. (1997)
SBR	0,083	-	-	$1,7 \times 10^{-3}$	Welles i sur. (2014)

Tablica 2.7 Maksimalne početne specifične aerobne brzine apsorpcije P predstavljene u literaturi za gradske EBPR uređaje.

Dominantni mikroorganizam/metabolizam	$q_{PO_4, PP, Ox}$ mg P g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Referenca
PAO - Modificirani UCT	19,2	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	9,0	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	13	Kuba i sur. (1997a, b)
PAO - Phoredox	4-6	Kuba i sur. (1997b)
	8,0	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	9,1	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
PAO - Sidestream PhoStrip	6,2	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	6,3	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	9,8	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
PAO - Pilot BIODENIPHO	2,2	Brdjanovic i sur. (2000)
	4	Meinhold i sur. (1999)

Takve znatne razlike su logične budući da su laboratorijski sustavi visoko obogaćeni organizmima koji akumuliraju fosfate (na temelju sličnih istraživanja, PAO vjerojatno mogu činiti više od 80-90 % ukupne populacije) s malom varijabilnošću u postotku obogaćenosti (Lopez-Vazquez i sur., 2009a; Welles i sur., 2014, 2015a), dok u gradskim uređajima PAO mogu činiti između 3 i 20 % ukupne aktivne frakcije biomase (Lopez-Vazquez i sur., 2008a). Štoviše, u gradskim uređajima u kojima se provodi biološko uklanjanje dušika i fosfora, EBPR kulture su izložene naizmjeničnim anaerobno-anoksično-aerobnim (A²O) fazama kojima se može smanjiti dostupnost unutarstaničnih PHA nakon sekvencijalne izloženosti anoksičnim i aerobnim uvjetima (budući da i anoksična i aerobna metabolička aktivnost zahtijeva PHA kao izvor ugljika i energije). Na temelju podataka navedenih u tablici 2.7, može se vidjeti da vrijednosti više od 10 mg P g VSS⁻¹ h⁻¹ nisu uobičajene. Takve kinetičke brzine se mogu smatrati prilično velikima budući da, kako je već ranije rečeno, gradski uređaji često imaju aerobna hidraulička vremena zadržavanja (HRT) od nekoliko sati (npr. najmanje 6-8 h i duže), što će pogodovati apsorpciji ortofosfata iz tekućeg dijela suspenzije. Aerobne brzine apsorpcije P ($q_{PO_4, PP, Ox}$) niže od 10 mg P g VSS⁻¹ h⁻¹ neće biti zadovoljavajuće ovisno o trajanju aerobne faze (premda se moraju izbjegavati razdoblja produžene aeracije) (Brdjanovic i sur., 1998c). Drugi važan aspekt koji treba razmotriti jest to da li je uređaj sklon kemijskoj precipitaciji P, budući da će ta pojava pogodovati kemijskom uklanjanju P na štetu EBPR procesa.

2.6.3 Anoksični šaržni testovi aktivnosti

Istovremeno uklanjanje ortofosfata i nitrata (ili nitrita) je izrazito poželjno zbog potencijalnih ušteda u energetskim i operativnim troškovima, dok se u isto vrijeme čuva ili održava aktivnost uklanjanja P koja može biti usporediva onoj opaženoj u anaerobno-aerobnim uvjetima (Kuba i sur., 1996). Međutim, u određenoj mjeri to je proturječno pitanje, naročito zbog prilično promjenjivih i nedosljednih anoksičnih aktivnosti uklanjanja P opaženih u gradskim uređajima (Hu i sur., 2002) i teoretski smanjenog uklanjanja P potencijalno uzrokovanog manjim prinosima biomase PAO. Tablica 2.8 prikazuje različite anoksične aktivnosti uklanjanja P opažene u gradskim uređajima (anaerobno-anoksični (A²) i anaerobno-anoksično-oksični (A²O) uređaji) uspoređene s aerobnim aktivnostima uklanjanja P u istim sustavima (u skladu s protokolima predstavljenima u ovom izvješću, a koje je uveo Murnleitner i sur., 1997).

Tablica 2.8 Maksimalne početne anoksične kinetičke brzine predstavljene u literaturi za laboratorijski obogaćene denitrificirajuće EBPR kulture.

Kultura ili sustav	$q_{PO_4_PP,Ax}$ P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$q_{PHA_Gly,Ax}$ C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	$q_{PAO,Ax}$ C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	m_{Ax} C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	Referenca
SBR, PAO, sustav A ²	0,1	0,8	0,05	$3,6 \times 10^{-3}$	Kuba i sur. (1996)
SBR, PAO, sustav A ²	0,02-0,63 ^a	0,0025	-	-	Carvalho i sur. (2007)
SBR, PAO, sustav A ²	0,58 ^a	0,9 ^a	-	-	Zeng i sur. (2003b)
SBR, PAO, sustav A ² O	0,33 ^a	-	-	-	Saito i sur. (2004)

^aJedinice: P-mmol g VSS⁻¹ h⁻¹

Tablica 2.9 Maksimalna početna specifična anoksična brzina apsorpcije P i njezin odnos s maksimalnom aerobnom brzinom apsorpcije P predstavljena za gradske EBPR uređaje.

Dominantni mikroorganizam/metabolizam	$q_{PO_4_PP,Ox}$ mg P g VSS ⁻¹ h ⁻¹	$q_{PO_4_PP,Ax}$ mg P g VSS ⁻¹ h ⁻¹	$q_{PO_4_PP,Ax} / q_{PO_4_PP,Ox}$ %	Referenca
PAO – Modificirani UCT	19,2	5,9	31 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	9,0	2,1	23 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	13	6	46 %	Kuba i sur. (1997a,b)
	4-6	1,2-1,6	20-40 %	Kuba i sur. (1997b)
PAO - Phoredox	8,0	1,9	23 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	9,1	4,4	48 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	6,2	0,6	9 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	6,3	0,0	0 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
PAO – Sidestream PhoStrip	9,8	3,3	34 %	Lopez-Vazquez i sur. (2008a)
	2,2	1,7	80 %	Brdjanovic i sur. (2000)
PAO – Pilot BIODENIPHO	4	2	54 %	Meinhold i sur. (1999)

Kako je prikazano u tablici 2.9, anoksična brzina apsorpcije P rijetko doseže više od 5 mg PO₄-P g VSS⁻¹ h⁻¹, a u određenim je okolnostima vrlo niska ili je nema. U svakom slučaju, različite anoksične aktivnosti P su zbirni odraz (i) stupnja obogaćivanja denitrificirajućih PAO sposobnih koristiti kisik i nitrat (i/ili ostalih EBPR kultura i nus-populacija uključenih u proces denitrifikacije) (Kerr-Jespersen i Henze, 1993; Meinhold i sur., 1999; Saad i sur., 2016), i/ili (ii) kapaciteta denitrifikacije potaknutog kod PAO (Kuba i sur., 1996, 1997; Wachtmeister i sur., 1997). U svakom slučaju, stupanj izloženosti sustava s aktivnim muljem će pogodovati rastu denitrificirajućih EBPR populacija. Prema tome, jače anoksične aktivnosti apsorpcije P mogu se očekivati u konfiguracijama uređaja koji rade s definiranom fazom prethodne denitrifikacije.

2.7 Primjer

2.7.1 Opis

Kako bi se ilustriralo izvođenje šaržnog testa aktivnosti EBPR, u ovom se dijelu predstavljaju podaci iz anaerobno-aerobnog testa (Test EBPR.AER.2) provedenog pri 10 °C s laboratorijski obogaćenom EBPR kulturom. Test EBPR.AER.2 je bio proveden kako bi se odredila anaerobna stehiometrija i anaerobna i aerobna kinetika procesa EBPR. Šaržni test aktivnosti je proveden u bioreaktoru od 2,5 L. Sva oprema, aparatura i materijali su pripremljeni kako je opisano u odjeljku 2.3. Senzori za pH i DO su kalibrirani manje od 24 h prije izvođenja testa. Test je trajao 4,5 h, te se sastojao od 2,25 h anaerobne faze (stvorene kontinuiranim upuhivanjem plina N₂ tijekom čitavog testa), nakon koje je uslijedila aerobna faza od 2,25 h (stvorena dobavom zraka, s time da je dosegnuta koncentracija DO viša od 4 mg L⁻¹). Prije šaržnog testa, 1,25 L koncentriranog EBPR mulja uzetog na kraju aerobne faze laboratorijskog bioreaktora prebačeno je u bioreaktor i aklimatizirano 30 min pri 10 °C uz sporo miješanje (100 rpm) pri pH 7,0, prateći preporuke opisane u odjeljku 2.3.5. Priprema aktivnog mulja za testove napravljena je u manje od 1 h nakon uzimanja mulja. Nakon toga, 20 min prije početka testa, uzeti su uzorci za određivanje parametara od interesa (u skladu s izvođenjem testa EBPR.AER.2).

Tablica 2.10 Primjer eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje šaržnog testa aktivnosti (Test tipa br. EBPR.AER.2) provedenog s laboratorijski obogaćenim EBPR muljem pri 10 °C koristeći sintetički influent pri pH 7,0.

Kombinirani anaerobno-aerobni šaržni testovi EBPR											Oznaka: EBPR.AER.2			
Datum:	Četvrtak 17.12.2015. 9:00 h										Eksperimentalna procedura u kratkim crtama:			Vrijeme (h:min)
Opis:	Testovi pri 10 °C, pH 7, s umjetnim supstratom i obogaćenom kulturom PAO										1. Potvrditi dostupnost materijala za uzorkovanje i potrebne opreme			08:00
Test br.:	3 od 6										2. Potvrditi kalibriranost i funkcionalnost sustava, mjeraca i senzora			08:10
Trajanje:	4,5 h (270 min)										3. Prebaciti 1,25 L mulja u šaržni reaktor			08:20
Supstrat:	Sintetički: Acetat (350 mg L ⁻¹) + minerali										4. Održavati aerobne uvjete pomoću nježnog miješanja i upuhivanja plina pri zadanoj T i pH			08:40
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u										5. 20 min prije početka uzeti uzorak radi određivanja početnog stanja			08:40
Uzorci br.:	EBPR.AER.2(1-22)										6. Zaustaviti aeraciju i početi upuhivati plin N ₂			08:50
Ukupni volumen uzorka:	305 mL (10 mL za MLVSS, 12 mL za PHA, 4,5 mL za glikogen, 6 mL za ostale uzorke)										7. Započeti ciklus, dodati 1,25 L sintetičkog medija (0 min)			09:00
Volumen reaktora:	2,5 L										8. Nastaviti s programom uzorkovanja u skladu s planom provođenja (5 min)			09:05
											9. Zaustaviti upuhivanje plina N ₂ , započeti s dodavanjem zraka (135 min)			11:15
											10. Zaustaviti uzorkovanje i aeraciju (nakon 270 min)			13:30
											11. Organizirati uzorke i očistiti eksperimentalnu opremu i prostor			13:45
											12. Pobrinuti se da je sva oprema isključena i da su uzorci propisno zbrinuti			14:00
Plan provođenja uzorkovanja														
Vrijeme (min)	-20	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	90	135	
Vrijeme (h)	-0:33	0:00	0:08	0:17	0:25	0:33	0:42	0:50	0:67	0:83	1:00	1:50	2:25	
Uzorak br.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Parametar	ANAEROBNA FAZA													
HAc (C-mmol L ⁻¹)	5.83 ²		4.85	4.57	3.98	3.48	2.87	2.21	1.35	0.43	0	0	0	
PO ₄ -P (P-mmol L ⁻¹)	0 ¹		0.24	0.45	1.01	1.35	1.69	2.14	2.85	3.01	3.04	3.07	3.11	
NH ₄ -N (N-mmol L ⁻¹)	1.32 ¹			1.34								1.26	1.39	
PHA (C-mmol)	12.27											20.04	20.08	
Glikogen (C-mmol)	15.09											12.68	12.71	
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)	Vidi tablicu												Vidi tablicu	
¹ Prosječna vrijednost koncentracije prisutne u sintetičkom supstratu i tekućoj fazi uzorka mulja prije početka testa														
Plan provođenja uzorkovanja (nastavak)														
Vrijeme (min)	140	145	150	155	160	165	180	195	215	270				
Vrijeme (h)	2:33	2:42	2:50	2:58	2:67	2:75	3:00	3:25	3:58	4:50				
Uzorak br.	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22				
Parametar	AEROBNA FAZA													
HAc (C-mmol L ⁻¹)														
PO ₄ (P-mmol L ⁻¹)	3.00	2.73	2.45	2.20	1.90	1.64	0.84	0	0	0				
NH ₄ (N-mmol L ⁻¹)				1.11			1.09	1.07	1.06				1.05	
PHA (C-mmol)							15.55						11.72	
Glikogen (C-mmol)							15.04						15.90	
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)													Vidi tablicu	
Mjerenja MLSS i MLVSS														
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer					
Početak anaerobne faze ²	1	0.08835	0.16525	0.10792	0.07690	0.05733	7,690	5,733	0.75					
	2	0.08835	0.16553	0.10997	0.07718	0.05556	7,718	5,556	0.72					
	3	0.08834	0.16435	0.10903	0.07601	0.05532	7,601	5,532	0.73					
Kraj anaerobne/Početak aerobne fa	4	0.08858	0.12437	0.09606	0.03579	0.02831	3,579	2,831	0.79					
	5	0.08848	0.12564	0.09646	0.03716	0.02918	3,716	2,918	0.79					
	6	0.08914	0.12527	0.09648	0.03613	0.02879	3,613	2,879	0.80					
Kraj aerobne faze	7	0.08868	0.12859	0.09952	0.03991	0.02907	3,991	2,907	0.73					
	8	0.08764	0.12716	0.09881	0.03952	0.02835	3,952	2,835	0.72					
	9	0.08722	0.12622	0.09800	0.03900	0.02822	3,900	2,822	0.72					
						Prosjeck	3,636	2,876	0.79					
						Prosjeck	3,948	2,855	0.72					
² Uzorak uzet prije dodavanja supstrata														
Sastav biomase														
Točka uzorkovanja	Početak anaer.	Kraj anaer.	Kraj aer.											
MLSS (mg L ⁻¹)	3,835	3,636	3,948											
MLVSS (mg L ⁻¹)	2,804	2,876	2,855											
Omjer	0.73	0.79	0.72											
Pepeo (mg L ⁻¹)	1,031	760	1,093											
PHB (mg L ⁻¹)	241.7	392.0	232.1											
PHV (mg L ⁻¹)	20.9	37.3	18.6											
PHA (mg L ⁻¹)	262.6	429.3	250.8											
Glikogen (mg L ⁻¹)	423.7	343.3	429.2											
% (PHA+GII) MLVSS ⁻¹	32.0	37.0	31.0											
Aktivna biomasa (mg L ⁻¹)	2,117	2,103	2,175											
Aktivna biomasa (Cmmol L ⁻¹)	81.4	80.9	83.6											
				Napomena:										
				Acetat (CH ₃ CO) 30.03 mg C-mmol ⁻¹										
				Ortofosfat (PO ₄ -P) 31.00 mg P-mmol ⁻¹										
				Amonij (NH ₄ -N) 14.00 mg N-mmol ⁻¹										
				PHB (CH _{1.5} O _{0.5}) 21.52 mg C-mmol ⁻¹										
				PHV (CH _{1.6} O _{0.4}) 20.02 mg C-mmol ⁻¹										
				Glikogen (CH ₁₀₆ O ₅₆) 27.00 mg C-mmol ⁻¹										
				Biomasa (CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.26}) 26.00 mg C-mmol ⁻¹										

Tablica 2.11 Sažeti prikaz anaerobnih i aerobnih konverzija opaženih u primjeru šaržnog testa aktivnosti (Test tipa EBPR.AER.2) provedenog s laboratorijski obogaćenim EBPR muljem pri 10 °C koristeći sintetski influent pri pH 7,0.

Parametar	Jedinica	Anaerobna faza			Aerobna faza		
		Početak [Vrijeme: 0]	Kraj [Vrijeme: 135 min]	Anaerobna konverzija	Početak [Vrijeme: 135 min]	Kraj [Vrijeme: 270 min]	Aerobna konverzija
Ac	C-mmol L ⁻¹	5,20	0,00	-5,20	0,00	0,00	0,00
PO ₄ -P	P-mmol L ⁻¹	0,00	3,11	3,11	3,11	0,00	-3,11
NH ₄ -N	N-mmol L ⁻¹	1,32	1,39	0,07	1,39	1,05	-0,34
PHB	C-mmol L ⁻¹	11,23	18,21	6,99	18,21	10,79	-7,43
PHV	C-mmol L ⁻¹	1,05	1,86	0,82	1,86	0,93	-0,93
PHAs (PHB+PHV)	C-mmol L ⁻¹	12,27	20,08	7,80	20,08	11,72	-8,36
Glikogen	C-mmol L ⁻¹	15,69	12,71	-2,98	12,71	15,90	3,18

Tablica 2.12 Sažeti prikaz anaerobnih i aerobnih stehiometrijskih i kinetičkih parametara opaženih u primjeru šaržnog testa aktivnosti (Test tipa EBPR.AER.2) provedenog s laboratorijski obogaćenim EBPR muljem pri 10 °C koristeći sintetski influent pri pH 7,0.

Konverzija	Simbol	Jedinica	Procijenjena vrijednost
Anaerobna stehiometrija			
Omjer neto otpuštenog P i apsorpcije Ac ^a	Y _{Ac,PO4,An}	P-mol C-mol ⁻¹	0,57
Omjer proizvodnje PHA i apsorpcije Ac	Y _{Ac,PHA,An}	C-mol C-mol ⁻¹	1,50
Omjer proizvodnje PHV i proizvodnje PHB	Y _{PHV/PHB,An}	C-mol C-mol ⁻¹	0,12
Omjer potrošnje glikogena i apsorpcije Ac	Y _{Gly/Ac,An}	C-mol C-mol ⁻¹	0,57
Anaerobne kinetičke brzine^b			
Maksimalna volumetrijska brzina apsorpcije Ac	r _{Ac,An}	C-mmol L ⁻¹ h ⁻¹	6,15
Maksimalna specifična brzina apsorpcije Ac	q _{Ac,An}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	0,075
Maksimalna volumetrijska brzina otpuštanja PO ₄	r _{PP,PO4,An}	P-mmol L ⁻¹ h ⁻¹	4,42
Maksimalna specifična brzina otpuštanja PO ₄	q _{PP,PO4,An}	P-mmol L ⁻¹ h ⁻¹	0,054
Brzina naknadnog anaerobnog otpuštanja PO ₄	r _{PP,PO4,Sec,An}	P-mmol L ⁻¹ h ⁻¹	0,063
Koeficijent anaerobnog održavanja	m _{PP,PO4,An}	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	7,69 E-04
Aerobne kinetičke brzine			
Maksimalna volumetrijska brzina apsorpcije PO ₄	r _{PO4,PP,Ox}	P-mmol L ⁻¹ h ⁻¹	3,12
Maksimalna specifična brzina apsorpcije PO ₄	q _{PO4,PP,Ox}	P-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	0,038
Volumetrijska aerobna brzina potrošnje NH ₄ ^c	r _{NH4,Bio,Ox}	N-mol L ⁻¹ h ⁻¹	0,15
Maksimalna specifična brzina rasta biomase ^d	q _{PAO,Ox}	C-mol C-mol ⁻¹ h ⁻¹	0,009

^a Ne uključujući naknadno otpuštanje P množenjem r_{PP,PO4,Sec,An} s trajanjem anaerobne faze (0,063 P-mmol L⁻¹ h⁻¹ · 2,25 h = 0,142 P-mmol).

^b Procijenjeno dijeljenjem maksimalnih volumetrijskih brzina konverzije s koncentracijom aktivne biomase na početku testa od 81,4 C-mmol.

^c Procijenjeno: aerobna potrošnja NH₄ podijeljena s trajanjem aerobne faze.

^d Procijenjeno: volumetrijska aerobna brzina potrošnje NH₄ podijeljena s N-sadržajem biomase (0,20 N-mol) i početnom koncentracijom aktivne biomase (81,4 C-mmol L⁻¹).

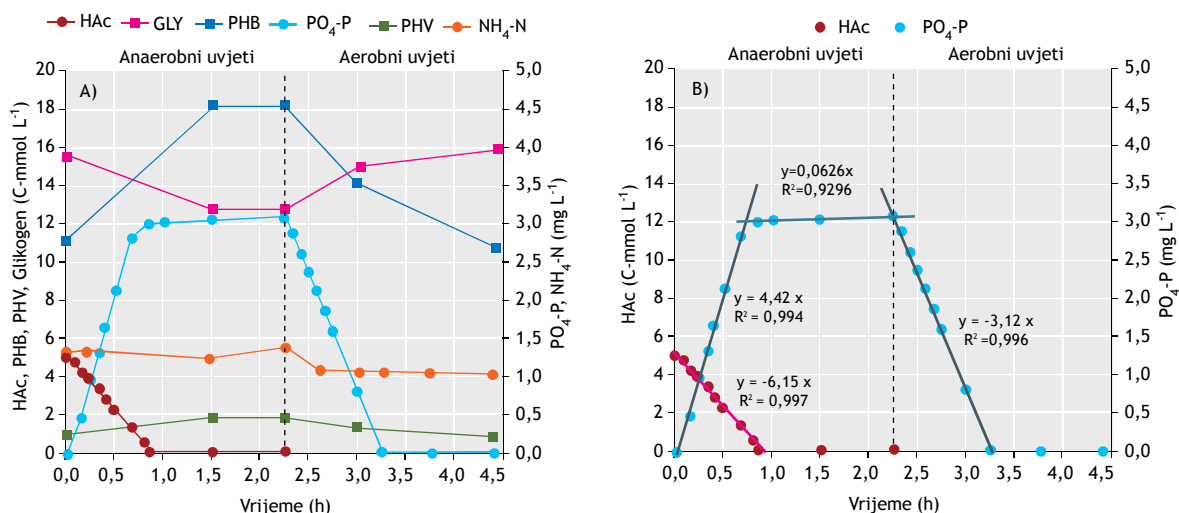
Test je počeo dodavanjem 1,25 L sintetičke otpadne vode koja je sadržavala 350 mg COD L⁻¹ kao Ac (ostali makro- i mikro-nutrijenti kao i 20 mg L⁻¹ ATU bili su uključeni u sintetičkoj otpadnoj vodi u skladu s odjeljkom 2.3.3). Budući da se test izvodio pri 10 °C, temperatura sintetičke otpadne vode prilagođena je na 10 °C u vodenoj kupelji u kojoj je održavana ista temperatura prije početka pokusa. Kako je glavni cilj bio odrediti anaerobnu stehiometriju i anaerobnu i aerobnu kinetiku procesa EBPR, uzorci su uzimani češće (svakih 5 min) u prvih 30 min svake anaerobne i aerobne faze. Odmah nakon uzimanja, svi uzorci su pripremljeni, sačuvani i pohranjeni prije analitičkog određivanja parametara od interesa (npr. PO₄, MLSS, MLVSS i PHA, među ostalim parametrima) kako je opisano u odjeljku 2.3.4 „Priprema materijala“. Svi uzeti uzorci su analizirani kako je opisano u odjeljku 2.2.5. Konkretno, unutarstanično pohranjeni PHA su određeni prema protokolu za određivanje PHB i PHV, a glikogen je određen metodama kiselinske hidrolize i ekstrakcije (Smolders i sur., 1994a). Ostali spojevi PHA, poput PH₂MV, nisu mjereni budući da je acetat bio dobavljen izvor ugljika, zbog čega se očekivalo da će PHB i PHV činiti većinu PHA. U tablici 2.10 prikazan je eksperimentalni plan provedbe izvođenja testa.

2.7.2 Analiza podataka

Nastavljajući se na rezultate iz eksperimenta prikazanih u tablici 2.10, slika 2.8 prikazuje rezultate testa prikazanih u planu provedbe, kao i procjenu maksimalnih volumetrijskih brzina primjenom linearne regresije. Različite anaerobne i aerobne konverzije parametara od interesa prikazane su u tablici 2.11, dok tablica 2.12 sadrži procjenu različitih anaerobnih i aerobnih stehiometrijskih i kinetičkih parametara od interesa.

Sve u svemu, rezultati šaržnog testa aktivnosti (slika 2.8) pokazuju tipični fenotip mulja kojim dominiraju PAO: puna apsorpcija Ac u anaerobnoj fazi povezana s anaerobnim otpuštanjem P, proizvodnjom PHA i potrošnjom glikogena, dok je puna apsorpcija PO_4 opažena u aerobnoj fazi zajedno s korištenjem PHA, nastajanjem glikogena i niskom potrošnjom NH_4 . Nadalje, relativno nizak omjer VSS/TSS opažen na početku i kraju testa (od oko 0,72-0,73) je tipičan za sustave EBPR zbog akumuliranja poli-P (koji je odražen u višem sadržaju pepela) u usporedbi sa sustavima koji provode jedino uklanjanje organskih tvari (pri čemu omjeri VSS/TSS obično nisu niži od 0,80) (Wentzel i sur., 2008).

Kako je prikazano u tablici 2.12, anaerobna stehiometrija, naročito omjer neto otpuštenog P i apsorpcije Ac ($Y_{\text{Ac},\text{PO}_4,\text{An}}$, PO_4/Ac ili P/C) od 0,57 P-mol C-mol^{-1} u kombinaciji s omjerom potrošnje glikogena i apsorpcije Ac od 0,57 C-mol C-mol^{-1} ukazuje da opažena aktivnost biomase (fiziologija) odgovara onoj kojom dominira metabolizam PAO (tablica 2.3). To može potvrditi relativno nizak omjer proizvodnje PHV i proizvodnje PHB ($Y_{\text{PHV}/\text{PHB},\text{An}}$) od 0,12 budući da se omjeri PHV/PHB blizu ili niži od 0,10 obično opažaju u sustavima obogaćenima s PAO (Smolders i sur., 1994a) zbog manje potrošnje glikogena za apsorpciju Ac u usporedbi sa sustavima kojima dominiraju GAO (Zeng i sur., 2003a). Nadalje, kada se opaženi omjer PO_4/Ac uspoređi s vrijednostima u tablici 2.3 (za obogaćene EBPR kulture) i slici 2.5, čini se da su PAO (ili njihova aktivnost) dominantni u mulju. Međutim, to je tek gruba procjena koju bi trebalo usporediti s korištenjem molekularnih tehnika. Omjer P/TSS u mulju također se može koristiti za ocjenu očekivanog omjera PO_4/Ac (slika 2.7). Ipak, na temelju prethodnih podataka, uzorak mulja pokazuje zadovoljavajuću aktivnost EBPR.



Slika 2.8 Grafički prikaz podataka dobivenih u primjeru eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje šaržnog testa aktivnosti (Test EBPR.AER.2, Tablica 2.10) provedenog s laboratorijski obogaćenim EBPR muljem pri 10 °C koristeći sintetički influent pri pH 7,0: A) profili eksperimentalnih podataka od interesa i B) eksperimentalni podaci o Ac i PO_4 prikazom linija glavnih trendova brzina konverzije za daljnju procjenu maksimalnih brzina.

Važan alat za ocjenu dosljednosti i kvalitete podataka je bilanca COD. U ovom primjeru, bilanca COD je napravljena kako bi se ocijenile anaerobne konverzije EBPR te pokazuje da se potroši oko 5,83

C-mmol Ac i 2,98 C-mmol glikogena, dok se proizvede 7,80 C-mmol PHA. Korištenjem faktora konverzije COD od 32 mg COD C-mmol⁻¹ i za Ac i za glikogen odnosno 36 mg COD mg C-mmol⁻¹ za PHA, procjenjuje se greška bilance COD ($\Delta\text{COD}(\%)$) od oko 0,2 % korištenjem jedn. 2.2. Slična bilanca COD se može napraviti s aerobnom konverzijom COD ako se provede test respirometrije.

Vezano uz anaerobne brzine, vrijednosti $q_{\text{Ac,An}}$ i $m_{\text{PP,PO}_4,\text{An}}$ od 0,075 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ odnosno $7,69 \times 10^{-4}$ P-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ se čine nižima od tipičnih vrijednosti prijavljenih za sustave obogaćene s PAO, oko 0,20 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ odnosno $2,1 \times 10^{-3}$ P-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ (tablica 2.12). Ipak, treba imati na umu da je šaržni test aktivnosti proveden pri temperaturi od 10 °C, dok su prethodne vrijednosti navedene u literaturi uglavnom dobivene iz testova provedenih pri 20 °C. Prema tome, radi usporedbe s testovima provedenima pri 20 °C (kao i pri ostalim temperaturama), Arrheniusovi koeficijenti temperature (θ) koje je predložio Meijer (2004) mogu se koristiti (1,094 za apsorpciju ugljika i 1,071 za anaerobno održavanje) za procjenu ekvivalentnih brzina pri 20 °C na temelju testova provedenih pri 10 °C. Stoga, ekvivalentne brzine pri 20 °C su: 0,18 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ za maksimalnu brzinu apsorpcije acetata (procijenjen $q_{\text{Ac,20,An}} = q_{\text{Ac,10,An}} / \theta^{(10-20)}$) i $1,53 \times 10^{-3}$ P-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ ($m_{\text{PP,PO}_4,20,\text{An}} = m_{\text{PP,PO}_4,10,\text{An}} / \theta^{(10-20)}$).

Slično tome, za maksimalnu aerobnu specifičnu brzinu apsorpcije ($q_{\text{PO}_4,\text{PP,Ox}}$) od 0,038 P-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ opaženu pri 10 °C, ekvivalentna maksimalna specifična brzina od 0,050 P-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ se procjenjuje pri 20 °C, što je unutar vrijednosti ranije navedenih u literaturi (tablica 2.6). Kako je prethodno navedeno, rast biomase se ne može izravno odrediti iz porasta MLVSS budući da će potencijalno mali rast biomase vjerojatno potpasti pod standardnu pogrešku tehnike analitičkog određivanja MLVSS. Umjesto toga, rast biomase se procjenjuje na temelju potrošnje NH₄ opažene u testu (pri čemu treba osigurati da NH₄ nije uklonjen nekim drugim biološkim ili kemijskim procesom). Tako se određuje maksimalna specifična brzina rasta biomase ($q_{\text{Bio,Ox}}$) od 0,009 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹ (C-mol nove biomase proizveden po C-molu postojeće biomase). Nakon ponovnog izračuna približne brzine rasta biomase s 10 °C na 20 °C (koristeći Arrheniusove koeficijente temperature za rast biomase od 1,081), procijenjena brzina rasta biomase je 0,020 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹, što je unutar raspona prethodno prijavljenih vrijednosti za EBPR mulj (0,016 C-mol C-mol⁻¹ h⁻¹) (Smolders, 1995). Sve u svemu, stehiometrijski i kinetički parametri dobiveni u testu su usporedivi sa sličnim vrijednostima ranije navedenima u literaturi za EBPR kulture (tablica 2.3), što snažno upućuje na to da je aktivnost EBPR opažena u testu bila tipična za obogaćenu EBPR kulturu.

2.8 Dodatna razmatranja

2.8.1 Pojava GAO u EBPR sustavima

Zbog štetnih učinaka koje organizmi koji akumuliraju glikogen mogu imati na uspješnost EBPR, pojava GAO je zadnjih godina predmet opsežnih istraživanja. Dosad su (i) dostupnost jednog izvora COD u influentu (bilo acetat ili proprionat), (ii) temperatura viša od 20 °C i (iii) pH vrijednosti niže od 7,0 predloženi kao glavni faktori koji pogoduju prisutnosti GAO u (laboratorijskim) EBPR sustavima (Filipe i sur., 2001b; Oehmen i sur., 2004; Lopez-Vazquez i sur., 2009b). Najkarakterističniji aspekti koji sugeriraju prisutnost GAO su anaerobni omjeri otpuštenog P i apsorpcije C puno niži od 0,50 P-mol C-mol⁻¹ i nepotpuna aerobna apsorpcija PO₄. Unatoč prividno čestoj pojavi GAO u laboratorijskim EBPR sustavima (možda kao posljedica rada laboratorijskih sustava na granicama gore navedenih parametara: s jednim izvorom ugljika, obično acetat, pri pH 7,0 i 20 °C), obilne populacije GAO se rijetko nalaze u komunalnim EBPR uređajima (Thomas i sur., 2003; Saunders i sur., 2003; Lopez-Vazquez i sur., 2008a; Lopez-Vazquez, 2009; Kong i sur., 2006), osim ako se ne odvijaju određeni uvjeti (kao što je ispuštanje industrijskih efluenata) (Burow i sur., 2007). Premda bi nizak anaerobni omjer otpuštenog P i apsorpcije C mogao upućivati na veću aktivnost ili uključenost GAO, kako je opisano u tekstu u nastavku, novija opažanja su pružila dokaze da PAO, u uvjetima ograničenja unutarstaničnim poli-P, mogu provesti sličan metabolizam kao GAO u anaerobnim uvjetima, ali ipak postići puno aerobno uklanjanje P (Schuler i Jenkins, 2003; Zhou i sur., 2008; Acevedo i sur., 2012; Welles i sur., 2015b). Stoga, anaerobni omjer otpuštenog P i apsorpcije C znatno niži od 0,50 P-mol C-mol⁻¹ (npr. oko 0,35 P-mol C-mol⁻¹) opažen u šaržnim testovima aktivnosti EBPR nužno ne znači da su GAO brojniji od PAO. I dok će stvarni mehanizmi koji djeluju na korištenje metabolizma tipa GAO sa strane PAO vjerojatno nastaviti biti predmet budućih istraživanja, korištenje mikroskopskih i molekularnih tehnika se preporučuje za identificiranje dominantnih EBPR mikrobnih populacija.

2.8.2 Učinak izvora ugljika

Dobro je poznato da RBCOD dodan u anaerobnu fazu (sadrži uglavnom hlapive masne kiseline kao što su acetat i propionat) poboljšava rast EBPR biomase (Comeau i sur., 1986; Mino i sur., 1998; Oehmen i sur., 2004). Ostali izvori RBCOD, kao što je glukoza, nisu prikladni zato što izgleda da poboljšavaju rast GAO ili G-bakterija (Cech i Hartman, 1993). Isto tako, pretpostavlja se da složenije supstrate treba hidrolizirati i fermentirati do VFA kako bi postali dostupni za EBPR biomasu (Wentzel i sur., 2008). S tim u vezi, vjerojatno je da složeniji izvori COD neće biti u cijelosti potrošeni u anaerobnoj fazi i da će 'curiti' u anoksičnu ili aerobnu fazu, što će djelovati na anoksične i aerobne rezultate EBPR (na primjer, kad se provode kombinirani anaerobno-anoksično-aerobni testovi, poput testa EBPR.ANOX.2 ili EBPR.AER.2). U idealnom slučaju, za zadovoljavajuće tumačenje dobivenih eksperimentalnih podataka, nikakav izvor COD ne može biti prisutan u anoksičnoj ili aerobnoj fazi šaržnog testa aktivnosti EBPR (osim ako nije predmet od interesa). Uz to, noviji razvoj iznosi hipotezu da, osim očito poznatih PAO (*Candidatus Accumulibacter phosphatis*), i drugi organizmi, poput *Actinobacteria* ili S-PAO (Kong i sur., 2005; Wu i sur., 2014), mogu provesti prekomjernu apsorpciju P kao što je *Accumulibacter* koristeći alternativne donore elektrona (npr. aminokiseline ili H₂S). Za svakodnevne ili redovne testove na dobro poznatim EBPR sustavima, korištenje sintetičkih otpadnih voda koji sadrže VFA može biti dovoljno dobro da se dobije zadovoljavajuća ocjena EBPR aktivnosti, kako je prikazano u ovom izvješću. Međutim, korištenje i primjena složenijih izvora COD, koji nesumnjivo mogu biti prisutni u sirovjoj ili istaloženoj otpadnoj vodi, može dovesti ili do EBPR aktivnosti niže od optimalne ili (zasad još uvijek nepoznatih) drugačijih metabolizama EBPR. Ovo potonje jest i nastaviti će biti predmet opsežnih istraživanja. Čitatelj mora biti svjestan da takvi uvjeti mogu dovesti do rezultata koji se mogu razlikovati od onih predstavljenih u ovom izvješću.

2.8.3 Učinak temperature

I dok su opsežna istraživanja posvećena ocjenjivanju ovisnosti kultura EBPR o temperaturi, i daju naslutiti da temperature niže od 20 °C pospješuju rast PAO, dok više temperature pogoduju razvoju GAO (Brdjanovic i sur., 1997, 1998b; Lopez-Vazquez i sur., 2009a), određena opažanja su ukazala na to da stabilni EBPR sustavi mogu raditi pri temperaturama višima od 25 °C (Cao i sur., 2009). Premda će za svaki pojedini slučaj specifične kombinacije između sastava otpadne vode, radnih i okolišnih uvjeta imati veliku ulogu, dugotrajan rad i aklimatizacija EBPR kultura na takve posebne uvjete također može dovesti do razvoja i obogaćivanja PAO kultura (ili sličnih organizama koji dijele fenotip PAO) koje mogu provesti stabilni EBPR pri višoj temperaturi. U tom pogledu, identifikacija takvih organizama je od velike važnosti ondje gdje će mikrobiološke metode i molekularne tehnike biti potrebne i primjenjive kako bi se objasnio identitet tih organizama.

2.8.4 Učinak pH

Kako je već rečeno, pH izravno djeluje na EBPR kulture (Smolders i sur., 1994a, Filipe i sur., 2001a). Tijekom šaržnih testova aktivnosti EBPR, pH treba pažljivo pratiti i dobro kontrolirati kako bi se dobili pouzdani podaci (treba izbjegavati fluktuacije pH veće od $\pm 0,1-0,2$). Međutim, više razine pH (naročito iznad pH 8,0) zajedno s prisutnošću RBCOD mogu dovesti do (očekivano) većeg anaerobnog otpuštanja P i pogodovati kemijski potaknutoj precipitaciji fosfata pomoću kalcija ili čak formiranju struvita ovisno o sastavu otpadne vode (NH₄MgPO₄ ili KMgPO₄) (Lin i sur., 2012; Mañas i sur., 2011). Isto tako, ne može se zanemariti da prisutnost aluminijskih soli u otpadnoj vodi, nastalih ispuštanjem mulja iz uređaja za proizvodnju vode za piće, može dovesti do precipitacije fosfora, naročito ako postoji dovoljno vrijeme zadržavanja u kanalizacijskoj mreži. Tim procesima će se smanjiti biološka dostupnost fosfora za PAO, što će rezultirati potencijalnim narušavanjem procesa EBPR, budući da PAO neće biti u mogućnosti nadopuniti svoje unutarstanične zalihe poli-P. Takvi će uvjeti dovesti do vrijednosti različitih od onih predstavljenih u ovom izvješću. S druge strane, premda prethodni proces ne mora biti poželjan i stoga bi ga trebalo izbjegavati u kontinuiranim konvencionalnim naizmjeničnim anaerobno-anoksično-aerobnim EBPR sustavima, on može ponuditi zanimljive alternativne opcije za oporavak P koje može biti vrijedno istražiti u svjetlu važne uloge fosfora u prehrambenom lancu i potencijalnom osiromašenju konvencionalnih svjetskih izvora fosfora.

2.8.5 Denitrifikacija pomoću EBPR kultura

Denitrificiranje mulja iz EBPR je predmet raširene debate od 90-ih godina 20. stoljeća. I dok je zadovoljavajuće simultano uklanjanje NO_3 i apsorpcija PO_4 opaženo u anoksičnoj fazi nekoliko EBPR sustava (Vlekke *et al.*, 1988; Kuba i sur., 1993, 1996, 1997a, 1997b; Wachtmeister i sur., 1997; Brdjanovic i sur., 2000; Zeng i sur., 2003b), ograničena ili nedosljedna simultana denitrifikacija i apsorpcija PO_4 opažena je u ostalim laboratorijskim i gradskim uređajima (Kern-Jespersen i Henze, 1993; Hu i sur., 2003; Carvalho i sur., 2007; Lopez-Vazquez i sur., 2008a). Zapravo, izgleda da je otkriće postojanja dvije različite podskupine *Accumulibacter* (poznati PAO) bilo potaknuto ocjenom denitrifikacijske sposobnosti EBPR biomase (Flowers i sur., 2008). Flowers i sur. (2008) su predložili da tzv. Tip I podskupine *Accumulibacter* ima sposobnost pune denitrifikacije (može denitrificirati od nitrata do plinovitog dušika), dok izgleda da Tip II podskupine *Accumulibacter* jedino može denitrificirati od nitrata nadalje (u skladu s prvim opažanjima Kern-Jespersen i Henze, 1993). Kako su sugerirali Kuba i sur. (1996) i Lopez-Vazquez i sur. (2008a), sposobnost mulja iz EBPR za simultano uklanjanje NO_3 i anoksičnu apsorpciju PO_4 može biti i odraz stvaranja potrebnih denitrificirajućih enzima (nitrat i nitrit reduktaza) i razvoja EBPR te sporednih populacija sposobnih za denitrificiranje. Stoga, kad se provode anoksični testovi aktivnosti EBPR, opažene relativne anoksične aktivnosti EBPR mogu uvelike varirati od praktički nule do znatno visokih anoksičnih aktivnosti (tablica 2.8, tablica 2.9) kao funkcija prethodno raspravljenih anoksičnih uvjeta i razvoja denitrificirajućih populacija u laboratorijskim ili gradskim uređajima.

2.8.6 Višak/manjak unutarstaničnih spojeva

Premda se iscrpljivanje unutarstaničnih zaliha poli-P u početku smatralo ograničavajućim faktorom za anaerobnu apsorpciju VFA od strane PAO (Brdjanovic i sur., 1997), kasnija dostignuća su pokazala da PAO mogu koristiti veće količine unutarstanično pohranjenog glikogena kao izvora energije za anaerobnu apsorpciju VFA kako bi se nadoknadila ograničena dostupnost poli-P i još uvijek provesti zadovoljavajuću potpuno aerobnu apsorpciju P (Schuler i Jenkins, 2003; Zhou i sur., 2008, Acevedo i sur., 2012; Welles i sur., 2014, 2015b, 2016). To je odraženo u aerobnim omjerima otpuštenog P i apsorpcije C puno nižima od $0,50 \text{ P-mol C-mol}^{-1}$ (slika 2.7) i većim anaerobnim omjerima glikogena i C (tablica 2.3). Na temelju opažanja Schuler i Jenkins (2003) te Welles i sur. (2015b), izgleda da se pomak s metaboličkog korištenja poli-P na glikogen odvija čim omjer ukupni P/TSS u biomasi padne ispod $0,08 \text{ mg P g TSS}^{-1}$ (Acevedo i sur., 2014). Nadalje, Welles i sur. (2015b) su primijetili da su maksimalne brzine dviju poznatih podskupina *Accumulibacter* (Flowers i sur., 2008) pogođene na različit način ovisno o dostupnosti unutarstaničnog poli-P, pri čemu je Tip I *Accumulibacter* pogođen više od Tipa II podskupine *Accumulibacter*. Time se mogu objasniti potencijalna odstupanja od onih predstavljenih u ovom izvješću, što se može potkrijepiti određivanjem sadržaja unutarstaničnog poli-P i glikogena ili barem procjenom omjera P/TSS u biomasi.

2.8.7 Prekomjerna aeracija

Izloženost EBPR biomase razdobljima produžene aeracije (npr. duže od 12-24 h) može dovesti do posljedičnog iskorištavanja PHA, glikogena i unutarstaničnog poli-P u aerobnim uvjetima (Brdjanovic i sur., 1998c; Lopez i sur., 2006), kao posljedica potreba biomase da zadovolji potrebe svojeg aerobnog održavanja. Slijedom toga, to će dovesti do konačnog aerobnog otpuštanja P čim unutarstanično pohranjene zalihe poli-P počnu biti hidrolizirane. Prema tome, ako se uzorci mulja iz EBPR aeriraju duže vrijeme prije izvođenja šaržnih testova aktivnosti (npr. preko noći ili tijekom transporta), vjerojatno je da će biti opažena niža aktivnost EBPR zbog potencijalno niskog (nižeg) sadržaja poli-P i glikogena u mulju. Stoga treba izbjegavati uvjete prekomjerne aeracije. Nadalje, to zaslužuje posebnu pažnju za zadovoljavajući rad gradskih EBPR uređaja s aktivnim muljem budući da razdoblja produžene aeracije u uvjetima niskog opterećenja (npr. vikendi ili praznici) mogu rezultirati neželjenim aerobnim otpuštanjem P, što će djelovati na kvalitetu obrađenog efluenta.

2.8.8 Manjak esencijalnih iona

Premda može biti trivijalna, prisutnost makro- i mikro-nutrijenata u pravoj koncentraciji i (biološka) raspoloživost je nužna za EBPR sustave s aktivnim muljem. Na primjer, kalij, magnezij, željezo i kalcij su među ostalima, prilično važni za reguliranje mikrobnog EBPR metabolizma i podržavaju pohranjivanje

unutarstaničnih spojeva (Brdjanovic i sur., 1997; Burow i sur., 2007; Barat i sur., 2008). Odsutnost, na primjer kalija, može dovesti do narušavanja procesa EBPR (Brdjanovic i sur., 1997), ali i njihov višak može djelovati na metabolizam PAO čime se potiče metabolizam GAO (Jobaggy i sur., 2006; Barat i sur., 2008), možda zbog kemijske precipitacije fosfora pomoću gore spomenutih elemenata. Time će se smanjiti njihova biološka raspoloživost, a time i aerobno nadopunjavanje zaliha poli-P. Izostanak ili prisutnost gore spomenutih elemenata u prekomjernim koncentracijama treba provjeriti ako se sumnja da se njihove koncentracije razlikuju od onih koje se redovno opažaju u sustavima obrade komunalne otpadne vode.

2.8.9 Toksičnost/inhibicija

Ograničen broj spojeva je identificiran kao toksičan ili inhibitoran za proces EBPR. Prisutnost nitrata ili nitrata u anaerobnoj zoni se smatra štetnim za proces EBPR budući da oni pospješuju aktivnost običnih denitrificirajućih organizama koji mogu potrošiti raspoloživi RBCOD na štetu PAO (Wentzel i sur., 2008). Isto tako, dokazano je da prisutnost nitrata u aerobnoj zoni u koncentracijama od svega 6-8 mg L⁻¹ inhibira PAO (Saito i sur., 2004), što može pogoršati negativne učinke pri nižem pH zbog povećanja slobodne dušične kiseline (FNA) (Zhou i sur., 2008; Pijuan i sur., 2010). Ovo potonje pogoduje pojavi GAO na štetu PAO, budući da su GAO tolerantniji na prisutnost FNA (Pijuan i sur., 2011), što rezultira narušavanjem procesa EBPR. Salinitet je još jedan faktor koji može inhibirati aktivnost PAO u kratkom roku (sati) (Welles i sur., 2014, 2015a). Welles i sur. (2014) su opazili da, nakon kratkotrajne izloženosti (sati), koncentracije klorida od svega 10.000 mg NaCl L⁻¹ (1 % salinitet) mogu dovesti do više od 50-postotne inhibiranosti anaerobnog metabolizma PAO i zapravo u cijelosti inhibirati aerobni metabolizam. Do sličnih okolnosti može doći zbog iznenadnog prodora soli u kanalizaciju ili prodora soli u uređaj (naročito na obalnim područjima), ili ih mogu uzrokovati ispusti industrijskih efluenata. Ipak, dugotrajna izloženost mulja iz EBPR visokim koncentracijama saliniteta (> 35.000 mg NaCl L⁻¹, 3,5 % salinitet) može poboljšati aklimatizaciju EBPR biomase koja može postati tolerantna na sol i sposobna provesti zadovoljavajuće poboljšano biološko uklanjanje fosfora na razinama saliniteta ekvivalentnima onima koje su opažene u morskoj vodi. Drugi spoj koji je potencijalno inhibitoran ili toksičan za mulj iz EBPR je H₂S, koji se može formirati u otpadnoj vodi (zbog prodora soli ili industrijskih ispusta) ili u anaerobnoj fazi sustava EBPR s aktivnim muljem. Njegova prisutnost može biti prilično inhibitorna za anaerobni metabolizam PAO pri koncentracijama od svega 20-25 mg H₂S L⁻¹ što dovodi do 50-postotne inhibiranosti (Saad i sur., 2013; Rubio-Rincon i sur., 2016). Sve u svemu, inhibitorni učinci će biti odraženi u ograničenoj aktivnosti EBPR ili aktivnosti EBPR manjoj od optimalne. Ako je to izvedivo, mulj se može oprati u otopini nutrijenata (kako je objašnjeno u odjeljku 2.3.5) kako bi se izbjegli potencijalno inhibitorni ili toksični spojevi.

3. Smjernice za provođenje laboratorijskih eksperimenata za biološko uklanjanje dušika (N) iz otpadnih voda

3.1 Opis procesa

Potreba za uklanjanjem dušika iz otpadnih voda proizlazi iz njegovog potencijalnog toksičnog učinka na život u vodi u prijemnim vodnim tijelima kao slobodnog amonijaka (NH_3), njegovog učinka na dušičnu potrošnju kisika i njegovu ulogu kao nutrijenta u pospješivanju eutrofikacije, naročito u morskim sredinama (Metcalf i Eddy, 2003). Dušik je uglavnom prisutan u otpadnim vodama u svojem reduciranom obliku kao amonij (NH_4) i može ga se ukloniti različitim fizikalno-kemijskim i biološkim procesima. Odabir najbolje opcije obično se temelji na ekonomskoj isplativosti. Općenito, fizikalno-kemijske metode kao što su otplinjavanje amonijaka zrakom, kloriranje do prijelomne točke i selektivna ionska izmjena karakteriziraju viši operativni troškovi koji se smatraju ekonomski izvedivima jedino kad su koncentracije amonija veće od 5 g N L^{-1} (Mulder, 2003). U otpadnim vodama koje sadrže manje od 5 g N L^{-1} , što je slučaj za neke industrijske efluenate i većinu komunalnih otpadnih voda (gdje su tipične koncentracije dušika obično niže od 100 mg N L^{-1}), obično se preferiraju procesi biološkog uklanjanja dušika zbog nižih operativnih troškova. Mogu se koristiti različiti biološki procesi i njihove kombinacije, što uključuje odgovarajuće metaboličke putove. Među proizašlim alternativama, karakteristike otpadne vode u smislu ulaznog omjera COD/N će dati smjernice u određivanju najprikladnijih bioloških procesa za uklanjanje dušika. Mogu se razlikovati tri raspona ulaznog omjera COD/N:

- (i) Za visoke ulazne omjere COD/N ($> 20 \text{ g COD g N}^{-1}$), potrebe za dušikom ili asimilacija dušika sa strane heterotrofnih bakterija (obični heterotrofni organizmi: X_{OHO}) za sintezu biomase tijekom uklanjanja COD (organska tvar) je obično dovoljna za postizanje potrebne koncentracije dušika u efluentu.
- (ii) Za ulazne omjere COD/N koji se nalaze između 5 i $20 \text{ g COD g N}^{-1}$, može se koristiti kombinacija asimilacije dušika za mikrobnog rasta i primjena konvencionalnih procesa nitrifikacije i heterotrofne denitrifikacije.
- (iii) Za omjere COD/N niže od 5 g COD g N^{-1} , konvencionalnim procesima nitrifikacije i heterotrofne denitrifikacije teško se mogu ostvariti zadovoljavajuće razine uklanjanja dušika. Konkretno, proces heterotrofne denitrifikacije će biti ograničen manjkom organske tvari i izvana treba dozirati dodatni izvor ugljika. Prema tome, nekonvencionalni procesi uklanjanja dušika koji se provode putem tzv. 'nitritne rute' su prikladniji za uklanjanje dušika zbog manjih (ili čak nikakvih) potreba za COD. Zbog toga, pored ostalih tehničkih i ekonomskih razmatranja, procesi kao što su djelomična nitrificacija-denitrificacija (poznata i kao "nitritna skretnica" engl. nitrite shunt) ili djelomična nitrifikacija-ANAMMOX (PNA) su danas najmoderniji procesi biološkog uklanjanja dušika za otpadne vode s niskim ulaznim omjerom COD/N. Zbog relativno manje brzine rasta bakterija koje anaerobno oksidiraju amonij, proces ANAMMOX (anaerobna oksidacija amonija) se trenutno uglavnom koristi za obradu toplih tokova otpadne vode ($> 25 \text{ }^\circ\text{C}$) kao što je supernatant iz sustava digestije anaerobnog mulja u uređajima za obradu komunalnih i industrijskih otpadnih voda.

Sve u svemu, ovisno o karakteristikama otpadne vode i lokalnim uvjetima, uklanjanje dušika iz otpadne vode može se provesti pomoću nekoliko tehnologija i njihovih kombinacija. Unatoč različitim tehnologijama i procesima uklanjanja N, u praktički svima od njih amonij se prvo (potpuno ili djelomično) oksidira u nitrit (nitrificacija) ili u nitrat (nitrifikacija), nakon čega se oksidirani oblik dušika reducira do plinovitog dušika koji se ispušta u atmosferu ili putem procesa denitrifikacije (iz nitrata u N_2), denitrificacije (iz nitrita u N_2) ili ANAMMOX (iz nitrita i amonija u N_2). Na temelju činjenice da primjenjena tehnologija u Projektu Poreč za uklanjanje dušika iz otpadne vode je klasična kombinacija aerobne nitrifikacije i anoksične denitrifikacije, ANAMMOX proces ne čini dio ovog izvješća.

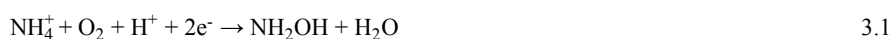
Učinkovitost uklanjanja dušika biološkim procesima ovisi o odgovarajućoj ravnoteži između aktivnosti različitih mikrobnih skupina. S tim u vezi, izvođenje šaržnih testova aktivnosti kako bi se procijenila i odredila stehiometrija i kinetičke brzine tih procesa biološke konverzije predstavlja koristan alat za praćenje i kontrolu procesa uklanjanja dušika. Prije detaljnog opisa metodologija i procedura šaržnog testa, u nastavku se u kratkim crtama predstavljaju biološki procesi nitrifikacije i denitrifikacije.

Za bolje razumijevanje konfiguracija različitih procesa, operativnih uvjeta i faktora koji djeluju na svaki proces, kao i metabolizam uključen u ciklus biološkog uklanjanja dušika, čitatelja se upućuje na standardne priručnike (npr. Henze i sur., 2008; Grady i sur., 2011).

3.1.1 Nitrifikacija

Nitrifikacija je naziv koji su proizvodnji nitrata dali Schläesing i Müntz (1877), koji su prvi prepoznali biološku prirodu tog procesa. Jedno desetljeće kasnije, Winogradsky (1890) je po prvi put izolirao bakteriju koja oksidira amonij, što je pokazalo da su za nitrifikaciju odgovorne specifične skupine bakterija. Opsežan posao Winogradskog (1892) na kultivaciji bakterija doveo je do izoliranja *Nitrosomonas europaea* i *Nitrobacter*, čime se pokazalo da je proizvodnja nitrata iz oksidacije amonija zapravo bila podijeljena u dva različita mikrobiološka procesa koje su provele dvije filogenetički nezavisne skupine kemolitoautotrofnih aerobnih bakterija: organizmi koji oksidiraju amonij (X_{AOO}) i proizvode nitrit te organizmi koji oksidiraju nitrit (X_{NOO}) i proizvode nitrat. Oksidaciju amonija uglavnom provode kemolitoautotrofne bakterije koje oksidiraju amonij, a koje koriste amonij kao svoj izvor energije i dušika, a anorganski ugljik kao izvor ugljika. Zabilježeno je da oksidaciju amonija provode i određene bakterije Archea (X_{AOA} , Könneke i sur., 2005) i heterotrofne bakterije (van Niel i sur., 1993), što pokazuje da je raznolikost organizama koji oksidiraju amonij veća nego što se ranije pretpostavljalo. Međutim, zbog dominacije kemolitoautotrofnog puta koji provode X_{AOO} u sustavima obrade otpadne vode, to je proces oksidacije amonija koji se razmatra u ovom izvješću.

Na razini mikrobnog procesa, oksidacija amonija do nitrita kreće formiranjem hidroksilamina (NH_2OH) kao posrednika putem enzima amonijak monoooksigenaza (AMO):



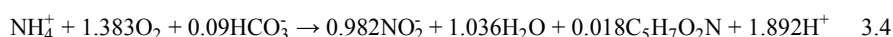
Hidroksilamin se onda dalje oksidizira do nitrita pomoću enzima hidroksilamin oksidoreduktaza (HAO):



Kombinacija ta dva redoks procesa poznata je kao nitritacija:



Ova jednadžba predstavlja jednadžbu kataboličke makro-kemijske reakcije procesa nitritacije. Kada se u obzir uzme i anabolizam, tada jednadžba metaboličke (katabolizam plus anabolizam) makro-kemijske reakcije postaje:

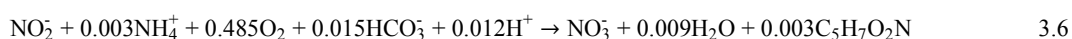


Kako je prikazano u gornjoj jednadžbi, po molu oksidiranog amonija proizvede se oko 2 mola protona. Karbonatni sustav dostupan u otpadnoj vodi obično služi kao pufer koji neutralizira proizvodnju protona putem otplinjavanja nastalog CO_2 . Kada karbonatni pufer, koji se obično mjeri kao alkalitet izražen u ekvivalentima kalcijevog karbonata ($CaCO_3$, meq L^{-1}), nije dostupan ili ga nema dovoljno u otpadnoj vodi (npr. u slučaju komunalne otpadne vode, alkalitet niži od oko 100 mg $CaCO_3 L^{-1}$ ili 2 meq L^{-1}), tada pH može pasti ispod pH 7,0 (Ekama i Wenzel, 2008).

U drugoj fazi procesa nitrifikacije, poznatij i kao proces nitratacije, X_{NOO} oksidiraju nitrit u nitrat pomoću enzima nitrit oksidoreduktaza (Nir):



X_{NOO} su aerobne kemolitoautotrofne bakterije koje za sintezu koriste anorganski ugljik kao izvor ugljika (npr. HCO_3^-) a amonij kao izvor dušika. Kada se u gornju jednadžbu ubaci rast bakterija, dobiva se sljedeća jednadžba metaboličke makro-kemijske reakcije:



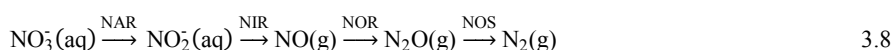
Kombinacija procesa nitrifikacije koji provode X_{AOO} i procesa nitratacije koji provode X_{NOO} čini proces nitrifikacije. Nitrifikacijska stehiometrija se može izraziti i prema standardnom modelu aktivnog mulja (ASM) kao:

$$\left(\frac{1}{Y_{ANO}} + i_{N,ANO}\right) \cdot S_{NHx} + \frac{4.75 - Y_{ANO}}{Y_{ANO}} \cdot S_{O_2} + \left(\frac{i_{N,ANO}}{14} + \frac{2}{14 \cdot Y_{ANO}}\right) \cdot S_{IC} \rightarrow X_{ANO} + \frac{1}{Y_{ANO}} \cdot S_{NO_3} \quad 3.7$$

gdje je S_{NO_3} koncentracija nitrata (mg N L^{-1}); S_{IC} je koncentracija alkaliteta (mmol L^{-1}), S_{O_2} je koncentracija DO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), S_{NHx} je koncentracija amonija (mg N L^{-1}), X_{ANO} je koncentracija nitrificirajućih organizama (mg COD L^{-1}), Y_{ANO} prirast nitrificirajućih organizama (g COD g N^{-1}), a $i_{N,ANO}$ je sadržaj dušika u stanicama nitrificirajućih organizama (g N g COD^{-1}).

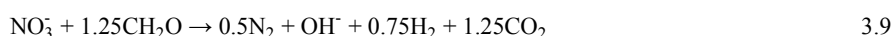
3.1.2 Denitrifikacija

1850-ih godina, prvo je Reiset (1856.), a potom Pasteur (1859.) zabilježio da je redukcija nitrata biološke prirode, što je označilo početak istraživanja o biološkom kruženju dušika. Čak i ako je Pasteur redukciju nitrata pogrešno pripisao 'mliječnom kvascu', razumio je ulogu organskih tvari. Reiset (1856.) je zapazio da se dušik ispušta u atmosferu prilikom raspadanja biljnih i životinjskih ostataka. Ubrzo nakon toga, Gayon i Dupetit (1883.) su taj proces nazvali denitrifikacijom, eksperimentalno je dokazano da su organske tvari potrebne u tom procesu (Munro, 1886), a nitrit, dušikov monoksid (NO) i didušikov oksid (N_2O) su identificirani kao posrednici (Payne, 1986). Uočeno je da ne samo bakterije, već i eukarioti i arheje mogu rasti zahvaljujući energiji dobivenoj oksidacijom organskih tvari ili anorganskih supstrata povezanom s redukcijom nitrata na nitrit, NO, N_2O i na kraju plinovit dušik (N_2) (Risgaard-Petersen i sur., 2006; Pina-Choa i sur., 2010). Pokazalo se da određeni mikroorganizmi sposobni provesti heterotrofnu nitrifikaciju također mogu provesti i denitrifikaciju u aerobnim i anoksičnim uvjetima, tzv. *aerobnu denitrifikaciju* (Robertson i sur., 1995). Denitrifikacija može krenuti i bez N_2O kao posrednika, kao u nedavno otkrivenoj denitrifikaciji u kojoj se metan koristi kao donor elektrona (Ettwig i sur., 2010). Prijavljena je i denitrifikacija nitrifikatora gdje X_{AOO} reducira nitrit do N_2O (Bock i sur. 1995). Za razliku od ostalih mikroorganizama u kruženju dušika (npr. X_{AOO} , X_{NOO} , ANAMMOX), nekoliko običnih heterotrofnih organizama (X_{OHO}) su fakultativni denitrifikatori koji radije koriste kisik kao akceptor elektrona zbog većeg prinosa energije, a na denitrifikaciju se prebacuju jedino kad prevladavaju niske razine kisika u prisutnosti nitrata ili nitrita (Zumft, 1997). Neovisno o korištenom donoru elektrona, opći biokemijski put za denitrifikaciju uključuje iste enzime u svakom od tih koraka redukcije od nitrata do plina dušika: nitrat reduktaza (NAR), nitrit reduktaza (NIR), reduktaza dušikovog monoksida (NOR) i reduktaza didušikovog oksida (NOS):



Ako ili denitrificirajući mikroorganizmi ne iskažu sve enzime za cjelovit lanac denitrifikacije ili alternativno u određenim okolišnim uvjetima, tada se posrednici NO i N_2O mogu izostaviti, što će oboje imati negativan utjecaj na okoliš zbog njihove toksičnosti i izravnog ili neizravnog doprinosa učinku stakleničkih plinova.

U sustavima obrade otpadne vode, biološko uklanjanje dušika uglavnom provode X_{OHO} koristeći organsku tvar kao donor elektrona. Kada organske tvari prirodno prisutne u otpadnoj vodi nisu dovoljne za postizanje potpune denitrifikacije, obično se doziraju vanjski donori elektrona (poput octene kiseline ili metanola, među ostalima). Budući da prevladava u obradi otpadne vode, u ovom se izvješću razmatra jedino denitrifikacija koju pokreću X_{OHO} (heterotrofna denitrifikacija), koja se odvija prema sljedećem generičkom kataboličkom putu (Mateju i sur., 1992):



Ova jednadžba ilustrira da heterotrofna denitrifikacija okolinu čini više alkalnom zbog proizvodnje iona hidroksida.

X_{OHO} kao akceptor elektrona mogu koristiti i nitrat i nitrit. Proces redukcije nitrata do plinovitog dušika se zove denitrifikacija, dok se proces redukcije nitrita do plinovitog dušika zove denitritacija. U skladu s oznakama standardnog modela aktivnog mulja (ASM), kada se kao izvor ugljika koristi generički topiv i biorazgradiv supstrat (S_B), stehiometrija denitrifikacije odnosno denitritacije može se opisati na sljedeći način:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_B + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{2.86 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{NO}_3} + i_{\text{N, OHO}} \cdot S_{\text{NH}_x} \rightarrow \\ & X_{\text{OHO}} + \left(\frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{2.86 \cdot 14 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} - \frac{i_{\text{N, OHO}}}{14} \right) \cdot S_{\text{IC}} \\ & + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{2.86 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{N}_2} \end{aligned} \quad 3.10$$

$$\begin{aligned} & \frac{1}{Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_B + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{1.71 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{NO}_2} + i_{\text{N, OHO}} \cdot S_{\text{NH}_x} \rightarrow \\ & X_{\text{OHO}} + \left(\frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{1.71 \cdot 14 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} - \frac{i_{\text{N, OHO}}}{14} \right) \cdot S_{\text{IC}} \\ & + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{1.71 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{N}_2} \end{aligned} \quad 3.11$$

Pri tome, $Y_{\text{OHO, Ax}}$ je heterotrofni prirast u anoksičnim uvjetima (g COD g COD^{-1}), X_{OHO} je koncentracija heterotrofnih mikroorganizama (mg COD L^{-1}), S_{NH_x} je koncentracija amonija (mg N L^{-1}), S_{NO_2} je koncentracija nitrita (mg N L^{-1}), S_{NO_3} je koncentracija nitrata (mg N L^{-1}), S_{N_2} je koncentracija otopljenog plinovitog dušika (mg N L^{-1}), a S_{IC} je koncentracija alkaliteta (mmol L^{-1}).

3.2 Mogućnosti praćenja procesa

Prema stehiometriji procesa uključenih u uklanjanje dušika, što je predstavljeno u odjeljku 3.1, dostupne su različite mogućnosti za ocjenu kinetike procesa i stehiometrijskih parametara od interesa za vrijeme šaržnog testa, kao što su:

- Kemijsko praćenje mjerenjem koncentracija nitrita, nitrata ili amonija kroz vrijeme; odabir optimalnih kemijskih vrsti koje će se pratiti ovisi o specifičnom procesu od interesa.
- Titrimetrijsko praćenje primjenom pH-statične titracije na one procese koji bitno utječu na pH otopine.
- Manometrijsko praćenje, primjenjivo na procese koji uključuju topive plinove niske topivosti, kao što je N_2 .
- Respirometrija, primjenjiva na aerobne procese koji djeluju na koncentracije otopljenog kisika (DO).

Zadnja mogućnost nije predstavljena u ovom poglavlju, već u 4. poglavlju.

Ostale mogućnosti praćenja su u kratkim crtama predstavljene u nastavku.

3.2.1 Kemijsko praćenje

Praćenje koncentracije supstrata i produkata kroz vrijeme je najuobičajeniji način ocjene kinetike nekog procesa.

Kada treba pratiti nitrifikaciju, kroz vrijeme se prate koncentracije amonija i nitrata. Za zasebnu ocjenu brzina nitracije ili nitratacije, moraju se kroz vrijeme mjeriti koncentracije amonija i nitrita ili nitrita i nitrata. Na kraju, kada istovremeno treba ocijeniti brzine nitracije i nitratacije, kroz vrijeme treba pratiti koncentracije amonija, nitrita i nitrata.

Za denitrifikaciju, najuobičajeniji šaržni test u kojemu se primjenjuje postupak kemijskog praćenja je tzv. test brzine apsorpcije nitrata (engl. *nitrate uptake rate*, NUR). Testovi NUR omogućuju ocjenu nekoliko parametara od praktičnog interesa, kao što su brzina iskorištavanja nitrata, iskorištavanje organskih tvari za denitrifikaciju i koeficijent prirasta anoksične biomase (Naidoo i sur., 1998; Kujawa i Klapwijk, 1999). Kako je opisano u odjeljku 2.2.4, uzorci se uzimaju za vrijeme šaržnih testova, nakon

čega se provode kemijske analize glavnih supstrata (npr. nitrit, nitrat i COD) kako bi se dobilo dovoljno informacija za ocjenu relevantnih kinetičkih i stehiometrijskih parametara.

3.2.2 Titrimetrijsko praćenje

Tehnika pH-statične titracije sastoji se od kontroliranog dodavanja primjereno razrijeđene otopine kiseline ili baze kako bi se održao konstanti pH (otuda naziv ‘statični’ pH) u biološkom sustavu gdje na pH djeluju različite reakcije. U takvim uvjetima, brzina titracije je proporcionalna brzini reakcije preko stehiometrijskog faktora. U načelu, ova tehnika je primjenjiva na svaku biološku ili fizikalno-kemijsku reakciju koja djeluje na koncentraciju protona (čime je povezana s pH), odnosno svaku reakciju kojom se neutralni supstrati pretvaraju u kisele ili lužnate produkte, ili kiseli ili lužnati supstrati u neutralne produkte. Postoji nekoliko bioloških reakcija od ekološkog interesa koje djeluju na pH suspenzije u kojoj se odvijaju. Pokušaji korištenja pH-statične titracije uglavnom su fokusirani na nitrifikaciju (Germaey i sur., 1997, 1998; Massone i sur., 1998) i denitrifikaciju (Massone i sur., 1996; Rozzi i sur., 1997; Bogaert i sur., 1997; Foxon i sur., 2002). Premda su to konsolidirane primjene tehnike pH-statične titracije, mogu se predvidjeti i druge, poput onih koje uključuju ravnoteže $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, npr. heterotrofna razgradnja organskih supstrata kojom se proizvodi CO_2 (Ficara i Rozzi, 2004) i acetoklastična metanogeneza kojom se proizvodi bikarbonat (Rozzi i sur., 2002).

Praćenje nitrifikacije je prva i najjača primjena ove tehnike budući da se odnos između oksidiranog amonija i proizvedenog protona $Y_{\text{NH}_4, \text{H}^+}$ može izračunati iz reakcijske stehiometrije, kako je pretpostavljeno u ASM1 (Henze i sur., 2000):

$$Y_{\text{NH}_4, \text{H}^+} = \frac{14}{2 + i_{\text{N,ANO}} \cdot Y_{\text{ANO}}} \approx 6.92 \text{ g N mol (protoni)}^{-1} \quad 3.12$$

Omjer N/H je stoga stehiometrijski faktor koji omogućuje konverziju brzine titracije u brzinu potrošnje amonija. Tehnika pH-statične titracije se može primijeniti i na denitrifikaciju budući da je ovaj proces ‘reakcija koja djeluje na pH’. Međutim, procjena omjera između potrošnje nitrita ili nitrata i proizvodnje protona $Y_{\text{NO}_x, \text{H}^+}$ na temelju stehiometrije nije tako jednostavna kao za nitrifikaciju, uglavnom stoga što ovisi o puno više faktora, kao što su izvor ugljika, karakteristike mulja i zadana vrijednost pH. Kako bi se teoretski izračunao $Y_{\text{NO}_x, \text{H}^+}$, Petersen i sur. (2002) su predložili konceptualni model koji pretpostavlja da sljedeća četiri procesa imaju o pH ovisni učinak na proizvodnju protona tijekom denitrifikacije: (i) apsorpcija slabih organskih kiselina kao izvora ugljika, (ii) apsorpcija nitrata, (iii) apsorpcija amonija za sintezu stanica te (iv) proizvodnja ugljikovog dioksida iz oksidacije organskog ugljika. Na temelju tih pretpostavki, predložena je sljedeća stehiometrija reakcije kako bi se ocijenio omjer između neto proizvodnje protona i potrošnje nitrata:

$$\frac{1}{Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_B + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{\beta \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{NO}_x} + i_{\text{N, OHO}} \cdot S_{\text{NH}_x} \rightarrow X_{\text{OHO}} + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{\beta \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{N}_2} + \left[-\frac{a}{C \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} - \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{\beta \cdot 14 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} + \frac{b \cdot i_{\text{N, OHO}}}{14} + \frac{C \cdot (1 - Y_{\text{OHO, Ax}}) \cdot x}{C \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \right] \cdot \text{H}^+ \quad 3.13$$

Pri tom je S_{NO_x} koncentracija nitrita ili nitrata, x je broj molova ugljika po molu organskog supstrata, C je faktor (u g COD mol^{-1} organskog supstrata) za iskazivanje organskog ugljika u jedinicama COD, β je kisikov ekvivalent oksidiziranog dušika, a , b , c su o pH ovisni faktori koji u obzir uzimaju ravnotežu disocijacije slabih kiselina/baza (a za organske kiseline - HA, b za ugljičnu kiselinu te c za amonij):

$$a = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{10^{-\text{pKa}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{pKa}}} \quad 3.14$$

$$b = \frac{10^{\text{pH} - \text{pK}1} \cdot (1 + 2 \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}2})}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}1} \cdot (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}2})} \quad 3.15$$

$$c = \frac{[\text{NH}_4^+]}{[\text{NH}_4^+] + [\text{NH}_3]} = \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{pK}_{\text{NH}_4}}} \quad 3.16$$

Pri tom je pK_a konstanta disocijacije za octenu kiselinu (4,75 pri 25 °C), pK_1 je konstanta disocijacije za ugljičnu kiselinu (6,352 pri 25 °C), pK_2 konstanta disocijacije za bikarbonat (10,33 pri 25 °C), a pK_{NH_4} konstanta disocijacije za amonij (9,25 pri 25 °C).

Zamjenom ispravne vrijednosti β (tj. 2,86 g COD N⁻¹ za N-NO₃ i 1,72 g COD N⁻¹ za N-NO₂), proizlazi da se $Y_{NOx_H^+}$, u g N mol⁻¹, u prisutnosti nitrata, $Y_{NO_3_H^+}$, ili nitrita, $Y_{NO_2_H^+}$, kao akceptor elektrona, može izraziti kao:

$$Y_{NO_3_H^+} = \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2,86 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot \left[\frac{a}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} - \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2,86 \cdot 14 \cdot Y_{OHO, Ax}} + \frac{c \cdot i_{N, OHO}}{14} + \frac{b \cdot (1 - Y_{OHO, Ax}) \cdot x}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} \right]^{-1} \quad 3.17$$

$$Y_{NO_2_H^+} = \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1,72 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot \left[\frac{a}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} - \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1,72 \cdot 14 \cdot Y_{OHO, Ax}} + \frac{c \cdot i_{N, OHO}}{14} + \frac{b \cdot (1 - Y_{OHO, Ax}) \cdot x}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} \right]^{-1} \quad 3.18$$

Ove jednadžbe pokazuju da je za ocjenu $Y_{NOx_H^+}$ potrebno znati kemijski sastav izvora ugljika (C i x), što je rijetko slučaj u praksi, i koeficijent anoksičnog prirasta biomase, $Y_{OHO, Ax}$. Kao takva, njegova ocjena je moguća u teoriji, ali teška u praksi.

Na sreću, $Y_{NOx_H^+}$ se može i eksperimentalno ocijeniti mjerenjem količine titracijske otopine (obično kiselina) dozirane u pH-statičnim uvjetima kako bi se denitrificirala poznata količina nitrita ili nitrata u prisutnosti izvora ugljika od interesa. Nakon što se izmjeri omjer $Y_{NOx_H^+}$, brzina titracije se može lako pretvoriti u brzinu apsorpcije nitrata ili nitrita.

3.2.3 Manometrijsko praćenje

Prema ovoj tehnici, brzina biološkog procesa kojim se proizvodi slabo topiva plinovita komponenta je proporcionalna brzini porasta tlaka, pod uvjetom da se biološka reakcija odvija u plinonepropusnom reaktoru. Odnos između generiranog nadtlaka, $P(t)$, i volumetrijske proizvodnje plina, $V_G(t)$, može se dobiti ako se pretpostavi da transfer plina iz tekuće u plinovitu fazu ne ograničava brzinu (miješanje mulja omogućuje brz transfer plinovitih vrsta) i da u otopini ne ostaju nikakve relevantne količine plinovitih vrsta. U takvim uvjetima i pri konstantnoj temperaturi, prema plinskom zakonu, primjenjuje se sljedeći odnos:

$$V_G(t) = \frac{P(t) - P_{atm}}{P_{atm}} \cdot V_{HS} \quad 3.19$$

Gdje je V_{HS} volumen plinske faze u reaktoru, a P_{atm} je atmosferski tlak.

Ovo mjeriteljsko načelo se dokazalo primjenjivim i korisnim u praćenju denitrifikacije (Sánchez i sur., 2000; Ficara i sur., 2009) i anaerobne oksidacije amonija (Dapena Mora i sur., 2007; Scaglione i sur., 2009; Bettazzi i sur., 2010; Lotti i sur., 2012), budući da oba procesa proizvode plinoviti dušik. Kod denitrifikacije, trebalo bi koristiti adsorbent CO₂ koji se obično nalazi u plinskoj fazi u reaktoru (npr. granule NaOH), kako bi se podaci o nadtlaku odnosili jedino na ispuštanje N₂.

3.3 Eksperimentalna struktura

3.3.1 Reaktori

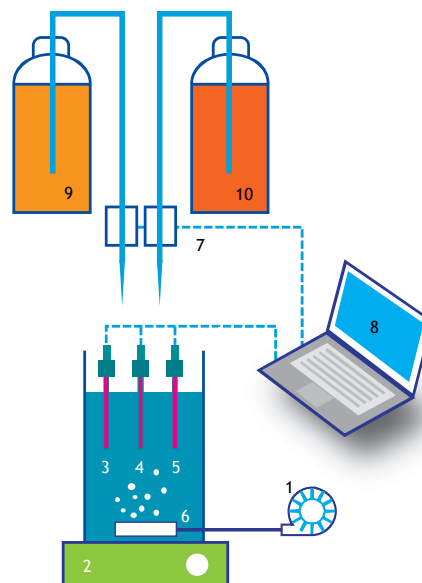
Neovisno o tehnologiji korištenoj za uklanjanje dušika iz otpadne vode, u svrhu ocjene uspješnosti procesa biološkog uklanjanja dušika, šaržni testovi aktivnosti mogu se provesti u aerobnim (nitrifikacija) ili anoksičnim uvjetima (denitrifikacija i ANAMMOX) ovisno o parametrima od interesa i prirodni istraživanja. U svakom slučaju, reaktor(i) korišten(i) za izvođenje testova moraju biti takvi da se: (i)

izbjegne prodor kisika u anoksičnim uvjetima, (ii) osigura zadovoljavajuća dostupnost S_{O_2} u aerobnim uvjetima (npr. S_{O_2} veći od 2 mg L^{-1}), (iii) osiguraju zadovoljavajući uvjeti miješanja, (iv) održi prikladna i poželjna temperatura, (v) osigura precizna kontrola pH te (vi) imaju dodatne otvore za uzimanje uzoraka i dodavanje influenta, otopina, plinova i bilo kojeg drugog tekućeg medija ili supstrata korištenog u testu. Po pitanju toga što je potrebno da se osiguraju valjani anoksični uvjeti, aerobni uvjeti, miješanje, kontrola temperature, kontrola pH i otvori za uzorkovanje i doziranje tijekom izvođenja testova, čitatelja upućujemo na odjeljak 2.2.1. Međutim, kada treba provesti titrimetrijske ili manomerijske eksperimente, potrebna je posebna oprema, kako je opisano u nastavku.

3.3.2 Oprema za titrimetrijske testove

Za provođenje titracijskih testova kojima se stabilnom održava zadana vrijednost, potrebna je automatizirana titracijska jedinica. Što se respirometara tiče, takvi su sustavi lako dostupni na tržištu. Može ih se lako provesti i pomoću konvencionalne laboratorijske opreme i osnovnih uređaja za prikupljanje i kontrolu signala. Konkretno, automatizirana titracijska jedinica trebala bi se sastojati od sljedećih komponenti (vidi sliku 3.1):

- Reakcijska posuda: reaktor s dobrim mješanjem i s termostatom ili kontrolom temperature za uzorak aktivnog mulja, radnog volumena od 0,5 do 1,5 L. Kod izvođenja testova nitrifikacije, reakcijska posuda ne mora biti plinonepropusna. Ipak, poželjno je smanjeno područje kontakta krutina-tekućina kako bi se ograničio transfer plin-tekućina kisika i ugljikovog dioksida. Kod izvođenja testova denitrifikacije potrebna je plinonepropusnost za valjan anoksičan rad.
- Sonde za ocjenu: temperature (s razlučivošću od $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$), pH (s razlučivošću od 0,01 pH jedinica) i, po mogućnosti, DO ($\pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ oko odabrane zadane vrijednosti).
- Sustav aeracije (za aerobne procese), obično s kapacitetom aeracije od $50\text{-}200 \text{ L L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, i keramički difuzor za aeraciju pomoću finih mjehurića.
- Automatiziran titracijski sustav kojim se pH može održati unutar uskog raspona (npr. pri definiranoj zadanoj vrijednosti $\text{pH} \pm 0,02$) i za evidentiranje volumena postupno dozirane titracijske otopine s predloženom razlučivošću od 0,1 mL i minimalnom učestalosti bilježenja od 1 podatka po minuti. Ručno evidentiranje dodanog volumena titracijske otopine može se dobiti pohranjivanjem titracijske otopine u menzuru i ručnim očitavanjem preostalog volumena u redovnim razmacima (svakih par minuta za nitrifikacijske testove) ili stavljanjem otopine na vagu pri čemu se njezina težina ili očitava ili automatski bilježi. Otopina od 0,05-0,02 N NaOH može se koristiti kao alkalna titracijska otopina, dok otopina 0,05-0,02 N HCl može služiti kao kisela titracijska otopina.



Slika 3.1 Shema pH-statičnog titracijskog sustava: 1. aerator; 2. mješalica; 3. temperaturna sonda; 4. pH sonda; 5. DO sonda; 6. reakcijska posuda; 7. sustav za doziranje titracijske otopine; 8. prikupljanje i bilježenje signala; 9. alkalna titracijska otopina; 10. kisela titracijska otopina.

Kada su uključeni aerobni biološki procesi, pH-statični sustavi se mogu prikladno nadograditi na pH/DO-statični sustav, u kojemu sekundarna titracijska jedinica daje razrijeđenu otopinu H_2O_2 , koja služi kao oksigenirana titracijska otopina. U tu svrhu, sustav opisan na slici 3.1 treba nadograditi uklapanjem sljedećeg:

- DO sonda, s minimalnom razlučivošću od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.
- Dodatni automatizirani sustav za doziranje ili titraciju kojim se S_{O_2} može održati u uskom rasponu ($\pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ oko odabrane zadane vrijednosti). $0,05\text{-}0,2 \text{ M}$ otopine H_2O_2 je prikladno kad se pH/DO-statični titracijski testovi provode na uzorcima konvencionalnog aktivnog mulja. Nakon što se dozira, otopinu H_2O_2 će u molekularni kisik (O_2) i vodu pretvoriti peroksidaze koje proizvode aerobne bakterije kako bi se neutralizirao oksidativni stres, čime kisik postaje dostupan za bakterijsku respiraciju. Zapravo, opaženo je da se razrijeđene otopine H_2O_2 mogu koristiti za kratkotrajne respirometrijske testove bez značajnijeg inhibiranja bakterija (npr. Ficara i sur., 2000).

Svrha ove DO-statične titracijske jedinice je održati vrijednost DO na unaprijed definiranoj zadanoj razini (zadana vrijednost DO) titriranjem oksigenirane titracijske otopine, čime se ostvaruju sljedeći ciljevi:

- Održati željeni redoks uvjet bez potrebe za aeriranjemto omogućuje da se izbjegne uklanjanje CO_2 , što je proces koji djeluje na pH koji se preklapa s drugim reakcijama od interesa koje djeluju na pH.
- Ocijeniti brzinu potrošnje kisika reakcije koja je, u DO-statičnom radu, jednaka brzini titracije oksigenirane titracijske otopine. To su dodatne informacije koje se mogu koristiti da se provjeri ili nadopuni brzina titracije alkalne/kisele otopine, kako je detaljnije opisano kasnije u ovom izvješću.

3.3.3 Oprema za manometrijske testove

Testove treba provesti pomoću plinonepropusne opreme. Obično se koriste sustavi koji se primjenjuju za izvođenje testova BOD. Minimalni zahtjevi su sljedeći:

- Staklena boca s (vidi sliku 3.2):
 - a. Radnim volumenom od oko 1 L.
 - b. Dva bočna otvora, zatvorena gumenim dijafragmama koje na mjestu drži plastični ili aluminijski pribor, za injektiranje supstrata i upuhivanje/ispuštanje plina.
 - c. Spremnik za granule NaOH smješten u plinskoj fazi boce i koji služi kao hvatač CO_2 .
 - d. Manometrijski mjerni uređaj, po mogućnosti opremljen uređajem za bilježenje podataka (*data logger*), postavljen na vrhu staklene boce s razlučivošću 1-3 mbar.
- Inkubator konstantne temperature koji temperaturene oscilacije ograničava na $\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$. Temperaturu se obavezno mora dobro kontrolirati za vrijeme testa, budući da temperaturene varijacije izazivaju promjene u vrijednostima nadtlaka koje nisu povezane s ispuštanjem plina, što bi stoga rezultiralo šumom u podacima.
- Magnetska mješalica koja može raditi na oko 100-200 rpm. Alternativno, može se koristiti termostatska orbitalna tresilica kako bi se osigurala i kontrola temperature i miješanje.



Slika 3.2 Komercijalno dostupna oprema za provedbu manometrijskih testova za potrebe denitrifikacije (fotografija: Lotti, 2016).

3.3.4 Uzimanje uzorka aktivnog mulja

Vrijeme i lokacija uzimanja uzorka aktivnog mulja u kojem se odvija nitrifikacija i denitrifikacija uvelike ovise o vrsti šaržnog testa aktivnosti koji će se provesti. Uklanjanje dušika putem procesa nitrifikacije i denitrifikacije se temelji na naizmjeničnim aerobno-anoksičnim uvjetima. Stoga bi, po mogućnosti, trebalo uzeti svjež uzorak na kraju faze odgovarajuće reakcije: aerobni za nitrifikaciju, anoksični za denitrifikaciju. Nesumnjivo, lokacija uzorkovanja će ovisiti o konfiguraciji sustava. U gradskim uređajima i pilot uređajima za obradu otpadne vode, prije uzorkovanja moraju se identificirati fizičke granice između faza. U ekstremnim slučajevima, kada faze nisu (fizički) dobro definirane, redoks granice moraju biti definirane pomoću DO mjerača, redoks mjerača i/ili određivanjem koncentracija nitrata i nitrita. U laboratorijskim uređajima (koji obično rade ovisno o vremenskom ciklusu), uzimanje uzoraka može biti relativno lakše, budući da vrijeme reakcije određuje dužinu faza. Kako bi se dobili homogeni i reprezentativni uzorci, uzorci mulja se moraju uzimati na točkama uzorkovanja gdje se odvijaju uvjeti dobrog miješanja.

U idealnom slučaju, šaržni testovi aktivnosti se moraju provesti čim prije je moguće nakon uzimanja uzorka. U laboratorijskim sustavima, u načelu, to ne bi trebao biti problem ako se šaržni testovi aktivnosti provode u istom laboratoriju i njihovo izvođenje se koordinira i sinkronizira s radom laboratorijskog reaktora. Isto tako, u gradskim uređajima i pilot uređajima za obradu, šaržni testovi aktivnosti se mogu provesti *in situ* ubrzo nakon uzimanja uzorka mješavine mulja i vode, ako je laboratorij uređaja za obradu otpadne vode uređen i opremljen potrebnom eksperimentalnom i analitičkom opremom. Ako se šaržni testovi aktivnosti ne mogu provesti istoga dana *in situ*, uzorak mješavine mulja i vode može se uzeti i prenijeti do lokacije na kojoj će se provoditi testovi. Nakon toga, posuda s uzorkom se može propisno pohraniti i prenijeti u hladnjaku ili spremniku s ledom (ispod ili blizu 4 °C) u neaeriranim uvjetima, a testove aktivnosti treba provesti najkasnije 24 h nakon uzorkovanja. Kako bi se izbjeglo stvaranje anaerobnih uvjeta tijekom pohrane i neželjena proizvodnja toksičnog sulfida kroz smanjivanje sulfata, mješavini mulja i vode trebalo bi dodati nitrat u konačnoj koncentraciji od oko 50-200 mg N L⁻¹. Međutim, dostupnost nitrata bi potaknula endogenu respiraciju biomase. Zbog toga je važno naglasiti da se snažno preporučuje provesti test čim je prije moguće nakon uzimanja uzorka.

Naročito nakon pohrane, biomasu prisutnu u uzorcima mješavine mulja i vode prije izvođenja šaržnih testova aktivnosti treba 'oprati' kako bi se uklonio sav dodani nitrat, 'reaktivirati' i aklimatizirati na ciljani pH i temperaturu od interesa. Pranje treba provesti pomoću odgovarajućeg 'medija za pranje' čiji mineralni sastav ovisi o ciljanoj mikrobnj populaciji, kako je navedeno niže. Kao medij za pranje može se koristiti i voda iz slavine sve dok je njezina vodljivost slična vodljivosti medija kultivacije. U svakom slučaju, poželjno je *in situ* izvođenje šaržnih testova aktivnosti budući da se time izbjegava izlaganje biomase promjenjivim uvjetima. Ukupna količina aktivnog mulja (mješavine mulja i vode) koju treba prikupiti ovisi o broju testova, volumenu reaktora i ukupnoj količini uzoraka koje treba uzeti kako bi se ocijenila aktivnost biomase. Često se dovoljnim smatra 10-20 L aktivnog mulja ili mješavine mulja i vode iz gradskih uređaja za obradu otpadne vode. S druge strane, uzorci uzeti iz laboratorijskih reaktora rijetko dosežu više od 1 L zato što su laboratorijski sustavi obično manji (od 0,5 do 2,2 L, a u nekim slučajevima do 8-10 L), a maksimalna količina koja se može izvući iz laboratorijskih reaktora je često određena dnevnim izvlačenjem viška mulja iz sustava. Budući da je maksimalna količina koju se smije izvući izravno povezana s korištenom starošću mulja (SRT), koje je pak određeno brzinom rasta organizama, treba posebno paziti kada se radi sa sporo rastućim organizmima kao što su nitrifikanti.

Prijedlozi o rasporedu uzorkovanja i idealnom trajanju pohrane opisani su ranije (vidi odjeljak 2.3) i treba ih pažljivo razmotriti.

3.3.5 Priprema uzorka aktivnog mulja

Općenito govoreći, uzorci aktivnog mulja mogu se koristiti kao takvi ili nakon specifičnih korekcija pH (sa ili bez prisutnosti pH pufera), temperature, koncentracije amonija/nitrata/nitrita, koncentracije izvora ugljika i X_{VSS} . Za konvencionalne uzorke aktivnog mulja iz uređaja u kojima se obrađuje komunalna otpadna voda, idealan bi bio uzorak koji ima X_{VSS} od oko 2-4 g VSS L⁻¹. Za jako razrijeđene ili koncentrirane uzorke mulja, može pomoći prethodna koncentracija (npr. dekantiranjem u Imhoffov stožac u trajanju od 30 min ili centrifugiranjem na 4.000 rpm u trajanju od nekoliko minuta) ili razrjeđivanje

sekundarnim efluentom iz istog uređaja za obradu otpadne vode. Time će se izbjeći pojava prespore ili prebrze konverzije.

Kad se takve procedure provode na anoksičnim ili anaerobnim uzorcima aktivnog mulja, odmah nakon uzorkovanja bi trebalo provesti otplinjavanje plinom N_2 kako bi se ponovno uspostavili odgovarajući anoksični/anaerobni uvjeti. Što se pH i temperature tiče, u načelu, što je zadana vrijednost pH vrijednosti bliža tipičnom radnom pH uređaja, to će proizašla brzina procesa biti reprezentativnija za brzinu radnog procesa. Isti koncept vrijedi i za odabir vrijednosti temperature. Ipak, pH pufer kao što je HEPES (N-2-hidroksietil-piperazin-N0-2-etan sulfonska kiselina) ili fosfatni pufer može se koristiti kako bi se održao konstantan pH tijekom čitavog trajanja šaržnog testa (Dapena-Mora i sur., 2007; Lotti i sur., 2012).

Općenito, glavni cilj uzorkovanja i eksperimentiranja trebao bi biti da se u najvećoj mogućoj mjeri smanji potreba za transportom, hlađenjem, pohranjivanjem i reaktiviranjem mulja. Kad god je to moguće, preporučuje se da se koristi 'svjež' mulj (i supstrat/medij). Kada će se testirati stvarni radni uvjeti, tada se odgovarajući šaržni testovi aktivnosti moraju provesti odmah nakon uzimanja mulja s minimalnim korekcijama radnih uvjeta (npr. za pH i temperaturu). Kada se šaržni testovi ne mogu provesti *in situ* ili ubrzo nakon uzorkovanja, uzorke mulja treba spremirati na temperaturi od oko 4 °C za potrebe očuvanja tijekom transporta i pohrane. Temperatura od 4 °C, što se obično smatra prikladnom temperaturom za pohranu konvencionalnih uzoraka aktivnog mulja. U takvim okolnostima, šaržne testove aktivnosti po mogućnosti treba provesti u manje od 24 h nakon uzimanja mulja i nakon 'reaktivacije' tako da se mulj zadrži na pH i temperaturi od interesa (nakon otplinjavanja plinom N_2 u slučaju denitrifikacije).

Dodavanje ograničenih količina supstrata može pogodovati reaktivaciji bakterijskog metabolizma. Međutim, priprema aktivnog mulja ovisi o testovima koji će se provesti, a specifični prijedlozi/preporuke su opisani u nastavku.

3.3.6 Supstrat

Kada se prava otpadna voda (bilo sirova ili istaložena) koristi za izvođenje testova aktivnosti, na relativno jednostavan način može je se dobiti do reaktora/fermentora. Gruba filtracija (kroz filtare s otvorima veličine 10 μm) može se koristiti za uklanjanje preostalih grubo dispergiranih čestica prisutnih u sirovoj otpadnoj vodi.

Ako će se proučavati različiti izvori i koncentracije ugljika, i efluent iz uređaja može se koristiti za pripremu polu-sintetičkog medija koji sadrži koncentraciju S_B od između 50 i 100 mg COD L^{-1} .

Za izvođenje konvencionalnih denitrifikacijskih testova, mogu se pripremiti otopine nitrata i nitrita kako bi se stvorili potrebni anoksični uvjeti. U tu svrhu, mogu se pripremiti različite koncentrirane otopine koristeći nitratne i nitritne soli.

Kada se testovi provode kako bi se ocijenio potencijalan inhibični ili toksični učinak određenog spoja pri različitim koncentracijama, mogu se pripremiti koncentrirane otopine i dodati ih tijekom testa kako bi se dobile željene koncentracije. Testovi koji se provode kako bi se ocijenilo jesu li inhibični ili toksični učinci reverzibilni moraju se provesti nakon pranja biomase radi uklanjanja inhibičnih ili toksičnih spojeva. Pranje se često provodi naizmjeničnim taloženjem i resuspenzijom uzorka mulja u mediju bez ugljika i nitrita (bilo u cijelosti sintetički ili pomoću obrađenog efluenta nakon filtracije) u anoksičnim uvjetima.

3.3.7 Analitičke procedure

Analitičke procedure od interesa (NH_4 , NO_2 , NO_3 , MLSS, MLVSS, COD, BOD) treba provesti u skladu sa sljedećim standardiziranim i uobičajeno korištenim analitičkim protokolima detaljno opisanima u Standardnim metodama (APHA i sur., 2012).

Ako se koristi specifičan izvor ugljika, njegovo određivanje treba provesti u skladu s relevantnom analitičkom metodom. Međutim, u u većini slučajeva, za određivanje topivog COD može biti prikladno pratiti iskorištavanje izvora ugljika.

3.3.8 Parametri od interesa

Nitrifikacija

Najznačajniji kinetički parametar aerobnog procesa oksidacije amonija (nitritacija) koji provode AOO je maksimalna specifična brzina oksidacije amonija (q_{AOO, NH_4}). Slično tome, za aerobni proces oksidacije nitrita (nitratacija) koji provode NOO, glavni parametar od interesa je maksimalna specifična brzina oksidacije nitrita (q_{NOO, NO_2, NO_3}). U tablici 3.1 prikazane su tipične kinetičke vrijednosti parametara u literaturi i za proces aerobne oksidacije amonija i oksidacije nitrita. U tablici 3.1 prikazane su i vrijednosti prirasta biomase i AOO i NOO navedene u literaturi.

Tablica 3.1 Očekivani stehiometrijski i kinetički parametri od interesa za aktivni mulj koji provodi aerobnu oksidaciju amonija i nitrita do nitrita i nitrata. Kinetički parametri se prijavljuju u odnosu na referentnu temperaturu od 20 °C.

Aerobna oksidacija amonija – proces nitritacije		
q_{AOO, NH_4} g N g VSS ⁻¹ d ⁻¹	Y_{AOO} g VSS g N ⁻¹	Referenca
0,11	0,14	Blackburne i sur. (2007)
0,09	0,11	Jones i sur. (2007)
0,24	0,13	Jubany i sur. (2008)
0,27	0,15	Koch i sur. (2000)
0,21	0,11	Lochtman (1995)
0,22	0,15	Wiesmann (1994)
Aerobna oksidacija nitrita – proces nitratacije		
q_{NOO, NO_2, NO_3} g N g VSS ⁻¹ d ⁻¹	Y_{NOO} g VSS g N ⁻¹	Referenca
0,21	0,07	Blackburne i sur. (2007)
0,13	0,07	Jones i sur. (2007)
0,39	0,06	Jubany i sur. (2008)
1,78	0,02	Koch i sur. (2000)
0,45	0,03	Lochtman (1995)
0,78	0,04	Wiesmann (1994)
1,07	0,03	Wik i Breitholtz (1996)

Kinetički podaci navedeni u tablici 3.1 odnose se na radnu temperaturu od 20 °C, a izračunati su iz originalnih vrijednosti u skladu s Arrheniusovom jednačbom u nastavku.

$$k_S(T) = k_S(T_{ref}) \cdot \exp\left(\frac{E_{a,S} \cdot (T_K - T_{ref})}{R \cdot T_K \cdot T_{ref}}\right) \quad 3.20$$

gdje je $k_S(T)$ maksimalna specifična brzina potrošnje supstrata S ocijenjena na željenoj radnoj apsolutnoj temperaturi T_K (K), T_{ref} je referentna apsolutna temperatura, R je idealna plinska konstanta (8,31 J mol⁻¹ K⁻¹), $E_{a,S}$ energija aktiviranja razmatranog biološkog procesa kojim se troši supstrat S. $E_{a, NH_4} = 68$ kJ mol⁻¹ K⁻¹ i $E_{a, NO_2} = 44$ kJ mol⁻¹ K⁻¹ su tipične vrijednosti energije aktivacije za proces nitritacije koji provode AOO, odnosno proces nitratacije koji provode NOO.

Kako je vidljivo u tablici 3.1, brzine aerobne potrošnje za oksidaciju amonija i nitrita navedene u literaturi mogu jako varirati, naročito za proces nitratacije koji kataliziraju NOO. Glavni razlog tome može biti udio aktivne biomase prisutne u biomasu aktivnog mulja, koja se obično naziva ukupnom koncentracijom MLVSS. Što je veća frakcija aktivne nitrificirajuće biomase, to je veća očekivana specifična brzina konverzije biomase. U konvencionalnom sustavu s aktivnim muljem, to se može izravno povezati s omjerom COD/N u influentu, pri čemu niži omjer COD/N odgovara većem udjelu aktivne nitrificirajuće biomase. Kako je prikazano u tablici 3.1, prijavljene vrijednosti prirasta su veće za bakterije koje oksidiraju amonij nego za bakterije koje oksidiraju nitrit.

Denitrifikacija

Kako bi se kvantificirala aktivnost OHO u anoksičnim uvjetima, moraju biti poznati relevantni stehiometrijski parametri i kinetičke konstante. Što se stehiometrije tiče, najvažniji parametar koji treba definirati je heterotrofni prirast u anoksičnim uvjetima $Y_{OHO, Ax}$ (u g COD-biomasa po g COD-supstrat). Kao i aerobni prirast, ovaj parametar može ovisiti o različitim faktorima, kao što su količina i kvaliteta organskog izvora ugljika i uvjeti u okolišu. Tipične vrijednosti za ovaj parametar navedene su u tablici 3.2. Ovaj se parametar može lako odrediti uspostavom prikladno osmišljenih šaržnih testova aktivnosti, kako je objašnjeno kasnije. Kada se provodi denitrifikacija, izvor ugljika potreban po nitratu/nitritu koji treba ukloniti (iskazan kao omjer COD/N ili kao omjer C/N) može se koristiti umjesto $Y_{OHO, Ax}$, budući da između toga dvoga postoji stehiometrijski odnos. Omjer COD/N predstavlja denitrifikacijski kapacitet izvora ugljika ili otpadne vode i može biti praktičniji parametar od $Y_{OHO, Ax}$.

Tablica 3.2 Očekivani stehiometrijski i kinetički parametri od interesa za sustave obrade otpadne vode s aktivnim muljem koji provode denitrifikaciju.

Parametar (simbol)	Napomena	Vrijednost	Referenca
Heterotrofni anoksični prirast ($Y_{OHO, Ax}$)	Acetat	0,66 g COD g COD ⁻¹	Ficara i Canziani (2007)
	Otpadna voda	0,50 g COD g COD ⁻¹	Orhon i sur. (1996)
	Acetat	0,66 g VSS g COD ⁻¹	Kujawa i Klapwijk (1999)
	Etanol	0,22 g VSS g COD ⁻¹	Hallin i sur. (1996)
	Metanol	0,18 g VSS g COD ⁻¹	Tchobanoglous i sur. (2003)
Omjer COD i dušika (COD/N)	Metanol	4,6 g COD g N ⁻¹	Bilanovic i sur. (1999)
	Metanol	4,7 g COD g N ⁻¹	Mokhayeri i sur. (2006)
	Etanol	3,5 g COD g N ⁻¹	Mokhayeri i sur. (2006)
	Acetat	3,4 g COD g N ⁻¹	Mokhayeri i sur. (2006)
Maksimalna specifična brzina denitrifikacije ($q_{NOx, N2}$)	Acetat,	10-19 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Ficara i Canziani (2007)
	Acetat, nitrit	15-28 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Ficara i Canziani (2007)
	Metanol, 13 °C	9,2 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Mokhayeri i sur. (2008)
	Etanol, 13 °C	30,4 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Mokhayeri i sur. (2008)
	Acetat, 13 °C	31,7 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Mokhayeri i sur. (2008)
	Acetat	1-3 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Kujawa i Klapwijk (1999)
	Acetat	2-10 mg N g VSS ⁻¹ h ⁻¹	Henze (1991)

Po pitanju kinetike rasta, specifična potrošnja supstrata (ili nitrat/nitrit ili COD) može se lako utvrditi šaržnim testovima aktivnosti. Ta vrijednost ovisi o radnim uvjetima korištenima tijekom testa (naročito o temperaturi, prirodi i koncentracijama supstrata). Stoga, te vrijednosti uvijek treba specificirati kada se izvještava o rezultatima nekog testa. Kao referentni uvjeti, testove denitrifikacije treba provesti pri 20 °C u neograničavajućim koncentracijama ugljika i nitrata/ nitrita. To će omogućiti određivanje maksimalne specifične brzine denitrifikacije. U praksi, maksimalna specifična brzina denitrifikacije $q_{NOx, N2}$ je povezana sa koncentracijom suspendirane tvari u suspenziji (X_{TSS}) ili, što je uobičajenije, sagorivim dijelom suspendirane tvari (X_{VSS}). Vrijednosti koje se navode u literaturi nalaze se u tablici 3.2.

3.3.9 Vrsta šaržnih testova

Ovisno o vrsti procesa od interesa (nitrifikacija ili/i denitrifikacija) i o odabranoj tehnici praćenja (kemijsko, titrimetrijsko ili manometrijsko), za ocjenu konverzija uklanjanja dušika mogu se provesti različiti testovi.

Tablica 3.4 sadrži opsežan popis testova koji se opisuju kasnije u ovom izvješću.

U nastavku se ti testovi detaljno opisuju. Prvo se predstavljaju nitrifikacijski testovi (odjeljak 3.4), a potom denitrifikacijski testovi (odjeljak 3.5).

Tablica 3.4 Šaržni testovi aktivnosti koji se provode kako bi se ocijenile konverzije biološkog uklanjanja dušika kao funkcija procesa i metode praćenja.

Oznaka testa	Proces	Metoda praćenja	Svrha
NIT.CHE	Nitrifikacija	Kemijsko	Procijeniti maksimalnu brzinu oksidacije NH ₄
NIT.TIT.1	Nitrifikacija	Titrimetrijsko	Procijeniti maksimalnu brzinu oksidacije NH ₄
NIT.TIT.2	Nitrifikacija	Titrimetrijsko	Procijeniti maksimalnu brzinu oksidacije NH ₄ i NO ₂ i brzinu amonifikacije
DEN.CHE.1	Denitrifikacija	Kemijsko	Procijeniti maksimalnu brzinu denitrifikacije i anoksični prirast na specifičnom izvoru C
DEN.CHE.2	Denitrifikacija	Kemijsko	Procijeniti denitrifikacijski potencijal otpadne vode
DEN.MAN	Denitrifikacija	Manometrijsko	Procijeniti maksimalnu brzinu denitrifikacije
DEN.TIT	Denitrifikacija	Titrimetrijsko	Procijeniti maksimalnu brzinu denitrifikacije

3.4 Nitrifikacijski šaržni testovi aktivnosti: priprema

3.4.1 Oprema

Svaka metodologija praćenja (kemijsko, titrimetrijsko ili manometrijsko) ima specifične potrebe za opremom. Kada se koristi kemijsko praćenje, potrebna je sljedeća oprema:

1. Šaržni reaktor opremljen sustavom za miješanje i odgovarajućim otvorima za uzorkovanje (odjeljak 3.3.1).
2. Kalibrirana pH elektroda (ako nije uključena/ugrađena u strukturu šaržnog reaktora).
3. Dvosmjerni kontrolor pH za dodavanje HCl i NaOH (alternativno, može se koristiti jednosmjerna kontrola – općenito za dodavanje HCl - ili ručna kontrola pH kroz ručno dodavanje HCl i NaOH). Za alkalne otopine koje treba zakiseliti, umjesto dodavanja kisele otopine može se razmotriti upuhivanje plinovitog CO₂ (ili plinske mješavine obogaćene s CO₂) budući da je prednost toga izbjegavanje dodavanja protuiona protona (tj. Cl⁻ kada se kao kiselina otopina koristi HCl).
4. Termometar (s preporučenim rasponom radne temperature od 0 °C do 40 °C).
5. Sustav za kontrolu temperature (ako nije uključen u strukturu šaržnog reaktora).
6. Mjerač DO s elektrodom (ako nije uključen/ugrađen u strukturu šaržnog reaktora) kako bi se potvrdili aerobni/anoksični uvjeti.
7. Zaporni sat.

Popis opreme potrebne za titrimetrijske i manometrijske testova opisan je u odjeljku 3.3.1.

3.4.2 Materijali

Za općenite upute o pripremi materijala, upućujemo čitatelja na odjeljak 2.3.4 i tablicu 2.2. Zahtjevi specifični za svaki pojedini test će biti navedeni u sklopu svakog protokola testa. Za cjelovit popis potrebnih materijala, upućujemo na odjeljak 2.3.2 (uz iznimku 7. i 8. točke).

3.4.3 Priprema medija

- Prava otpadna voda

Za šaržne testove koji zahtijevaju korištenje prave otpadne vode, slijedite upute navedene u odjeljku 2.3.3.

- Titracijske otopine

- a. Potrebne su otopine NaOH i HCl. Obično bi za većinu primjena bila dovoljna 0,05-0,1 N otopina.
- b. Otopina H₂O₂ se može dobiti razrjeđivanjem komercijalno dostupnih otopina H₂O₂. Najčešća otopina H₂O₂ je 3-postotna, što odgovara koncentraciji od 0,44 mola O₂ L⁻¹. Dakle, odgovarajuća oksigenirana titracijska otopina može se dobiti ako se ta otopina deseterostruko razrijedi (konačna koncentracija od 44 mmol O₂ L⁻¹). Kako bi se provjerila koncentracija otopine H₂O₂, može se koristiti jodometrijska metoda (metoda 4,500-Cl B u APHA i sur., 2012). Razrijedena otopina treba biti spremljena u tamne boce, a nove otopine treba pripremiti svakih 7-10 dana.

- **Koncentrirane otopine amonija i nitrita**

Ove se otopine mogu pripremiti iz soli (npr. iz NH_4Cl i NaNO_2). Prikladna koncentracija koncentriranih otopina je između 5 i 10 g N L^{-1} . pH otopine amonija treba biti prilagođen na 7,0 kako bi se smanjila potencijalna interferencija tijekom pH-statičnih testova.

- **Alil-N-tiourea (ATU)**

Općenito je dovoljna otopina koncentracije otprilike 5-10 g L^{-1} .

- **Kisele i bazne otopine**

Treba koristiti 100-250 mL 0.2 M otopine HCl i 100-250 mL 0.2 M otopine NaOH za automatsku ili ručnu kontrolu pH, odnosno 10-50 mL 1 M otopine HCl i 10-50 mL 1 M otopine NaOH za početnu prilagodbu pH ako se željeni radni pH jako razlikuje od pKa vrijednosti puferkog sredstva. Umjesto NaOH, 0.2 M Na_2CO_3 se može koristiti kao alkalna otopina, koja ima prednost u tome da djeluje i kao izvor baze i ugljika. Stoga se preporučuje korištenje Na_2CO_3 kao bazne otopine kad otpadnoj vodi može nedostajati anorganski ugljik. Ovaj stavak ne vrijedi kada se koristi titrimetrija.

- **Sintetički medij**

Ovaj medij treba sadržavati sve potrebne makro- (natrij, klorid, fosfat, magnezij, sulfat, kalcij, kalij) i mikro-nutrijente (željezo, cink, bakar, mangan, bor, molibdat, kobalt, jodid) kako bi se osiguralo da stanice nisu ograničene, a u ekstremnim slučajevima kako bi se izbjegao neuspjeh testa. Dakle, premda njihove koncentracije mogu djelovati jako niske, mora se osigurati da su sve te sastavnice dodane otopini u potrebnim količinama. Vezano uz makro-nutrijente, preporučuje se sljedeći sastav (količine po litri otopine nutrijenta) (na temelju Kampschreur i sur., 2007): 72 mg NaH_2PO_4 , 35 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 180 mg NaCl, 30 mg KCl, i 1 mg ekstrakta kvasca. Mikro-nutrijenti se mogu dobiti doziranjem 0,3 mL L^{-1} otopine elementa u tragovima koja sadrži (po litri otopine, recept na temelju Kampschreur i sur., 2007): 10 g EDTA, 1,5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g H_3BO_3 , 0,03 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g KI, 0,12 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Mogu se koristiti druge slične otopine nutrijenata sve dok sadrže sve prethodno navedene potrebne nutrijente.

- **Medij za pranje**

Ako se uzorak mulja mora oprati kako bi se uklonio neželjeni spoj (koji čak može biti inhibitoran ili toksičan), potrebno je pripremiti medij za pranje. Kao medij za pranje može se koristiti isti gore opisan sintetički medij. Proces pranja se može ponoviti dva ili tri puta koristeći postupak opisan u odjeljku 2.3.5. Nakon toga, mogu se provesti sljedeći pripremi koraci šaržnih testova aktivnosti. U posebnim slučajevima kad se koristi mulj iz gradskih uređaja, za pranje se može koristiti efluent uređaja (samo ako ne sadrži toksične ili inhibitorne spojeve).

Prije izvođenja eksperimenta, treba prikupiti uzorke medija i mješavine vode i mulja ili aktivnog mulja korištene za provođenje testova kako bi se potvrdila/provjerila početna (željena) koncentracija paramet(a)ra od interesa (npr. amonij, nitrit, nitrat, X_{TSS} , X_{VSS}).

Na kraju, i potrebne radne i koncentrirane otopine za određivanje analitičkih parametara od interesa moraju biti pripremljene u skladu sa Standardnim metodama (APHA i sur., 2012) i odgovarajućim protokolima.

3.5 Nitrifikacijski šaržni testovi aktivnosti: izvođenje

Test NIT.CHE Nitrifikacijski kemijski test: procjena maksimalne brzine oksidacije amonija

Priprema aktivnog mulja

1. O uzimanju uzoraka molimo pogledajte odjeljak 3.3.4.
2. Za uzorke aktivnog mulja iz konvencionalnih uređaja u kojima se obrađuju komunalne otpadne vode, bio bi prikladan uzorak s koncentracijom X_{VSS} od oko 2-4 g VSS L^{-1} . Prilagodba X_{VSS} se može provesti kako je predloženo u odjeljku 3.3.5.
3. Ulijte definirani volumen (V_{ML}) uzorka mješavine vode i mulja (obično 1 do 3 L) u reakcijsku posudu i pokrenite sustave za miješanje, aeraciju i kontrolu temperature i pH kako bi se temperatura i pH održali oko željenih zadanih vrijednosti. Odaberite željenu zadanu vrijednost pH; obično su prikladne vrijednosti između 7,5 i 8,4. Ako nije dostupna automatizirana kontrola pH, pH korigirajte na željenu

vrijednost ručnim dodavanjem kisele/bazne otopine. U načelu, što je zadana vrijednost pH bliža uobičajenom radnom pH u uređaju, to će brzina nitrifikacije biti bliža i reprezentativnija. Isto načelo se primjenjuje na odabir zadane vrijednosti temperature. Što se tiče DO, sustav aeracije treba osigurati dovoljno kisika kako bi se tijekom izvođenja nitrifikacijskih testova izbjegli uvjeti koji ograničavaju DO. To znači da bi u endogenim uvjetima opažena vrijednost DO trebala biti visoka (npr. $> 6 \text{ mg L}^{-1}$).

4. Pričekajte 30-ak min kako bi se postigli i osigurali stabilni početni uvjeti. Ova faza pred-inkubacije će obično omogućiti da se potroši sav preostali nitrit preostao iz uređaja ili izvor porijekla mulja.

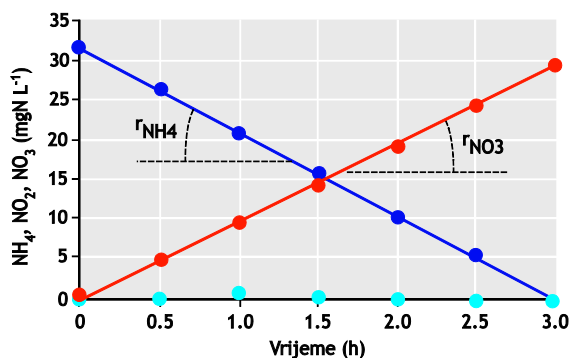
Izvođenje testa

1. Provjerite jesu li očitavanja temperature, pH i DO na zadanim vrijednostima ili barem unutar odabranih intervala. U protivnom korigirajte radne uvjete i pričekajte dok se sustav ne stabilizira.
2. Nakon što se postignu stabilni uvjeti, dodajte otopinu amonija (s time da ste prethodno prilagodili njezinu temperaturu ciljanoj temperaturi testa) kako bi se u mješavini vode i mulja postigla koncentracija amonija koja nije niti ograničavajuća niti inhibirajuća. Tipične i prikladne vrijednosti su one između 20 i 40 mg N L^{-1} .
3. Pokrenite zaporni sat kako biste precizno pratili vremena uzorkovanja, budući da test formalno počinje dodavanjem otopine amonija. Uzmite uzorke aktivnog mulja svakih 20-30 min tijekom izvođenja testa. Napominjemo da svi uzorci moraju biti filtrirani kroz filtar s porama veličine 0,45 μm (ili manje), osim onih koji se koriste za određivanje koncentracija X_{TSS} i X_{VSS} .
4. Završite test nakon 3 do 4 h ili, ako to omogućuje uzorkovanje i analitičko određivanje amonija u uzetim uzorcima, kada se amonij potroši.
5. Nakon završetka testa, uzmite uzorak za završnu procjenu X_{VSS} .

Napominjemo da je nitrit prilično nestabilan, zbog čega koncentracije nitrata treba odrediti ubrzo nakon uzorkovanja istog dana (vidi tablicu 2.2).

Analiza podataka

Tipičan rezultat ovog testa prikazan je na slici 3.3.



Slika 3.3 Tipični profili dobiveni testom NIT.CHE: koncentracije amonija (●), nitrita (●) i nitrata (●) se prikazuju na osi y. Prikazane su i relevantne brzine od interesa (npr. brzina uklanjanja amonija r_{NH_4} , i brzina proizvodnje nitrata r_{NO_3}).

Na osi y prikazuje se koncentracija amonija, nitrita i nitrata (u mg N L^{-1}), a vrijeme (u satima) se prikazuje na osi x. Linearna regresija nad tim podacima omogućuje izračun brzine uklanjanja amonija i proizvodnje nitrata (u $\text{mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Napominjemo da prikupljeni podaci trebaju biti dovoljni da se pouzdano procijeni odgovarajuća brzina uklanjanja/proizvodnje (npr. r_{NH_4} i r_{NO_3}) pomoću linearne regresije sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije (npr. $R^2 > 0,98$). Dakle, potrebno je po mogućnosti najmanje 4 do 5 podatkovnih točaka da se provede linearna regresija, što ukazuje na to da će na početku testa trebati uzeti veći broj uzoraka.

Nitrit se može akumulirati do nekoliko mg N L^{-1} kad se koristi konvencionalni aktivni mulj. Međutim, ako se aktivni mulj koristi za izvođenje testova (djelomične) nitrifikacije, tada se očekuje veće akumuliranje

nitrita i njegovu koncentraciju treba pratiti kroz vrijeme, slično kao za amonij i nitrat (za primjer vidi Test NIT.TIT.2). Kada se koristi konvencionalni aktivni mulj za punu oksidaciju amonija do nitrata, brzina uklanjanja amonija treba biti jednaka brzini proizvodnje nitrata uz zanemarivo nakupljanje nitrita za vrijeme testa. Maksimalna specifična brzina oksidacije amonija ($q_{\text{AOO,NH}_4}$, kao mg N g VSS⁻¹ h⁻¹) se stoga može izračunati kako slijedi:

$$q_{\text{AOO,NH}_4} = r_{\text{NH}_4} / X_{\text{VSS}}$$

3.21

Test NIT.TIT.1 Nitrifikacijski titracijski test: procjena maksimalne brzine oksidacije amonija

Priprema aktivnog mulja

1. Za konvencionalne uzorke aktivnog mulja iz uređaja u kojima se obrađuju komunalne otpadne vode, bit će prikladan uzorak s X_{VSS} od oko 2-4 g VSS L⁻¹. Za jako razrijeđene ili koncentrirane uzorke mulja, može pomoći koncentriranje (npr. dekantiranjem u Imhoffov stožac u trajanju od 30 min ili centrifugiranjem pri 4.000 rpm u trajanju od nekoliko minuta) te razrjeđivanje sekundarnim efluentom iz istog uređaja za obradu otpadne vode. Time će se izbjeći prespora ili prebrza nitrifikacija.
2. Ulijte definirani volumen uzorka aktivnog mulja (obično 1 L) u reakcijsku posudu i pokrenite sustave za aeraciju i kontrolu temperature. Odaberite željenu zadanu vrijednost pH. Obično su prikladne vrijednosti između 7,5 i 8,4. U načelu, što je zadana vrijednost pH bliža uobičajenom radnom pH uređaja ili izvora mulja, to će opažana brzina nitrifikacije biti bliža i reprezentativnija. Isto načelo se primjenjuje na odabir vrijednosti temperature. Što se tiče DO, sustav aeracije treba osigurati dovoljno kisika kako bi se tijekom izvođenja nitrifikacijskih testova izbjegli uvjeti koji ograničavaju DO. To znači da bi u endogenim uvjetima opažena vrijednost DO trebala biti relativno visoka (npr. > 6 mg L⁻¹).
3. Aktivirajte automatiziran sustav titracije za razdoblje pred-inkubacije od oko 1 h. Ova faza pred-inkubacije će osigurati: (i) da se endogeni uvjeti postignu na početku titracijskog testa (S_B , amonij i nitrit se oksidiziraju za vrijeme ove faze prekonocne aeracije) i (ii) da su temperatura, pH i S_{O_2} stabilni na početku testa. Prethodno ovlaženi zrak može se koristiti da se ograniči značajnije isparavanje vode tijekom ove faze pred-inkubacije. Napominjemo da produžena razdoblja inkubacije (npr. duža od 4 h) mogu smanjiti brzinu nitrifikacije zbog brzog endogenog raspadanja biomase u aerobnim uvjetima.

Izvođenje testa

1. Aktivirajte bilježenje podataka.
2. Dodajte koncentriranu otopinu amonijevog klorida (s time da ste prethodno prilagodili njezinu temperaturu ciljanoj temperaturi testa) kako bi se postigla koncentracija amonija u aktivnom mulju koja nije niti ograničavajuća niti inhibirajuća (uobičajeno prikladne vrijednosti su između 20 i 40 mg N L⁻¹). Dodavanje NH₄Cl alkalnoj suspenziji ima acidifirajući učinak (kiselinska hidroliza) koji dovodi do brzog opadanja pH, što treba kompenzirati automatskim sustavom kontrole pH ili ručnim dodavanjem koncentriranog NaOH. Svako dodavanje titracijskih otopina za vrijeme faze korigiranja pH treba zanemariti prilikom analize podataka. Po dodavanju amonija, nitrificirajuće bakterije će oksidirati dodani amonij, slijedom čega će trebati dodati alkalnu titracijsku otopinu kako bi se kompenzirao acidifirajući učinak nitrifikacije.
3. Zabilježite dodani volumen titracijske otopine NaOH kroz vrijeme (V_{NaOH} nasuprot vremena) (obično je prikladno 20-40 min). Provjerite ostaje li očitavanje pH blizu ciljanoj zadanoj vrijednosti pH ± 0,02 i da razina S_{O_2} ne postane ograničavajuća. Nemojte mijenjati brzinu aeracije ili uvjete miješanja budući da bi to djelovalo na brzinu titracije, što bi otežalo ocjenu brzine titracije povezane s nitrifikacijom. Prikupljeni podaci trebaju biti dovoljni da se pouzdano procijeni odgovarajuća brzina titracije (Q_{NaOH}) pomoću linearne regresije V_{NaOH} u ovisnosti o vremenu reakcije sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije ($R^2 > 0,98$).
4. Dodajte alil-N-tioureu kako bi se postigla konačna koncentracija ATU od 10 mg L⁻¹. Pri toj koncentraciji, oksidacija amonija će biti inhibirana. Nastavite bilježiti brzinu titracije NaOH daljnjih 20-30 min kako bi se ocijenila rezidualna brzina titracije budući da pozadinski pH djeluje na reakcije kao što je uklanjanje CO₂ ($Q_{\text{NaOH,final}}$), ako je prisutno. Valja primijetiti da što je duže razdoblje prethodne inkubacije, to je manji značaj $Q_{\text{NaOH,final}}$.
5. Test sada može završiti. Izmjerite završni volumen aktivnog mulja i uzmite uzorak radi ocjene koncentracije X_{VSS} . Napominjemo da će se volumen suspenzije promijeniti za vrijeme testa zbog

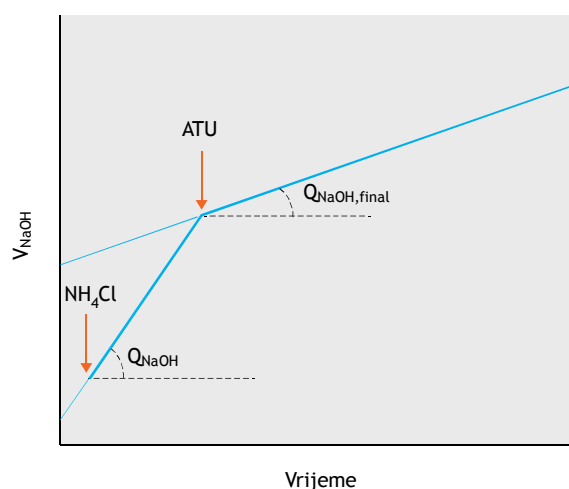
dodavanja titracijskih otopina. Očekuje se da dodavanje titracijske otopine ne čini više od 10 % završnog volumena aktivnog mulja.

Analiza podataka

Tipičan trend volumena NaOH dodanog za vrijeme testa prikazan je na slici 3.4. Iz tih podataka (titracijski volumen u ovisnosti u vremenu) mogu se izračunati brzine titracije (Q) kroz nagib titracijske krivulje pomoću odgovarajućeg računalnog programa ili primjenom sljedeće formule:

$$Q = \frac{n \cdot \sum t_i \cdot V_{\text{NaOH},i} - \sum t_i \cdot \sum V_{\text{NaOH},i}}{n \cdot \sum t_i^2 - (\sum t_i)^2} \quad 3.22$$

Gdje je n broj zabilježenih dostupnih podataka [t_i , $V_{\text{NaOH},i}$].



Slika 3.4 Primjer pH-statične titracijske krivulje tijekom nitrifikacijskog testa kako bi se ocijenio maksimalni kapacitet oksidacije amonija. Strelice označavaju dodavanje amonijevog klorida i alil-N-tiouree. Na grafikonu su identificirane i relevantne brzine titracije.

Brzine titracije NaOH (Q_{NaOH} i $Q_{\text{NaOH,final}}$ u mL min^{-1}) se koriste za ocjenu brzine oksidacije amonija (F_{NH_x} u mg N min^{-1}), uzimajući pritom u obzir koncentraciju otopine NaOH (N_{NaOH} u meq mL^{-1}) i omjer između oksidacije amonija i potrošnje alkaliteta $Y_{\text{NH}_4\text{-H}^+}$ koji se može izračunati iz jednadžbe 3.12. Dakle:

$$F_{\text{NH}_x} = (Q_{\text{NaOH}} - Q_{\text{NaOH,final}}) \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot Y_{\text{NH}_4\text{-H}^+} \quad 3.23$$

Na kraju, maksimalna specifična brzina oksidacije amonija mulja ($q_{\text{AOO,NH}_4}$, u $\text{mg N g VSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) može se izračunati uzimajući u obzir koncentraciju X_{VSS} u uzorku mulja (u g VSS L^{-1}) i volumen suspenzije opažen na kraju testa (V_{ML}):

$$q_{\text{AOO,NH}_4} = 60 \cdot F_{\text{NH}_x} / (V_{\text{ML}} \cdot X_{\text{VSS}}) \quad 3.24$$

Test NIT.TIT.2 Nitrifikacijski titracijski test: procjena maksimalne brzine oksidacije amonija i nitrita

Priprema aktivnog mulja

Slijedite 1., 2. i 3. korak pripreme aktivnog mulja opisan za Test NIT.TIT.1.

Izvođenje testa

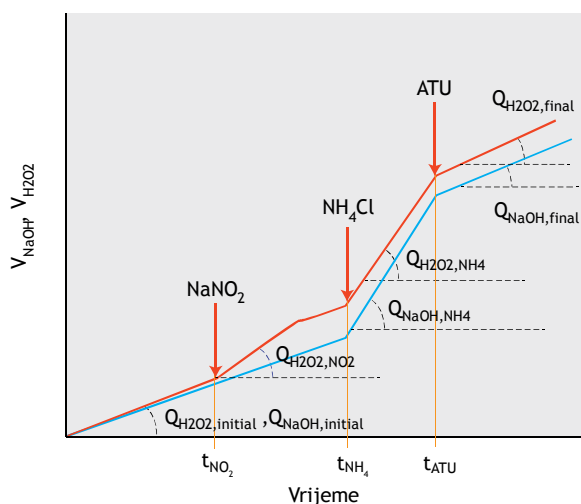
1. Odaberite odgovarajuću zadanu vrijednost za S_{O_2} (zadana vrijednost DO). Obično su vrijednosti između $4,0 \text{ mg N L}^{-1}$ i $6,0 \text{ mg N L}^{-1}$ prikladne za ocjenu maksimalnih brzina nitrifikacije. Aktivirajte sustav za bilježenje podataka.
2. Zabilježite volumen titracijskih otopina H_2O_2 i NaOH dodanih kroz vrijeme ($V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ i V_{NaOH} nasuprot vremena) (obično je prikladno 20-40 min). Provjerite ostaju li vrijednosti pH i DO unutar intervala

zadane vrijednosti $\text{pH} \pm 0,02$, odnosno zadane vrijednosti $\text{S}_{\text{O}_2} \pm 0,10 \text{ mg L}^{-1}$. Prikupljeni podaci bi trebali biti dovoljni da se pouzdano procijeni (tj. sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije, $R^2 > 0,98$) brzina titracije lužine iz linearne regresije V_{NaOH} nasuprot vremenskim podacima, odnosno brzina titracije kisika ($Q_{\text{H}_2\text{O}_2}$) iz linearne regresije $V_{\text{H}_2\text{O}_2}$ nasuprot vremenskim podacima. Tijekom ove faze, titracijske brzine potiču od endogene respiracije koja dovodi do potrošnje DO i nastajanje CO_2 ; DO se kompenzira dodavanjem H_2O_2 (brzinom naznačenom kao $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{ini}}$), a nastajanje CO_2 dodavanjem NaOH (brzinom naznačenom kao $Q_{\text{NaOH},\text{ini}}$).

3. Dodajte nitrit u niti ograničavajućoj niti inhibirajućoj koncentraciji u aktivnom mulju (obično su prikladne vrijednosti oko 10 mg N L^{-1}) kako bi se pokrenula oksidacija nitrita. Ponovite dobivanje podataka kako je opisano u 2. koraku kako bi se procijenila brzina titracije kisika koja uključuje potrebu za kisikom za oksidaciju nitrita ($Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NO}_2}$). Brzina titracije lužine se neće promijeniti budući da oksidacija nitrita ne djeluje značajnije na pH suspenzije.
4. Dodajte koncentriranu otopinu amonijevog klorida u skladu s uputama iz 2. koraka postupka provođenja testa opisanog za Test NIT.TIT.1. I tim dodavanjem će se potaknuti oksidacija amonija. Ponovite dobivanje podataka kako je opisano u 2. koraku kako bi se procijenila brzina titracije lužine ($Q_{\text{NaOH},\text{NH}_4}$) i brzina titracije kisika ($Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NH}_4}$) koje uključuju potrebe za oksidacijom amonija.
5. Dodajte alil-N-tioureu (ATU) u konačnoj koncentraciji od 10 mg L^{-1} . Oksidacija amonija će biti inhibirana. Nastavite bilježiti brzinu titracije NaOH daljnjih 20-30 min kako bi se ocijenila rezidualna brzina titracije, zbog toga što pozadinski pH djeluje na reakcije kao što su proizvodnja CO_2 ($Q_{\text{NaOH},\text{final}}$) i reakcije koje djeluju na kisik ($Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{final}}$) uključujući endogenu respiraciju i oksidaciju preostalog nitrita.
6. Završite test u skladu s uputama iz 4. koraka postupka provođenja testa opisanog za Test NIT.TIT.1.

Analiza podataka

Tipičan trend kumuliranog volumena titracijskih otopina dodanih za vrijeme testa prikazan je na slici 3.5.



Slika 3.5 Primjer pH/DO-statične titracijske krivulje tijekom nitrifikacijskog testa provedenog kako bi se ocijenio maksimalni kapacitet oksidacije amonija i nitrita. Strelice označavaju dodavanje nitrita, alil-N-tiouree i amonija. Na grafikonu su identificirane i relevantne brzine titracije.

Iz tih podataka (volumen u vremenu) mogu se izračunati brzine titracije (Q) kao nagib titracijske krivulje pomoću odgovarajućeg računalnog programa ili primjenom formule prethodno opisane u Testu NIT.TIT.1.

Brzine titracije NaOH ($Q_{\text{NaOH},\text{NH}_4}$ i $Q_{\text{NaOH},\text{final}}$ u mL min^{-1}) mogu se prvo koristiti za ocjenu brzine oksidacije amonija ($F_{\text{NH}_x,\text{NaOH}}$ u mg N min^{-1}) uzimajući u obzir koncentraciju titracijskih otopina NaOH (N_{NaOH} u meq mL^{-1}) i omjer između oksidacije amonija i potrošnje alkaliteta, kako je sugerirano u Testu NIT.TIT.1:

$$F_{\text{NH}_x, \text{NaOH}} = (Q_{\text{NaOH}, \text{NH}_4} - Q_{\text{NaOH}, \text{final}}) \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot Y_{\text{NH}_4, \text{H}^+} \quad 3.25$$

Slično tome, brzine titracije kisika ($Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NH}_4}$ i $Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{final}}$ u mL min^{-1}) mogu se prvo koristiti za ocjenu brzine oksidacije amonija ($F_{\text{NH}_x, \text{H}_2\text{O}_2}$ u mg N min^{-1}) uzimajući u obzir koncentraciju titracijskih H_2O_2 otopina ($N_{\text{H}_2\text{O}_2}$ u $\text{mmol O}_2 \text{ mL}^{-1}$) i omjer između oksidacije amonija do nitrata i potrošnje kisika, $Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_3}$, što je, u skladu s ASM stehiometrijom nitrifikacije (Henze i sur., 2000):

$$F_{\text{NH}_x, \text{H}_2\text{O}_2} = (Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NH}_4} - Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{final}}) \cdot N_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 32 \cdot Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_3} \quad 3.26$$

$$Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_3} = \frac{1}{4.57 - Y_{\text{AOO}}} = 0.23 \text{ g N g O}_2^{-1} \quad 3.27$$

Vrijednosti $F_{\text{NH}_x, \text{NaOH}}$ i $F_{\text{NH}_x, \text{H}_2\text{O}_2}$ bi trebale biti slične, a njihova se usporedba može koristiti za validaciju eksperimentalnih podataka. Razlike veće od 15 % mogu ukazivati na potrebu za pažljivom provjerom postavki eksperimenta.

Brzine titracije kisika prikupljene tijekom 3. koraka ($Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NO}_2}$ u mL min^{-1}) će se koristiti za određivanje brzine oksidacije nitrita (F_{NO_2} in mg N min^{-1}) uzimajući u obzir omjer između oksidacije nitrita do nitrata i potrošnju kisika, $Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2, \text{NO}_3}$, kako slijedi (u skladu sa stehiometrijom nitrifikacije u dva koraka):

$$F_{\text{NO}_2} = (Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NO}_2} - Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{initial}}) \cdot N_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 32 \cdot Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2, \text{NO}_3} \quad 3.28$$

$$Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2, \text{NO}_3} = \frac{1}{1.14} = 0.88 \text{ g N g O}_2^{-1} \quad 3.29$$

Ako se ne opaža nikakva razlika između vrijednosti $Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NO}_2}$ i $Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{initial}}$, tada je ili brzina oksidacije nitrita vrlo spora ili je puno sporija od brzine oksidacije amonija. To može dovesti do akumuliranja nitrita tijekom endogene faze budući da bi do oksidacije amonija vjerojatno došlo na amoniju oslobođenom kroz amonifikaciju. Ako je tome tako, $Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{initial}}$ bi uključivao potrošnju kisika zbog sporog procesa oksidacije nitrita i bio bi jednak $Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NO}_2}$. U tom slučaju, uzorak aktivnog mulja treba obraditi kako bi se uklonio sav sadržaj nitrita centrifugiranjem, dekantiranjem supernatanta i resuspenzijom u fiziološkom mediju bez nitrita kako bi se ocijenila brzina oksidacije nitrita. Međutim, kad je brzina oksidacije nitrita jako spora, kemijsko praćenje u dužem razdoblju testiranja (nekoliko sati) može dovesti do pouzdanijih procjena i trebalo bi imati prednost. Valja primijetiti da za vrlo spore brzine oksidacije nitrita, $F_{\text{NH}_x, \text{H}_2\text{O}_2}$ može biti viši od $F_{\text{NH}_x, \text{NaOH}}$. Zapravo, korištenje $Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_3}$ više nije ispravno budući da u obzir treba uzeti samu potrebu za oksidacijom amonija do nitrita, budući da $Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_3}$ kvantificira cjelokupnu potrebu za oksidacijom i amonija i nitrita. Stoga, u takvom slučaju, $F_{\text{NH}_x, \text{H}_2\text{O}_2}$ bi se točnije procijenilo uzimajući u obzir omjer između oksidiranog amonija i potrošnje kisika za oksidaciju amonija do nitrita, $Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_2}$, što se može izraziti u skladu sa stehiometrijom nitrifikacije u dva koraka kao:

$$F_{\text{NH}_x, \text{H}_2\text{O}_2} = (Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{NH}_4} - Q_{\text{H}_2\text{O}_2, \text{final}}) \cdot N_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 32 \cdot Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2, \text{NO}_2} \quad 3.30$$

$$Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2, \text{NO}_2} = \frac{1}{3.43 - Y_{\text{AOO}}} = 0.31 \text{ g N g O}_2^{-1} \quad 3.31$$

Štoviše, razlika između $Q_{\text{NaOH}, \text{initial}}$ i $Q_{\text{NaOH}, \text{final}}$ omogućuje procjenu brzine amonifikacije u endogenim uvjetima. Prva brzina titracije kompenzira alkalni učinak endogene respiracije i učinak nitrifikacije, što je ograničeno procesom amonifikacije koji je odgovoran za oslobađanje amonija. Alkalizirajući učinak povezan s amonifikacijom više nije prisutan nakon dodavanja ATU. Prema tome, brzina amonifikacije ($F_{\text{N}, \text{NH}_x}$ u mg N min^{-1}) se može procijeniti iz razlike prema sljedećoj jednadžbi:

$$F_{\text{N}, \text{NH}_x} = Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2, \text{NO}_3} \cdot (Q_{\text{NaOH}, \text{initial}} - Q_{\text{NaOH}, \text{final}}) \cdot N_{\text{NaOH}} \quad 3.32$$

Na kraju, maksimalne specifične brzine oksidacije amonija i nitrita u mulju ($q_{\text{AOO}, \text{NH}_x}$, i $q_{\text{NO}_2, \text{NO}_3}$ u $\text{mg N g VSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i specifična brzina amonifikacije ($q_{\text{N}, \text{NH}_x}$) mogu se izračunati uzimajući u obzir koncentraciju X_{VSS} u uzorku mulja (u g VSS L^{-1}) i volumen suspenzije opažen na kraju testa (V_{ML}):

$$q_{\text{AOO,NHx}} = 60 \cdot F_{\text{NHx}} / (V_{\text{ML}} \cdot X_{\text{VSS}}) \quad 3.24$$

$$q_{\text{NOO,NO}_3\text{NO}_2} = 60 \cdot F_{\text{NO}_2} / (V_{\text{ML}} \cdot X_{\text{VSS}}) \quad 3.33$$

$$q_{\text{N}_\text{NHx}} = 60 \cdot F_{\text{N}_\text{NHx}} / (V_{\text{ML}} \cdot X_{\text{VSS}}) \quad 3.34$$

3.6 Denitrifikacijski šaržni testovi aktivnosti: priprema

Svrha ovih testova je procijeniti maksimalnu brzinu denitrifikacije uzorka mulja i anoksični prirast biomase. Mogu se koristiti i različite vrste izvora ugljika kao što je ugljik pohranjen unutar stanice, vanjski izvori ugljika (npr. šećer ili alkohol) ili otpadna voda. Obično se maksimalna brzina denitrifikacije izražava kad se koristi biološki lako razgrađivi izvor ugljika (za asimilaciju kojeg je mulj prilagođen), dok se niže brzine opažaju u prisustvu složenih organskih molekula koje zahtijevaju prethodnu hidrolizu ili kada se doziraju otopine vanjskog izvora ugljika koje zahtijevaju specijalizirane metaboličke sposobnosti/mikroorganizme.

Predstavljaju se četiri testa. Prvi test (DEN.CHE.1) se odnosi na korištenje biološki lako razgrađivog izvora ugljika, za što su brzina denitrifikacije i anoksični prirast biomase relevantni parametri koje treba ocijeniti. U drugom testu (DEN.CHE.2) koristi se prava otpadna voda. Premda se iz toga mogu izvući kinetičke informacije, ovaj drugi test je uglavnom namijenjen ocjeni denitrifikacijskog kapaciteta te otpadne vode, odnosno količini nitrata koja se može denitrificirati po jediničnom volumenu te specifične otpadne vode. Na kraju, predstavljaju se još dva testa za ocjenu maksimalne brzine denitrifikacije primjenom manometrijske (DEN.MAN) ili titrimetrijske (DEN.TIT) procedure praćenja.

3.6.1 Oprema

Svaka metodologija praćenja (kemijsko, titrimetrijsko ili manometrijsko) zahtijeva posebnu opremu.

Kada se koristi kemijsko praćenje, potrebna je sljedeća oprema:

1. (Zrakonepropusni) šaržni reaktor opremljen sustavom za miješanje i odgovarajućim otvorima za uzorkovanje (kako je opisano u odjeljku 3.3.1).
2. Dobava plina dušika (preporučeno).
3. Kalibrirana pH elektroda (ako nije uključena ili ugrađena u strukturu šaržnog reaktora).
4. Dvosmjerni kontrolor pH za dodavanje HCl i NaOH (alternativno, može se koristiti jednosmjerna kontrola, općenito za dodavanje HCl, ili ručna kontrola pH kroz ručno dodavanje HCl i NaOH).
5. Termometar (s preporučenim radnim rasponom temperature od 0 °C do 40 °C).
6. Sustav za kontrolu temperature (ako nije uključen u strukturu šaržnog reaktora).
7. Mjerač DO s elektrodom (ako nije uključen/ugrađen u strukturu šaržnog reaktora) kako bi se potvrdili anoksični uvjeti.
8. Zaporni sat.

Kada se provode titrimetrijski testovi, potrebna je sljedeća oprema:

1. Oprema za titrimetrijski sustav opisana u odjeljku 3.3.1.
2. Dobava plina dušika (preporučeno).

Kada se provode manometrijski testovi, potrebna je sljedeća oprema:

1. Oprema za manometrijski sustav opisana u odjeljku 3.3.1.
2. Dobava plina dušika (preporučeno).

3.6.2 Materijali

Za cjelovit popis potrebnih materijala, vidjeti odjeljak 2.3.2 (uz iznimku 7. i 8. točke).

3.6.3 Radne otopine

- Prava otpadna voda

Za šaržne testove koji zahtijevaju korištenje prave otpadne vode, slijedite upute navedene u odjeljku 2.3.3.

- Otopina izvora ugljika

Ona se obično sastoji od biološki lako razgradivog izvora ugljika (S_B), po mogućnosti hlapivih masnih kiselina poput acetata ili propionata, šećera ili alkoholnih otopina. Odabir organskog izvora ugljika ovisi o prirodi ili cilju testa i odgovarajućim istraživačkim pitanjima. Ponekad se koriste složeniji supstrati koji su sličniji pravim otpadnim vodama, koji sadrže mješavinu biološki lako i sporo razgradivog COD. Za testove šaržne anoksične aktivnosti, treba poznavati koncentraciju COD (i ukupni i topivi) kako bi se odabrala valjana doza.

- Otopine nitrata ili nitrita

Nitratne i nitritne soli su potrebne za prilagodbu razine nitrata/nitrita za vrijeme denitrifikacijskih testova.

- Medij za pranje

Ako uzorak mulja treba 'oprati' kako bi se uklonili neželjeni spojevi, vidjeti odjeljak 3.3.4.

- Kisele i bazne otopine

Koriste se 100-250 mL 0.2 M otopine HCl i 100-250 mL 0.2 M otopine NaOH za automatsku ili ručnu kontrolu pH i 10-50 mL 1 M otopine HCl i 10-50 mL 1 M otopine NaOH za početnu korekciju pH ako se željeni radni pH jako razlikuje od pKa vrijednosti puferkog sredstva. Za titrimetrijske testove, titrationske otopine treba pripremiti u skladu s uputama navedenima u odjeljku 3.4.3.

- Otopina nutrijenata

Otopina nutrijenata treba sadržavati sve potrebne makro- (amonij, magnezij, sulfat, kalcij, kalij) i mikro-nutrijente (željezo, cink, kalcij, bakar, mangan, molibdat, kobalt) kako bi se osiguralo da stanicama ne nedostaju osnovni nutrijenti za njihov metabolizam. Dakle, unatoč činjenici da njihove koncentracije mogu djelovati jako niske, mora se osigurati da su sve navedene komponente dodane otopini u potrebnim količinama. Vezano uz makro-nutrijente, preporučuje se sljedeći sastav (količine po litri otopine nutrijenta) (na temelju Smolders i sur., 1994): 107 mg NH_4Cl , 90 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 14 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 36 mg KCl, 1 mg ekstrakta kvasca. Mikro-nutrijenti se mogu dobiti doziranjem 10 mL L^{-1} otopine elementa u tragovima koja sadrži (po litri otopine) (na temelju Vishniac i Santer, 1957): 50 g EDTA, 22 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.54 g $CaCl_2$, 5.06 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 4.99 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.10 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1.57 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, i 1.61 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Mogu se koristiti slične otopine nutrijenata sve dok sadrže sve prethodno navedene potrebne nutrijente.

Preporučuje se da se prije izvođenja eksperimenta uzme uzorak medija i mulja kako bi se potvrdila/provjerila početna (željena) koncentracija paramet(a)ra od interesa (npr. COD, nitrat/nitrit, X_{vss}).

Na kraju, radne i koncentrirane otopine potrebne za određivanje analitičkih parametara od interesa također moraju biti pripremljene u skladu sa Standardnim metodama (APHA i sur., 2012) i odgovarajućim protokolima za njihovo čuvanje i analitičko određivanje.

3.6.4 Priprema materijala

Za općenite upute o tome kako organizirati pripremu materijala, molimo vidjeti odjeljak 2.3.4 i tablicu 2.2. Zahtjevi specifični za određeni test bit će navedeni unutar protokola za svaki pojedini test.

3.7 Denitrifikacijski šaržni testovi aktivnosti: izvođenje

Test DEN.CHE.1 Denitrifikacijski kemijski test: procjena maksimalne brzine denitrifikacije i anoksičnog prirasta u prisutnosti specifičnog izvora ugljika

Priprema aktivnog mulja

Optimalna točka uzorkovanja za aktivni mulj bio bi izlaz iz bazena za naknadnu denitrifikaciju.

1. Za konvencionalne uzorke aktivnog mulja iz uređaja u kojima se obrađuju komunalne otpadne vode, prikladan bi bio uzorak s X_{vss} od oko 2-4 g VSS L^{-1} . X_{vss} se može prilagoditi kako je predloženo u odjeljku 3.3.5.

2. Ulijte poznati volumen (V_{ML}) uzorka aktivnog mulja (obično 1 do 3 L) u reakcijsku posudu i pokrenite miješanje. Pokrenite i sustave za kontrolu temperature i pH kako bi se oba parametra održala oko željenih zadanih vrijednosti.
3. Plinsku fazu reaktora otplinite plinom N_2 u trajanju od oko 10 min kako bi se osiguralo okruženje bez kisika. Osigurajte izlaz plina kako bi se ograničio nadtlak. Otplinjavanje se može nastaviti do kraja testa. Ako to nije izvedivo, onda treba koristiti odgovarajući zrakonepropusni reaktor s izlazom plina kojim će se spriječiti povratna difuzija kisika (npr. pomoću jednosmjernog kontrolnog ventila ili U-cijevi napunjene vodom) (vidi odjeljak 2.2.1 za više informacija o tome kako osigurati anoksične uvjete).
4. Pričekajte 30-ak min kako bi se osigurali stabilni početni uvjeti. Ova faza pred-inkubacije će obično omogućiti uklanjanje čitavog preostalog nitrata.

Izvođenje testa

Provjerite jesu li vaše ciljane vrijednosti temperature, pH i S_{O_2} blizu zadanih vrijednosti ili unutar odabranih intervala. Ako nisu, prilagodite ih i pričekajte dok se sustav ne stabilizira.

1. Dodajte koncentrirane otopine nitrata i S_B . Temperaturu obje te otopine ranije je trebalo prilagoditi ciljanoj temperaturi. Početna koncentracija nitrata ne smije biti niti ograničavajuća niti inhibirajuća (prikladne vrijednosti su obično 20 do 25 mg N L⁻¹). Ako se očekuje da će u uzorku aktivnog mulja biti prisutan rezidualni nitrat, tada dodavanje nitrata treba smanjiti.
2. Dodajte dovoljnu količinu biološki lako razgradivog izvora ugljika (S_B) tako da ne bude limitirajući faktor u reakciji. Kako bi se procijenila odgovarajuća količina S_B , može se razmotriti stehiometrijski odnos između količine S_B i nitrata potrošenog za vrijeme denitrifikacije:

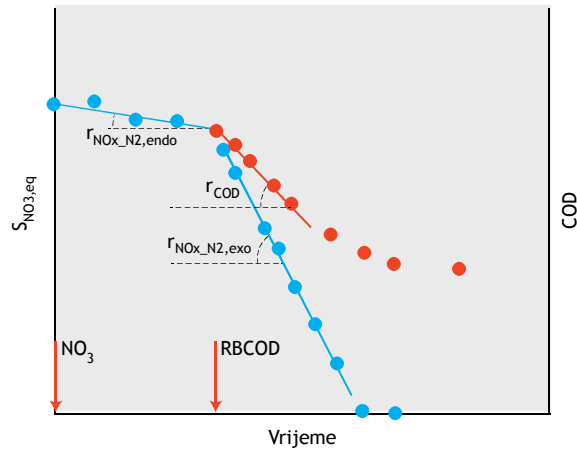
$$Y_{NO_3, S_B, Ax} = \frac{2.86}{1 - Y_{OHO, Ax}} \text{ (g COD g N}^{-1}\text{)} \quad 3.35$$

3. Dodavanje S_B bi trebalo jamčiti da je omjer S_B prema nitratu barem dvostruka stehiometrijska vrijednost utvrđena gornjim izrazom. Valja imati na umu da anoksični prirast biomase, $Y_{OHO, Ax}$, ovisi o izvoru ugljika, što je i prikazano u tablici 3.2. Međutim, za grubu se procjenu obično može koristiti vrijednost od 0,5. Kod takve pretpostavke, koncentracija S_B u aktivnom mulju od 200 mg COD L⁻¹ bi obično bila dovoljna. Ta koncentracija ujedno zadovoljava i početnu vrijednost omjera S_B prema X_{VSS} (0,05-0,1 g COD g VSS⁻¹) predloženu u odjeljku 2.3.1. Niže vrijednosti mogu rezultirati prebrzim nestankom ugljika, dok previsoke vrijednosti mogu dovesti do inhibicije biomase. Koncentrirana otopina amonija se također može dodati kako bi se omjer amonija prema S_B prilagodio na 0,05 g N g COD⁻¹.
4. Test počinje dodavanjem otopina nitrata i S_B . Pokrenite zaporni sat kako biste točno pratili vremena uzorkovanja i počeli uzorkovanje.
5. Uzmite uzorke aktivnog mulja u pravilnim vremenskim razmacima. Kao općenit prijedlog, uzorci za određivanje izvora C (ili topivog COD ovisno o analitičkom parametru od interesa) i nitrata i nitrata moraju se uzimati svakih 10 min u prvih 30 min nakon dodavanja S_B , svakih 15 min tijekom idućih 60 min, a kasnije svakih 30 min do završetka testa.
6. Završite test kad se nitrat i nitrit u cijelosti potroše. Koristite indikatorske papiriće za nitrat i nitrit kako biste mogli brzo ocijeniti kada su ti spojevi potrošeni.
7. Uzmite uzorak za konačnu procjenu koncentracije X_{VSS} .

Treba napomenuti da je koncentracija nitrata nestabilna, zbog čega koncentracije nitrata i nitrata treba brzo izmjeriti, po mogućnosti istoga dana.

Analiza podataka

Tipičan rezultat ovog testa prikazan je na slici 3.6.



Slika 3.6 Tipični profili dobiveni testom DEN.CHE.1: koncentracije nitrata (●) na glavnoj osi y, koncentracije COD (●) na sekundarnoj osi y. Prikazane su i relevantne brzine od interesa (brzina endogene denitrifikacije $r_{NOx_N2,endo}$, brzina egzogene denitrifikacije, $r_{NOx_N2,exo}$, i brzina potrošnje COD r_{COD}). Strelica označava dodavanje supstrata.

Na glavnoj osi y, prikazan je ekvivalent oksidiranog dušika $S_{NO3,Eq}$, koji odgovara ponderiranom zbroju koncentracija nitrata i nitrita:

$$S_{NO3,Eq} = S_{NO3} + 0.6 \cdot S_{NO2} \quad 3.36$$

Ponder 0,6 primijenjen na koncentraciju nitrita odgovara relativnom kapacitetu nitrita za prihvatanje elektrona u odnosu na nitrat ($1,71 / 2,86 = 0,6$), kako su sugerirali Kujawa i Klapwijk (1999). Na sekundarnoj osi y, prikazani su podaci o topivom COD. Tijekom prvog razdoblja (tj. prije dodavanja vanjskog izvora ugljika), dolazi do endogene denitrifikacije i opaža se sporo smanjivanje $S_{NO3,Eq}$.

Linearna regresija na ovim podacima (vidi odjeljak 3.4.2) može se koristiti za ocjenu brzine endogene denitrifikacije ($r_{NOx_N2,endo}$, u $mg\ N\ L^{-1}\ min^{-1}$). Nakon dodavanja S_B , raspoloživost egzogenog izvora ugljika ubrzava potrošnju nitrata i nitrita. Prikupljanje podataka o nitratu/nitritu nakon toga, ali prije nego što nitrat/nitrit postane ograničavajući, omogućuje da se ocijeni brzina egzogene denitrifikacije ($r_{NOx_N2,exo}$, u $mg\ N\ L^{-1}\ min^{-1}$). Slično tome, unutar istog vremenskog okvira može se ocijeniti maksimalna brzina potrošnje COD (r_{COD} , u $mg\ COD\ L^{-1}\ min^{-1}$).

Maksimalna specifična brzina denitrifikacije S_B ($q_{NOx_N2,SB}$ u $mg\ N\ g\ VSS^{-1}\ h^{-1}$) na testiranom izvoru ugljika može se izračunati kako slijedi:

$$q_{NOx_N2,SB} = 60 \cdot (r_{NOx_N2,exo} - r_{NOx_N2,endo}) / X_{VSS} \quad 3.37$$

Štoviše, kombiniranjem brzina denitrifikacije i brzine potrošnje COD, prirast biomase ($Y_{OHO,Ax}$) se također može procijeniti pomoću sljedeće formule:

$$Y_{OHO,Ax} = 1 - 2.86 \frac{(r_{NOx_N2,exo} - r_{NOx_N2,endo})}{r_{COD}} \quad 3.38$$

Test DEN.CHE.2 Denitrifikacijski kemijski test: procjena denitrifikacijskog potencijala otpadne vode

Priprema aktivnog mulja

Uzorke za ovaj test treba uzeti na izlazu iz bazena za primarnu denitrifikaciju.

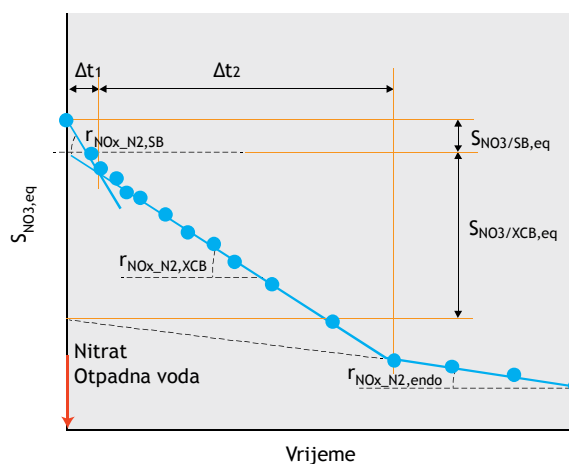
1. Slijedite 1. korak procedure pripreme aktivnog mulja opisane za Test DEN.CHE.1. U ovom slučaju koncentracija biomase od $3-4\ g\ VSS\ L^{-1}$ bila bi prikladnija budući da se dobiva učinak razrjeđenja kad se doda otpadna voda.
2. Ulijte poznati volumen uzorka aktivnog mulja (V_{ML} , obično $0,6-0,8\ L$) i uzmite uzorak aktivnog mulja kako biste odredili koncentraciju sagorivog dijela suspendiranih tvari ($MLVSS$ u $g\ VSS\ L^{-1}$). Slijedite 2., 3. i 4. korak procedure pripreme aktivnog mulja opisan za Test DEN.CHE.1.

Izvođenje testa

1. Provjerite jesu li vaše ciljane vrijednosti temperature, pH i DO unutar odabranih intervala. Ako nisu, prilagodite ih i pričekajte da se stabiliziraju.
2. Odaberite odgovarajući volumen otpadne vode (V_{ww}) koji će se dodati. Bilo bi idealno dodati takvu količinu otpadne vode da konačna biološki razgradiva koncentracija COD u reakcijskoj posudi ostane između 30 i 70 mg L⁻¹. Uz pretpostavku tipične koncentracije biološki razgradivog ugljika ($S_B + X_{CB}$) od 100-180 mg L⁻¹, bio bi prikladan faktor razrjeđenja ($V_{ML}:V_{WW}$) od 2 do 6. Ulijte otpadnu vodu u reakcijsku posudu i dodajte koncentriranu otopinu nitrata kako bi se postigla početna koncentracija nitrata u konačnoj mješavini ($V_{ML}+V_{WW}$) od 20-25 mg N L⁻¹.
3. Pokrenite zaporni sat kako biste točno pratili vremena uzorkovanja i počeli uzorkovanje. Kao općenit prijedlog, uzorci za određivanje koncentracija nitrata i nitrita moraju se uzimati svakih 5 min u prvih 30-45 min izvođenja testa, svakih 10 ili 15 min tijekom idućih 30-45 min, a kasnije svakih 15 ili 30 min do završetka testa.
4. Zaključite test nakon 3-4 h kada se opazi spora brzina (nalik na endogenu).

Analiza podataka

Tipičan rezultat ovog testa prikazan je na slici 3.7. Na osi y, prikazan je ekvivalent oksidiranog dušika $S_{NO_3,Eq}$ za vrijeme testa. Mogu se opaziti različite brzine denitrifikacije. Najveća brzina ($r_{NO_x, N_2, SB}$) se opaža na početku, odnosno kada su heterotrofnim organizmima dostupni S_B i X_{CB} (interval Δt_1 na grafikonu). Nakon što se u cijelosti potroši organska frakcija S_B , denitrifikacija se nastavlja jedino na topivim organskim tvarima koje su dostupne kroz hidrolizu X_{CB} , odnosno na tzv. biološki sporo razgradivom organskom materijalu (interval Δt_2 na grafikonu). Brzina denitrifikacije ($r_{NO_x, N_2, X_{CB}}$) je dakle ograničena brzinom hidrolize X_{CB} . Kada se organske tvari koje se mogu hidrolizirati u cijelosti potroše, denitrifikacija se može nastaviti na endogenom ugljiku sporijom brzinom ($r_{NO_x, N_2, endo}$) sve dok su nitrat i nitrit još uvijek dostupni.



Slika 3.7 Tipični profili dobiveni testom DEN.CHE.2. Prikazane su koncentracije nitrata tijekom izvođenja testa (●). Prikazane su relevantne brzine od interesa (brzina denitrifikacije na frakcijama biološki lako razgradivog $r_{NO_x, N_2, SB}$, i biološki sporo razgradivog $r_{NO_x, N_2, X_{CB}}$, i brzina endogene denitrifikacije $r_{NO_x, N_2, endo}$). Strelice označuju dodavanje nitrata i otpadne vode. Identificirane su i relevantne varijacije ekvivalenta nitrata ($S_{NO_3/SB,eq}$ na S_B i $S_{NO_3/XCB,eq}$ na X_{CB}).

Linearna regresija $S_{NO_3,Eq}$ u odnosu na vremenske podatke za svaki interval (vidi odjeljak 3.4.2) omogućuje da se izračuna svaka relevantna brzina denitrifikacije (u mg N L⁻¹ min⁻¹). Specifična brzina denitrifikacije (u mg N g VSS⁻¹ h⁻¹) može se izračunati na sljedeći način:

- specifična brzina denitrifikacije na S_B :

$$q_{NO_x, N_2, SB} = 60 \cdot (r_{NO_x, N_2, SB} - r_{NO_x, N_2, endo}) / X_{VSS} \quad 3.39$$

- specifična brzina denitrifikacije na X_{CB} :

$$q_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{XCB}} = 60 \cdot (r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{XCB}} - r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{endo}}) / X_{\text{VSS}} \quad 3.40$$

- specifična brzina endogene denitrifikacije:

$$q_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{endo}} = 60 \cdot (r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{endo}}) / X_{\text{VSS}} \quad 3.41$$

Količina ekvivalenata nitrata koji se potroše na biološki lako ($S_{\text{NO}_3/\text{SB},\text{eq}}$) i sporo ($S_{\text{NO}_3/\text{XCB},\text{eq}}$) razgradivim izvorima ugljika je također prikazana na grafu, a može se procijeniti kako slijedi:

$$S_{\text{NO}_3/\text{SB},\text{eq}} = (r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{SB}} - r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{XCB}}) \cdot \Delta t_1 \quad 3.42$$

$$S_{\text{NO}_3/\text{XCB},\text{eq}} = (r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{XCB}} - r_{\text{NO}_x\text{N}_2,\text{endo}}) \cdot \Delta t_2 \quad 3.43$$

Razmatranjem testiranog volumena otpadne vode, može se konačno procijeniti denitrifikacijski potencijal biološki lako (DP_{SB}) i sporo razgradivih (DP_{XCB}) organskih spojeva:

$$DP_{\text{SB}} = \frac{S_{\text{NO}_3/\text{SB},\text{eq}} \cdot (V_{\text{ML}} + V_{\text{WW}})}{V_{\text{WW}}} \quad 3.44$$

$$DP_{\text{XCB}} = \frac{S_{\text{NO}_3/\text{XCB},\text{eq}} \cdot (V_{\text{ML}} + V_{\text{WW}})}{V_{\text{WW}}} \quad 3.45$$

Test DEN.MAN Denitrifikacijski manometrijski test: procjena kinetičke brzine denitrifikacije

Priprema aktivnog mulja

1. Slijedite 1. korak protokola pripreme aktivnog mulja opisanog za test DEN.CHE.1.
2. Odaberite odgovarajuću količinu aktivnog mulja koja će se uliti u reakcijsku posudu (V_{ML}). U tu svrhu, treba imati na umu da količina nadtlaka izazvanog ispuštanjem plina ovisi o preostalom volumenu plinske faze reaktora (V_{HS}) i o očekivanoj proizvodnji N_2 (količina dušika koja će se denitrificirati) i volumenu plinske faze reaktora (V_{HS}). Prema tome, ispravan odabir ovog omjera je ključan za izbjegavanje ekstremnih tlakova (bilo previsokih ili preniskih). Maksimalni nadtlak će se postići na kraju testa, odnosno kad je sav nitrat denitrificiran, što se opisuje kao:

$$P_{\text{max}} - P_{\text{atm}} = \frac{P_{\text{atm}}}{V_{\text{HS}}} \cdot \frac{M_{\text{N}_2}}{28 \cdot 1,000} \cdot 22.4 \cdot \frac{(273 + T_{\text{C}})}{273} \quad 3.46$$

Pri tome je T_{C} temperatura ($^{\circ}\text{C}$), M_{N_2} je masa plina dušika generiranog denitrifikacijom tijekom testa (mg N), koja ovisi o koncentraciji nitrata ($S_{\text{NO}_3\text{N}_2,\text{Ax}}$, u mg N L^{-1}) i količini aktivnog mulja, kako slijedi:

$$M_{\text{N}_2} = S_{\text{NO}_3\text{N}_2,\text{Ax}} \cdot V_{\text{ML}} \quad 3.47$$

Ubacivanjem ove jednadžbe u prethodnu i preslagivanjem, dobiva se sljedeći odnos:

$$\frac{V_{\text{ML}}}{V_{\text{HS}}} = \frac{P_{\text{max}} - P_{\text{atm}}}{P_{\text{atm}}} \cdot \frac{28}{22.4} \cdot \frac{273}{(273 + T_{\text{C}})} \cdot \frac{1}{\frac{S_{\text{NO}_3\text{N}_2,\text{Ax}}}{1,000}} \quad 3.48$$

Optimalna vrijednost za P_{max} je obično oko 0,2 atm, što znači da se u tipičnim uvjetima ($T_{\text{C}} \sim 20^{\circ}\text{C}$, $S_{\text{NO}_3\text{N}_2,\text{Ax}} \sim 20 \text{ mg N L}^{-1}$), dobiva omjer V_{ML} prema V_{HS} od oko 11. Prema tome, za ukupni volumen reaktora od 1 L, idealni volumen aktivnog mulja koji će se koristiti tijekom testa bit će 0,92 L.

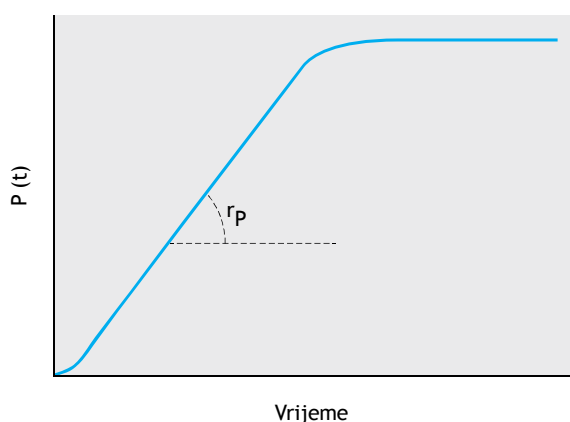
3. Ulijte prethodno izračunatu količinu aktivnog mulja u reakcijsku posudu. Ubacite magnet za miješanje. Dodajte kuglice NaOH u plinsku fazu za adsorpciju CO_2 . Plinsku fazu reaktora otplinite plinom N_2 i čvrsto zatvorite sve otvore bioreaktora. Stavite reaktor u termostatsku komoru i uz nježno miješanje, pričekajte 30 min dok se temperatura ne stabilizira.

Izvođenje testa

1. Odredite volumen otopine nitrata koji treba odjednom dodati kako bi se postigla koncentracija nitrata u aktivnom mulju od 20-25 mg N L⁻¹. Pomoću štrcaljke, ubrizgajte koncentriranu otopinu nitrata kroz gumenu dijafragmu. Odaberite količinu izvora ugljika koja će se odjednom dozirati kako bi se radilo u uvjetima koncentracije izvora ugljika koji nije ni limitirajući ni inhibitoran (vidi 4. korak izvođenja testa DEN.CHE). Potom ubrizgajte otopinu izvora ugljika i pratite vrijeme izvođenja pomoću zapornog sata.
2. Počnite s prikupljanjem podataka s manometra. Prikupljajte podatke svakih 15-30 min ili dok se u krivulji nadtlaka ne opazi točka infleksije, što ukazuje na to da je nitrat iscrpljen.
3. Završite test. Provjerite završni pH i uzmite završni uzorak kako biste izmjerili koncentraciju MLVSS.

Analiza podataka

Tipičan rezultat manometrijskog testa denitrifikacije pomoću manometra s uređajem za bilježenje podataka prikazan je na slici 3.8.



Slika 3.8 Tipičan profil nadtlaka dobiven manometrijskim testom denitrifikacije provedenim pomoću manometra opremljenog uređajem za bilježenje podataka. Grafikon prikazuje maksimalnu brzinu proizvodnje tlaka r_p .

Tijekom prvih 10-15 min, različite se pojave mogu preklapati zbog potencijalnih interferencija kao što su: (i) prodor preostalog kisika koji može zaostati u tekućem dijelu suspenzije, (ii) ravnoteža tlaka vodene pare, (iii) početno akumuliranje N₂ u tekućoj fazi i/ili (iv) mikrobiološke faze stacionarnog rasta. Zbog tog razloga, početne podatke o nadtlaku treba zanemariti. Sljedeći podaci o nadtlaku se mogu koristiti za izračun brzine proizvodnje nadtlaka (r_p , atm min⁻¹) pomoću linearne regresije (vidi odjeljak 3.3.3).

Iz r_p , brzina denitrifikacije ($F_{\text{NO}_3\text{N}_2}$, mg N min⁻¹) se može procijeniti kako slijedi:

$$F_{\text{NO}_3\text{N}_2} = \frac{r_p}{P_{\text{atm}}} \cdot V_{\text{HS}} \cdot \frac{28}{22.4} \cdot \frac{273}{273 + T_C} \quad 3.49$$

P_{atm} se izražava u atm, a V_{HS} u mL.

Na kraju, specifična brzina denitrifikacije $q_{\text{NO}_x\text{N}_2}$ (mg N g VSS⁻¹ h⁻¹) se može izračunati pomoću koncentracije MLVSS u aktivnom mulju (X_{VSS}):

$$q_{\text{NO}_x\text{N}_2} = 60 \cdot F_{\text{NO}_3\text{N}_2} / (V_{\text{ML}} \cdot X_{\text{VSS}}) \quad 3.50$$

Test DEN.TIT Denitrifikacijski titrimetrijski test: procjena kinetičke brzine denitrifikacije

Priprema aktivnog mulja

Za konvencionalne uzorke aktivnog mulja iz uređaja za obradu komunalne otpadne vode, bit će prikladan uzorak s X_{VSS} od oko 2-4 g VSS L⁻¹. Uzorak treba uzeti na ispustu ili kraju bazena za primarnu denitrifikaciju ili naknadnu denitrifikaciju, ovisno o ciljanoj dionici obrade.

1. Ulijte poznati volumen uzorka aktivnog mulja (obično 1 L) u reakcijsku posudu i pokrenite sustave za kontrolu temperature. Odaberite željene vrijednosti pH i temperature.
2. Pokrenite sustav automatske titracije i ostavite aktivni mulj u takvim uvjetima u razdoblju predinkubacije (idealno 1 h). Faza predinkubacije će potaknuti potrošnju preostalog nitrata ili nitrita iz uređaja.

Izvođenje testa

1. Pokrenite bilježenje podataka.
2. Dodajte koncentriranu otopinu nitrata (nakon što ste njezinu temperaturu prilagodili ciljanoj temperaturi testa) kako bi se postigla neograničavajuća koncentracija nitrata u aktivnom mulju (prikladne vrijednosti su obično između 10 i 20 mg N L⁻¹) i otopinu S_B u koncentraciji koja je niti ograničavajuća niti inhibirajuća. Napominjemo da mora biti poznata količina dodanog nitrata (M_{NO_x,ini} u mg N). Kako bi se ocijenila odgovarajuća količina S_B, može se koristiti stehiometrijski odnos između količine S_B i potrošenog nitrata, što se može izračunati kako slijedi:

$$Y_{\text{NO}_3\text{-SB,Ax}} = \frac{2.86}{1 - Y_{\text{OHO,Ax}}} \quad (\text{g COD g N}^{-1}) \quad 3.35$$

Napominjemo da se ista vrsta testa može provesti koristeći nitrit umjesto nitrata. U tom slučaju, treba koristiti sljedeći odnos:

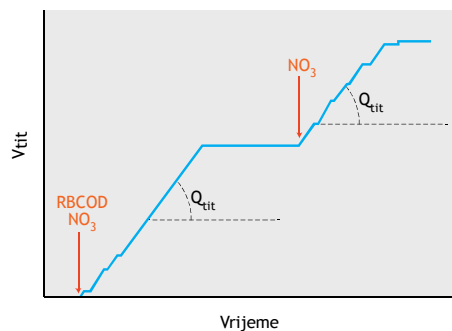
$$Y_{\text{NO}_2\text{-SB,Ax}} = \frac{1.71}{1 - Y_{\text{OHO,Ax}}} \quad (\text{g COD g N}^{-1}) \quad 3.51$$

Dodavanje S_B se stoga može kalibrirati kako bi se zajamčilo da je omjer S_B prema nitratu (ili nitritu) barem 3-4 puta veći od gore navedene stehiometrijske vrijednosti. Napominjemo da Y_{HD} ovisi o izvoru ugljika. Ipak, za grubu se procjenu obično može koristiti vrijednost od 0,5. To znači da dodavanje S_B treba kalibrirati kako bi se osigurala koncentracija S_B u aktivnom mulju od 350 mg COD L⁻¹ kada se koristi nitrat, odnosno 200 mg COD L⁻¹ kada se koristi nitrit. Nakon tih dodavanja, denitrificirajuće bakterije će postati aktivne, a njihova aktivnost će obično povećati pH. Automatski sustav titracije će reagirati da se smanji pH kako bi se održala kontrolna vrijednost pH kroz dodavanje kiseline.

3. Zabilježite volumen titracijske otopine dodane kroz vrijeme (V_{tit} u odnosu na vrijeme). Provjerite ostaje li pH vrijednost unutar intervala željene vrijednosti pH ± 0,02. Koncentracija DO treba biti ispod granice detekcije. Nastavite s testom dok se na grafikonu titracijske otopine ne opazi jasna točka infleksije. Ta točka ukazuje da je nitrat u cijelosti potrošen, zbog čega se denitrifikacija zaustavila. Prikupljeni podaci bi trebali biti dovoljni da se pouzdano procijeni brzina titracije (Q_{tit}) iz linearne regresije V_{tit} u odnosu na vrijeme sa zadovoljavajućim koeficijenom determinacije (obično R² > 0,98).
4. 3. se korak može ponoviti dodavanjem još jedne doze nitrata. Dodavanje S_B više nije potrebno budući da je u aktivnom mulju prisutna dovoljna rezidualna koncentracija za drugu fazu denitrifikacije.
5. Završite test u skladu s uputama iz 4. koraka procedure opisane za provođenje testa NIT.TIT.1.

Analiza podataka

Tipičan trend u nakupljenom volumenu titracijske otopine dodane tijekom testa prikazan je na slici 3.9.



Slika 3.9 Primjer pH-statične titracijske krivulje tijekom denitrifikacijskog testa i svrhu procjene maksimalne brzine denitrifikacije. Strelice označavaju dodavanje otopina nitrata i S_B. Na grafikonu je prikazana i relevantna brzina titracije.

Iz podataka (V_{tit} u odnosu na vremenske podatke) se mogu izračunati brzine titracije (Q_{tit}) na temelju nagiba titracijske krivulje (vidi odjeljak 3.3).

$Y_{NO_3_H^+,Ax}$, u g N mol protona⁻¹ se može procijeniti analiziranjem volumena dodane titracijske otopine sve dok se ne opazi plato titracijske otopine (V_T na slici 3.9) i masa dodanog nitrata (ili nitrita) ($M_{NOx,ini}$):

$$Y_{NO_3_H^+,Ax} = \frac{M_{NOx,ini}}{V_T \cdot N_T} \quad 3.52$$

N_T je normalitet titracijske otopine. Kada se provede više od jednog dodavanja nitrata (kao u slučaju prikazanom na slici 3.9), izračun se može ponoviti po svakom dodatku, a srednja vrijednost se može uzeti kao procjena $Y_{NO_3_H^+,Ax}$.

Brzina titracije (Q_{tit} u mL min⁻¹) se može koristiti za procjenu brzine denitrifikacije ($F_{NO_3_H^+,Ax}$ u mg N min⁻¹) uzimajući u obzir koncentraciju titracijske otopine (N_T) i vrijednost $Y_{NO_3_H^+,Ax}$:

$$F_{NO_3_H^+,Ax} = Q_{tit} \cdot N_T \cdot Y_{NO_3_H^+,Ax} \quad 3.53$$

Na kraju, maksimalna specifična brzina denitrifikacije mulja ($q_{NOx_N_2}$, u mg N g VSS⁻¹ h⁻¹) se izračunava uzimajući u obzir koncentraciju MLVSS u uzorku mulja (u g VSS L⁻¹) i volumen suspenzije procijenjen na kraju testa (u L):

$$q_{NOx_N_2} = 60 \cdot F_{NO_3_H^+,Ax} / (V_{ML} \cdot X_{VSS}) \quad 3.54$$

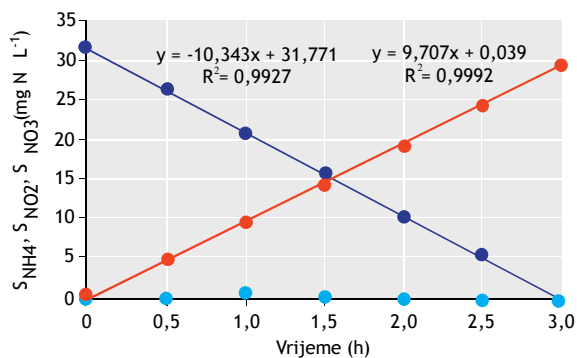
3.10 Primjeri

3.10.1 Nitrifikacijski šaržni test aktivnosti

Opis

Kako bi se ilustriralo izvođenje aerobnog šaržnog testa aktivnosti za nitrifikaciju, u ovom se dijelu predstavljaju podaci iz testa provedenog pri 20°C s uzorkom aktivnog mulja iz gradskih uređaja. Test NIT.CHE.1 je proveden kako bi se odredila maksimalna specifična brzina oksidacije amonija. Šaržni test aktivnosti je proveden koristeći reaktor od 2,5 L. Sva oprema, uređaji i materijali su pripremljeni kako je opisano u odjeljku 3.4.1. Senzori za pH i DO su kalibrirani manje od 24 h prije izvođenja testa. Šaržni je test trajao 3 h. Uključujući vrijeme potrebno za pripremu testa i fazu čišćenja nakon testa, operacije su trajale otprilike 5 h. Prije šaržnog testa, 2,0 L svježeg aktivnog mulja uzetog na kraju aerobne faze gradskih uređaja (u skladu s odjeljkom 3.3.4) prebačene su u reaktor i aklimatizirane 1 h pri 20 °C uz sporo miješanje (100 rpm) slijedom preporuka opisanih u odjeljku 3.3.5. Kontrola pH i DO je pokrenuta pri zadanoj vrijednosti pH od 7,5 odnosno DO 6 mg O₂ L⁻¹. Nakon toga, 15 min prije početka testa, miješanje je ubrzano na 200 rpm i uzeti su uzorci kako bi se odredili parametri od interesa (npr. koncentracije amonija, nitrita, nitrata i MLVSS). Prije dodavanja sintetičkog medija, njegova je temperatura prilagođena u vodenoj kupki na ciljanu temperaturu šaržnog testa (20 °C). Prvi uzorak je uzet 5 minuta prije dodavanja sintetičkog medija kako bi se odredili početni uvjeti. Test je započeo dodavanjem sintetičkog medija (nulta minuta): 50 mL je sadržavalo 1 g NH₄-N L⁻¹ kao i ostale makro- i mikro-nutrijente opisane u odjeljku 3.3.6. Uzorci su uzimani svakih 30 min u razdoblju od 3 h. Trajanje šaržnog testa je odabrano kako bi se omogućila potpuna oksidacija prisutnog amonija. Odmah nakon uzorkovanja, svi uzorci su pripremljeni i sačuvani kako je opisano u odjeljku 2.3.4. Svi uzeti uzorci su analizirani kako je opisano u odjeljku 3.3.7. U tablici 3.5 prikazan je eksperimentalni plan provedbe i rezultati izvođenja testa.

Slijedom rezultata iz eksperimenta prikazanih u tablici 3.5, na slici 3.12 prikazani su rezultati testa kao i procjena maksimalnih volumetrijskih brzina (pomoću linearne regresije).



Slika 3.12 Grafički prikaz koncentracija amonija (●), nitrita (●) i nitrata (●) dobivenih u primjeru nitrifikacijskog šaržnog testa aktivnosti (Test NIT.CHE.1). Test je proveden s aktivnim muljem iz gradskih uređaja pri 20 °C i pH 7,5 koristeći sintetički medij kao influent.

Tablica 3.5 Rezultati nitrifikacijskog šaržnog testa aktivnosti.

Nitrifikacijski šaržni test aktivnosti										Oznaka: NIT.CHE.1	
Datum:	Ponedjeljak 05.10.2015. 10:00 h									Eksperimentalna procedura u kratkim crtama:	Vrijeme (h:min)
Opis:	Nitrifikacijski test pri 20 °C s pravim aktivnim muljem									1. Potvrditi dostupnost materijala za uzorkovanje i potrebne opreme.	08:00
Test br.:	1									2. Potvrditi kalibriranost i funkcionalnost sustava, mjerača i senzora.	08:10
Trajanje	3 h (180 min)									3. Prebaciti 2,0 L mulja u šaržni reaktor.	08:30
Supstrat:	Sintetički: amonij i nitrit (1.000 mg L ⁻¹) + minerali									4. Pokrenuti aerobne uvjete pomoću nježnog miješanja i upuhivanja plina pri zadanoj T i pH.	08:40
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u									5. 15 min prije početka uzeti uzorak radi određivanja početnog stanja.	09:40
Uzorak br.:	NIT.CHE 1-8									7. Započeti šaržni test: dodati 0,05 L sintetičkog influenta.	09:55
Ukupan volumen uzorka:	80 mL									8. Uzeti prvi uzorak radi određivanja početnog stanja (nulta minuta)	10:00
	(5 mL normalni uzorak, 20 mL za MLVSS)									9. 30. minuta: nastaviti s programom uzorkovanja u skladu s planom provođenja	10:30
Volumen reaktora:	2,5 L									10. 180. minuta: zaustaviti aeraciju i miješanje.	13:00
										11. Organizirati uzorke i očistiti sustav.	13:10
										12. Provjeriti jesu li svi sustavi isključeni.	13:20
Plan provođenja uzorkovanja											
Vrijeme (min)	-15	-5	0	30	60	90	120	150	180		
Vrijeme (h)	-0.25	-0.08	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00		
Uzorak br.	1		2	3	4	5	6	7	8		
Parametar	AEROBNA FAZA										
NH ₄ -N (mg N L ⁻¹)	6.8		31	27.3	20.6	17.2	12.4	4.9	0.4		
NO ₂ -N (mg N L ⁻¹)	0 ¹		0	0.4	0.9	0.6	0.3	0.4	0.1		
NO ₃ -N (mg N L ⁻¹)	0.1		0.1	5.1	9.8	14.2	19.4	24	29.6		
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)	Vidi tablicu									Vidi tablicu	
¹ Prosječna vrijednost koncentracije prisutne u sintetičkom supstratu i tekućoj fazi uzorka mulja prije početka testa											
Mjerenja MLSS i MLVSS											
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer		
Početak testa ²	1	0.09630	0.16530	0.10210	0.06900	0.06320	3,450	3,160	0.92		
	2	0.09580	0.16380	0.10190	0.06800	0.06190	3,400	3,095	0.91		
	3	0.09640	0.16440	0.10230	0.06800	0.06210	3,400	3,105	0.91		
						Prosjeck	3,417	3,120	0.91		
Kraj testa	4	0.09540	0.16490	0.10200	0.06950	0.06290	3,475	3,145	0.91		
	5	0.09610	0.16410	0.10180	0.06800	0.06230	3,400	3,115	0.92		
	6	0.09570	0.16400	0.10220	0.06830	0.06180	3,415	3,090	0.90		
						Prosjeck	3,430	3,117	0.91		
² Koncentracije su korigirane u odnosu na razrjeđenje zbog dodavanja sintetičkog medija.											
Sastav biomase											
Točka uzorkovanja	početak testa	Kraj testa									
MLSS (mg L ⁻¹)	3,417	3,430									
MLVSS (mg L ⁻¹)	3,120	3,117									
Omjer	0.91	0.91									
Pepeo (mg L ⁻¹)	297	313									

Maksimalna volumetrijska brzina uklanjanja amonija iznosi $10,3 \text{ mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a za proizvodnju nitrata $9,7 \text{ mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Uzimajući u obzir prosječnu koncentraciju MLVSS od $3,1 \text{ g L}^{-1}$ između uzoraka mulja uzetih na početku i na kraju testa, može se procijeniti specifična brzina oksidacije amonija od $3,3 \text{ mg N g VSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, što odgovara oko $80 \text{ mg N g VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Važno je primijetiti da je zbroj topivih spojeva anorganskog dušika na početku i na kraju šaržnog testa usporediv ($31,1$ nasuprot $30,1 \text{ mg N L}^{-1}$), što ukazuje na to da je nitrifikacija bila dominantni proces tijekom šaržnog testa. Dvije linije trenda pokazuju brzinu konverzije amonija i proizvodnje nitrata za daljnju procjenu odgovarajućih maksimalnih specifičnih brzina. Smanjivanje u zbroju koncentracija amonija, nitrita i nitrata bi sugeriralo simultanu pojavu procesa uklanjanja dušika kao što su denitrifikacija i ANAMMOX, koji se mogu odvijati u prisutnosti anoksičnih uvjeta. Usporedive brzine oksidacije amonija i proizvodnje nitrata ukazuju na to da su, u testiranom mulju, aktivnosti AOO i NOO dobro uravnotežene i da im je omogućeno postizanje pune nitrifikacije. Ta opažanja je potkrijepio i izostanak nitrita. Izmjerena specifična brzina oksidacije amonija je usporediva s brzinama navedenima u tablici 3.1, što ukazuje na velik udio nitrificirajućih bakterija u testiranom uzorku aktivnog mulja.

3.10.2 Denitrifikacijski šaržni test aktivnosti

Opis

U ovom se dijelu opisuje test kojim se ocjenjuje maksimalna brzina denitrifikacije i anoksični prirast u prisustvu acetata kao izvora ugljika.

Korišten je zrakonepropusni reaktor opremljen mehaničkim sustavom miješanja i automatskim sustavima kontrole pH i temperature. Osigurano je i propuhivanje plinom N_2 .

Dan prije testiranja, sonde za pH i DO su kalibrirane i svi potrebni materijali su pripremljeni kako je predloženo u odjeljku 2.3.2 (uz iznimku 7. i 8. točke). Pripremljeno je 10 g N L^{-1} nitratne otopine pomoću NaNO_3 i koncentrirana otopina acetata pomoću natrijevog acetata u koncentraciji od 10 g COD L^{-1} (vodeći računa da $1 \text{ g CH}_3\text{COONa}$ odgovara $0,78 \text{ g COD}$). 1 M otopine HCL i 1 M otopine NaOH su pripremljene za automatsku korekciju pH. Nadalje, korištene su 2 L mulja. Definiran je preliminarni plan rada prikazan u tablici 3.6.

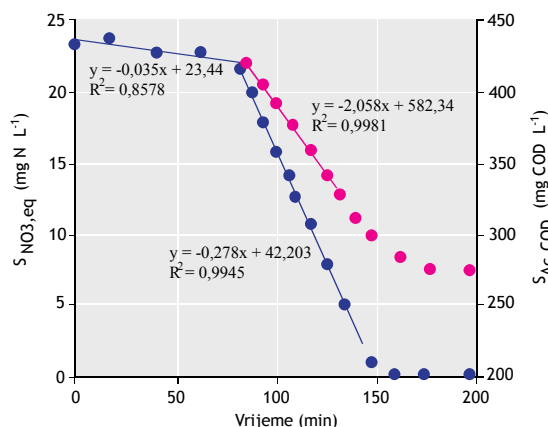
Tablica 3.6 Rezultati denitrifikacijskog šaržnog testa aktivnosti.

Denitrifikacijski šaržni test aktivnosti											Oznaka: DEN.CHE.1	
Datum:	Srijeda 02.09.2015. 9:00 h					Ekperimentalna procedura u kratkim crtama:					Vrijeme (h:min)	
Opis:	Test pri 20 °C, pH 7, s umjetnim supstratom i obogaćenom laboratorijskom kulturom (aktivnim muljem)					1. Dan prije testiranja provjereni instrumenti, kalibrirane sonde, pripremljen plan rada, radne otopine, spremnici za prikupljanje uzoraka i svi ostali materijali.						
Test br.:	1					2. Uzet mulj iz SBR-a i prebačen u reakcijsku posudu.					09:00	
Trajanje	3,5 h (210 min)					3. Pokretanje otplinjavanja plinom N ₂ .					09:05	
Supstrat:	Sintetički: Acetat (200 mgCOD/L) + nitrat (20 mgN/L)					4. Dodavanje nitrata, uzet prvi uzorak.					09:10	
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u					5. Ostalih 5 uzoraka uzeto u razmacima od 20 min.						
Uzorci br.:	DEN.CHE.1 (1-18)					6. Dodavanje acetata i uzorkovanje.					10:30	
Ukupan volumen uzorka:	240 mL					7. Ostalih 13 uzoraka uzeto u razmacima 5/10 min.						
	(10 mL za MLVSS te 10 mL za svaki uzorak)					8. Test zaustavljen.					11:35	
Volumen reaktora:	2,5 L					9. Uzet uzorak za mjerenje MLVSS, procjena ukupnog volumena.					11:40	
						10. Provjeriti jesu li svi uzorci ispravno uskladišteni i isključiti sustav.					11:50	
Plan provođenja uzorkovanja												
Vrijeme (min)	0	20	40	60	80	85	90	95	100	105	110	120
Vrijeme (h)	0.00	0.33	0.67	1.00	1.33	1.42	1.50	1.58	1.67	1.75	1.83	2.00
Uzorak br.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parametar	ANOKSIČNA FAZA											
NO ₃ -N (mg N L ⁻¹)	23.0	23.2	22.0	21.8	20.2	18.2	15.8	14.0	12.3	11.2	10.2	7.3
NO ₂ -N (mg N L ⁻¹)	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	1.0	2.0	2.5	2.8	3.0	3.0	2.7
COD _{soluble} (mg COD L ⁻¹)					418.0	407.3	397.3	385.8	378.0	366.5	353.7	336.5
Plan provođenja uzorkovanja (nastavak)												
Vrijeme (min)	130	140	150	160	180	185						
Vrijeme (h)	2.17	2.33	2.50	2.67	3.00	3.08						
Uzorak br.	13	14	15	16	17	18						
Parametar	ANOKSIČNA FAZA											
NO ₃ -N (mg N L ⁻¹)	4.9	1.8	0.3	0.0	0.0							
NO ₂ -N (mg N L ⁻¹)	2.0	2.1	1.5	1.0	0.0							
COD _{soluble} (mg COD L ⁻¹)	315.0	303.6	285.7	275.0	271.4							
MLSS (g L ⁻¹)						2.51						
Ukupna biomasa (gVSS)	4.58											
r _{D,end} (mg N L ⁻¹ min ⁻¹)	0.035											
r _{D,exog} (mg N L ⁻¹ min ⁻¹)	0.278											
r _{COD} (mg COD L ⁻¹ min ⁻¹)	2.050											
Anoksični prirast	0.660											
Brzina denitrifikacije (mg N g MLVSS ⁻¹ h ⁻¹)	6.600											

Početna koncentracija nitrata postavljena je na 20 mg N-NO₃ L⁻¹ (što odgovara dodavanju 4 mL koncentrirane otopine nitrata). Početna koncentracija COD postavljena je na 200 mg L⁻¹ (dodavanje 40 mL koncentrirane otopine acetata). U skladu s uputama navedenima u odjeljku 3.7, planiralo se uzeti do 18 uzoraka. Svi odgovarajući materijali i potrošna roba (npr. plastične čašice) su pripremljeni i označeni kako bi se izbjegle greške u identifikaciji za vrijeme uzimanja uzoraka. Na dan testa, aktivni je mulj uzorkovan iz pilot SBR uređaja na kraju njegove denitrifikacijske faze. Dvije litre aktivnog mulja su prebačene u reakcijsku posudu, i pokrenut je sustav održavanja temperature na 20 °C, slično radnoj temperaturi pilot SBR uređaja. Istovremeno, pokrenut je sustav kontrole pH uz zadanu vrijednost 7,4. Početni pH bio je 7,7. Uključen je sustav otplinjavanja plinom N₂ kako bi se uklonio sav preostali DO i osigurali anoksični uvjeti nakon dodavanja nitrata. Nakon 5 min, koncentracija S_{O2} u tekućem dijelu suspenzije bila je ispod granice detekcije sonde i otplinjavanje plinom N₂ je isključeno. Unaprijed definirani volumen koncentrirane otopine nitrata je odjednom dodana kroz otvor za uzorkovanje. Nakon otprilike 1 min, pokrenut je zaporni sat i uzet je prvi uzorak (nulta minuta). Još četiri uzorka su uzeta u razmacima od 20 min kako bi se procijenila brzina endogene denitrifikacije. Nakon toga, dodana je koncentrirana otopina COD i nakon 30 sekundi uzet je uzorak. Zatim je uzeto 6 uzoraka u razmacima od 5 min, nakon čega su uzorci uzeti svakih 10 min. Uzorkovanje je nastavljeno, pri čemu su profili nitrata i nitrita neprekidno praćeni pomoću indikatorskih papirića za detekciju NO₃ i NO₂, sve dok nitrat i nitrit nisu u cijelosti potrošeni. Uzeti su uzorci korišteni za procjenu koncentracije nitrata, nitrita i topivog COD. Test je završio nakon 180 min. Jedan završni uzorak je uzet kako bi se procijenila koncentracija MLVSS. Na kraju, svi sustavi su zaustavljeni i reaktor je otvoren kako bi se izmjerila završna količina aktivnog mulja. Svi uzorci su prikupljeni i čuvani kako je opisano u odjeljku 2.3.4. Svi prikupljeni uzorci su analizirani kako je opisano u 3.3.7.

Analiza podataka

Relevantni podaci o provedbi i rezultati analitičkih određivanja prikazani su u tablici 3.6. Na slici 3.13 su grafički prikazani trendovi COD i $S_{NO_3,Eq}$ (izračunato kao $S_{NO_3,Eq} = S_{NO_3} + 0.6 \cdot S_{NO_2}$). Kako je prikazano na slici 3.13, brzine endogene i egzogene denitrifikacije su procijenjene pomoću linearne regresije ($r_{NOx_N_2,exo}$ i $r_{NOx_N_2,endo}$ u $mg\ N\ L^{-1}\ min^{-1}$), kao i brzina egzogene potrošnje COD (r_{COD} , u $mg\ COD\ L^{-1}\ min^{-1}$). Napominjemo da su za određivanje kinetičkih brzina korišteni jedino podaci dobiveni u denitrifikacijskoj fazi u uvjetima bez ograničenja supstratom. Na primjer, samo oni podaci koji su pokazali najveću linearnost na temelju najveće vrijednosti R^2 , i za $N-NO_{eq}$ i topivi COD.



Slika 3.13 Grafički prikaz koncentracija (●) $N-NO_{eq}$ i (●) topivog COD dobivenih testom DEN.CHE.1 (kako je predstavljen u tablici 3.6). Test je proveden koristeći uzorak aktivnog mulja iz SBR koji radi pri $20\ ^\circ C$ i pH 7,5 i acetat kao izvor ugljika. Nagibi linija trendova su korišteni za kvantificiranje brzine endogene, egzogene denitrifikacije i brzine apsorpcije organskog ugljika.

Prema tome, maksimalne brzine se mogu odrediti kao:

- Maksimalna specifična brzina denitrifikacije:

$$q_{NOx_N_2} = 60 \cdot \frac{r_{NOx_N_2,exo} - r_{NOx_N_2,endo}}{X_{VSS}} \quad 3.55$$
$$= 60 \cdot \frac{0.28 - 0.035}{2.51} = 5.8\ mg\ N\ g\ VSS^{-1}\ h^{-1}$$

- Anoksični prirast na acetatu:

$$Y_{OHO,Ax} = 1 - 2.86 \cdot \frac{r_{NOx_N_2,exo} - r_{NOx_N_2,endo}}{r_{COD}} \quad 3.56$$
$$= 1 - 2.86 \cdot \frac{0.28 - 0.035}{2.05}$$
$$= 0.66\ g\ COD_{biomass}\ g\ COD_{acetate}^{-1}$$

Objekti dobivene vrijednosti su u rasponu podataka navedenih u tablici 3.2, što potkrepljuje pouzdanost rezultata.

3.11 Dodatna razmatranja

3.11.1 Prisutnost ostalih organizama

Prisutnost drugih mikroorganizama koji ne provode biološke konverzije koje se istražuju može izmijeniti rezultate šaržnih testova, što dovodi do potcjenjivanja ili precjenjivanja kinetike i stehiometrijskih parametara od interesa.

U nitrifikacijskim šaržnim testovima aktivnosti, istovremena pojava denitrifikacijske i/ili ANAMMOX aktivnosti može dovesti do krive procjene uklanjanja nitrata i/ili proizvodnje nitrata.

Međutim, budući da oba ta biološka procesa zahtijevaju anoksične uvjete, dovoljno je osigurati potpuni prodor kisika u biomasu. I dok se 3-4 mg O₂ L⁻¹ smatraju dovoljnim za osiguravanje potpuno aerobnih uvjeta kod testiranja uzoraka flokuliranog i suspendiranog mulja, veće koncentracije kisika bi mogle biti potrebne kad se ocjenjuje aktivnost nitrifikacijskog biofilma. Važno je primijetiti da kada se šaržni test provodi u prisutnosti COD, aerobno uklanjanje COD koje provode heterotrofni mikroorganizmi bi dodatno smanjilo prodor kisika u biofilm, što bi pridonijelo formiranju neželjenih anoksičnih zona (ako kisik postane ograničavajući).

U denitrifikacijskim šaržnim testovima aktivnosti, istovremena pojava ANAMMOX aktivnosti može dovesti do precjenjivanja kinetike redukcije nitrita i/ili potcjenjivanja kinetike redukcije nitrata. Kako bi se to izbjeglo, šaržni test treba provesti u uvjetima ograničenja amonijem. Važno je primijetiti da amonij prisutan tijekom šaržnog testa aktivnosti treba svakako biti dovoljan da se podrže potrebe denitrificirajućih bakterija za izvorom N, što se može izračunati unaprijed. Kada je cilj šaržnog testa ocijeniti utjecaj određenog izvora ugljika na kinetiku denitrifikacije, istovremena pojava procesa denitrifikacije koji provode mikroorganizmi koji mogu pohraniti COD unutar stanica (npr. PAO i GAO) može dovesti do netočnih opažanja. U tom slučaju, razdoblje aeracije prije izvođenja šaržnog testa može se koristiti kako bi se u cijelosti uklonio unutarstanično pohranjen COD prisutan u biomasu.

3.11.2 Manjak esencijalnih mikro- i makro-nutrijenata

Premda to može djelovati trivijalno, prisutnost makro- i mikro-nutrijenata u pravoj koncentraciji i (biološka) dostupnost neophodna je za biološke procese uključene u uklanjanje dušika u sustavima s aktivnim muljem kao što su procesi nitrifikacije i denitrifikacije opisani u ovom izvješću. Makro- i mikro-nutrijenti su obično prisutni u većini komunalnih otpadnih voda, ali njihovu prisutnost treba provjeriti i potvrditi, naročito ako proučavani uređaj za obradu otpadne vode redovno zaprima industrijske efluente. Zbog slabog prirasta autotrofnih mikroorganizama kao što su nitrifikatori, manjak makro-nutrijenata nije tako čest kod obrade komunalne otpadne vode. Ipak, tome treba posvetiti pozornost kada se ti biološki procesi primjenjuju na obradu industrijskih otpadnih voda i općenito za visoko onečišćene otpadne vode. U tu svrhu, može se provesti jednostavna procjena potreba biomase za nutrijentima kao funkcija opterećenja dušikom koji treba obraditi i to usporediti s koncentracijama nutrijenata u influentu kako bi se procijenilo je li potrebno vanjsko dodavanje kako bi se podržale potrebe za biološkim rastom i brzina konverzije.

3.11.3 Učinci toksičnosti ili inhibicije

Utvrđeno je da je nekoliko spojeva toksično ili inhibitorno za bakterijske zajednice koje provode procese nitrifikacije i denitrifikacije. Budući da OHO koji mogu provesti denitrifikaciju u sustavima s aktivnim muljem ima u obilju, oni se mogu aklimatizirati i prilagoditi različitim okolišnim i radnim uvjetima i čak izdržati prisutnost različitih potencijalno toksičnih ili inhibitornih spojeva. S druge strane, autotrofne bakterije koje kataliziraju procese nitrifikacije su sklonije problemima inhibicije i toksičnosti. Popis spojeva i raspona koncentracija koje mogu biti toksične ili inhibitorne za nitrificirajuće bakterije je toliko dugačak i složen da treba pogledati specifičnu literaturu. Unatoč činjenici da se mikrobne zajednice također mogu aklimatizirati i prilagoditi uvjetima lošijima od optimalnih, inhibitorni učinci određenih spojeva mogu dovesti do mikrobne aktivnosti lošije od optimalne i na kraju do neuspjeha biološkog procesa. Kako bi se ocijenio inhibitorni učinak određenog spoja ili određene otpadne vode na aktivnost nitrifikacije i denitrifikacije, može se provesti niz šaržnih testova aktivnosti kako je opisano u ovom izvješću. Usporedba između aktivnosti izmjerene u prisutnosti ili odsustvu različitih koncentracija potencijalnih inhibitornih spojeva može dati korisne naznake o inhibitornom potencijalu takvih spojeva u odnosu na određeni testirani aktivni mulj. Slično tome, kada se sumnja da otpadna voda koja se koristi za izvođenje testova ima ili generira inhibitorni učinak na određeni biološki proces, mogu se provesti dva niza šaržnih testova aktivnosti: jedan s originalnim aktivnim muljem, a drugi s istom biomasom, ali ispran u mineralnoj otopini kako bi se uklonili potencijalno inhibitorni ili toksični spojevi. Ipak, važno je napomenuti da takav pristup može biti uspješan jedino ako su inhibirajući učinci otpadne vode koja će se testirati (brzo) povrativi.

3.11.4 Učinci izvora ugljika na denitrifikaciju

Dobro je poznato da kinetika denitrifikacije ovisi o izvorima ugljika koji se koriste kao donori elektrona (e.g. Mokhayeri i sur., 2006, 2008). Za redovno praćenje denitrifikacijskog potencijala aktivnog mulja, korištenje sintetičkog medija koji sadrži S_B kao što su VFA može biti dovoljno za zadovoljavajuću ocjenu denitrifikacijske aktivnosti (kako je prikazano u ovom izvješću). Korištenje i primjena složenijih izvora COD, koji nesumnjivo mogu biti prisutni u sirovoj ili istaloženoj komunalnoj otpadnoj vodi, može dovesti do denitrifikacijske aktivnosti koja je lošija od optimalne. Kada su vanjski izvori COD potrebni za poboljšano uklanjanje dušika (npr. u postdenitrifikacijskoj jedinici), metode opisane u ovom izvješću mogu se koristiti da se ocijeni utjecaj različitih izvora COD na denitrifikacijsku kinetiku uzorka aktivnog mulja. oboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR) može se provesti u sustavima obrade otpadne vode s aktivnim muljem uvođenjem anaerobne faze na početku linije obrade otpadne vode. Visoka učinkovitost uklanjanja P, niži operativni troškovi, manja proizvodnja mulja i potencijalni povrat fosfora pridonijeli su primjeni i popularnosti tog procesa (Mino i sur., 1998; Henze i sur., 2008; Oehmen i sur., 2007). EBPR provode organizmi koji akumuliraju fosfor (polifosfat) (PAO) (Comeau i sur., 1987; Mino i sur., 1998) koji, unutarstaničnom akumulacijom polifosfata (poli-P), mogu ukloniti veće količine fosfora (0,35-0,38 g P g VSS⁻¹ PAO) nego obični heterotrofni organizmi (OHO) (0,03 g P g VSS⁻¹ OHO) (Wentzel i sur., 2008). Znanstvene, mikrobiološke i tehničke karakteristike procesa EBPR su u fokusu istraživanja koja su u zadnjih nekoliko desetljeća provodile različite istraživačke skupine (Wentzel i sur., 1986, 1987; Comeau i sur., 1986, 1987; Smolders i sur., 1994a,b; Mino i sur., 1987, 1998; Oehmen i sur., 2005a, 2005c, 20i306, 2007; Nielsen i sur., 2010). Konkretno, napori su usmjereni na razvijanje boljeg razumijevanja stvarnih metaboličkih mehanizama EBPR kako bi se utvrdio mikrobnii identitet uključenih organizama i optimizirale potrebne konfiguracije procesa, a sve kako bi se unaprijedila i povećala učinkovitost i pouzdanost procesa EBPR.

PAO su heterotrofni organizmi. Međutim, za razliku od OHO, PAO posjeduju jedinstvenu sposobnost korištenja unutarstanično pohranjenog poli-P za proizvodnju potrebne energije (adenozin trifosfat, ATP) u anaerobnim uvjetima radi pohrane biološki lako razgradive organske tvari (RBCOD), kao što su hlapive masne kiseline (VFA) poput acetata (Ac) i propionata (Pr), kao unutarstanične poli- β -hidroksi-alkanoate (PHA). Pohranjeni PHA se kasnije koriste u anoksičnim ili aerobnim uvjetima za poboljšano apsorpiranje fosfora, sintezu glikogena, rast i održavanje biomase. Zbog takvog svojstva PAO imaju prednost pred ostalim mikrobnim populacijama od značaja. Na taj se način PAO mogu namnožiti kako bi se postiglo EBPR recikliranjem aktivnog mulja kroz izmjenu anaerobne i anoksične ili aerobne faze, uz istovremeno usmjeravanje influenta koji je obično bogat hlapivim masnim kiselinama prema anaerobnoj fazi.

4. Smjernice za provođenje laboratorijskih eksperimenata za biološko uklanjanje organske tvari (KPK) iz otpadnih voda i respirometriju

4.1 Opis procesa

U konvencionalnim sustavima obrade otpadne vode s aerobnim uklanjanjem organske tvari, obični heterotrofni organizmi (OHO) uklanjanju organske tvari prisutne u otpadnoj vodi kako bi proizveli više biomase koristeći kisik za respiraciju. S metaboličkog gledišta, proces uklanjanja uključuje anabolički (za sintezu stanica) i katabolički proces (za proizvodnju energije potrebne za sintezu stanica). U anaboličkom procesu, OHO dobivaju ugljik potreban za rast stanica iz organske tvari prisutne u otpadnoj vodi. U međuvremenu, u kataboličkom procesu, odvija se oksidacijsko-redukcijska reakcija koja uključuje prijenos elektrona iz organske tvari (koja služi kao donorelektrona) kisiku (akceptor elektrona), čime se proizvodi energija potrebna za sintezu stanica. Međutim, zbog prilično raznolike mješavine biološki razgradivih i nerazgradivih organskih spojeva prisutnih u otpadnoj vodi, COD se obično koristi za procjenu njihove ukupne koncentracije. Tome je većinom tako jer se korištenje COD preferira pred ostalim analitičkim parametrima (kao što je biokemijska potrošnja kisika: BOD₅ ili ukupan organski ugljik: TOC) zbog nekoliko prednosti. One uključuju (Henze i sur., 1997; Henze i Comeau, 2008): (i) određivanje ekvivalenta kisika (ili kapaciteta za predaju elektrona) organskih spojeva, (ii) detaljnije i korisnije određivanje organske tvari zbog mogućnosti mjerenja svih razgradivih i nerazgradivih organskih tvari, (iii) potencijal da se bilanca organskih tvari zaključi na temelju COD (kao posljedica prethodnih dviju prednosti), kao i praktične implikacije kao što su (iv) brza analiza (tj. nekoliko sati u odnosu na 5 dana potrebnih za BOD₅). Općenito uzevši, točna stehiometrija uključena u aerobno uklanjanje organskih tvari nije jednostavna. Ipak, sljedeća jednadžba za aerobnu potrošnju glukoze (C₆H₁₂O₆) (koja zanemaruje većinu nutrijenata osim dušika) može se koristiti kako bi se ilustrirao biološki proces aerobnog uklanjanja (Metcalf i Eddy, 2003):



C₅H₇NO₂ je pojednostavljena formula novo stvorenih stanica u aerobnoj razgradnji organskih tvari (Hoover i Porges, 1952).

S gledišta mikrobnog rasta, oko ⅔ biološki razgradivih organskih tvari (iz čega slijedi tzv. teoretski stehiometrijski aerobni prirast, Y_{OHO}, od ~0,67 g COD-biomase po potrošenom g COD-organske tvari) pretvara se u novu biomasu putem anabolizma, a preostala ⅓ se oksidira pomoću kisika putem kataboličkih putova kako bi se proizvela energija potrebna za rast biomase (Marais i Ekama, 1976). Uz to, za mikrobnost, makro-nutrijenti (poput dušika i fosfora) i mikro-nutrijenti (poput kalija, natrija, kalcija, magnezija, cinka, mangana i željeza) su potrebni za sintezu stanica (Metcalf i Eddy, 2003). Manjak bilo kojeg od tih elemenata može dovesti do ograničenja odvijanja mikrobnih procesa. Pretpostavlja se da potrebe novo stvorene biomase za dušikom i fosforom iznose otprilike 0,10 g N g VSS⁻¹ odnosno 0,03 g P g VSS⁻¹ (Ekama i Wentzel, 2008a). To znači da ako otpadna voda sadrži 100 mg BCOD L⁻¹ (biološki razgradive organske tvari), tada koncentracije dušika i fosfora koje moraju biti osigurane ne bi smjele biti niže od 4,7 mg NH₄-N L⁻¹ odnosno 1,4 mg PO₄-P L⁻¹, kako bi se zadovoljile potrebe za nutrijentima. Navedeno pretpostavlja teoretski prirast Y_{OHO} od 0,67, opaženi prirast od 0,40 (za starost mulja od oko 5 dana) te omjer COD-VSS biomase od 1,42 mg COD mg VSS⁻¹. S praktičnog gledišta i kako bi se izbjegla ograničenja nutrijenata zbog različitog opaženog Y_{OHO} (vidi tablicu 4.1), obično se predlaže omjer COD:N:P od 100:5:1 (Metcalf i Eddy, 2003).

Važno je naglasiti da se ne mogu sve organske tvari prisutne u otpadnoj vodi podvrgnuti razgradnji. U najosnovnijoj klasifikaciji, u otpadnoj se vodi mogu identificirati barem četiri različite organske frakcije s različitim fizičkim karakteristikama i stupnjem biološke razgradivosti koji određuju potencijal njihovog uklanjanja u obradi otpadne vode (Ekama i Wentzel, 2008a). To su (i) biološki razgradive topive organske tvari koje OHO lako konvertiraju (zbog čega su poznate i kao biološki lako razgradive organske tvari, RBCOD ili S_B prema standardiziranom označavanju (Corominas i sur., 2010)), (ii) biološki razgradive suspendirane organske tvari koje se uglavnom ugrade unutar flokula aktivnog mulja i bivaju

podvrgnute hidrolizi prije biološke razgradnje, zbog čega ih se obično karakterizira kao biološki sporo razgradive organske tvari (SBCOD ili XC_B u skladu s Corominas i sur., 2010), (iii) biološki nerazgradive suspendirane organske tvari koje se uglavnom ugrade unutar flokula mulja i nakupljaju se u suspendiranoj fazi aktivnog mulja te (iv) biološki nerazgradive topive organske tvari koje se niti ugrade u aktivni mulj niti razgrađuju pa ostaju u topivoj fazi.

OHO mogu brzo potrošiti RBCOD. Premda je biološka raspadanje SBCOD spora, kod starosti mulja koja se obično koristi u većini uređaja s aktivnim muljem (npr. duže od 3-4 dana), SBCOD se doslovno u potpunosti iskoristi (Ekama i Wentzel, 2008a). Prema tome, OHO koriste RBCOD i SBCOD za sintezu stanica, čime se proizvodi više biomase. Nova biomasa OHO stvorena uklanjanjem i konverzijom RBCOD i SBCOD, kao i nakupljanje biološki nerazgradivih suspendiranih organskih tvari, postaje dio organske mase aktivnog mulja u reaktoru koja se obično mjeri kao MLVSS. Zbog sposobnosti flokulacije aktivnog mulja, materijal krutina je relativno jako taloživ, tako da ga se može uspješno ukloniti u sekundarnim taložnicama, čime se dobiva obrađen i bistar efluent. Muljna masa istaložena u sekundarnoj taložnici vraća se u biološki reaktor, a na kraju se uklanja kroz otpad aktivnog mulja koji je u funkciji starosti mulja uređaja (Arden i Lockett, 1914). Međutim, budući da biološki nerazgradive topive organske tvari ne mogu biti uspješno uklonjene u sustavu aktivnog mulja, one uređaj napuštaju kroz efluent, što pridonosi koncentraciji COD u efluentu.

Pored aerobnog uklanjanja organskih tvari, u sustavima aktivnog mulja koji provode biološko uklanjanje nutrijenata (BNR), većina organskih tvari će biti uklonjena u anaerobnoj i anoksičnoj fazi koja prethodi aerobnoj fazi. Na primjer, u anaerobnoj fazi sustava s aktivnim muljem projektiranim za EBPR, PAO apsorbiraju hlapive masne kiseline, dok u anoksičnoj fazi BNR uređaja, denitrificirajući organizmi koriste biološki razgradive organske tvari za potrebe denitrifikacije koristeći nitrat ili nitrit kao akceptor elektrona. Uz to, potencijalna pojava procesa redukcije sulfata bakterijama koje reduciraju sulfate u anaerobnim fazama sustava s aktivnim muljem također može dovesti do uklanjanja organskih tvari. Nadalje, uklanjanje organskih tvari može se odvijati i u sustavima anaerobne obrade otpadne vode (npr. anaerobni reaktor s uzlaznim tokom (UASB)) u potpuno anaerobnim uvjetima pomoću strogo anaerobnih organizama.

Kako je opaženo, uklanjanje organske tvari se može odvijati u različitim okolišnim uvjetima i mogu ga provoditi različite skupine mikroorganizama. Ovaj je odjeljak fokusiran na izvođenje šaržnih testova aktivnosti kako bi se procijenilo aerobno uklanjanje organskih tvari kao primarni proces uklanjanja koji provode OHO u konvencionalnim sustavima s aktivnim muljem u potpuno aerobnim uvjetima. Ocjena aktivnosti ostalih procesa predstavljena je u ostalim odjeljcima ovog izvješća.

Svrha ovog odjeljka je da služi kao vodič za izvođenje šaržnih testova aktivnosti za određivanje brzina uklanjanja RBCOD u sustavima s aktivnim muljem i ostalim sustavima s biomasom u suspendiranom stanju. Odjeljak ne obuhvaća uklanjanje frakcija SBCOD budući da njihovo određivanje zahtijeva izvođenje testova respirometrije opisanih u ovom poglavlju. Nadalje, premda je frakcioniranje organskih spojeva u ulaznoj otpadnoj vodi na COD (kao i na N i P) od velike važnosti za projektiranje, rad, modeliranje i ocjenjivanje uređaja (s aktivnim muljem) za obradu otpadne vode, cilj ovog poglavlja nije razraditi protokole karakterizacije i frakcioniranja otpadne vode. U tu svrhu čitatelja upućujemo na drugdje objavljene znanstvene i tehničke izvještaje (Henze, 1992; Kappeler i Gujer, 1992; Wentzel i sur., 1995; Hulsbeek i sur., 2002; Roeleveld i van Loosdrecht, 2002; Vanrolleghem i sur., 2003; WERF, 2003; Langergraber i sur., 2004).

Važno je primijetiti da i neki od protokola karakterizacije i frakcioniranja otpadne vode, kao i detaljno određivanje stvarnih prirasta biomase pomoću organskih tvari iz različitih otpadnih voda, također zahtijevaju testove respirometrije.

4.2 Eksperimentalna struktura

4.2.1 Reaktori

Kako bi se ocijenila aktivnost aerobnog uklanjanja organske tvari pomoću aktivnog mulja, šaržni testovi se moraju provesti u aerobnim uvjetima čime će osigurati dovoljno dostupnog otopljenog kisika (održavajući koncentracije DO višima od 2 mg L^{-1}) i dobre uvjete miješanja. Što se ostalih procesa tiče, također je važno održati prikladnu i željenu temperaturu, preciznu kontrolu pH te imati dodatne otvore za

uzimanje uzoraka i dodavanje influenta, otopina, plinova i bilo kojeg drugog tekućeg medija ili supstrata korištenog u testu. Općenito, za izvođenje testova aerobnog uklanjanja organske tvari mogu se koristiti slični bioreaktori sa svojstvima i karakteristikama onih korištenih za izvođenje šaržnih testova aktivnosti EBPR (vidi odjeljak 2.2.1). I ovdje se mogu primijeniti preporuke slične onima opisanima u odjeljku 2.2.1 po pitanju aeracije, miješanja i kontrole pH, lokacije i karakteristika otvora za uzorkovanje i doziranje.

4.2.2 Uzimanje uzoraka aktivnog mulja

Za izvođenje šaržnih testova aktivnosti aerobnog uklanjanja organske tvari, treba uzeti svježi uzorak na kraju aerobnog bazena ili faze na mjestu uzorkovanja gdje postoje uvjeti dobrog miješanja. U idealnom slučaju, šaržne testove aktivnosti treba provesti ubrzo nakon uzimanja uzorka (unutar 2 do 3 h nakon uzorkovanja). Ako se šaržni testovi aktivnosti ne mogu provesti *in situ* ili istog dana kad i uzorkovanje, uzorak aktivnog mulja se može sakupiti u posudu ili spremnik na kraju aerobne faze i propisno transportirati i pohraniti u hladnjak ili pomoću leda (ako je moguće, temperaturu treba držati oko 4 °C). U svakom slučaju, *in situ* izvođenje šaržnih testova aktivnosti je poželjno iz očitih razloga. Ukupni volumen aktivnog mulja koji treba prikupiti ovisi o broju (ponavljanje) testova, volumenu reaktora i ukupnom volumenu uzoraka koje treba uzeti kako bi se ocijenila aktivnost biomase. Često se po šarži dovoljnim može smatrati 10-20 L aktivnog mulja uzetog iz uređaja za obradu otpadne vode u punom mjerilu. S druge strane, uzorci uzeti iz reaktora u laboratorijskom mjerilu rijetko daju više od 1 L budući da laboratorijski sustavi koriste male reaktore (od 0,5 do 2,4 L, a u nekim slučajevima 8-10 L, iznimno 15 L), a maksimalni volumen koji se može izvući iz laboratorijskih reaktora je često određen dnevnim izvlačenjem viška mulja iz sustava (što je izravno povezano s starošću mulja i, slijedom toga, definirano brzinom rasta organiz(a)ma od interesa).

4.2.3 Priprema uzoraka aktivnog mulja

Za šaržne testove aktivnosti provedene *in situ*, mulj bi, u načelu, trebalo prebaciti iz matičnog reaktora (u slučaju laboratorijski obogaćenog mulja) ili reakcijskog bazena (u slučaju pokusnog ili uređaja u punom mjerilu) u bioreaktor ili reaktor gdje će se odvijati testovi aktivnosti. Tada bi aktivni mulj trebalo aerirati najmanje 1 ili 2 h kako bi se uklonio sav preostali biološki razgradiv COD prisutan u sustavu, uz istovremeno prilagođavanje uzorka željenom pH i temperaturi (kako je opisano u odjeljku 2.3.5). Alternativno, za uklanjanje preostalog COD, aktivni se mulj može oprati pomoću medija za pranje opisanog u odjeljku 2.3.3 i procedure pranja opisane u odjeljku 2.3.5.

Ako će se provesti samo šaržni test aktivnosti aerobnog uklanjanja organske tvari (tj. test nitrifikacije nije od interesa), tada se uzorku mulja može dodati inhibitor nitrifikacije odmah nakon što je mulj prebačen u bioreaktor (npr. alil-N-tiourea: ATU do preporučene konačne koncentracije od 20 mg L⁻¹). Konkretno, time će se zaustaviti nitrifikacija, čime će se izbjeći veća potrošnja kisika, ako će se paralelno provoditi testovi respirometrije. Uzorci mulja pohranjeni u hladnim uvjetima mogu se također oprati mineralnom otopinom kako bi se uklonile sve preostale organske tvari.

Za šaržne testove koji se provode s uzorcima mulja pohranjenima u hladnim uvjetima (na oko 4 °C), uzorke mulja treba „reaktivirati“ jer pohranjivanje na niskoj temperaturi usporava metabolizam bakterija. Kako bi se mulj reaktivirao, aktivni mulj treba aerirati 1-2 h na željenom pH i, naročito, na temperaturi istraživanja.

4.2.4 Medij

Kada se za izvođenje testova aktivnosti koristi prava otpadna voda (bilo sirova ili istaložena), na prilično jednostavan način se može staviti u reaktor/ fermentor. U normalnim ili redovnim uvjetima, taj korak se odvija na početku testa. Ako je to potrebno, sirova otpadna voda se može filtrirati (kroz sita s otvorima 1 ili 2 mm) ili taložiti (u trajanju od 1 do 3 h). Ako testove aktivnosti treba provesti pri različitim koncentracijama suspendiranih tvari, (i) obrađeni efluent iz uređaja može se uzeti i koristiti za razrjeđivanje (pod pretpostavkom da su koncentracije suspendiranih tvari u efluentu relativno niske, npr. 20-30 mg TSS L⁻¹) ili (ii) aktivni mulj se može koncentrirati dekantiranjem i ispuštanjem supernatanta u nekoliko ponovljenih koraka sve dok se ne postigne MLSS od interesa.

Ako treba izučavati različite izvore i koncentracije ugljika, efluent iz uređaja se može koristiti i za pripremu polusintetičkog medija (sve dok ne sadrži toksične ili inhibitorne spojeve) koji sadrži koncentraciju RBCOD od interesa koja, na primjer nakon razrjeđenja u omjeru 1:1 u bioreaktoru, može osigurati ciljane početnu koncentraciju COD. Međutim, ovisno o prirodi i svrsi testova, koncentracije ugljika prisutne u sintetičkoj otpadnoj vodi mogu varirati i proporcionalno se prilagoditi trajanju testa. Obično se koncentracije od oko 400 mg COD L⁻¹ mogu koristiti s aktivnim muljem ili iz laboratorijskog ili uređaja u punom mjerilu. Osim izvora ugljika, sintetička otpadna voda mora sadržavati potrebne makro- i mikro-elemente. Predloženi recept za sintetičku otpadnu vodu za početni COD od oko 400 mg COD L⁻¹ može po litri sadržavati (Smolders i sur., 1994a): 862 mg NaAc·3H₂O (400 mg COD), 107 mg NH₄Cl (28 mg N), 40 mg NaH₂PO₄·2H₂O (8 mg P), 90 mg MgSO₄·7H₂O, 14 mg CaCl₂·2H₂O, 36 mg KCl, 1 mg ekstrakta kvasca i 0,3 mL otopine elemenata u tragovima (koja po litri uključuje 10 g EDTA, 1,5 g FeCl₃·6H₂O, 0,15 g H₃BO₃, 0,03 g CuSO₄·5H₂O, 0,12 g MnCl₂·4H₂O, 0,06 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,12 g ZnSO₄·7H₂O, 0,18 g KI i 0,15 g CoCl₂·6H₂O). Ako se tako želi, sintetičku otpadnu vodu se može koncentrirati do više željene koncentracije COD kako bi se objasnile potencijalne stope razrjeđivanja, sterilizirati u autoklavu (1 h pri 110 °C) i koristiti kao koncentriranu otopinu ako će se u definiranom vremenskom razdoblju provoditi nekoliko testova. Međutim, otopinu treba baciti ako se opazi bilo kakva precipitacija ili ako izgubi transparentnost.

Za eksperimente koji se izvode s laboratorijski obogaćenim kulturama, testove je najbolje izvoditi s istom (sintetičkom) otpadnom vodom koja je korištena za kultivaciju s istraživanim koncentracijama ugljika, osim ako nije potrebno drugačije. Alternativno, slično uzorcima iz uređaja u punom mjerilu, može se prikupiti efluent iz reaktora, filtrirati kroz grube filtre kako bi se uklonile krupne čestice te koristiti za pripremu potrebnog medija.

4.2.5 Analitički testovi

Većina potrebnih analitičkih testova (za određivanje COD, ukupnog P, PO₄, NH₄, NO₂, NO₃, TSS, VSS itd.) može se provesti pomoću standardiziranih i uobičajeno korištenih protokola detaljno opisanih u Standardnim metodama (APHA i sur., 2012). Za određivanje otopljenih parametara kao što je topivi COD, PO₄, NH₄, NO₂ i NO₃, uzorke treba filtrirati odmah nakon uzimanja kroz filtre s porama veličine 0,45 μm. Od dvije najčešće korištene metode za analitičko određivanje COD, preporučuje se bikromatna metoda, budući da permanganatna metoda ne oksidira u potpunosti sve organske spojeve (Henze i Comeau, 2008). Određivanje VFA (poput acetata, propionata i hlapivih masnih kiselina) može se provesti pomoću GC. Glukoza i ostali spojevi ugljika (uključujući VFA) mogu se odrediti pomoću HPLC.

4.2.6 Parametri od interesa

Kako bi se odredila i ocijenila aktivnost OHO, mogu se procijeniti različiti stehiometrijski omjeri i kinetičke brzine, kako je prikazano u tablici 4.1.

Važno je spomenuti da je Arhenijusov temperaturni koeficijent od između 1,060 i 1,123 (s tipičnom vrijednošću od 1,070) predložen za opis aerobnog uklanjanja organske tvari (Metcalf i Eddy, 2003).

Kako je prikazano u tablici 4.1, teoretski stehiometrijski prirast biomase na biološki razgradivim organskim tvarima iznosi 0,67 g COD g COD⁻¹ (Metcalf i Eddy, 2003; Ekama i Wentzel, 2008a). Međutim, uobičajeno je promatrati više stehiometrijske omjere koji navodno mogu dosegnuti do 0,90-0,91 g COD g COD⁻¹ (Dircks i sur., 1999; Goel i sur., 1999). Ako je to slučaj, treba biti svjestan da su vrijednosti više od 0,67 g COD g COD⁻¹ prouzrokovane izravnim pohranjivanjem biološki razgradivih organskih tvari, a ne većim prirastom biomase. Takvi se procesi obično javljaju kad je RBCOD (S_B) dominantna organska tvar u uređajima projektiranim sa selektorima. Dodatni detalji dostupni su u literaturi (Gujer i sur., 1993; Henze i sur., 2008). Vezano uz aerobne brzine uklanjanja organske tvari, one navedene u literaturi mogu jako varirati od 3 do 10 g COD-supstrat g COD-biomasa⁻¹ d⁻¹. Glavni razlog za to može biti neto koncentracija aktivne biomase prisutne u sustavu (u odnosu na ukupnu koncentraciju MLVSS). Kratki SRT (manje od 3 dana) može dovesti do velike frakcije aktivne biomase u odnosu na VSS prisutan u sustavu, što bi se moglo odraziti u visokoj brzini uklanjanja organske tvari. Međutim, (jako) dugi SRT (na primjer, puno duže od 20 dana) će dovesti do većeg nakupljanja biološki nerazgradivog VSS (prisutnog u influentu) ili koji su endogenom respiracijom proizveli OHO (mjerljivo i kao MLVSS), što povećava koncentraciju MLVSS u mulju i dovodi do niže maksimalne specifične brzine uklanjanja COD, q_{OHO,COD,OX}. Prema tome, najviši q_{OHO,COD,OX} (do 10 g COD-supstrat g COD-

biomasa⁻¹ d⁻¹) se može očekivati u testovima koji se izvode s uzorcima aktivnog mulja koji sadrže relativno velike koncentracije aktivne biomase OHO, što se obično opaža u sustavima s muljem male starosti.

Tablica 4.1 Očekivani stehiometrijski i kinetički parametri od interesa za sustave s aktivnim muljem koji provode aerobno uklanjanje organske tvari.

Parametar	Napomena	Referenca
Aerobni stehiometrijski parametar Y_{OHO} (g COD-biomasa g COD-supstrat⁻¹)		
0,67	Teoretski omjer	Ekama i Wentzel (2008a)
0,72	Acetat kao izvor organske tvari	Dircks i sur. (1999)
0,37	Metanol kao izvor organske tvari	McCarty (2007)
0,65	Format kao izvor organske tvari	McCarty (2007)
0,40 -0,80; obično 0,60	jedinica g VSS g BOD ⁻¹	Metcalf i Eddy (2003)
0,30-0,60	jedinica g VSS g RBCOD ⁻¹	Metcalf i Eddy (2003)
0,67-0,792*	Različiti izvori organske tvari RBCOD	Guisasola (2005)
0,91*	Glukoza kao izvor organske tvari	Dircks i sur. (1999)
0,90*	Glukoza kao izvor organske tvari	Goel i sur. (1999)
Aerobni kinetički parametar $q_{OHO,COD,OX}$ (g COD supstrat g COD-biomasa⁻¹ d⁻¹)		
6	ASM2d model	Henze i sur. (1999)
2-10, obično 5	g RBCOD g VSS ⁻¹ d ⁻¹	Metcalf i Eddy (2003)
3 - 10		Kappeler i Gujer (1992)

4.3 Aerobni šaržni testovi aktivnosti organske tvari: priprema

4.3.1 Oprema

Za izvođenje aerobnih organskih šaržnih testova aktivnosti potrebna je sljedeća oprema:

1. Šaržni reaktor ili fermentor opremljen sustavom za miješanje i odgovarajućim otvorima za uzorkovanje (kako je opisano u odjeljku 4.2.1).
2. Dobava kisika (izvori zraka ili čistog kisika).
3. pH elektroda (ako nije uključena/ugrađena u strukturu šaržnog reaktora).
4. Dvosmjerni kontrolor pH za dodavanje HCl i NaOH (alternativno, može se koristiti jednosmjerna kontrola, općenito za dodavanje HCl, ili ručna kontrola pH kroz ručno dodavanje HCl i NaOH).
5. Termometar (preporučeni radni raspon temperature od 0 °C do 40 °C).
6. Sustav za kontrolu temperature (ako nije uključen u strukturu šaržnog reaktora).
7. Mjerač DO s elektrodom (ako nije uključen/ugrađen u strukturu šaržnog reaktora).
8. Automatski dvosmjerni kontrolor za dobavu plina dušika i kisika (ako nije uključen u strukturu šaržnog reaktora i ako se testovi moraju provesti pri definiranoj koncentraciji DO).
9. Centrifuga s kapacitetom radnog volumena od najmanje 250 mL radi izvođenja postupka pranja mulja (ako je potrebno).
10. Zaporni sat.

Provjerite jesu li sve elektrode i mjerači (pH, temperatura i DO) kalibrirani najmanje 24 h prije izvođenja šaržnih testova aktivnosti u skladu sa smjernicama i preporukama proizvođača i/ili dobavljača.

4.3.2 Materijali

1. Dvije menzure od 1 ili 2 L (ovisno o korištenim količinama mulja) za čuvanje aktivnog mulja i pranje mulja ako je potrebno.
2. Najmanje 2 plastične šprice (po mogućnosti od 20 mL ili najmanje 10 mL) za prikupljanje i određivanje topivih spojeva (nakon filtracije).
3. Najmanje 3 plastične šprice (po mogućnosti od 20 mL) za prikupljanje krutina, partikulatnih ili unutarstaničnih spojeva (bez filtracije).
4. Filtar s porama veličine 0,45 μm. Po mogućnosti ne od celuloznog acetata zato što mogu otpustiti određene tragove celuloze ili acetata u prikupljene uzorke vode. Razmotriti najmanje dvostruko više filtara od broja uzoraka koje treba filtrirati za određivanje topivih spojeva.

5. Prozirne plastične čašice od 10 ili 20 mL za prikupljanje uzoraka za određivanje topivih spojeva (npr. topivi COD, amonij, ortofosfat).
6. Prozirne plastične čašice od 10 ili 20 mL za prikupljanje uzoraka za određivanje suspendiranih krutina u mješavini vode i mulja (MLSS) i volatilnih suspendiranih krutina (MLVSS). Razmotriti prikupljanje trostrukog broja tih uzoraka zbog varijabilnosti analitičke tehnike.
7. Plastična kutija ili kutija za suhi led punjena ledom s potrebnom zapreminom za privremenu pohranu (u trajanju do 1-2 h nakon završetka šaržnog testa aktivnosti) plastičnih čašica i plastičnih cijevi za centrifugiranje nakon prikupljanja uzoraka.
8. Plastične rukavice i zaštitne naočale.
9. Pasteurove ili plastične pipete za dodavanje HCl i/ili NaOH (kad se kontrola pH provodi ručno).
10. Metalne laboratorijske kvačice ili stezaljke za zatvaranje cijevi korištenih kao otvor za uzorkovanje kad se uzorci ne uzimaju iz reaktora/bioreaktora.

4.3.3 Radne otopine

- Prava otpadna voda

Ako se za šaržni test aktivnosti koristi prava otpadna voda, uzorak se mora uzeti u influentu odgovarajućeg uređaja za obradu otpadne vode, a šaržni test aktivnosti treba provesti što je prije moguće nakon uzimanja uzorka. Ako se zbog lokacije i udaljenosti testovi ne mogu provesti u manje od 1 ili 2 h nakon uzimanja uzorka, tada uzorak otpadne vode treba čuvati na hladnom dok se test ne provede (npr. stavljanjem posude ili spremnika u hladnjak na temperaturu od 4 °C). Ipak, prije izvođenja testa, temperaturu otpadne vode treba prilagoditi ciljanoj temperaturi na kojoj će se izvoditi šaržni test aktivnosti (po mogućnosti dosegnutoj u manje od 1 h). U tu se svrhu može koristiti vodena kupelj ili prostorija s kontroliranom temperaturom.

- Sintetički influentni medij ili supstrat

Ako se testovi mogu ili ih se želi provesti sa sintetičkom otpadnom vodom, tada sintetički influent može sadržavati mješavinu ugljika i (makro- i mikro-) nutrijenata. Općenito, može ih se pomiješati sve zajedno u istom mediju, sve dok se ne opazi precipitacija. Uobičajeni sastav i koncentracija su:

- a. Otopina izvora ugljika: mora se sastojati od izvora RBCOD kao što je VFA (poput acetata ili propionata) ili glukoza, ovisno o prirodi i cilju testa i odgovarajućim istraživačkim pitanjima. Za uzorke mulja bilo iz laboratorijskih ili sustava u punom mjerilu preporučuje se početna koncentracija COD od oko 400 mg L⁻¹.
- b. Otopina nutrijenata: Trebala bi sadržavati sve potrebne makro- (amonij, fosfor, magnezij, sulfat, kalcij, kalij) i mikro-nutrijente (željezo, bor, bakar, mangan, molibdat, cink, jod, kobalt) kako bi se osiguralo da stanice nisu ograničene njihovim izostankom i izbjeglo dobivanje krivih rezultata te, u ekstremnim slučajevima, neuspjeh testa. Dakle, premda njihove koncentracije mogu djelovati trivijalnim, nužno je osigurati da se u otopinu dodaju sve sastavnice u potrebnim količinama. Sljedeći sastav otopine nutrijenata se može preporučiti za influente koji sadrže do 400 mg COD L⁻¹ (na temelju Smolders i sur., 1994a) po litri: 107 mg NH₄Cl (28 mg), 90 mg MgSO₄·7H₂O, 40 mg NaH₂PO₄·2H₂O (8 mg P), 14 mg CaCl₂·2H₂O, 36 mg KCl, 1 mg ekstrakta kvasca i 0,3 mL otopine elemenata u tragovima (koja po litri uključuje 10 g EDTA, 1,5 g FeCl₃·6H₂O, 0,15 g H₃BO₃, 0,03 g CuSO₄·5H₂O, 0,12 g MnCl₂·4H₂O, 0,06 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,12 g ZnSO₄·7H₂O, 0,18 g KI i 0,15 g CoCl₂·6H₂O). Slične otopine nutrijenata mogu se koristiti tako dugo dok sadrže sve prethodno navedene potrebne nutrijente.
- c. Medij za pranje: Ako se uzorak mulja mora oprati kako bi se uklonio preostali COD ili prisutnost neželjenih spojeva (koji čak mogu biti inhibitorni ili toksični), potrebno je pripremiti otopinu nutrijenata. Za pranje mulja mogla bi se koristiti sljedeća otopina nutrijenata koja po litri sadrži (Smolders i sur., 1994a): 107 mg NH₄Cl, 40 mg NaH₂PO₄·2H₂O, 90 mg MgSO₄·7H₂O, 14 mg CaCl₂·2H₂O, 36 mg KCl, 1 mg ekstrakta kvasca i 0,3 mL otopine elemenata u tragovima (koja po litri uključuje 10 g EDTA, 1,5 g FeCl₃·6H₂O, 0,15 g H₃BO₃, 0,03 g CuSO₄·5H₂O, 0,12 g MnCl₂·4H₂O, 0,06 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,12 g ZnSO₄·7H₂O, 0,18 g KI and 0,15 g CoCl₂·6H₂O). Proces pranja se može ponoviti dva ili tri puta. Nakon toga, mogu se poduzeti naredni koraci pripreme testova aktivnosti šarže.
- d. Otopina ATU: Kako bi se inhibirala nitrifikacija, može se pripremiti otopina ATU da dosegne početnu koncentraciju od oko 20 mg L⁻¹ (nakon dodavanja). Otopinu ATU treba dodati prije izlaganja mulja aerobnim uvjetima (uključujući pripremu ili aklimatizaciju uzorka mulja).

- e. Kisele i bazne otopine: 100-250 mL 0,2 M otopine HCl i 100-250 mL 0,2 M otopine NaOH za automatsku ili ručnu kontrolu pH.

Na kraju, radne i koncentrirane otopine potrebne za određivanje analitičkih parametara od interesa također moraju biti pripremljene u skladu sa Standardnim metodama i odgovarajućim protokolima.

4.3.4 Priprema materijala

1. Prikupite materijale za izvođenje šaržnih testova aktivnosti, a definiranje broja uzoraka koje treba uzeti može se pripremiti slijedeći iste korake predstavljene u odjeljku 2.3.4.
2. Određivanje učestalosti uzimanja uzoraka: za određivanje maksimalne kinetičke brzine uklanjanja RBCOD, uzorke treba uzimati svakih 5 min tijekom prvih 30-40 min trajanja šaržnog testa aktivnosti.
3. Uzmite niz uzoraka prije dodavanja bilo kakvog medija kako bi se povećala pouzdanost podataka i utvrdilo početno stanje mulja.
4. Pažljivo definirajte maksimalni i minimalni radni volumen reaktora u skladu s preporukama u odjeljku 2.3.4.
5. Nakon što se definira broj i učestalost uzimanja uzoraka, označite sve plastične čašice. Definirajte nomenklaturu i/ili kraticu za lakše identificiranje i raspoznavanje šaržnog testa, vremena uzorkovanja i paramet(a)ra od interesa koje treba odrediti pomoću tog uzorka. Označavanje i plastičnih čašica i poklopca pomoći će u lakšem identificiranju uzorka.
6. Tablica 4.2 sadrži primjer radnog lista za izvođenje i praćenje uzimanja uzoraka i provođenje šaržnog testa. Uz to, može se koristiti i za vođenje baze podataka o različitim provedenim šaržnim testovima.
7. Organizirajte sav potreban materijal u relativno uskom krugu rada oko laboratorijske strukture kako bi se izbjeglo kašnjenje u postupanju i pripremi uzoraka.
8. Kalibrirajte sve mjerače (pH, DO i termometar) manje od 24 h prije izvođenja testova i čuvajte ih u odgovarajućim otopinama do izvođenja testova, slijedeći pritom posebne preporuke odgovarajućeg proizvođača ili dobavljača. Potvrdite i da su očitavanja pouzdana.
9. Uzorke propisno pohranite i čuvajte ih dok ne budu analizirani. Tablica 2.2 sadrži preporuke za čuvanje uzoraka ovisno o analitičkom određivanju parametra od interesa.

4.3.5 Priprema aktivnog mulja

Ove procedure smatraju da se šaržni testovi aktivnosti mogu provesti što je prije moguće nakon uzimanja uzoraka iz uređaja u punom mjerilu ili laboratorijskih sustava ili, u najgorem slučaju, unutar 24 h nakon uzorkovanja. Izvođenje šaržnih testova 24 h nakon uzimanja uzoraka se ne preporučuje zbog potencijalnih promjena i raspadanja mikroorganizama. Imajući to na umu, preporučuju se sljedeće procedure za pripremu uzoraka aktivnog mulja za izvođenje testova šaržne aktivnosti:

1. Ako se šaržni testovi aktivnosti mogu provesti u manje od 1 h nakon uzimanja uzorka mulja i ako uzorak mulja ne treba oprati:
 - a. Temperaturu šaržnog bioreaktora prilagodite ciljanoj temperaturi istraživanja.
 - b. Uzmite uzorak mulja na kraju aerobne faze.
 - c. Prebacite uzorak mulja u reaktor ili fermentor.
 - d. Konačnoj koncentraciji dodajte otopinu ATU od 20 mg L⁻¹ kako bi se inhibirala nitrifikacija (naročito ako će se provoditi testovi respirometrije) (vidi odjeljak 4.3.3).
 - e. Započnite s miješanjem (100 – 300 rpm) i pratite temperaturu i pH uzorka mulja tako da unutar reaktora postavite eksterni termometar (ako struktura nema ugrađen termometar) sve dok mulj ne postigne ciljanu temperaturu i pH istraživanja.
 - f. Počnite aerirati uzorke mulja, održavajući koncentraciju otopljenog kisika većom od 2 mg L⁻¹.
 - g. Započnite s aerobnim šaržnim testovima aktivnosti jednom kad pH i DO budu stabilni.
2. Ako uzorak aktivnog mulja treba oprati, tada se koraci prikazani u odjeljku 2.3.5 (za testove koji se mogu provesti u manje od 1 h ili 24 h nakon uzorkovanja) mogu slijediti za pripremu uzoraka aktivnog mulja koristeći medij za pranje naveden u odjeljku 4.3.3.

4.4 Aerobni šaržni testovi aktivnosti organske tvari: izvođenje

Slično prethodnim testovima, kako bi se olakšalo izvođenje i za potrebe evidentiranja i arhiviranja podataka, unaprijed treba pripremiti eksperimentalni plan provedbe sličan onom prikazanom u tablici 4.2. Aerobni testovi aktivnosti uklanjanja organske tvari mogu se provesti kako bi se ocijenilo uklanjanje

RBCOD u sustavima s aktivnim muljem. Mogu se provoditi s uzorcima aktivnog mulja iz uređaja u punom mjerilu ili laboratorijskih sustava koristeći pravu ili sintetičku otpadnu vodu. Uzorke treba prikupljati na kraju aerobne faze sve dok u uzorku ne bude prisutan RBCOD. Za izvođenje testa organskog uklanjanja organske tvari predlažu se sljedeći koraci:

Test OHO.AER.1. Jedinствен aerobni test uklanjanja organske tvari

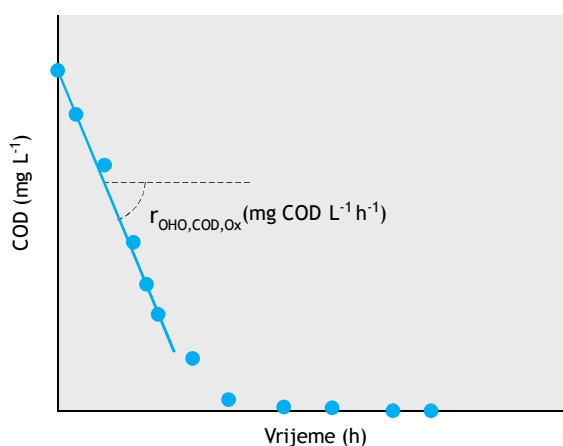
- a. Nakon što je mulj prikupljen, pripremljen i prenesen u šaržni reaktor (vidi odjeljak 4.3.5), uzorak održavajte aeriranim najmanje 30 min, uz istovremenu potvrdu da su pH i temperatura na ciljanoj vrijednosti od interesa. U protivnom, postavite odgovarajuće zadane vrijednosti (ako se koriste automatski kontrolirani pH i temperatura) ili ih podesite ručno. Pričekajte dok se ne postignu stabilni uvjeti.
- b. Osigurajte da je koncentracija DO veća od 2 mg L^{-1} .
- c. Pratite vrijeme izvođenja i uzorkovanja pomoću zapornog sata.
- d. Kada se postignu stabilni operativni uvjeti (nekih 20 min prije početka testa), uzmite prve uzorke iz vodne faze i biomase kako bi se odredile početne koncentracije parametara od interesa: topivi COD, NH_4 , PO_4 i koncentracije MLSS i MLVSS.
- e. Pričvrstite špricu za uzimanje uzoraka, zatim otvorite ili otpustite laboratorijsku stezaljku koja zatvara otvor za uzorkovanje te gurajte i vucite injekciju nekoliko puta dok se ne prikupi homogeni uzorak (obično je potrebno oko 5 puta). Kada je injekcija puna, zatvorite stezaljku i uklonite injekciju.
- f. Odmah filtrirajte uzorke korištene za određivanje topivog COD, NH_4 , PO_4 (kroz filtre s veličinom otvora $0,45 \mu\text{m}$). Ostale uzorke (npr. MLVSS i MLVSS) treba pripremiti u skladu s odgovarajućim protokolima.
- g. Prije i za vrijeme testa uzorke pohranite na temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u hladnjaku ili po mogućnosti u hladnom spremniku s ledom.
- h. Počnite s izvođenjem aerobnog testa s početnim vremenom nula uz dodavanje prave ili sintetičke otpadne vode (kao otopine izvora ugljika).
- i. Dodajte pravu otpadnu vodu ili sintetički influent kako bi se postigao početni omjer RBCOD i MLVSS u reaktoru od oko $0,10 \text{ mg COD mg VSS}^{-1}$. Na primjer, početne koncentracije RBCOD i MLVSS nakon miješanja mogu se kretati oko $400 \text{ mg COD L}^{-1}$ za uzorke koji sadrže $4,000 \text{ mg VSS L}^{-1}$. Viši ili niži omjeri također mogu biti prihvatljivi sve dok postoji dovoljno vremena za uzorkovanje.
- j. Osigurajte da očitavanja DO ostanu iznad 2 mg L^{-1} nakon dodavanja otpadne vode i da ne dođe do većih varijacija temperature i pH (više od $1 \text{ }^\circ\text{C}$ za temperaturu ili $\pm 0,1$ za pH).
- k. Trajanje i uzorkovanje:
 - (i) Testovi obično mogu trajati između 2 i 4 h za početne koncentracije topivog COD do $400 \text{ mg COD L}^{-1}$ (pri pH 7,0 i $20 \text{ }^\circ\text{C}$).
 - (ii) Za određivanje aerobnih kinetičkih parametara, uzorke za određivanje topivog COD trebalo bi uzimati svakih 5 min u prvih 30-40 min izvođenja testa. Nakon tog razdoblja, učestalost uzorkovanja može se smanjiti na 10 ili 15 min tijekom prvog sata, a kasnije na svakih 15 ili 30 min dok test ne završi.
- l. Aerobni test zaključite uzimanjem uzoraka za određivanje koncentracija topivog COD, MLSS, MLVSS, NH_4 i PO_4 .
- m. Organizirajte uzorke i osigurajte da su svi uzorci cjeloviti i propisno obilježeni kako bi se izbjeglo miješanje uzoraka i trivijalne pogreške.
- n. Dok se prikupljeni uzorci ne analiziraju, čuvajte i pohranite ih kako je preporučeno odgovarajućim analitičkim procedurama.
- o. Očistite uređaj i poduzmite odgovarajuće mjere kako bi se zadržali i očuvali različiti senzori, oprema i materijali.
- p. Zadržite mulj (dio) korišten u testu za moguće kasnije korištenje (npr. za identifikaciju mikroba).

4.5 Analiza podataka

Prirast biomase na COD je glavni stehiometrijski parametar od interesa za ocjenu aerobne stehiometrije običnih heterotrofnih organizama (Tablica 4.1). Međutim, aerobni šaržni test aktivnosti predstavljen u ovom odjeljku ne može se koristiti za određivanje Y_{OHO} . To je uglavnom stoga što se za određivanje Y_{OHO} , testovi respirometrije moraju provesti paralelno s aerobnim testovima kako bi se ocijenila količina COD

koja se koristi za proizvodnju energije. To je predstavljeno u drugoj literaturi (Wentzel i sur., 1995; Dircks i sur., 1999; Goel i sur., 1999; Guisasola i sur., 2005).

Maksimalna specifična aerobna brzina uklanjanja RBCOD ($q_{\text{OHO,COD,ox}}$) može se izračunati tako da se grafički prikažu eksperimentalni podaci dobiveni u aerobnim šaržnim testovima aktivnosti (os y) u ovisnosti o vremenu (os x), a specifična brzina se procijeni pomoću linearne regresije. Budući da nas zanimaju maksimalne brzine, može se primijeniti pristup s linearnom regresijom tako da se procijeni iz više od 4 do 5 eksperimentalnih točaka uz istovremeno ostvarivanje statističkog koeficijenta determinacije (R^2) ne nižeg od 0,90-0,95. To je glavni razlog zašto je učestalost uzorkovanja unutar prvih 30-40 min izvođenja šaržnih testova aktivnosti postavljena na 5 min. Maksimalna volumetrijska brzina može se odrediti na temelju nagiba jednadžbe pravca linearne regresije. To će dovesti do određivanja maksimalne volumetrijske brzine (obično se navodi u jedinicama kao što su $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ili $\text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$). Na slici 4.1 prikazana je procjena maksimalnih brzina aerobnog uklanjanja za jednu kulturu OHO.



Slika 4.1 Primjer određivanja maksimalne aerobne volumetrijske brzine uklanjanja organske tvari (izražena u $\text{mg COD L}^{-1} \text{h}^{-1}$) u aerobnom šaržnom testu aktivnosti.

Brzina se može izraziti kao maksimalna specifična brzina tako da se volumetrijska brzina (ili vrijednost nagiba) podijeli s koncentracijom VSS u aktivnom mulju. Važno je napomenuti da se maksimalna specifična brzina rasta ne može jednostavno izračunati prateći povećanje koncentracija biomase tijekom ciklusa budući da ona može biti praktički zanemariva i potpasti pod standardnu pogrešku analitičkog određivanja MLVSS. Umjesto toga, mogu se provesti ili dugotrajni neprekinuti testovi ili aerobne testove aktivnosti treba kombinirati s testovima respirometrije kako je prikazano u drugoj literaturi (Kappeler i Gujer, 1992; Wentzel i sur., 1995).

4.6 Primjer

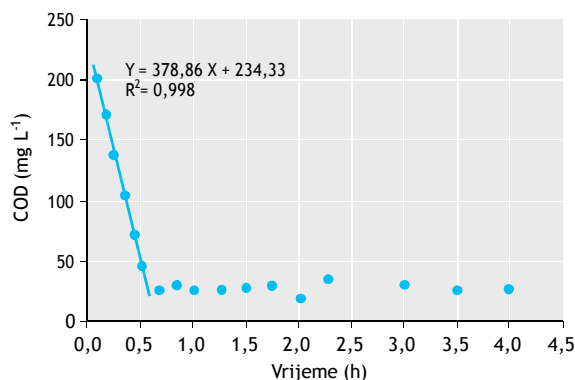
4.6.1 Opis

Kako bi se ilustriralo izvođenje aerobnog šaržnog testa aktivnosti za OHO, u ovom se dijelu predstavljaju podaci iz testa provedenog na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ s uzorkom aktivnog mulja iz uređaja u punom mjerilu. Test OHO.AER.1 je proveden kako bi se odredila aerobna brzina uklanjanja RBCOD za OHO. Prema tome, šaržni test aktivnosti je proveden u reaktoru od 3,0 L. Sva oprema, aparatura i materijali su pripremljeni kako je opisano u odjeljku 4.3. Senzori za pH i DO su kalibrirani manje od 24 h prije izvođenja testa. Test je trajao 4 h. Prije šaržnog testa, 1,25 L svježeg aktivnog mulja prikupljenog na kraju aerobne faze uređaja u punom mjerilu prebačeno je u reaktor i aklimatizirano 1 h na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz sporo miješanje (100 rpm) pri pH 7,0 slijedeći preporuke opisane u odjeljku 4.3.5. Priprema aktivnog mulja za testove provedena je manje od 1 h nakon prikupljanja mulja. Nakon toga, 20 min prije početka testa, miješanje je pojačano na 300 rpm i uzeti su uzorci za određivanje parametara od interesa (u skladu s izvođenjem Testa OHO.AER.1). Test je započeo dodavanjem 1,25 L sintetičkog medija koji je sadržavao 400 mg COD L^{-1} kao Ac. Ostali makro- i mikro-nutrijenti kao i 20 mg L^{-1} ATU su uključeni u sintetički medij u skladu s odjeljkom 4.3.3. Budući da se test provodio na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura sintetičkog medija je također

prilagođena na 15 °C u vodenoj kupelji koja je radila na istoj temperaturi prije dodavanja. Uzorci su uzimani svakih 5 min u prvih 30 min aerobne faze. Odmah nakon prikupljanja, svi uzorci su pripremljeni i spremljeni kako je opisano u odjeljku 4.3.4. Svi prikupljeni uzorci su analizirani kako je opisano u odjeljku 4.2.4. Tablica 4.2 prikazuje eksperimentalni plan provedbe testa.

4.6.2 Analiza podataka

Slijedom rezultata šaržnog testa aktivnosti prikazanih u tablici 4.2, na slici 4.2 prikazana je procjena maksimalnih volumetrijskih brzina OHO primjenom linearne regresije.



Slika 4.2 Grafički prikaz podataka dobivenih u primjeru eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje šaržnog testa aktivnosti (tip OHO.AER.1) provedenog s aktivnim muljem iz uređaja u punom mjerilu na 15 °C i koristeći sintetički influent pri pH 7,0. Glavna linija trenda pokazuje brzinu konverzije RBCOD za daljnju procjenu maksimalne specifične kinetičke brzine.

Na temelju maksimalne volumetrijske brzine uklanjanja COD prikazane na slici 4.2 i uzimajući u obzir koncentraciju MLVSS od 1,890 mg L⁻¹ (kao prosječna koncentracija MLVSS opažena među uzorcima mulja uzetima na početku i na kraju testa), može se procijeniti specifična brzina uklanjanja RBCOD od 0,20 g COD g VSS⁻¹ h⁻¹, što odgovara oko 4,81 g RBCOD g VSS⁻¹ d⁻¹. Koristeći omjer COD-VSS za biomasu od 1,42 g COD g VSS⁻¹ (Metcalf i Eddy, 2003), može se izračunati $q_{\text{OHO,COD,OX}}$ of 3.39 g RBCOD g VSS⁻¹ d⁻¹. Nadalje, budući da test nije proveden pri 20 °C već pri 15 °C, pomoću tipičnog Arrhenijusovog koeficijenta od 1,07 za aktivnost OHO (Metcalf i Eddy, 2003), može se odrediti $q_{\text{OHO,COD,OX}}$ of 4.75 g RBCOD g COD⁻¹ d⁻¹ (3.39 g RBCOD g VSS⁻¹ d⁻¹ / 1.07⁽¹⁵⁻²⁰⁾). Ta vrijednost je u rasponu ostalih maksimalnih specifičnih brzina navedenih za aerobne procese uklanjanja organske tvari. Važno je napomenuti da je sintetički influent sadržavao 400 mg COD L⁻¹, a koncentracija COD izmjerena 5 min nakon početka testa bila je 203 mg COD L⁻¹ zbog razrjeđenja 1,25 L sintetičkog influenta s 1,25 L aktivnog mulja (koji nije sadržavao RBCOD) i velike brzine uklanjanja. Štoviše, može se primijetiti i da je: (i) početna koncentracija COD u aktivnom mulju prije dodavanja otpadne vode iznosila oko 56 mg L⁻¹, a (ii) završna koncentracija COD na kraju testa ostala je na oko 30 mg COD L⁻¹. Ova potonja koncentracija odgovara topivom biološki nerazgradivom COD prisutnom u uzorku aktivnog mulja koji se ne može ukloniti biološkim putem (kako je objašnjeno ranije u ovom poglavlju).

Tablica 4.2 Primjer eksperimentalnog plana provedbe za izvođenje šaržnog testa aktivnosti (tip OHO.AER.1) provedenog s aktivnim muljem iz uređaja u punom mjerilu na 15 °C koristeći sintetski influent pri pH 7,0.

Aerobni šaržni testovi uklanjanja COD		Oznaka: OHO.AER.1										
Datum:	Četvrtak 09.10.2015. 10:00 h	Eksperimentalna procedura u kratkim crtama:	Vrijeme (h:min)									
Opis:	Testovi pri 25 °C, pH 7, sintetički supstrat i uzorak iz gradskog uređaja	1. Potvrditi dostupnost materijala za uzorkovanje i potrebne opreme.	08:00									
Test br.:	1 od 6	2. Potvrditi kalibriranost i funkcionalnost sustava, mjerača i senzora.	08:10									
Trajanje	4,0 h (240 min)	3. Prebaciti 1,25 L mulja u šaržni reaktor.	08:30									
Supstrat:	Sintetički: Acetat (350 mg L ⁻¹) + mineralna otopina s N i P	4. Započeti s nježnim miješanjem i upuhivanjem plina pri zadanoj T i pH.	08:40									
Točka uzorkovanja:	Srednja visina mješavine mulja i vode u SBR-u	5. 20 min prije početka uzeti uzorak radi određivanja početnog stanja.	09:40									
Uzorci br.:	OHO.AER.1(1-22)	7. Započeti test: dodati 1,25 L sintetičkog influenta (nulta minuta).	10:00									
Ukupan volumen uzorka:	222 mL (10 mL za MLVSS, 6 mL za ostale uzorke)	8. 5. minuta: nastaviti s programom uzorkovanja u skladu s planom provođenja	10:05									
Volumen reaktora:	2,5 L	9. 240. minuta: zaustaviti aeraciju i miješanje.	14:00									
		11. Organizirati uzorke i očistiti sustav.	14:15									
		12. Provjeriti jesu li svi sustavi isključeni.	14:20									
Plan provođenja uzorkovanja												
Vrijeme (min)	-20	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	75
Vrijeme (h)	-0.33	0.00	0.08	0.17	0.25	0.33	0.42	0.50	0.67	0.83	1.00	1.25
Uzorak br.	1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Parametar	AEROBNA FAZA											
HAc (mg L ⁻¹)	56 ¹		203	195.5	184	173	158.5	143.5	135.5	129	119.5	83
PO ₄ -P (mg L ⁻¹)	1.2 ¹											
NH ₄ -N (mg L ⁻¹)	5.3 ¹											
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)	Vidi tablicu											See table
¹ Prosječna vrijednost koncentracije prisutne u sintetičkom supstratu i tekućoj fazi uzorka mulja prije početka testa.												
Plan provođenja uzorkovanja (nastavak)												
Vrijeme (min)	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	
Vrijeme (h)	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75	3.00	3.25	3.50	3.75	4.00	
Uzorak br.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Parametar	AEROBNA FAZA											
HAc (mg L ⁻¹)	73	63	43	38	28	30.5	33	25.5	28	26.5	30	
PO ₄ -P (mg L ⁻¹)											1.8	
NH ₄ -N (mg L ⁻¹)											8.3	
MLSS i MLVSS (mg L ⁻¹)											Vidi tablicu	
Mjerenja MLSS i MLVSS												
Točka uzorkovanja	Čašica br.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	MLSS	MLVSS	Omjer			
Početak aerobne faze ²	1	0.08835	0.10741	0.08849	0.01906	0.01892	1,906	1,892	0.99			
	2	0.08835	0.10759	0.09018	0.01924	0.01742	1,924	1,742	0.91			
	3	0.08834	0.10683	0.08940	0.01849	0.01742	1,849	1,742	0.94			
						Prosjeak	1,893	1,792	0.95			
Kraj aerobne faze	4	0.08868	0.10758	0.08934	0.01890	0.01824	1,890	1,824	0.97			
	5	0.08764	0.10617	0.08874	0.01853	0.01742	1,853	1,742	0.94			
	6	0.08722	0.10648	0.08973	0.01926	0.01675	1,926	1,675	0.87			
						Prosjeak	1,890	1,747	0.93			
² Uzorak uzet prije dodavanja supstrata.												
Sastav biomase												
Točka uzorkovanja	Početak aer.	Kraj aer.										
MLSS (mg L ⁻¹)	1,893	1,890										
MLVSS (mg L ⁻¹)	1,792	1,747										
Omjer	0.95	0.93										
Pepeo (mg L ⁻¹)	101	142										
			Napomena:									
			Acetat (CH ₂ O) 30.03 mg C·mmol ⁻¹									
			Ortofosfat (PO ₄ ³⁻ -P) 31.00 mg P·mmol ⁻¹									
			Amonij (NH ₄ ⁺ -N) 14.00 mg N·mmol ⁻¹									

Prisutnost dušika (kao amonija) i fosfora (kao ortofosfata) na početku (od oko 5,3 odnosno 1,2 mg L⁻¹ u aktivnom mulju) i kraju testa (8,3 odnosno 1,8 mg L⁻¹) ukazuje na to da ti mikro-nutrijenti nisu bili ograničavajući. Zapravo, koncentracije su više na kraju testa zato što je sintetički influent sadržavao oko 28 mg NH₄-N L⁻¹ i 8 mg PO₄-P L⁻¹. Prema tome, nakon razrjeđivanja i potrošnje nutrijenata za sintezu biomase, na kraju aerobnog testa ostalo je 8,3 mg NH₄-N L⁻¹ i 1,8 mg PO₄-P L⁻¹. Ako trebaju biti poznate stvarne potrebe za dušikom (N_{req}) i fosforom (P_{req}), onda se mogu procijeniti pomoću sljedećih izraza:

$$N_{req} = \frac{Y_{COD} \cdot RBCOD_{removed} \cdot N_s}{f_{CV}}$$

$$P_{\text{req}} = \frac{Y_{\text{COD}} \cdot \text{RBCOD}_{\text{removed}} \cdot P_{\text{S}}}{f_{\text{CV}}}$$

Pri tome je Y_{OHO} prirast biomase (u COD-biomasa COD-supstrat⁻¹), $\text{RBCOD}_{\text{removed}}$ je koncentracija RBCOD uklonjena u testu (uzimajući u obzir početnu koncentraciju COD i potencijalne učinke razrjeđenja), N_{S} je dušik potreban za rast biomase pretpostavljen da iznosi oko 0,10 g N g VSS⁻¹, P_{S} je fosfor potreban za rast biomase pretpostavljen da iznosi oko 0,03 g P g VSS⁻¹, f_{CV} je omjer COD-VSS u mulju, za koji se obično pretpostavlja da iznosi 1,42 ili 1,48 g COD g VSS⁻¹ (Metcalf and Eddy, 2003; Ekama and Wentzel, 2008a).

4.7 Dodatna razmatranja i preporuke

4.7.1 Istovremeno pohranjivanje i mikrobnog rasta

Različite studije provedene u laboratorijskim ili sustavima u punom mjerilu su dokazale istovremenu pojavu pohranjivanja RBCOD i mikrobnog rasta u aerobnim uvjetima (van Loosdrecht i sur., 1997; Beun i sur., 2000; Dircks i sur., 2001; Martins i sur., 2003; Sin i sur., 2005). U takvim uvjetima i kada su OHO izloženi visokim gradijentima koncentracije supstrata (poput onih opaženih u reaktorima s čepolikim strujanjem ili u aerobnim selektorima u sustavima s aktivnim muljem), dio RBCOD prisutan u tekućem dijelu suspenzije se prenosi kroz staničnu membranu i pohranjuje kao unutarstanični polimeri kao što su PHA za njihovo daljnje korištenje za mikrobnog rasta kad koncentracije supstrata postanu niske ili iscrpljene (van Loosdrecht i sur., 1997; Beun i sur., 2000, Dircks i sur., 2001). Preostala frakcija RBCOD koja nije unutarstanično pohranjena se izravno koristi za rast biomase (Sin i sur., 2005). Takva kombinacija procesa će dovesti do prividno viših vrijednosti Y_{OHO} budući da aerobni procesi pohranjivanja prividno zahtijevaju manje kisika od izravnog rasta na RBCOD (barem kad se odvija proces pohranjivanja supstrata). Uloga i važnost procesa pohranjivanja u sustavima aktivnog mulja je prepoznata do takvog stupnja da su razvijeni i razmotreni različiti modeli kako bi se dobio bolji opis istovremene pojave pohranjivanja i rasta u sustavima u punom mjerilu (Gujer i sur., 1999; Sin i sur., 2005; Guisasaola i sur., 2005, van Loosdrecht i sur., 2015). Za izvođenje aerobnih testova uklanjanja tvari koji su fokusirani na određivanje brzina uklanjanja, istovremena pojava tih procesa ne bi trebala imati izravne praktične implikacije. Međutim, čitatelj treba biti svjestan da će oni djelovati na profile brzine potrošnje kisika i dovesti do određenih odstupanja u predloženim vrijednostima Y_{OHO} , što je detaljno opisano u drugim izvorima (Gujer i sur., 1999).

4.7.2 Manjak nutrijenata

Premda se to može činiti trivijalnim, prisutnost makro- i mikro-nutrijenata u pravim koncentracijama je bitna za uspješan rad sustava s aktivnim muljem. Oni su obično prisutni u dovoljnim količinama u većini komunalnih otpadnih voda, ali njihovu prisutnost treba provjeriti i potvrditi, naročito ako uređaj za obradu otpadnih voda redovno zaprima industrijske efluente. U tu svrhu, može se napraviti jednostavna procjena potrebe biomase za nutrijentima kao funkcija koncentracije uklanjanja COD (kako je predloženo u ovom poglavlju) i usporediti s koncentracijama nutrijenata u influentu kako bi se procijenilo postoji li dovoljno nutrijenata da se zadovolje potrebe biološkog rasta. Manjak takvih nutrijenata može dovesti do ozbiljnih problema, uključujući pojavu sitnih flokula aktivnog mulja i nitastih bakterija (Eikelboom, 2000; Martins, 2004), što negativno djeluje na taloživost mulja, kvalitetu efluenta i, u ekstremnim slučajevima, može u potpunosti onеспособiti sustav s aktivnim muljem.

4.7.3 Toksičnost ili inhibicija

Obični heterotrofni organizmi su tako rašireni i raznoliki u sustavima s aktivnim muljem da se mogu aklimatizirati i prilagoditi različitim okolišnim i radnim uvjetima i čak izdržati prisutnost različitih potencijalno toksičnih ili inhibitornih spojeva, naročito onih koji dolaze iz industrijskih aktivnosti. Premda se mogu aklimatizirati i prilagoditi takvim različitim uvjetima, inhibitorni učinci mogu dovesti do mikrobne aktivnosti koja je slabija od optimalne. Kako bi se procijenili takvi potencijalni učinci, mogu se provesti dva šaržna testa aktivnosti: jedan s originalnim muljem, a drugi s istim muljem ali opranim u mineralnoj otopini kako bi se uklonili potencijalno inhibitorni ili toksični spojevi (kako je objašnjeno u odjeljku 4.3.5). Kako bi se usporedili rezultati dobiveni iz svakog šaržnog testa aktivnosti, bit će jako korisno procijeniti inhibira li prisutnost određenih spojeva aktivnost OHO. Ipak, treba biti svjestan da takav pristup može biti uspješan jedino ako su inhibirajući učinci (brzo) povrativi.

Prilog I: Jedinični koeficijenti konverzije

Tablica A1 Faktori konverzije (CF) za neto konverzije, stehiometrijske i kinetičke parametre za ugljik, fosfor, dušik i sumpor.

Parametar	Jedinica (mg)	Jedinica (mol)	CF	Jedinica (COD)	CF
ANAEROBNI PARAMETRI					
Otpušteni fosfat/apsorpcija HAC	mg PO ₄ mg C ₂ H ₄ O ₂ ⁻¹	P-mol C-mol ⁻¹	0,32	mg PO ₄ mg COD ⁻¹	0,95
Korištenje glikogena/ apsorpcija HAC	mg (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n mg C ₂ H ₄ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,11	mg COD mg COD ⁻¹	1,12
Nastajanje PHB/apsorpcija HAC	mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n mg C ₂ H ₄ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,40	mg COD mg COD ⁻¹	1,57
Nastajanje PHV/apsorpcija HAC	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n mg C ₂ H ₄ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,50	mg COD mg COD ⁻¹	1,82
Nastajanje PH ₂ MV/apsorpcija HAC	mg (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n mg C ₃ H ₆ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,58	mg COD mg COD ⁻¹	2,01
Otpušteni fosfat/apsorpcija HPr	mg PO ₄ mg C ₃ H ₆ O ₂ ⁻¹	P-mol C-mol ⁻¹	0,80	mg PO ₄ mg COD ⁻¹	0,65
Korištenje glikogena/apsorpcija HPr	mg (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n mg C ₃ H ₆ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	0,92	mg COD mg COD ⁻¹	0,77
Nastajanje PHB/apsorpcija HPr	mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n mg C ₃ H ₆ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,15	mg COD mg COD ⁻¹	1,08
Nastajanje PHV/apsorpcija HPr	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n mg C ₃ H ₆ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,23	mg COD mg COD ⁻¹	1,25
Nastajanje PH ₂ MV/apsorpcija HPr	mg (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n mg C ₃ H ₆ O ₂ ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,30	mg COD mg COD ⁻¹	1,39
Nastajanje PHV/Nastajanje PHB	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,08	mg COD mg COD ⁻¹	1,16.
ANOKSIČNI PARAMETRI					
Razgradnja PHB/uklanjanje nitrata	mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,88	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	1,66
Razgradnja PHV/ uklanjanje nitrata	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	3,10	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	1,92
Razgradnja PH ₂ MV/uklanjanje nitrata	mg (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	3,26	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	2,12
Nastajanje glikogena/uklanjanje nitrata	mg (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,30	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	1,18
Nastajanje poli-P/uklanjanje nitrata	mg (PO ₃ Mg _{0.33} K _{0.33}) _n mg NO ₃ ⁻¹	P-mol N-mol ⁻¹	0,62	-	-
Nastajanje aktivne biomase/uklanjanje nitrata	mg (CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20} P _{0.02}) mg NO ₃	C-mol N-mol ⁻¹	2,38	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	1,52
Razgradnja metanola/uklanjanje nitrata	mg CH ₄ O mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	1,92	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	1,98
Razgradnja etanola/uklanjanje nitrata	mg C ₂ H ₆ O mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,70	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	2,06
Razgradnja acetata/uklanjanje nitrata	mg C ₂ H ₄ O ₂ mg NO ₃ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,08	mg COD mg NO ₃ ⁻¹	1,06
Razgradnja PHB/uklanjanje nitrita	mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,14	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	1,66
Razgradnja PHV/uklanjanje nitrita	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,30	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	1,92
Anoksična razgradnja PH ₂ MV/uklanjanje nitrita	mg (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,42	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	2,12
Nastajanje glikogena/uklanjanje nitrita	mg (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	1,71	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	1,18
Nastajanje poli-P/uklanjanje nitrita	mg (PO ₃ Mg _{0.33} K _{0.33}) _n mg NO ₂ ⁻¹	P-mol N-mol ⁻¹	0,46	-	-
Nastajanje aktivne biomase/uklanjanje nitrita	mg CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20} P _{0.02} mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	1,77	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	1,52
Razgradnja metanola/uklanjanje nitrita	mg CH ₄ O mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	1,43	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	1,98
Razgradnja etanola/uklanjanje nitrita	mg C ₂ H ₆ O mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	2,00	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	2,06
Razgradnja acetata/uklanjanje nitrita	mg C ₂ H ₄ O ₂ mg NO ₂ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	1,54	mg COD mg NO ₂ ⁻¹	1,06
Uklanjanje nitrita/uklanjanje amonija	mg NO ₂ mg NH ₄ ⁻¹	N-mol N-mol ⁻¹	0,39	mg NO ₂ mg NH ₄ ⁻¹	-
Uklanjanje nitrata/uklanjanje amonija	mg NO ₃ /mg NH ₄ ⁻¹	N-mol N-mol ⁻¹	0,29	mg NO ₃ mg NH ₄ ⁻¹	-
Nastajanje aktivne biomase/Potrošnja amonija	mg(CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20} P _{0.02}) mg NH ₄ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	0,69	mg COD mg NH ₄ ⁻¹	-
AEROBNI PARAMETRI					
Razgradnja PHB/potrošnja kisika	mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n mg O ₂ ⁻¹	C-mol mol O ₂ ⁻¹	0,37	mg COD mg O ₂ ⁻¹	1,66
PHV Razgradnja/potrošnja kisika	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n mg O ₂ ⁻¹	C-mol mol O ₂ ⁻¹	0,40	mg COD mg O ₂ ⁻¹	1,92
Razgradnja PH ₂ MV/potrošnja kisika	mg (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n mg O ₂ ⁻¹	C-mol mol O ₂ ⁻¹	0,42	mg COD mg O ₂ ⁻¹	2,12
Nastajanje glikogena/potrošnja kisika	mg (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n mg O ₂ ⁻¹	C-mol mol O ₂ ⁻¹	0,29	mg COD mg O ₂ ⁻¹	1,18
Nastajanje poli-P/potrošnja kisika	mg (PO ₃ Mg _{0.33} K _{0.33}) _n mg O ₂ ⁻¹	P-mol mol O ₂ ⁻¹	0,08	mg (PO ₃ Mg _{0.33} K _{0.33}) _n mg O ₂ ⁻¹	-
Nastajanje aktivne biomase/potrošnja kisika	mg (CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20} P _{0.02}) mg O ₂ ⁻¹	C-mol mol O ₂ ⁻¹	0,31	mg COD mg O ₂ ⁻¹	1,52
Nastajanje aktivne biomase/Potrošnja amonija	mg (CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20} P _{0.02}) mg NH ₄ ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	0,69	mg COD mg NH ₄ ⁻¹	1,52
OPĆI PARAMETRI					
-	mg P mg C ⁻¹	P-mol C-mol ⁻¹	0,39	-	-
-	mg C mg C ⁻¹	C-mol C-mol ⁻¹	1,00	-	-
-	mg C mg N ⁻¹	C-mol N-mol ⁻¹	1,16	-	-
-	mg P mg N ⁻¹	P-mol N-mol ⁻¹	0,45	-	-
-	mg C mg O ₂ ⁻¹	C-mol O ₂ -mol ⁻¹	1,33	-	-
-	mg P mg O ₂ ⁻¹	P-mol O ₂ -mol ⁻¹	1,04	-	-
MOLARNE MASE					

HF	mg CH ₂ O ₂	C-mol	0,022	mg COD	0,35
HAc	mg C ₂ H ₄ O ₂	C-mol	0,033	mg COD	1,06
HPr	mg C ₃ H ₆ O ₂	C-mol	0,041	mg COD	1,53
HBr	mg C ₄ H ₈ O ₂	C-mol	0,045	mg COD	1,80
Laktat	mg C ₃ H ₆ O ₃	C-mol	0,033	mg COD	1,06
Metanol	mg CH ₄ O	C-mol	0,031	mg COD	1,98
Etanol	mg C ₂ H ₆ O	C-mol	0,043	mg COD	2,06
Glukoza	mg C ₆ H ₁₂ O ₆	C-mol	0,033	mg COD	1,06
Sulfid	mg S ²⁻	S-mol	0,031	mg COD	2,00
Ugljikov dioksid	mg CO ₂	C-mol	0,023	-	-
Fosfat	mg PO ₄	P-mol	0,011	-	-
Dušik	mg N ₂	N-mol	0,071	-	-
Amonij	mg NH ₄	N-mol	0,055	-	-
Nitrat	mg NO ₃	N-mol	0,048	-	-
Nitrit	mg NO ₂	N-mol	0,065	-	-
Kisik	mg O ₂	mol O ₂	0,031	-	-
Sulfat	mg SO ₄	S-mol	0,010	-	-
PHB	mg (C ₄ H ₆ O ₂) _n	C-mol	0,046	mg COD	1,66
PHV	mg (C ₅ H ₈ O ₂) _n	C-mol	0,050	mg COD	1,92
PH2MV	mg (C ₆ H ₁₀ O ₂) _n	C-mol	0,053	mg COD	2,12
Glikogen	mg (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	C-mol	0,037	mg COD	1,18
Poli-P	mg (PO ₃ Mg _{0.33} K _{0.33}) _n	P-mol	0,010	-	-
Aktivna biomasa	mg (CH _{2.09} O _{0.54} N _{0.20} P _{0.02})	C-mol	0,038	mg COD	1,52

DODATNI FAKTORI

Najčešći udio aktivne biomase u VSS u kulturama obogaćenima EBPR-om ^a	mg VSS	mg aktivne biomase	0,80	-
--	--------	--------------------	------	---

^a Sadržaj glikogena u mulju varira, ovisno o sadržaju poli-P (Welles i sur., 2015b).

5. Smjernice za provođenje respirometrije

5.1 UVOD

Cilj ovog poglavlja je dati praktične smjernice za procjenu brzine respiracije biomase. Pristup će biti orijentiran na praksu i vodit će se metodama. Ipak, pružit će se i određeni osnovni biokemijski podaci o respiraciji kako bi se razumjelo na koji je način respiracija povezana s mikrobnim iskorištavanjem supstrata i rastom. Objasniti ćemo da se respiracija može procijeniti u smislu brzine apsorpcije krajnjeg akceptora elektrona, kao što je molekularni kisik ili nitrat, ili, u slučaju anaerobne respiracije, u smislu brzine proizvodnje metana ili sulfida. Mjerenje brzine potrošnje (ili proizvodnje), odnosno respirometrija, će se objasniti pomoću različitih mjernih principa, a pružit ćemo i neke praktične preporuke. Fokus će biti na laboratorijskim testovima u kojima se koriste uzorci biomase i otpadne vode. Međutim, većina mjernih principa se u pravilu može automatizirati, ili su već automatizirana u komercijalnim respirometrima, radi automatskog mjerenja brzine respiracije ili čak *in-line* u uređaju za obradu otpadne vode.

Informacije koje se mogu dobiti iz respirometrijskih mjerenja mogu se podijeliti u dvije vrste: izravne i neizravne (Spanjers i sur., 1998). Izravne informacije, poput brzine aerobne respiracije ili specifične metanogene aktivnosti, pružaju informacije o stvarnoj aktivnosti biomase i mogu se na primjer koristiti za evidentiranje respirograma (vremenskih nizova brzina respiracije) u laboratoriju. Neizravne se informacije odnose na varijable koje se izvode iz respirometrijskih mjerenja, kao što su koncentracija mikroorganizama, koncentracija supstrata i kinetički parametri. U ovom slučaju respirometrijska mjerenja se koriste kao ulazni podaci za jednostavne aritmetičke izračune ili čak podešavanje modela.

Budući da je cilj ovog poglavlja dati tek praktične smjernice za procjenu brzine respiracije, biokemijski kontekst će se objasniti tek u osnovnim crtama, a čitatelja se upućuje na literaturu o biokemiji (Alberts i sur., 2002; Nelson i Cox, 2008). Budući da se praktične smjernice fokusiraju na respirometrijske metode koje se mogu lako provesti u većini laboratorija, neće biti rigorozne rasprave o svim respirometrijskim mjernim principima, a za cjelovitiji opis koncepta upućujemo na Spanjers i sur. (1998). Za raspravu o korištenju izravnih i neizravnih respirometrijskih informacija u kontroli procesa aktivnog mulja čitatelj može konzultirati Copp i sur. (2002).

5.1.1 Osnove respiracije

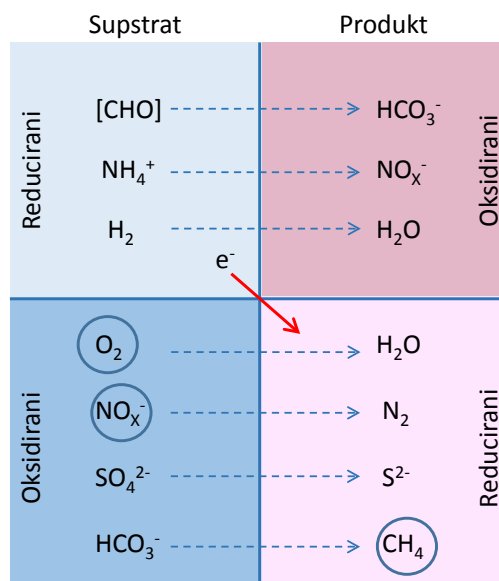
U biokemijskom smislu, mikroba respiracija je metabolički proces proizvodnje adenozin trifosfata (ATP) u kojemu ili organski ili anorganski spojevi služe kao donor elektrona, a anorganski spojevi služe kao krajnji akceptor elektrona (npr. kisik, nitrat, sulfat). Univerzalni nositelj energije, ATP, nastaje kako se elektroni uklonjeni iz donora elektrona prenose duž lanca za prijenos elektrona od jednog metaboličkog nositelja do idućeg i, u konačnici, do krajnjeg akceptora elektrona. Na taj način, mikroorganizmi pretvaraju energiju unutarmolekularnih veza u donoru elektrona u visoko-energetske fosfatne veze ATP-a (katabolizam). Energija se potom koristi za sintetiziranje različitih molekularnih komponenti potrebnih za rast (anabolizam), održavanje i reprodukciju stanica.

Tijekom procesa respiracije, donor elektrona se pretvara u svoj oksidirani oblik, a akceptor elektrona se pretvara u svoj reducirani oblik. U slučaju ugljičnog donora (organski spojevi), oksidirani oblik je ugljikov dioksid. Ako je akceptor elektrona molekularni kisik, tada je njegov reducirani oblik voda. Pretvorbu ugljičnog donora s kisikom kao akceptorom elektrona provode heterotrofne bakterije.

Anorganski donori koje u njihov oksidirani oblik pretvaraju aerobni mikroorganizmi, gdje kisik služi kao krajnji akceptor elektrona, uključuju amonij i nitrit, divalentno željezo i sulfid, a pretvorbe provode nitrifikanti (bakterije koje oksidiraju amonijak i nitrit), bakterije koje oksidiraju željezo odnosno bakterije koje oksidiraju sulfid. U ovom slučaju CO₂ je izvor ugljika, a organizmi se zovu autotrofi. Neaerobni mikroorganizmi kao krajnji akceptor elektrona koriste anorganske spojeve koji nisu kisik, poput nitrita, nitrata, sulfata i ugljikovog dioksida. U tim slučajevima govorimo o anoksičnim (nitrit, nitrat) i anaerobnim procesima (CO₂, sulfat). Treba uzeti na znanje da se u obradi otpadne vode različiti procesi

respiracije mogu odvijati istovremeno, pri čemu različiti mikroorganizmi koriste raznolike supstrate i krajnje akceptore elektrona ili se nadmeću za iste supstrate i krajnje akceptore elektrona.

Slika 5.1 sadrži shematski prikaz nekih primjera metaboličkih konverzija. Treba primijetiti da se i donor elektrona i krajnji akceptor elektrona mogu smatrati supstratom, poput mnogih drugih komponenti koje ulaze u metaboličke putove. U respirometriji, respiracija se općenito smatra potrošnjom O_2 , NO_2^- ili NO_3^- ili (u anaerobnoj respirometriji) proizvodnjom CH_4 . Općenito, metaboličke konverzije uključene u respiraciju su kataboličke reakcije, a nekoliko plinovitih spojeva potrošenih ili proizvedenih tijekom tih reakcija može se koristiti za procjenu glavnih metaboličkih konverzija. Međutim, u načelu se mogu razmatrati i druge tvari, kao što je potrošnja NH_4^+ , HS^- ili S^{2-} , ili SO_4^{2-} , ili proizvodnja N_2 . Ostali produkti koji nisu uključeni u sliku, ali koji su također povezani s respiracijom uključuju H^+ i toplinu, a povezane metode su titrimetrija odnosno kalorimetrija. Ipak, one su izvan opsega ovog poglavlja.



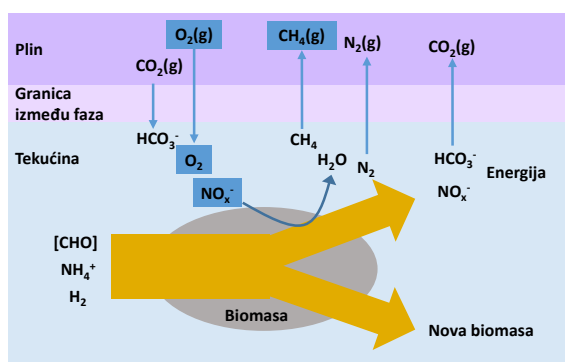
Slika 5.1 Shematski prikaz nekih primjera metaboličkih konverzija. e^- označava elektron koji se prenosi od donora elektrona do krajnjeg akceptora elektrona. [CHO] označava bilo koji ugljikohidrat. Zaokruženi spojevi se općenito koriste kao mjerene varijable u respirometriji.

Budući da se energija generirana tijekom procesa mikrobne respiracije koristi za funkcije rasta i održavanja stanica, kao što su reprodukcija, mobilnost stanica, osmotska aktivnost itd., brzina respiracije je povezana s brzinom tih procesa. Međutim, ta dva procesa je teško razlikovati. Kao primjer, razmotrite aerobnu respiraciju heterotrofnih mikroorganizama koji koriste ugljični (organski) supstrat kao donor elektrona, a kisik kao krajnji akceptor elektrona. Samo dio (1-Y) potrošenog organskog supstrata se oksidira kako bi se dobila energija za rast i održavanje stanica. Ostatak, obično polovica (na temelju težina/težina) molekula supstrata (prinos Y) se reorganizira u novu staničnu masu. Zbog toga je brzina potrošnje kisika povezana s rastom biomase kroz prinos. U anaerobnoj respiraciji hidrogenotrofnih metanogena, gdje se supstrat H_2 koristi kao donor elektrona, a CO_2 kao akceptor elektrona, samo mali dio Y supstrata se reorganizira u biomasu, dok se najveći dio oksidira da bi se proizveo CH_4 .

U aktivnom mulju, uklanjanje ugljičnog supstrata nije jedini proces kojim se troši kisik. Pored toga što heterotrofna masa troši kisik, postoje neki drugi biološki procesi koji mogu pridonijeti respiraciji aktivnog mulja, kao što je oksidacija anorganskih spojeva koju vrše nitrifikanti i ostale bakterije, i specifične mikrobne oksidacijske reakcije koje ubrzavaju oksidaze i mono-oksidgeaze. Nitrifikacijske bakterije ugrađuju tek manji dio amonija prisutnog u supstratu u novu biomasu, dok se većina supstrata (amonij) oksidira za proizvodnju energije. Te autotrofne bakterije koriste otopljeni ugljikov dioksid kao izvor ugljika za novu biomasu. U usporedbi s heterotrofnom biomasom, nitrifikanti trebaju više kisika za svoj rast. Nitrifikacija se zbiva u dva koraka: oksidacija amonijaka do nitrita i oksidacija nitrita do nitrata. Poput nitrifikanata, i autotrofne bakterije koje oksidiraju sumpor i bakterije koje oksidiraju željezo

umjesto organske tvari koriste anorganske spojeve za dobivanje energije i koriste ugljikov dioksid ili karbonat kao izvor ugljika. Bakterije koje oksidiraju sumpor mogu oksidirati sumporovodik (ili druge reducirane spojeve sumpora) u sumpornu kiselinu. Bakterije koje oksidiraju željezo oksidiraju anorgansko dvovalentno željezo u trovalentni oblik da bi se dobila energija. Osim bakterija, u aktivnom mulju su prisutne i praživotinje te ostali predatori organizmi više razine, koji također troše kisik. Napokon, neki anorganski donori elektrona kao što su dvovalentno željezo i sulfid mogu biti kemijski oksidirani, čime se također troši kisik.

Svi gore spomenuti procesi kojima se troši kisik pridonose ukupnoj brzini respiracije aktivnog mulja. Obično je namjera respirometrije mjeriti jedino biološku potrošnju kisika, a ponekad se nastoje razlikovati različiti biološki procesi kao što su heterotrofna oksidacija i nitrifikacija. Međutim, u mnogim je slučajevima teško razlikovati specifične mikrobne procese i identificirati kemijsku potrošnju kisika.



Slika 5.2 Odnos između respiracije, korištenja i rasta supstrata za tri vrste supstrata $[CHO]$, NH_4^+ i H_2 i srodnog akceptora elektrona npr. O_2 , NO_3^- i HCO_3^- (Spanjers i sur., 1998).

5.1.2 Osnove respirometrije

Respirometrija se općenito definira kao mjerenje i tumačenje brzine biološke potrošnje anorganskog akceptora elektrona u dobro definiranim eksperimentalnim uvjetima. U načelu, sve tvari prikazane u 'obliku supstrat-oksidirani' istaknute na slici 5.1 mogu služiti kao mjerena varijabla. Iznimka je anaerobna respirometrija gdje se općenito mjeri brzina proizvodnje krajnjeg reduciranog produkta, metana. To je stoga što su tijekom anaerobne razgradnje uključeni brojni posrednici i nije moguće mjeriti brzinu potrošnje tih posrednih supstrata. Štoviše, metanogeneza općenito nije korak koji ograničava brzinu. Prema tome, brzina proizvodnje metana odražava proces koji ograničava brzinu (uglavnom hidroliza u slučaju složenog supstrata).

Treba napomenuti da se u načelu može mjeriti i brzina potrošnje donora elektrona, kao što je $[CHO]$, NH_4^+ i H_2 . Međutim, to se u pravilu ne smatra respirometrijom i zbog toga što tvari donora elektrona kao što su $[CHO]$ i NH_4^+ također mogu biti potrošene u procesima koji nisu povezani s generiranjem energije, na primjer apsorpcijom u biomasi, zbog čega nisu jasno povezani s generiranjem energije. Na kraju, mjerenje proizvodnje CO_2 može se smatrati respirometrijom zato što je proizvodnja CO_2 povezana s generiranjem energije (slika 5.2). Međutim, budući da je CO_2 u plinskoj fazi povezan s karbonatnim sustavom, bit će potrebna dodatna mjerenja da se izmjeri pH i koncentracija bikarbonata u tekućoj fazi.

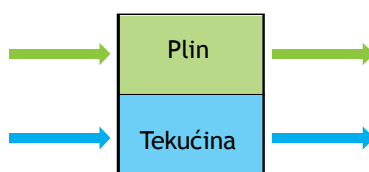
Respirometrija uvijek uključuje određenu tehniku za procjenu brzine kojom biomasa apsorbira akceptor elektrona (poput O_2 i NO_3^-) iz tekućine ili proizvodi njegov reducirani oblik (poput CH_4); vidi sliku 5.2. Za akceptore elektrona kao što su O_2 i NO_3^- to se općenito temelji na mjerenju koncentracije akceptora elektrona u tekućoj fazi i određivanju njegove masene bilance kako bi se iz toga izvela brzina respiracije. Ako se mjeri potrošnja kisika i prisutna je plinovita faza, u obzir treba uzeti i masenu bilancu kisika u plinskoj fazi. Slično tome, ako se mjeri brzina proizvodnje metana, u obzir treba uzeti masenu bilancu metana i u tekućoj fazi i u plinskoj fazi.

Za aerobnu respirometriju, odnosno procjenu brzine kojom biomasa apsorbira O₂, Spanjers i sur. (1998) su predstavili klasifikaciju respirometrijskih principa koji se temelje na dva jednostavna kriterija: prvi je mjesto mjerenja kisika, tekuća ili plinska faza, a drugi je stanje plinske i tekuće faze, od kojih obje mogu biti u stanju gibanja (pokretni) ili u mirovanju (statični). Utvrđeno je da bi se većina od predloženih respirometrijskih naprava mogla svrstati u jednu od osam kategorija formiranih takvom strukturom. Štoviše, za svaku od kategorija u literaturi su pronađeni primjeri primjene.

5.2 OPĆA METODOLOGIJA RESPIROMETRIJE

5.2.1 Osnove respirometrijske metodologije

Brzina respiracije se obično mjeri respirometrom. Respirometri se kreću u rasponu od jednostavne ručno upravljane boce opremljene senzorom do složenih instrumenata koji rade u potpunosti automatski. U nekim slučajevima sam bioreaktor uređaja za obradu može služiti kao respirometar. Uz iznimku potonjeg, svojstvo zajedničko svim respirometrima je reaktor, odvojen od bioreaktora, gdje se okupljaju različite komponente (biomasa, supstrat itd.). Rad svih respirometara uključuje određenu tehniku za procjenu brzine kojom biomasa apsorbira neku komponentu iz tekućine ili proizvodi komponentu (slika 5.2). U prošlosti su razvijene brojne tehnike. Međutim, Spanjers i sur. (1998) su otkrili da se sve mjerne tehnike za brzinu respiracije mogu razvrstati u samo osam osnovnih principa prema dva kriterija: (1) faza u kojoj se mjeri koncentracija (plinska (G) ili tekuća (L)) i (2) da li postoji li ili ne, ulaz i izlaz tekućine i plina (pokretni (F) ili statični (S)). Rad svih postojećih respirometara može se objasniti u smislu tih kriterija. Na slici 5.3 prikazana je generička shema respirometra. Treba primijetiti da plinska faza uključuje i mjehuriće raspršene u tekućoj fazi. U kasnijim dijelovima, principi će se obraditi prema gore navedenim kriterijima. Nećemo raspravljati o korisnosti različitih mjernih tehnika budući da smatramo da svaka tehnika ima svoje prednosti, ovisno o specifičnoj primjeni, pod uvjetom da su ispunjeni ispravni uvjeti mjerenja.



Slika 5.3 Generička shema respirometra.

5.2.2 Općeniti principi: više od samo kisika

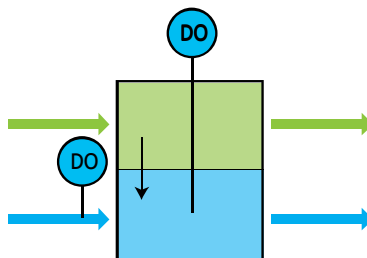
5.2.2.1 Principi na temelju mjerenja u tekućoj fazi

Većina tehnika koje se temelje na mjerenju u tekućoj fazi koriste posebnu elektrodu ili senzor. Pouzdano mjerenje brzine respiracije je moguće jedino ako je senzor ispravno kalibriran i ako je u obzir uzet niz okolišnih varijabli, kao što su temperatura i tlak. Senzori imaju i vrijeme odgovora koje mora biti uzeto u obzir u nekim respirometrijskim strukturama.

Respirometri koji se temelje na mjerenju koncentracije otopljenog kisika (DO) u tekućoj fazi koriste masenu bilancu DO iznad tekuće faze. Zamislite sustav koji se sastoji od tekuće faze, koja sadrži biomasu, i plinsku fazu, pri čemu u objema postoji idealno miješanje i imaju ulaz i izlaz (slika 5.4). Pretpostavlja se da se može izmjeriti koncentracija DO u tekućoj fazi. Masena bilanca DO iznad tekuće faze iznosi:

$$\frac{d(V_L \cdot S_{O_2})}{dt} = Q_{in} \cdot S_{O_2, in} - Q_{out} \cdot S_{O_2} + V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - V_L \cdot r_{O_2} \quad 5.1$$

U gornjem izrazu S_{O_2} je koncentracija DO u tekućoj fazi (mg L^{-1}), $S_{O_2}^*$ je koncentracija zasićenja DO u tekućoj fazi (mg L^{-1}), $S_{O_2, \text{in}}$ je koncentracija DO u tekućoj fazi koja ulazi u sustav (mg L^{-1}), kLa je koeficijent masenog prijenosa kisika, na temelju volumena tekućine (h^{-1}), Q_{in} je brzina protoka tekućine koja ulazi u sustav (L h^{-1}), Q_{out} je brzina protoka tekućine koja izlazi iz sustava (L h^{-1}), r_{O_2} je brzina respiracije biomase u tekućini ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$), a V_L je volumen tekuće faze (L).



Slika 5.4 Princip mjerenja u tekućoj fazi, pokretni plin, pokretna tekućina (LFF).

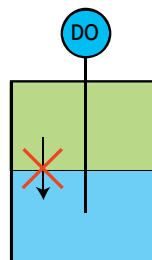
Treba primijetiti da, budući da se radi o masenoj bilanci iznad tekuće faze, jedn. 5.1 ne sadrži članove protoka plina. Prvi i drugi član na desnoj strani jednadžbe predstavljaju advektivni protok DO u ulaznom i izlaznom toku tekućine. U većini sustava Q_{in} i Q_{out} će biti jednaki, tako da je tekući volumen konstantan. Treći član opisuje maseni prijenos kisika iz plinske faze u tekuću fazu. Zadnji član sadrži brzinu respiracije koju treba izvesti iz masene bilance. Prema tome, S_O se mora izmjeriti, a svi ostali koeficijenti moraju biti poznati ili zanemareni (odnosno nemaju utjecaja). U praksi, određivanje r_{O_2} se može pojednostaviti na nekoliko načina. U onome što slijedi pretpostavlja se da je tekući volumen konstantan, tako da se članovi u jedn. 5.1 mogu podijeliti s V_L .

- Statični plin, statična tekućina (LSS)

Jedan pristup je koristiti metodu bez protoka tekućine i masenog prijenosa kisika (slika 5.5). U takvom slučaju otpadaju prva tri člana na desnoj strani jedn. 5.1 i masena bilanca se reducira na:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = -r_{O_2} \quad 5.2$$

Prema tome, kako bi se dobila brzina respiracije, treba odrediti jedino diferencijalni član. To se može postići mjerenjem smanjivanja DO kao funkcije vremena zbog respiracije, što je jednako aproksimiranju diferencijalnog člana s članom konačne razlike: $\Delta S_{O_2}/\Delta t = -r_{O_2}$. Za ovaj je princip tipično to da se DO nakon nekog vremena može iscrpiti, tako da za daljnje mjerenje ponovne aeracije r_{O_2} koncentraciju DO treba ponovno dovesti do više razine. DO i supstrat ograničavaju respiraciju kad njihove koncentracije postanu preniske, što dovodi do nelinearnog smanjivanja DO, što pak komplicira procjenu diferencijalnog člana. Valja primijetiti da na slici 5.5 postoji plinska faza. Međutim, pretpostavlja se da nema masenog prijenosa iz plinske faze u tekuću fazu. U praksi, kako bi se spriječio unos kisika u tekućinu, plinska faza može biti odsutna. Na tom se principu temelji procedura za određivanje r_{O_2} u skladu sa standardnim metodama (APHA i sur., 2012).



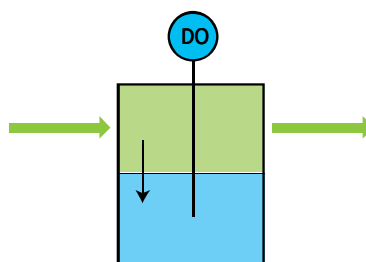
Slika 5.5 Princip mjerenja utekućoj fazi, statični plin, statična tekućina (LSS).

- Pokretni plin, statična tekućina (LFS)

Nedostatak potrebe za ponovnom aeracijom može se eliminirati kontinuiranim aeriranjem biomase. Tada u masenu bilancu mora biti uključen član masenog prijenosa $kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$ (jedn. 5.3):

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} \quad 5.3$$

Kako bi se dobio r_{O_2} , mora se odrediti i diferencijalni član i član za maseni prijenos. Za izračun potonjeg, mora biti poznat koeficijent masenog prijenosa (kLa) i koncentracija zasićenja DO ($S_{O_2}^*$). Te koeficijente treba redovno određivati zato što ovise o uvjetima u okolini kao što su temperatura, barometarski tlak i svojstva tekućine (viskozitet, salinitet itd.). Najjednostavniji pristup je odrediti ih pomoću zasebnih testova ponovne aeracije i literaturnih tablica. Drugi pristup je procijeniti koeficijente na temelju mjerenja dinamike promjene koncentracije DO primjenom tehnika procjene parametara. Prednost potonje metode je u tome što se vrijednosti koeficijenata aeracije mogu relativno lako ponovo izmjeriti. Ovaj respirometrijski princip omogućuje mjerenje r_{O_2} pri gotovo konstantnoj koncentraciji DO, čime se uklanja ovisnost r_{O_2} o koncentraciji DO (pod uvjetom da je $DO \gg 0 \text{ mg L}^{-1}$). Treba primijetiti da, premda je na slici 5.6 prikazan ulaz i izlaz iz plinske faze, u jedn. 5.3 nema člana za protok plina. Nema potrebe razmatrati članove za protok plina ako je $S_{O_2}^*$ poznat ili određen.

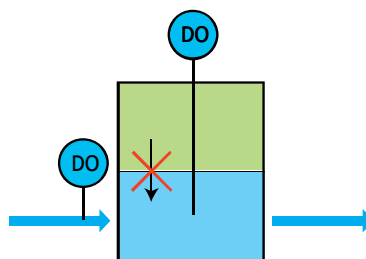


Slika 5.6 Princip mjerenja u tekućoj fazi, pokretni plin, statična tekućina (LFS).

- Statični plin, pokretna tekućina (LSF)

Ponavljanje aeracije ili procjena koeficijenata prijenosa kisika, kao kod već gore navedenih principa mjerenja, mogu se izbjeći kad tekućina s dovoljno visokom ulaznom koncentracijom DO kontinuirano teče kroz zatvorenu i u cijelosti izmiješanu stanicu bez plinske faze (slika 5.7). Sada u masenu bilancu treba uključiti članove za protok tekućine (jedn. 5.4):

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = \frac{Q_{in}}{V_L} \cdot S_{O_2,in} - \frac{Q_{out}}{V_L} \cdot S_{O_2} - r_{O_2} \quad 5.4$$



Slika 5.7 Princip mjerenja u tekućoj fazi, statični plin (nema), pokretna tekućina (LSF).

Objek koncentracije DO, $S_{O_2, in}$ i S_{O_2} , se moraju izmjeriti da bi se mogao izračunati r_{O_2} . U respirometru, Q_{in} i V_L su konstante instrumenta, zbog čega se pretpostavlja da su poznate ili kalibrirane. Taj princip je zapravo kontinuirani pandan onog objašnjenog u jedn. 5.2, i kao takav je osjetljiv i na učinak ograničavanja supstrata i DO. Međutim, učinak ograničavajućeg supstrata može se ukloniti kontinuiranom dobavom supstrata (otpadna voda) i DO u respiracijsku stanicu.

- Pokretni plin, pokretna tekućina (LFF)

Bez gornjih pojednostavljenja, cjelovita masena bilanca (jedn. 5.1) vrijedi za princip prikazan na slici 5.4. Kako bi se pomoću tog principa dobila mjerenja brzine respiracije, potrebna je kombinacija pristupa navedenih za gore pojednostavljene principe. Na primjer, moraju se izmjeriti protoci i ulazne koncentracije kisika, dok se koeficijenti kLa i $S_{O_2}^*$ moraju procijeniti, npr. tako da ih se procijeni na temelju dinamike koncentracije DO.

5.2.2.2 Principi na temelju mjerenja u plinskoj fazi

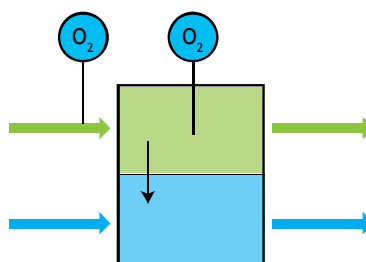
Respirometrijske tehnike utemeljene na mjerenju plinovitog kisika uvijek se bave s dvije faze: tekuća faza koja sadrži biomasu koja respirira i plinska faza gdje se odvija mjerenje kisika. Glavni razlog mjerenja u plinskoj fazi je da se izbjegnu poteškoće povezane s ometajućim kontaminantima koji su uobičajeni u tekućoj fazi (npr. formiranje sloja biomase na senzoru). Plinoviti kisik se mjeri fizikalnim metodama kao što je paramagnetna metoda ili plinometrijskim metodama.

Plinometrijskim metodama mjere se promjene u koncentraciji plinovitog kisika. Prema jednadžbi stanja idealnog plina $P \cdot V = n \cdot R \cdot T$, promjene u koncentraciji kisika mogu se izvesti iz promjena u tlaku (ako se volumen održava konstantnim, manometrijska metoda) ili promjena u volumenu (ako se tlak održava konstantnim, volumetrijska metoda). Te se metode obično primjenjuju u zatvorenim mjernim sustavima (nema ulaznih i izlaznih tokova), što može uzrokovati ponovno provođenje aeracije, a time je i privremeno potrebno obustaviti mjerenja. To ograničava mogućnosti kontinuiranog praćenja brzine respiracije. Međutim, obustave zbog ponovljenih aeracija nisu potrebne ako se potrošeni kisik nadopuni poznatom brzinom, npr. dobavom čistog kisika iz spremnika ili pomoću elektrolize. Brzina kojom se kisik dobavi onda je jednaka brzini biološke respiracije (uz pretpostavku neizmerno brzog prijenosa mase u tekućinu). Budući da se ugljikov dioksid ispušta iz tekuće faze kao rezultat biološke aktivnosti, taj plin treba ukloniti iz plinske faze kako bi se izbjegla interferencija s mjerenjem kisika. U praksi se to radi pomoću lužina kemijskom apsorpcijom proizvedenog ugljikovog dioksida.

Respirometrijski principi koji se temelje na mjerenju plinovitog kisika također koriste masene bilance kisika za izvođenje brzine respiracije. Međutim, pored masene bilance u tekućoj fazi (jedn. 5.1), u obzir se mora uzeti i bilanca u (idealno izmiješanoj) plinskoj fazi (slika 5.8):

$$\frac{d}{dt}(V_G \cdot C_{O_2}) = F_{in} \cdot C_{O_2, in} - F_{out} \cdot C_{O_2} - V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) \quad 5.5$$

U gornjem izrazu, C_{O_2} je koncentracija O_2 u plinskoj fazi ($mg L^{-1}$), $C_{O_2, in}$ je koncentracija O_2 u plinu koji ulazi u sustav ($mg L^{-1}$), F_{in} je brzina protoka plina koji ulazi u sustav ($L h^{-1}$), F_{out} je brzina protoka plina koji izlazi iz sustava ($L h^{-1}$), a V_G je volumen plinske faze (L).



Slika 5.8 Princip mjerenja u plinskoj fazi, pokretni plin, pokretna tekućina (GFF).

Član $V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$ predstavlja brzinu prijenosa mase kisika iz plinske faze u tekuću fazu, i to je veza između dviju faza. Iz masenih bilanci (jedn. 5.1 i jedn. 5.5) proizlazi da, kako bi se izračunao r_{O_2} , mora se izmjeriti C_{O_2} (izravno ili pomoću općeg plinskog zakona, vidi gore) i potrebno je znati S_{O_2} . Međutim, S_{O_2} se ne mjeri pri upotrebi principa mjerenja samo u plinskoj fazi. Kod ovih respirometrijskih principa pretpostavlja se da su koncentracije kisika u plinskoj i tekućoj fazi u ravnoteži, odnosno da je maseni prijenos dovoljno brz ($kLa \rightarrow \infty$), tako da $S_{O_2} \approx S_{O_2}^*$. Budući da je, po definiciji, koncentracija zasićenja DO proporcionalna koncentraciji O_2 u plinskoj fazi:

$$S_{O_2}^* = H \cdot C_{O_2} \quad 5.6$$

razumno je tvrditi da:

$$S_{O_2} = H \cdot C_{O_2} \quad 5.7$$

i da:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = H \cdot \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad 5.8$$

Prema tome, mjerenje u plinskoj fazi je dobar prikaz stanja u tekućoj fazi, pod uvjetom da se zna Henryjeva konstanta proporcionalnosti H , npr. iz kalibracije ili tablica, te da je koeficijent masenog prijenosa visok. Valjanost ove pretpostavke o ravnoteži bi trebalo kritički evaluirati.

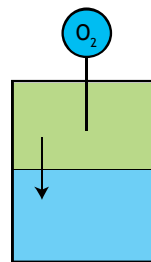
- Statični plin, statična tekućina (GSS)

Najjednostavnija tehnika mjerenja brzine respiracije u plinskoj fazi temelji se na uvjetima statične tekuće faze i statične plinske faze, odnosno nema ni ulaza niti izlaza (slika 5.9). Pored masene bilance DO u tekućoj fazi, mora se razmotriti i masena bilanca u plinskoj fazi:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} \quad 5.9$$

$$\frac{d(V_G \cdot C_{O_2})}{dt} = -V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) \quad 5.10$$

Prema tome, kako bi se izračunao r_{O_2} , mora se izmjeriti promjena u koncentraciji kisika u plinskoj fazi, dC_{O_2}/dt , i potrebno je znati dS_{O_2}/dt (jedn. 5.9). Pomoću senzora kisika se može mjeriti dC_{O_2}/dt . Ako se koristi plinometrijska metoda, dC_{O_2}/dt se odnosi na promjenu u volumenu ili promjenu u tlaku (jedn. 5.10).



Slika 5.9 Princip mjerenja u plinskoj fazi, statični plin, statična tekućina (GSS).

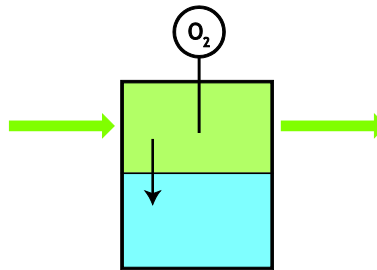
Kod ovog principa, postoji ista restrikcija kao i kod najjednostavnijeg principa utemeljenog na DO: kada se kisik iscrpi, mora ga se nadopuniti npr. otvaranjem plinske faze kako bi se nastavilo mjerenje r_{O_2} .

- Pokretni plin, statična tekućina (GFS)

Druga tehnika se temelji na fazi pokretnog plina, odnosno biomasu se kontinuirano aerira zrakom (ili čistim kisikom) kako bi se osigurala dovoljna prisutnost kisika (slika 5.10). U usporedbi s jedn. 5.10, u masenu bilancu za plinsku fazu treba uključiti dva člana za prijenos:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} \quad 5.11$$

$$\frac{d(V_G \cdot C_{O_2})}{dt} = F_{in} \cdot C_{O_2,in} - F_{out} \cdot C_{O_2} - V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) \quad 5.12$$

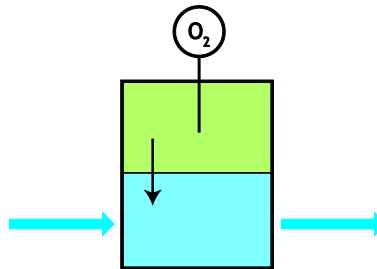


Slika 5.10 Princip mjerenja u plinskoj fazi, pokretni plin, statična tekućina (GFS).

Kako bi se omogućio izračun r_{O_2} , pored varijabli prethodne tehnike, moraju se znati protoci plina, F_{in} i F_{out} , i koncentracije kisika u ulaznim i izlaznim tokovima, $C_{O_2,in}$ i C_{O_2} . Među njima, obično se mjeri C_{O_2} , a ostali se zadaju ili znaju. Plinometrijska metoda ovdje nije dovoljno precizna evidentna, pa se C_{O_2} zbog toga mjeri paramagnetnom metodom.

- Statični plin, pokretna tekućina (GSF)

Primjena principa mjerenja u plinskoj fazi sa statičnom plinskom fazom i pokretnom tekućom fazom (slika 5.11) dosad nije pronađen u literaturi ili u praksi.



Slika 5.11 Princip mjerenja u plinskoj fazi, statični plin, pokretna tekućina (GSF).

- Pokretni plin, pokretna tekućina (GFF)

Princip mjerenja u plinskoj fazi može se primijeniti i na velike bioreaktore. U tom slučaju postoje tokovi ulazne i izlazne tekućine za reaktor, a masenoj bilanci u tekućoj fazi moraju se dodati članovi za prijenos (jedn. 5.1). Pretpostavka o proporcionalnosti između C_{O_2} i S_{O_2} (jedn. 5.7) postaje još važnija jer, osim toga, o njoj ovisi i član za izlaz iz tekućine faze. Tada bi moglo biti korisno dodatno mjerenje otopljenog kisika za točnu procjenu brzine respiracije. Tehnika tada više ne bila temeljena na čistom principu mjerenja u plinskoj fazi. Ipak, valja primijetiti da, općenito, kombiniranje principa L i G može dovesti do pouzdanijih mjerenja brzine respiracije. U tablici 5.1 je sažeto prikazano osam mjernih principa. Prvi stupac sadrži nazive članova masene bilance, a drugi stupac matematičke ekvivalente. U narednim stupcima su navedeni respirometrijski principi, od kojih su prva četiri kada se mjeri u tekućoj fazi, a ostala su četiri kada se mjeri u plinskoj fazi. Masene bilance za svaki princip se formiraju množenjem matematičkih članova s koeficijentima u stupcu odgovarajućeg principa i njihovim zbrajanjem.

Tablica 5.1 Pregled mjernih principa brzina respiracije.

Respirometrijski princip → Proces ↓	Jednadžba ↓	Broj slike →	Mjerenje u TEKUĆOJ fazi				Mjerenje in PLINSKOJ fazi			
			LSS 3.5	LFS 3.6	LSF 3.7	LFF 3.4	GSS 3.9	GFS 3.10	GSF 3.11	GFF 3.8
Respiracija	$V_L \cdot r_{O_2}$		-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Akumuliranje otopljenog kisika	$\frac{d}{dt}(V_L \cdot S_{O_2})$		-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Protok tekućine	$Q_{in} \cdot S_{O_2,in} - Q_{out} \cdot S_{O_2}$				1	1			1	1
Razmjena plinova	$V_L \cdot k_L a (S_{O_2}^* - S_{O_2})$			1		1	1	1	1	1
Akumuliranje plinovitog kisika	$\frac{d}{dt}(V_G \cdot C_{O_2})$						-1	-1	-1	-1
Protok plina	$F_{in} \cdot C_{O_2,in} - F_{out} \cdot C_{O_2}$							1		1
Razmjena plinova	$V_L \cdot k_L a (S_{O_2}^* - S_{O_2})$						-1	-1	-1	-1

5.3 OPREMA

5.3.1 Oprema za anaerobnu respirometriju

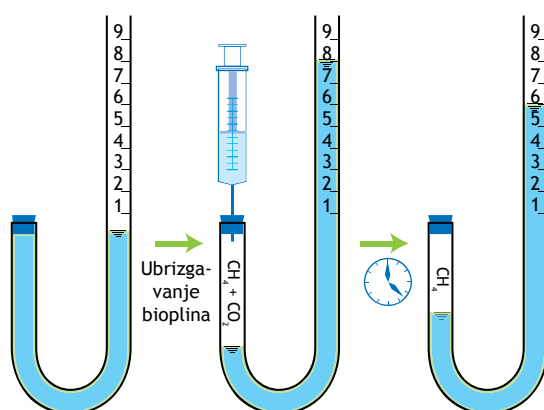
Iako je predmet ovog izvješća aerobna respirometrija, zbog kompletnosti uključili smo i anaerobnu respirometriju. Kako bi se proveo anaerobni respirometrijski test, postoje dva zahtjeva. Kao prvo, potrebna je struktura u kojoj se odvija anaerobna respiracija. To može biti mala boca ili veći reaktor. U takvoj se boci ili reaktoru kombiniraju supstrat, npr. primarni mulj ili škrob, i inokulum s elementima potrebnima za anaerobnu respiraciju. Kao drugo, potreban je sustav za mjerenje proizvodnje metana. Kako bi se kvantificirala anaerobna respiracija, treba odrediti put elektrona. Niti potrošnja supstrata niti potrošnja akceptora elektrona se ne može mjeriti izravno, zbog čega se konačni produkti anaerobne respiracije, H₂ i metan, određuju u anaerobnoj respirometriji.

5.3.1.1 Sastav bioplina

Metan napušta bocu ili reaktor putem bioplina. Osim metana, bioplin sadrži i CO₂, H₂S i tragove ostalih spojeva. Prema tome, kako bi se kvantificirao protok metana, potrebno je znati i protok bioplina i sastav bioplina. U tu svrhu, sastav bioplina se može ili izmjeriti ili prilagoditi. Prilagodavanje bioplina znači uklanjanje svih plinova osim metana prije kvantificiranja protoka.

- Mjerenje sastava bioplina i korigiranje izmjerenog protoka

Sastav bioplina može se izmjeriti pomoću plinske kromatografije. Međutim, postoje i jeftinije i jednostavnije metode, kao npr. oprema prikazana na slici 5.12.

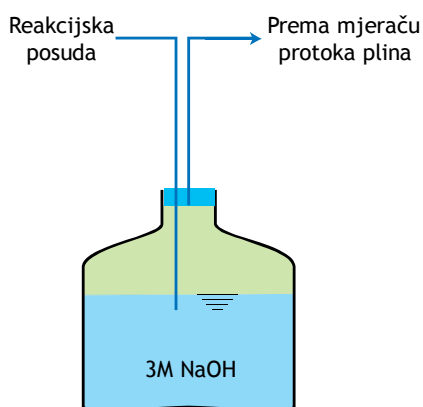


Slika 5.12 Jeftin i jednostavan način određivanja koncentracije metana u bioplenu.

Ova cijev se napuni alkalnom otopinom (obično 3 M NaOH) kako bi se uklonio CO_2 i H_2S , koji se otapaju u alkalnoj otopini, čime u plinskoj fazi ostaje samo metan. Kao prvo, bioplin se ubrizgava u lijevi krak ($t = 0$). Onda se postupno CO_2 i H_2S tope u alkalnoj otopini sve dok se ne ukloni sav CO_2 i H_2S ($t = \text{kraj}$). Sadržaj metana se može izračunati iz razlika u volumenu u $t = 0$ i $t = \text{kraj}$. U ovom primjeru, ukupni volumen bioplina je 10 mL, od čega su 4 mL otopljeni. Prema tome, sadržaj metana u uzorku bioplina se izračunava kao 60 %. Vrijeme potrebno da CO_2 i H_2S reagiraju s alkalnom otopinom treba eksperimentalno odrediti. To se može napraviti tako da se procijeni vrijeme potrebno sustavu da dosegne stabilno stanje, odnosno kada se volumen plina više ne mijenja. Kako bi se izračunala brzina protoka CH_4 iz boce ili reaktora, volumen bi trebalo korigirati pomoću zakona idealnog plina i stvarne temperature.

- Uklanjanje ostalih plinova iz bioplina

Kada se uklone CO_2 i H_2S , plin će obično sadržavati 100% metana (može biti prisutno nešto N_2 i H_2). To znači da *in situ* uklanjanje spojeva koji nisu metan, zajedno s mjerenjem protoka, daje protok metana. U praksi, to znači da se iz reakcijske posude plin vodi preko velike površine alkalne otopine (obično 3 M otopine NaOH) (slika 5.13). Treba napomenuti da, za razliku od prikaza na slici 5.13, ulaz u bocu za uklanjanje plinova ne mora biti potopljen. To je zato da se spriječi povratni tok alkalne otopine. Na primjer, kad u plinskoj fazi reakcijske posude postoji podtlak, alkalna otopina bi bila uvučena u reakcijsku posudu, što bi smjesta ugrozilo eksperiment. Podtlak se može javiti kada padne temperatura u plinskoj fazi, npr. kada se pokvari termostatska vodena kupelj ili vratašca inkubatora neko vrijeme ostanu otvorena.



Slika 5.13 Shematski prikaz boce za uklanjanje plinova.

5.3.1.2 Mjerenje protoka plina

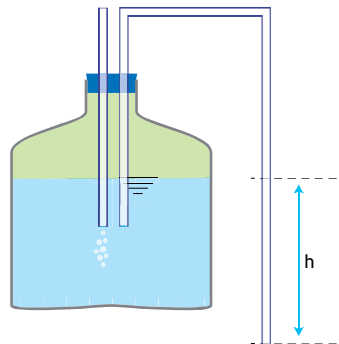
Postoji čitav niz načina mjerenja proizvodnje plina, ali u laboratorijskoj anaerobnoj respirometriji to je obično ograničeno na manometrijske ili volumetrijske metode.

- Manometrijske metode

Manometrijske se metode temelje na mjerenju porasta tlaka u plinskoj fazi reakcijske posude. Kako se proizvodi bioplin, tlak u plinskoj fazi se povećava. Međutim, visok tlak u plinskoj fazi može rezultirati povećanom topljivošću CO_2 , što može znatno narušiti aktivnost mikroba (Theodorou i sur., 1994). Zbog toga, tlak treba povremeno otpuštati kako ne bi postao previsok (rasterećivanje). Općenito, koristi se gornja granica od 1,4 bar. Također, potrebno je osigurati da reakcijska posuda bude dizajnirana tako da izdrži tlak. Kada se tlak ne otpušta automatski, ova metoda zahtijeva rad tijekom eksperimenta. Neodgovarajuće postupanje može dovesti do eksplozije reakcijske posude. Preporučuje se da se uvijek kada se radi s manometrijskom metodom koriste zaštitne naočale. Pored toga, kod početnog mjerenja tlaka i mjerenja nakon rasterećivanja u obzir bi trebalo uzeti i učinak temperature na tlak plina i tlak vodene pare, odnosno u reakcijskoj posudi prije mjerenja bi trebalo postići stanje ravnoteže. Kako bi se izračunala proizvodnja plina, povećanja tlaka između dva rasterećivanja tlaka se zbrajaju te se pomoću zakona idealnog plina iz ovog ukupnog povećanja tlaka izračunava količina proizvedenih molova bioplina. Sastav bioplina treba mjeriti i ako nema uklanjanja CO_2 i H_2S .

- Volumetrijske metode

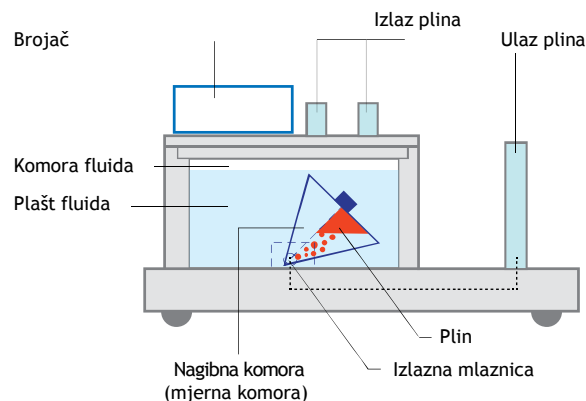
Klasična i precizna volumetrijska metoda je korištenje Mariottove boce (McCarthy, 1934), pri čemu se plin uvodi u bocu s ispustom za tekućinu i potiskuje tekućinu (slika 5.14).



Slika 5.14 Mariottova boca za mjerenje proizvedenih volumena plina.

Težina ili volumen istisnute tekućine ukazuje na volumen plina koji se proizvede. Kada je tekućina alkalna otopina, CO₂ ili H₂S uklonjeni *in situ*, a težina istisnute tekućine će ukazivati na volumen metana. Nedostatak je taj što tikvicu treba povremeno iznova napuniti, što remeti kontrolu tlaka. Ako se istisnuta tekućina mjeri vagom spojenom na računalo, proizvodnja plina se može mjeriti u stvarnom vremenu.

Drugi primjer principa volumetrijskog mjerenja je nagibni mehanizam (slika 5.15).



Slika 5.15 Shematski prikaz poprečnog presjeka anaerobnog respirometra s nagibnom komorom. Kako se uvodi plin, nagibna komora se naizmjenice nagiba desno i lijevo. Količina škljocaja se mjeri i bilježi (www.ritter.de).

Prednost je to što nema potrebe za aktivnim resetiranjem mjerača protoka plina. On može kontinuirano raditi, odnosno ne zahtijeva pažnju kao Mariottova boca. Postoji nekoliko komercijalnih sustava koji koriste ovaj princip. Princip mjerenja se temelji na nagibnoj komori potopljenoj u ulje ili vodu. Ta se komora s dna puni plinom. Plin se akumulira ispod komore i u određenom trenutku plin potiče pozitivni uzgon, nakon čega se komora nakrivljuje, čime se ispušta plin i na taj način resetira sustav. Svaki nagib se broji i iz toga se izračunava volumen plina. Nedostatak ove metode jest to da je prilično skupa i ima ograničen raspon protoka (do 4 L h⁻¹).

5.3.2 Oprema za aerobnu i anoksičnu respirometriju

Slično anaerobnoj respirometriji, potrebna je oprema u kojoj se odvija aerobna i anoksična respiracija. To se u osnovi sastoji od protresene boce ili reaktora u kojem se kombinira biomasa u aerobnim ili anoksičnim uvjetima i otpadna voda ili specifični supstrat. Uz to, potreban je sustav za mjerenje apsorpcije krajnjeg akceptora elektrona, tj. kisika, nitrita ili nitrata. Obrada podataka može biti ručna, što

je većinom slučaj kod mjerenja BOD, ili u cijelosti automatizirana, na primjer ako izmjerene podatke treba pretvoriti u brzine respiracije s visokom učestalošću mjerenja. U određenom broju sofisticiranih (uključujući komercijalne) respirometara, rad s opremom je tako kompliciran da zahtijeva automatiziran upravljački sustav.

5.3.2.1 Reaktor

Reaktor je obično posuda volumena u rasponu od nekoliko 100 mL do nekoliko litara. Ovisno o primjeni, laboratoriju ili terenu, materijal može biti staklo ili plastika, a često je proziran kako bi se mogao pregledati sadržaj. Ovisno o principu mjerenja (odjeljak 5.3.1.2), posuda je u cijelosti zatvorena kako bi se spriječila izmjena kisika s plinskom fazom, ili je otvorena kako bi se omogućio prijenos kisika iz plinske faze. Otvorene posude mogu biti opremljene i opremom za aeraciju (npr. difuzor plina) kako bi se pospješio prijenos kisika. U nekim slučajevima može se rukovati i otvorenom posudom (za aeraciju) i zatvorenom posudom (za mjerenje apsorpcije kisika). U svakom slučaju, sadržaj posude je u cijelosti izmiješan pomoću magnetne poluge, miješalice, pumpe ili aeracijom. U laboratoriju, posuda može biti termostatska, pri čemu se često koristi dvostruka stjenka za hlađenje/grijanje ili samo grijači element ako se temperatura održava iznad ambijentne temperature. Ovisno o principu rada (pokretna tekućina, pokretni plin), reaktor može imati nekoliko ulaznih i izlaznih otvora te jedan ili više otvora za smještaj jednog ili više senzora. Dodatna oprema može uključivati ventile, pumpe (za biomasu, otpadnu vodu, supstrat, zrak i plin), bazen za miješanje, spremnik za supstrat, spremnik za kisik, spremnik za dobavu NO_3 , jedinicu za predobradu uzorka (sito, filter), generator kisika itd.

5.3.2.2 Mjerni sustav

U mnogim se slučajevima mjerni sustav sastoji od senzora (tj. sonda s pridruženim mjerjačem, priključena ili ne, na sustav prikupljanja podataka) za mjerenje koncentracije akceptora elektrona, tj. kisika, nitrata ili nitrita. Kisik se može mjeriti izravno u tekućoj fazi pomoću galvanске, polarografske ili optičke sonde za otopljeni kisik. U jednostavnim laboratorijskim testovima, naročito BOD testu, otopljeni se kisik može mjeriti titrimetrijskom ili fotometrijskom metodom (odjeljak 5.4.2). Koncentracija kisika u plinovitoj fazi može se izravno izmjeriti pomoću paramagnetnog analizatora kisika. Međutim, promjene u koncentraciji kisika mogu se mjeriti pomoću senzora za tlak ili senzora istisnuća volumena plina. Koncentracije nitrata i nitrita u tekućoj fazi mogu se mjeriti pomoću ion selektivnog ili UV-spektrofotometrijskog senzora (Rieger i sur., 2008).

Senzori mogu imati spora vremena odgovora i važno je osigurati da je senzor dovoljno brz da prati kinetiku biokemijskog procesa. Kao pravilo, senzor mora biti 10 puta brži od brzine mjerene reakcije.

5.3.2.3 Primjena u praksi

U literaturi su opisane brojne praktične primjene, a određen broj njih je uveden na tržište. Kako je objašnjeno u odjeljku 5.3.1, sve mjerne tehnike za brzinu respiracije mogu se klasificirati u samo osam temeljnih principa, a rad svih postojećih respirometara može se objasniti u smislu te klasifikacije i odgovarajućih masenih bilanci. Međutim, samo je ograničen broj respirometara korišten u znatnijem broju u istraživanju i praksi, ili čak komercijalnoj proizvodnji. U nastavku opisujemo neke respirometre u smislu njihovog temeljnog principa i tehničke primjene. Ipak, treba naglasiti da se to ni u kojem slučaju ne smije shvatiti kao preporuka za određenu metodu. Odabir određenog mjernog principa, njegova tehnička provedba ili komercijalna manifestacija ovisi o svrsi mjerenja, vještini korisnika i raspoloživom proračunu.

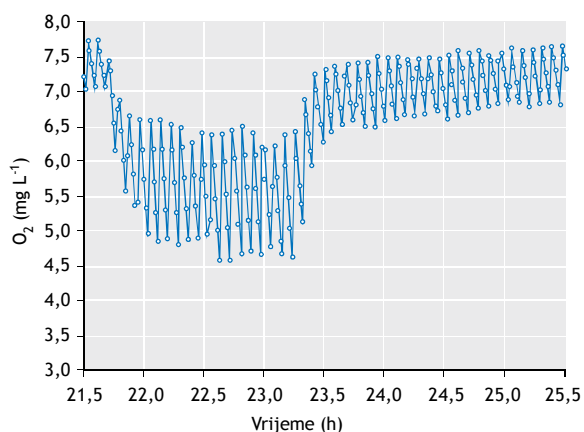
- Princip mjerenja u tekućoj fazi, statični plin, statična tekućina (LSS)

Princip LSS se može promatrati kao najjednostavniji respiometrijski princip budući da izostanak pokretne tekuće i plinske faze podrazumijeva da nisu potrebni nikakvi dodatni materijali, kao što su pumpe i oprema za aeraciju. BOD test (odjeljak 5.4.2) je primjer primjene ovog principa. Na slici 5.16 prikazan je primjer BOD boce korištene u testu gdje se DO mjeri jedino na početku i na kraju testa, i primjer BOD boce s kontinuiranim mjerenjem apsorpcije kisika pomoću senzora za tlak. Potonje omogućuje procjenu krajnjeg BOD i koeficijent brzine apsorpcije kisika prvog reda (odjeljak 5.4.2).



Slika 5.16 BOD boca za klasični BOD test (lijevo) i boce za kontinuirano mjerenje apsorpcije kisika (desno) (fotografije: Wheaton i Velp Scientifica).

Međutim, princip LSS se primjenjuje i u polu-kontinuiranoj verziji kako bi se mjerila brzina respiracije biomase polukontinuirano, i u laboratoriju i na terenu. Zbog mnogo veće koncentracije biomase od one korištene u tipičnom BOD testu, koncentracija DO zbog respiracije opada unutar nekoliko minuta od gotovo zasićene koncentracije do ograničavajuće koncentracije. Brzina respiracije se onda izračunava iz nagiba krivulje opadanja koncentracije DO. Kako bi se omogućilo ponovljeno mjerenje brzine respiracije, biomasa se ponovno aerira za svako mjerenje, što daje tipičan profil DO u obliku zuba pile (slika 5.17).



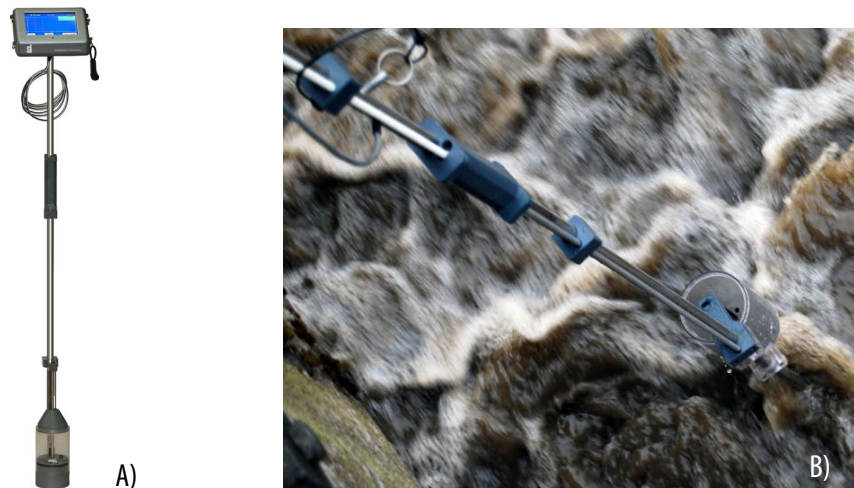
Slika 5.17 Neobrađeni podaci o koncentraciji DO iz LSS respirometra s ponovljenom aeracijom.

U ovom primjeru vrijeme između razdoblja uključene i isključene aeracije je konstantno. Kod ostalih respirometara aeracija se uključuje i isključuje ovisno o stvarnoj koncentraciji DO, npr. između 4 i 6 mg O₂ L⁻¹. Gornju i donju granicu DO treba pažljivo definirati, budući da one određuju učestalost podataka o brzini respiracije i njihovu točnost. I doista, kad je brzina respiracije niska, može trebati duže vrijeme da se koncentracija DO smanji s gornje na donju granicu, dok prekratka razdoblja smanjivanja izračun brzine respiracije čine osjetljivim na pogreške mjerenja budući da je dostupno tek nekoliko podatkovnih točaka DO.

Potencijalne poteškoće s ovom tehnikom su to da tijekom smanjivanja DO treba izbjegavati prijenos kisika iz plinske u tekuću fazu (naročito kritično kad je brzina respiracije niska) i da određivanje linearnog smanjivanja DO nije uvijek evidentno. Ovo potonje je poseban izazov kada je tehnika mjerenja automatizirana. Zapravo, prijelaz iz faze ponovne aeracije u fazu smanjivanja DO može potrajati neko

vrijeme (deseci sekundi) i na njega djeluje uklanjanje mjehurića plina iz tekućine i brzina odziva sonde za DO. Respirometri koji se temelje na ovoj tehnici omogućuju mjerenje brzine respiracije s intervalom mjerenja u rasponu od obično nekoliko minuta do nekoliko desetaka minuta. Također omogućuju, naročito u laboratoriju, generiranje respirograma dodavanjem otpadne vode ili specifičnih supstrata.

Slika 5.18 ilustrira respirometar koji se temelji na toj tehnici. Ovaj respirometar s plutajućom kuglom je osmišljen za automatizirano uzorkovanje i ispuštanje aktivnog mulja, ponovljenu aeraciju i izračun brzine respiracije.



Slika 5.18 Primjer praktične primjene respirometrije na principu LSS. (A) Pogled izbliza sonde za mjerenje DO i (B) respirometar u radu, tj. pluta na aktivnom mulju u aeracijskom bazenu (fotografije: Strathkelvin Instruments Ltd.).

Slika 5.19 je primjer još jedne praktične primjene principa LSS sa zatvorenim respiracijskim reaktorom (desna posuda) koja se puni aktivnim muljem iz aeriranog reaktora (lijeva posuda). Smanjivanje DO u ovom reaktoru se mjeri dok se ne dosegne određeni minimalni DO (ili nakon određenog vremena ili određene varijacije DO), nakon čega se sadržaj zamjenjuje svježim, aeriranim aktivnim muljem iz aeriranog reaktora i kreće novi ciklus.



Slika 5.19 Primjer još jedne praktične primjene na principu LSS (fotografija: P.A. Vanrolleghem).

- Princip mjerenja u tekućoj fazi, pokretni plin, statična tekućina (LFS)

Nedostatak potrebe za ponovnom aeracijom može se ukloniti kontinuiranim aeriranjem biomase. Kontinuirani dotok kisika jamči neograničavajuću koncentraciju DO čak i pri velikim brzinama respiracije, na primjer pri visokoj koncentraciji biomase i visokim dozama otpadne vode ili supstrata. Štoviše, kontinuirana aeracija omogućuje otvorenu posudu, što olakšava dodavanje otpadne vode i supstrata.

Kako bi se dobila brzina respiracije, mora biti poznat i član za maseni prijenos (u procesnim uvjetima) i diferencijalni član u masenoj bilanci DO (jedn. 5.3). Član za maseni prijenos se izračunava iz izmjerene koncentracije DO, koeficijenta kLa masenog prijenosa i koncentracije zasićenja DO $S_{O_2}^*$. Ta dva koeficijenta treba redovno određivati zato što ovise o uvjetima u okolini kao što su temperatura, barometarski tlak i svojstva tekućine (npr. soli i određene organske tvari). Najjednostavniji pristup je odrediti ih pomoću zasebnih testova ponovne aeracije i literaturnih tablica. Standardne procedure za te testove u procesnim uvjetima su dostupne i temelje se na narušavanju ravnoteže koncentracije DO ometanjem aeracije, dodavanjem vodikovog peroksida ili čak dodavanjem biološki lako razgradivog supstrata. Dobivena krivulja ponovljene aeracije se onda može koristiti za procjenu kLa i koeficijenta zasićenja DO $S_{O_2}^*$. Prednost metode utemeljene na narušavanju DO zbog respiracije biološki lako razgradivog supstrata je to što se vrijednosti koeficijenta aeracije mogu relativno lako i često ažurirati. Međutim, kada se javi tek umjereno narušavanje DO, točnost procijenjenog kLa je niska. Isto tako, mora se pretpostaviti da se brzina respiracije smanjila na konstantnu (endogenu) brzinu tijekom reaeracijskog dijela krivulje.

Procjena $S_{O_2}^*$ nije potrebna kada nas zanima jedino supstratom potaknuta respiracija, tj. egzogena respiracija $r_{O_2,exo}$. Ukupna respiracija je zbroj endogene respiracije $r_{O_2,endo}$ i egzogene respiracije $r_{O_2,exo}$. Uzevši u obzir da su $r_{O_2,endo}$, kLa i $S_{O_2}^*$ konstantni u kratkom intervalu, može se pokazati da ravnoteža koncentracije DO dosegnuta u endogenim uvjetima $S_{O_2,endo}^*$ obuhvaća endogenu respiraciju (Kong i sur., 1996). Masena bilanca za kisik se onda može preformulirati kao:

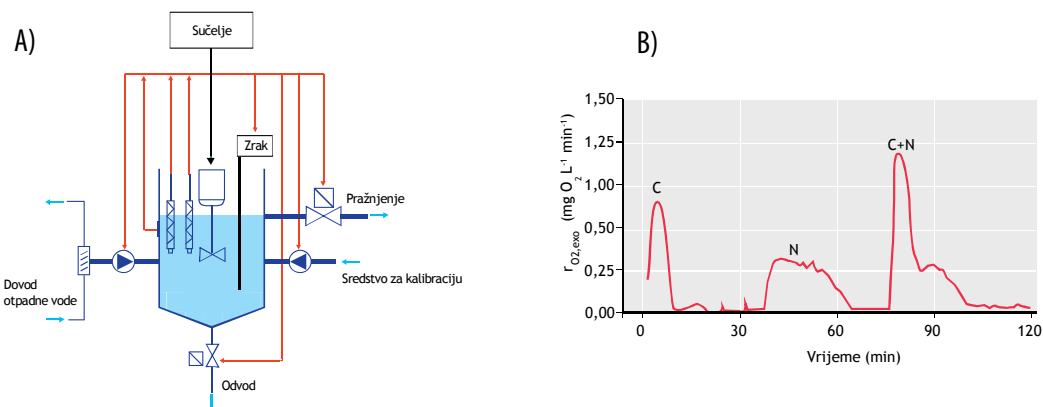
$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} =$$

$$kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2,endo} - r_{O_2,exo} \quad 5.13$$

Uvrštavanjem $r_{O_2,endo} = kLa (S_{O_2,endo}^* - S_{O_2})$ i zamjenom $r_{O_2,endo}$ u gornju jednadžbu, dobiva se:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2,endo}^* - S_{O_2}) - r_{O_2,exo} \quad 5.14$$

Kako bi se iz ove masene bilance procijenila brzina egzogene respiracije $r_{O_2,exo}$, jedino treba procijeniti ravnotežu koncentracije DO $S_{O_2,endo}^*$ (izravno iz podataka, slika 5.20) i kLa iz reaeracijskog dijela krivulje narušavanja DO dobivenog s biološki lako razgradivim supstratom. Druga prednost ovog respiometrijskog LFS principa je da omogućuje mjerenje r_{O_2} pri gotovo konstantnoj koncentraciji DO, čime se uklanja ovisnost respiracije o koncentraciji DO (pod uvjetom da je $DO \gg 0 \text{ mg L}^{-1}$). Još jedna prednost je i to da je vremenski interval u kojemu se mogu dobiti vrijednosti brzine respiracije kratak, odnosno jedino je ograničen učestalošću mjerenja sonde za DO. To respirometar na principu LFS čini prikladnim za kinetičke testove i eksperimente optimiziranja modela.



Slika 5.20 (A) Dijagram s prikazom respirometra na principu LFS (Vanrolleghem i sur., 1994) i (B) primjer tipičnih neobrađenih podataka (Kong i sur., 1996).

Očito, dok se respirometar koji slijedi princip LFS u svojem osnovnom obliku sastoji od posude opremljene aeratorom, miješalicom ili recirkulacijskom pumpom za miješanje i sondom za DO, naprednija verzija osmišljena za automatizirane (*online*) eksperimente uključuje dodatnu opremu kao što su pumpe za punjenje posude biomasom, dodavanje otpadne vode i supstrata, nivo sonde te ventile za pražnjenje posude. To zahtijeva prikladan sustav za obradu i kontrolu podataka, pored dovoljnog kapaciteta računanja za proceduru procjene. Na slici 5.21 prikazan je primjer komercijalne verzije ovog mjernog principa.

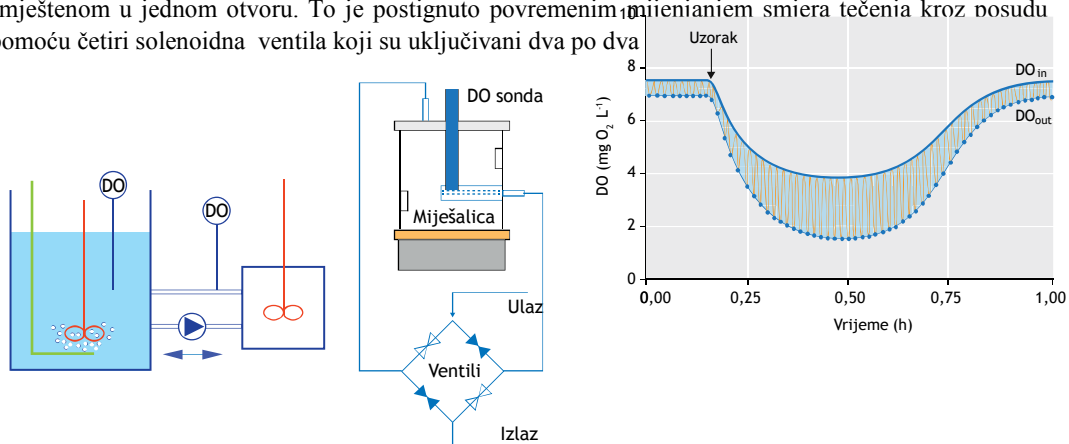


Slika 5.21 Primjer komercijalne verzije respirometra na principu LFS koja koristi strukturu prikazanu na slici 5.20. U sredini je termostatirana posuda, a na dnu, lijevo i desno, pumpe za dodavanje otpadne vode i kalibraciju (fotografija: Kelma NV).

- Princip mjerenja u tekućoj fazi, statični plin, pokretna tekućina (LSF)

LSF respirometrijski mjerni principi omogućuje kontinuirano uzorkovanje biomase, na primjer uzorka aktivnog mulja iz laboratorijskog reaktora ili aeracijskog bazena na gradskim uređajima, uz istovremeno mjerenje brzine respiracije. Kad biomasa teče kroz zatvorenu posudu s potpuno izmiješanim sadržajem (respirometrijska stanica) bez plinske faze, tada se, slijedeći jedn. 5.4, brzina respiracije može izračunati ako je poznat volumen respirometrijske stanice i brzina protoka i ako se mjere koncentracije DO na ulazu i izlazu iz stanice. Alternativno, DO se može mjeriti u izvorišnom reaktoru (pod uvjetom da je smanjivanje DO u dobavnoj liniji zanemarivo) i u samoj respirometrijskoj stanici. U svakom slučaju, kao i kod drugih principa određivanja, koncentracija DO u stanici mora biti dovoljno visoka da spriječi ograničavanje DO,

što zahtijeva dovoljno visoku ulaznu koncentraciju DO pri određenoj brzini respiracije. Potencijalan izvor pogrešnih mjerenja je povezan s korištenjem dvije sonde za DO za mjerenje DO na ulazu i izlazu, jer kada se karakteristike sonde blago razlikuju, mogu se javiti razmjerno velike relativne greške u razlici između dva mjerenja DO potrebnih za izračun brzine respiracije. Spanjers i Olsson (1992) su to riješili naizmjeničnim mjerenjem koncentracija DO na ulazu i izlazu iz reaktora jedinstvenom sondom smještenom u jednom otvoru. To je postignuto povremenim mijenjanjem smjera tečenja kroz posudu pomoću četiri solenoidna ventila koji su uključivani dva po dva



Slika 5.22 Primjer praktične primjene koja slijedi princip LSF, s jedinstvenom sondom za DO za mjerenje koncentracije DO na ulazu i izlazu iz respirometrijske posude (Spanjers, 1993). (A) Shema mjernog sustava i (B) tipični profil signala zabilježenog jedinstvenom sondom (Spanjers i Olsson, 1992). Signal predstavlja DO koji oscilira između DO na ulazu i DO na izlazu iz stanice. Ovaj signal DO je temelj za izračun brzine respiracije.

Ako se po pitanju brzine respiracije pretpostavlja stabilno stanje, tada se brzina može izračunati pomoću jedn. 5.4 uz pretpostavku da je diferencijalni član nula. Međutim, aproksimiranjem jednadžbe diferencijalnom jednadžbom, može se izračunati brzina respiracije u dinamičnim uvjetima.

Na slici 5.23 prikazana je komercijalna verzija na principu LSF koja koristi rješenje s jednom sondom. Taj respirometar mjeri brzinu respiracije s intervalom od obično jedne minute i može se spojiti na laboratorijski reaktor ili aeracijski bazen na uređaju, na primjer pomoću brze petlje.



Slika 5.23 Primjer komercijalne verzije principa LSF koja koristi laboratorijsku opremu prikazanu na slici 5.22. Lijevo je laboratorijski aeracijski spremnik s aktivnim muljem. U kutiji s opremom lijevo je pumpa za uzorkovanje, a desno je skup solenoidnih ventila. Posuda je postavljena iza ventila (fotografija: Applitek NV).

- Princip mjerenja u plinskoj fazi, statični plin, statična tekućina (GSS)
- Poput principa LSS koji je jedan od principa tekuće faze, princip GSS je najjednostavniji princip mjerenja u plinskoj fazi zato što izostanak pokretnog plina i tekućine podrazumijeva da nisu potrebni nikakvi dodatni materijali poput pumpi i aeracijske opreme. Međutim, budući da se izračun brzine respiracije

temelji na mjerenju kisika u plinskoj fazi, a stvarna respiracija se zbiva u tekućoj fazi, odnos između dinamike kisika u plinskoj fazi mora biti povezan s brzinom respiracije. Prema tome, pored masene bilance DO u tekućoj fazi, u obzir se mora uzeti masena bilanca kisika u plinskoj fazi i mora se riješiti skup jednažbi za brzinu respiracije, uz pretpostavku odnosa prijenosa između plina i tekućine.

Tipični respirometar koji radi na principu GSS se sastoji od posude s biomasom, opreme za miješanje i za mjerenje plina. Plinoviti kisik se mjeri fizičkim metodama, kao što su plinometrijska metoda ili paramagnetna metoda. Plinometrijskim metodama se mjere promjene u koncentraciji plinovitog kisika, što se može izvesti iz promjena u tlaku (ako se volumen održava konstantnim, manometrijska metoda) ili promjena u volumenu (ako se tlak održava konstantnim, volumetrijska metoda, npr. Mariotteova boca), vidi odjeljak 5.3.1.2. Kao i kod principa LSS, kada je potrošnja kisika prevelika, te metode zahtijevaju nadopunu plinovitog kisika, čime se privremeno prekidaju mjerenja. To ograničava mogućnost kontinuiranog praćenja brzine respiracije. Važna komplikacija principa GSS je to da, budući da se iz tekuće faze ispušta ugljikov dioksid kao rezultat biološke aktivnosti, taj plin treba ukloniti iz plinske faze kako bi se izbjegla interferencija s nekim od jednostavnijih principa mjerenja kisika. U praksi se to radi pomoću baza radi kemijske apsorpcije proizvedenog ugljikovog dioksida.

Slično principu LSS, princip GSS se može koristiti za izvođenje BOD testa (odjeljak 5.4.2), na primjer Oxitop (slika 5.16).

- Princip mjerenja u plinskoj fazi, pokretni plin, statična tekućina (GFS)

Slično kao mjerni princip LFS, respirometri koji koriste princip GFS se temelje na fazi pokretnog plina, odnosno biomasa se kontinuirano aerira zrakom (ili čistim kisikom) kako bi se osigurala dovoljna prisutnost kisika u tekućini. Međutim, izračun brzine respiracije temelji se na mjerenju kisika u plinskoj fazi, odnosno konkretnije na mjerenju plina koji izlazi iz tekuće faze nakon aeracije, poznatog i kao izlazni plin. Budući da izlazni plin može sadržavati ostale komponente koje su pod utjecajem metaboličkih procesa u tekućoj fazi, kao što su ugljikov dioksid i dušik, očito je da se i njih može mjeriti kako bi se dobile dodatne informacije o aktivnosti biomase.

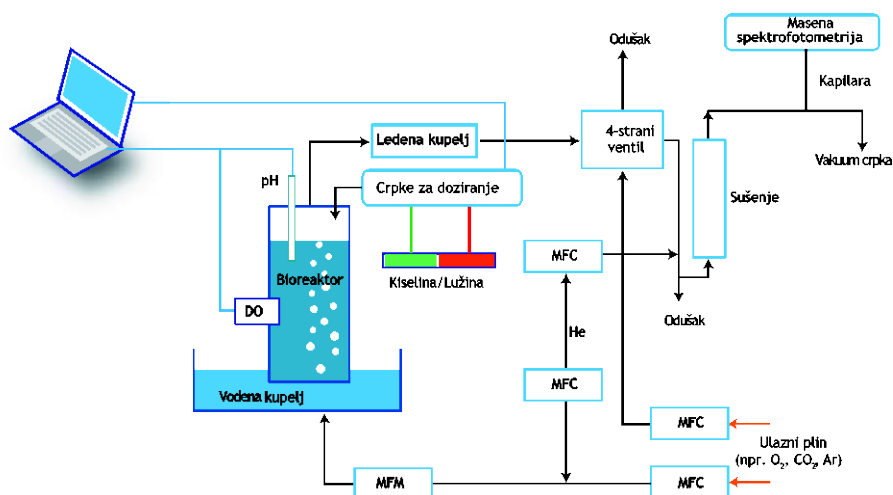
Tipični respirometar koji radi na principu GFS se sastoji od posude s biomasom, opreme za aeraciju i miješanje i sustav za mjerenje izlaznog plina. Plinoviti kisik se mjeri fizičkim metodama, kao što su plinometrijska metoda (odnosno dobavom čistog kisika iz spremnika ili elektrolizom) ili paramagnetna metoda.

Slijedeći plinometrijsku metodu, u zatvorenoj plinskoj fazi promjena tlaka ili promjena volumena je povezana s potrošnjom kisika u tekućoj fazi. Te se informacije mogu koristiti za aktiviranje sustava za proizvodnju kisika, koji se temelji na boci s kisikom ili elektrolitskoj ćeliji, a protok kisika ili električna struja se mogu pretvoriti u brzinu respiracije. Zapravo, proizašli dotok kisika služi kao aeracija, tj. pokretni plin. Promjena tlaka može se mjeriti senzorom za tlak. Ne postoji dokumentacija s opisom korištenja promjene volumena za aktiviranje dobave kisika. Očito, plinometrijska metoda se temelji na mjerenju prijenosa kisika [$kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$], a ne na mjerenju koncentracije kisika u plinskoj fazi. Koncentracija kisika u plinskoj fazi mora se pretpostaviti kao konstantna (tj. $dC_{O_2} / dt = 0$). U svakom slučaju, plinometrijska metoda zahtijeva sustav apsorpcije CO₂ kako bi se iz plina uklonio CO₂. CO₂ u plinu koji je proizveden za vrijeme biološke razgradnje i ispušta se u plinsku fazu iz tekuće faze bi inače ometao mjerenje promjene tlaka ili volumena. Obično se po molu O₂ u aerobnoj respiraciji proizvede jedan mol CO₂, što po definiciji znači da neće doći do promjene tlaka plina.

Alternativno, koncentracija kisika u plinskoj fazi može se mjeriti izravno, čime se uklanja potreba za hvatanjem CO₂ i omogućuje kontinuirano aeriranje biomase zrakom. Međutim, pored koncentracije plinovitog kisika, treba izmjeriti i koncentraciju DO u tekućoj fazi zato što pored masene bilance u plinskoj fazi treba razmotriti i masenu bilancu u tekućoj fazi. Slično tome, treba izmjeriti protok plina, na primjer pomoću masenog mjerača protoka plina.

Kisik je jedan od malog broja plinova koji pokazuju paramagnetne karakteristike, tako da ga se može mjeriti kvantitativno u plinskoj mješavini koristeći paramagnetnu metodu. Ta se metoda temelji na promjeni u magnetnom polju kao rezultat prisutnosti kisika, a ta promjena je proporcionalna koncentraciji plinovitog kisika.

Druga metoda za mjerenje koncentracije kisika u plinskoj fazi je pomoću masenog spektrometra. Korištenje ove skuplje opreme ima prednost u tome da se mogu mjeriti i ostali plinovi, što se onda obično naziva analizom izlaznih plinova. Naročito se CO₂ može mjeriti u plinskoj fazi budući da je to koristan pokazatelj aktivnosti biomase u svim redoks uvjetima. Međutim, ako se mjeri CO₂ u izlaznom plinu, a budući da je CO₂ povezan s karbonatnim sustavom, za mjerenje pH i koncentracije bikarbonata u tekućoj fazi bit će potrebna dodatna oprema (Pratt *et al.*, 2003). Napominjemo da je maseni spektrometar skupa oprema koja zahtijeva i posebne (kalibracijske) plinove, što tu metodu prije čini naprednim laboratorijskim alatom nego metodom za terensku primjenu. Alternativa može biti manje skup infracrveni analizator CO₂.



Slika 5.24 Shema strukture respirometra koji radi na principu GFS (Pratt i sur., 2003).

Na slici 5.24 prikazan je primjer praktične primjene principa GFS. Taj se respirometar temelji na analizi izlaznog plina pomoću masene spektrometrije i integriran je s titracijskom jedinicom kako bi se objasnila interakcija proizvodnje i evolucije CO₂ s kiselim/baznim puferskim sustavima u tekućoj fazi.

Respirometar se koristio za proučavanje procesa dvofazne nitrifikacije, odnosno akumuliranja nitrita u sustavima obrade otpadne vode koji rade u promjenjivim okolišnim uvjetima, tj. koncentracijama pH i DO (Gapes i sur., 2003).

5.4 KARAKTERIZACIJA OTPADNE VODE

Razvijeno je i primijenjeno nekoliko metoda za karakterizaciju otpadne vode, kako u smislu karakterizacije opterećenja onečišćujućim tvarima tako i u smislu ocjene toksičnosti. U nastavku će se prvo opisati različite respirometrijske metode za procjenu biokemijske potrošnje kisika, nakon čega će uslijediti respirometrijski testovi toksičnosti i, na kraju, pregled metoda za frakcioniranje otpadne vode.

5.4.1 Potencijal proizvodnje metana (BMP)

5.4.1.1 Svrha

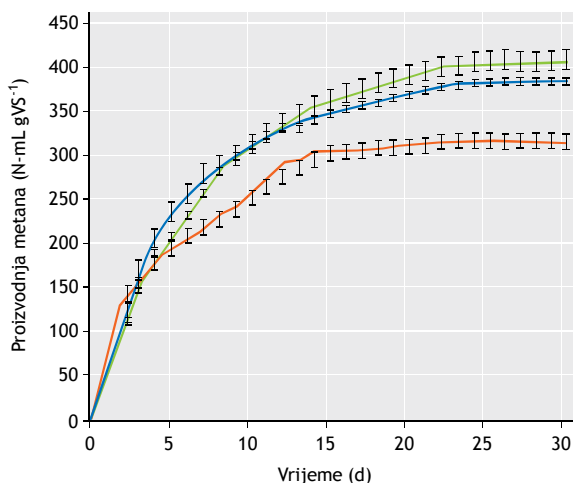
Test potencijala proizvodnje metana (BMP) se provodi kad treba znati koliko određeni supstrat proizvodi metana, npr. kada se razmatra ulaganje u razvoj anaerobnog digestora. Isto tako, proizvodnja metana tijekom vremena može biti od interesa kod optimiziranja starosti mulja u digestoru ili za dimenzioniranje opreme za postupanje s bioplinom.

5.4.1.2 Općenito

BMP test se provodi kako bi se ispitalo koliki je potencijal proizvodnje metana nekog uzorka. BMP u određenoj mjeri određuje i projektantske i ekonomske detalje bioplinskog postrojenja (Angelidaki i sur., 2009). No BMP test se može provesti i kako bi se ocijenilo ponašanje biomase. Na primjer, brzina

proizvodnje metana može se koristiti za procjenu hidrolitičke aktivnosti inokuluma. BMP testovi se često koriste u literaturi, ali protokoli se uvelike razlikuju. Bilo je određenih napora da se predloži standardna procedura (Angelidaki i sur., 2009).

Na slici 5.25 prikazan je tipični rezultat BMP testa. U ovom slučaju je prikazna postupna proizvodnja metana iz otpadne vode filtrirane kroz grubi filter.



Slika 5.25 Rezultati BMP testa: postupna proizvodnja metana iz otpadne vode filtrirane kroz grubi filter. Mjerenja su provedena u tri navrata. Crvena linija predstavlja krutine s trakastog filtra; zelena krutine iz rotacijskog filtra, a plava mješavinu obiju krutina (Kooijman, 2015; neobjavljeni podaci)

5.4.1.3 Izvođenje testa

U BMP testovima, količina inokuluma (potrebna za anaerobnu digestiju) se obično mjeri kao sagorive suspendirane tvari (VSS). Moguća alternativa su ukupne sagorive suspendirane tvari (VS). Razlika između te dvije metode je to da VS razmatra sve sagorive frakcije u inokulumu, dok VSS razmatra jedino tvari veće od određenog otvora filtra, izdvojene filtriranjem. VSS imaju prednost pred VS zato što se ne očekuje da će aktivna biomasa proći kroz filter u mjerenju VSS, zbog čega je VSS jače povezan s aktivnom biomasom nego VS; vidi i odjeljak 5.5.1. Međutim, mjerenje VS se može odabrati i zbog njegove točnosti i jednostavnosti mjerenja i općenito niske koncentracije otopljenih sagorivih tvari u inokulumu, u usporedbi s ukupnim sagorivim tvarima. Za mjerenje VS ili VSS, većina istraživača koristi standardnu metodu (APHA i sur., 2012).

U BMP testovima, način mjerenja supstrata ovisi o svrsi testa i o obliku supstrata. Za biomasu u otpadnoj vodi obično se koristi VS. Tekući supstrat poput otpadne vode može se kvantificirati pomoću COD. Kad se istražuje BMP u konvencionalnoj anaerobnoj digestiji, važno je da se tijekom BMP testova ne akumuliraju VFA. To znači da acidifikacija i potrošnja VFA sa strane metanogenih mikrobnih kultura moraju biti u ravnoteži. Zbog toga je važan omjer između inokuluma i supstrata. Za biomasu iz digesora može se koristiti sljedeći omjer, koji u većini slučajeva neće dovesti do nakupljanja VFA:

$$2 \geq \frac{VSS_{inoculum}}{VS_{substrate}} \quad 5.15$$

Treba primijetiti da su to mase korištene u testu, izražene u gramima VS ili VSS, a ne koncentracije. Kako bi se dobio BMP supstrata, paralelno treba izmjeriti pozadinsku proizvodnju metana iz inokuluma (slijepa proba bez supstrata) i odbiti od proizvedenog plina mješavinom inokulum-supstrat.

Kako bi se proveo BMP test, reakcijske boce treba inkubirati na željenoj temperaturi. Standardna mezofilna temperatura je 35 °C. Temperatura se može održavati konstantnom pomoću vodene kupelji. Miješanje se provodi lopatastim miješalicama u reakcijskoj boci. Kada se u BMP testovima koristi biomasa velikog viskoziteta, nedovoljno miješanje može negativno djelovati na brzine digestije, a

ponekad miješalica u malim testnim bočicama (200-400 mL) ne ispunjavaju zadovoljavajuće miješati. To se može riješiti inkubiranjem reakcijskih boca na inkubatorskoj tresilici. Trajanje BMP testova ovisi o njihovoj svrsi i karakteristikama supstrata, ali najčešće se koristi vrijeme odvijanja testa od 30 dana.

5.4.1.4 Obrada podataka

U mnogim slučajevima anaerobni respirometrijski testovi imaju za cilj izmjeriti BMP supstrata. Kako je prikazano na slici 5.25, BMP ovisi o trajanju digestije, slično analizi BOD (odjeljak 5.4.2). BMP se obično izražava po gramu VS. Za višak aktivnog mulja to je obično između 150 i 200 N-mL gVS⁻¹. Za primarni mulj to je 300-400 N-mL g VS⁻¹. Budući da je hidroliza često korak koji u anaerobnoj digestiji ograničava brzinu (Eastman i Ferguson, 1981), brzina proizvodnje metana je izravno povezana s brzinom hidrolize, tako da je nagib respirograma kakav je prikazan na slici 5.25 izravna mjera brzine hidrolize u tom trenutku u vremenu.

5.4.1.5 Preporuke

- **Korekcija tlaka i temperature**

Kako bi se odredila količina metana koja se proizvede u eksperimentu, u svakom vremenskom trenutku tijekom testa potrebno je znati volumen plina u kombinaciji s tlakom i temperaturom. Obično se količina proizvedenog plina izražava u standardnim uvjetima (obično 273,15 K, 0 °C i 1.013,25 mbar, 1 atm).

- **Difuzija metana**

Zna se da se molekule metana mogu difundirati kroz plastiku kao što je silikon. Zbog toga je u oblikovanju BMP testa (ili specifične metanogene aktivnosti, odjeljak 5.5.2) vrlo važno da materijali koji su u kontaktu s bioplinom imaju slabu propusnost za metan.

- **pH indikator za otopinu za pročišćavanje plina**

Vrlo je važno da tekućina za pročišćavanje plina u boci kakva je prikazana na slici 5.13 i u mjernom uređaju kakav je prikazan na slici 5.15 ima visok (> 9) pH tako da tekućina apsorbira CO₂ i H₂S. Niži pH će rezultirati krivim mjeranjima. Kako bi se osiguralo da tekućina za pročišćavanje nije zasićena, može joj se dodati metilensko modrilo, koje boju tekućine pretvara u modru kad je pH > 9, što omogućuje vizualnu provjeru djelotvornosti otopine.

- **Aktivnost inokuluma**

Aktivnost metanogena je jako osjetljiva na temperaturne razlike. Naročito kad se provode SMA testovi, važno je da aktivnost metanogena bude visoka od samog početka eksperimenata. Zbog toga se savjetuje da se inokulum pohrani pri 35 °C u trajanju od 24 h prije eksperimenta. Na taj način, u BMP (SMA) testu provedenom pri 35 °C neće biti temperaturnog šoka za metanogene i BMP (ili SMA) neće biti pod utjecajem temperature.

- **Mikro i makro nutrijenti**

Za vrijeme BMP (ili SMA) testa može postojati manjak mikro- i makro-nutrijenata, što može djelovati na uspješnost konverzije. Ako nutrijenata nema dovoljno, treba ih dodati. U literaturi postoje različiti prijedlozi za otopine nutrijenata za anaerobne testove digestije (Angelidaki i sur., 2009; Zhang i sur., 2014).

- **Inhibicija kisikom**

Kad je voda u ravnoteži sa zrakom, koncentracija kisika će biti oko 9 mg L⁻¹ pri standardnim uvjetima. Zna se da kisik inhibira metanogene. Kisik će također 'trošiti' COD u mješavini. Zbog toga može biti poželjno (naročito u SMA testovima gdje se mjere brzine metanogena) ukloniti kisik iz otopine supstrata prije miješanja s biomasom. Obično se koristi uklanjanje kisika plinovitim N₂. Vrlo nježnim upuštanjem mjehurića plinovitog N₂ ~ 60 sec kroz otopinu supstrata uklonit će se kisik.

- **Plinonepropusnost**

Prije BMP testa, treba provjeriti je li sustav proizvodnje i mjerenja plina plinonepropustan. To se može napraviti tako da se poznata količina zraka ubrizga u cijev spojenu na bocu s otopinom za pročišćavanje plina i mjerač protoka plina kako bi se osiguralo da je sve ispravno postavljeno i plinonepropusno. Količina izmjereneog zraka i količina ubrizganog zraka moraju biti jednake. Ako nisu, vjerojatno negdje curi.

- Alkalne otopine za pročišćavanje plina

Alkalne otopine za pročišćavanje plina se obično koriste za uklanjanje kiselih komponenti iz plina. U alkalnim otopinama se ne uklanjaju drugi spojevi kao što su NH_3 i H_2 . NH_3 je često prisutan u znatnim količinama kad je pH digestata visok (blizu 9). Kad u digestoru postoji ozbiljna acidifiakcija, može se formirati H_2 i tako biti prisutan u većim količinama u bioplenu. Kako bi se izbjegle značajnije varijacije u pH mješavine tijekom testa, mješavini se može dodati puferska otopina fosfora.

5.4.2 Biokemijska potrošnja kisika (BOD)

5.4.2.1 Svrha

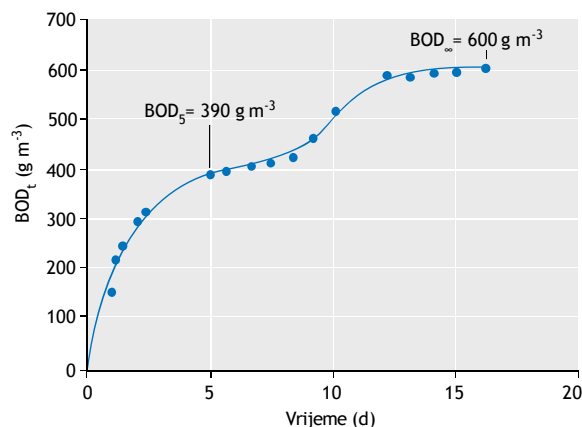
Test biokemijske potrošnje kisika (BOD) se provodi kako bi se procijenila koncentracija biološki razgradive organske tvari u uzorku vode, npr. radi projektiranja uređaja za obradu otpadne vode ili ocjenu njegovog rada u pogledu uklanjanja organske tvari. Zahvaljujući njegovoj osjetljivosti, koristi ga se i za procjenu koncentracije organske tvari u prijemnim vodama.

5.4.2.2 Općenito

Određivanje BOD otpadnih voda, efluenata i onečišćenih prijemnih voda temelji se na testu kojim se mjeri bakterijska potrošnja kisika tijekom određenog razdoblja inkubacije. Testom se kvantificira biokemijska razgradnja organskog materijala (ugljična biokemijska potrošnja kisika - CBOD), ali će uključivati i kisik korišten za oksidiranje anorganskog materijala kao što su sulfidi i divalentno željezo. Ako se u testu ne doda inhibitor nitrifikacije, može se mjeriti i količina kisika korištenog za oksidiranje reduciranih oblika dušika (dušična biokemijska potrošnja kisika - NBOD). Kako bi bilo jasno na što se misli, pojam 'ukupni BOD' (BOD_t) se koristi kad nije dodan inhibitor nitrifikacije, odnosno zbroj CBOD i NBOD.

Obično je vrijeme inkubacije ograničeno na pet dana, što dovodi do tradicionalnog BOD_5 . Međutim, testovi se mogu provoditi i u drugim vremenima inkubacije, npr. sedam dana kako bi se olakšalo organiziranje laboratorija, ili 28, 60 do 90 dana inkubacije kako bi se odredio tzv. krajnji BOD (također: UBOD, BOD_∞ ili BOD_U). Njime se mjeri kisik potreban za ukupnu razgradnju organskog materijala (krajnja potrošnja ugljika) i/ili kisik za oksidaciju spojeva reduciranog dušika (krajnja dušična potrošnja).

Mjerenja koja uključuju NBOD općenito nisu korisna za procjenu potrošnje kisika povezane s organskim materijalom. Zapravo, NBOD se može procijeniti izravno iz dušika koji se može nitrificirati (amonijak ili ukupni dušik po Kjeldahlu), a CBOD se može procijeniti oduzimanjem teoretskog ekvivalenta oksidacije reduciranog dušika od rezultata neinhibiranog testa. Međutim, ova metoda je nezgrapna i podložna osjetnim greškama. Kemijskom inhibicijom nitrifikacije dobiva se izravnija i pouzdanija mjera CBOD.



Slika 5.26 Krivulja BOD_t za mješovite komunalne otpadne vode i otpadne vode iz klaonice (Henze i sur., 1995).

5.4.2.3 Izvođenje testa

U osnovi postoje dva principa mjerenja BOD. Jedan koristi zatvorenu bocu (LSS respirometar), a jedini kisik dostupan za oksidaciju organske tvari je kisik otopljen u (razrijeđenom) uzorku na početku testa.

U drugim metodama kisik se kontinuirano dobavlja iz plinske faze prisutne u boci (LFS respirometar), a potrošeni kisik se prati.

U nastavku će se predstaviti pristup prvog testa, nakon čega se raspravlja o metodama koje koriste dobavu kisika iz plinske faze.

- **BOD test pomoću LSS respirometra**

Metoda se sastoji od toga da se zrakonepropusnu bočicu u cijelosti napuni uzorkom vode i inkubira je se na tamnom mjestu (kako bi se spriječila fotosinteza) na $20 \pm 0,1$ °C određeni broj dana (5, 7, 28, 60, 90 dana). Koncentracija otopljenog kisika se mjeri na početku i nakon inkubacije, a BOD se izračunava iz razlike između početnog i završnog DO. Budući da se početna koncentracija DO određuje ubrzo nakon razrjeđivanja, sva apsorpcija kisika do koje dođe nakon tog mjerenja uključena je u mjerenje BOD. Boce su obično volumena 300 mL sa zatvaračem od brušenog stakla i zvonolikim otvorom. Boce treba pažljivo očistiti deterdžentom i temeljito isprati (kako bi se iz boce uklonio sav deterdžent).

Razrjeđivanje

Budući da je jedini izvor kisika onaj koji je prisutan na početku, može doći jedino do ograničene oksidacije budući da se koncentracija DO ne bi nikada trebala spustiti ispod $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ da se spriječi ograničenje reakcije kisikom. Time su koncentracije BOD u uzorku ograničene na oko najviše 7 mg L^{-1} . I dok to može biti prikladno za uzorke efluenta i vodoprijemnika, otpadne vode će u takvom testu sa zatvorenom bocom trebati u znatnoj mjeri razrijediti. Razrjeđivanje pak prate problemi budući da rast bakterija zahtijeva nutrijente kao što su dušik, fosfor i metali u tragovima (Mg, Ca, Fe). Bez njih biološka razgradnja onečišćujućih tvari može biti ograničena, što može dovesti do potcjenjivanja BOD. Isto tako, može biti potrebno dodavanje pufera kako bi se osiguralo da će pH inkubiranog uzorka ostati unutar raspona prikladnog za rast bakterija. Jasno, voda korištena za razrjeđivanje ne smije sadržavati biološki razgrađive tvari.

Nacjeppljivanje

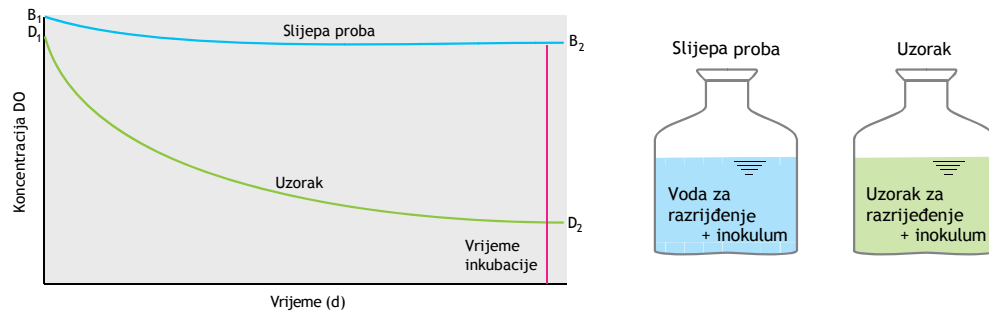
Budući da test ovisi o aktivnosti bakterija za razgradnju organske tvari prisutne u uzorku, neophodna je populacija mikroorganizama koji mogu oksidirati biološki razgrađivu tvar u uzorku. Otpadne vode kućanstava, nedezinficirani efluenti iz uređaja za obradu otpadne vode i površinske vode u koje su ispuštene otpadne vode sadrže zadovoljavajuće mikrobne populacije. Neke vode, npr. industrijske otpadne vode, mogu zahtijevati inokulum za pokretanje biološke razgradnje. Takav inokulum se može dobiti iz biomase ili efluenta iz uređaja za obradu otpadne vode, ali budući da u takvom inokulumu mogu biti prisutni nitrifikanti, preporučuje se da se u testu koristi inhibitor nitrifikacije kako bi se osigurali valjani rezultati CBOD testa. U nekim slučajevima onečišćujuće tvari mogu zahtijevati organizme drugačije od onih prisutnih u uređaju za obradu otpadnih voda iz kućanstava, kada se preporučuje nacjeppljivanje pomoću bakterija dobivenih iz uređaja koji zaprima takav otpad ili iz prijemne vode nizvodno od točke ispuštanja.

Slijepa proba

I voda za razrjeđivanje i inokulum mogu djelovati na rezultat BOD testa, npr. unošenjem organske tvari u bocu. Zapravo se mogu javiti četiri situacije prikazane na donjoj shemi:

	Inokulum	Razrjeđivanje
1	-	-
2	x	-
3	-	x
4	x	x

Budući da bi razrjeđivanje moglo djelovati na kvalitetu testa, kvalitetu treba osigurati tako da se provede BOD test sa slijepom probom u kojemu se u bocu napunjenu vodom za razrjeđivanje dodaje ista količina inokuluma kao i u testu s uzorkom (slika 5.27).



Slika 5.27 Rezultat tipičnog BOD testa u zatvorenoj boci s uzorkom i slijepom otopinom.

Mjerenje DO

Otopljeni kisik može se izmjeriti azidnom modifikacijom titrimetrijske jodometrijske metode ili pomoću dobro kalibrirane elektrode DO. Za mjerenje krajnjeg BOD u razdobljima produžene inkubacije, preporučuje se jedino pristup mjerenja pomoću elektrode DO zato što se DO mora mjeriti u razmacima tijekom inkubacije (intervali od 2 do najviše 5 dana, najmanje 6 do 8 vrijednosti).

Obrada podataka

Izračun BOD uzorka je sljedeći (slika 5.27):

$$\text{BOD} = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2)}{p} \quad 5.16$$

U gornjem izrazu D_1 je koncentracija DO u razrijeđenom uzorku odmah nakon pripreme (mg L^{-1}), D_2 je koncentracija DO u razrijeđenom uzorku na kraju razdoblja inkubacije (mg L^{-1}), B_1 je koncentracija DO slijepe otopine odmah nakon pripreme (mg L^{-1}), B_2 je koncentracija DO slijepe otopine na kraju razdoblja inkubacije (mg L^{-1}), a p je decimalna volumetrijska frakcija korištenog uzorka.

Treba primijetiti da se zapravo masena bilanca testa sa zatvorenom bocom piše kao (LSS respirometrijski princip):

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = -r_{O_2} \quad 5.17$$

Iz toga, nakon integracije, slijedi da je,

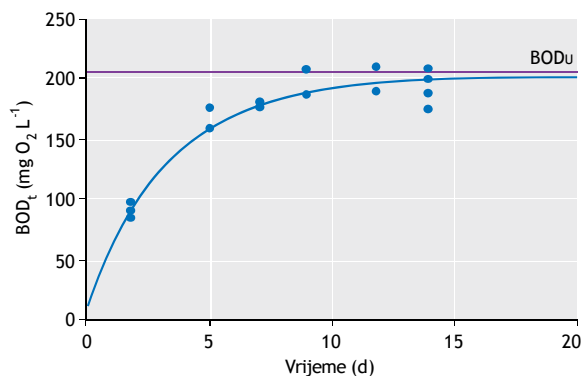
$$\text{BOD} = S_{O_2,t_0} - S_{O_2,t_{fin}} = \int_{t_0}^{t_{fin}} r_{O_2}(t) \cdot dt \quad 5.18$$

To pokazuje da je BOD ništa drugo doli područje ispod tzv. respirograma, odnosno vremenski niz podataka o brzini respirometrije.

Za određivanje krajnjeg BOD, sljedeću jednadžbu prvog reda treba prilagoditi vremenskom nizu podataka o smanjivanju DO (slika 5.28):

$$\text{BOD}_t = \text{BOD}_U (1 - e^{-kt}) \quad 5.19$$

U gornjem izrazu BOD_t je apsorpcija kisika izmjerena u trenutku t (mg L^{-1}), BOD_U je krajnji BOD (mg L^{-1}), a k je koeficijent brzine apsorpcije kisika prvog reda (d^{-1}).



Slika 5.28 Izmjereni BOD uzorka u razdoblju od 14 dana i podešavanje jednadžbe kinetici prvog reda (Weijers, 2000).

Jednadžbu bi po mogućnosti trebalo korigirati pomoću nelinearne regresije, npr. pomoću funkcije Solver u Excelu kako bi se minimizirao zbroj kvadratnih pogrešaka između izmjerenih vremenskih nizova apsorpcije kisika i modelom predviđenih BOD_t za određene vrijednosti BOD_U i *k*. Treba primijetiti da ovaj pristup daje ne samo BOD_U već i *k*. Ovo potonje pruža informaciju o brzini razgradnje organske tvari. Napominjemo da model prvog reda ne mora uvijek biti najbolji izbor. Puno bolja podešavanja se često mogu dobiti pomoću alternativnih kinetičkih modela, naročito onih koji se sastoje od zbroja dva ili više modela prvog reda.

Preporuke

Kad je koncentracija DO na kraju testa manja od 1 mg L⁻¹ ili je smanjenje DO manje od 2 mg L⁻¹, test bi trebalo ponovno provesti, ali s većim odnosno manjim razrjeđivanjem.

Kako bi se provjerilo je li BOD test dobro proveden, može se napraviti kontrola testa pomoću otopine s poznatim BOD. Preporučena otopina je standardna mješavina 150 mg L⁻¹ glutaminske kiseline i 150 mg L⁻¹ glukoze. 2-postotno razrjeđenje ove koncentrirane otopine trebalo bi dovesti do BOD₅ od otprilike 200 ± 30 mg L⁻¹. Može se predvidjeti BOD_U od 308 mg L⁻¹ (APHA, 2012).

Može biti potrebna prethodna obrada uzorka. Temperaturu i pH uzorka će možda prije razrjeđivanja trebati korigirati na 20 °C i 6,5 < pH < 7,5. Ako je uzorak kloriran, treba ga deklorirati (dodavanjem Na₂SO₃) i svakako treba koristiti inokulum. Može se naići na uzorke prezasićene kisikom (više od 9 mg L⁻¹ pri 20 °C) ako je uzorak bio hladan ili je došlo do fotosintetske aktivnosti. U takvim je slučajevima potrebna deoksigenacija na način da se snažno protrese djelomično napunjena BOD bočica ili je se aerira čistim komprimiranim zrakom.

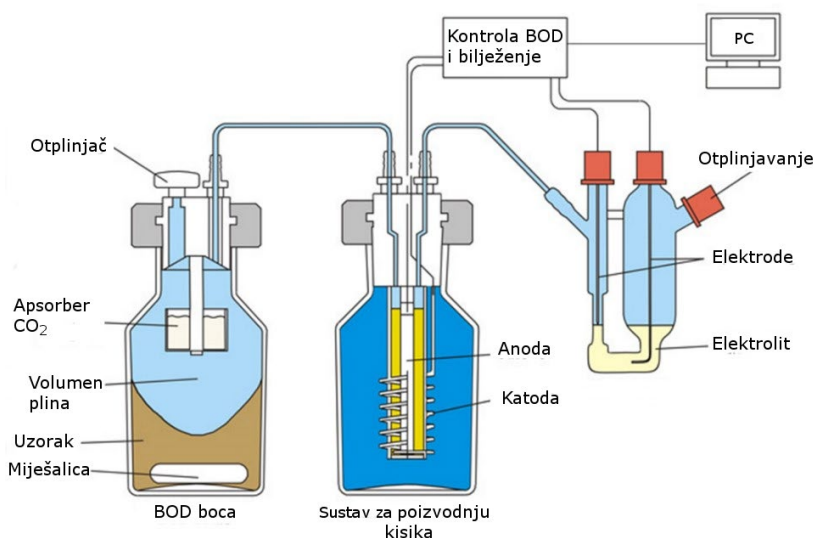
Nitrifikacija se može inhibirati pomoću više kemikalija, npr. nitrapirin, aliltiourea (ATU) ili 2-klor-6-(triklormetil)piridin (TCMP). I dok preporučene koncentracije obično dovedu do odgovarajuće inhibicije, prijavljena je prilagodba mikroorganizama tim kemikalijama, a mogu se i razgraditi tijekom testa, što omogućuje da nitrifikacija započne u kasnijoj fazi testa. Stoga se preporučuje da se na kraju testa provjeri jesu li nastali nitrit i nitrat.

Dostupna je (terenska) testna oprema za mjerenje BOD bez laboratorijske opreme. Osigurani su standardni nutrijenti i bakterije za inokulaciju, a DO se mjeri na temelju fotometrijske metode.

- BOD test pomoću GFS respirometra

Kako bi se riješio problem ograničene količine otopljenog kisika dostupne u testu sa zatvorenim bočicom, razvijena je oprema za ispitivanje BOD. U sklopu ove testne opreme u tekućinu se uvodi kisik, što omogućuje razgradnju organske tvari. Na taj način, razrjeđivanje može biti nepotrebno ili se može značajno smanjiti budući da se raspon mjerenja BOD može značajno proširiti. Osnovna se oprema sastoji od boce u kojoj je osigurana plinska faza koja može dobavljati kisik kako se troši u testiranom uzorku. Ili volumen plina sadrži dovoljno kisika koji će omogućiti završetak oksidacije biološki razgradive tvari u uzorku, ili oprema omogućuje nadopunjavanje plinske faze svježim kisikom iz vanjskog izvora. Na taj način, osim BOD, može se mjeriti apsorpcija kisika više ili manje kontinuirano kroz vrijeme, čime se inherentno pruža mogućnost da se izračuna brzina respiracije s vremenom.

Postoji raznolika oprema koja radi prema GFS principu. Temeljni principi uključuju manometrijske respirometre koji prate promjenu tlaka u plinskoj fazi iznad tekućine kako se kisik troši. Interferencija koju izaziva CO₂ koji se proizvodi za vrijeme biološke razgradnje i ispušta se iz tekućine se rješava tako da se CO₂ hvata u alkalnoj (KOH) otopini ili granulama ugrađenima u opremu. Pomoću zakona idealnog plina, zabilježeni pad tlaka može se pretvoriti u potrošnju kisika. Komercijalno je dostupna oprema koja koristi pretvornik tlaka, jednostavnu logiku izračuna i uređaj za bilježenje podataka za vremenski niz BOD. Volumetrijski respirometri bilježe smanjivanje volumena plina (pri konstantnom tlaku) kako se kisik troši u plinskoj fazi. I ovdje je potrebno uklanjanje CO₂ pomoću alkalne otopine/granula. Elektrolitski respirometri koriste princip konstantnog volumena i tlaka plina za aktiviranje elektrolitske proizvodnje kisika i održavaju koncentraciju kisika u plinskoj fazi konstantnom (slika 5.29). CO₂ ispušten iz tekućine bi ponovno narušio princip konstantnog tlaka i mora ga se ukloniti iz plinske faze. Alternativno, može se dobiti kisik, i mjeriti njegov protok, iz izvora čistog kisika (npr. boca s plinom) kako bi se održao tlak u zrakonepropusnoj boci.



Slika 5.29 Elektrolitski respirometar za analizu BOD (SELUTECH GmbH).

Ako nije dostupna vanjska dobava kisika, kao što je slučaj kod ranije opisanog respirometra ("BOD test pomoću LSS respirometra"), treba posvetiti pažnju ukupnoj potrošnji kisika u uzorku. Ona ne bi trebala premašiti količinu kisika prisutnog u plinskoj fazi iznad tekućine, budući da bi to dovelo do ograničavanja kisikom i pogrešnih rezultata. Volumen uzorka koji treba dodati u bocu će prema tome ovisiti o njegovom sadržaju BOD, a priručnici o respirometrima će obično sadržavati tablicu s volumenima koje treba dodati za različite raspone BOD. U svakom slučaju, metode bez dobave kisika se suočavaju sa smanjivanjem koncentracije DO u tekućini, što može djelovati na brzinu oksidacije tijekom testa.

Instrumenti omogućuju očitavanje BOD učestalošću od već svakih 15 min do svakih 6 h. Velika učestalost prikupljanja podataka može pomoći u tumačenju rezultata u smislu kinetike razgradnje ili može omogućiti bolje podešavanje modela kako bi se smanjio utjecaj šuma u mjerenju ili dobila pouzdanija procjena krajnjeg BOD.

Preporuke

Interferencija od strane drugih plinova osim CO₂ može dovesti do pogrešnih rezultata, ali ne prijavljuje se često. Temperaturne varijacije mogu djelovati i na mjerenje tlaka i volumena kao što djeluju na ukupni tlak. Uz to, promjene atmosferskog tlaka mogu djelovati na mjerenje u nekim respirometrima.

Može se otkriti potrošnja kisika od svega 0,1 mg L⁻¹, ali preciznost testa će ovisiti o ukupnoj količini potrošenog kisika, preciznosti mjerenja tlaka ili volumena i učinku varijacija u temperaturi i atmosferskom tlaku.

Budući da se kisik mora prenijeti iz plinske faze u tekuću fazu, mora se paziti da brzina apsorpcije kisika previše ne prekorači brzinu masenog prijenosa kisika u tekuću fazu, budući da bi to dovelo do

ograničavanja kisika u procesu biološke razgradnje, a time i do pogrešaka u rezultatu BOD. Prijenos kisika uglavnom ovisi o uvjetima miješanja u tim respirometrima, čime se brzine apsorpcije kisika ograničavaju na $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ za naprave sa sporim miješanjem i do $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ako je osigurano miješanje velikog intenziteta. Ako brzina apsorpcije premašuje dobavnu brzinu predmetnog respirometra, uzorak se može razrijediti tako da se brzina apsorpcije smanji na prihvatljive vrijednosti. Sastav vode za razrjeđivanje se mora provjeriti kako je već spomenuto.

Treba primijetiti da je BOD test respirometrijski test budući da mjeri potrošnju krajnjeg akceptora elektrona, O_2 , premda općenito ne mjeri brzinu respiracije. Zapravo, BOD je kumulativna potrošnja kisika koja se može dobiti objedinjavanjem brzine respiracije kroz određeno razdoblje inkubacije. Kako je gore spomenuto, LFS respirometrija inherentno omogućuje izračun brzine respiracije s vremenom.

Također treba napomenuti da se BOD može mjeriti na slične načine pomoću drugih akceptora elektrona kao što je nitrat.

Može biti potrebno naciepljivanje i dodavanje nutrijenata za konkretne uzorke otpadne vode, ako predmetna biomasa nije prisutna ili ako otpadna voda nije uravnotežena u smislu nutrijenata nasuprot organskog materijala, zbog čega može biti izložena ograničenjima bakterijskog rasta, što dovodi do neobjektivnih rezultata BOD.

5.4.3 Kratkotrajna biokemijska potrošnja kisika (BOD_{st})

Vremenska varijacija sastava otpadne vode se može lako karakterizirati pomoću kemijskih metoda kao što su analize COD i TOC. Te metode mogu pružiti podatke pri velikoj učestalosti mjerenja (npr. na satnoj osnovi), ali ne pružaju informacije o biološkoj obradivosti onečišćujućih tvari. Tradicionalne metode koje se oslanjaju na praćenje biološke razgradnje onečišćujućih tvari kako bi se dobila naznaka obradivosti, kao što je gore spomenuta metoda BOD_5 , su jasno neprikladne za pružanje informacija takvom velikom učestalošću zbog velikog razmaka između početka analize uzorka i rezultata mjerenja. Ipak, princip praćenja apsorpcije kisika radi procjene obradivosti i koncentracije organske tvari u otpadnoj vodi je izrazito važan, budući da se većina procesa obrade otpadne vode oslanja na aerobnu razgradnju organske tvari. Zbog toga, predložene su metode za skraćivanje vremena reakcije tih biološki posredovanih metoda na takvu razinu da njihova primjena u praćenju s velikom učestalošću postane moguća.

Kratkotrajna biokemijska potrošnja kisika (BOD_{st}) se definira kao količina kisika potrošenog za biološku razgradnju biološki lako razgradive organske tvari po volumenu otpadne vode.

U tradicionalnom BOD_5 testu (odjeljak 5.4.2), mala količina biomase se dodaje velikom uzorku otpadne vode (obično se početni omjer supstrata i biomase S_0/X_0 postavlja na između 10/1 i 100/1 $\text{mg BOD}_5 \text{ mg MLVSS}^{-1}$). Kao rezultat toga, treba doći do značajnog rasta prije nego što se dostupne onečišćujuće tvari razgrade, i može doći do faze prilagodbe u kojoj se mulj prilagođava onečišćujućim tvarima. Kako bi se ubrzalo vrijeme reakcije (na unutar sata), tehnike za određivanje BOD_{st} se temelje na malom omjeru S_0/X_0 (obično 1/20 do 1/200 $\text{mg BOD}_5 \text{ mg MLVSS}^{-1}$). Ti uvjeti se postižu dodavanjem malog alikvota otpadne vode aktivnom mulju prisutnom u testnoj posudi. Na taj se način u znatnoj mjeri (često na manje od jednog sata) može smanjiti vrijeme razgradnje i ne očekuje se značajniji rast biomase zbog relativno male količine dodane organske tvari.

Zbog kratkog trajanja testa, očito je da se tvar koja se u uzorku otpadne vode biološki sporo razgrađuje neće razgraditi, odnosno mjeri se samo biološki lako razgradiva frakcija. Nema vremena ni za prilagodbu biomase bilo kojoj novoj organskoj komponenti koja može biti prisutna u otpadnoj vodi, a kojoj je biomasa po prvi put izložena. Uz to, postoji i važno ograničenje da se u testu ne koristi biomasa iz uređaja s naprednim biološkim uklanjanjem mulja (EBPR). Ta biomasa sadrži organizme koji akumuliraju fosfor (PAO) i koji mogu pohraniti hlapive masne kiseline (VFA). Kada se frakcija VFA u biološki lako razgradivoj tvari troši za pohranjivanje, ne oksidira se, zbog čega se neće mjeriti u respirometrijskom testu. Čitatelja upućujemo i na odjeljke 5.5.3.2 i 5.5.3.3 (slika 5.48).

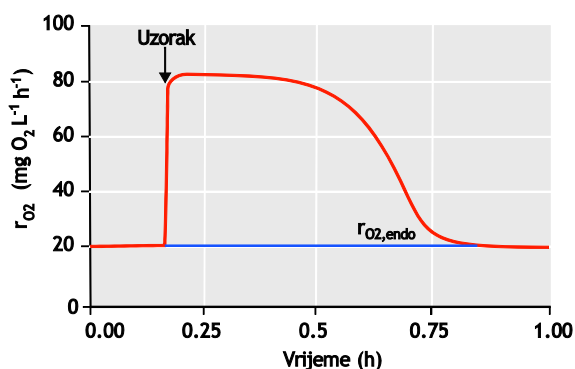
Međutim, mogućnost mjerenja biološki lako razgradive tvari je jako važna informacija naročito za predviđanje i optimiziranje uspješnosti denitrifikacije i naprednog biološkog uklanjanja fosfora. Napominjemo da, budući da se respirometrijski test može koristiti za razlikovanje između biološki sporo

i lako razgrađive tvari, to daje temelj za procjenu frakcija otpadne vode u kontekstu matematičkog modela (odjeljak 5.4.5).

Zbog brze respiracije proizašle iz velikog razgradnog kapaciteta dostupnog u testnoj posudi, može doći do problema u zadovoljavanju potreba mulja za kisikom. Respirometrijske metode koje se temelje na mjerenju smanjivanja početne količine kisika prisutnog u biomasi su ozbiljno ograničene zbog rizika ograničavanja kisikom. Slijedom toga, dinamički raspon koncentracije takvih metoda je mali, s maksimalnim dodavanjima uzorka od 5 mg BOD_{st} L⁻¹ aktivnog mulja. Očito, taj problem rješava aeriranje mulja, dostupno u raznoj respirometrijskoj opremi. Međutim, intenzitet aeracije mora biti dovoljan. Ipak, budući da se u mnogim slučajevima otopljeni kisik mjeri u testnoj posudi, lako se može provjeriti je li dobavljeno dovoljno kisika (odnosno, DO uvijek treba biti iznad 2 mg L⁻¹) tijekom BOD_{st} testa. U većini respirometara početne koncentracije BOD_{st} u testnoj posudi mogu lako dosegnuti 100 mg BOD_{st} L⁻¹.

5.4.3.1 Izvođenje testa

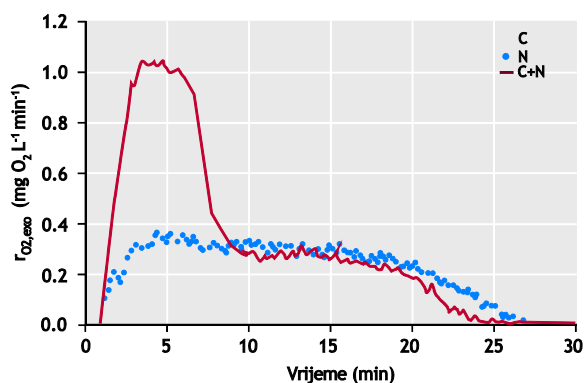
BOD_{st} test se provodi tako da se prvo određeni volumen aktivnog mulja stavi u termostatoranu (npr. 20 °C) i aeriranu testnu posudu i pusti da dođe do stabilnog stanja koje karakterizira ono što se zove endogena respiracija. Endogena respiracija se definira kao stanje u koje biomasa dospje kad u aktivnom mulju više nema dostupnog vanjskog supstrata. Biomasa respiracijom oksidira vlastite rezervne materijale ili produkte razgradnje mrtve biomase. Postizanje tog stanja može potrajati između nekoliko sati i jednog dana, ovisno o tome koliko je aktivni mulj opterećen biološki sporo razgrađivom tvari (koja može hidrolizirati). Tipične brzine endogene respiracije su između 2 i 10 mg O₂ L⁻¹ h⁻¹. Nakon što se postigne endogeno stanje, odjednom se ubrizgava određeni volumen otpadne vode, čija se količina izračunava tako da dovede do željenog omjera S₀/X₀- od otprilike 1/20 do 1/200 mg BOD₅ mg MLVSS⁻¹.



Slika 5.30 Shematski prikaz respirograma. Nakon što biomasa prođe endogenu respiraciju (vanjski supstrat nije prisutan), ubrizgava se uzorak koji sadrži organsku tvar. Egzogeno respiracija započinje i nastavlja se dok se ne ukloni sav supstrat, nakon čega se respiracija vraća na razinu endogene respiracije.

Čim supstrat postane dostupan biomasi, počinje biološka razgradnja i brzina apsorpcije kisika se brzo povećava do maksimalne brzine koja je određena aktivnošću biomase i brzinom razgradnje supstrata. Ako su u mulju prisutni nitrifikanti i otpadna voda sadrži dušik koji se može nitrificirati (amonijak i organski dušik koji se brzo amonificira), ta brzina egzogene respiracije uključuje i brzinu apsorpcije za nitrifikaciju. Supstrati će se postupno iscrpljivati i brzina apsorpcije kisika će se postupno smanjivati da bi na kraju dosegla endogenu brzinu. Supstratom inducirana krivulja brzine apsorpcije kisika se zove respirogram, čiji se shematski prikaz nalazi na slici 5.30.

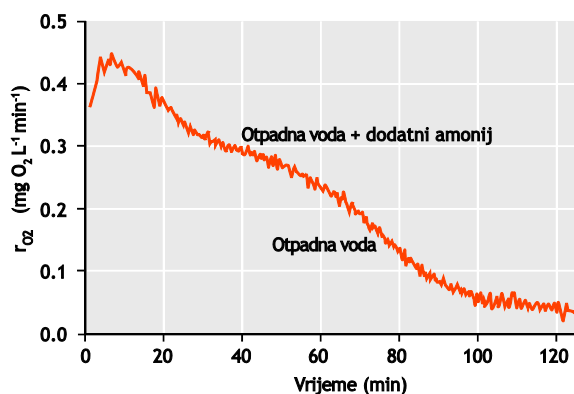
Slika 5.31 ilustrira da su egzogeno heterotrofna i autotrofna respiracija neovisne i njihovi respirogrami se mogu preklapati. Prikazana su tri respirograma, jedan s dodavanjem COD samo u obliku acetata koji pokazuje heterotrofnu aktivnost, jedan s dodavanjem amonijaka koji pokazuje aktivnost nitrifikanata te jedan s mješavinom COD/N.



Slika 5.31 Ilustracija zbrajanja brzina egzogene heterotrofne i autotrofne respiracije. Kvadratni simboli predstavljaju respirogram s dodavanjem 20 mg COD L⁻¹ acetata, krugovi predstavljaju brzinu respiracije zbog nitrifikacije nakon dodavanja 2,5 mg N L⁻¹, a linija je respirogram mješavine 20 mg COD L⁻¹ i 2,5 mg N L⁻¹ (Kong i sur., 1996)

Slike 5.32, 5.33 i 5.34 prikazuju neke tipične respirograme, od koji neki pokazuju samo brzine egzogene respiracije koje se, slijedeći neka respirometrijska načela, mogu izračunati izravno iz podataka o DO.

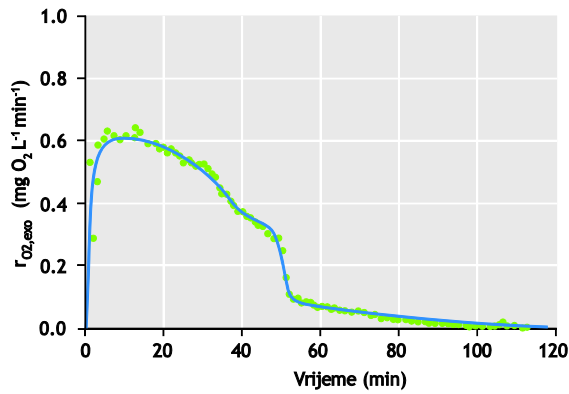
Prisutnost respiracije zbog nitrifikacije je primjetna na respirogramu na slici 5.32. Doista, kad se ubrizga uzorak otpadne vode nadopunjen dodatnim amonijem, može se jasno opaziti dodatna egzogena respiracija zbog respiracije za nitrifikaciju u izostanku inhibiranosti nitrifikacije.



Slika 5.32 Primjer respirograma dobivenih iz BOD testova s otpadnom vodom i otpadnom vodom pomiješanom s dodatnom količinom amonija (Petersen i sur., 2002a).

Kada se provode dva eksperimenta, jedan u prisutnosti inhibitora nitrifikacije, a drugi bez inhibitora, može se procijeniti koncentracija amonija u otpadnoj vodi tako da se napravi razlika između BOD_{st} oba uzorka. Ta potrošnja kisika koja se dijeli s 4,33 mg O₂ mg N⁻¹ omogućuje da se dobije koncentracija amonija u uzorku otpadne vode (pod uvjetom da je ostvarena puna nitrifikacija do nitrata). Štoviše, budući da je amonifikacija obično vrlo brz proces, tako se može kvantificirati ne samo amonij, već zapravo dušik u otpadnoj vodi koji se može nitrificirati.

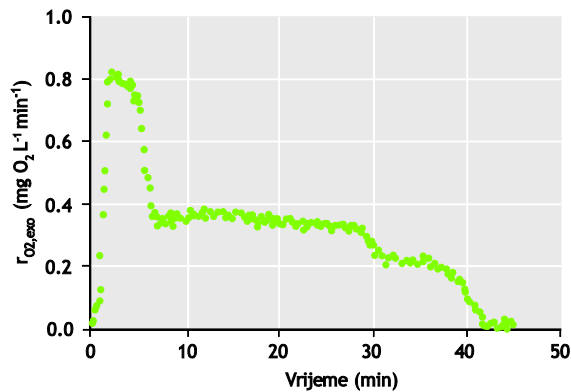
Na slici 5.33 prikazan je primjer respirograma za tipični uzorak komunalne otpadne vode dodan biomasi bez inhibitora nitrifikacije.



Slika 5.33 Primjer respirograma dobivenih iz BOD₅ testova s komunalnom otpadnom vodom (Spanjers i Vanrolleghem, 1995).

Na tom grafikonu prikazana je jedino brzina egzogene respiracije. Tumačenje respirograma je sljedeće (Spanjers i Vanrolleghem, 1995). Počevši od desnog kraja respirograma, brzina respiracije se postupno povećava do nekih 50 minuta, u kojem trenutku se opaža iznenađan pad u brzini respiracije. Do takvog iznenađenog pada dolazi zbog potpunog uklanjanja amonija iz aktivnog mulja, nakon čega se oksidira samo organska tvar koja može hidrolizirati. Otud potječe i tipičan eksponencijalni pad u brzini respiracije zbog prirode hidrolize prvog reda.

U zadnjem primjeru predstavljen je respirogram industrijske otpadne vode (slika 5.34).



Slika 5.34 Rezultati OUR testa s industrijskom otpadnom vodom s prikazom tri preklopljena respirograma koji odgovaraju razgradnji tri različita otapala (Coen i sur., 1998)

I ovdje su prikazane samo brzine egzogene respiracije. Respirogram zapravo prikazuje preklapanje tri respirograma. To bi se moglo objasniti prisutnošću tri glavna otapala u otpadnoj vodi koje je paralelno razgradila aklimatizirana biomasa. Izvođenjem tri horizontalne linije koje odgovaraju platoima, mogu se odrediti količine svakog od otapala uzimajući odgovarajuću površinu (vidi niže izračune). Treba primijetiti da se na slici 5.34 horizontalne linije mogu koristiti zato što izmjerene brzine odgovaraju uvjetima zasićenja supstrata, dok u nekim drugim slučajevima (na primjer slika 5.39) dolazi do ograničenja supstratom, odnosno brzina respiracije se smanjuje kako se supstrat iscrpljuje, i koriste se nagnute linije.

5.4.3.2 Izračuni

Budući da se BOD_{st} (mg O₂ L⁻¹) definira kao količina kisika potrošenog za biološku razgradnju onečišćujućih tvari, može ga se lako izračunati integriranjem vremenskih nizova brzina egzogene respiracije r_{O₂,exo} (mg O₂ L⁻¹ h⁻¹):

$$\text{BOD}_{\text{st}} = \int_{t_{\text{pulse}}}^{t_{\text{final}}} r_{\text{O}_2,\text{exo}}(t) \cdot dt \quad 5.20$$

U tom izrazu, t_{pulse} je vrijeme dodavanja uzorka, a t_{final} je vrijeme potrebno za povratak na brzinu endogene respiracije nakon dodavanja uzorka.

Očito, BOD_{st} ubrizganog uzorka se izvodi iz:

$$BOD_{\text{st}}^{\text{sample}} = \frac{V_{\text{Sludge}} + V_{\text{Sample}}}{V_{\text{Sample}}} \cdot BOD_{\text{st}} \quad 5.22$$

U tom izrazu, V_{Sample} je volumen uzorka, a V_{Sludge} je volumen mulja u testnoj posudi prije dodavanja uzorka.

Kako je objašnjeno ranije u kontekstu slike 5.31, količina dušika koji se može nitrificirati (N_{Nit} u mg N L^{-1}) se može izračunati iz dijela respirograma koji se može pripisati brzini respiracije zbog nitrifikacije $r_{\text{O}_2, \text{exo}}^{\text{Nit}}$ ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$):

$$N_{\text{Nit}} = \frac{1}{4.57 - Y_{\text{ANO}}} \int_{t_{\text{pulse}}}^{t_{\text{final}}} r_{\text{O}_2, \text{exo}}^{\text{Nit}}(t) \cdot dt \quad 5.23$$

U tom izrazu, Y_{ANO} je koeficijent prinosa nitrifikanata, obično $0,24 \text{ mg COD mg N}^{-1}$.

Slično tome, BOD_{st} pripisan različitim frakcijama organske tvari prisutne u otpadnoj vodi može se izračunati iz brzina egzogene respiracije koje se mogu pripisati preklapljenim brzinama respiracije $r_{\text{O}_2, \text{exo}}^i$ ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), slika 5.33:

$$BOD_{\text{st}}^i = \int_{t_{\text{pulse}}}^{t_{\text{final}}} r_{\text{O}_2, \text{exo}}^i(t) \cdot dt \quad 5.24$$

5.4.4 Toksičnost i inhibicija

5.4.4.1 Svrha

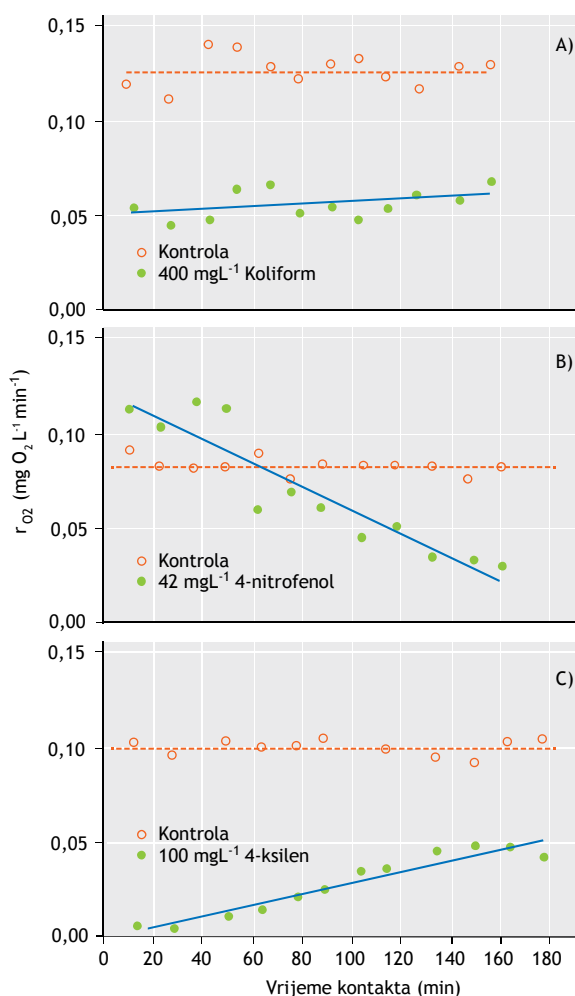
Respirometrijske tehnike se često preferiraju za procjenu inhibitornih i toksičnih učinaka tvari ili otpadne vode na biomasu (Volskay i Grady, 1990). Inhibicija je pogoršanje biološkog funkcioniranja i obično je reverzibilna. Toksičnost je negativan učinak na biološki metabolizam, obično ireverzibilna inhibicija (Batstone i sur., 2002). U ovom poglavlju preferiramo korištenje pojmova toksičnost i toksična tvar kako bi se obuhvatili i reverzibilni i ireverzibilni učinci. Premda se rezultati testova toksičnosti često izražavaju u smislu IC_{50} (koncentracija koja proizvodi 50-postotnu inhibiciju respiracije), IC_{50} ne daje potpun uvid u toksični učinak neke kemikalije. Kako bi se predvidjeli učinci toksičnih spojeva na uklanjanje organske tvari i nutrijenata ili kako bi se osmislile mjere ublažavanja u procesu biološke obrade, treba kvantificirati učinke toksične tvari na kinetiku biološke razgradnje.

5.4.4.2 Izvođenje testa

Za procjenu toksičnosti mogu se koristiti smanjenja brzine endogene i egzogene respiracije. Ako se kao pokazatelj toksičnosti koristi smanjenje u brzini endogene respiracije, biomasa se prvo dovodi do endogenog stanja, dodaje se toksična tvar i onda se mjeri smanjivanje brzine endogene respiracije. Ako je toksična tvar ili toksična otpadna voda biološki razgradiva, može se javiti egzogena respiracija, što će omesti evaluaciju smanjivanja brzine endogene respiracije. Također je utvrđeno da je biomasa manje osjetljiva na toksične tvari kad je u svojem endogenom stanju.

Temelj za procjenu toksičnosti na temelju brzina egzogene respiracije (vidi odjeljak 5.4.3.1) su respirogrami. U testu koji se temelji na egzogenoj brzini, referentni supstrat (npr. acetat za heterotrofne testove toksičnosti ili amonijak za testove toksičnosti nitrifikanata) se ubrizgava prije ubrizgavanja potencijalno toksičnog uzorka kako bi se procijenila referentna brzina respiracije (tj. aktivnost biomase). Nakon što je toksična tvar dodana i imala je vremena djelovati na biomasu, ubrizgava se još jedan volumen referentnog supstrata, a utvrđena aktivnost (npr. maksimalna brzina egzogene respiracije) se uspoređuje s onom dobivenom prije ubrizgavanja toksične tvari. Treba napomenuti da vrijeme između ubrizgavanja toksične tvari i ubrizgavanja referentnog supstrata može djelovati na utvrđenu razinu toksičnosti budući da dugotrajnija izloženost može dovesti do snažnijeg učinka ili može dovesti i do prilagodbe biomase (slika 5.35). Nema jasne naznake o optimalnim vremenima izloženosti. Ponekad čak

može doći do stimuliranja respiracije, odnosno rasta maksimalne brzine respiracije za razgradnju referentnog supstrata nakon dodavanja toksične tvari nego bez nje. Tome je tako zbog povećanih potreba biomase za energijom kako bi se mogla nositi s toksičnim tvari (npr. energetsko razdvajanje u prisutnosti benzoidne kiseline kao toksične tvari). U svakom slučaju uvijek je važno navesti korišteno vrijeme između ubrizgavanja toksične tvari i referentnog supstrata.



Slika 5.35 Tipični podaci iz testova inhibiranosti respiracije s različitim vremenima kontakta: (A) kloroform, (B) 4-nitrofenol te (C) 4-ksilen (Volskay i Grady, 1990)

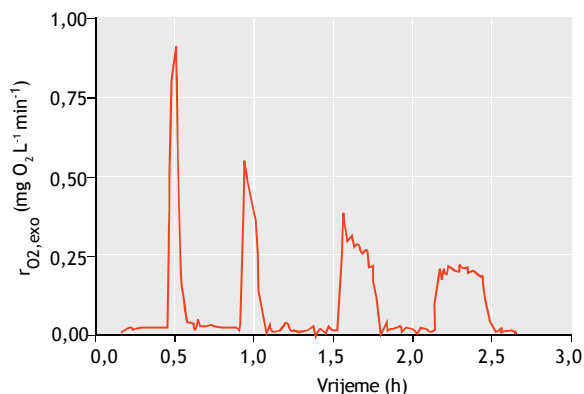
5.4.4.3 Izračuni

Razina ozbiljnosti toksičnosti se može dobiti tako da se izračuna omjer u razinama aktivnosti prije i nakon dodavanja toksične tvari.

$$\text{Toxicity (\%)} = \frac{r_{O_2, \text{exo}}^{\text{max}}(\text{before}) - r_{O_2, \text{exo}}^{\text{max}}(\text{after})}{r_{O_2, \text{exo}}^{\text{max}}(\text{before})} \times 100 \quad 5.25$$

Očito je da će razina ozbiljnosti toksičnosti ovisiti o korištenoj dozi toksične tvari. Krivulje doza-odgovor se dobivaju iz niza eksperimenata u kojima se odgovor na toksičnost mjeri u različitim dozama, koje omogućuju procjenu IC_{50} (pola maksimalne inhibitorne koncentracije). Običan testni protokol za dobivanje odnosa između doze i učinka je napraviti slijed: referentni supstrat-toksična tvar-referentni supstrat u jednoj dozi, zamijeniti biomasu svježom biomasom i provesti još jedan slijed: referentni supstrat-toksična tvar-referentni supstrat, ali pri višoj dozi. Obično je koncentracija doze višekratnik prethodne doze. Ovaj skup slijedova, referentni supstrat-toksična tvar-referentni supstrat se nastavlja sve do potpune inhibiranosti biomase.

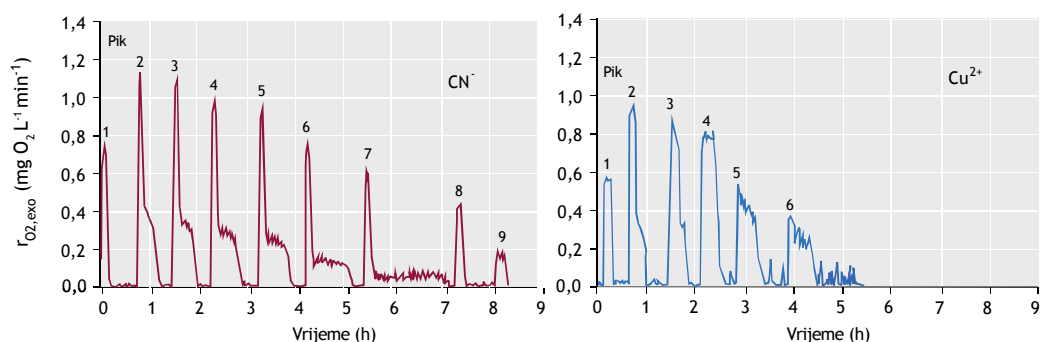
Kako bi se ubrzalo eksperimentiranje, može se izostaviti korak koji uključuje zamjenu biomase (Kong i sur., 1994), ali onda vrijeme kontakta nije pod kontrolom eksperimentatora. Na slici 5.36 prikazan je primjer takvog brzog određivanja odnosa između doze i učinka za dodavanje bakra biomasi u sve većim dozama od 0, 2,5, 5,0 i 10,0 ppm.



Slika 5.36 Tipični respirogrami dobiveni iz testa ARIKA (Automated Respiration Inhibition Kinetics Analysis) s bakrom (Kong i sur., 1994). Prvi respirogram je dobiven pomoću čistog acetata, a kasniji respirogrami su serija rezultata gdje je korištena mješavina acetata s geometrijskom progresijom koncentracije toksične tvari (kumulativna koncentracija toksične tvari: 2,5, 7,5 i 17,5 ppm).

To dovodi do koncentracija izloženosti bakru od 0, 2,5, 7,5 i na kraju 17,5 ppm, ali svaka s različitim vremenima kontakta. Na slici je jasno vidljivo da se maksimalna brzina respiracije za razgradnju acetata (referentni supstrat u ovom eksperimentu) brzo smanjuje. Valja primijetiti da područje ispod krivulje ostaje isto, odnosno BOD_{st} (odjeljak 5.4.3) ostaje isti budući da je sav acetat i dalje razgrađen, premda manjom brzinom. To također znači da treba duže vrijeme da se respirogram završi.

Iz ovog eksperimenta može se vizualno zaključiti da IC₅₀ iznosi oko 7,5 ppm budući da je maksimalna brzina respiracije pri ovoj koncentraciji bakra oko pola maksimalne brzine respiracije u odsustvu bakra (usporedi prvi respirogram, u ~0,5 h, s trećim respirogramom, u ~1,7 h).



Slika 5.37 Egzogeni respirogrami s dodavanjem supstrata C i N (20 mg L⁻¹ odnosno 2 mg L⁻¹) i s Cu²⁺ (A) i CN⁻ (B) kao toksičnim tvarima. Prvi maksimum je onaj za čistu acetata, drugi je za čistu mješavinu C i N, nakog čega slijedi serija mješavina supstrata C i N i toksične tvari (kumulativne koncentracije Cu²⁺ od 2,5, 7,5, 17,5, 37,5, 77,5 i 157,5 ppm i kumulativne koncentracije CN⁻ od 0,013, 0,038, 0,088, 0,188, 0,388, 0,788 i 1,588 ppm). (Kong i sur., 1996).

Kako je ranije spomenuto, autotrofni i heterotrofni respirogrami mogu se preklapati, a testiranje toksičnosti prema heterotrofnoj i autotrofnoj aktivnosti se prema tome može provesti u jednom eksperimentu s mješavinom COD i N kao referentnim supstratom. Na slici 5.37 procijenjen je utjecaj dvije klasične toksične tvari, bakra i cijanida, na heterotrofnu i autotrofnu biomasu. Te serije

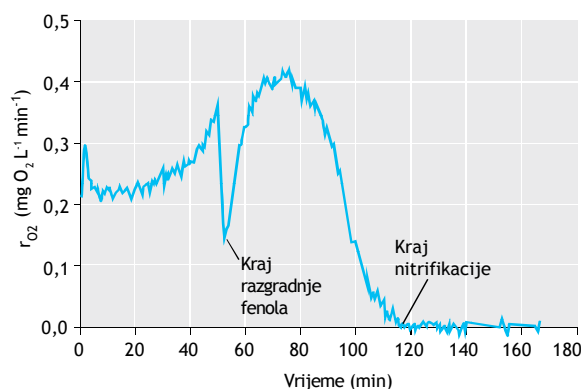
respirograma s rastućom koncentracijom toksične tvari pokazuju da su nitrifikanti osjetljiviji na cijanid od heterotrofa (IC_{50} iznosi otprilike 0,2 ppm za nitrifikante, a oko 1 ppm za heterotrofe). Za bakar, IC_{50} za acetatne oksidatore i IC_{50} za nitrifikante su približno isti budući da se čitav respirogram zajedno smanjuje.

5.4.4.4 Biološki razgradive toksične tvari

Dosad je razmatrana jedino toksičnost biološki nerazgradivih tvari. Ipak, korištenje respirometrije za određivanje toksičnosti biološki razgradivih tvari je složenije. Kada se za određivanje toksičnosti koristi tipični slijed: referentni supstrat-toksična tvar-referentni supstrat, biološki razgradiva toksična tvar će dovesti do respirograma nakon ubrizgavanja. Prema tome, to se mora završiti prije dodavanja druge doze referentnog supstrata. Ako je toksični utjecaj reverzibilan (tj. inhibicija), može biti da se ne može otkriti nikakva toksičnost, budući da je toksična tvar uklonjena iz aktivnog mulja. Međutim, protivno ovoj kratkotrajnoj, ili privremenoj, toksičnosti, dugotrajna toksičnost može se procijeniti pomoću slijeda: referentni supstrat-toksična tvar-referentni supstrat, kako je gore objašnjeno.

Respirometrija može biti vrlo korisna za istraživanje određenog broja biološki razgradivih toksičnih tvari koje su inhibitorne za vlastitu biološku razgradnju kroz ono što se zove inhibicija supstratom, odnosno supstrat na kojem biomasa raste je inhibitoran za process rasta biomase. I nitrifikacija može biti samo-inhibirana kad je koncentracija amonijaka previsoka. Respirogrami takvih samo-inhibitornih supstrata pokazuju rastuću brzinu respiracije kako se koncentracija biološki razgradive toksične tvari s vremenom smanjuje, čime se smanjuje njegov inhibitorni učinak.

Na slici 5.38 je prikazano kako respirometrija može objasniti određene složene pojave koje se javljaju u biološkoj otpadnoj vodi izloženoj toksičnim tvarima (Gernaey i sur., 1999). U ovom primjeru, fenol i amonij se dodaju miješanoj biomasi koja se sastoji od nitrificirajućih i heterotrofnih bakterija. Fenol je jedan od najpoznatijih primjera toksičnog, ali biološki razgradivog spoja. U preliminarnom je eksperimentu potvrđeno da bi biomasa korištena u eksperimentima mogla razgraditi fenol. Ono što je opaženo u respirometrijskom eksperimentu prikazanom na slici 5.38 je da je nitrifikacija inhibirana fenolom koji postupno razgrađuju heterotrofi. Međutim, samu razgradnju fenola također inhibira toksični učinak fenola na heterotrofe, odnosno: samo-inhibicija. U prvoj fazi, nitrifikacija je inhibirana, ali se fenol razgrađuje, mada polako. Razgradnja fenola se ubrzava nakon nekih 30 minuta i dolazi kraju nakon nekih 50 minuta, što se može vidjeti u oštrm padu u profilu $r_{O_2,exo}$. Čim razgradnja fenola završi, nitrifikacija se ubrzava do iste brzine kao prije dodavanja fenola (može se provesti i zaseban eksperiment s dodavanjem amonija kako bi se procijenio učinak na samu nitrifikaciju).



Slika 5.38 Respirometrijski odgovor miješane heterotrofno-nitrificirajuće biomase na dodavanje mješavine fenola (15 mg L⁻¹) i amonija (5 mg N L⁻¹). Prikazana je jedino brzina egzogene respiracije (Gernaey i sur., 1999).

Budući da inhibirajuća koncentracija ovisi o porijeklu i aklimatizaciji biomase, moglo bi biti zanimljivo istražiti toksičnost spoja za aklimatiziranu biomasu. Primjer aklimatizacije utemeljene na respirometrijskom eksperimentu, s postupnim povećanjem IC_{50} i koeficijentom inhibicije, može se pronaći kod Rezouga i sur., (2009).

5.4.5 Frakcioniranje otpadne vode

Korištenje dinamičkih modela u procesima aktivnog mulja postaje sve raširenije i postalo je način razmišljanja i komuniciranja o procesima obrade otpadne vode. Model aktivnog mulja br. (ASM1) koji je predstavila Radna skupina IAWQ o matematičkom modeliranju za projektiranje i rad bioloških procesa obrade otpadne vode (Henze i sur., 1987) je općenito prihvaćen kao inovativan i u mnogim se studijama koristi za simuliranje uređaja za obradu otpadne vode. Taj će model biti temelj ovog odjeljka, koji se bavi korištenjem brzine respiracije za dobivanje frakcija otpadne vode u kontekstu ASM1.

Prije određivanja odnosa između brzine respiracije i frakcija komponenti ASM1, nužno je objasniti ovaj model za heterotrofni proces (tablica 5.2). Pretpostavlja se da čitatelj razumije Gujerovu matricu prikazanu u tablici 5.2.

Prema ASM1, ukupna brzina respiracije biomase u kontaktu s otpadnom vodom je:

$$r_{O_2, \text{tot}} = \frac{1 - Y_{OHO}}{Y_{OHO}} \cdot X_{OHO} \cdot \mu_{OHO} + \frac{4.57 - Y_{ANO}}{Y_{ANO}} \cdot X_{ANO} \cdot \mu_{ANO} \quad 5.26$$

Pri tome su specifične brzine rasta μ_{OHO} i μ_{ANO} funkcije S_B odnosno S_{NHx} (Henze i sur., 1987).

Koncentracije S_B i S_{NHx} , pak, ovise o brzinama pri kojima se razgrađuju XC_B , $S_{N,B}$ i $XC_{N,B}$ (tablica 5.2). Jasno je da svi nezavisni procesi sažeti u tablici 5.2 na kraju djeluju na masenu bilancu kisika (i nitrat ako se ista evaluacija radi za anoksične uvjete).

Postoje dva pristupa za procjenu frakcija otpadne vode za modeliranje: izravne metode fokusirane su na specifične frakcije koje se mogu izravno ocijeniti iz izmjerenih brzina respiracije (Ekama i sur., 1986; Spanjers i sur., 1999), dok metode optimizacije koriste (više ili manje pojednostavljen) model koji se podešava izmjerenim podacima (Kappeler i Gujer, 1992; Wanner i sur., 1992; Spanjers i Vanrolleghem, 1995). U potonjem pristupu, numeričke tehnike se koriste za pronalaženje vrijednosti nepoznatih frakcija otpadne vode koje dovode do najmanjeg odstupanja između modelom predviđenih i izmjerenih brzina respiracije.

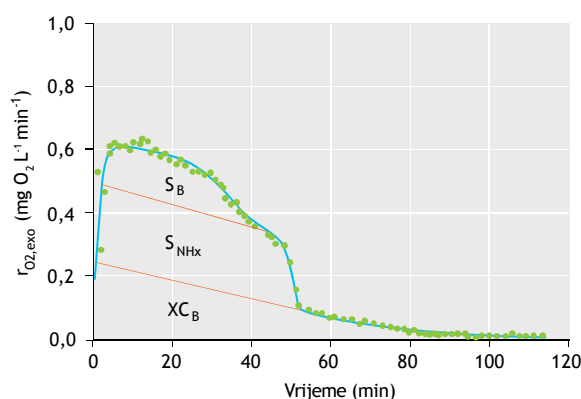
Iz procesa opisanih u tablici 5.2, jasno je da na ukupnu brzinu respiracije djeluju koncentracije svih biološki razgradivih komponenti i da je kumulativna potrošnja kisika (tj. integral od r_{O_2}) mjera količine razgrađenih komponenti. Treba primijetiti da budući da se u izravnim metodama uzimaju integrali brzina respiracije, učestalost mjerenja i omjeri signal-buka (pogreška mjerenja u usporedbi s vrijednosti mjerenja) nisu jako ključni za pouzdanu procjenu koncentracija komponenti. To je u suprotnosti s kinetičkom karakterizacijom (Vanrolleghem i sur., 1999 i Petersen i sur., 2003), gdje se informacije dobivaju iz promjena u brzinama respiracije (derivativ od r_{O_2}). To podrazumijeva puno veću ovisnost o točnosti parametra kvalitete respirometrijskog mjerenja.

Neodvojiv dio respirometrijskih testova za karakterizaciju otpadne vode je korištenje biomase: procjena komponentni otpadne vode temelji se na respirometrijskom odgovoru biomase na otpadnu vodu. Dva važna aspekta su povezana s korištenjem biomase. Prvi aspekt je količina komponente otpadne vode u odnosu na biomasu (omjer S_O/X_O , odjeljci 5.4.1.3 i 5.4.3) koja se koristi. Drugi aspekt: u konceptu odumiranje-regeneracija usvojenom u ASM1, novi S_B , XC_B , S_{NHx} , $S_{N,B}$ i $XC_{N,B}$ se kontinuirano generiraju iz raspadajuće biomase. U sklopu tog modela stoga je teško razlikovati između komponenti koje potječu iz otpadne vode i iz same biomase. Zapravo, prijelaz između egzogene respiracije i endogene respiracije je postupan. Respirometrijski test bi stoga trebalo organizirati na takav način da se te brzine mogu razlikovati. To je jedan od najizazovnijih problema u respirometrijskoj karakterizaciji otpadne vode u kontekstu ASM1.

Table 3.2 Activated Sludge Model No. 1: Gujer matrix (Henze *et al.*, 1987).

Component (i) → ↓ Process (j)	1 S _U	2 S _B	3 X _{U,INF}	4 X _{C,B}	5 X _{O,H}	6 X _{A,NO}	7 X _{U,E}	8 S _{O₂}	9 S _{NOx}	10 S _{NHx}	11 S _{B,N}	12 X _{C,B,N}	13 S _{ALK}	Process rate (p _j)
1 Aerobic growth of heterotrophic biomass		$-\frac{1}{Y_{O,H}}$			1			$-\frac{1-Y_{O,H}}{Y_{O,H}}$		$-i_{N,X,Bio}$			$-\frac{i_{N,X,Bio}}{14}$	$\mu_{O,H,max} \cdot \frac{S_B}{K_{S_B,O,H} + S_B} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \cdot X_{O,H}$
2 Anoxic growth of heterotrophic biomass		$-\frac{1}{Y_{O,H}}$			1					$-i_{N,X,Bio}$			$-\frac{1-Y_{O,H}}{14 \cdot 2.86 - Y_{O,H}} \cdot \frac{i_{N,X,Bio}}{14}$	$\mu_{O,H,max} \cdot \frac{S_B}{K_{S_B,O,H} + S_B} \cdot \frac{K_{O_2,O,H}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \cdot \frac{S_{NOx}}{K_{NOx,O,H} + S_{NOx}} \cdot X_{O,H}$
3 Aerobic growth of autotrophic biomass						1		$-\frac{4.57 - Y_{A,NO}}{Y_{A,NO}}$	$-\frac{1}{Y_{A,NO}}$	$-\frac{1}{Y_{A,NO}} - i_{N,X,Bio} - Y_{A,NO}$			$-\frac{i_{N,X,Bio}}{14} - \frac{2}{14 \cdot Y_{A,NO}}$	$\mu_{A,NO,max} \cdot \frac{S_{NHx}}{K_{S_{NHx},A,NO} + S_{NHx}} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2,A,NO} + S_{O_2}} \cdot X_{A,NO}$
4 Decay of heterotrophic biomass				$1 - f_{XU,Bio,ly}$	-1							$i_{N,X,Bio} - f_{XU,Bio,ly} \cdot i_{N,X,E}$		$b_{O,H} \cdot X_{O,H}$
5 Decay of autotrophic biomass				$1 - f_{XU,Bio,ly}$		-1						$i_{N,X,Bio} - f_{XU,Bio,ly} \cdot i_{N,X,E}$		$b_{A,NO} \cdot X_{A,NO}$
6 Ammonification of soluble organic nitrogen									1		-1		$\frac{1}{14}$	$q_{am} \cdot S_{B,N} \cdot X_{O,H}$
7 Hydrolysis of slowly biodegradable substrate		1		-1										$q_{X_{C,B},S_{B,ly,d}} \cdot \frac{X_{C,B}}{K_{X_{C,B},ly,d} + X_{C,B}} \cdot \frac{X_{O,H}}{X_{O,H}} \cdot \left(\frac{S_{O_2}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} + \frac{X_{C,B}}{K_{X_{C,B},ly,d} + X_{C,B}} \cdot \frac{S_{NOx}}{K_{NOx,O,H} + S_{NOx}} \right) \cdot X_{O,H}$
8 Hydrolysis of organic nitrogen											1	-1		$\rho_7 \cdot (X_{C,B,N} / X_{C,B})$

Slika 5.39 prikazuje respirogram dobiven u šaržnom eksperimentu gdje se na početku otpadna voda dodaje endogenom mulju.



Slika 5.39 Profil brzine egzogene respiracije dobiven nakon dodavanja 0,7 L otpadne vode u 1,3 L aktivnog mulja i frakcioniranje u skladu s procedurom koju su opisali Spanjers i Vanrolleghem, 1995b.

Na slici 5.39 prikazana je jedino brzina egzogene respiracije, odnosno endogena respiracija se oduzima od ukupne brzine respiracije. Tipični respirogram otpadne vode pokazuje početni maksimum izazvan oksidacijom biološki lako razgradive tvari, nakon čega slijedi jedan ili više naglih padova u kojima se sukcesivno nastavlja oksidacija ostalih komponenti. Čitavo područje ispod respirograma predstavlja ukupne biološki razgradive komponente $(S_B + X_{C,B}) / (1 - Y_{OHO}) + (S_{NHx} + S_{N,B} + X_{C,N,B}) / (4.57 - Y_{ANO})$, što slijedi iz gornje jednadžbe o ukupnoj brzini respiracije. Na slici 5.39 mogu se razaznati tri frakcije supstrata, koje odgovaraju S_B , $X_{C,B}$ i S_{NHx} .

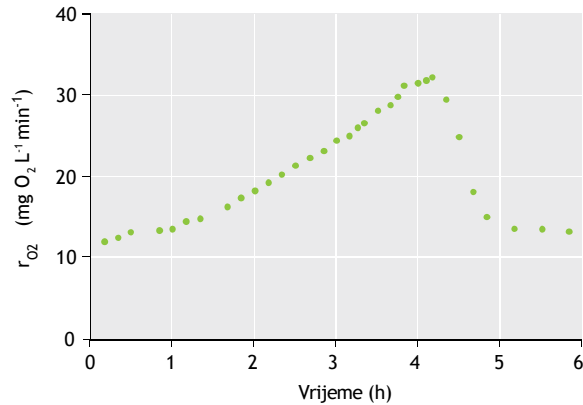
5.4.5.1 Biološki lako razgradivi supstrat (S_B)

Biološki lako razgradivi supstrat se po svojoj prirodi sastoji od topivih spojeva (jednostavne građe/male molekularne mase), kao što su hlapive masne kiseline, alkoholi itd. (Henze i sur., 1992). Karakteristika tih spojeva je to da se brzo razgrađuju, zbog čega izazivaju brzi respirometrijski odgovor. Tipični šaržni test za određivanje S_B (npr. Ekama i sur., 1986) uključuje dodavanje uzorka otpadne vode endogenom mulju i praćenje brzine respiracije dok se ne vrati na razinu na kojoj se može razumno pretpostaviti da je biološki lako razgradivi supstrat uklonjen iz aktivnog mulja. Ako se pojave ostali procesi koji također troše kisik (npr. brzina endogene i nitrifikacijske respiracije), mora ih se identificirati ili pretpostaviti tako da ih se može oduzeti iz ukupne brzine respiracije (slika 5.39). Nitrifikacija može biti inhibirana (odjeljak 5.4.2). Tek kad se objasne drugi procesi koji troše kisik, brzina respiracije povezana s oksidacijom biološki lako razgradivog supstrata ($r_{O_2,exo}^{S_B}$) se može identificirati i koristiti za izračun koncentracije S_B u otpadnoj vodi. Koncentracija biološki lako razgradivog supstrata prisutnog na početku u mješavini biomase i otpadne vode može se onda izračunati kako slijedi:

$$S_B(0) = \frac{1}{1 - Y_{OHO}} \left(\int_0^{t_{fin}} r_{O_2,exo}^{S_B}(t) dt \right) \quad 5.27$$

Koncentracija S_B u otpadnoj vodi se onda lako izračuna ako se u obzir uzme razrjeđivanje. Krajnja točka t_{final} integracijskog intervala je vremenski trenutak u kojemu je S_B potpuno oksidiran i u kojemu brzina egzogene respiracije za S_B postaje nula. Integral se može lako dobiti određivanjem površine ispod krivulje, na primjer koristeći računalne programe s tablicama za računanje, poznat i kao grafička metoda. Alternativa ovoj izravnoj metodi je metoda optimizacije, kako je objašnjeno gore. Ona se sastoji od rješavanja jednadžbi masene bilance pomoću numeričkog integratora za predviđanje brzina egzogene respiracije za S_B u takvom šaržnom eksperimentu. Ovisno o početnoj vrijednosti $S_B(0)$ danoj integracijskom algoritmu, simulacija će rezultirati različitim predviđenim respirogramom. Stoga se može tražiti vrijednost $S_B(0)$ koja daje 'najbolju prilagodbu' izmjerenim podacima. Za ovu jednostavnu

primjenu metoda optimizacije bi mogla biti malo pretjerana, ali za složenije zadatke procjene (idući odlomak), taj pristup postaje točniji od metoda izravnog izračuna. Treba primijetiti da za izračun S_B iz brzina respiracije treba znati koeficijent heterotrofnog prirasta Y_{OHO} . Taj stehiometrijski koeficijent je uvijek uključen kad se potrošnja kisika pretvara u ekvivalente supstrata (vidi i idući odjeljak i odjeljke 5.4.5.2 – 5.4.5.6). Gore opisan šaržni test se koristi i za procjenu ostalih komponenti ASMI i, pomoću metode optimizacije, kinetičkih parametara. To objašnjava njegovu popularnost u kalibracijskim procedurama.

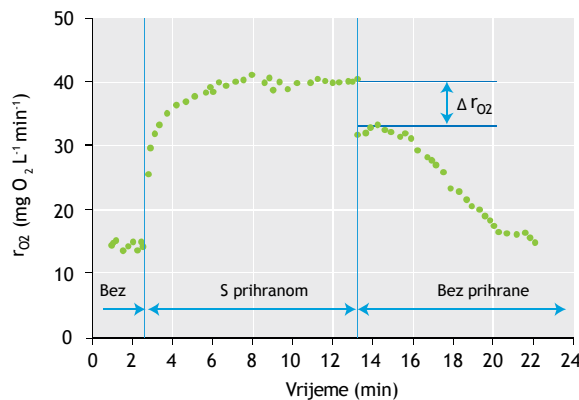


Slika 5.40 Brzine respiracije mjerene u šaržnom eksperimentu (Kappeler i Gujer, 1992) za određivanje biološki lako razgradivog supstrata prema metodi Wentzel i sur., 1995.

Jedan drugi šaržni test (Wentzel i sur., 1995) se sastoji od praćenja brzine respiracije neistaložene otpadne vode bez inokuliranja u relativno dugom razdoblju (do otprilike 20 h). Dobiva se respirogram sličan onom prikazanom na slici 5.40. S_B se izračunava iz brzina respiracije opaženih između početka testa do iznenadnog pada (zbog iscrpljivanja S_B), uz korekciju za rastuću endogenu respiraciju zbog povećanja biomase tijekom testa. Pored Y_{OHO} , treba znati i brzinu neto rasta, koja se može dobiti iz istog testa.

Ekama i sur. (1986) su predstavili metodu za određivanje S_B koja uključuje praćenje brzine respiracije u potpuno izmješanom reaktoru koji radi u režimu naizmjeničnog kontinuiranog dodavanja supstrata i prestanka prihrane. Hipoteza je da iznenadni pad u brzini respiracije na nižu razinu, opažen nakon prestanka prihrane (slika 5.41), odgovara S_B koji je ušao putem influenta. Prema tome, koncentracija biološki lako razgradivog supstrata u otpadnoj vodi može se izračunati kao:

$$S_B = \frac{V_{\text{react}}}{Q_{\text{ww}}} \cdot \frac{\Delta r_{O_2, \text{tot}}}{1 - Y_{OHO}} \quad 5.28$$

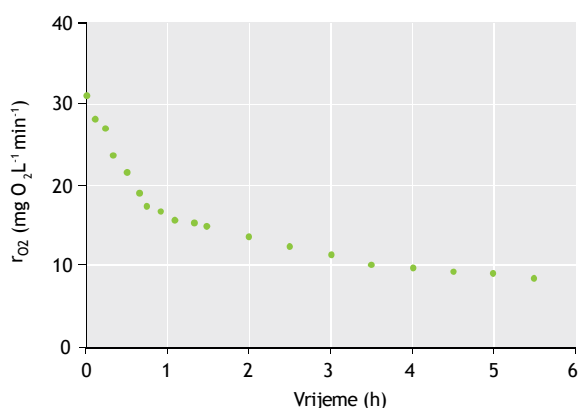


Slika 5.41 Brzine respiracije (r_{O_2}) dobivene pomoću eksperimentalne strukture Ekama i sur., (1986) koje omogućuju izravnu procjenu biološki lako razgradivog supstrata S_B .

5.4.5.2 Biološki sporo razgradivi supstrat (X_{CB})

Pretpostavlja se da se biološki sporo razgradivi supstrat X_{CB} , ponekad definiran i kao suspendirana organska tvar, se sastoji od spojeva (velike molekularne mase) u rasponu od topivih do koloidalnih i suspendiranih (Henze, 1992). Zajedničko svojstvo tih spojeva je da ne mogu proći kroz staničnu membranu i prvo moraju biti podvrgnuti hidrolizi do spojeva male molekularne mase (S_B) koji se potom mogu asimilirati i oksidirati. Budući da je brzina hidrolize manja od brzine oksidacije S_{SB} , respirometrijski odgovor na X_{CB} je sporiji i obično se može prilično lako identificirati na kraju respirograma.

U šaržnom testu, dio krivulje koji se eksponencijalno smanjuje se može često opaziti u respirogramima nakon početnog maksimuma SS (slika 5.39). Na slici 5.42, ovo usporevanje počinje nakon otprilike 0,75 sata. Koncentracija otpadne vode u X_{CB} može se procijeniti na način sličan gornjem, koristeći odgovarajući $r_{O_2,exo}^{X_{CB}}$ (Kappeler i Gujer, 1992). Procesi oksidacije koji se usporedno javljaju kao što je nitrifikacija, mogli bi ometati i komplicirati identificiranje brzine respiracije kojom upravlja hidroliza. U ovom slučaju inhibitor nitrifikacije se može koristiti za lakšu procjenu X_{CB} (Spanjers i Vanrolleghem, 1995). Alternativno, ako se podaci iz takvih respirometrijskih šaržnih testova ocjenjuju pomoću metode optimizacije kako bi se odgovor modela upario s podacima, nitrifikacijski se dio može lako izvući iz respirograma (Spanjers i Vanrolleghem, 1995).



Slika 5.42 Brzina respiracije (r_{O_2}) dobivena prema Kappeler i Gujer (1992) za procjenu X_{CB} .

Primjer na slici 5.43 je predstavljen kako bi se naglasilo da su sve gore spomenute metode koje koriste respiraciju kisika primjenjive i za anoksične testove respiracije mjerenjem nitrata (putem laboratorijske analize ili pomoću sonde za nitrat). Na ovoj slici nije predstavljen respirogram nitrata, već, zapravo, njegov integral, tj. promjena u koncentraciji nitrata. Praćenjem različitih razdoblja s različitim brzinama korištenja nitrata (početno razdoblje s biološkom razgradnjom S_B i X_{CB} , nakon čega slijedi razdoblje biološke razgradnje jedino X_{CB} , nakon čega slijedi endogena respiracija nitrata) do osi y omogućuje izravnu procjenu nitrata korištenog za različite procese, a time i izračun njihovih pripadajućih koncentracija u otpadnoj vodi.

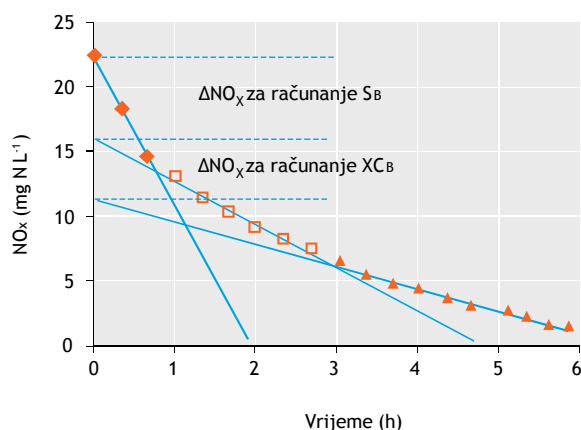
Izračun treba napraviti na sličan način kao i za brzinu respiracije kisika, s određenim izmjenama (ΔNO_x sa slike 5.43 u ovom slučaju zamjenjuju integrale):

$$S_B(0) = \frac{2.86}{1 - Y_{OHO,ax}} \left(\int_0^{t_{fin}} r_{NO_x,exo}^{S_B}(t) dt \right) \quad 5.29$$

$$X_{CB}(0) = \frac{2.86}{1 - Y_{OHO,ax}} \left(\int_0^{t_{fin}} r_{NO_x,exo}^{X_{CB}}(t) dt \right) \quad 5.30$$

Pri tome se koristi faktor ekvivalencije COD od 2,86 g COD g NO_3-N^{-1} . Trebalo bi uzeti u obzir da je anoksični prirast ponešto niži od aerobnog prirasta: dok se za Y_{OHO} često koristi vrijednost od 0,66 g

$\text{COD}_{\text{biomass}} \text{ g COD}_{\text{substrate}}^{-1}$, predlaže se da se anoksični prirast uzme kao $0,54 \text{ g COD}_{\text{biomass}} \text{ g COD}_{\text{substrate}}^{-1}$ (Muller i sur., 2003).



Slika 5.43 Tipičan profil koncentracije nitrata za određivanje S_B i X_{C_B} iz eksperimenta nitratne (tj. anoksične) respiracije (Urbain i sur., 1998).

5.4.5.3 Heterotrofna biomasa (X_{OHO})

Neke otpadne vode mogu sadržavati znatne koncentracije heterotrofne biomase (Henze, 1992), tako da postoji potreba za kvantificiranjem te komponente. U šaržnom testu koji su opisali Kappeler i Gujer (1992) te Wentzel i sur. (1995) X_{OHO} je procijenjen iz evolucije brzine respiracije sirove otpadne vode bez dodavanja biomase za inokulum. Izračun zahtijeva Y_{OHO} i dva parametra koja se mogu procijeniti iz istih podataka: maksimalne specifične brzine rasta μ_{OHO} i koeficijenta raspadanja b_{OHO} . Respirogrami izgledaju poput onog predstavljenog na slici 5.40. Postupkom se u načelu prati količina heterotrofne biomase originalno prisutne u otpadnoj vodi tako da se originalna brzina respiracije usporedi s brzinom respiracije nakon značajnog (i koji se stoga može dobro kvantificirati) rasta X_{OHO} .

5.4.5.4 Autotrofna (nitrificirajuća) biomasa (X_{ANO})

Autori zasad nisu svjesni procedura u kojima se procjenjuje koncentracija autotrofne biomase. Tome je vjerojatno tako zbog činjenice da je prilično malo vjerojatno da će se u otpadnoj vodi pronaći značajnije količine nitrifikanata. Međutim, moglo bi se zamisliti da je primjenjiva procedura slična onoj koja je razvijena za X_{OHO} , tj. ocijeniti brzinu respiracije za nitrifikaciju $r_{O_2, \text{exo}}^{\text{Nit}}$ autotrofa prisutnih u otpadnoj vodi i usporediti je s brzinom respiracije kulture s poznatom koncentracijom autotrofne biomase X_{ANO} , npr. nakon značajnijeg rasta.

5.4.5.5 Amonij (S_{NHx})

Koncentracija amonija u otpadnoj vodi može se procijeniti korištenjem konvencionalnih analitičkih tehnika. Ipak, respirometrija nudi i mogućnost izvođenja S_{NHx} iz šaržnih mjerenja na način sličan za S_B i X_{C_B} (pod uvjetom da se test provede s nitrificirajućim aktivnim muljem). Iz tablice 5.2 slijedi da je koeficijent prirasta nitrifikanata Y_{ANO} potreban da se potrošnja kisika za nitrifikaciju pretvori u koncentraciju dušika dijeljenjem s $(4.57 - Y_{ANO})$. Međutim, vrijednost S_{NHx} nije jako osjetljiva na Y_{ANO} budući da je Y_{ANO} nizak u usporedbi s 4.57. Treba primijetiti da se amonijak koristi i za asimilaciju (tj. oko 12 % težine biomase budući da se VSS sastoji od dušika), što može zahtijevati priličnu količinu dušika ako se biološki razgrađuje velika količina COD ($\text{COD}^{\text{Degraded}}$). Dušik koji se može nitrificirati može se aproksimirati pomoću:

$$N_{\text{Nit}} = S_{\text{NHx}} - i_{\text{N,Bio}} \cdot Y_{\text{OHO}} \cdot \text{COD}^{\text{Degraded}} \quad 5.31$$

Pri tome je $i_{\text{N,Bio}}$ sadržaj dušika u novo formiranoj biomasi. Iz te se jednadžbe lako može izvesti originalna koncentracija dušika kad su poznati $\text{COD}^{\text{Degraded}}$, i stehiometrijski parametri $i_{\text{N,Bio}}$ i Y_{OHO} .

Podešavanje modela u koji je uključena oksidacija ugljika i dušika respirometrijskim podacima (tj. metoda optimizacije) će automatski uzeti tu korekciju u obzir (Spanjers i Vanrolleghem, 1995).

5.4.5.6 Frakcije organskog dušika ($X_{C,B,N}$ i $S_{B,N}$)

Vjerojatno stoga što su brzine hidrolize i amonifikacije spojeva organskog dušika relativno velike, dosad nije posvećivano puno pažnje uspostavi respirometrijskih tehnika za kvantificiranje $X_{C,B,N}$ i $S_{B,N}$ (te su komponente čak napuštene u kasnijim modelima aktivnog mulja br. 2 i 3). U šaržnim testovima, ti se spojevi obično pretvaraju u S_{NH_x} prije nego što se S_{NH_x} koji je bio originalno prisutan u otpadnoj vodi ukloni nitrifikacijom. Te su frakcije prema tome obuhvaćene u određenoj koncentraciji amonijaka. Prema tome, $X_{C,B,N}$ i $S_{B,N}$ nisu izravno opažljivi u takvim testovima.

Ipak, za neke otpadne vode koraci hidrolize i amonifikacije mogu biti znatno sporiji i može biti potrebna kvantifikacija koncentracija komponenti. U takvim slučajevima, može se zamisliti procedura u kojoj se nitrifikacijska brzina respiracije $r_{O_2, exo}^{Nit}$ prati i tumači u smislu hidrolize i amonifikacije, slično načinu na koji se respiracija, proizašla iz razgradnje COD, tumači u smislu procesa hidrolize. Slijedom toga, količine supstrata koji sadrže dušik mogle bi se procijeniti pomoću integrala od $r_{O_2, exo}^{Nit}$ za odgovarajuće frakcije i njihovim dijeljenjem sa $(4.57 - Y_{ANO})$, stehiometrijskim koeficijentom koji odgovara nitrifikaciji. U slučaju da se zbiva simultano uklanjanje COD, ponovno bi trebalo napraviti korekciju za dušik asimiliran u novu heterotrofnu biomasu (odjeljak 5.4.5.5).

5.5 KARAKTERIZACIJA BIOMASE

5.5.1 Volatilne suspendirane krutine

U testovima karakterizacije biomase, aktivnost se obično normalizira izražavanjem brzine konverzije po jedinici sagorivih suspendiranih tvari (VSS) kako bi se objasnile promjenjive koncentracije biomase. Međutim, treba primijetiti da VSS nije ekvivalentan biomasi, odnosno: jedino se (obično nepoznati) dio VSS sastoji od aktivne biomase, a VSS je tek aproksimacija koncentracija biomase. Zapravo, izazov metoda opisanih u ovom odjeljku je procijeniti onaj dio VSS koji predstavlja koncentraciju biomase. Za daljnje informacije o tome kako procijeniti dio VSS koji je aktivna biomasa čitatelja upućujemo na Ekama i sur. (1996), Still i sur. (1996) i Lee i sur. (2006).

5.5.2 Specifična metanogena aktivnost (SMA)

5.5.2.1 Svrha

Test specifične metanogene aktivnosti (SMA) uključuje procjenu acetoklastične metanogene aktivnosti biomase. To je u suprotnosti s anaerobnim testovima aktivnosti biomase gdje se mjeri cjelokupna aktivnost biomase, kojom se razgrađuje obično složen supstrat. U tim testovima aktivnost je ograničena brzinom najsporijeg koraka razgradnje, što je obično hidroliza, tako da se procjenjuje hidrolitička aktivnost biomase za taj konkretni supstrat. Test SMA se može koristiti za praćenje rada reaktora ili za karakteriziranje biomase prije njezinog korištenja kao inokuluma za pokretanje novog reaktora, a time i njegovog potencijala kao inokuluma za taj specifični proces (Sorensen i Ahring, 1993).

5.5.2.2 Općenito

U testovima SMA, kvantificira se aktivnost metanogena. To se postiže dobavom supstrata koji se može izravno pretvoriti u metan. To može biti plin CO_2 ili H_2 , ali uobičajeniji i praktičniji supstrat je acetat. Kako ga koristi sve više istraživača, u literaturi je to postao standardni test (Ersahin i sur., 2014; Jeison i van Lier, 2007). Brzina konverzije acetata u metan, normaliziran na biomasu, daje informacije o aktivnosti metanogena u biomasi. Obično se izražava u $g\ COD\ g\ VSS^{-1}\ d^{-1}$.

Kako bi se spriječila acidifikacija anaerobne digestije, proizvodnja VFA i potrošnja VFA moraju biti u ravnoteži (odjeljak 5.4.1). SMA stoga ukazuje na maksimalnu proizvodnju acetata tijekom anaerobne digestije s kojom se mogu nositi acetoklastični metanogeni bez da pH padne na vrijednosti koje inhibiraju metanogenezu.

5.5.2.3 Izvođenje testa

U testovima SMA (kao i testovima BMP), količina inokuluma (potreban za anaerobnu digestiju) se obično mjeri kao sagorive suspendirane tvari (VSS), premda je moguće koristiti i ukupne sagorive tvari (VS) (odjeljak 5.4.1).

U testu SMA, omjer između inokuluma i supstrata se ujednačuje tako da je količina metana dovoljno visoka da se može točno izmjeriti. Protok treba biti unutar raspona mjerača protoka plina, a koncentracija acetata je ispod razina inhibicije. Ono što se često koristi je koncentracija acetata od 2 g COD L⁻¹ i može se koristiti sljedeći omjer supstrata i inokuluma:

$$2 = \frac{VSS_{inokulum}}{COD_{supstrata}} \quad 5.32$$

I COD i VSS se navode u masi u kojoj ulaze u test, izraženoj u gramima, ne koncentracijama.

- Koncentrirane otopine
 - Potrebna je koncentrirana otopina fosfatnog pufer koji sadrži koncentriranu otopinu A (0.2 M K₂HPO₄·3H₂O: 45,65 g L⁻¹) i koncentriranu otopinu B (0.2 M NaH₂PO₄·2H₂O: 31,20 g L⁻¹).
 - Otopina makronutrijenata po litri sadrži: 170 g NH₄Cl, 8 g CaCl₂·2H₂O i 9 g MgSO₄·7H₂O.
 - Otopina mikronutrijenata po litri sadrži: 2 g FeCl₃·4H₂O, 2 g CoCl₂·6H₂O, 0,5 g MnCl₂·4H₂O, 30 mg CuCl₂·2H₂O, 50 mg ZnCl₂, 50 mg HBO₃, 90 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 100 mg Na₂SeO₃·5H₂O, 50 mg NiCl₂·6H₂O, 1 g EDTA, 1 mL HCl 36%, 0,5 g rezazurina te 2 g ekstrakta kvasca.

- Inokulum

Inokulum je tipični anaerobni mulj iz komunalnog bioplinskog uređaja. Mjere se ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne sagorive suspendirane tvari (VSS) mulja.

- Supstrati

Kao supstrat za aktivnost acetoklastične metanogeneze koristi se sol natrijev acetat-trihidrat (NaC₂H₃O₂·3H₂O) (M = 136,02 g mol⁻¹). COD vrijednost: 0,4706 g COD po g NaC₂H₃O₂·3H₂O. Obično se priprema otopina natrijevog acetata (otopina supstrata) s koncentracijom od 2,0 g COD L⁻¹, koja bi trebala uključivati sljedeće koncentrirane otopine:

- Fosfatni pufer: pomiješajte 30,5 mL koncentrirane otopine A i 19,5 ml koncentrirane otopine B (ukupno 50 mL) po litri supstratnog medija kako bi se dobilo 10 mM fosfatnog pufera pri pH = 7.
- Makronutrijenti: dozirajte 6 mL po L supstratnog medija.
- Mikronutrijenti: dozirajte 6 mL po L supstratnog medija.

Provjerite pH i izmjerite koncentraciju COD supstratnog medija. Za slijepe probe, pripremite istu otopinu, ali bez supstrata (otopina medija).

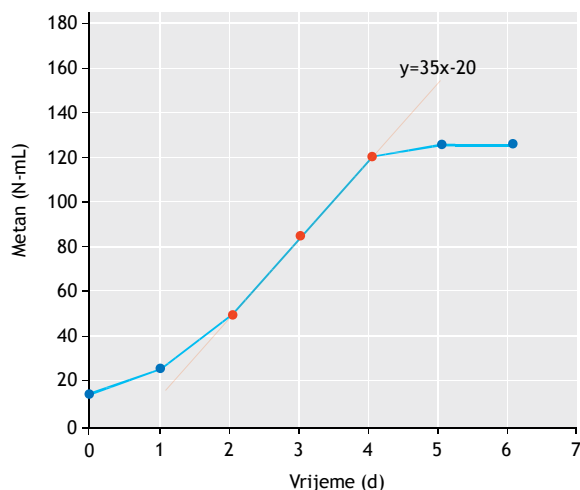
- Priprema reakcijskih posuda i izvođenje testa

Koristite tri primjerka i za slijepu probu i za uzorak, odnosno tri bočice kao slijepe probe (samo otopine inokuluma i medija) i tri bočice za uzorak (otopine inokuluma i supstrata). Kako je gore navedeno, u SMA testu se obično koristi omjer inokuluma i supstrata od 2:1 (na temelju VSS). Odaberite ukupni volumen tekućine koji je prikladan za reakcijske posude. Za izvođenje SMA testa, kao i za BMP test, bočice treba inkubirati na željenoj temperaturi. Standardna mezofilna temperatura je 35 °C. SMA test se nastavlja dok ne prestane proizvodnja bioplina.

5.5.2.4 Obrada podataka

Metan proizveden tijekom SMA testa se mjeri kroz vrijeme. Na slici 5.44 prikazan je primjer podataka iz SMA testa. Treba primijetiti da test nije počeo kod 0 N·mL. To je stoga što se plinska faza reakcijske bočice proširila tijekom zagrijavanja do 35 °C, čime je stvorena mala količina protoka plina. Taj protok plina u prvih 10 minuta stoga ne predstavlja pravi protok metana. Tijekom prva dva dana može se opaziti faza male aktivnosti: faza prilagodbe (tzv. lag faza). To se objašnjava činjenicom da su metanogeni u t = 0 uneseni u novu matricu u kojoj su osmotski tlak, vodljivost, sastav nutrijenata ili koncentracije supstrata bili različiti od matrice iz koje su metanogeni uzeti (digestirani mulj). Ta lag faza je normalna za SMA testove. Nakon t = 4 dana, proizvodnja metana je gotovo stala, najvjerojatnije zbog osiromašivanja supstrata. Prije početka SMA testa, može se izračunati očekivana proizvodnja metana na temelju COD

acetata. Za 1 g COD acetata, teoretski se može proizvesti 350 N-mL metana. To se može izračunati kako slijedi: 1 mol acetata daje 1 mol CH₄, prema tome 1 g Ac daje 1/59 mola CH₄. Pri standardnoj temperaturi i tlaku (STP, tj.: 273,15 K i 1013,25 mbar), 1 mol plina je ekvivalentan 22,4 L, prema tome 1 g Ac daje $22,4/59 = 0,380$ L CH₄. Budući da 1 g Ac predstavlja COD od 1,085, dobijemo $0,380/1,085 = 0,350$ L CH₄ g COD⁻¹.



Slika 5.44 Primjer SMA testa.

Podatak koji treba izvući iz ovog grafikona je maksimalna brzina proizvodnje. Maksimalna brzina proizvodnje može se izračunati iz nagiba respirograma na slici 5.44. Nagib se može izračunati u bilo kojoj točki, ali treba odabrati odgovarajući interval. U ovom je slučaju odabran interval između $t = 2$ i $t = 4$ (crveno na slici 5.44) zato što je brzina proizvodnje tu najveća. Maksimalna brzina proizvodnje mulja je 35 N-mL d^{-1} . U ovom je primjeru uneseno 800 mg VSS inokuluma, pa je stoga SMA $43 \text{ N-mL g VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Treba napomenuti da se količina metana najčešće izražava u COD. Jedan g COD metana zauzima 350 N-mL plina pri STP. Prema tome, SMA ovog eksperimenta je $43/350 = 0,123 \text{ g COD g VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Ta vrijednost potpada pod tipičan raspon od 0,1 i 0,2 g COD g VSS⁻¹ d⁻¹ koji se uobičajeno javlja u konvencionalnim digestorima mulja u uređajima za obradu otpadne vode. Mulj u reaktoru tipa UASB obično ima veći SMA, između 0,2 i 0,4 g COD g VSS⁻¹ d⁻¹.

- Preporuke

Naročito u SMA testovima važno je obratiti pažnju na osjetljivost metanogena na temperaturu i inhibiciju kisikom. Za daljnje informacije o toj i o nekim drugim preporukama čitatelja upućujemo na odjeljak o BMP testovima.

Način obrade podataka za skupinu slijepih proba razlikuju se od BMP testa, odnosno u SMA testu podaci za skupinu slijepih proba se oduzimaju od podataka za skupinu uzorka.

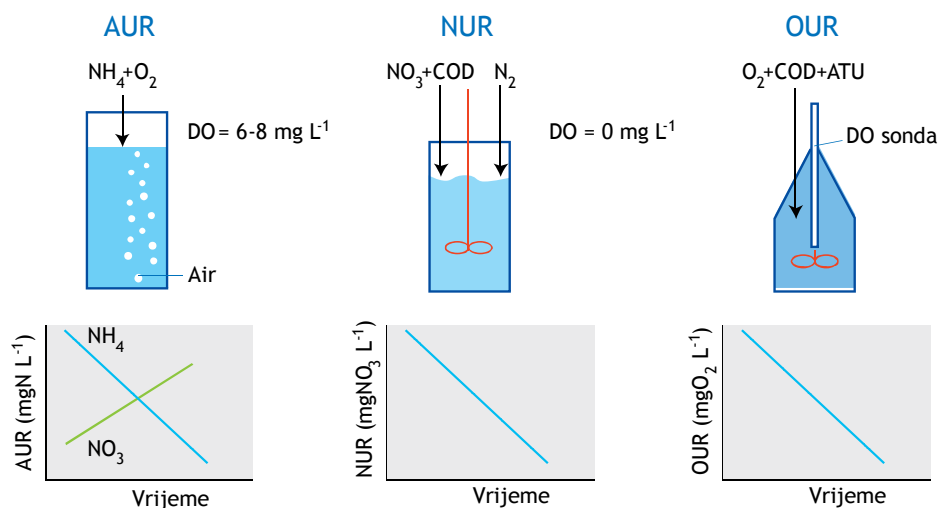
5.5.3 Specifična aerobna i anoksična aktivnost biomase

Kristensen i sur. (1992) su saželi skup laboratorijskih procedura razvijenih za procjenu aktivnosti nitrifikanata (AUR: brzina iskorištavanja amonijaka), denitrificirajuće biomase (NUR: brzina iskorištavanja nitrata) i heterotrofne biomase (OUR: brzina iskorištavanja kisika). Te tri procedure i primjeri shematskih podataka prikazani su na slici 5.45 i obrađeni u nastavku.

5.5.3.1 Maksimalna specifična brzina nitrifikacije (AUR)

Kako bi se procijenila brzina iskorištavanja amonijaka (AUR), koncentrirana biomasa (npr. uzeta iz linije povratnog ili viška mulja) i voda iz slavine se pomiješaju u jednolitrenim menzurama kako bi se dobila koncentracija suspendiranih tvari od 3-4 g VSS L⁻¹. Aktivni mulj se drži u suspenziji aeracijom kroz

difuzore, koji biomasu ujedno opskrbljuju kisikom u rasponu koncentracije od 6-8 mg O₂ L⁻¹. Nakon što se postigne stabilno stanje (endogena respiracija), dodaje se amonijak kako bi se dosegla početna koncentracija NH₄-N od 20 mg N L⁻¹. Napominjemo da je nitrifikacija acidifirajuća reakcija i da pH treba pratiti tijekom testa kako bi se osiguralo da nema učinaka na pH. Kvaliteta određivanja AUR može se poboljšati dodavanjem alkaliteta ili ugradnjom sustava kontrole pH s dodavanjem baze.



Slika 5.45 Laboratorijske respirometrijske procedure i primjeri podataka za karakterizaciju nitrificirajuće biomase (AUR: brzina iskorištavanja amonijaka), denitrificirajuće biomase (NUR: brzina iskorištavanja nitrata) i heterotrofne biomase (OUR: brzina iskorištavanja kisika) (Kristensen i sur., 1992).

Uzorci 10 mL aktivnog mulja se potom uzimaju u intervalima od 15-30 min svaka 3-4 h. Uzorke treba odmah filtrirati kako bi se zaustavile biološke reakcije, a filtrati se mogu konzervirati dodavanjem 0,1 mL, 4 M H₂SO₄ do analize. Uzorci se potom analiziraju za amonijačni dušik, te nitratni i nitritni dušik. Alternativno, ion-selektivna elektroda za amonijak, ili ion-selektivni ili UV senzor za nitrat i nitrit, se mogu koristiti izravno u aeriranoj suspenziji kako bi se dobili detaljniji vremenski nizovi i potencijalno provele studije biokinetičkog modeliranja za nitrifikante.

AUR (mg NH₄-N L⁻¹ h⁻¹) se izračunava iz nagiba proizašle krivulje proizvodnje nitrata plus nitrita, a kontrole radi i iz krivulje korištenja amonijaka. Doista, na trošenje amonijaka može djelovati i endogena aktivnost heterotrofa uslijed raspadanja i otpuštanja amonija i usporednim korištenjem tog amonija za novi rast. Proizvedeni oksidirani oblici dušika su izravna posljedica nitrifikacije, naravno pod uvjetom da je koncentracija kisika u svakom trenutku dovoljno visoka da se spriječi denitrifikacija. Specifični AUR (SAUR, mg NH₄-N g VSS⁻¹ h⁻¹) se dobiva dijeljenjem volumetrijske brzine s koncentracijom biomase (g VSS L⁻¹) postavljene na početku eksperimenta kako bi se mogli usporediti kapaciteti nitrifikacije s tipičnim vrijednostima.

Nitrifikacijski se kapacitet naravno može izvesti i iz respirometrijskog eksperimenta s dodavanjem amonijaka (odjeljak 5.4.5.5). Maksimalna brzina respiracije može se pripisati nitrifikaciji ($r_{O,ex}^{Nit}$) u mg O₂ L⁻¹ h⁻¹, odnosno nakon oduzimanja endogene respiracije može se prebaciti u brzinu konverzije amonijaka (mg NH₄-N L⁻¹ h⁻¹) pomoću jednadžbe slične onoj korištenoj da se dobije dušik koji se može nitrificirati (odjeljak 5.4.5.5):

$$AUR = \frac{r_{ANO,O2}}{4.57 - Y_{ANO}}$$

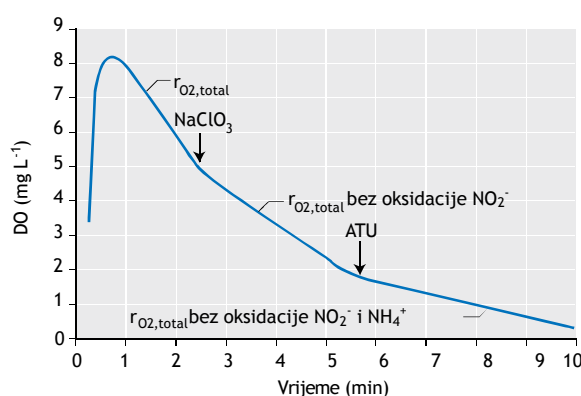
5.33

Y_{ANO} je koeficijent prirasta nitrifikanata, obično 0,24 mg COD mg N⁻¹.

Kako bi se razdvojile aktivnosti biomase koja oksidira amonijak i biomase koja oksidira nitrit, mogu se provesti dva eksperimenta, jedan s dodavanjem amonijaka i jedan s dodavanjem nitrita. Adsorpcija amonijaka i nitrita može se pratiti u tim zasebnim eksperimentima i pretvoriti u određene aktivnosti.

Eksperimenti u kojima se javlja rast nitrita mogu se koristiti i da se obje aktivnosti izvedu odvojeno, odnosno određivanjem brzine iskorištavanja nitrita, nakon što je oksidiran sav amonijak, može se izračunati aktivnost biomase koja oksidira nitrit. AUR bi se sada trebao dobiti iz profila amonijaka, a ne iz profila nitrata, budući da potonji kasni iza profila amonijaka zbog akumuliranja nitrita u aktivnom mulju. Kako bi ovakva vrsta analize funkcionirala, važno je da kapacitet oksidiranja amonijaka bude znatno brži od kapaciteta oksidiranja nitrita budući da se mora akumulirati znatna količina nitrita (preporučeno je više od 2 mg NO₂-N L⁻¹ kod iscrpljivanja amonijaka).

Surmacz-Gorska i sur. (1996) su razvili alternativnu metodu za određivanje aktivnosti dviju skupina biomase uključenih u nitrifikaciju. Ta se metoda temelji na respirometrijskom eksperimentu kojemu se, nakon što se DO smanjio za oko 3 mg L⁻¹, prvo dodaje natrijev klorat (NaClO₃, 20 mM, tj. 2,13 g L⁻¹), inhibitor za drugi korak u nitrifikaciji, nakon čega slijedi dodavanje ATU nakon što se DO smanji za još 2 mg L⁻¹ kako bi se inhibirao prvi korak nitrifikacije. Tipičan profil koncentracije DO dobiven u testu sa zatvorenom bočicom prikazan je na slici 5.46.



Slika 5.46 Tipičan profil koncentracije DO zabilježen postupkom karakteriziranja nitrifikacije u dva koraka utemeljenim na inhibiranju oksidacije nitrita kloratom (Surmacz-Gorska i sur., 1996). Nagibi profila DO se koriste za procjenu pojedinih r_{O_2} (OUR).

Pojedine brzine respiracije, izražene u mg O₂ L⁻¹ h⁻¹, se dobivaju izravno iz tri pada DO i omogućuju da se izračuna potrošnja kisika za dva nitrifikacijska koraka: $r_{O_2,NO_2,exo}$ (povezano s r_{NOO,O_2}) se izračunava iz razlike u nagibu DO prije i nakon dodavanja klorata, dok se $r_{O_2,NH_4,exo}$ (povezano s r_{AOO,O_2}) dobiva iz razlike u nagibu DO prije i nakon dodavanja ATU. S tim brzinama respiracije, aktivnosti obiju nitrifikacijskih biomasa (u mg NH₄-N L⁻¹ h⁻¹ odnosno mg NO₂-N L⁻¹ h⁻¹) mogu se izračunati kako slijedi:

$$r_{NH_4_NO_2} = \frac{r_{AOO,O_2}}{3.43 - Y_{AOO}} \quad 5.34$$

$$r_{NO_2_NO_3} = \frac{r_{NOO,O_2}}{1.14 - Y_{NOO}} \quad 5.35$$

Pri tome su Y_{AOO} i Y_{NOO} koeficijenti prirasta dva nitrifikacijska koraka, obično 0,18 mg COD mg NH₄-N⁻¹ odnosno 0,06 mg COD mg NO₂-N⁻¹. I ovdje se specifične aktivnosti dobivaju dijeljenjem volumetrijskih brzina s koncentracijom VSS.

5.5.3.2 Maksimalna specifična brzina aerobne heterotrofne respiracije (OUR)

Kako bi se odredila brzina iskorištavanja kisika povezana s aerobnom heterotrofnom aktivnošću (OUR), biomasa i voda iz slavine se miješaju kako bi se dobila koncentracija suspendiranih krutina od 2-3 g VSS L⁻¹ u šaržnom volumenu od jedne litre. Potom se provodi eksperiment s viškom COD. Obično se dodaje acetat u koncentraciji od obično 200 mg COD L⁻¹, tj. omjer S₀/X₀ od oko 1/10 do 1/20. Kako bi se dobila aerobna heterotrofna endogena aktivnost, treba dodati alternativni indikator aerobne heterotrofne aktivnosti, a ne COD. Nitrifikaciju se mora inhibirati dodavanjem alitiourea (ATU, obično 5-10 mg L⁻¹). Biomasi se kontinuirano aerira kako bi se održala koncentracija DO od 6-8 mg O₂ L⁻¹. U proceduri koju su predložili Kristensen i sur. (1992), brzina respiracije se mjeri povremenim ulijevanjem dijela šarže u

BOD tikvicu od 300 mL BOD kako bi se izmjerila brzina iskorištavanja kisika pomoću sonde za kisik uvedene u tikvicu (princip LSS). OUR se onda može izračunati iz nagiba proizašlog pada DO. Treba primijetiti da se ovdje ukupna brzina respiracije u prisutnosti inhibitora nitrifikacije koristi kao indikator aerobne heterotrofne aktivnosti, tj. $r_{O_2,endo} + r_{O_2,exo}$. Za dobivanje OUR mogu se naravno koristiti i alternativni načini dobivanja brzine respiracije obrađeni u odjeljcima 5.2 i 5.5.

Specifična brzina iskorištavanja kisika (SOUR), često korišten indikator aktivnosti biomase, se izračunava tako da se OUR podijeli s koncentracijom VSS u šaržnom eksperimentu.

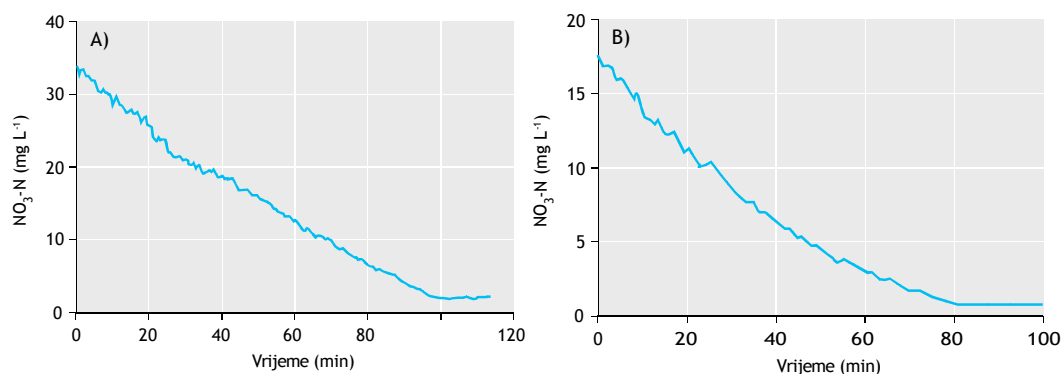
Važan element koji treba uzeti u obzir jest to da korištenje acetata ne mora biti idealno u svim slučajevima, budući da su se neke biomase prilagodile režimu hranjenje-ili-glad i pohranjuju COD umjesto da ga koriste izravno za rast. Odgovarajuća brzina respiracije za pohranjivanje se može prilično razlikovati od brzine respiracije koja je poželjna za ocjenu heterotrofne aktivnosti. Ako se otkrije pohranjivanje, za ocjenu aktivnosti bi trebalo koristiti alternativni izvor COD, npr. prethodno spomenut referentni supstrat za BOD, glutaminsku kiselinu.

5.5.3.3 Maksimalna specifična brzina denitrifikacije (NUR)

Specifična brzina iskorištavanja nitrata (SNUR) za denitrifikaciju može se procijeniti pomoću dvolitrenih šaržnih reaktora s potpuno izmiješanim sadržajem i zatvorenom atmosferom. Koncentrirana biomasa se sakupi i pomiješa s vodovodnom vodom u reaktorima kako bi se dobila koncentracija suspendiranih krutina od 3-4 g VSS L⁻¹. Nakon što se postigne stabilno stanje (endogena respiracija), dodaje se nitrat kako bi se dobila početna koncentracija od 20-30 mg N L⁻¹. COD, najčešće kao acetat, se dodaje u prevelikoj količini kako bi se dobila početna koncentracija od 100-150 mg COD L⁻¹. Za određivanje endogenog NUR, treba koristiti veće koncentracije biomase (kako bi se skratilo vrijeme eksperimentiranja) i ne dodaje se COD. Budući da je denitrifikacija proces kojim se povećava pH, koji raste kad je acetat izvor COD (vidi rezultate kontrole pH testova NUR s acetatom i glukozom na slici 5.47; Petersen i sur., 2002b), pH treba pratiti i prema potrebi korigirati. Ipak, vjerojatnost negativnih učinaka pH je puno niža nego s testovima AUR, zbog manje pH osjetljivosti heterotrofne biomase i manjeg pH učinka denitrifikacije na pH.

Uzorci 10 mL aktivnog mulja se uzimaju u intervalima od 15-30 min svakih 3-4 h. Najbolji način uzimanja uzoraka je za vrijeme dodavanja plinovitog dušika kako bi se izbjegao prodor kisika u reaktore. Uzorke treba prethodno obraditi kako je spomenuto gore za određivanje AUR i treba ih analizirati za nitratni plus nitritni dušik. Alternativno, ion-selektivni ili UV senzor za nitrat i nitrit se može koristiti u reaktoru kako bi se dobili detaljniji vremenski nizovi i potencijalno provele studije biokinetičkog modeliranja o procesu denitrifikacije. Primjer takvih podataka nalazi se na slici 5.47.

NUR (mg NO₃-N L⁻¹ h⁻¹) se izračunava iz nagiba proizašle krivulje iskorištavanja nitrata plus nitrita. Specifični NUR (SNUR, mg NO₃-N g VSS⁻¹ h⁻¹) se dobiva dijeljenjem volumetrijske brzine s koncentracijom biomase (g VSS L⁻¹) postavljenom na početku eksperimenta, kako bi se mogli denitrifikacijski kapaciteti usporediti s tipičnim vrijednostima.



Slika 5.47 Primjer eksperimenta brzine iskorištavanja nitrata s acetatom (A) i glukozom (B) uz kontrolu pH dodavanjem kiseline (A) ili baze (B) (Petersen i sur., 2002b).

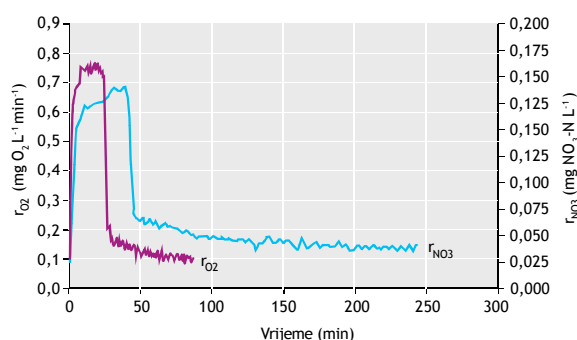
Anoksična i aerobna heterotrofna aktivnost su usko povezane budući da obje odražavaju kapacitet heterotrofne biomase da oksidira organsku tvar, bilo oksidiranim dušikom ili kisikom kao akceptorom elektrona. Na slici 5.48 prikazana je tipična usporedba respirograma NUR i OUR dobivenih s istom biomasom i dodavanjem acetata (Sin i Vanrolleghem, 2004). Postepeni pad brzine respiracije na kraju krivulje koji se javlja u oba eksperimenta nakon povratka na endogenu respiraciju pokazuje da se gore spomenuto pohranjivanje COD javlja i u anoksičnim i aerobnim uvjetima za taj uzorak biomase.

Kod uspoređivanja brzina respiracije u anoksičnim i aerobnim uvjetima, treba biti svjestan da su brzine konverzije COD ipak tipično niže u anoksičnim uvjetima. To se objašnjava na dva načina: ili su specifične brzine konverzije niže u anoksičnim uvjetima ili je samo frakcija ukupne biomase sposobna respirirati s nitratom. Često korištena karakteristika biomase za ovu pojavu je tzv. faktor anoksične redukcije η koji je omjer između obje aktivnosti te se izvodi na temelju ekvivalenta elektrona (otuda faktor 2,86):

$$\eta = 2,86 \cdot \frac{r_{\text{NO}_3, \text{exo}}}{r_{\text{O}_2, \text{exo}}} \quad 5.36$$

Faktor η je blizu jedan ($\sim 0,85$) za biološki lako razgradivi supstrat (Ekama i sur., 1996). Za biološki sporo razgradivi supstrat u modelu aktivnog mulja br. 1 (ASM1), $\eta \sim 0,33$ (van Haandel i sur., 1981), a u ASM2, 0,66 (Clayton i sur., 1991). Razlog ove razlike još uvijek nije jasan.

Korištenje omjera η pretpostavlja se da je prirast na nitratu ili na kisiku isti. Međutim, prirast u anoksičnim uvjetima je obično niži od onog u aerobnim uvjetima (Muller i sur., 2003). To znači da će se za istu brzinu konverzije COD potrošiti više akceptora elektrona u anoksičnim uvjetima (mora se sagoriti više COD kako bi se postigla proizvodnja iste biomase). To stoga znači da, u teoriji, faktor redukcije može biti iznad jedan ako je brzina konverzije COD ista.



Slika 5.48 Usporedba aerobnog (crveno) i anoksičnog (plavo) respirograma s dodavanjem acetata mulju iz UPOV-a Ossemeersen: nakon dodavanja $46,9 \text{ mg COD}_{\text{Ac}} \text{ L}^{-1}$ (r_{O_2}) i $38,9 \text{ mg COD}_{\text{Ac}} \text{ L}^{-1}$ (r_{NO_3}) (Sin i Vanrolleghem, 2004).

Reference poglavlja 2, 3 i 4

- Abdeen, S., Di, W., Hui, L., Chen, G.-H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Fecal coliform removal in a sulfate reducing autotrophic denitrification and nitrification integrated (SANI) process for saline sewage treatment. *Water Science and Technology*, 62(11): 2564-2570.
- Acevedo, B., Oehmen, A., Carvalho, G., Seco, A., Borrás, L. and Barat, R. (2012). Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage. *Water Research*, 46(6): 1889-1900.
- Acevedo, B., Borrás, L., Oehmen, A. and Barat, R. (2014). Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms. *Water Research*, 65: 235-244.
- Al Abbas, F.M., Williamson, C., Bhole, S.M., Spear, J.R., Olson, D.L., Mishra, B. and Kakpovbia, A.E. (2013). Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78: 34-42.
- Ahn, J., Schroeder, S., Beer, M., McIlroy, S., Bayly, R.C., May, J.W., Vasiliadis, G. and Seviour, R.J. (2007). Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7): 2257-2270.
- Almeida, P.F., Almeida, R.C.C., Carvalho, E.B., Souza, E.R., Carvalho, A.S., Silva, C.H.T.P. and Taft, C.A. (2006). Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: *Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry*, Taft, C.A. (Ed.). Research Signpost, Trivandrum, India.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF). (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd edition, ISBN: 0875530133, Washington, D.C.
- Arden, E. and Lockett, W.T. (1914). Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 33(10): 523-539.
- Artiga, P., Gonzalez, F., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Garrido, J.M., Ficara, E. and Méndez, R. (2005). Multiple analyses reprogrammable titration analyser for the kinetic characterisation of nitrifying and autotrophic denitrifying biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 26: 176-183.
- Baetens, D., Aurola, A.M., Foglia, A., Dionisi, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). Gas chromatographic analysis of polyhydroxybutyrate in activated sludge: a round-robin test. *Water Science and Technology*, 46(1-2): 357-361.
- Bale, C.W., Chartrand, P., Degtrov, S.A., Eriksson, G., Hack, K., Ben Mahfoud, R., Melançon, J., Pelton, A.D. and Petersen, S. (2002). FactSage thermochemical software and databases. *Calphad*, 26: 189-228.
- Balk, M., Altınbaş, M., Rijpstra, W.I.C., Sinnighe Damsté, J.S. and Stams, A.J.M. (2008). *Desulfatirhabdium butyrativorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 110-115.
- Barañao, P.A. and Hall, E.R. (2004). Modelling carbon oxidation in CTMP pulp mill activated sludge systems: calibration of ASM3. *Water Science and Technology*, 50(3): 1-10.
- Barat, R., Montoya, T., Borrás, L., Ferrer, J. and Seco, A. (2008). Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism. *Water Research*, 42(13): 3415-3424.
- Barker, P.S. and Dold, P.L. (1995). COD and nitrogen mass balances in activated-sludge systems. *Water Research*, 29(2): 633-643.
- Bettazzi, E., Caffaz, S., Vannini, C. and Lubello, C. (2010). Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: a batch-scale experimental study. *Process Biochemistry*, 45(4): 573-580.
- Beun, J.J., Paletta, F., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2000). Stoichiometry and kinetics of Poly-B-hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 379-389.
- Bi, Z., Qiao, S., Zhou, J., Tang, X. and Zhang, J. (2014). Fast start-up of Anammox process with appropriate ferrous iron concentration. *Bioresource Technology*, 170: 506-512.
- Bilanovic, D., Battistoni, P., Cecchi, F., Pavan, P. and Mata-Alvarez, J. (1999). Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Research*, 33(15): 3311-3320.
- Bjerrum, J., Schwarzenbach, G. and Sillén, L.G. (1958). *Stability Constants*. Chemical Society, London.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z. and Keller, J. (2007). Determination of growth rate and yield of nitrifying bacteria by measuring carbon dioxide uptake rate. *Water Environment Research*, 79(12): 2437-2445.
- Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R. and Zart, D. (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Archives of Microbiology*, 163: 16-20.
- Bogaert, H., Vanderhasselt, H., Gernaey, K., Yuan, Z., Thoeye, C. and Verstraete, W. (1997). A new sensor based on pH-effect of the denitrification process. *Journal of Environmental Engineering*, 123: 884-891.
- Boyles, S. (1997). *The Science of Chemical Oxygen Demand*. Technical Information Series, Booklet No. 9, HACH Company, USA, pp: 1-23.
- Brdjanovic, D., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (1996). The dynamic effects of potassium limitation on biological phosphorus removal. *Water Research*, 30(10): 2323-2328.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G. J. and Heijnen, J. J. (1997). Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal systems. *ASCE Journal of Environmental Engineering*, 123: 144-154.
- Brdjanovic, D. (1998a). *Modelling biological phosphorus removal in activated sludge systems*. PhD Thesis. Delft University of Technology, ISBN: 9054104155, Balkema Publishers, Rotterdam, the Netherlands.
- Brdjanovic, D., Logemann, S., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (1998b). Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies. *Water Research*, 32(4): 1035-1048.
- Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (1998c). Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Research*, 32(1): 200-208.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M., Veersteeg, P., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (2000). Modelling COD, N and P removal in a full-scale WWTP Haarlem Waarderpolder. *Water Research*, 34: 846-858.
- Burow, L.C., Kong, Y., Nielsen, J.L., Blackall, L.L. and Nielsen, P.H. (2007). Abundance and ecophysiology of *Defluviococcus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 153(1): 178-185.
- Butlin, K.R., Selwyn, S.C. and Wakerley, D.S. (1956). Sulfide production from sulphate-enriched sewage sludges. *Journal of Applied Bacteriology*, 19(1): 3-15.

- Caccavo, F.Jr., Frolund, B., van Ommen Kloeke, F. and Nielsen, P.H. (1996). Deflocculation of activated sludge by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1487-1490.
- Carvajal-Arroyo, J.M., Sun, W., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2013). Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. *Chemosphere*, 91: 22-27.
- Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A. and Reis, M.A. (2007). Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research*, 41(19): 4383-4396.
- Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Eusébio, M. and Reis, M.A. (2014). The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 66: 296-307.
- Cao, Y., Ang, C., Chua, K., Woo, F., Chi, H., Bhawna, B., Chong, C.T., Ganesan, N., Ooi, K.E. and Wah, Y. (2009). Enhanced biological phosphorus removal in the retrofitting from an anoxic selector to an anaerobic selector in a full-scale activated sludge process in Singapore. *Water Science and Technology*, 59(5): 857-865.
- Cech, J.S. and Hartman, P. (1993). Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. *Water Research*, 27(7): 1219-1225.
- Chen, G.-H., Brdjanovic, D., Ekama, G.A. and van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Seawater as alternative water resource. In: Proceedings of the 7th IWA Leading Edge Technology Conference on Water and Wastewater Treatment, Arizona, USA, June 2-4.
- Chen, H., Yu, J.-J., Jia, X.-Y., and Jin, R.-C. (2014). Enhancement of Anammox performance by Cu(II), Ni(II) and Fe(III) supplementation. *Chemosphere*, 117 (1): 610-616.
- Comeau, Y., Hall, K.J., Hancock, R.E.W. and Oldham, W.K. (1986). Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 20(12): 1511-1521.
- Comeau, Y., Rabionwitz, B., Hall, K.J. and Oldham, W.K. (1987). Phosphate release and uptake in enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 59(7): 707-715.
- Comeau Y. (2008). Microbial metabolism. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing. London, UK.
- Corominas, L., Rieger, L., Takács, I., Ekama, G.A., Hauduc, H., Vanrolleghem, P., Oehmen, A., Gernaey, K., van Loosdrecht M.C.M. and Comeau, Y. (2010). New framework for standardized notation in wastewater treatment modelling. *Water Science and Technology*, 61(4): 841-857.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Joulain, C., Cayol, J.-L. and Hirschler-Réa, A. (2004). *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel nalkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1639-1642.
- Cypionka, H. (1987). Uptake of sulfate, sulfite and thiosulfate by proton-anion symport in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Archives of Microbiology*, 148(2): 144-149.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annual Reviews of Microbiology*, 54: 827-848.
- Dai, Y., Yuan, Z., Wang, X., Oehmen, A. and Keller, J. (2007). Anaerobic metabolism of *Deftuviococcus vanus* related glycogen accumulating organisms (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water Research*, 41(9): 1885-1896.
- Daigger, G.T., Hodgkinson, A., Aquilina, S. and Fries, M.K. (2015). Development and implementation of a novel sulfur removal process from H₂S containing wastewaters. *Water Environment Research*, 87(7): 618-625.
- Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R. and Jetten M.S.M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 859-865.
- de Graaff, M.S., Temmink, H., Zeeman, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Buisman C.J.N. (2011). Autotrophic nitrogen removal from black water: calcium addition as a requirement for settleability. *Water Research*, 45: 63-74.
- Dircks, K., Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. and Henze, M. (2001). Glycogen metabolism in aerobic mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2): 85-94.
- Dircks, K., Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Mosbaek, H. and Aspegren, H. (2001). Storage and degradation of poly-B-hydroxybutyrate in activated sludge under aerobic conditions. *Water Research*, 35: 2277-2285.
- Dircks, K., Pind, P.F., Mosbaek, H. and Henze, M. (1999). Yield determination by respirometry - The possible influence of storage under aerobic conditions in activated sludge: *Water SA*, 25: 69-74.
- Dosta, J., Fernandez, I., Vazquez-Padin, J. R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Alvarez, J. and Mendez, R. (2008). Short-and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1): 688-693.
- Eckenfelder, W. (1986). Operation control and management of activated sludge plants treating industrial wastewaters. *Proceedings of a seminar sponsored by Vanderbilt University*. Tennessee.
- Eikelboom, D.H. (2000). Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. ISBN-13: 9781780406831, IWA Publishing, London, UK.
- Ekama, G.A. and Wentzel, M.C. (2008a). Organic matter removal. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Ekama, G.A. and Wentzel, M.C. (2008b). Nitrogen removal. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing. London, UK.
- Ekama, G.A., Wilsenach, J.A. and Chen, G.-H. (2010). Some opportunities and challenges for urban wastewater treatment. In: 7th IWA LET conference, Arizona, USA, June 2-4 (keynote presentation), Retrieved in September 2015 from <http://repository.ust.hk/ir/Record/1783.1-16616>
- Ettwig, K.F., Butler, M.L., Le Paslier, D., Pelletier, E., Manganot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464, 543-548.
- Ficara, E. and Canziani, R. (2007). Monitoring denitrification by pH-static titration. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2): 368-377.
- Ficara, E. and Rozzi, A. (2004). Coupling pH-static and DO-stat titration to monitor degradation of organic substrates. *Water Science and Technology*, 49(1): 69-77.
- Ficara, E., Cortezzi, P. and Rozzi, A. (2003). Theory of pH-stat titration, *Biotechnology and Bioengineering*, 82: 28-37.

- Ficara, E., Musumeci, A. and Rozzi, A. (2000). Comparison and combination of titrimetric and respirometric techniques to estimate nitrification kinetics parameters. *Water SA*, 26(2): 217-224.
- Ficara, E., Sambusiti, C. and Canziani, R. (2009). Manometric monitoring of biological denitrification. In: Proceeding of the 2nd IWA Specialized Conference in Nutrients Management in Wastewater Treatment Processes, Krakow, Poland, 6-9 September, 2009. Lemtech Consulting (Ed.), Krakow. pp: 61-68.
- Filipe, C.D., Daigger, G.T. and Grady, Jr, C.P. (2001a). A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(1): 17-31.
- Filipe, C.D., Daigger, G.T. and Grady, Jr, C.L. (2001b). pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms. *Water Environment Research*, 73(2): 223-232.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Mayer, C., Korstgens, V. and Borchard, W. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Community structure and cooperation of biofilms, Allison, D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M. and Wilson, M. (Eds.), SGM Symposium Series, 59, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 87-105.
- Flowers, J.J., He, S., Carvalho, G., Brook, Peterson, S., López, C., Yilmaz, S., Zilles, J.L., Morgenroth, E., Lemos, P., Reis, M.A.M., Crespo, M.T.B., Noguera, D.R. and McMahon, K.D. (2008). Ecological differentiation of *Accumulibacter* in EBPR reactors. In: Proceedings of the Water Environment Federation, WEFTEC 2008, pp: 31-42.
- Foxon, K.M., Brouckaert, C.J., Buckley, C.A. and Rozzi, A. (2002). Denitrifying activity measurements using an anoxic titration (pHstat) bioassay. *Water Science and Technology*, 46(9): 211-218.
- Gayon, U. and Dupetit, G. (1883). La fermentation des nitrates. *Mem. Soc. Sci. Phys. Nat.*, Bordeaux 2(5): 35-36.
- Gernaey, K., Bogaert, H., Massone, A., Vanrolleghem, P. and Verstraete, W. (1997). On-line nitrification monitoring in activated sludge with a titrimetric sensor. *Environmental Science and Technology*, 31: 2350-2355.
- Gernaey, K., Bogaert, H., van Rolleghem, P., Massone, A., Rozzi, A. and Verstraete, W. (1998). A titration technique for online nitrification monitoring in activated sludge. *Water Science and Technology*, 37(12): 103-110.
- Gibson, G.R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(6): 769-797.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H. and Matsuo, T. (1999). Modelling hydrolysis processes considering intracellular storage: *Water Science and Technology*, 39: 97-105.
- Grady, Jr, L.C.P., Daigger, G.T., Love, N.G., and Filipe, C.D.M. (2011). Biological wastewater treatment. 3rd edition, ISBN 9780849396793, IWA Publishing, CRC Press, London, UK.
- Grein, F., Ramos, A.R., Venceslau, S.S. and Pereira, I.A.C. (2013). Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2): 145-160.
- Guisasola, A., Qurie, M., Vargas, M., Casas, C. and Baeza, J.A. (2009). Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor. *Process Biochemistry*, 44: 689-695.
- Guisasola, G., Pijuan, M., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C. and Lafuente, J. (2004). Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake in bio-P sludge: process modelling using oxygen uptake rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 85: 721-733.
- Guisasola, A., Sin, G., Baeza, J.A., Carrera, J. and Vanrolleghem, P.A. (2005). Limitations of ASM 1 and ASM 3: a comparison based on batch oxygen uptake rate profiles from different full-scale wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 52(10): 69-77.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T. and van Loosdrecht, M.C.M. (1999). Activated sludge model No. 3. *Water Science and Technology*, 39(1): 183-193.
- Hallin, S., Throback, I.N., Dicksved, J. and Pell, M. (2006). Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *American Society for Microbiology*, 72(8): 5445-5452.
- Hansen, T.A. (1993). Carbon metabolism of sulfate-reducing bacteria. In: The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives, Odom, J.M., Singleton, Jr, R. (Eds.), ISBN 978-1-4613-9263-7, Brock/Springer Book Series in Contemporary Bioscience, Springer-Verlag, New York Inc.
- Hansen, T.A. (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3): 165-185.
- Henze, M. (1991). Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Water Science and Technology*, 23(4-6): 669-679.
- Henze, M. (1992). Characterization of wastewater for modeling of activated sludge processes. *Water Science and Technology*, 25(6): 1-15.
- Henze, M., Harremoes, P., Jansen, J.L.C. and Arvin, E. (1997). Wastewater treatment: biological and chemical processes. ISBN 978-3-540-42228-0, Springer, Berlin.
- Henze, M. and Comeau, Y. (2008). Wastewater characterization. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C., Marais, G.v.R. and van Loosdrecht, M.C.M. (1999). Activated sludge model no. 2d, ASM2d. *Water Science and Technology*, 39(1): 165-182.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T. and van Loosdrecht, M.C.M. (2000). Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. IWA Scientific and Technical Report No. 9, IWA Publishing, London, UK.
- Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (2008). Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Hoover, S.R. and Porges, N. (1952). Assimilation of dairy wastes by activated sludge II: The equation of synthesis and oxygen utilization. *Sewage and Industrial wastes*, 24(3): 306-312.
- Hu, Z., Lotti, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Kartal, B. (2013). Nitrogen removal with the anaerobic ammonium oxidation process. *Biotechnology Letters*, 35(8):1145-1154.
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Lu, F. and Fan, X.J. (2003). A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Research*, 37(14): 3463-3471.
- Hu, Z.R., Wentzel, M.C. and Ekama, G.A. (2002). Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Research*, 36(19): 4927-4937.
- Hulsbeek, J.J.W., Kruit, J., Roeleveld, P.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). A practical protocol for dynamic modelling of activated sludge systems. *Water Science and Technology*, 45(6): 127-136.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M. and Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, 9(3-4): 213-224.

- Isaksen, M.F. and Jørgensen, B.B. (1996). Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 408-414.
- Jobbagy, A., Literathy, B., Wong, M., Tardy, G. and Liu, W. (2006). Proliferation of glycogen accumulating organisms induced by Fe (III) dosing in a domestic wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 54(1): 101-109.
- Jones, R., Dold, P., Takács, I., Chapman, K., Wett, B., Murthy, S. and Shaughnessy, M. (2007). Simulation for operation and control of reject water treatment processes. In: Proceedings of the Water Environment Federation WEFTEC 2007, pp: 4357-4372.
- Jørgensen, B.B. (2006). Bacteria and marine biogeochemistry. In: Marine geochemistry, 2nd edition, Schulz, H.D. and Zabel, M. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 169-206.
- Jubany, I., Carrera, J., Lafuente, J. and Baeza, J.A. (2008). Start-up of a nitrification system with automatic control to treat highly concentrated ammonium wastewater: Experimental results and modeling. *Chemical Engineering Journal*, 144(3): 407-419.
- Kampschreur, M.J., Picioreanu, C., Tan, N.C.G., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M. and van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Unraveling the source of nitric oxide emission during nitrification. *Water Environment Research*, 79: 2499-2509.
- Kamysny, Jr., A., Zilberbrand, M., Ekelchik, I., Voitkovski, T., Gun, J. and Lev, O. (2008). Speciation of polysulfides and zero-valent sulfur in sulfide-rich water wells in southern and central Israel. *Aquatic Geochemistry*, 14: 171-192.
- Kappeler, J. and Gujer, W. (1992). Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Science and Technology*, 25(6): 125-139.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., den Camp, H.J.M.O., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., Keltjens J.T., Jetten, M.S.M. and Stroums, M. (2011). Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 479: 127-130.
- Kern-Jespersen, J.P. and Henze, M. (1993). Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Research*, 27: 617-624
- Khanal, S.K. (2008). *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*, Wiley-Blackwell, ISBN: 978-0-8138-2346-1, Iowa, USA.
- Kjeldsen, K.U., Joulain, C. and Ingvorsen, K. (2004). Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 38(7): 2038-2043.
- Kjeldsen, K.U., Loy, A., Jakobsen, T.F., Thomsen, T.R., Wagner, M. and Ingvorsen, K. (2007). Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 287-298.
- Koch, G., Egli, K., van der Meer, J.R. and Siegrist, H. (2000). Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor. *Water Science and Technology*, 41(4-5): 191-198.
- Koch G., Kuhn M., Gujer W. and Siegrist H. (2000). Calibration and validation of activated sludge model No. 3 for Swiss municipal wastewater. *Water Research*, 34: 3580-3590.
- Kong, Y., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H. (2005). Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4076-4085.
- Kong, Y., Xia, Y., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H., (2006). Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology*, 8(3): 479-489.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B. and Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058): 543-6.
- Kuba, T., Smolders, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1993). Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 27(5-6): 241-252.
- Kuba, T., Murnleitner, E., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1996). A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 52: 685-695.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Brandse, F.A. and Heijnen, J.J. (1997a). Occurrence of denitrifying phosphorus removing bacteria in modified UCT-type wastewater treatment plants. *Water Research*, 31(4): 777-786.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Murnleitner, E. and Heijnen, J.J. (1997b). Kinetics and stoichiometry in the biological phosphorus removal process with short cycle times. *Water Research*, 31(4): 918-928.
- Kujawa, K. and Klapwijk, B. (1999). A method to estimate denitrification potential for pre-denitrification systems using NUR batch tests. *Water Research*, 33: 2291-2300.
- Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B.M., Amann, R., Jørgensen, B.B. and Jetten, M.S.M. (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 6478-6483.
- Lackner, S., Gilbert, E.M., Vlaeminck, S.E., Joss, A., Horn, H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014). Full-scale partial Nitritation/Anammox experiences - an application survey. *Water Research*, 55: 292-303.
- Langergraber, G., Rieger, L., Winkler, S., Alex, J., Wiese, J., Owerdieck, C., Ahnert, M., Simon, J. and Maurer, M. (2004). A guideline for simulation studies of wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 50(7): 131-138.
- Lanham, A.N., Ricardo, A.R., Coma, M., Fradinho, J., Carvalheira, M., Oehmen, A., Carvalho, G. and Reis, M.A.M. (2012). Optimisation of glycogen quantification in mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*, 118: 518-525.
- Lanham, A.B., Oehmen, A., Saunders, A.M., Carvalho, G., Nielsen, P.H. and Reis, M.A. (2014). Metabolic modelling of full-scale enhanced biological phosphorus removal sludge. *Water Research*, 66: 283-295.
- Lau, G.N., Sharma, K.R., Chen, G.-H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2006). Integration of sulfate reduction autotrophic denitrification and nitrification to achieve low-cost sludge minimization for Hong Kong sewage. *Water Science and Technology*, 53(3): 227-235.
- Lens, P.N., De Poorter, M.-P., Cronenberg, C.C. and Verstraete, W.H. (1995). Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Water Research*, 29(3): 871-880.
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(1): 41-88.
- Li, L., Han, Y., Yan, X. and Liu, J. (2013). H₂S removal and bacterial structure along a full-scale biofilter bed packed with polyurethane foam in a landfill site. *Bioresource Technology*, 147: 52-58.
- Liamleam, W. and Annachhatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, 25(5): 452-463.
- Lin, Y.M., Bassin, J.P. and van Loosdrecht, M.C.M. (2012). The contribution of exopolysaccharides induced struvites accumulation to ammonium adsorption in aerobic granular sludge. *Water Research*, 46(4): 986-992.

- Little, B.J. and Lee, J.S. (2007). Microbiologically influenced corrosion. ISBN 978-0-471-77276-7, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Liu, M.C and Peck, Jr., H.D. (1981). The isolation of a hexaheme cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* and its identification as a new type of nitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 256(24): 13159-13164.
- Lochtman, S.F.W. (1995). Proceskeuze en -optimalisatie van het SHARON proces voor slibverwerkingsbedrijf Sluisjesdijk (Process choice and optimisation of the SHARON process for the sludge treatment plant Sluisjesdijk). BODL report: TU Delft.
- Lopez, C., Pons, M.N. and Morgenroth, E. (2006). Endogenous processes during long-term starvation in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 40(8): 1519-1530.
- Lopez-Vazquez, C.M., Song, Y.L., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Moussa, M.S., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Short term temperature effects on the anaerobic metabolism of glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(3): 483-495.
- Lopez-Vazquez, C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2008a). Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Research*, 42(10): 2349-2360.
- Lopez-Vazquez, C.M., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2008b). Comment on "Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?" by Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Lu, H. and Yuan, Z. *Water Research* (2008). doi: 10.1016/j.watres.2008.01.003, *Water Research*, 42(13): 3561-3562.
- Lopez-Vazquez, C.M. (2009). *The competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms: temperature effects and modelling. PhD Thesis*. ISBN 9780415558969, Delft University of Technology, CRC Press/Balkema, Leiden, the Netherlands.
- Lopez-Vazquez, C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009a). Temperature effects on glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 43(11): 2852-2864.
- Lopez-Vazquez, C.M., Oehmen, A., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J., Yuan, Z. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009b). Modeling the PAO—GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature. *Water Research*, 43(2): 450-462.
- Lopez-Vazquez, C.M., Kubare, M., Saroj, D.P., Chikamba, C., Schwarz, J., Daims, H. and Brdjanovic, D. (2014). Thermophilic biological nitrogen removal in industrial wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2): 945-956.
- Lotti, T., van der Star, W.R., Kleerebezem, R., Lubello, C. and van Loosdrecht, M.C.M. (2012). The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research*, 46(8): 2559-2269.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Lubello, C. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014). Physiological and kinetic characterization of a suspended cell Anammox culture. *Water Research*, 60(14): 1-14.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Hu, Z., Kartal, B., de Kreuk, M.K., van Erp Taalman Kip, C., Kruit, J., Hendrickx, T.L.G. and van Loosdrecht, M.C.M. (2015a). Pilot-scale evaluation of anammox based main-stream nitrogen removal from municipal wastewater. *Environmental Technology*, 36(9): 1167-1177.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Abelleira-Pereira, J.M., Abbas, B. and van Loosdrecht M.C.M. (2015b). Faster through training: the Anammox case. *Water Research*, 81: 261-268.
- Lotti, T., Kleerebezem, R. and van Loosdrecht, M.C.M. (2015c). Effect of temperature change on Anammox activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(1): 98-103.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009). Brock biology of microorganisms, 12th edition, ISBN 0-13-232460-1, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Mañas, A., Biscans, B. and Spérandio, M. (2011). Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. *Water Research*, 45(12): 3776-3786.
- Marais, G.v.R. and Ekama, G.A. (1976). The activated sludge process part 1 - Steady state behaviour. *Water S.A.*, 2(4): 163-200.
- Martins, A.M.P. (2004). *Bulking sludge control: kinetics, substrate storage, and process design aspects. PhD Thesis*. ISBN 972-9098-07-7, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- Martins, A.M.P., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2003). Effect of feeding pattern and storage on sludge settleability under aerobic conditions. *Water Research*, 37(11): 2555-2570.
- Massone, A., Antonelli, M. and Rozzi, A. (1996). The DENICON: a novel biosensor to control denitrification in biological wastewater treatment plants. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige, University of Gent, 1709-1714.
- Massone, A.G., Gernaey, K., Rozzi, A. and Verstraete, W. (1998). Measurement of ammonium concentration and nitrification rate by a new titrimetric biosensor. *WEF Research Journal*, 70(3): 343-350.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J. and Janoch, T. (1992). Biological water denitrification - a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 170-183.
- McCarty, P.L. (2007). Thermodynamic electron equivalents model for bacterial yield prediction: Modifications and comparative evaluations. *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 377-388.
- Meijer, S.C.F. (2004). *Theoretical and practical aspects of modelling activated sludge processes. PhD Thesis*. ISBN 90-9018027-3, Delft University of Technology, Delft, the Netherlands.
- Meinhold, J., Arnold, E. and Isaacs, S. (1999). Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Research*, 33(8): 1871-1883.
- Mesquita D.P., Amaral A.L., Ferreira E.C. (2013) Activated sludge characterization through microscopy: a review on quantitative image analysis and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*, 802: 14-28.
- Metcalf and Eddy (2003). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. 4th edition, ISBN-13:978-0070418783, McGraw-Hill, Boston, USA.
- Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*, 32(11): 3193-3207.
- Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y. and Matsuo, T. (1987). Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In: biological phosphorus removal from wastewaters, Ramadori, R. (Ed.), Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. pp: 27-38.
- Mohan, S.V., Rao, N.C., Prasad, K.K. and Sarma, P.N. (2005). Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry*, 40(8): 2849-2857.
- Mokhayeri, Y., Nichols, A., Murthy, S., Riffat, R., Dold, P. and Takács, I. (2006). Examining the influence of substrates and temperature on maximum specific growth rate of denitrifiers. *Water Science and Technology*, 54(8): 155-162.

- Mokhayeri, Y., Riffat, R., Takács, I., Dold, P., Bott, C., Hinojosa, Bailey, W. and Murthy S. (2008). Characterizing denitrification kinetics at cold temperature using various carbon sources in lab-scale sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*, 58(1): 233-238.
- Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T. and Hanada, S. (2003). A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles*, 7: 283-290.
- Moussa, M.S., Fuentes, O.G., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Gijzen, H.J. (2006). Nitrification activities in full-scale treatment plants with varying salt loads. *Environmental Technology*, 27(6): 635-643.
- Moussa, M.S., Rojas, A.R., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Model-based evaluation of nitrogen removal in a tannery wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 50(6): 251-60.
- Moussard, H., L'Haridon, S., Tindall, B.J., Banta, A., Schumann, P., Stackebrandt, E., Reysenbach, A.-L., and Jeanthon, C. (2004). *Thermodesulfator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 227-233.
- Mulder, A. (2003). The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Water Science and Technology*, 48(1): 67-75.
- Munro, J.H.M. (1886). The formation and destruction of nitrates and nitrites in artificial solutions and in river and well waters. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49: 632-681.
- Murmleitner, E., Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1997). An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(5): 434-450.
- Muyzer, G. and Stams, A.J.M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 6:441-455.
- Naidoo, V., Urbain, V. and Buckley, C.A. (1998). Characterisation of wastewater and activated sludge from European municipal wastewater treatment plants using the NUR test. *Water Science and Technology*, 38(1): 303-310.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. ISBN-10: 1-4292-33414-8, W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Nielsen, P.H. and Keiding K. (1998). Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. *Water Research*, 32(2): 313-320.
- Nielsen, P.H., Mielczarek, A.T., Kragelund, C., Nielsen, J.L., Saunders, A.M., Kong, Y., Hansen, A.A. and Vollertsen, J. (2010). A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research*, 44(17): 5070-5088.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Keller, J. (2004). Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Science and Technology*, 50(10): 139-144.
- Oehmen, A., Vives, M.T., Lu, H., Yuan, Z. and Keller, J. (2005a). The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Research*, 39(15): 3727-3737.
- Oehmen, A., Keller-Lehmann, B., Zeng, R.J., Yuan, Z. and Keller, J. (2005b). Optimisation of poly-β-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *Journal of Chromatography A*, 1070(1-2): 131-136.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Keller, J. (2005c). Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(2): 162-168.
- Oehmen, A., Saunders, A.M., Vives, M.T., Yuan, Z. and Keller, J. (2006). Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 123(1): 22-32.
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L. and Reis, M.A. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Research*, 41(11): 2271-2300.
- Ong, Y.H., Chua, A.S.M., Fukushima, T., Ngoh, G.C., Shoji, T. and Michinaka A. (2014). High-temperature EBPR process: The performance, analysis of PAOs and GAOs and the fine-scale population study of *Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*. *Water Research*, 64: 102-112.
- Orhon, D., Sözen, S. and Artan, N. (1996). The effect of heterotrophic yield on the assessment of the correction factor for anoxic growth. *Water Science and Technology*, 34(5): 67-74.
- Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H. and Okabe, S. (2011). Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus Brocadia sinica*'. *Microbiology*, 157: 1706-1713.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. and Stams, A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 119-136.
- Parrou, J.L. and François, J. (1997). A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Analytical Biochemistry*, 248(1): 186-188.
- Pasteur, L. (1859). Note sur la fermentation nitreuse. *Bulletin de la Société de chimie de Paris* (séance du 11 mars): 22-23.
- Payne, W.J. (1986). 1986: Centenary of the isolation of denitrifying bacteria. *ASM News* 52(12): 627-629.
- Petersen, B., Gernaey, K. and Vanrolleghem, P.A. (2002). Anoxic activated sludge monitoring with combined nitrate and titrimetric measurements. *Water Science and Technology*, 45(4-5): 181-190.
- Pijuan, M., Guisasola, A., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C. and Lafuente, J. (2006). Net P-removal deterioration in enriched PAO sludge subjected to permanent aerobic conditions. *Journal of Biotechnology*, 123: 117-126.
- Pijuan, M., Ye, L., and Yuan, Z. (2010). Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of poly-phosphate accumulating organisms. *Water Research*, 44(20): 6063-6072.
- Pijuan, M., Ye, L. and Yuan, Z. (2011). Could nitrite/free nitrous acid favour GAOs over PAOs in enhanced biological phosphorus removal systems? *Water Science and Technology*, 63(2): 345-351.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6): 2109-2117.
- Piña-Ochoa, E., Hogslund, S., Geslin, E. and Risgaard-Petersen, N. (2010). Survival and life strategy of the foraminiferan *Globobulimina turgida* through nitrate storage and denitrification. *Marine Ecology Progress Series*, 417: 39-49.
- Poinapen, J., Ekama, G.A. and Wentzel, M.C. (2009). Biological sulphate reduction with primary sewage sludge in an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor - Part 2: Modification of simple wet chemistry analytical procedures to achieve COD and S mass balances. *Water SA*, 35(5): 535-542.
- Postgate, J.R. (1965). Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews*, 29(4): 425-441.

- Postgate, J.R. (1984). *The Sulfate-Reducing Bacteria*. 2nd Edition, ISBN: 9780521257916, Cambridge University Press, UK.
- Puyol, D., Carvajal-Arroyo, J.M., Garcia, B., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2013). Kinetic characterization of *Brocadia* spp.-dominated Anammox cultures. *Bioresource Technology*, 139: 94-100.
- Puyol, D., Carvajal-Arroyo, J.M., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2014). Nitrite (not free nitrous acid) is the main inhibitor of the anammox process at common pH conditions. *Biotechnology Letters*, 36(3): 547-551.
- Rabus, R., Hansen, T.A. and Widdel, F. (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: *The prokaryotes*, Vol. 2, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (Eds.), New York: Springer, pp: 659-768.
- Ramdani, A., Dold, P., Gadbois, A., Deleris, S., Houweling D. and Comeau, Y. (2012). Characterization of the heterotrophic biomass and the endogenous residue of activated sludge. *Water Research*, 46(3): 653-668.
- Rebac, S., Visser, A., Gerbens, S., van Lier, J.B., Stams, A.J.M. and Lettinga, G. (1996). The effect of sulphate on propionate and butyrate degradation in a psychrophilic anaerobic expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Environmental Technology*, 17(9): 997-1005.
- Reichenbecher, W. and Schink, B. (1997). *Desulfovibrio inopinatus* sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene). *Archives of Microbiology*, 168: 338-344.
- Reiset, J. (1856). Experiences sur la putrefaction et sur la formation des fumiers. *Comptes rendus des séances hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 42: 177-180.
- Rikmann, E., Zekker, I., Tomingas, M., Tenno, T., Menert, A., Loorits, L. and Tenno, T. (2012). Sulfate-reducing anaerobic ammonium oxidation as a potential treatment method for high nitrogen-content wastewater. *Biodegradation*, 23: 509-524.
- Rintala, J.A. and Puhakka, J.A. (1994). Anaerobic treatment in pulp and paper-mill waste management: A review. *Bioresource Technology*, 47(1): 1-18.
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A.M., Ingvarsdén, S., Schmid, M. C., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Derksen, J.W.M., Piña-Ochoa, E., Eriksson, S.P., Nielsen, L.P., Revsbech, N.P., Cedhagen, T. and van der Zwaan, G. J. (2006). Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature*, 443(7107): 93-96.
- Robertson, L.A., Dalsgaard, T., Revsbech, N.P. and Kuenen, J.G. (1995). Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas-chromatography and N-15 mass-spectrometry. *FEMS Microbiology Ecology*, 18(2): 113-119.
- Roeleveld, P.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). Experience with guidelines for wastewater characterisation in The Netherlands. *Water Science and Technology*, 45(6): 77-87.
- Rozzi, A., Castellazzi, L. and Speece, R.E. (2002). Acetoclastic methanogenic activity measurements by a titration biosensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1): 20-26.
- Rozzi, A., Castellazzi, L. and Speece, R.E. (2002). Acetoclastic methanogenic activity measurements by a titration biosensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1): 20-26.
- Rozzi, A., Ficara, E. and Rocco, A. (2003). DO-stat titration respirometry: principle of operation and validation. *ASCE-Journal of Environmental Engineering*, 129(7): 602-609.
- Rozzi, A., Massone, A. and Antonelli, M. (1997). A VFA measuring biosensor based on nitrate reduction. *Water Science and Technology*, 36(6-7): 183-189.
- Rubio-Rincon, F., Welles, L., López-Vázquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D., (2016). Sulfide effects on the metabolism of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I. (*submitted*).
- Saad, S.A., Welles, L., López-Vázquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2013). Sulfide effects on the anaerobic kinetics of phosphorus-accumulating organisms. In: *Proceedings of 13th World Congress on Anaerobic Digestion*, 25-28th June, Santiago de Compostela, Spain.
- Saad, S.A., Welles, L., Abbas, B., López-Vázquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2016). Denitrification pathways of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I using different carbon sources. (*submitted*).
- Saito, T., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Research*, 38(17): 3760-3768.
- Sánchez, M., Mosquera-Corral, A., Mendez, R. and Lema, J.M. (2000). Simple methods for the determination of the denitrifying activity of sludges. *Bioresource Technology*, 75(1-6): 1-6.
- Saunders, A.M., Oehmen, A., Blackall, L.L., Yuan, Z. and Keller, J. (2003). The effect of GAOs on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants. *Water Science and Technology*, 47(11): 37-43.
- Scaglione, D., Buttiglieri, G., Ficara, E., Caffaz, S., Lubello, C. and Malpei, F. (2009). Microcalorimetric and manometric tests to assess anammox activity. *Water Science and Technology*, 60(10): 2705-2711.
- Schuler, A.J. and Jenkins, D. (2003). Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, part I: experimental results and comparison with metabolic models. *Water Environment Research*, 75(6): 485-498.
- Schlœsing, T. and Müntz, A. (1877). Sur la nitrification par les ferments organiques. *Comptes rendus des séances hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 85: 301-303.
- Sin, G., Guisasola, A., De Pauw, D.J.W., Baeza, J.A., Carrera, J. and Vanrolleghem, P.A. (2003). A new approach for modelling simultaneous storage and growth processes for activated sludge systems under aerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(5): 600-613.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1994a). Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(6): 461-470.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1994b). Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(7): 837-848.
- Smolders, G.J.F., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1995). A metabolic model for the biological phosphorus removal process. *Water Science and Technology*, 31(2): 79-93.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 589-596.
- Tang, K., Baskaran, V. and Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1): 73-94.
- Tang, C.-J., Zheng, P., Chen, T.-T., Zhang, J.-Q., Mahmood, Q., Ding, S., Chen, X.-G., Chen, J.-W., and Wu D.-T. (2011). Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-ANAMMOX process. *Water Research*, 45: 201-210.

- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41: 100-180.
- Thomas, M., Wright, P., Blackall, L.L., Urbain, V. and Keller, J. (2003). Optimisation of Noosa BNR plant to improve performance and reduce operating costs. *Water Science and Technology*, 47(12): 141-148.
- Udert, K.M., Kind, E., Teunissen, M., Jenni, S. and Larsen, T.A. (2008). Effect of heterotrophic growth on nitrification/anammox in a single sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 58: 277-284.
- van de Graaf, A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142(8): 2187-2196.
- van den Brand, T.P.H., Roest, K., Brdjanovic, D., Chen, G.-H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014a). Influence of acetate and propionate on sulphate-reducing bacteria activity. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6): 1839-1847.
- van den Brand, T.P.H., Roest, K., Chen, G.-H., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014b). Temperature effect on acetate and propionate consumption by sulphate reducing bacteria in saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(9): 4245-4255.
- van den Brand, T.P.H., Roest, K., Chen, G.-H., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2015). Occurrence and activity of sulphate reducing bacteria in aerobic activated sludge systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3): 507-516.
- van Houten, R.T., van der Spoel, H., van Aelst, A.C., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1996). Biological sulfate reduction using synthesis gas as energy and carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(2): 136-144.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lopez-Vazquez, C.M., Meijer, S.C.F., Hooijmans, C.M., and Brdjanovic, D. (2015) Twenty-five years of ASM1: past, present and future of wastewater treatment modelling. *Journal of Hydroinformatics*, 17(5):697-718.
- van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A. and Heijnen, J.J. (1997). Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Science and Technology*, 35(1): 41-47.
- van Niel, E.W.J., Arts, P.A.M., Wesselink, B.J., Robertson L.A. and Kuenen, J.G. (1993). Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 102: 109-118.
- Vanrolleghem, P.A., Insel, G., Petersen, B., Sin, G., De Pauw, D., Nopens, I., Doverman, H., Weijers, S. and Gernaey, K. (2003). A comprehensive model calibration procedure for activated sludge models. In: Proceedings of the 76th Annual WEF Conference and Exposition, October 11-15, Los Angeles.
- Villa-Gomez, D., Ababneh, H., Papirio, S., Rousseau, D.P.L. and Lens, P.N.L. (2011). Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inverted fluidized bed reactors. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1): 200-207.
- Villegas, J.D., de Laclós, H.F., Dovat, J., Membrez, Y. and Holliger, C. (2011). Nitrogen removal from digested manure in a simple one-stage process. *Water Science and Technology*, 63: 1991-1996.
- Vishniac, W. and Santer, M. (1957). *Thiobacilli*. *Bacteriological Reviews*, 21: 195-213.
- Vlekke, G.J.F.M., Comeau, Y. and Oldham W.K. (1988). Biological phosphate removal from wastewater with oxygen or nitrate in sequencing batch reactors. *Environmental Technology Letters*, 9: 791-796.
- Wachtmeister, A., Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1997). A sludge characterization assay for aerobic and nitrifying phosphorus removing sludge. *Water Research*, 31(3): 471-478.
- Wang, J., Lu, H., Chen, G.H., Lau, G.N., Tsang, W.L. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009). A novel sulfate reduction, autotrophic denitrification, nitrification integrated (SANI) process for saline wastewater treatment. *Water Research*, 43(9): 2363-2372.
- Welles, L., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2014). Impact of salinity on the anaerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms (PAO) and glycogen-accumulating organisms (GAO). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17): 7609-7622.
- Welles, L., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2015a). Impact of salinity on the aerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8): 3659-3672.
- Welles, L., Tian, W.D., Saad, S., Abbas, B., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2015b). *Accumulibacter* clades Type I and II performing kinetically different glycogen-accumulating organisms metabolisms for anaerobic substrate uptake. *Water Research*, 15(83): 354-366.
- Welles, L., Abbas, B., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2016). Metabolic response of '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' clade II to changes in P/C ratio in their environment. (submitted).
- Wentzel, M.C., Dold, P.L., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A. and Marais, G.v.R. (1987). Experiments towards establishing the kinetics of biological excess phosphorus removal. In: Biological phosphorus removal from wastewaters: Proceedings of an IAWPRC Specialized Conference, Rome, Italy, 28-30 September 28-30, 1987 (Pergamon Press, Vol. 4, p. 79)..
- Wentzel, M.C., Comeau, Y., Ekama, G.A., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2008). Enhanced biological phosphorus removal. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Wentzel, M.C., Lötter, L.H., Loewenthal, R.E and Marais, G.v.R. (1986). Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal- a biochemical model. *Water SA*, 12(4): 209-224.
- Wentzel, M.C., Mbewe, A. and Ekama, G.A. (1995). Batch tests for measurement of readily biodegradable COD and active organism concentrations in municipal waste waters. *Water SA*, 21(2): 117-124.
- WERF. (2003). Methods for wastewater characterization in activated sludge modeling. - Water Environment Research Foundation report 99-WWF-3, ISBN13: 9781843396628. WERF (Alexandria) and IWA Publishing (London), pp. 575
- Wett, B. (2007). Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Science and Technology*, 56(7): 81-88.
- Widdel, F. (2006). The genus *Desulfotomaculum*. In: The prokaryotes, Vol. 2, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds.), New York: Springer, pp: 787-794.
- Wiesmann, U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology, Fiechter, A. (Ed.), ISBN-13: 978-1843396628, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 113-154.
- Wik, T. and Breitholtz, C. (1996). Steady-state solution of a two-species biofilm problem. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(6): 675-686.
- Winogradsky, M.S. (1890). Reserches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'institut Pasteur*, 4: 213-231.
- Winogradsky, M.S. (1892). Contribution à la morphologie des organismes de la nitrification. *Archives of Biological Sciences*, 1: 87-137.

- Wu, D., Ekama, G.A., Wang, H.G., Wei, L., Lu, H., Chui, H.K., Liu, W.T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M. and Chen, G.H. (2014). Simultaneous nitrogen and phosphorus removal in the sulphur cycle-associated Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) process. *Water Research*, 49: 251-264.
- Yamamoto, R.I., Komori, T. and Matsui, S. (1991). Filamentous bulking and hindrance of phosphate removal due to sulfate reduction in activated sludge. *Water Science and Technology*, 23(4-6): 927-935.
- Yang, Z., Zhou, S. and Sun, Y. (2009). Start-up of simultaneous removal of ammonium and sulfate from an anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in an anaerobic up-flow bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 113-118.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Saito, T. and Tanaka, K. (2006). The effect of nitrite on aerobic phosphate uptake and denitrifying activity of phosphate-accumulating organisms. *Water Science and Technology*, 53(6): 21-27.
- Zeng, R.J., van Loosdrecht, M.C.M., Yuan, Z. and Keller, J. (2003a). Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(1): 92-105.
- Zeng, R.J., Saunders, A.M., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Keller, J. (2003b). Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2): 140-148.
- Zeng, W., Li, B., Yang, Y., Wang, X., Li, L. and Peng, Y. (2014). Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by polyphosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2): 277-287.
- Zhou, Y., Pijuan, M. and Yuan, Z. (2007). Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by polyphosphate accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4): 903-912.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Lu, H. and Yuan, Z. (2008). Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)? *Water Research*, 42(10): 2361-2368.
- Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z. and Ng, W.J. (2012). Response of poly-phosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions. *Bioresour Technol*, 116: 340-347.
- Zietz, U. (1995). The formation of sludge bulking in the activated sludge process. *European Water Pollution Control*, 5: 21-27.
- Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 533-616.

Reference poglavlje 5

- Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, Garland Science, 1616 pp.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops : a proposed protocol for batch assays. *Water Sci Tech*. 59(5): 927-34.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF) (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Edition. New York. ISBN 9780875530130.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H. and Vavilin, V. (2002) *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)*. IWA Publishing, London.
- Clayton, J.A., Ekama, G.A., Wentzel M.C. and Marais G.v.R (1991) Denitrification kinetics in biological nitrogen and phosphorus removal systems treating municipal wastewaters. *Water Sci Tech*. 23(4/6-2): 1025-1035.
- Coen, F., Petersen, B., Vanrolleghem, P.A., Vanderhaegen, B. and Henze, M. (1998) Model-based characterization of hydraulic, kinetic and influent properties of an industrial WWTP. *Water Sci Tech*. 37(12): 317-326.
- Copp, J.B., Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A. (Eds.), 2002. *Respirometry in control of the activated sludge process: Benchmarking control strategies*. Scientific and Technical Report No. 11, IWA Publishing, London, UK.
- Eastman, J.A. and Ferguson, J.F., 1981. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Water Poll. Control Fed*. 53: 352-366.
- Ekama, G.A., Dold, P.L. and Marais, G.v.R. (1986) Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems. *Water Sci Tech*. 18: 91-114.
- Ekama, G.A., Wentzel, M.C., Casey, T.G. and Marais, G.v.R (1996) Filamentous organism bulking in nutrient removal activated sludge systems. Paper 3: Stimulation of the selector effect under anoxic conditions. *Water SA*, 22(2):119-126.
- Ersahin, M.E., Ozgun, H., Tao, Y., van Lier, J.B., 2014. Applicability of dynamic membrane technology in anaerobic membrane bioreactors. *Water Res*. 48: 420-9.
- Gaps, D., Pratt, S., Yuan, Z., and Keller, J. (2003) Online titrimetric and off-gas analysis for examining nitrification processes in wastewater treatment. *Water Res*. 37: 2678-2690.
- Germaey, K., Petersen, B., Ottoy, J.P. and Vanrolleghem, P.A. (1999) Biosensing activated sludge. WQI, May/June 1999, 16-21.
- Henze, M. Grady Jr., C.P.L., Gujer, W., Marais G.v.R. and Matsuo, T. (1987). *Activated sludge model No. 1*. Scientific and Technical Report No. 1, IAWPRC, London.
- Henze, M. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Water Sci Tech*. 25 (6): 1-15.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. and Arvin, E. (1995). *Wastewater Treatment Biological and Chemical Processes*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 383.
- Jeison, D. and van Lier, J.B., (2007). Thermophilic treatment of acidified and partially acidified wastewater using an anaerobic submerged MBR: Factors affecting long-term operational flux. *Water Res*. 41: 3868-79.
- Kappeler, J. and Gujer, W. (1992) Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Sci Tech*. 25(6): 125-139.
- Kong, Z., Vanrolleghem, P.A. and Verstraete, W. (1994) Automated respiration inhibition kinetics analysis (ARIKA) with a respirographic biosensor. *Water Sci Tech*. 30(4): 275-284.
- Kong, Z., Vanrolleghem, P.A., Willems, P. and Verstraete, W. (1996) Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. *Water Res.*, 30: 825-836.
- Kristensen, G.H., Jorgensen, P.E. and Henze, M. (1992) Characterization of functional groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Water Sci Tech*. 25(6): 43-57.

- Lasaridi, K.E. and Stentiford, E.I. (1998) A simple respirometric technique for assessing compost stability. *Water Res.* 32(12): 3717-23.
- Lee, B.J., Wentzel, M.C. and Ekama, G.A. (2006) Measurement and modelling of ordinary heterotrophic organism active biomass concentration in anoxic/aerobic activated sludge mixed liquor. *Water Sci Tech.* 54(1):1-10.
- Muller, A., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. and Loewenthal, R.E. (2003) Heterotrophic anoxic yield in anoxic aerobic activated sludge systems treating municipal wastewater. *Water Res.* 37: 2435-2441.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th Edition, Palgrave Macmillan, ISBN: 978-0-716-77108-1, 1100 pp.
- McCarthy, E.L. (1934) Mariotte's bottle. *Science*. 80, 100.
- Petersen, B., Gernaey, K., Henze, M. and Vanrolleghem, P.A. (2002a) Evaluation of an ASM1 model calibration procedure on a municipal-industrial wastewater treatment plant. *J. Hydroinformatics*, 4, 15-38.
- Petersen, B., Gernaey, K. and Vanrolleghem, P.A. (2002b) Anoxic activated sludge monitoring with combined nitrate and titrimetric measurements. *Water Sci Tech.* 45(4-5): 181-190.
- Petersen, B., Gernaey, K., Henze, M. and Vanrolleghem, P.A. (2003) Calibration of activated sludge models: A critical review of experimental designs. In: *Biotechnology for the Environment: Wastewater Treatment and Modeling, Waste Gas Handling*. Eds. Agathos S.N. and Reineke W., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 101-186.
- Pratt, S., Yuan, Z., Gapes, D., Dorigo, M., Zeng, R.J. and Keller, J. (2003) Development of a Novel Titration and Off-Gas Analysis (TOGA) Sensor for Study of Biological Processes in Wastewater Treatment Systems. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 482-495.
- Rezouga, F., Hamdi, M. and Sperandio, M. (2009) Variability of kinetic parameters due to biomass acclimation: Case of para-nitrophenol biodegradation. *Bioresource Technology*. 06/2009; 100(21): 5021-9.
- Rieger, L., Langergraber, G., Kaelin, D., Siegrist H. and Vanrolleghem P.A. (2008) Long-term evaluation of a spectral sensor for nitrite and nitrate. *Water Sci Tech.* 57(10): 1563-1569.
- Sin, G. and Vanrolleghem, P.A. (2004) A nitrate biosensor based methodology for monitoring anoxic activated sludge activity. *Water Sci Tech.* 50(11): 125-133.
- Sorensen, A.H. and Ahring, B.K. 1993. Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 427-431.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P.A. (1995a) Application of a hybrid respirometric technique to the characterization of an industrial wastewater. *Proceedings 50th Purdue Industrial Waste Conference*, 611-618.
- Still, D.A., Ekama, G.A., Wentzel, M.C., Casey, T.G. and Marais, G.v.R (1996) Filamentous organism bulking in nutrient removal activated sludge systems. Paper 2: Stimulation of the selector effect under aerobic conditions. *Water SA*, 22(2): 97-118.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P.A. (1995b) Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci Tech.* 31(2): 105-114.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A., Olsson, G., Dold, P.L., 1998. Respirometry in control of the activated sludge process: Principles. Scientific and Technical Report No. 7, IAWQ, London, UK.
- Surmacz-Gorska, J., Gernaey, K., Demuyne, C., Vanrolleghem, P.A. and Verstraete, W. (1996) Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res.*, 30:1228-1236.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mcallan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
- Urbain, V., Naidoo, V., Ginestet, P. and Buckley, C.A. (1998) Characterization of wastewater biodegradable organic fraction: accuracy of the nitrate utilisation rate test. In *Proceedings of the Water Environmental Federation 71st Annual Conference and Exposition*, October 3-7, Orlando, Florida (USA), 247-255.
- van Haandel, A.C., Ekama, G.A. and Marais, G.v.R (1981) The activated sludge process Part 3 - Single sludge denitrification. *Water Res.*, 15: 1135-1152.
- Vanrolleghem, P.A., Kong, Z., Rombouts, G. and Verstraete, W. (1994). An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 59: 321-333.
- Vanrolleghem, P.A., Spanjers, H., Petersen, B., Ginestet, P. and Takacs, I. (1999) Estimating (combinations of) Activated Sludge Model No.1 parameters and components by respirometry. *Water Sci Tech.* 39(1): 195-214.
- Volskay, V. and Grady, C. (1990) Respiration inhibition kinetic analysis. *Water Res.*, 24, 863-874.
- Weijers, S.R. (2000) Modelling, Identification and Control of Activated Sludge Plants for Nitrogen Removal. PhD thesis. Eindhoven University of Technology.
- Wanner, O., Kappeler, J. and Gujer, W. (1992) Calibration of an activated sludge model based on human expertise and on a mathematical optimization technique - A comparison. *Water Sci Tech.* 25(6): 141-148.
- Wentzel, M.C., Mbewe, A. and Ekama, G.A. (1995) Batch test for measurement of readily biodegradable COD and active organism concentrations in municipal waste waters. *Water SA*, 21, 117-124.
- Zhang, X., Hu, J., Spanjers, H., van Lier, J.B., (2014). Performance of inorganic coagulants in treatment of backwash waters from a brackish aquaculture recirculation system and digestibility of salty sludge. *Aquac. Eng.* 61: 9-16.