

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Milena M. Knežević

UKLANJANJE AZOTNIH JEDINJENJA IZ OTPADNIH  
VODA U DISPERZNIM SISTEMIMA

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
TECHNOLOGY AND METALLURGY FACULTY

Milena M. Knežević

REMOVAL OF NITROGEN COMPOUNDS FROM  
WASTEWATER IN DISPERSED SYSTEMS

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2015.

KOMISIJA

.....

**Prof. dr Dragan Povrenović, dipl.inž.**

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....

**Prof. dr Nevenka Bošković-Vragolović, dipl.inž.**

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....

**Prof. dr Vlada Veljković, dipl.inž.**

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet Leskovac

# UKLANJANJE AZOTNIH JEDINJENJA IZ OTPADNIH VODA U DISPERZNIM SISTEMIMA

## REZIME

U ovom radu ispitivana je mogućnost primene reaktora sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi za proces uklanjanja azota iz otpadne vode.

U cilju primene fontansko-fluidizovanog sloja sa centralnom cevi u procesu uklanjanja azota iz otpadne vode, analiziran je uticaj fluido-mehaničkih parametara sistema na zapreminski koeficijent prenosa mase. Istraživanja su izvođena u  $2D$  polukoloni ukupne visine  $1000\text{ mm}$ , poprečnog preseka centralne cevi  $50 \times 50\text{ mm}$  i anulusa  $50 \times 140\text{ mm}$ . Ispitivan je uticaj protoka tečnosti u intervalu  $3,5 - 4,5\text{ m}^3/h$ , protoka gasa od  $300 - 800\text{ L/h}$ , prečnika staklenih sferičnih čestica  $3, 4, 5$  i  $6\text{ mm}$ , kao i cirkulacije čestica kroz centralnu cev na zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika,  $k_L a$ . Rezultati ispitivanja su pokazali da cirkulacija čestica kroz centralnu cev, doprinosi povećanju  $k_L a$ , kao i povećanje prečnika čestica i ukupnih protoka vazduha i vode. Rezultati ispitivanja su pokazali da cirkulacija čestica kroz centralnu cev, doprinosi povećanju  $k_L a$ , kao i povećanje prečnika čestica i ukupnih protoka vazduha i vode.

U  $2D$  polukoloni sa centralnom cevi ispitivan je i uticaj protoka tečnosti na rast mikroorganizama i formiranje biofilma na plastičnim sferičnim nosačima, odnosno efikasnost uklanjanja azota iz sintetičke otpadne vode pri datim fluido-mehaničkim uslovima u sistemu. Ulazni protok tečnosti kroz mlaz je varirao od  $1,0$  do  $1,8\text{ m}^3/h$ , dok je ulazni protok tečnosti kroz anulus i protok vazduha održavan konstantnim na  $0,6\text{ m}^3/h$  i oko  $200\text{ L/h}$  respektivno.

Rezultati istraživanja su pokazali da sistem sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi može biti primenjen za proces uklanjanja azota iz otpadne vode, uz dostizanje visoke efikasnosti. Sprovedena eksperimentalna istraživanja su pokazala i da je hidrodinamika sistema jedan od ključnih parametara u kontroli mikrobiološkog procesa u tretmanu otpadnih voda.

*Ključne reči:* trofazni sistem, fontansko-fluidizovani sloj, zapreminski koeficijent prenosa mase, cirkulacija čestica, biofilm, nitrifikacija, parcijalna nitrifikacija, otpadna voda.

Naučna oblast: Tehnologija prečišćavanja otpadnih voda

Uža naučna oblast: Inženjerstvo zaštite životne sredine

UDK 663.14.031.3:628.3:541.182

# REMOVAL OF NITROGEN COMPOUNDS FROM WASTEWATER IN DISPERSED SYSTEMS

## SUMMARY

In this work the possibility of using spout-fluid bed with a draft tube for removal of nitrogen compounds from wastewater was analyzed.

In order to apply a spout-fluid bed reactor with a draft tube for removal of nitrogen compounds from wastewater, the influence of fluid-mechanical parameters on volumetric mass transfer coefficient was analyzed. Experiments were carried out in a 1000 mm high 2D semi-column with a draft tube. The draft tube had a cross section of 50x50 mm<sup>2</sup> and the annular region of the reactor had a cross section of 50x140 mm<sup>2</sup>. The work described in this paper reports the influence of several fluid-mechanical parameters including liquid and gas flow rates, particle diameters and particle circulation on volumetric mass transfer coefficient,  $k_L a$ . The liquid flow ranged from 3,5– 4,5 m<sup>3</sup>/h and gas flow ranged from 300 to 800 L/h. The particles used were glass spheres with diameters of 3, 4, 5 and 6 mm. The experimental results have shown that particle circulation through the draft tube contributes to  $k_L a$  increase as well as the increase in the particle diameter, the gas and liquid flow rates.

The influence of liquid flow through a draft tube on microorganisms growth and biofilm formation on plastic carriers in a 2D semi-column was analyzed. The liquid inlet spout flow was varied from 1,0 to 1,8 m<sup>3</sup>/h, while the annulus inlet flow and air flow had constant values of 0,6 m<sup>3</sup>/h and 200 L/h respectively.

Experimental results showed that spout-fluid bed with a draft tube can be used for efficient removal of ammonium from wastewater. Also, results showed that hydrodynamic of the system is one of the main parameter to control biological wastewater treatment.

*Keywords:* three-phase system, spout-fluid bed, volumetric mass transfer coefficient, particle circulation, biofilm, nitrification, partial nitrification, wastewater treatment.

Scientific field: Technology of wastewater treatment

Field of Academic Expertise: Environmental Engineering

UDC 663.14.031.3:628.3:541.182

## SADRŽAJ

1. OTPADNA VODA	1
2. BIOLOŠKI TRETMAN OTPADNIH VODA	3
2.1. Kinetika mikrobiološkog rasta	10
3. PROCESI UKLANJANJA AZOTA IZ OTPADNIH VODA	15
3.1. Nitrifikacija	15
3.2. Denitrifikacija	25
3.3. Nekonvencionalni procesi uklanjanja azota iz otpadnih voda	29
4. BIOFILMOVI	33
4.1. Formiranje biofilma	33
4.2. Ekstracelularne polimerne supstance (EPS)	35
4.3. „Quorum sensing“	37
4.4. Aktivnost biofilma	38
4.5. Nosači biofilma	41
5. TIPOVI REAKTORA ZA PROCES UKLANJANJA AZOTA IZ OTPADNIH VODA	43
6. DISPERZNI SISTEMI	45
7. UKLANJANJE AZOTA U KOLONI SA PAKOVANIM SLOJEM KERAMIČKIH KUGLICA	47
7.1. Eksperimentalni sistem	47
7.2. Rezultati i diskusija	49
8. FONTANSKO-FLUIDIZOVANI SLOJ SA CENTRALNOM CEVI	53
8.1. Ispitivanje prenosa mase u fontansko-fluidizovanom sloju sa centralnom cevi	53
8.1.1. Eksperimentalni sistem	54
8.1.2. Rezultati i diskusija	57
8.2. Uklanjanje azota u trofaznom sistemu sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi	72
8.2.1. Eksperimentalni sistem	72
8.2.2. Rezultati i diskusija	75
8.2.3. Uklanjanje azota u pakovanom sloju	94
9. ZAKLJUČAK	97
LISTA SIMBOLA	98
LITERATURA	103

## 1. OTPADNA VODA

Voda koja je prošla kroz neki upotrebnii ciklus, koji je uzrokovao promene njenih fizičkih, hemijskih i bioloških karakteristika i učinio je štetnom po ljudsko zdravlje ili životnu sredinu, naziva se otpadna voda. Nakon tako izazvane promene, ona može da sadrži patogene mikroorganizme, nutrijente koji stimulišu rast akvatičnih biljaka, toksična jedinjenja ili jedinjenja koja potencijalno mogu biti mutagena ili kancerogena, kao i niz drugih zagađujućih materija. U zavisnosti gde nastaje, ona može biti sanitarna, industrijska ili komunalna otpadna voda.

Ranijih godina, pod otpadnom vodom se podrazumevala samo ona koja nastaje u domaćinstvima i stambenim objektima, da bi razvojem industrije, a pre svega hemijske, prehrambene i industrije metalnog kompleksa, rasla i potreba za tretmanom industrijskih otpadnih voda.

Konvencionalni postupak za tretman otpadnih voda, sve do kasnih 80-tih godina XX veka se sastojao samo od osnovne primarne i sekundarne obrade, to uključuje rešetke, peskolov, primarni taložnik, aeracioni bazen sa aktivnim muljem i sekundarni taložnik (*Povrenović i Knežević, 2013*). Može se reći da konvencionalni postupak predstavlja osnovu svih ostalih varijanti sistema za prečišćavanje otpadnih voda.

Da bi se bilo koja otpadna voda mogla tretirati na dovoljno efikasan način, neophodno je poznavati sastav i količinu komponenata koje se u njoj nalaze. Stoga su istraživanja u oblasti karakterizacije otpadnih voda postala sve značajnija, razvijene su nove tehnike za detekciju što manjih vrednosti koncentracija konstituenata kao i analize specifičnih zagađujućih materija i njihovog potencijalnog efekta na zdravlje ljudi i životnu sredinu. Veliki napredak u analitičkoj tehnici doprineo je razvoju mnogih sofisticiranijih instrumenata, pa zahvaljujući tome komponente otpadne vode mogu da se detektuju i u mikrogramima po litru ( $\mu g/L$ ), a u nekim slučajevima čak i u nanogramima po litru ( $ng/L$ ). Razvojem analitičkih metoda omogućeno je praćenje ponašanja konstituenata u otpadnoj vodi i njihov uticaj na performanse sistema i kvalitet efluenta. Međutim, tehnologije prečišćavanja otpadnih voda, odnosno uklanjanje prisutnih zagađujućih materija nije u koraku sa povećanom efikasnošću njihove detekcije. Neki polutanti, koji mogu biti detektovani i u veoma niskim koncentracijama, na žalost, ne mogu biti uklonjeni pomoću trenutno dostupnih tehnologija na ekonomski opravdan način.

Otpadna voda nakon prečišćavanja uglavnom se ispušta u recipijente. Osnovno pitanje je koji nivoi prečišćavanja moraju biti dostignuti kako bi se izbegle negativne posledice po ljudsko zdravlje i životnu sredinu? Ovo se propisuje posebnim pravilnicima i zakonskim aktima na državnom nivou, uz poštovanje i određenih međunarodno usvojenih normi.

Zagađujuće materije u otpadnim vodama mogu biti klasifikovane na više različitih načina. Na primer, one mogu biti klasifikovane prema njihovim fizičkim karakteristikama (rastvorene ili nerastvorene), prema hemijskim (organske ili neorganske), prema mogućnosti njihove izmene dejstvom mikroorganizama (biorazgradive ili bionerazgradive), prema njihovom poreklu (biološke ili antropogene), prema njihovom delovanju (toksične ili netoksične) itd.

Očigledno je da ove podele nisu striktno jer dolazi do njihovog preklapanja pošto u otpadnoj vodi može postojati rastvoren, biorazgradiv organski materijal kao i nerastvorni biorazgradiv organski materijal i tome slično. Bez obzira kakvo se zagađenje nalazilo u otpadnoj vodi posao inženjera za prečišćavanje otpadnih voda je da projektuje proces kojim će se ukloniti svo zagađenje iz otpadne vode na efikasan i ekonomičan način.

Tretman otpadnih voda može biti fizički, hemijski i biološki. Fizički tretman, kako samo ime kaže, se zasniva na zakonima fizike, poput operacije sedimentacije. Hemijski tretman je tretman u kom se striktno odigravaju hemijske reakcije, kao što je proces hemijske precipitacije, dok se u biološkom tretmanu koriste živi mikroorganizmi za uklanjanje ili transformaciju polutanata pomoću enzimi katalizovanih hemijskih reakcija.

U cilju dostizanja odgovarajućih nivoa prečišćavanja ovi procesi i operacije se koriste zajedno formirajući preliminarni, primarni, sekundarni, tercijarni i kvaterni tretman otpadnih voda.

U preliminarnom tretmanu iz otpadne vode se uklanjaju krupni i grubi predmeti koji mogu da oštete opremu. Primarnim tretmanom se pomoću mehaničkih i operacija prenosa mase uklanjaju materije koje se mogu procediti, flotirati, oksidovati i istaložiti. U sekundarnom tretmanu se koriste pre svega biološki procesi za uklanjanje organskih materija. Tercijarni tretman se koristi radi uklanjanja nutrijenata azota i fosfora, biološkim ili hemijskim procesima. Kvaterni tretman obuhvata procese i operacije za uklanjanje preostalog zagađenja kao i dezinfekciju vode.

Važni faktori koji utiču na odabir procesa i način njegovog izvođenja zavise od karakteristika postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda kao i pouzdanosti u dostizanju zahtevanih propisa. Promene koncentracije organskih materija, nutrijenata i drugih zagađujućih materija u influentu, utiču na promenu kvaliteta efluenta postrojenja za tretman otpadnih voda. Zbog ovakvih promena potrebno je da se projektuje takvo postrojenje koje će održavati koncentracije materija u efluentu na vrednostima koje zadovoljavaju propise.

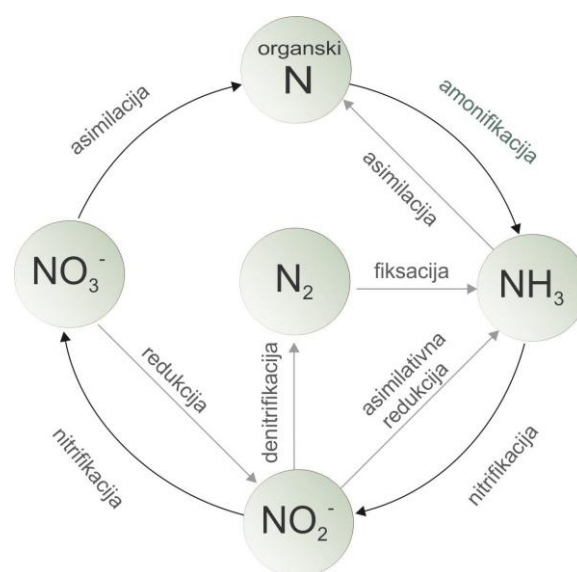


## 2. BIOLOŠKI TRETMAN OTPADNIH VODA

U otpadnim vodama se pored rastvorenih i partikulativnih zagađujućih materija nalazi veliki broj različitih vrsta mikroorganizama. Mešovita populacija mikroorganizama tokom svoje životne aktivnosti, rasta i razmnožavanja koristi znatan deo organskih i manji deo neorganskih materija iz otpadne vode. Oni biorazgradive materije transformišu i prevode u ugljen-dioksid ili gasoviti azot, vodu i gradivne materije za novostvorenu biomasu i na taj način vrše njihovo uklanjanje iz vode. Na ovoj mogućnosti mikroorganizama se zasniva biološki proces prečišćavanja otpadnih voda čiji je zadatak da optimizuje parametre procesa i obezbedi potrebne uslove za aktivnost aktera prečišćavanja.

Biološki proces prečišćavanja otpadnih voda se odlikuje nizom prednosti nad hemijskim tretmanom, troši se manja količina hemikalija, redukuje se količina nastalog mulja i manje se troši energije. Uklanjanje određenih zagađujućih komponenata iz otpadne vode je moguće ostvariti samo dejstvom određene mikrobiološke vrste, odnosno cilj biološkog tretmana može biti dostignut jedino prisustvom specifičnih mikrobioloških vrsta.

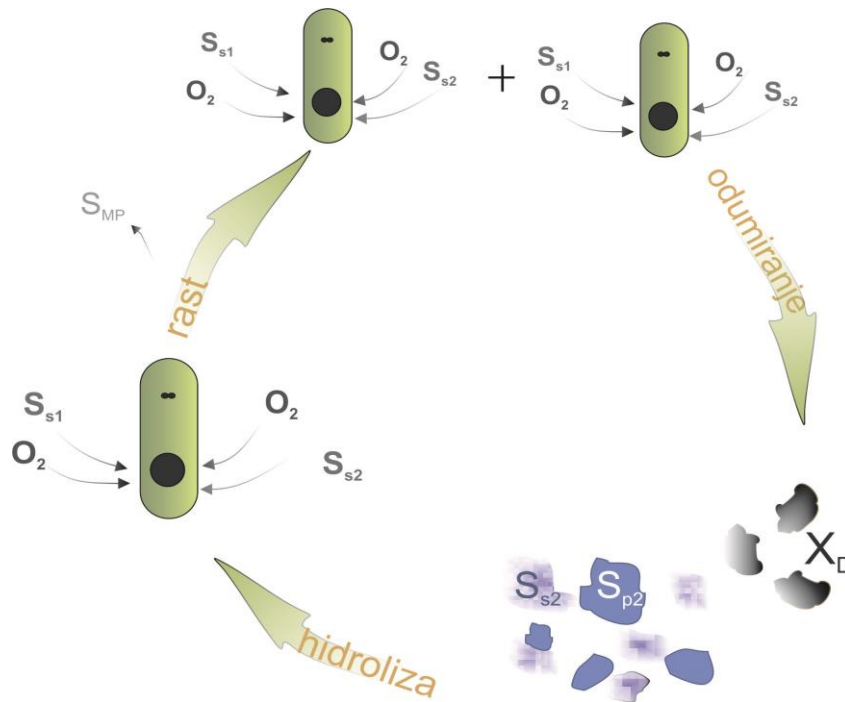
Prilikom projektovanja biohemijskog procesa prečišćavanja otpadnih voda, inženjeri koriste prirodne cikluse koji se u bioprocesu izvršavaju za mnogo kraće vreme nego što bi bilo potrebno da se oni izvrše u prirodi i to uglanom sa negativnim posledicama po životnu sredinu. Dva glavna ciklusa koja se koriste u biohemijskom tretmanu su ciklus ugljenika i ciklus azota. Zapravo većina biohemijskih procesa koristi samo polovinu ciklusa ugljenika, u koju spada oksidacija organskog ugljenika do ugljen dioksida. Druga polovina ciklusa ugljenika se koristi u biohemijskim procesima koji se zasnivaju na upotrebi algi i biljaka koje vezuju ugljen dioksid a oslobađaju kiseonik, međutim ovi procesi nisu mnogo rasprostranjeni (*Gradi i dr., 1999*). Ciklus azota se skoro ceo koristi u biohemijskom tretmanu, a šematski je prikazan na slici 2.1. Jedini korak u ciklusu azota koji se ne primenjuje u biohemijskim reakcijama je fiksacija azota u kojem se gasoviti azot konvertuje u oblik koji može biti upotrebljen od strane biljaka, životinja i mikroorganizama.



Slika 2.1. Ciklus azota u prirodi

U biohemijskom procesu prečišćavanja se prate četiri kategorije polutanata u otpadnoj vodi: rastvorene organske materije, nerastvorene (partikulativne) organske materije, rastvorene neorganske materije i nerastvorene neorganske materije. Većina zagađujućih materija u otpadnoj vodi čine organske materije, dok je najvažnija zagađujuća neorganska komponenta azot u obliku amonijaka. Bakterije jedino mogu da koriste i degradiraju rastvorenu organsku materiju male molekulske mase. Sve ostale organske materije moraju biti podvrgnute ekstracelularnim enzimima pomoću kojih se oslobađaju komponente malih molekulskih masa koje mogu biti transportovane preko ćelijske membrane. U sanitarnim otpadnim vodama, azot se nalazi u obliku amonijaka ( $NH_3$ ) i organskog azota, dok industrijske otpadne vode mogu da sadrže i nitrata ( $NO_3^-$ ). Organski azot se nalazi u obliku amino grupa ( $NH_2^-$ ) iz kojih se amonifikacijom oslobađa u obliku amonijaka. Oblik azota koji bakterije mogu da inkorporiraju tokom rasta je amonijak. Mikrobiološki proces razlaganja partikulativnih materija i organskih jedinjenja visokih molekulskih masa se naziva hidroliza. Reakcije hidrolize imaju dve glavne uloge u biohemijskim reaktorima za tretman otpadnih voda. Prvo, ove reakcije su odgovorne za rastvaranje ćelijskih komponenata koje nastaju kao rezultat odumiranja (raspadanja i lize) ćelija. Druga uloga reakcija hidrolize je u rastvaranju partikulativnog materijala koji se nalazi u otpadnoj vodi. Reakcija hidrolize je ključna u dostizanju željenog stepena biohemijskog prečišćavanja.

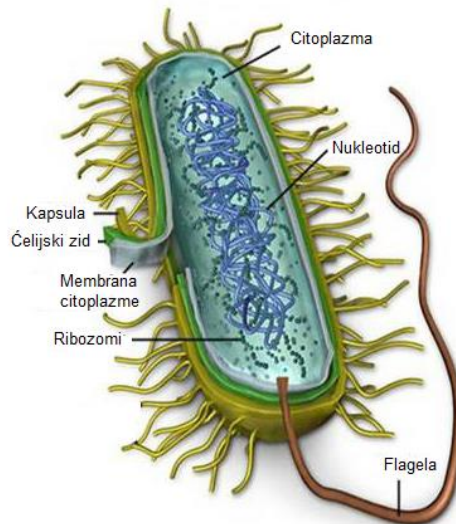
Zbir osnovnih dešavanja u aerobnom bioreaktoru koji prima rastvoreni supstrat ( $S_{s1}$ ) se može prikazati šematski na slici 2.2. Bakterija koristi supstrat i raste, stvarajući nove ćelije. Tokom upotrebe supstrata javljaju se i mikrobiološki produkti ( $S_{mp}$ ). Pored rasta i razmnožavanja bakterija u svakom bioreaktoru se dešava i proces odumiranja ćelija iz koga se oslobađa u medijum i rastvoreni ( $S_{s2}$ ) i partikulativni supstrat ( $S_{p2}$ ). Takođe odumiranjem bakterija nastaju i ćelijski ostaci ( $X_D$ ) koji se zbog veoma spore razgradnje smatraju bionerazgradivim u biohemijskim procesima. Partikulativni ćelijski fragmenti ( $S_{p2}$ ) podležu hidrolizi doprinoseći povećanju koncentracije rastvorenog supstrata ( $S_{s2}$ ) koji može biti korišćen od strane mikroorganizama. Prikazani koncept dešavanja u bioreaktoru sadrži osnovne elemente potrebne za modelovanje biološkog procesa koji je u realnosti mnogo kompleksniji i zahteva mnogo komplikovaniji koncept od prikazanog (*Gradi i dr., 1999*).



Slika 2.2. Elementarni koncept dešavanja u aeracionom bioreaktoru

Organizmi se mogu podeliti u tri osnovne grupe: arčea (*Archaea*), bakterije i eukarije (*Eucarya*). Arčee i bakterije su mikroskopski i prokariotski organizmi (ne poseduju nuklearnu membranu), dok su eukarije organizmi koji sadrže ćelijsku membranu i mogu da variraju u veličini od mikroskopske (protozoe) do makroskopske veličine (životinje).

Sa inženjerske tačke gledišta najvažniju ulogu imaju bakterije. Bakterija je jednoćelijski prokariotski organizam (slika 2.3). Unutrašnjost ćelije je ispunjena sa koloidnom suspenzijom proteina, ugljenih hidrata i ostalih kompleksnih organskih jedinjenja, koja se naziva citoplazma. Citoplazmatični deo sadrži ribonukleinsku kiselinu (*RNA*), čija je glavna uloga u sintezi proteina. Pored *RNA* u citoplazmi se nalazi i dezoksiribonukleinska kiselina (*DNA*) koja sadrži sve informacije neophodne za reprodukciju svih ćelijskih komponenata. Uglavnom se razmnožavaju binarnom deobom. Ključne ćelijske komponente su *DNK* i *RNK* ribozomi od kojih zavisi sposobnost mikroorganizama u procesu prečišćavanja otpadnih voda.



Slika 2.3. Građa prokariotske ćelije  
(micro.magnet.fsu.edu)

Prokariote se sastoje od 80% vode i 20% suve materije, od toga 90% suve materije je organsko, a 10% neorgansko. Veličina pojedinačne bakterije se kreće u opsegu 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$ . Empirijska opšte prihvaćena formula za organsku frakciju ćelije je  $C_5H_7O_2N$ . Relativni odnos elemenata prikazanih u formuli zavisi od tipa mikroorganizma, supstrata koji se koristi za energiju i ostalih dostupnih nutrijenata potrebnih za rast.

Mikroorganizmi da bi nastavili reprodukciju i da bi pravilno funkcionisali moraju da imaju izvor energije, ugljenik za sintezu novog ćelijskog materijala i neorganske elemente (nutrijente), kao što su azot, fosfor, sumpor, kalijum, kalcijum i magnezijum. Prokariote zahtevaju i metalne jone u tragovima ili mikronutrijente kao što su cink, mangan, bakar, molibden, gvožđe i kobalt. Ovi neophodni elementi za ćeliju moraju biti dostupni u okruženju i svaki nedostatak ovih supstanci će limitirati ili čak zaustaviti njihov rast.

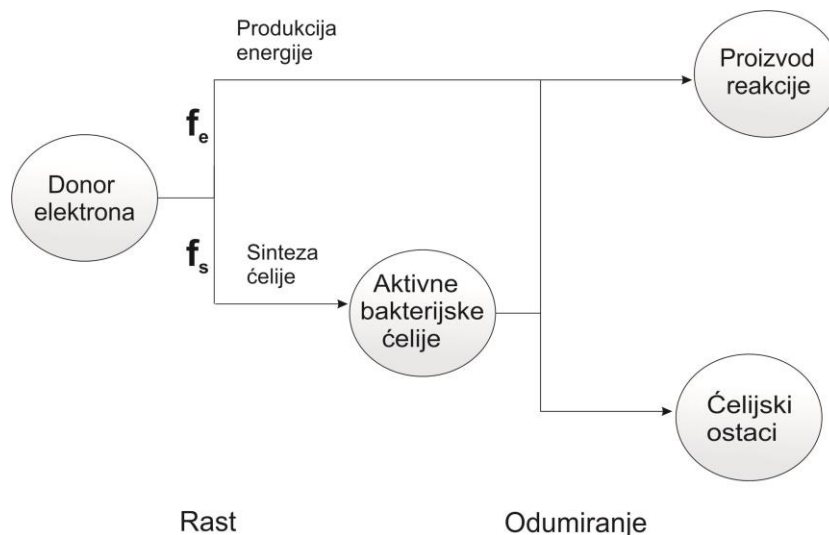
Kao i svi organizmi, bakterije dobijaju energiju oksidacijom hemijskih jedinjenja, tokom koje nastaju elektroni. Oksido-redukujuće reakcije uključuju prenos elektrona od elektron donora do elektron akceptora. Elektron donor se u reakcijama oksiduje, a elektron akceptor redukuje. U zavisnosti od mikroorganizma donori i akceptori elektrona mogu biti i organske i neorganske materije. Donorom elektrona se smatra energetski supstrat ili „hrana“ mikroorganizmima, odnosno jedinjenje koje sadrži ugljenik u redukujućem stanju (organska jedinjenja) ili neke druge elemente u redukujućem stanju (redukujuća neorganska jedinjenja, poput amonijaka, vodonika ili sulfida). Na Zemlji postoji nebrojano mnogo elektron donora za mikroorganizme. Suprotno tome, postoji samo nekoliko akceptora elektrona, kiseonik, nitrati, nitriti, gvožđe (III), sulfati i ugljen dioksid.

Dostupna energija iz supstrata zavisi od oksidacionog stanja u kom se nalazi, što ukazuje na količinu dostupnih elektrona koji nastaju oksidacijom tog supstrata. Visoko redukujuća jedinjenja sadrže više elektrona i imaju veću standardnu slobodnu energiju od visoko oksidovanih jedinjenja, bez obzira da li su organskog ili neorganskog tipa.

Metabolizam bakterija predstavlja sumu svih hemijskih procesa unutar ćelija. On se može podeliti na katabolizam koji uključuje sve oksidacione procese za dobijanje energije i anabolizam koji uključuje sve procese koji su uključeni u sintezu novih ćelijskih komponenata iz izvora ugljenika. Ćelije energiju potrebnu za rast i održavanje života mogu da dobijaju oksidacijom hemijskih jedinjenja (hemotrofi) ili preko fotosinteze (fototrofi). U katabolizmu hemotrofi mogu da oksiduju organsku materiju (hemoorganotrofi) ili neorgansku materiju (hemolitotrofi). U oba slučaja oslobođena energija se čuva prenošenjem elektrona preko nosioca elektrona poput *NADH* i formiranjem visoko energetske fosfatne veze poput *ATP*. Elektroni i visoko energetske formirane veze mogu dalje biti transportovani do drugih delova ćelije gde su potrebni za sintezu, održavanje ili kretanje ćelije.

Postoje dva osnovna tipa anabolizma, heterotrofni i autotrofni. Kod heterotrofnog anabolizma organska jedinjenja koja sadrže dva ili više ugljenikovih atoma predstavljaju glavni izvor ugljenika. Kod autotrofnog, neorganski ugljenik se koristi kao jedini i osnovni izvor ugljenika. Za stvaranje ćelijskih komponenata iz organskog jedinjenja potrebno je manje energije nego za sintezu ćelijskih komponenata iz neorganskog ugljenika. Konverzija neorganskog ugljenika, ugljen dioksida u ćelijski ugljenik se odvija reduktivnim procesima koji zahtevaju dodatni unos energije. Zbog toga autotrofi troše više energije za sintezu ćelijskih komponenata od heterotrofa, što za posledicu ima manji prinos ćelijske mase i sporiji rast.

Kada mikroorganizmi koriste supstrat- elektron donor za sintezu, deo njegovih elektrona  $f_e$  se odmah transportuje do elektron akceptora za stvaranje energije potrebne za konverziju druge frakcije elektrona  $f_s$  unutar mikrobiološke ćelije (slika 2.4). Suma udela elektrona  $f_e$  i  $f_s$  je 1. Ćelije takođe odumiru, zbog uobičajenog procesa održavanja ili prisustva predatora zbog čega se deo elektrona iz frakcije  $f_s$  transportuje do akceptora elektrona za stvaranje dodatne energije a drugi deo elektrona ostaje u neaktivnim ćelijskim ostacima.



Slika 2.4. Upotreba donora elektrona za stvaranje energije i sintezu

Stehiometrijske jednačine se uglavnom pišu u molarnim jedinicama, ali ih je za biohemijske procese pogodnije pisati u masenim jedinicama. Međutim, zbog toga što mikroorganizmi dobijaju energiju iz oksido-redukcionih jednačina u kojima se elektroni prevode od elektron donora do elektron akceptora, pogodnije je pisati jednačine u *COD* jedinicama (hemijska potreba za kiseonikom) koja predstavlja meru slobodnih elektrona za različite konstituente koji podležu promeni oksidacionog stanja. Za ovo je potrebno poznavati princip prevođenja stehiometrijskih jednačina u molarnim i masenim jedinicama u *COD* jedinice.

Reakcije mikrobiološkog rasta se sastoje iz dve komponente, jedne za sintezu i druge za dobijanje energije. Molarna stehiometrijska jednačina mikrobiološkog rasta se može dobiti objedinjavanjem tri tipa polureakcija: za ćelijski materijal ( $R_C$ ), za elektron donor ( $R_D$ ) i za elektron akceptor ( $R_A$ ) (McCarty, 1975).

Ukupna stehiometrijska jednačina predstavlja sumu ovih polureakcija:

$$R = R_D - f_e \cdot R_A - f_s \cdot R_C \quad (2.1)$$

Član  $f_e$  predstavlja udeo elektrona elektron donora koji se kupuju sa elektron akceptorom, tj. deo elektrona elektron donora koji se koriste za energiju, a član  $f_s$  udeo elektrona elektrodonora koji se koriste za sintezu. Ovo znači da svi elektroni koji potiču od donora elektrona završavaju u sintetizovanoj biomasi ( $f_e$ ) ili u akceptoru elektrona ( $f_s$ ).

Pored tipa donora elektrona druga važna karakteristika bakterija je tip akceptora elektrona. Tri glavna tipa akceptora elektrona su kiseonik, kao najvažniji, neorganske komponente i organske komponente. Ukoliko je kiseonik prisutan ili se uvodi u sistem u količinama koje nisu limitirajuće, onda se smatra da je sredina aerobna.

U aerobnoj sredini se postiže visok rast biomase po jedinici uklonjene zagađujuće materije. U anaerobnim sredinama krajnji akceptor elektrona su poput ugljen dioksida i sulfata. Pod ovakvim uslovima osvtaruje se manje efikasan rast biomase. Ukoliko su nitrati ili nitriti prisutni u sredini bez prisustva kiseonika i služe kao krajnji akceptori elektrona onda se ovakva sredina naziva anoksi. Rast mikroorganizama pod ovakvim uslovima je veći od rasta pod anaerobnim uslovima ali nije veći od rasta u aerobnim uslovima kada je prisutan kiseonik.

Prema prethodno navedenom biohemijski procesi se mogu podeliti na aerobne (u prisustvu kiseonika) i anaerobne procese (bez prisustva kiseonika). Unutar ovih granica mogu se odvijati procesi koji se više ili manje približavaju navedenim graničnim uslovima. Razlika ova dva osnovna procesa je u putevima biološke oksidacije organskih materija. U procesima prečišćavanja aerobni procesi su daleko više zastupljeni od anaerobnih procesa.

Aerobni postupci su pogodni za primenu kada je koncentracija biorazgradivog organskog zagađenja u otpadnoj vodi u opsegu od 50 do 4 000 *mg/L* u *COD* jedinicama. Za koncentracije niže od 50 *mg/L COD* ekonomičniji postupak od procesa sa aktivnim muljem je adsorpcija. Anaerobni tretmani se uglavnom koriste kao predtretman kod visokozagađenih otpadnih voda u kojima se koncentracija biorazgradivog *COD* kreće u opsegu od 4 000 do 50 000 *mg/L*.

Ukoliko je iz vode potrebno ukloniti zagađujuće materije čija je koncentracija veća od 50 000 *mg/L* onda se u tu svrhu kao najekonomičniji proces koristi isparavanje ili spaljivanje.

Biohemijski procesi se mogu podeliti i prema tipu reaktora u kojima se izvode, zbog toga što geometrija reaktora veoma utiče na efikasnost biohemijske transformacije. Bioreaktori za prečišćavanje otpadnih voda mogu se svrstati u dve glavne kategorije u zavisnosti od načina rasta mikroorganizama u njima: reaktori sa suspendovanim rastom mikroorganizama i reaktori sa mikroorganizmima imobilisanim na pogodnim nosačima.

U procesu suspendovanog rasta, mikroorganizmi odgovorni za prečišćavanje otpadne vode se održavaju u suspendovanom stanju ogovarajućim metodama mešanja. Većina procesa suspendovanog rasta se odvija u aerobnim uslovima, odnosno u prisustvu kiseonika. Najčešće korišćen proces suspendovanog rasta je proces sa aktivnim muljem, koga čine flokule u kojima se pored živih, aktivnih mikroorganizama, nalaze i odumrle ćelije, kao i organske i neorganske materije (biorazgradive i bionerazgradive) iz otpadne vode koja se prečišćava.

U reaktorima sa imobilisanom biomasom, kako sama reč kaže, mikroorganizmi u ovakvim reaktorima rastu zakačeni za čvrstu površinu radije nego slobodni u suspenziji. Površina za rast mikroorganizama može biti fiksirana u prostoru, preko koje u tankim slojevima protiče otpadna voda (biofilteri), potom se može rotirati oko ose krećući se kroz fluid (biodiskovi) ili površine za rast mikroorganizama mogu biti u obliku sitnih čestica koje se održavaju u suspenziji pomoću protoka fluida (fluidizovani slojevi).

Uspešnost svakog tipa biološkog procesa zahteva poznavanje mikroorganizama koji učestvuju u procesu, specifičnih reakcija koje oni obavljaju, faktora sredine koji utiču na njihove karakteristike, njihove potrebe za nutrijentima i kinetičke reakcije.

## 2.1. KINETIKA MIKROBIOLOŠKOG RASTA

Karakteristike bioloških procesa koji se koriste u tretmanu otpadnih voda zavise od dinamike korišćenja supstrata i mikrobiološkog rasta. Efikasan rad ovakvih sistema zahteva razumevanje bioloških reakcija koje se dešavaju i razumevanje osnovnih principa regulisanja rasta mikroorganizama. Veoma je važno poznavati sve faktore okruženja koje utiču na količinu iskorišćenog supstrata i rast mikroorganizama.

Svaki mikrobiološki proces se odvija određenom kinetikom, koja je određena vrednostima četiri kinetička parametra: maksimalna specifična brzina mikrobiološkog rasta,  $\hat{\mu}$ , konstanta zasićenja supstratom,  $K$ , prinos biomase,  $Y$ , koeficijent odumiranja mikroorganizama,  $b$ .

Vrednosti kinetičkih parametara ukazuju na brzinu korišćenja supstrata i rasta biomase i u funkciji su od karakteristika otpadne vode i mikrobiološke populacije. Kinetički parametri predstavljaju efekat mikrobiološke degradacije različitih konstituenata otpadnih voda.

U biološkim procesima, ćelijski rast se obavlja istovremeno sa oksidacijom organskih i neorganskih komponenata. Odnos količine proizvedene biomase i količine iskorišćenog supstrata (g biomase/g supstrata) predstavlja stvarni prinos biomase:

$$Y = \frac{\text{g proizvedene biomase}}{\text{g utrošenog supstrata}} \quad (2.2)$$

Zapravo, ove dve aktivnosti, rast biomase i korišćenje supstrata su proporcionalane, gde  $Y$  predstavlja faktor proporcionalnosti.

Matematički, brzina rasta ćelija može se prikazati jednačinom:

$$\frac{dX_a}{dt} = Y \left( -\frac{dS}{dt} \right) - b \cdot X_a \quad (2.3)$$

u kojoj  $dX_a/dt$  predstavlja neto brzinu rasta aktivnih mikroorganizama  $X_a$ ,  $-dS/dt$

brzinu potrošnje supstrata,  $b$  brzinu odumiranja mikroorganizama, a  $Y$  stvarni prinos biomase.

Vrednost stvarnog prinosa biomase zavisi od uslova sredine za rast, tipa akceptora elektrona,  $pH$ , temperature, karakteristika ugljenika i azota.



Prinos biomase po utrošenom supstratu se naziva „stvarni” kada se smatra da je sav utrošeni supstrat upotrebljen za sintezu novih ćelija. Međutim u biohemijskim procesima stvarna količina novoformirane biomase se izražava preko neto prinosa  $Y_n$ , koji je uvek manji od  $Y$  (Grady i dr., 1999). Ovako definisan  $Y_n$  predstavlja razliku između rasta nastalog iz utrošenog supstrata i odumiranja ćelija usled endogene respiracije ili prisustva predatora:

$$Y_n = \frac{dX_a/dt}{-dS/dt} = Y - b \frac{X_a}{\left(-\frac{dS}{dt}\right)} \quad (2.4)$$

Neto prinos je manji od stvarnog prinosa zbog toga što određeni udeo elektrona koji su na početku prisutni u supstratu mora biti utrošen za energiju održavanja života ćelije, jer mikroorganizmima nije potrebna energija samo za sintezu novih ćelija već i za održavanje života, pa se deo supstrata koristi i za ćelijske procese. Ukoliko u medijumu nije dostupna energija za odvijanje esencijalnih ćelijskih procesa, bilo mehaničkih (pokretljivost, osmotska regulacija, molekularni transport, održavanje jonskog gradijenta) ili hemijskih (proces koji su u vezi sa resintezom struktura poput ćelijskog zida, flagela, ćelijske membrane i kataboličkog aparata), ćelija počinje da koristi unutrašnje izvore energije, odnosno otpočinje endogeni metabolizam. Nakon iscrpljivanja i unutrašnjih izvora energije, ćelija postaje dezorganizovana i umire.

Kada je brzina potrošnje supstrata po jedinici mase ćelija veoma mala, desna strana jednačine 2.1.3 postaje jednaka nuli, pa je i neto prinos  $Y_n$  jednak nuli. Tada se supstrat koristi samo za održavanje ćelije. Pod ovakvim uslovima energija za održavanje života  $m$  je jednaka:

$$Y_n = 0, \quad \frac{-dS/dt}{X_a} = \frac{b}{Y} = m \quad (2.5)$$

Takođe postoji dosta razloga koji doprinose razlici vrednosti  $Y_n$  i  $Y$ , poput prisustva predatorskih mikroorganizama. Pored toga postoji i proces koji takođe dovodi do gubitka biomase u sistemu a to je liza ćelije (engl. „cell lysis”) (Mason i dr., 1986). Rast bakterije zahteva povezanost između biosinteze i deljenja ćelijskog zida da bi se omogućio rast i deoba ćelije. Enzimi odgovorni za hidrolizu ćelijskog zida su pod strogom regulacijom da bi se omogućilo njihovo delovanje sa enzimima za biosintezu tokom deobe ćelije. Ukoliko se izgubi ova regulacija doći će do oštećenja ćelijskog zida (liza) i smrti organizma. Kada dođe do oštećenja ćelije tada se citoplazma i ostali unutrašnji konstituenti oslobađaju u medijumu i ponašaju se kao supstrat za rast ostalih organizama u zajednici. Ćelijski zid i ćelijska membrana kao i ostali strukturni elementi, pod dejstvom hidrolitičkih enzima u medijumu postaju rastvoreni i tako dostupni aktivnim ćelijama kao supstrat. Jedino mali deo ćelije, nazvanim ćelijski ostaci se veoma sporo rastvaraju pa se u većini biohemijskih procesa smatraju bionerazgradivim. Kada se sumira navedeno vidi se da aktivne, vijabilne bakterije odgovorne za konverziju supstrata čine samo jedan deo biomase u sistemu.

Makroskopski gledano, nemoguće je razlikovati veliki broj faktora ovog tipa koji utiču da neto prinos ima manju vrednost od stvarnog prinosa biomase po utrošenom supstratu, pa su u inženjerskoj praksi svi oni objedinjeni pod jednim nazivom „mikrobiološko raspadanje“ (engl. „*microbial decay*“) (Lawrence and McCarty, 1970).

Smatralo se da eksponencijalni rast bakterija može biti moguć samo ako su svi nutrijenti, uključujući i supstrat prisutni u visokim koncentracijama. Međutim, ranih 1940. godina, ustanovilo se da bakterije mogu da rastu eksponencijalno i ako je jedan nutrijent prisutan u ograničenim količinama.

Vrednost specifične brzine rasta  $\mu$ , upravo zavisi od koncentracije tog limitirajućeg nutrijenta, koji može biti izvor ugljenika, elektron donor, elektron akceptor, azot ili neki drugi faktor koji je potreban za rast organizama. Ovakav pristup se smatra osnovnim konceptom mikrobiološke kinetike (Fenel, 1966).

Jednačina sa istorijskim prednjačenjem i najvećom prihvatanošću je Monodova jednačina:

$$\mu_{syn} = \left( \frac{1}{X_a} \frac{dX_a}{dt} \right) = \hat{\mu} \frac{S}{K+S} \quad (2.6)$$

Koeficijent zasićenja supstratom,  $K$ , pokazuje koliko se specifična brzina rasta  $\mu_{syn}$  koja je u vezi sa sintezom ćelije, približava maksimalnoj specifičnoj brzini rasta  $\hat{\mu}$ . Što je niža vrednost ovog koeficijenta, pri nižoj koncentraciji supstrata će se  $\mu_{syn}$  približavati  $\hat{\mu}$ .

Monodova jednačina predstavlja elementarnu jednačinu na osnovu koje su se razvile ostale jednačine za izračunavanje specifične brzine rasta mikroorganizama kada je u otpadnim vodama prisutna inhibitorna supstanca (Andrews, 1968; Han i Levenspiel, 1988), za komplementarne i zamenljive nutrijente (Bader, 1982; Baltzis i Fredrickson, 1988; Sinclair i Ryder, 1975; Sykes, 1973) itd.

Veliki broj kompleksnih dešavanja u sistemu utiče da vrednost neto prinosa u biohemijском procesu bude niža od stvarnog prinosa. Zbog toga je veoma nepouzđano da se svi oni uvrste u kinetičke modele zbog njihove kompleksnosti, pa se u inženjerskoj praksi koriste pojednostavljeni modeli. Prema tome brzina raspadanja odnosno odumiranja mikroorganizama,  $b$ , objedinjuje sve faktore koji su u vezi sa gubitkom biomase odnosno smrti ćelije:

$$\mu_{dec} = \left( \frac{1}{X_a} \cdot \frac{dX_a}{dt} \right)_{dec} = -b \quad (2.7)$$

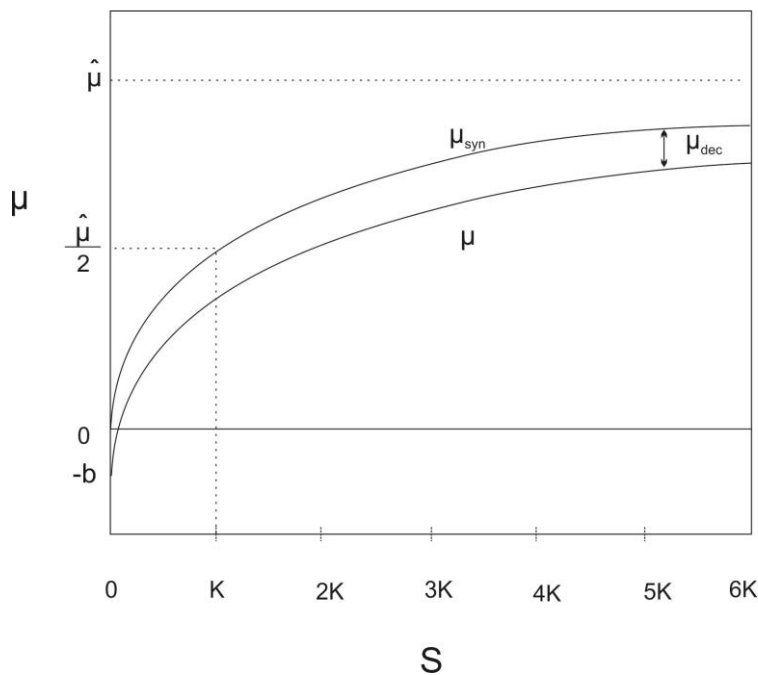
Međutim, sva aktivna biomasa izgubljena endogenim raspadanjem se ne oksiduje za dobijanje energije za održavanje života. Najveći deo odumrle ćelije je podložan oksidaciji dok manji deo ostaje kao inertan. Brzina oksidacije se može prikazati sledećom jednačinom:

$$\left( \frac{1}{X_a} \cdot \frac{dX_a}{dt} \right)_{dec} = -f_d b \quad (2.8)$$

Gde  $f_d$  predstavlja biorazgradivu frakciju aktivne biomase. Brzina nastajanja inertnog dela biomase predstavlja razliku između ukupne brzine raspadanja i brzine oksidacije biorazgradivog dela:

$$-\frac{1}{X_a} \frac{dX_i}{dt} = \left( \frac{1}{X_a} \cdot \frac{dX_a}{dt} \right)_{inert} = -(1 - f_d)b \quad (2.9)$$

Na slici 2.5. je prikazano kako  $\mu$  varira sa koncentracijom supstrata  $S$  i da je  $\mu = \hat{\mu}/2$  kada je  $K = S$ .



Slika 2.5. Zavisnost specifične brzine rasta od koncentracije supstrata (Rittmann i McCarty, 2001)

Na kraju se specifična brzina rasta mikroorganizama,  $\mu$ , može predstaviti kao suma rasta i odumiranja, raspadanja biomase.

$$\mu = \frac{1}{X_a} \cdot \frac{dX_a}{dt} = \mu_{syn} + \mu_{dec} = \hat{\mu} \frac{S}{K+S} - b \quad (2.10)$$

Slika 2.5 takođe prikazuje da  $\mu$  može da ima i negativnu vrednost za veoma niske koncentracije supstrata,  $S$ .

Sa aspekta prečišćavanja otpadnih voda, odnosno cilja uklanjanja supstrata nameće se jedan od takođe važnih parametara procesa, a to je brzina potrošnje supstrata,  $r_{ut}$ . Prema ovome, Monodova jednačina dobija oblik:

$$r_{ut} = \frac{\hat{q}S}{K+S} X_a \quad (2.11)$$

u kojoj  $\hat{q}$  predstavlja maksimalnu specifičnu brzinu potrošnje supstrata.

Potrošnja supstrata i rast biomase su povezani preko jednačine:

$$\hat{\mu} = \hat{q}Y \quad (2.12)$$

Neto brzina rasta je:

$$r_{net} = Y \frac{\hat{q}S}{K+S} X_a - bX_a \quad (2.13)$$

odnosno, specifična brzina rasta mikroorganizama je:

$$\mu = \frac{r_{net}}{X_a} = Y \frac{\hat{q}S}{K+S} - b \quad (2.14)$$

### 3. PROCESI UKLANJANJA AZOTA IZ OTPADNIH VODA

Pred kraj XX veka uklanjanje nutrijenata, azota i fosfora iz otpadnih voda vršilo se samo u specijalnim slučajevima kada je indentifikovan veliki uticaj nutrijenata na kvalitet vode. Biološko uklanjanje nutrijenata (*Biological nutrient removal, BNR*), predstavljalo je inovativni poces za poboljšanje tretmana otpadnih voda. Međutim, zbog obogaćivanja vode nutrijentima koje je dovelo do degradacije kvaliteta vode, proces uklanjanja nutrijenata je počeo da se ekstenzivno koristi u svim oblastima. Azot u obliku amonijaka je veoma toksičan za ribe i ostale vodene organizme jer utiče na smanjenje rastvorenog kiseonika i dovodi do pojave eutrofikacije vodenih površina.

Azot se iz otpadnih voda može ukloniti fizičko-hemijskim ili biološkim putem. U fizičko-hemijske postupke spadaju membranska filtracija, „stripping“ amonijaka, jonska izmena, hlorisanje do prevojne tačke, elektrodijaliza, precipitacija. Biološki procesi se zbog niza prednosti nad fizičko-hemijskim daleko više koriste za uklanjanje azota iz otpadnih voda.

Sanitarne otpadne vode sadže oko 30 – 40 mg /L azota. Neke otpadne vode sadrže visoke koncentracije ukupnog azota poput otpadne vode sa farmi svinja (600 – 4000 mg/L), procedne otpadne vode sa deponija (500 – 1000 mg/L) i otpadne vode nekih industrija poput industrije štavljenja kože (50 – 200 mg/L), klanična industrija (170 – 200 mg/L), industrija skroba (800 – 1100 mg/L), industrija pektina (1300 – 3000 mg/L), (*Stijn i dr., 2010*).

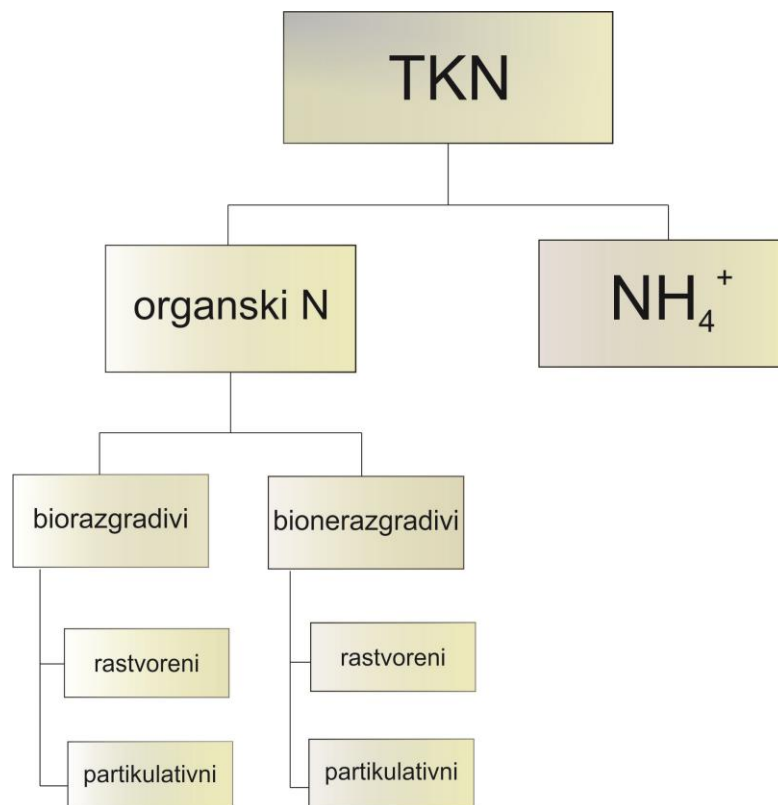
Intenzivnim istraživanjem mehanizma biološkog uklanjanja nutrijenata, ovaj deo procesa prečišćavanja je postao deo konvencionalnog postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Zbog velikog značaja uklanjanje nutrijenata u tretmanu otpadnih voda je postalo sastavni deo biološkog tretmana otpadnih voda i predmet je mnogih istraživanja u teorijskom i praktičnom smislu. Sistemi sa biološkim uklanjanjem nutrijenata predstavljaju najkomplikovanije biohemijske procese koji se koriste u tretmanu otpadnih voda i javljaju se u velikom broju različitih projektnih rešenja.

#### 3.1. NITRIFIKACIJA

Hemijski elementi, azot i fosfor predstavljaju esencijalne elemente za rast mikroorganizama, biljaka i životinja. Za biološki rast potrebni su i ostali elementi, ali su azot i fosfor nutrijenti od najvećeg značaja. Azot se inkorporira u ćelijsku biomasu u obliku proteina ili nukleinskih kiselina. U životnoj sredini azot se može naći u različitim jedinjenjima jer može posedovati različita oksidaciona stanja. U njegovom najnižem oksidacionom stanju –III, nalazi se u amonijum jonu i u organskim jedinjenjima, a s druge strane, azot u svom maksimalnom mogućem oksidacionom stanju +V, nalazi se u nitratnom jonu.

Uobičajeni i najvažniji oblici azota u otpadnoj vodi su amonijak ( $NH_3$ ,  $-III$ ), amonijum jon ( $NH_4^+$ ,  $-III$ ), azot kao gas ( $N_2$ ,  $0$ ), nitritni jon ( $NO_2^-$ ,  $+III$ ), nitratni jon ( $NO_3^-$ ,  $+V$ ).

Ukupni, tzv. Kjedalov azot (*TKN*) čine organski azot i amonijak, a ukupni azot u otpadnoj vodi pored Kjedalovog azota sadrži i nitrite i nitrate. Jedinjenja koja sadrže organski azot mogu biti biorazgradiva i bionerazgradiva, a obe ove forme mogu biti u rastvorenom ili partikulativnom obliku (slika 3.1). Biorazgradivi azot u rastvorenom obliku je direktno dostupan mikroorganizmima, dok partikulativni biorazgradivi deo, da bi postao dostupan mikroorganizmima mora prvo da hidrolizuje. Bionerazgradivi rastvoreni deo, kako sama reč kaže, nije razgradiv od strane biomase pa će u nepromenjenom obliku proći kroz ceo biološki tretman i kao takav se pojaviti u efluentu. Bionerazgradivi partikulativni deo azota se taloženjem izdvaja iz sistema, zajedno sa ostalim delom otpadnog mulja koji se sreće u procesu.



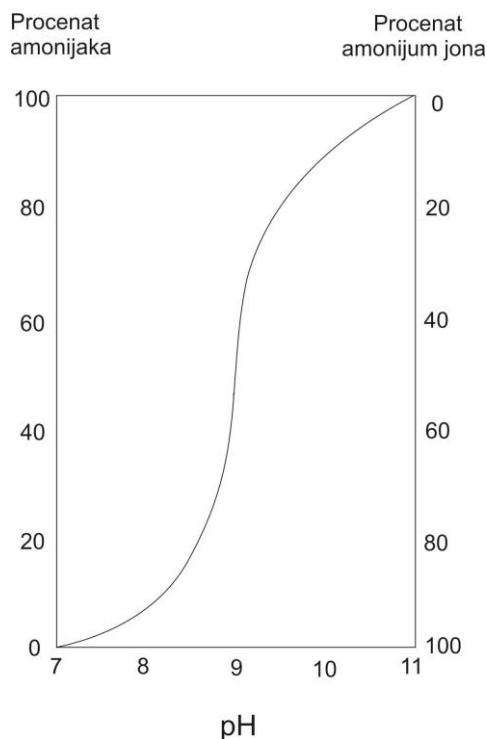
Slika 3.1. Prisustvo azota u otpadnoj vodi

Organska jedinjenja koja sadrže azot sastoje se od kompleksnih jedinjenja uključujući amino kiseline, proteine i ureu. Bakterije tokom rasta mogu da inkorporiraju u ćeliju samo azot u obliku amonijaka, odnosno, bakterije ne mogu direktno da koriste azot iz organske materije koja ga sadrži. Da bi azot iz kompleksnih organskih jedinjenja postao dostupan bakterijama neophodno je da se izvrši proces oslobađanja azota u obliku amonijaka iz kompleksnih organskih jedinjenja u otpadnu vodu. Ovaj proces se naziva *amonifikacija* i dešava se pod dejstvom heterotrofnih mikroorganizama. Amonifikacija je konverzija rastvorenog organskog materijala u amonijak koji se dešava kada bakterija konzumira rastvorenu organsku materiju koja sadrži azot. Amonijak se iz otpadne vode uklanja na dva načina. Prvo, koristi se za sintezu nove biomase, a kao drugo koristi se kao supstrat za autotrofnu biomasu.

Amonijak je toksičan za mikroorganizme ali brzo hidrolizuje u svoj netoksičan oblik, amonijum jon.



U zavisnosti od *pH* vrednosti vode, amonijak može biti prisutan u obliku amonijum jona ( $NH_4^+$ ) ili u obliku amonijaka ( $NH_3$ ). Kada je *pH* vrednost veća od 7, ravnoteža reakcije po jednačini 3.1. se pomera u desnu stranu, utičući na povećanje koncentracije amonijaka. Ukoliko je *pH* vrednost niža od 7 amonijum jon postaje dominantna vrsta, slika 3.2.



Slika 3.2. Konverzija amonijaka i amonijum jona u zavisnosti od *pH*, (Gerardi, 2002)

Bakterije asimiluju azot zbog njegovih nekoliko ključnih funkcija u ćeliji (gradivni materijal ćelije, gradivni materijal za enzime, transfer genetičkog materijala). Azot se u ćeliju može ugraditi samo u obliku amonijum jona jer se u tom jedinjenju azot nalazi u istom oksidacionom stanju kao i u ćeliji ( $-III$ ). Ukoliko amonijum jon nije prisutan već samo nitrati i nitriti, ćelija će biti primorana da njih koristiti kao izvor azota s tim što će prinos biomase u ovom slučaju biti manji jer je neophodna veća količina energije da bi se nitriti i nitrati redukovali u amonijum jon koji može biti upotrebljen. Manje vremena i energije će biti potrebno bakteriji da azot iz oksidacionog stanja  $+III$  (nitritni jon) prevede u oksidaciono stanje  $-III$ , nego iz oksidacionog stanja  $+V$  (nitrati jon) u  $-III$ .

Ukoliko otpadna voda sadrži amonijak u količinama većim od potrebnih za ćelijsku sintezu, može doći do nitrifikacionog procesa. Nitrifikacija je termin koji opisuje aerobni dvostepeni proces u kome se amonijum jon ( $NH_4^+$ ) oksiduje do nitrita ( $NO_2^-$ ), a potom se nitriti oksiduju do nitrata ( $NO_3^-$ ). Aerobne autotrofne bakterije imaju najveću ulogu u obavljanju procesa nitrifikacije. Nitrifikacija uključuje dve grupe autotrofnih bakterija.

U prvom stepenu nitrifikacije amonijak se oksiduje u nitrite pomoću bakterija *Nitrosomonas*, a u drugom stepenu nitriti se oksiduju u nitrata pomoću bakterija *Nitrobacter*. Uprkos činjenici da je navedeno preko sto heterotrofnih vrsta koje formiraju nitrata iz amonijaka, značajna količina nitrata u prirodnom sistemu se ne pripisuje heterotrofima. Zapravo zbog proizvodnje male količine energije tokom oksidacionih reakcija, autotrofne nitrifikacione bakterije su veoma efikasne u konvertovanju amonijum jona u nitrata. Bakterija *Nitrosomonas* je toliko efikasna da pojedinačna ćelija može da konvertuje količinu amonijum jona za koju bi trebalo milion heterotrofa. Prema tome nitrifikacione bakterije *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* su najznačajnije obligatne aerobne bakterije koje se koriste u biohemijским procesima uklanjanja azota iz otpadnih voda. Ove bakterije nisu patogeni mikroorganizmi i ne nalaze se u crevnom traktu ljudi. Nitrifikacione bakterije su autohtone u zemljištu i vodi.

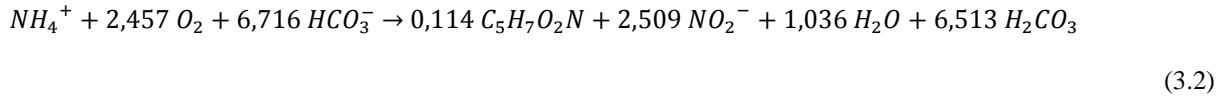
Glavna strukturna karakteristika ovih bakterija je citomembrana. Citomembrana predstavlja aktivno mesto za oksidaciju amonijum i nitritnih jona. Ovi joni se adsorbuju na površini citomembrane gde bivaju oksidovani pomoću enzima na površini citomembrane. Tokom oksidacije se stvaraju visoko energetske fosfatne veze, a nastali nitriti i nitrati se ispuštaju u vodu.

Uprkos činjenici da su nitrifikacione bakterije autotrofi ne znači da ne mogu da inkorporiraju u sebe i organski ugljenik. Međutim, količina organskog ugljenika koja se inkorporira je mala i zavisi od uslova rasta, pa se prilikom pisanja stehiometrijskih jednačina reakcije nitrifikacije ona zanemaruje i uzima se u obzir samo ugljen dioksid kao jedini izvor ugljenika. Ugljenik u ugljen dioksidu se nalazi u najvišem oksidacionom stanju pa je energija potrebna za rast autotrofnih bakterija znatno viša od energije potrebne za rast heterotrofa. Kao rezultat ovoga, dobija se mali prinos autotrofne biomase.

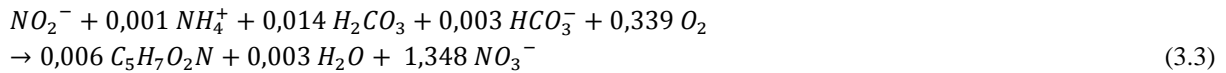


Količina energije koja je potrebna za ćelijsku sintezu zavisi od jedinjenja ugljenika i azota koji se koriste za rast. Primenom polureakcija i uobičajenog prinosa nitrifikacionih bakterija dobijaju se stehiometrijske jednačine za:

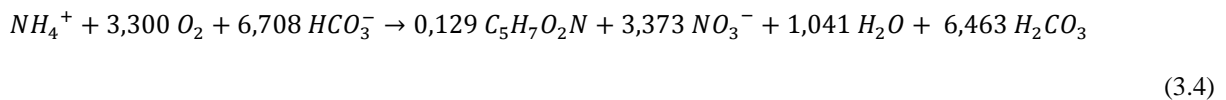
prvi stepen



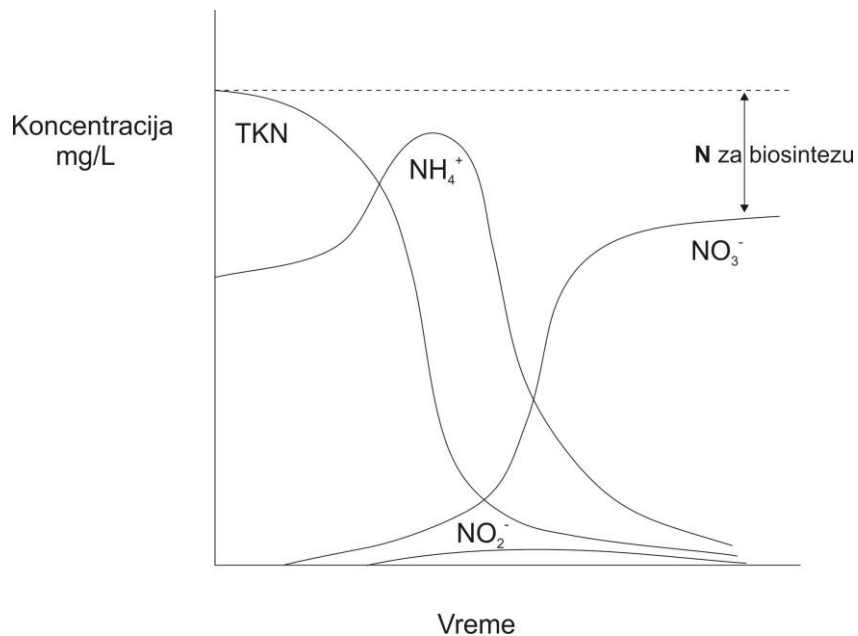
drugi stepen



ukupnu reakciju nitrifikacije



Postoji nekoliko intermedijara, poput hidroksilamina ( $NH_2OH$ ) koji se javljaju u nitrifikacionom procesu, međutim zbog njihovog kratkog veka se ne prikazuju u stehiometrijskim jednačinama. Na slici 3.3 je pokazan put konverzije azota tokom vremena u biološkom procesu.



Slika 3.3. Konverzija azota tokom vremena u biološkom procesu (Gerardi, 2002)

Kada otpadna voda uđe u sistem za prečišćavanje sa određenom koncentracijom *TKN* i amonijum jonom, prvo dolazi do amonifikacija *TKN* čiji je rezultat oslobađanje amonijum jona. Amonifikacija *TKN* je brži proces od uklanjanja amonijum jona, pa se u početku beleži povećanje koncentracije amonijum jona u sistemu. Nakon ovog povećanja koncentracija amonijum jona počinje da opada. Ovaj pad koncentracije je u vezi sa dva faktora. Prvo deo amonijum jona se troši kao nutrijent za biosintezu, a drugo, deo amonijum jona se oksiduje do nitrita. Ukoliko u sistemu vladaju adekvatni uslovi za odvijanje nitrifikacije, neće doći do akumulacije nitrita već će se nastaviti njihova oksidacija u nitrate. Vremenom kako opada koncentracija amonijum jona u sistemu koncentracija nitrata raste.

Na osnovu jednačine 3.4. vidi se da se tokom oksidacije amonijaka u nitrate troši velika količina alkaliteta izraženog kao  $HCO_3^-$  po uklonjenom  $NH_4^+$  u vrednosti  $6,708 \text{ mg } HCO_3^- / \text{ mg } NH_4^+$ , što je ekvivalentno sa  $8,62 \text{ mg } HCO_3^- / \text{ mg } NH_4^+ - N$  (ili  $7,14 \text{ g}$  alkaliteta kao  $CaCO_3$ ). Velika količina alkaliteta se troši zbog neutralizacije  $H^+$  jona koji nastaje tokom oksidacije, dok se samo mala količina alkaliteta inkorporira u ćelijsku masu. Ukoliko otpadna voda ne sadrži dovoljno alkaliteta, *pH* će pasti do nivoa koji će ugroziti aktivnost mikroorganizama.

Zbog održavanja optimalnog *pH* za nitrifikacione bakterije dodaju se alkalije koje sadrže bikarbonate ( $HCO_3^-$ ), karbonate ( $CO_3^{2-}$ ) ili hidrokside ( $OH^-$ ). Nitrifikacione bakterije preferiraju alkalije sa bikarbonatima. Dodatkom alkalija obezbeđuje se bakterijama i neophodan neorganski ugljenik ( $CO_2$ ). Autotrofne bakterije su osetljivije na promene *pH* od heterotrofnih.

Sve bakterije rastu veoma slabo izvan opsega *pH* od 6,0 do 8,0, a nitrifikacione bakterije pogotovo. Optimalne vrednosti *pH* za ovu vrstu bakterija se kreću u opsegu od 7,5 do 8,0. Pri višim vrednostima *pH* povećava se efikasnost odvijanja nitrifikacije što je u vezi sa boljim funkcionisanjem enzimskog sistema unutar bakterije. Ukoliko *pH* vrednost padne ispod 7 može doći do pada efikasnosti nitrifikacije zbog nedostatka ugljenika usled izdvajanja ugljen dioksida ( $CO_2$ ) (Wett i Rauch, 2002; Guisasola i dr., 2007).

Siegrist i Gujer (1987) su dali jednačinu zavisnosti specifične brzine rasta autotrofnih bakterija od *pH*:

$$\hat{\mu}_A = \hat{\mu}_{A0} \left[ 1 + 10^{(6,5-pH)} \right]^{-1} \quad (3.5)$$

Prikazane jednačine takođe pokazuju da su znatne količine kiseonika potrebne za proces nitrifikacije:  $3,30 \text{ mg } O_2 / \text{ mg } NH_4^+$  uklonjenog, što je ekvivalentno sa  $4,33 \text{ mg } O_2 / \text{ mg } NH_4^+ - N$  oksidovanog u nitrate. Od te ukupne količine potrebnog kiseonika,  $3,22 \text{ mg } O_2$  će biti upotrebljeno od strane bakterija *Nitrosomonas*, dok će  $1,11 \text{ mg } O_2$  biti upotrebljeno od strane bakterija *Nitrobacter*. Koncentracija potrebnog rastvorenog kiseonika za nitrifikacione bakterije može imati značajan uticaj na ukupnu količinu kiseonika potrebnog u biohemijskom procesu.

Autotrofne bakterije su mnogo osetljivije na koncentraciju rastvorenog kiseonika u otpadnoj vodi nego što su to heterotrofne bakterije. Koncentracije rastvorenog kiseonika oko  $2 \text{ mg/L}$  smatraju se dovoljnim za odvijanje nitrifikacije, dok u sistemima sa biofilmovima i veće koncentracije rastvorenog kiseonika u masi vode mogu biti nedovoljne usled limitirajuće difuzije kiseonika kroz biofilm. Efekat inhibicije niskim koncentracijama rastvorenog kiseonika je veći za *Nitrobacter* nego za *Nitrosomonas* bakterije. U ovakvim slučajevima odigrava se nepotpuna nitrifikacija koja za posledicu ima povećanu koncentraciju  $\text{NO}_2^-$  u efluentu. Pored činjenice da komunalne otpadne vode sadrže mnogo manju koncentraciju azota od biorazgradivog organskog materijala i da je u reaktorima za prečišćavanje otpadnih voda heterotrofna populacija u mnogo većoj količini od autotrofne zbog veće vrednosti maksimalne specifične brzine rasta, ove dve grupe bakterija zahtevaju skoro istu količinu kiseonika. Razlog je u velikoj promeni oksidacionog stanja azota (produkcija nitrata) i razlike u prinosu biomase ove dve grupe bakterija.

Takođe, iz stehiometrijske jednačine nitrifikacije se može videti da će biti formirana mala količina biomase što sledi na osnovu malog prinosa autotrofne biomase. Za svaki uklonjeni  $\text{mg NH}_4^+$  nastaje samo  $0,129 \text{ mg}$  nove biomase, što je ekvivalentno sa  $0,166 \text{ mg biomase/mg NH}_4^+ - \text{N}$ . Najveći deo prinosa biomase po uklonjenom amonijačnom azotu  $0,146 \text{ mg biomase/mg NH}_4^+ - \text{N}$ , činiće *Nitrosomonas*, a samo  $0,020 \text{ mg biomase/mg NH}_4^+ - \text{N}$ , će biti u vezi sa rastom *Nitrobacter*.

Rast nitrifikacionih bakterija će imati neznatan uticaj na količinu biomase u biohemijskim procesima, ali će pored toga imati veliki uticaj na količinu potrebnog kiseonika i alkaliteta.

Zbog autotrofne prirode nitrifikacionih bakterija, generalno se smatralo da organske materije deluju toksično na njih. Međutim, takav stav je osporen istraživanjima sa čistim (*Rittenberg, 1969*) i mešovitim (*Heukelekian, 1947; Hockenbury, 1977*) populacijama. Nitrifikacija može da se odvija adekvatnom brzinom i u prisustvu organskih materija ukoliko su ostali parametri sredine, a pre svega koncentracija kiseonika i  $\text{pH}$  odgovarajući, a čak se pokazalo da prisustvo organskih materija može i da pospeši nitrifikaciju (*Hockenbury, 1977*). Međutim, mora se voditi računa o optimalnom odnosu organskog i azotnog zagađenja,  $\text{COD/N}$ , jer postoje granične vrednosti ovog odnosa pri kojima dolazi do inhibicije procesa nitrifikacije. Vrednost odnosa  $\text{COD/N}$  pri kome dolazi do inhibicije nitrifikacionih bakterija zavisi od tipa ispitivanog sistema (*Ohashi i dr., 1995; Qingjuan i dr., 2008; Wosiack i dr., 2015; Ding i dr., 2012*). Uticaj odnosa  $\text{COD/N}$  na inhibiciju procesa prevođenja nitrita u nitrata je iskorišćen kod procesa nitrifikacije odnosno parcijalne nitrifikacije i denitrifikacije (*Regmi i dr., 2014*) radi smanjenja troškova aeracije i izvora ugljenika koji je potrebno dodati.

Takođe, u literaturi se tvrdilo da prisustvo heterotrofa u sistemu smanjuje aktivnost nitrifikacionih bakterija, a što se pokazalo kao netačno (*Blanc i dr., 1986; Hockenbury, 1977*). Efekat heterotrofa na autotrofe je indirektan, poput potrošnje kiseonika i promene  $\text{pH}$ , jer su autotrofi veoma osetljivi na ove parametre. Pravilnim projektovanjem sistema za prečišćavanje otpadnih voda, može se omogućiti da autotrofi i heterotrofi nesmetano obavljaju svoje aktivnosti.

Nitrifikacioni organizmi su osetljivi na širok opseg organskih i neorganskih jedinjenja u koncentracijama koje su mnogo niže od onih koje bi imale uticaj na aerobne heterotrofne organizme. U mnogim slučajevima se inhibitornost ispoljava kroz smanjenu brzinu oksidacije amonijaka u nitrite iako bakterija nastavlja da raste, dok se u nekim slučajevima inhibitornost ispoljava letalnim ishodom bakterije. Većina inhibitora nitrifikacije su jedinjenja koja sadrže helatne metale (*Hockenbury i dr., 1977*) i amino grupe (*Hockenbury i Grady, 1977*), a neka od njih su sposobna da utiču na smanjenje procesa nitrifikacije za 50% u koncentracijama nižim od 1,0 mg/L.

Ispitivanja su pokazala da je najslabija karika u nitrifikacionom lancu *Nitrosomonas* koja je mnogo osetljivija na organske inhibitore od *Nitrobacter*. Većina inhibitornih supstanci pokazuje nekompetitivnu inhibiciju, pa se u tom slučaju može upotrebiti jednačina:

$$\mu_A = \hat{\mu}_A \left( \frac{S}{K+S} \right) \left( \frac{K_I}{K_I+S_I} \right) \quad (3.6)$$

Iako većina inhibitora deluje na nekompetitivan način, postoje inhibitori poput metana i etilena koji deluju kao kompetitivni inhibitori (*Keener i Arp, 1993*). Razlog je što ova jedinjenja imaju sličnu veličinu molekula kao i amonijak, pa se direkto takmiče sa njim za aktivna mesta na enzimima koja iniciraju oksidaciju amonijaka.

Halogeni hidrokarbonati su nekompetitivni inhibitori, ali mnogi od njih reaguju sa enzimima stvarajući proizvode koji oštećuju ćeliju i na taj način deluju mnogo gore od jednostavne inhibicije. Slobodan amonijak i azotasta kiselina mogu da deluju inhibitorno ukoliko je visoka koncentracija azota u otpadnim vodama (*Anthonisen i dr., 1976*).

Smatra se da je glavni inhibitor nitrifikacije slobodan amonijak kada je  $pH > 8$ , a slobodna azotasta kiselina kada je  $pH < 7,5$ . U literaturi se mogu naći različite vrednosti koncentracija ova dva jedinjenja koja inhibiraju nitrifikacione bakterije. Neke predložene vrednosti koncentracije  $NH_3$  koja inhibira amonijak oksidujuće bakterije su 8 – 120 mg N/L, i nitrit oksidujuće bakterije 0,08 – 0,82 mg N/L, a inhibirajuće koncentracije  $NHO_2$  za amonijak oksidujuće bakterije iznose 0,2 – 2,8 mg N/L, i nitrit oksidujuće 0,06 – 0,83 mg N/L (*Anthonisen i dr., 1976*). Ovo ukazuje na postojanje kompleksne veze između koncentracije amonijaka i nitrita,  $pH$  i obe grupe nitrifikacionih bakterija. Ova međusobna povezanost parametara postaje veoma važna kada otpadne vode sadrže visoke koncentracije azota koje moraju biti tretirane.

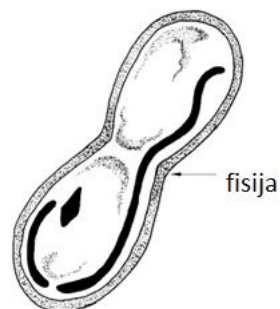
Temperatura može dvojako da deluje na biološke reakcije. Kao prvo, utiče na stopu odigravanja enzimsko katalizovanih reakcija, a kao drugo utiče na difuziju supstrata do ćelija. Oba ova slučaja nisu uvek prepoznatljiva i dovode do zabune u određivanju temperaturnog efekta. Stvarni temperaturni efekti bi uvek trebalo da se određuju direktno u ispitivanom sistemu. Temperatura je takođe kritičan parametar za nitrifikacioni proces jer su specifične brzine rasta nitrifikacionih bakterija niske i pri najboljim uslovima.

Rast ovih bakterija na temperaturama iznad 10 °C skoro da je direktno proporcionalan temperaturi, dok ispod 10 °C brzina rasta rapidno opada. Na temperaturama ispod 5 °C i iznad 45 °C rast ovih bakterija prestaje. Optimalna temperatura za nitrifikacioni proces je u opsegu od 28 do 32 °C. Uticaj temperature je veći na *Nitrobacter* nego na *Nitrosomonas* (Gerardi, 2002). Najveći uticaj temperatura ima na kinetičke parametre rasta  $\hat{\mu}_A$  i  $K_N$ . Sa porastom temperature vrednosti ova dva parametra rastu. Na osnovu poznatih parametara na određenoj temperaturi korišćenjem jednačine 3.7 mogu se dobiti vrednosti parametara na drugoj temperaturi, za odgovarajuće vrednosti temperaturnog korekcionog faktora  $\theta$ .

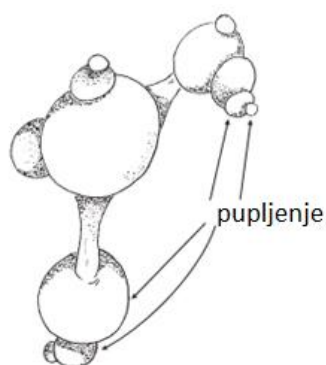
$$k_1 = k_2 \cdot \theta^{(T_1 - T_2)} \quad (3.7)$$

Nitrifikacione bakterije čine visoko specijalizovane grupe u koju spada ograničen broj rodova i vrsta pa je razlika u vrednostima kinetičkih parametara značajno manja nego što je slučaj kod heterotrofa. Maksimalna specifična brzina rasta za *Nitrosomonas* se nalazi između vrednosti 0,014 (Lawrence i McCarty, 1970) i 0,092 (Sharma i Ahlert, 1977)  $h^{-1}$ , dok se vrednost od 0,032  $h^{-1}$  smatra tipičnom na 20 °C (Rittmann i Snoeyink, 1984). Vrednost koeficijenta zasićenja amonijakom se nalazi u opsegu 0,06 – 5,6 mg N/L (Sharma i Ahlert, 1977), a generalno prihvaćena vrednost ovog koeficijenta iznosi 1,0 mg/L (Rittmann i Snoeyink, 1984). Maksimalna specifična brzina rasta za *Nitrobacter* je slična kao i za *Nitrosomonas* i nalazi se u opsegu 0,006 – 0,060  $h^{-1}$  (Lawrence i McCarty, 1970; Sharma i Ahlert, 1977), a za tipičnu vrednost se smatra 0,034  $h^{-1}$  (Rittmann i Snoeyink, 1984). Dobijene vrednosti za koeficijent zasićenja supstratom za *Nitrobacter* su malo više u odnosu na vrednosti za *Nitrosomonas*, a nalaze se u opsegu 0,06 – 8,4 mg  $NO_2^-$ /L, (Sharma i Ahlert, 1977) a kao tipična vrednost se smatra 1,3 mg/L (Rittmann i Snoeyink, 1984).

Amonijum oksidujuće bakterije, *Nitrosomonas*, se razmnožavaju binarnom fisijom, deljenjem na dva dela, (slika 3.4) i njihovo generaciono vreme se kreće od 8 do 36h, dok se generaciono vreme nitrit oksidujućih bakterija, *Nitrobacter*, koje se razmnožavaju pupljenjem (slika 3.5) kreće od 12 do 60h (Gerardi, 2002).



Slika 3.4. Razmnožavanje *Nitrosomonas* binarnom fisijom, (Gerardi, 2002)



Slika 3.5. Razmnožavanje *Nitrobacter* pupljenjem, (Gerardi, 2002)

Maksimalne specifične brzine rasta su mnogo niže kod autotrofa nego kod heterotrofa zbog činjenice da autotrofi moraju sve svoje ćelijske komponente da sintetizuju iz ugljen dioksida. Koeficijent zasićenja supstratom ima nižu vrednost kod autotrofa nego kod heterotrofa, pa zbog tako niskih vrednosti ovog koeficijenta proces nitrifikacije će se uglavnom odvijati kao reakcija nultog reda za širok opseg koncentracija amonijaka i nitrita.

Zbog niske vrednosti specifične brzine rasta veoma važan parametar u projektovanju biohemijskih procesa je srednje vreme zadržavanja ćelija (*SRT*). Ukoliko je *SRT* kraće od vremena potrebnog za rast ćelija može doći do gubitka autotrofne biomase iz sistema. U zavisnosti od tipa sistema u kome se odvija biološki proces prečišćavanja neophodno je determinisati adekvatnu vrednost *SRT* da bi se obezbedio stabilan rast bakterija.

Glavna razlika između rasta autotrofa i heterotrofa se ogleda u većoj osetljivosti autotrofa na koncentraciju rastvorenog kiseonika od heterotrofa. Vrednost koeficijenta zasićenja kiseonikom za obe grupe bakterija, *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*, se nalazi u opsegu 0,3 – 1,3 mg/L (Sharma i Ahlert, 1977). Ukoliko se u ispitivanom sistemu javlja otpor difuziji onda se vrednosti ovog koeficijenta nalaze bliže donjoj granici, odnosno vrednost koeficijenta zasićenja kiseonikom za *Nitrosomonas* iznosi 0,50 mg/L, a za *Nitrobacter* 0,68 mg/L.

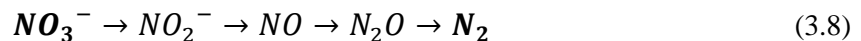
Industrijske otpadne vode, poput industrije mleka, za proizvodnju ribe i kože sadrže visok sadržaj soli pored visokog organskog i azotnog zagađenja. Biološko uklanjanje nutrijenata može da se odvija adekvatno pri limitiranim promenama u salinitetu. Poznato je da ukoliko dođe do osmotskog stresa u otpadnoj vodi dolazi i do promene mikrobiološke aktivnosti (Omil i dr., 1995). Amonijum oksidujuće bakterije (*AOB*) i nitrit oksidujuće bakterije (*NOB*) reaguju drugačije na promenu uslova okruženja, odnosno promenu saliniteta. *AOB* su mnogo otpornije na visoke koncentracije soli od *NOB* (Moussa i dr., 2006; Chen i dr., 2003). Pri visokim koncentracijama soli amonijum oksidujuće bakterije su sposobne da promene populacionu strukturu visoko otpornim vrstama na salinitet dok nitrit oksidujuće bakterije pri povećanju koncentracije soli ostaju inhibirane (Lorenzo i dr., 2015; Tak 2000).

U zavisnosti od tipa ispitivanog sistema inhibitorne koncentracije soli za proces nitrifikacije su iznosile 10 g/L (Bassin i sar., 2012; Uygur i Kargi, 2004; Tak, 2000), 15 g/L (Aslan i Simsek, 2012), 24,1 g/L (Lorenzo i dr., 2015).

### 3.2. DENITRIFIKACIJA

Kao što je u prethodnom poglavlju objašnjeno, procesom nitrifikacije azot u obliku amonijaka se preko nitrita prevodi u nitrati oblik. Ispuštanje vode koja sadrži nitrate u prirodne recipijente je manje štetno od ispuštanja vode koja sadrži amonijak, jer amonijak utiče na značajnu potrošnju rastvorenog kiseonika u vodi, isto kao i organska materija u njoj. Međutim, u pojedinim slučajevima ispuštanje nitrata takođe može da ima štetan efekat po vodoprijemnik, pa se zbog toga određenim standardima određuju dozvoljene koncentracije nitrata koje može da sadrži voda koja se ispušta u vodoprijemnik. Da bi se i ovaj moguć negativni efekat prekomerne koncentracije nitrata sprečio, na proces nitrifikacije se nadovezuje proces denitrifikacije koji predstavlja integralni deo biološkog uklanjanja azota iz otpadne vode. U poređenju sa nekim drugim alternativnim postupcima uklanjanja amonijaka, hlorovanjem ili procesom jonske izmene, biološko uklanjanje azota (nitrifikacija i denitrifikacija) je mnogo efikasniji proces koji se češće koristi.

Denitrifikacija predstavlja proces prevođenja nitrata u gasoviti azot (3.8) pod dejstvom heterotrofnih bakterija u anoksi uslovima, odnosno uslovima bez prisustva rastvorenog kiseonika.



Denitrifikacione bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Archromobacter*, *Bacillus*, su fakultativne heterotrofne bakterije i mogu da rastu i u aerobnim i u anoksi uslovima. Jedina razlika između aerobnog i anoksi rasta heterotrofa je u prirodni krajnjeg akceptora elektrona i njegovog uticaja na količinu *ATP*-a (adenozin trifosfata) koji se može generisati u ćeliji.

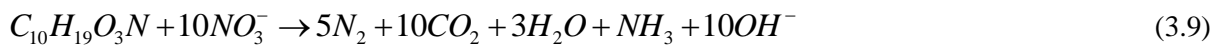
U aerobnim uslovima akceptor elektrona je kiseonik, a u anoksi uslovima akceptori elektrona su nitrati.

Cilj aerobnog procesa je da se akceptor elektrona dodaje da bi se uklonilo organsko zagađenje u otpadnoj vodi, dok je cilj anoksi procesa obrnut, dodaje se organski supstrat (donor elektrona) da bi se uklonio akceptor elektrona.

Mogućnost za odigravanje denitrifikacije postoji u svakom bioreaktoru u kom vladaju adekvatni uslovi za ovaj proces, a to su: niska koncentracija kiseonika, visoka koncentracija nitrata i prisustvo organske materije kao donora elektrona.

Donor elektrona može biti organska materija iz otpadne vode i eksterni izvor donora elektrona poput metanola ili acetata. Reakcije oksidacije u zavisnosti od donora elektrona su sledeće:

Otpadna voda:

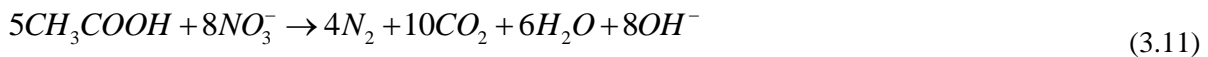


Izraz  $C_{10}H_{19}O_3N$  se obično koristi za predstavljanje biorazgradive organske materije u otpadnim vodama.

Metanol:



Acetat:



Iz reakcije denitrifikacije u kojoj je donor elektrona organska materija u otpadnoj vodi uočava se proizvodnja 3,57 g alkaliteta (kao  $CaCO_3$ ), po g redukovanog nitrata. Pozivajući se na podatak da se u nitrifikacionom procesu troši 7,14 g alkaliteta (kao  $CaCO_3$ ) za svaki g oksidovanog  $NH_4^+ - N$ , uočava se jedna od prednosti procesa denitrifikacije da se oko polovine količine utrošenog alkaliteta u procesu nitrifikacije može nadoknaditi u fazi denitrifikacije.

Ovo ukazuje da se kombinovanjem procesa nitrifikacije i denitrifikacije manje koristi hemikalija za održavanje alkaliteta odnosno pH na željenoj vrednosti za uspešno odvijanje procesa uklanjanja azota iz otpadne vode.

Pomoću oksido-redukcionih polu-reakcija, može biti izračunat ekvivalent kiseonika upotrebom nitrata ili nitrita kao akceptora elektrona:

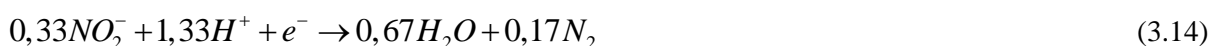
Za kiseonik:



Za nitrat:



Za nitrit:





Poređenjem polu-reakcija za kiseonik i nitrata, uočava se da je 0,25 *mola* kiseonika ekvivalentno sa 0,2 *mola* nitrata za transfer elektrona u oksido - redukciji. Ukoliko se ekvivalent kiseonika za nitrata ( $0,25 \cdot 32 \text{ gO}_2/\text{molu}$ ) podeli sa ekvivalentnim gramima nitrata ( $0,20 \cdot 14 \text{ g N/molu}$ ), dobija se vrednost od  $2,86 \text{ gO}_2/\text{gNO}_3^- - \text{N}$ . Korišćenjem nitrata kao krajnjeg akceptora elektrona za uklanjanje organskog zagađenja u procesu denitrifikacije smanjuje se ukupna količina potrebnog kiseonika za proces uklanjanja azota. Ukoliko su nitriti akceptori elektrona, računanjem na sličan način kao predhodni, dobija se da je ekvivalent kiseonika za nitrite  $1,71 \text{ g O}_2 / \text{g NO}_2^- - \text{N}$ .

Ekvivalent kiseonika je važan podatak pri računanju ukupne potrebe za kiseonikom u nitrifikaciono-denitrifikacionom biološkom procesu.

Prisustvo rastvorenog kiseonika u toku procesa denitrifikacije može da dovede do inhibicije redukcije nitrata represijom enzima za redukciju nitrata. Odnosno, denitrifikacione bakterije preferiraju aerobnu respiraciju za razgradnju *BOD*, pa će u prisustvu koncentracije kiseonika veće od  $1 \text{ mg/L}$  denitrifikacione bakterije aktivirati enzimski mehanizam za upotrebu molekuskog kiseonika, a deaktiviraće enzimski mehanizam za upotrebu nitrita ili nitrata.

Jedan od važnih parametara procesa denitrifikacije je količina biorazgradivog organskog materijala (*COD* ili *BOD*) koju je potrebno dodati kao donore elektrona da bi se uklonila prisutna količina nitrata. Donori elektrona mogu biti biorazgradive organske materije koje dolaze sa otpadnom vodom ili egzogeni izvori metanola ili acetata.

Prema nekim izvorima, potrebno je  $3 \text{ g BOD}$  za uklanjanje  $1 \text{ g}$  redukovanog  $\text{NO}_3^-$  (Gerardi, 2002), zapravo prava vrednost će zavistiti od operativnih uslova sistema i od vrste upotrebljenih donora elektrona u procesu denitrifikacije. Za svaki tip otpadne vode i sistem u kome se odvija biološka denitrifikacija neophodno je eksperimentalnim putem odrediti optimalni odnos *C/N*.

Ono o čemu se mora voditi računa prilikom izvođenja nitrifikacije i denitrifikacije je proizvodnja  $\text{N}_2\text{O}$  gasa. Azotsuboksid se smatra veoma značajnim gasom staklene bašte čiji je efekat na globalno zagrevanje za 300 puta veći od efekta ugljen dioksida (Ravishankara i dr., 2009; IPCC, 2007). Autotrofna nitrifikacija i heterotrofna denitrifikacija su indentifikovani kao glavni emiteri ovog gasa, iako put njegovog nastajanja nije u potpunosti jasan (Wunderlin i dr., 2010; Wunderlin i dr., 2013). Pored  $\text{N}_2\text{O}$  može biti emitovan i *NO* koji je toksičan za mikroorganizme (Zumft, 1993) i takođe doprinosi razaranju ozonskog omotača u stratosferi (Crutzen, 1979).

Smatra se da na produkciju  $\text{N}_2\text{O}$  utiče oksidacija intermedijara hidroksilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) usled neizbalansirane aktivnosti amonijum oksidujućih bakterija (*AOB*) (Yu i dr., 2010), hemijsko razlaganje hidroksilamina, hemijska oksidacija hidroksilamina pomoću  $\text{NO}_2^-$  kao akceptora elektrona (Stüven i dr., 1992), akumulacija nitrita (Ahn i dr., 2011), niska vrednost koncentracije kiseonika, niska temperatura, neizbalansiran odnos *COD/N* (Sun i dr., 2013).

Tokom konvencionalnog procesa uklanjanja azota, nitrifikacija/denitrifikacija, nastaju različita jedinjenja azota prikazana u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Jedinjenja azota koja nastaju tokom nitrifikacije i denitrifikacije

<b>Jedinjenje azota</b>	<b>Hemijska formula</b>	<b>Oksidaciono stanje N</b>
Nitratni jon	$NO_3^-$	+V
Nitritni jon	$NO_2^-$	+III
Azotmonoksid	$NO$	+II
Nitroksil	$NOH$	+I
Azotsuboksid	$N_2O$	+I
Molekulski azot	$N_2$	0
Hidroksilamin	$NH_2OH$	-I
Amonijak	$NH_3$	-III
Amonijum jon	$NH_4^+$	-III

Ceo proces transformacije azota u otpadnim vodama, se sastoji od procesa amonifikacije, sinteze, nitrifikacije i denitrifikacije.

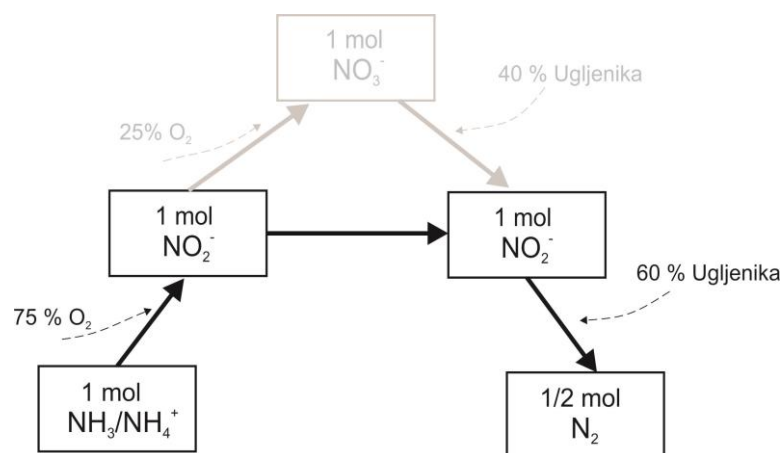
Konvencionalni postupak uklanjanja azota iz otpadnih voda, nitrifikacija-denitrifikacija, se odlikuje visokom efikasnošću uklanjanja azota, visokom stabilnošću i pouzdanošću procesa, relativno lakom kontrolom procesa i srednjim troškovima (*Van Hulle i dr., 2010*).

### 3.3. NEKONVENCIONALNI PROCESI UKLANJANJA AZOTA IZ OTPADNIH VODA

Za uklanjanje azota iz otpadnih voda pored konvencionalnih procesa nitrifikacije i denitrifikacije razvili su se noviji mikrobiološki postupci čija je upotreba karakteristična za visoko opterećene otpadne vode azotom. U novije mikrobiološke postupke spada: parcijalna nitrifikacija, SHARON, CANON, OLAND, ANAMMOX.

#### PARCIJALNA NITRIFIKACIJA

Parcijalna nitrifikacija (nitritacija) je proces prevođenja amonijum jona u nitrite ali ne i u nitrate. Da bi se postigla parcijalna nitrifikacija neophodno je sprečiti oksidaciju nitrita u nitrate. Najvažniji parametri sredine da bi se omogućio proces parcijalne nitrifikacije su koncentracija rastvorenog kiseonika, koncentracija slobodnog amonijaka ( $NH_3$ ) i slobodne azotaste kiseline ( $HNO_2$ ), temperatura i  $pH$ . Zbog različite osetljivosti bakterija koje oksiduju amonijak u nitrite i bakterija koje oksiduju nitrite do nitrata, podešavanjem ovih parametara se može omogućiti odigravanje parcijalne nitrifikacije. Bakterije koje oksiduju nitrite do nitrata su mnogo osetljivije na nepogodne uslove sredine od bakterija koje oksiduju amonijak do nitrita, pa se kao rezultat toga javlja akumulacija nitrita u sistemu. Hidroksilamin i hlorati mogu takođe da inhibiraju nitrit oksidujuće bakterije ali ne i amonijak oksidujuće bakterije. Parcijalna nitrifikacija može da se postigne i odgovarajućim vremenom zadržavanja u sistemu sa suspendovanim rastom jer ove dve grupe bakterija zahtevaju različito vreme zadržavanja u reaktoru. Procesom nitritacija-denitrifikacija mogu se tretirati vode sa visokom koncentracijom azota (100 – 5000 mg/L) uz ostvarivanje značajnih benefita (Hellingsa i dr., 1998; Van Hulle i dr., 2010). Parcijalnom nitrifikacijom i anoksi denitrifikacijom se smanjuju potrebe za kiseonikom za 25%, potrebe za izvorom ugljenika za 40% s obzirom da se samo nitriti prevode u molekularni azot, (slika 3.6). Ovo je veoma važno ukoliko se dodaje sintetički donor elektrona (metanol). Takođe, ovim postupkom se smanjuje i količina mulja koji nastaje u odnosu na konvencionalni nitrifikaciono/denitrifikacioni proces (Peng i Zhu, 2006).



Slika 3.6. Nitritacija/Denitrifikacija, (Stensel, 2006)

## SHARON

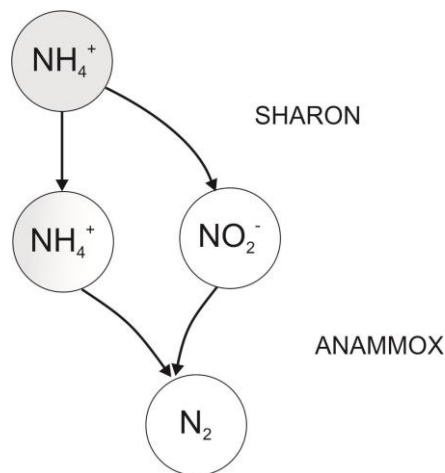
(*Stable High rate Ammonia Removal Over Nitrite*)

Drugi tip procesa koji je zasnovan na parcijalnoj nitrifikaciji je SHARON proces u kom se polovina amonijum jona prisutnih u influentu prevodi u nitrite. SHARON proces se takođe odlikuje prednostima nad konvencionalnim nitrifikacionim procesom. Postiže se smanjenje od 25% potrebne energije za aeraciju, 30% manje mulja nastaje i 20% manje se emituje  $CO_2$  (Shalini i Joshep, 2012).

## ANAMMOX

(*ANAerobic AMMonium OXidation*)

Anammox proces predstavlja denitrifikaciju nitrita pomoću amonijaka kao donora elektrona. Korak koji prethodi anammox procesu je parcijalna nitrifikacija, kojom se polovina amonijum jona konvertuje u nitrate (slika 3.7). Zbog ovoga se vrlo uspešno koristi kombinovan SHARON-ANAMMOX proces koji je uspostavljen i u realnoj primeni za tretman voda. Sistemi na bazi SHARON-ANAMMOX procesa se odlikuju manjom potrošnjom kiseonika kao i alkaliteta, ne zahtevaju dodavanje organskog ugljenika, nastaje manja količina nitritnih i nitratnih jona kao i zanemarljiva količina mulja, u odnosu na konvencionalni postupak uklanjanja azota.



Slika 3.7. SHARON/ANAMMOX proces

Prvo postrojenje za tretman otpadnih voda na bazi ANAMMOX procesa je uspostavljeno u Holandiji 2002. godine, a danas postoji više od 20 sistema ovog tipa. Međutim, anammox bakterijama je potrebno 10 – 11 dana da bi udvostručile svoju populaciju (Van der Star i dr., 2007), što limitira široku primenu ovakvog procesa i zahteva rigorozno praćenje i regulaciju procesa.

## CANON

*(Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite)*

CANON predstavlja kompletno ukljanjanje azota preko nitrita do gasovitog azota pomoću autotrofnih bakterija. Zapravo, ovaj koncept procesa se sastoji od parcijalne nitrifikacije i anammox procesa u jednom reaktoru uz kooperaciju dve vrste bakterija. Nitrifikacione bakterije oksiduju amonijak do nitrita, pri tome troše kiseonik i stvaraju anoksi uslove potrebne za odvijanje anammox procesa.

## OLAND

*(Oxygen Limited Autotrophic Nitrification/Denitrification)*

OLAND predstavlja autotrofni proces u kom se amonijum jon ( $NH_4^+$ ) oksiduje do nitrita u prisustvu kiseonika, a potom se nitriti prevode u gasoviti azot pomoću amonijum jona kao donora elektrona pod kiseonik-limitiranim uslovima (Kuai i Verstraete, 1998). Ovaj proces se takođe odlikuje manjim operativnim troškovima (Windey i dr., 2005), čak do 63% manje potrošnje kiseonika i 100% manje potrošnje organskog ugljenika (Verstraete i Philips, 1998) u odnosu na konvencionalni nitrifikaciono-denitrifikacioni proces.

Međutim, procesi OLAND i CANON koji su do sada bili testirani na pilot i „full scale” postrojenjima za tretiranje otpadnih voda bogatih amonijum jonom nisu davali zadovoljavajući stepen konverzije u odnosu na opterećenje amonijum jonom, s tim da detaljni mehanizmi koji su doveli do ovoga nisu u potpunosti jasni (Ahn, 2006).

Pregledom dostupne literature mogu se uočiti i druge mogućnosti uklanjanja azota iz otpadnih voda. Pored tradicionalne autotrofne nitrifikacije i heterotrofne denitrifikacije, odnedavno, heterotrofna nitrifikacija i aerobna denitrifikacija privukla je dosta pažnje zbog svoje potencijalne primene u biološkom sistemima za uklanjanje azota. Ove specijalne heterotrofne bakterije imaju veće stope rasta od autotrofa, mogu da koriste organska jedinjenja za izvor ugljenika i energiju i mogu da konvertuju amonijum jon u azotni gas pod aerobnim uslovima (Chen i dr., 2012a; Chen i dr., 2012b; Huang i dr., 2013; Zhang i dr., 2012; Zhao i dr., 2010).

Pored široko rasprostranjene heterotrofne denitrifikacije interesovanje poprima autotrofna denitrifikacija koja se odnosi na redukovanje nitrita i nitrata pomoću neorganskih jedinjenja kao donora elektrona poput vodonika (Lee i Rittmann, 2002; Moon i dr., 2008; van Rijn i dr., 2006) elementarnog sumpora, vodonik sulfida i tiosulfata (Di Capua i dr., 2015).

Da bi se prevazišle mane, a iskoristile prednosti pojedinačnog procesa heterotrofne ili autotrofne denitrifikacije, sve više se razvija i kombinovani heterotrofno-autotrofni proces denitrifikacije (*Della Rocca i dr., 2006; Huang i dr., 2015; Liu i dr., 2014*).

Literaturni podaci novijeg datuma pokazuju i mogućnost odigravanja anaerobne denitrifikacije uz  $Mn^{+}$  kao elektro donor, čime se omogućava simultano uklanjanje  $NO_3^{-}$  i  $Mn^{+}$  čije je prisustvo karakteristično za podzemne vode (*Su i dr., 2015*).

Sve ovo inicira postojanje mnogobrojnih mikrobioloških mogućnosti, a samim tim i mogućnosti izučavanja i razvijanja novih procesa uklanjanja azota iz otpadnih voda.

## 4. BIOFILMOVI

Bakterijski biofilmovi predstavljaju visoko organizovanu populaciju mikroorganizama, koncentrovanih na međupovršini čvrsto/tečno, povezanih ekstracelularnom polimernom sluzavom matricom (*Costerton i dr., 1995*). Generalno, biofilmovi veoma utiču na ljudsko zdravlje i industrijsku produktivnost. Oni imaju izražen uticaj na kvalitet vode, posebno i sa aspekta pratećih pojava poput efikasnosti proizvodnje električne energije, korozije, pogoršavanja kvaliteta zubnih površina, zagađenja površina u prehrambenoj industriji i na pogoršavanje kvaliteta vazduha u ventilacionim i klima uređajima. Međutim, veoma je važno istaći da su biofilmovi sastavni deo prirodnog okruženja i da mogu da posluže u veoma korisne svrhe poput prečišćavanja vode za piće i otpadnih voda, kao i detoksikaciju opasnog otpada. Upravo ova dobra strana biofilмова je upotrebljena u biološkom prečišćavanju otpadnih voda sa mikroorganizmima imobilisanim na čvrstim nosačima.

Biofilmovi u tretmanu otpadnih voda koriste brojne mehanizme za uklanjanje biorazgradivih materija poput biološke degradacije, biosorpcije, bioakumulacije i biomineralizacije (*Singh i dr., 2006*).

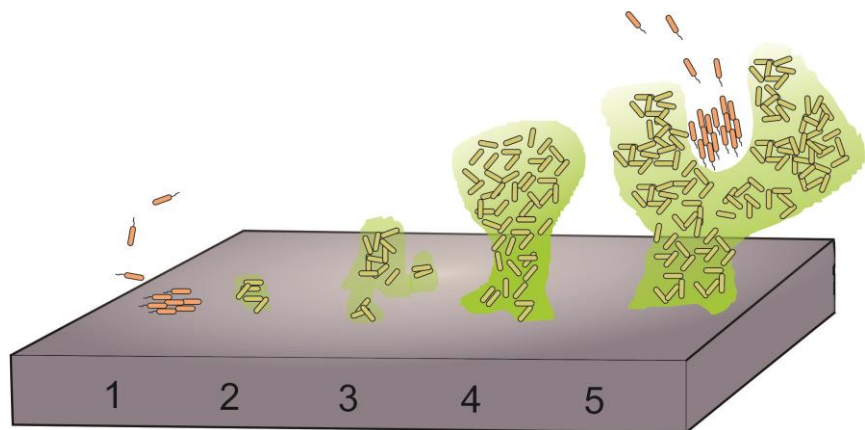
Način na koji funkcionišu biofilmovi omogućava dobijanje efikasnijeg procesa prečišćavanja otpadnih voda. Biološki procesi prečišćavanja sa biofilmovima odlikuju se brojnim prednostima nad procesima sa suspendovanim biomasom, poput velike specifične površine za rast bakterija i velike gustine biomase po jedinici zapremine reaktora (*Mendoza-Espinosa i Stephenson, 1999*). Sistemi sa imobilisanim mikroorganizmima su veće operative fleksibilnosti, zahtevaju manje prostora, imaju manje hidrauličko vreme zadržavanja, a veće vreme zadržavanja biomase, povećane su sposobnosti za degradaciju teško razgradivih jedinjenja i drugo (*Chen i Chen, 2000; Verma i dr., 2006; Wilderer i McSwain, 2004; Oga i dr., 1991; Lieu, 1994*). Takođe, omogućavaju i bolju kontrolu brzine reakcija i dinamike rasta populacije (*Lazarova i Manem, 2000*).

### 4.1. FORMIRANJE BIOFILMA

Mikroorganizmi se pomoću ekstracelularnih polimernih supstanci, koje izlučuju, drže u ćelijskim agregatima na nosačima, formirajući matričnu strukturu biofilma. Matrica biofilma se sastoji od vode (do 97%), mikrobnih ćelija, izlučenih polimernih supstanci (*EPS*), absorbovanih nutrijenata i metabolita, produkata lize ćelije, čak i partikulativnih materija i nekih drugih supstanci iz okolnog okruženja (*Sutherland, 2001*).

Formiranje biofilma se može predstaviti kroz pet faza (slika 4.1.1):

- 1) Inicijalno vezivanje
- 2) Ireverzibilno vezivanje
- 3) Sazrevanje 1
- 4) Sazrevanje 2
- 5) Odvajanje



Slika 4.1. Faze formiranja biofilma

Inicijalno vezivanje počinje kada površina nosača bude obložena neorganskim rastvorenim supstancama i organskim molekulima iz medijuma (vode) kojem je izložena (formiranje, engl. „*conditionig film*“). Potom ćelije brzo i efikasno, pomoću hemotakse ili Braunovog kretanja dolaze na površinu nosača gde dolazi do njihovog privremenog vezivanja za površinu pomoću nespecifičnih interaktivnih sila kao što su Van der Valsove sile, elektrostatičke sile, Braunove sile ili vezivanjem vodonika (Gottenbos i dr., 1999). Inicijalno vezane ćelije retko dolaze u direktan dodir sa površinom zbog odbojnih elektrostatičkih sila, pa se pomoću izlučenih polimera vezuju za supstrat na površini nosača.

Druga faza razvijanja biofilma je ireverzibilno vezivanje koje nastaje kada mikroorganizmi počinju da proizvode ekstracelularne (vanćelijske) polimerne supstance, *EPS*. Proizvodnjom *EPS* ćelije ostaju čvrsto vezane za površinu, a stvarno nepovratno vezivanje je jedino moguće ukoliko nema fizičkog ili hemijskog stresa. Promena, od inicijalnog do ireverzibilnog vezivanja je kratka i traje nekoliko minuta čak i manje (Palmer i dr., 2007).

Nakon vezivanja za površinu, ćelija nastavlja regularno svoju reprodukciju uz regrutovanje novih planktonskih ćelija, što dovodi do rasta biofilma, stvaranja trodimenzionalne matrice. Ova faza razvoja biofilma se naziva sazrevanje. Bakterije vezane za površinu koriste nutrijente iz mase vode za svoj rast i veću proizvodnju *EPS* i time stvarajući mikrokolonije. Tokom rasta biofilma može se uočiti promena u genskoj ekspresiji u odnosu na planktonsku ćeliju. Primer toga je proizvodnja spoljašnjih dodataka potrebnih za kretanje ćelija koja se obustavlja zbog ćelijske imobilnosti u matrici biofilma, dok se podstiče proizvodnja *EPS* i membranskih proteina za transport (Garrett i dr., 2008). Ova regulacija gena zavisi od gustine populacije i kontrolisana je pomoću prenosivog molekula kao signala u komunikacionom sistemu između ćelija poznatim pod nazivom „*Quorum sensing*“ (Dunne, 2002).



Zreli bakterijski biofilmovi predstavljaju dinamičke, prostorno i vremenski heterogene zajednice, čija građa zavisi od uslova okruženja (dostupnost nutrijenata, *pH*, temperature, sila otiranja, osmoze) u kojem rastu kao i od sastava mikrobiološke konzorcije (*De Lancey Pulcini, 2001*). Rast biofilma je prilično spor proces. Potrebno je i do nekoliko dana za formiranje strukturalne zrelosti biofilma.

Zrele formacije biofilma predstavljaju žive konstrukcije sa naprednom organizacijom koja neprekidno prilagođava sebe na okruženje, što znači da može doći do napuštanja biofilma od strane ćelija, zbog potrage za novim povoljnijim staništem. Ova faza se naziva osipanje ili odvajanje biofilma. Biološki, hemijski i fizički parametri koji dovode do odvajanja biofilma su veoma kompleksni. Smatra se da faktori poput degradacije ekstracelularnih polimernih supstanci, nedostatka supstrata ili kiseonika, komunikacije između ćelija („Quorum sensing“), hidrodinamičke sile, erozija i guljenje (engl. „*sloughing*“) utiču na odvajanje biofilma sa nosača (*Chambless i Stewart, 2007; Webb, 2007*).

Matrica biofilma poput fizičke barijere štiti bakterijske ćelije od antimikrobnih agenata i stresova u okruženju (*Davey i O'Toole, 2000*). Ponašanja i strategije preživljavanja bakterijskih kolonija znatno prevazilaze mogućnosti individualnih bakterija. Primer toga je što su mikrobnji biofilmovi tolerantniji na doze antibiotika koje su i do 1000 puta veće od doza koje ubijaju slobodno plivajuću bakteriju (*Stewart i Costerton, 2001*).

#### **4.2. EKSTRACELULARNE POLIMERNE SUPSTANCE (EPS)**

Ekstracelularne polimerne supstance predstavljaju molekule velikih težina koje izlučuju mikroorganizmi ili se donose iz okolnog okruženja (*Nielsen i dr., 1997*). Ove supstance su osnovne komponente ćelijskih agregata bilo flokula aktivnog mulja, granularnog mulja ili biofilma, koje drže ćelije zajedno u formiranoj trodimenzionalnoj matrici. Proizvodnja ekstracelularne matrice je preduslov za formiranje biofilma (*Branda i dr., 2005; Flemming i dr., 2007*).

Ekstracelularne polimerne supstance su svojim najvećim delom sastavljene od proteina, polisaharida, nukleinskih kiselina, lipida i drugih komponenata koje sadrže jonizujuće funkcionalne grupe poput karboksilne, fosforne i hidroksilne u aktivnom mulju, granularnom mulju i biofilmovima (*Wei i dr., 2014a*). Ugljeni hidrati koje čine deo *EPS* se uglavnom sastoje od polisaharida. *EPS* su prisutne i izvan ćelija i u unutrašnjosti mikrobioloških agregata. U biofilmovima, eksopolisaharidi se smatraju odgovornim za strukturu stabilnost i građu biofilma (*Sutherland, 2001*). Bakterijski polisaharidi se mogu podeliti na granične i na rastvorene. Granični polisaharidi su vezani za površinu ćelije, čak mogu biti i kovalentno vezani, dok su rastvoreni polisaharidi oni koji se ne vezuju za ćeliju nakon izlučivanja (*Kumar i dr., 2007*). Ispitivanja rastvorenih *EPS* su veoma limitirana, tako da se većina ispitivanja odnosi na granične *EPS*. Struktura graničnog *EPS* je uglavnom opisana pomoću dva sloja. Unutrašnji sloj graničnih *EPS* je jasnog oblika, čvrsto i stabilno vezan za površinu ćelije, a spoljašnji sloj graničnog *EPS* je sluzav i bez vidljivih ivica, slabo i dispersibilno vezan (*Nielsen i Jahn, 1999*).

*EPS* ima veliki uticaj na fizičko-hemijske karakteristike mikrobioloških agregata, uključujući strukturu, površinsko naelektrisanje, flokulaciju, taložne karakteristike, dehidrataciju i adsorpcione mogućnosti (*Sheng i dr., 2010*).

Zbog prisustva mnogih funkcionalnih grupa u *EPS*, *EPS* može da gradi komplekse sa teškim metalima. S obzirom na broj dostupnih karboksilnih i hidroksilnih grupa u pitanju je veliki kapacitet vezivanja (*Ha i dr., 2010*). Takođe, proteini, ugljeni hidrati i nukleinske kiseline imaju sposobnost građenja kompleksa sa teškim metalima (*Priester i dr., 2006; Zhang i dr., 2006*). Organske materije poput benzena, boja, huminskih kiselina itd, takođe mogu biti adsorbovane (*Spath i dr., 1988; Esparza-Soto i Westerhoff, 2003; Sheng i dr., 2008*).

*EPS* se sastoji od hidrofobnih i hidrofilnih delova što ukazuje na to da su *EPS* amfoterne. Relativan odnos ovih hidrofobnih i hidrofilnih grupa zavisi od samog sastava *EPS* (*Sheng i dr., 2010*).

Pored strukturnih, zaštitnih i biosorpcionih karakteristika, *EPS* može da posluži kao supstrat za ćelijski rast u uslovima nedostatka hranljivih materija (*Bahat-Samet i dr., 2004; Zhang i Bishop, 2003*) ali postoje i deovi *EPS* koji nisu biorazgradivi (*Lispidou i Rittman, 2002*). Tip supstrata kao i sadržaj nutrijenata takođe imaju veliki efekat na sastav i produkciju *EPS*. Primer toga su istraživanja koja su pokazala da produkcija *EPS* u aktivnom mulju može biti pospešena kada je koncentracija fosfora na izmaku (*Liu i dr, 2006*).

Ekstracelularne polimerne supstance utiču i na ubrzavanje stvaranja mikrobioloških agregata vezivanjem ćelija blizu jednih drugima (*Liu i dr., 2004*).

Vreme zadržavanja ćelija (*SRT*) takođe ima uticaj na produkciju *EPS*, mada rezultati u dostupnoj literaturi pokazuju kontradiktornost. Pojedni rezultati ispitivanja uticaja *SRT* na *EPS* u aktivnom mulju pokazali su da povećanje *SRT* ima značajan i pozitivan uticaj na stvorenu količinu *EPS*, kako u količini proteina tako i u količini ugljenih hidrata (*Sesay i dr., 2006*), dok drugi rezultati pokazuju da se sadržaj *EPS* nije značajno promenio sa povećanjem *SRT* (*Liao i dr., 2001*).

U prisustvu toksičnih supstanci poput teških metala, bakterije u aktivnom mulju i u biofilmovima proizvode više *EPS* da bi se zaštitile od štetnog okruženja (*Fang i dr., 2002; Aquino i Stuckey 2004; Priester i dr., 2006*).

Smicajne sile u reaktorima isto utiču na sastav *EPS*. Rezultati istraživanja su pokazali da se povećanjem smicajnih sila u sistemima sa biofilmovima utiče na hiper produkciju polisaharida u *EPS* (*Ramasamy i Zhang, 2005*), pošto se smatra da povećana produkcija polisaharida u *EPS* pomaže bakterijsku adheziju (*Liu i Tay, 2002*). Međutim, ova povećana produkcija polisaharida usled povećanih smicajnih sila, se nakon kultivacije, odnosno, nakon 15 – 20 dana vraća na prvobitan nivo (*Ramasamy i Zhang, 2005*).

Količina rastvorenog kiseonika takođe utiče na stvaranje *EPS*. U sistemu sa aktivnim muljem, usled limitirane koncentracije kiseonika u reaktoru dolazi do dezintegracije flokula (*Nielsen i dr., 1996*). Rezultati istraživanja su pokazali da ukoliko je koncentracija rastvorenog kiseonika u reaktoru sa aktivnim muljem visoka, dolazi do povećanog stvaranja ugljenih hidrata u *EPS* (*Shin i dr., 2001*).

Ekstracelularne polimerne supstance su raspoređene u slojevima biofilma i njihov prinos varira sa dubinom biofilma (*Zhang i Bishop, 2001*). Distribucija *EPS* komponenti varira kako prostorno tako i vremenski. Sastav *EPS* zavisi od sastava mikrobiološke konzorcije i uslova sredine (*Kolter i Greenberg, 2006*).

Postoji dosta različitih metoda ekstrakcije *EPS*. Idealna *EPS* ekstrakcija bi bila ona koja je efikasna, koja omogućava ekstrahovanje cele količine *EPS* iz cele organske materije za dat ćelijski uzorak, uz uzrokovanje minimalne lize ćelije i ne narušavanja strukture *EPS* (*Frolund i dr., 1996*). One mogu biti fizičke, hemijske ili kombinovane fizičke i hemijske. Zbog kompleksne kompozicije teško je analizirati sastav, strukturu i funkciju *EPS*. Univerzalna metoda za kvantitativnu ekstrakciju *EPS* iz mikrobioloških agregata ne postoji, pa se za svaki poseban slučaj mora izabrati metoda i izvršiti njena optimizacija, uzimajući u obzir karakteristike uzorka (*Sheng i dr., 2010*). Da bi se što bolje izvršila karakterizacija *EPS* razvile su se novije analitičke metode u koje spadaju: gasna hromatografija (*GC*), gasna hromatografija–masena spektrometrija (*GC – MS*), tečna hromatografija visokih performansi (*HPLC*), skenirajuća elektronska mikroskopija (*SEM*), skenirajuća elektronska mikroskopija okruženja (*ESEM*), konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (*QCM*), fotoelektronska spektroskopija sa X-zracima (*XPS*) itd.

Ispitivanja ekstracelularnih polimernih supstanci su od velikog interesa ne samo zbog shvatanja biološkog tretmana otpadnih voda već i zbog poboljšavanja efikasnosti takvog tretmana kroz optimizaciju operativnih parametara (*Sheng i dr., 2010*).

Ekstracelularne polimerne supstance su veoma kompleksne, potrebno je još dosta istraživanja da bi se njihova uloga u biološkom tretmanu u potpunosti razumela.

### **4.3. KOMUNIKACIJA IZMEĐU ĆELIJA- „QUORUM SENSING“**

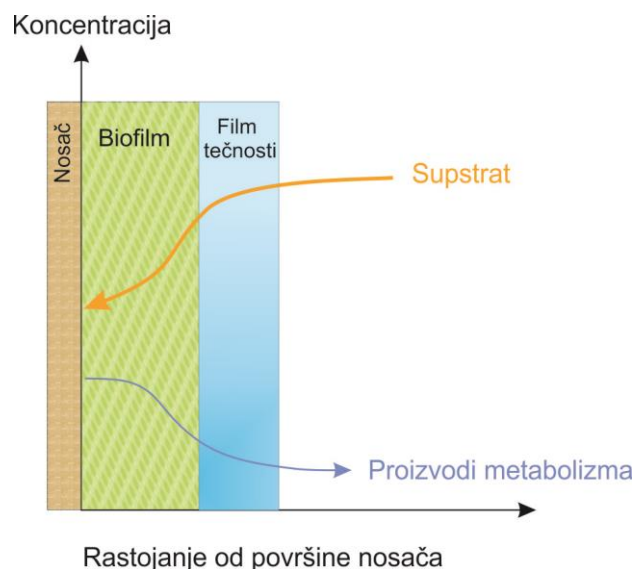
„*Quorum sensing*“, (*QS*), predstavlja način komunikacije između ćelija koji uključuje sintezu, otpuštanje i detekciju molekulskih signala zvanih *autoinducerima* (*AIs*) (*Fuqua i dr., 1994*). Bakterije mogu da odgovore na veliki broj *AIs*. Do sada postoje definisana tri tipa *AIs* koji su u vezi sa bakterijskim *QS*, *acyl homoserine lactones* (*AHLs*), *autoinducer oligopeptides* (*AIP*) i *autoinducer-2* (*AI – 2*). *AHLs* i *AIP* se pretežno koriste kao molekulski signali Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, respektivno, dok se *AI – 2* univerzalno koristi za međukomunikaciju obe vrste, Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija (*Miller i Bassler, 2001; von Bodman i dr., 2008*). *QS* sistem bakterije mogu da koriste za monitoring gustine njihove populacije i da aktiviraju specifičnu ekspresiju gena koja im omogućava da se ponašaju na koordiniran način (*Jayaraman i Wood, 2008*).

Postoje dokazi da QS sistem doprinosi razvoju biofilmova određenih bakterija, kao i to da utiče i na raspad razvijenih biofilmova, odnosno QS je umešan u sve faze razvoja biofilma (Parsek i Greenberg, 2005; Moons i dr., 2009). QS je široko rasprostranjena pojava koja omogućava bakterijama da se prilagode i prežive u uslovima sredine koji se stalno menjaju. Planktonske bakterije kao i bakterije u biofilmu luče hemijske signale. Međutim, bakterije u biofilmu su gušće pa su i signali mnogo koncentrovaniji, a samim tim i efikasniji.

U tretmanu otpadnih voda manipulacija QS sistemom može biti održiva strategija za upravljanje biofilmovima (Feng i dr., 2013). Shvatanje QS signalizacije i QS inhibicije je od značaja za uspešno vođenje biološkog procesa prečišćavanja kroz samu kontrolu mikrobiološke atezije, kolonizacije i formiranja biofilma. Međutim, sveobuhvatno sagledavanje QS procesa u biofilmovima sačinjenih od velikog broja bakterijskih vrsti pod složenim uslovima sredine potrebno je još ispitivati.

#### 4.4. AKTIVNOST BIOFILMA

Biofilmovi su veoma kompleksni, kako fizički tako i mikrobiološki. Mogu se posmatrati kao izbočine (engl. „clusters“) zakačene jedna za drugu pomoću ekstracelularnog polimernog materijala. Unutar izbočina se nalaze šupljine, pore i kanali, što rezultuje neuniformnom raspodelom biomase unutar biofilma (Costerton i dr., 1995; Lazarova i Manem, 1995). Fizički parametri, poroznost i gustina takođe nisu uniformni unutar biofilma (Zhang i Bishop, 1994). Struktura biofilma i njegova aktivnost su dva najznačajnija parametra za efikasno odvijanje i kontrolu procesa sa biofilmovima u tretmanu otpadnih voda (Lazarova i Manem, 1995). Aktivnost biofilma je direktno proporcionalan brzini razgradnje supstrata od strane mikroorganizama u biofilmu ukoliko ne postoji limitiranost transporta supstrata unutar biofilma (Boaventura i Rodrigues, 1997). Supstrat se molekulskom i turbulentnom difuzijom transportuje do površine biofilma, a odatle i u njegovu unutrašnjost. Transport supstrata unutar biofilma je rezultat difuzije u gušćim agregatima i konvekcije unutar pora i vodenih kanala. U mnogim ispitivanim sistemima pokazano je da je difuzija dominantna za prenos mase unutar biofilma (Horn i Morgenroth, 2006). U biofilmovima u kojima prenos mase kontroliše difuzija, brzina konverzije supstrata zavisi od koeficijenta difuzije ( $m^2/s$ ) i koncentracije supstrata u masi vode. Koncentracija supstrata će biti niža na površini biofilma nego u masi tečnosti i nastavljaće da opada sa dubinom biofilma, odnosno zbog difuzije gradijenti supstrata i metaboličkih proizvoda će rasti unutar biofilma (slika 4.2). Ovo znači da će bakterije na površini biofilma rasti brže od bakterija u unutrašnjosti, što u pojedinim slučajevima može da znači da bakterije u samoj unutrašnjosti biofilma neće doprineti uklanjanju supstrata. Što su biofilmovi deblji veći je gradijent koncentracije, pa samim tim i mogućnost da pojedini delovi biofilma ostanu bez dostupnih potrebnih materija za njihovu aktivnost. Različitost koncentracija kiseonika i supstrata unutar biofilma omogućava povoljne uslove za razvoj velikog broja različitih vrsta mikroorganizama. Povećan transfer gena, koji je često detektovan u biofilmovima, garantuje progresivnu evoluciju i genetski diverzitet, koji utiče na porast konkurentnosti bakterijskih ćelija.



Slika 4.2. Gradijent koncentracije

Koncept o limitirajućoj difuziji unutar biofilma je veoma važan kod merenja koncentracije rastvorenog kiseonika u masi vode. Koncentracije rastvorenog kiseonika od  $2 - 3 \text{ mg/L}$  se smatraju dovoljnim za obavljanje aerobnog procesa sa suspendovanim mikroorganizmima. Međutim, u procesima sa biofilmovima ove koncentracije kiseonika mogu biti limitirajuće, pogotovo za proces nitrifikacije, koji zahteva prisustvo veće koncentracije rastvorenog kiseonika. U sistemima sa biofilmovima za uklanjanje azota iz otpadnih voda limitirajuća difuzija može da ima i svoje prednosti, zapravo ona može da omogući stvaranje anaerobnog sloja unutar biofilma i time obezbedi odigravanje nitrifikacije i denitrifikacije u istom sistemu.

Rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazali su da debljina i gustina biofilma zavise od smicajnih sila unutar sistema, dok sastav biofilma zavisi od sastava medijuma i aktivnosti mikroorganizama (Alves i dr., 2002). Gustina biofilma raste sa povećanjem smicajnih sila koje deluju na biofilm, što ukazuje na direktnu vezu gustine biofilma sa hidrodinamikom sistema (Vieira i dr., 1993). Kao razlog ovome navodi se pojačavanje EPS matrice od strane bakterija, koje se na taj način štite od agresivnih smicajnih sila fluida iz okruženja. Takođe, porast gustine biofilma sa povećanjem sila otiranja usled međusobnih sudara čestica su potvrđena u eksperimentima rađenim sa pokretnim nosačima u fluidizovanom sloju i u air-lift reaktoru (Kwok i dr., 1998; Chang i dr., 1991). Intenzivnim istraživanjima gustine biofilma pokazano je da se gustina biofilma menja sa dubinom biofilma. U najdubljim slojevima biofilma (bližim nosaču) gustina je  $5 - 10$  puta veća nego u površinskim slojevima (Zhang i Bishop, 1994b). Takođe se i koncentracija aktivne biomase menja sa dubinom biofilma. Aktivni mikroorganizmi su uglavnom smešteni u spoljašnjim slojevima biofilma dok su inertne materije, koje ne utiču na biooksidaciju, smeštene u unutrašnjosti biofilma. Merenja su pokazala da aktivna masa čini oko 30% ukupne biomase u dubljim slojevima biofilma, dok aktivna masa skoro 100% čini ukupnu biomasu u spoljašnjim slojevima biofilma (Zhang i Bishop, 1994b). Brzina biohemijske transformacije više zavisi od metaboličke aktivnosti mikrobiološke zajednice nego od ukupne biomase u reaktoru (La Motta, 1976; Imat i dr., 1993; Lazarova i dr., 1994).

Ukoliko postoje dve bakterijske vrste koje se ne bore ni za jedan nutrijent, već samo za prostor, njihova krajnja distribucija će zavisiti od njihove relativne specifične brzine rasta na bilo kojoj poziciji unutar biofilma. Na površini biofilma će biti dominantnija vrsta koja ima veću maksimalnu specifičnu brzinu rasta, a u unutrašnjosti će biti organizmi koji sporije rastu. U sistemima sa heterotrofima i autotrofima, heterotrofi će rasti u spoljašnjim slojevima a autotrofi u unutrašnjim. Ova pozicija unutar biofilma spororastućim bakterijama pruža i prednost i nedostatak. Prednost je što su u dubljim slojevima biofilma autotrofi zaštićeni od smicajnih sila koje otiru biomasu sa površine biofilma, a nedostak je u povećanom otporu prenosa mase jer njihov supstrat, amonijum jon, mora da difunduje kroz sloj heterotrofa da bi došao do autotrofnih konzumenata (*Rittman i Manem, 1992*). Pozicija heterotrofa i autotrofa unutar biofilma će pre svega zavisiti od koncentracija supstrata ovih bakterija (*Rittman i Manem, 1992*). Ukoliko se pored kompeticije za prostor javi i kompeticija za neku komponentu, poput kiseonika, distribucija organizama postaje mnogo kompleksnija u zavisnosti od relativne vrednosti komponente za koju se bore kao i od kinetike rasta svake vrste na individualnom supstratu.

Sve bakterije bez obzira na kojoj se poziciji nalaze u biofilmu, podležu procesu odumiranja, čiji je rezultat nagomilavanje ćelijskih ostataka unutar filma. Akumulacija neaktivnih materija unutar biofilma veoma utiče na fiziološko stanje biofilma. Prisustvo neaktivnih materija nameće promene mikrobnog metabolizma koji dalje utiče na promene mikrobiološke aktivnosti kao i na rast mikroorganizama. Zbog ovoga rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazuju da će maksimalna mikrobiološka aktivnost biti prisutna kod tankih biofilmova (*Liu i Capdeville, 1996*). S tim u vezi, ako su biofilmovi deblji ne znači da sadrže više aktivnih ćelija (*Chang i dr., 1991*).

Hidrodinamika je jedan od činilaca koji deluje na formiranje tanjih biofilmova. Pri višim vrednostima protoka tečnosti formira se tanji granični (nepokretan) sloj tečnosti kao i tanji sloj biomase. Što je granični sloj tečnosti manji, manji je otpor prenosu mase kiseonika i supstrata do površine biofilma. Tanji sloj biomase, čija je debljina u funkciji erozionog faktora, pored bolje penetracije komponenata kroz biofilm, karakteriše veća mikrobiološka aktivnost (*Liu i Capdeville, 1996*). Za efikasno odvijanje nitrifikacionog procesa kao ključni parametar se pokazala aktivnost biofilma (*Liu i Capdeville 1996*).

Činilac koji takođe utiče na regulisanje debljine biofilma je međusobno otiranje čestica. Dobijeni rezultati određenih ispitivanja su pokazali da trenje među česticama ima veći efekat na koeficijent otiranja biofilmova nego što ima brzina tečnosti koja prolazi preko površine biofilma (*Hermanowicz i Ganczarezyk, 1985; Mulcahy i LaMotta, 1978*). Postoje i ispitivanja koja pokazuju da postoji optimalna količina čestica (zapreminska koncentracija čestica) u air-lift reaktoru koja omogućava formiranje aktivnog nitrifikacionog biofilma, a da se pri tome ne naruši ćelijski rast prekomernim otiranjem (*Lee i dr., 2004*).

Neto efekat oba procesa, rasta i odumiranja je migracija čestica iz unutrašnjosti ka spoljašnjosti biofilma gde ih sile trenja otiru, čime se održava konstantna debljina biofilma. Odnosno, u sistemima sa imobilisanim mikroorganizmima javlja se fluks biomase. Ukoliko je neto rast pozitivan u kontrolnoj zapremini, biomasa raste. Ako gustina biomase pri tome ostaje konstantna, biomasa mora preći granicu kontrolne zapremine, dajući fluks biomase (*Wanner i Gujer, 1984; Wanner i Gujer, 1986*).

Fluks biomase u kontrolnoj zapremini je proporcionalan neto rastu biomase (rast minus odumiranje) (*Rittmann i Manem, 1992*). Čelijski ostaci će takođe biti generisani u biofilmu zbog odumiranja biomase i zauzimaće prostor, a time će doprineti i fluksu. Ovaj fluks doprinosi da biofilm raste po dubini tokom vremena dok neto rast ne bude izbalansiran sa gubitkom po jedinici površine usled površinskog otiranja. Jedan od rezultata ovog fluksa koji počinje od površine biofilm-nosač i raste sa udaljavanjem od te površine je neto migracija čestica iz unutrašnjosti biofilma do površine biofilm-tečnost. Ukoliko pojedine vrste mikroorganizama ne mogu dovoljno brzo da rastu u biofilmu da bi nadoknadili ovo pomeranje, verovatno će biti izgubljene iz sistema.

#### 4.5. NOSAČI BIOFILMA

Nosač mikroorganizama može biti kamen, šljunak, pesak, šljaka i u širokom opsegu plastični i drugi sintetski materijali. Selekcija nosača se uglavnom vrši na osnovu veličine, poroznosti, gustine, specifične površine i otpornosti na eroziju (*Christensson i Welander, 2004; Ødegaard i dr., 2000*). Takođe, važno a o čemu se malo zna je uticaj karakteristika hemijskih veza između površine nosača i biofilma na kvantitet biofilma pa i na samu efikasnost procesa. Bakterijsko prijajanje za površinu je složen proces koji obuhvata inicijalne interakcije faza praćene molekulskim i čelijskim interakcijama. Ove interakcije zavise od tipa bakterijske ćelije, površine za imobilizaciju ćelija i uslova sredine (*An i Friedman, 1998*). Kada se ćelije lociraju na površinu nosača, fizičko-hemijske karakteristike nosača su te koje podstiču bakterije na lučenje ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) (*Renner i Weibel, 2011*). Ispitivanjem količine ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) uključujući, rastvorene EPS, slabo i jako vezane granične EPS u biofilmovima formiranim na dva nosača napravljenih od različitog materijala u CANON procesu, pokazano je da tip nosača utiče i na količinu i karakteristike proizvedenih EPS (*Chen i dr., 2013*). Pokazalo se takođe da početno vezivanje kasnije utiče na strukturu biofilma, sposobnosti prijajanja i odvajanja biofilma (*Busscher i dr., 1995; Lackner i dr., 2009*). Zaključeno je da je pokretačka sila za bakterijsko vezivanje za površinu površinski napon između ćelije i površine, koji je veći od površinskog napona ćelija-tečnost ili tečnost-površina (*Ista i dr., 2004*). Zapravo, adhezija mikroorganizama za različite inertne površine nosača je regulisana elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama, odnosno, energijom površine. Visoka hidrofobnost površine je povezana sa niskom vrednošću energije površine i obrnuto.

Bakterijska ćelija uvek nosi negativno naelektrisanje bilo da se nalazi u kiseloj, neutralnoj ili alkalnoj sredini i zbog toga ima veću sklonost ka približavanju pozitivno naelektrisanjoj površini usled elektrostatičkog privlačenja (*Bernstein i dr., 2011*). Adekvatni nosači biofilma nisu uvek dostupni i uglavnom se koriste nosači koji nose negativno naelektrisanje zbog kojeg se javlja elektrostatičko odbijanje površine i mikrobne ćelije. Da bi se omogućilo prijajanje bakterija za nosač potrebno je modifikovati karakteristike površine.

Uobičajeno je da se pre deluje na elektrostatičke interakcije nego na hidrofobne interakcije, pa se na taj način vrši prevlačenje površine nosača sa slojem pozitivnog naelektrisanja koloidnih čestica, hidrolizovanim katjonima, amino grupama itd. (*Melo i dr., 1992*). Rezultati istraživanja rađenih u nitrifikacionom sistemu sa mešanom kulturom pokazuju da se više biofilma vezuje na površinu koja je modifikovana amino grupama nego za površinu koja nije modifikovana ili za površinu koja je modifikovana metil grupama (*Lackner i dr., 2009*).

Utjecaj tipa nosača na količinu formiranog biofilma su ispitivana na četiri vrste nosača napravljenih od najlona, *HDPE*, melamina i acetalne polimerne plastike. Rezultati istraživanja su pokazali da hemija površinskog vezivanja može biti potreban projektni parametar radi dobijanja efikasnijeg procesa prečišćavanja otpadnih voda (*Khan i dr., 2013*). Određivanjem ugla kvašenja i površinske energije sva četiri tipa materijala, pokazalo se da najlon ima najmanji ugao kvašenja odnosno da je najhidrofilniji i da ima najveću površinsku energiju, dok je acetalna plastika najhidrofobnija i ima najmanju vrednost površinske energije, što su i potvrdili dobijeni rezultati. Najveća masa imobilisanih bakterija ( $mg/cm^2$ ) kao i najveća efikasnost uklanjanja amonijum jona i estrogena iz otpadne vode, za koje je rađeno ispitivanje, je bila u sistemu sa površinom napravljenom od najlona, a najniže vrednosti ova dva parametra su bile za sistem sa acetalnom plastikom. Druga istraživanja koja su rađena sa čistom kulturom heterotrofa i amonijum oksidujućih bakterija (*AOB*), pokazuju isto da se sa povećanjem površinske energije, odnosno što je površina hidrofilnija, postigla veća količina imobilisanih bakterija (*Khan i dr., 2011; Dimitrov i dr., 2007; Kim i dr., 1997*). Takođe postoje rezultati istraživanja koji pokazuju suprotne efekte.

Hrapavost površine nosača kao i površinska energija nosača su preduslov za formiranje početne faze biofilma i vezivanja organizama (*Lakshmi i dr., 2012*). Što je površina hrapavija ona je i poroznija, pa su veće i specifične površine za imobilizaciju bakterija. Ujedno pore i mikrošupljine na nosačima štite bakterije od smicajnih sila omogućavajući im duže vreme zadržavanja u reaktoru. Međutim, ispitivanja uticaja hrapavosti površine nosača, napravljenih od osam vrsta plastike, na efikasnost procesa nitrifikacije u mešovitoj populaciji nisu pokazala međusobnu zavisnost (*Stepenson i dr., 2013*). Nosači su bili izrađeni od akrilonitril butadien stirena (*ABS*), najlona (*Ny*), polikarbonata (*PC*), polietilena (*PE*), polipropilena (*PP*), politetrafluoroetilena (*PTFE*), polivinil hlorida (*PVC*) i tufnola (*Tu*). Pomoću mikroskopske analize atomskih sila (*AFM*) određena je hrapavost površine različitih plastika, koje su potom rangirane počevši od najveće hrapavosti površine  $PE > PTFE > Ny > PVC > Tu > ABS > PP > PC$ . Najniža stopa nitrifikacije je zabeležena u rezervoaru sa nosačem napravljenim od *PE*, koji je imao najveću hrapavost površine. Suprotno tome, u rezervoaru sa nosačem napravljenim od *PC*, koji je imao najmanju hrapavost površine, zabeležene su relativno visoke stope nitrifikacije. U odnosu na postignutu stopu nitrifikacije ispitivani materijali nosača su rangirani počevši od najveće  $PTFE > Tu > PC > PP > PE > ABS > PVC$ . Rezultati merenja adhezije energije površine su pokazali da su više stope nitrifikacije postignute sa materijalima od plastike koji su imali nižu adhezionu energiju površine, odnosno *PTFE* je imao najnižu. Ovi rezultati su suprostavljeni prethodno navedenim rezultatima istraživanja koji pokazuju da se sa povećanjem površinske energije povećava imobilizacija bakterija. Takođe, postoji još rezultata koji ovo potvrđuju. *Sousa i dr. (1997)* su ispitivali nosače od polimernih materijala za adheziju autotrofnih nitrifikacionih bakterija i vršili karakterizaciju površine materijala u odnosu na hidrofobnost i površinsko naelektrisanje. Ispitivano je pet vrsta plastike, *PE*, *PP*, *PVC*, polistiren visoke gustine i polimetil-metakrilat. Rezultati su pokazali da je *PP* najhidrofobniji materijal od ispitivanih, čime obezbeđuje najbolju površinu za razvoj biofilma. Oba prethodno navedena istraživanja *Stephenson i dr., (2013)* i *Sousa i dr., (1997)* su pokazala isto rangiranje plastičnih materijala od uporedivih, idući od materijala sa kojim se postiže veća stopa nitrifikacije,  $PP > PE > PVC$ . *Liu (1995)* je rangirao tri vrste polimera  $PS > PP > PE$  u odnosu na maksimalnu akumulaciju nitrifikacionih bakterija. *Kim i dr., (1997)* su pokazali da su favorizujuće površine za unapređivanje formiranja nitrifikacionog biofilma one sa negativnom slobodnom energijom. Različito dobijeni rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazuju veoma bitne implikacije u izboru i dodatnom ispitivanju materijala za nosače u tretmanu otpadnih voda u kome se odvija proces nitrifikacije.



## 5. TIPOVI REAKTORA ZA PROCES UKLANJANJA AZOTA IZ OTPADNIH VODA

Dosadašnji rezultati istraživanja i primene aerobnih procesa prečišćavanja otpadnih voda pomoću biofilmova pokazuju njihovu visoku efikasnost u uklanjanju nutrijenata. Ovako koncipirani sistemi, pored toga što obezbeđuju velike površine za rast mikroorganizama, obezbeđuju i efikasno mešanje, odnosno intenzivan prenos mase. Sistemi sa imobilisanim mikroorganizmima imaju niz prednosti u odnosu na sisteme sa suspendovanim mikroorganizmima, o kojima je prethodno bilo reči. U moguće nosače mikroorganizama spada širok opseg plastičnih i sintetičkih materijala, pored peska, stakla, kamenja. Pored veličine, gustine i specifične površine koja je jedna od najbitnijih svojstava nosača bitna je i struktura, odnosno građa nosača zbog potrebnih hidrodinamičkih karakteristika koje moraju biti zadovoljene u zavisnosti od sistema u kom se dati nosači primenjuju. U ispitivanjima različitih sistema korišćeni su nosači mikroorganizama poput peska (*Aslan i Dahab, 2008*), lava kamenja (*Andalib i dr., 2011*), keramičkih ploča (*Hamoda i dr., 1996*), čestica silicijuma i aluminijuma (*Bougard i dr., 2006*), alginat gel kuglica (*Tartakovsky i dr., 1996*), različitih vrsta plastika (*Hem i dr., 1994; Nogueira i dr., 2002; Stepenson i dr., 2013*), stakla (*Rittmann i Manem, 1992*) i mnogi drugi.

Sistemi sa imobilisanom biomasom pored niza prednosti, karakterišu se visokom kompleksnošću i zahtevaju niz merenja i ispitivanja pojedinačnih i uzajamnih delovanja parametara koji utiču na krajnju primenu ovih sistema. Geometrija sistema, tokovi fluida, tip nosača, koncentracija rastvorenog kiseonika, koncentracija supstrata, osobine fluida, temperatura, *pH*, alkalitet i mnogi drugi parametri određuju kinetiku procesa uklanjanja azota iz otpadnih voda, pa ih je zbog toga neophodno uskladiti tako da čine sistem u kom mikroorganizmi imaju optimalne uslove za njihovu aktivnost.

Procesi sa biofilmovima su pogodni za nitrifikaciju jer pre svega omogućavaju spororastućim nitrifikacionim bakterijama potrebno vreme zadržavanja biomase ( $> 10$  dana) neophodno za postizanje efikasnog procesa uklanjanja azota (*Rittmann, 1987*).

Postoje brojna istraživanja različitih tipova reaktora za proces uklanjanja azota iz otpadnih voda.

Za proces nitrifikacije ispitivani su reaktori sa statičkim slojem (*Hamoda i dr., 1996; Sudarno i dr., 2011; Stepenson i dr., 2013; Villaverde i dr., 1997*), reaktori sa fluidizovanim slojem (*Aslan i Dahab, 2008; Andalib i dr., 2011; Bougard i dr., 2006; Dong i dr., 2011; Hem i dr., 1994; Shore i dr., 2012; Tartakovsky i dr., 1996; Wang i dr., 2012*), air lift reaktori (*Heijnen i dr., 1993; Nogueira i dr., 2002*).

Proces parcijalne nitrifikacije je ispitivan u SBR sistemu (*Kong i dr., 2013*), u sistemu sa granulisanim muljem (*Liang i dr., 2015*), u sekvencionalnom šaržnom air-lift reaktoru sa granulisanim muljem (*Song i dr., 2013*), air-lift reaktoru sa unutrašnjom cevi (engl. „*internal loop*“) (*Jin i dr., 2013; Xing i dr., 2013*) kontinualnom „*plug-flow*” stepenom procesu (*Ge i dr., 2014*) itd.

Anammox proces ispitivan je u sistemu sa fluidizovanim slojem (*van Graaf i dr., 1996*), sekvencionalnom šaržnom reaktoru (*Strous i dr., 1998*), membranskom bioreaktoru (*Trigo i dr., 2006*) i drugim.

Takođe i denitrifikacioni proces je ispitivan u različitim tipovima sistema, sa pakovanim slojem (*Shen i dr., 2013*), biološkom reaktoru sa cikličnim rotirajućim slojem (*Jafari i dr., 2015*) i drugim.

Pored ispitivanja pojedinačnih procesa za uklanjanje azotnih jedinjenja iz otpadne vode, u različitim tipovima sistema ispitivano je i simultano odvijanje pojedinih procesa poput simultanog odvijanja nitrifikacije i denitrifikacije u sistemu sa fluidizovanim slojem (*Aslan, i dr., 2008*), u sistemu sa stepenim fluidizovanim slojem (*Wang i dr., 2012*), sistemu sa recirkulacionim fluidizovanim slojem (*Li i dr., 2011*), SBR sistemu (*Rodríguez i dr., 2011*), bioelektrohemijskom sistemu (*Virdis i dr., 2011*) i drugim. Takođe je ispitivano simultano odvijanje parcijalne nitrifikacije, anammox procesa i denitrifikacije (SNAD) u SBR sistemu (*Lan i dr., 2011*), u sekvencionalnom šaržnom reaktoru sa biofilmom (SBBR) (*Daverey i dr., 2015*), membranskom bioreaktoru (MBR) (*Abbassi i dr., 2014*) itd.

U dostupnoj literaturi se može naći dosta podataka o ispitivanju različitih tipova reaktora za kompletno uklanjanje azota iz otpadnih voda ili delova procesa prevođenja amonijum jona do gasovitog oblika azota i njihovih kombinacija. Ispitivane su i različite modifikacije već primenjenih reaktora i drugih parametara procesa, poput tipova nosača, mikrobiološke populacije itd., u cilju dobijanja što efikasnijeg procesa ili ispitivanja novih mogućnosti u uklanjanju nutrijenata iz otpadnih voda.

Međutim, pregledom dostupne literature, nije nađena primena fontanskog ili fontansko-fluidizovanog sloja u procesima uklanjanja azota iz otpadnih voda. Biološki procesi koji su ispitivani u trofaznom (voda-vazduh-čestice) fontanskom sloju sa centralnom cevi su procesi uklanjanja nitrata i ugljenika (*Joshi i dr., 2014*) i proces degradacije fenola (*Safont i dr., 2012*).

Pored bioprocesa fontanski slojevi sa centralnom cevi su se koristili za pirolizu biomase (*Fernandez-Akarregi i dr., 2013; Makibar i dr., 2011; Zhang i dr., 2009*), za procese oblaganja (engl. „coating“) i sušenja (*Altzibar i dr., 2008; Arsenijević i dr., 2002; Berghel i Renström, 2014; Povrenović i dr., 1992*).

U dosadašnjim ispitivanjima ovih sistema (*Grbavčić i dr., 1992; Littman i dr., 2009; Povrenović i dr., 1996*) pokazano je da reaktor sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi ima više prednosti u odnosu na fontanske ili fontansko-fluidizovane sisteme. Ovakvi sistemi, kao dvofazni, gas-čestice ili tečnost-čestice, se odlikuju intenzivnim kontaktom fluida i čestica i već su našli svoju primenu u pojedinim procesima (*Aguado i dr., 2005; Plawsky i dr., 2010*). Trofazni sistemi sa fontansko-fluidizovanim slojem voda-čestice u koji se uvodi gas još uvek nisu dovoljno ispitani i nisu našli svoju primenu u industrijskoj praksi.

Zbog svoje fleksibilnosti i intenzivnog kontakta fluida i čestica, reaktor sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi može imati svoju primenu u aerobnim postupcima prečišćavanja otpadnih voda. Da bi se ovaj tip reaktora mogao primeniti za proces uklanjanja azota iz otpadnih voda, neophodno je ispitati uticaj njegovih fluido-mehaničkih karakteristika na niz parametara biološkog procesa kao i njihov međusobni uticaj u ovakvom sistemu.

## 6. DISPERZNI SISTEMI

Posmatrajući kinetiku određenih mikroorganizama, vidi se da je pri projektovanju njihovog efikasnog procesa potrebno obezbediti dovoljno vreme zadržavanja u reaktoru kao i efikasno mešanje. Danas se u takve svrhe koriste disperzni sistemi koji obezbeđuju dovoljnu površinu za rast biomase, kao i intezivan prenos mase.

Prva ispitivanja mogućnosti ostvarenja takvog kontakta su vršena u cilindričnim kolonama. Ako se cilindrična kolona do određene visine napuni česticama, a na perforiranom dnu obezbedi dovod fluida po čitavom poprečnom preseku (anularni tok) i u vidu mlaza u osi kolone na dnu (mlaznični tok), moguće je određenim kombinacijama ova dva toka formirati niz različitih stanja u sloju čestica.

Počev od nasutog sloja, slika 6.1a, dovođenjem fluida po poprečnom preseku kolone, dovoljnog da se izazove minimalna fluidizacija čestica u sloju obrazuje se fluidizovani sloj, slika 6.1b, koji se odlikuje neuređenim kretanjem, oscilovanjem čestica u sloju, a u zavisnosti od protoka fluida ekspanduje i povećava poroznost sloja.

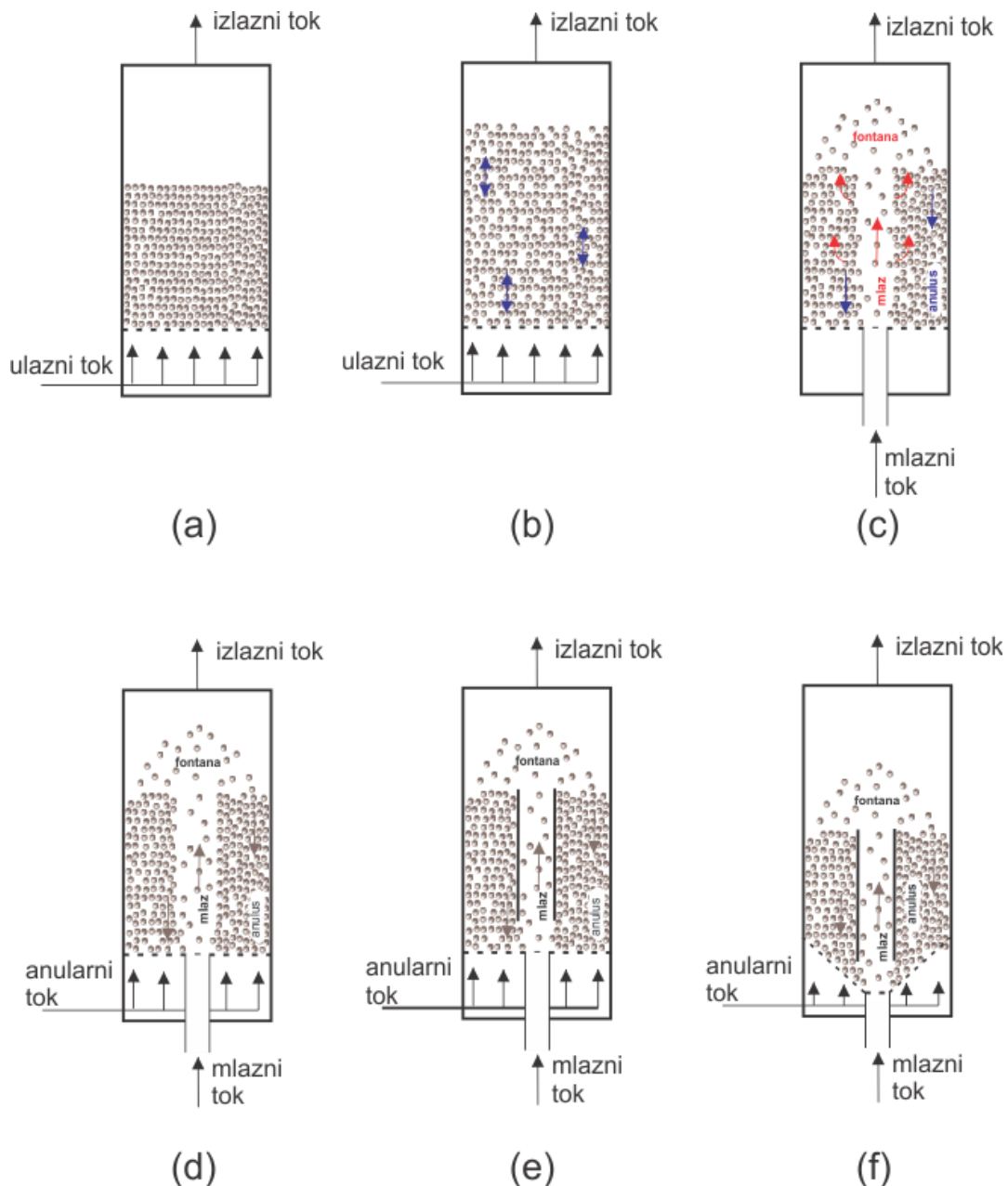
Ukoliko se fluid dovodi samo kroz mlaznicu osno postavljenu na dnu kolone, moguće je obrazovati fontanski sloj, slika 6.1c. Ovako obrazovan sloj se odlikuje uređenim kretanjem čestica u tri odvojene zone. U centralnoj zoni se čestice mlazom fluida nose naviše, da bi nakon odnošenja iznad visine nasutog sloja došle u zonu koja se naziva fontana. U njoj čestice gube kinetičku energiju i padaju na vrh sloja čestica koji okružuje mlazni tok. Ta zona se naziva anulus. Čestice se u ovoj zoni kreću naniže i u radijalnom pravcu, pa na svom putu bivaju ponovo usisane u mlaz da bi nastavile već opisani put i formirale cirkulaciono kretanje čestica u sloju. Fluid koji se dovodi mlaznicom, radi obrazovanja fontanskog sloja, kreće se u mlazu istostrujno sa česticama naviše, ali istovremeno, zbog razlike u pritisku, penetrira u anulus po radijalnom pravcu, duž čitavog mlaza, i u anulusu se kreće naviše, suprotnostrujno u odnosu na čestice. Jedan od najvažnijih parametara fontanskog sloja je maksimalna visina sloja koja se može fontanovati. Ukoliko se visina sloja povećava, dostiže se određena vrednost pri kojoj se menja struktura sloja i dolazi do pojave fluidizacije čestica na vrhu. Ova visina je maksimalna visina sloja koji se može fontanovati.

Fontansko-fluidizovani sloj, slika 6.1d, se obrazuje pri istovremenom dovođenju fluida, mlazničnim i anularnim tokom. Karakteriše se istim kretanjem čestica kao i fontanski sloj, ali sa znatno većom količinom fluida u anularnoj zoni, a samim tim i intenzivnijim kontaktom čestica i fluida. Kod fontansko-fluidizovanog sloja maksimalna visina direktno zavisi od vrednosti brzine fluida koji se dovodi nezavisnim anularnim tokom, kao i od vrednosti odnosa brzina fluida na vrhu sloja pri maksimalnoj visini.

Još jedna od mogućnosti je fontansko-fluidizovani sloj sa centralnom cevi, slika 6.1e, gde se nezavisnim anularnim tokom napaja anulus sloja i time povećava intenzitet kontakta fluid-čestice.

Pored klasičnih cilindričnih kolona opisana stanja je moguće obrazovati i u kolonama različite geometrije. Na osnovu dugogodišnjih ispitivanja ovakvih sistema pokazalo se da je fontansko-fluidizovani sloj sa centralnom cevi i koničnim dnom, slika 6.1f, optimalno rešenje za većinu procesa.

Kombinovanjem tokova i geometrije moguće je doći do različitih izvedbi ovakvih sistema.

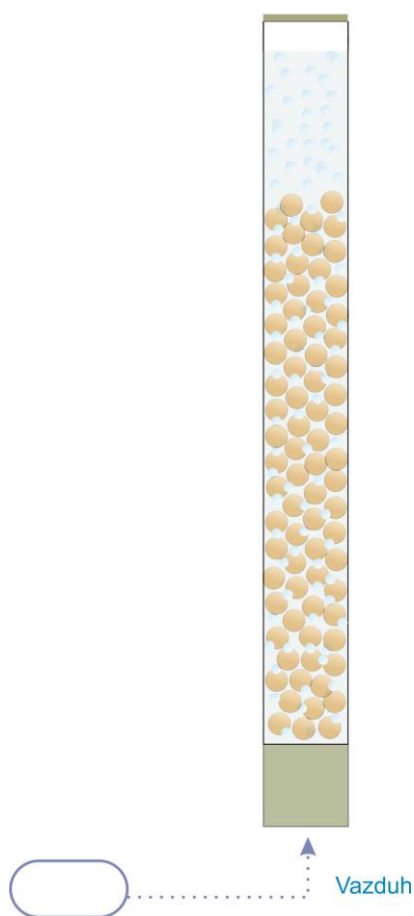


Slika 6.1. Formiranje različitih stanja u sloju čestica različitim kombinacijama anularnog i mlaznog toka i geometrije reaktora

## 7. UKLANJANJE AZOTA U KOLONI SA PAKOVANIM SLOJEM KERAMIČKIH KUGLICA

### 7.1. EKSPERIMENTALNI SISTEM

Ekperimentalna ispitivanja nitrifikacionog procesa izvođena su šaržno u staklenoj koloni, visine 660 mm i prečnika 45 mm sa pakovanim slojem čestica, slika 7.1. Sloj čestica su činile keramičke kuglice srednjeg prečnika 9 mm, sa hrapavom, poroznom površinom, slika 7.2. Keramičke kuglice sa formiranim biofilmom prikazane su na slici 7.3. Masa sloja čestica je iznosila 500 g, a količina tečnosti u koloni 0,6 L. Vazduh je u kolonu uveden sa dna preko distributora, protokom od 100 L/h.



Slika 7.1. Šema eksperimentalnog sistema



Slika 7.2 . Nosači mikroorganizama-keramičke kuglice



Slika 7.3. Keramičke kuglice sa formiranim biofilmom

Kolona je zasejana sa 200 mL aktivnog mulja iz aerobno/anoksi bazena sa postrojenja za tretman komunalnih otpadnih voda grada Subotice. Za eksperiment je korišćena sintetička otpadna voda koja je sadržala nutrijente i elemente u tragovima neophodne za rast mikroorganizama u određenim koncentracijama datim u tabeli 7.1. Kao izvor azota korišćen je amonijum hlorid ( $NH_4Cl$ ) čije su koncentracije menjane sa vremenom. Vrednost  $pH$  je održavana oko 7,5 pomoću rastvora  $NaHCO_3$ . Koncentracija rastvorenog kiseonika u masi vode je održavana oko 6 mg/L. Temperatura vode se kretala u opsegu 20 – 32 °C, u zavisnosti od ambijentalne temperature. Koncentracija azota u vodi je određivana fotometrijski, a koncentracija kiseonika,  $pH$  vrednost i temperatura su određivane pomoću *WTW oxi 340i*.

Tabela 7.1. Sastav sintetičke otpadne vode

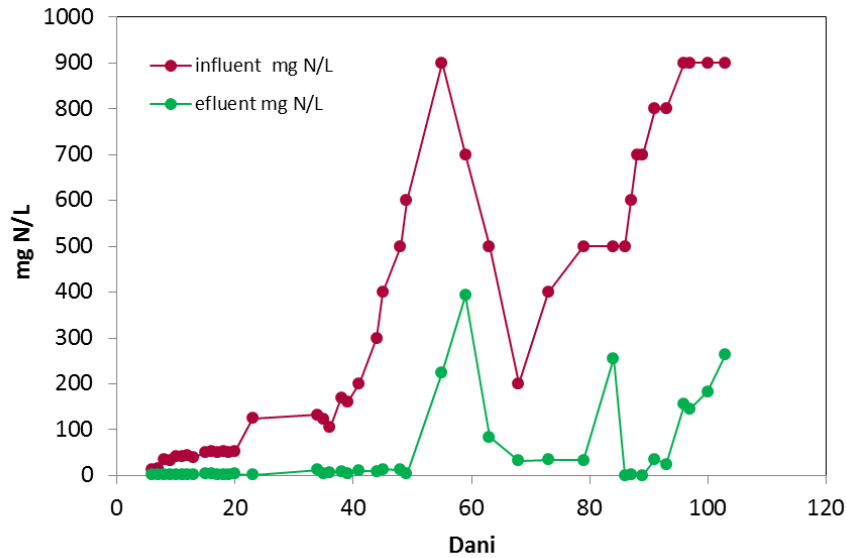
Supstanca	Koncentracija, mg/L
$NH_4Cl - N$	25-900
$NaCl$	50-900
$MgSO_4$	130-2300
$KCl$	30-500
$CaCl_2$	40-720
$NaHPO_4$	230-4100
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03
$ZnCl_2$	0,1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,004
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,72
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1,55

Aklimatizacija mulja je trajala oko 6 dana, nakon čega je detektovano uklanjanje azota. Imobilizacija bakterija je trajala 15 dana, nakon čega je voda sa preostalim suspendovanim mikroorganizmima ispuštena iz kolone. Nakon perioda zasejavanja, svakog dana je iz kolone ispuštena voda i ulivana nova sintetička otpadna voda sa određenom koncentracijom azota i neophodnim elementima. Rezultati eksperimentalnog istraživanja su prikazani do 103. dana trajanja procesa, s tim što je kolona sa pakovanim slojem keramičkih nosača i nakon toga održavana u radu.

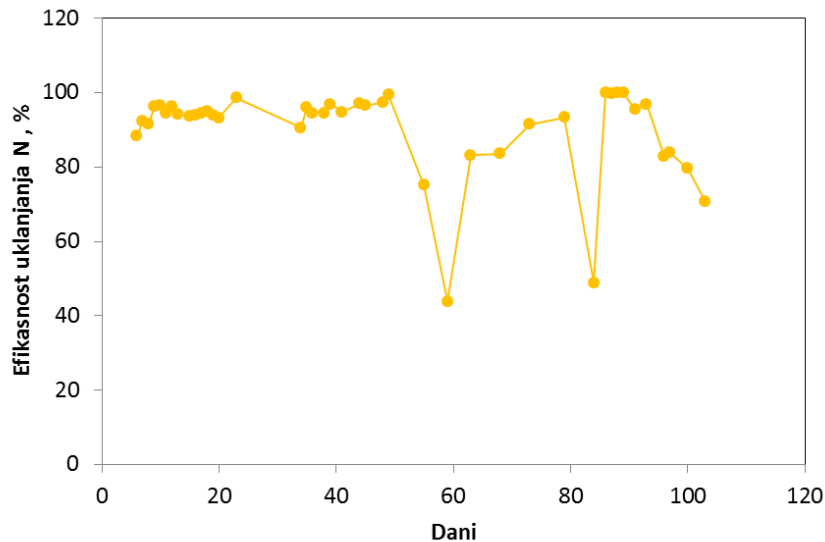
Biofilm je posmatran pomoću *FE* skenirajućeg elektronskog mikroskopa (*FE – SEM*, TESCAN MIRA 3 XMU), nakon prethodne pripreme uzorka. Priprema uzorka za *FE – SEM* je obuhvatala držanje uzoraka 48h u 2,5 % glutraldehidu, zatim ispiranje uzoraka držanjem po 15 minuta u 3% sirćetnoj kiselini, 3% sirćetnoj kiselini i 25% alkoholu (1:1), 3% sirćetnoj kiselini i 50% alkoholu (1:1) i 70% alkoholu, sukcesivno. Potom je rađeno prevlačenje površine uzorka tankim slojem zlata nakon koje je omogućena vizuelizacija uzorka pomoću *FE – SEM* koji je radio na 20 keV. Analiza mikrobiološke populacije imobilisane na nosačima je urađena od strane Instituta za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo (IMGGI).

## 7.2. REZULTATI I DISKUSIJA

Dobijeni rezultati eksperimentalnog istraživanja u koloni sa pakovanim slojem keramičkih nosača su prikazani na slikama 7.4. i 7.5. Na slici 7.4. je prikazana promena koncentracije azota u influentu i efluentu tokom vremena, a na slici 7.5. promena efikasnosti procesa nitrifikacije u ispitivanom sistemu.



Slika 7.4. Koncentracija azota u influentu i efluentu tokom vremena



Slika 7.5. Efikasnost nitrifikacionog procesa tokom vremena

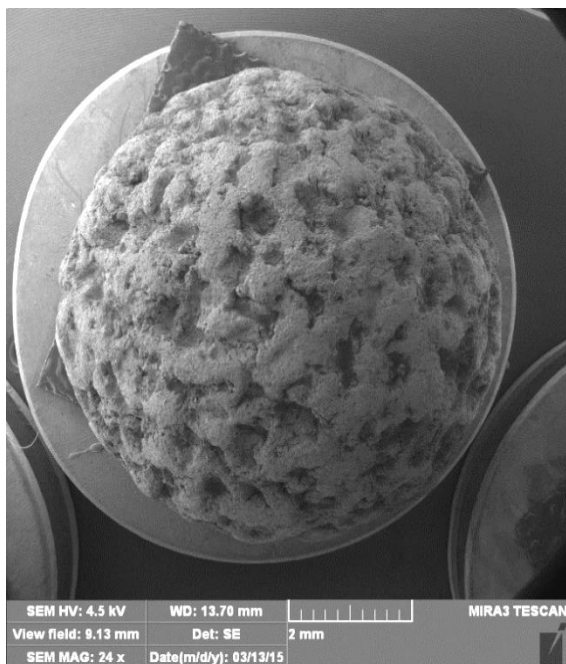
Dobijeni rezultati pokazuju da se u ispitivanom sistemu dostizala visoka efikasnost uklanjanja azota u opsegu 80 – 100%, međutim, mogu se uočiti i tri drastična pada efikasnosti. Nakon detektovanih padova efikasnosti uklanjanja azota, vršeno je manuelno skidanje viška biofilma sa keramičkih nosača, posle čega se na osnovu dobijenih rezultata vidi porast i ponovno dostizanje visoke efikasnosti procesa nitrifikacije.

Pad u efikasnosti može poticati od limitirane difuzije kiseonika kroz biofilm, usled formiranja debljeg biofilma. Međutim u koloni sa pakovanim slojem nosača biofilma vrednosti koncentracije rastvorenog kiseonika su iznosile oko 6 mg/L. Ove koncentracije rastvorenog kiseonika su visoke i smatraju se dovoljnim za aerobne procese u biofilmovima, pa se pretpostavlja da koncentracija rastvorenog kiseonika nije predstavljala limitirajući parametar procesa. Potvrda ovih rezultata može se dobiti dodatnim eksperimentalnim ispitivanjima vrednosti koncentracije kiseonika unutar slojeva biofilma pomoću mikroelektroda (*Mašić i dr., 2010*).

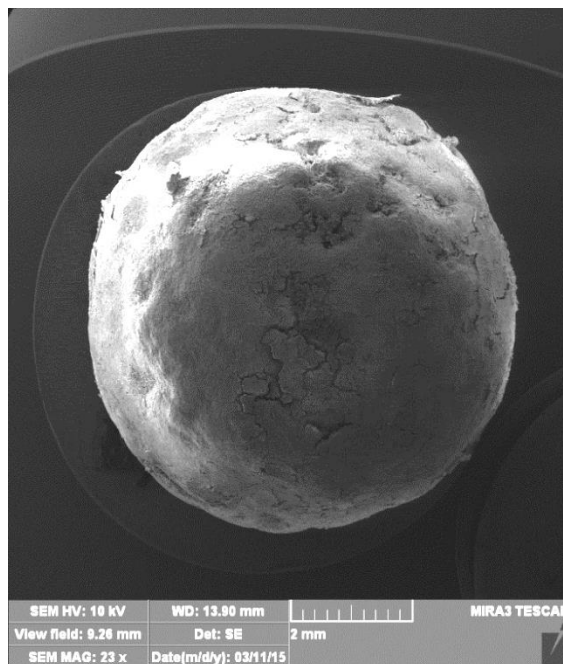
Vrednosti *pH*, takođe, predstavljaju inhibitorne parametre procesa nitrifikacije. Biofilmovi zbog svoje kompleksnosti stvaraju svoje mikrokruženje, zbog toga *pH* vrednosti u heterotrofnom nitrifikacionom biofilmu mogu da budu za oko 0,5 jedinica *pH* niže nego u masi tečnosti, pa čak i za jednu jedinicu *pH* niže kada su u pitanju autotrofno-heterotrofni biofilmovi (*Siegrist i Gujer, 1987*). U ispitivanoj koloni sa nepokretnim slojem, vrednost *pH* je održavana oko 7,5 pomoću natrijum bikarbonata, tako da se uzevši u obzir i niže vrednosti *pH* unutar biofilma, pad efikasnosti procesa nitrifikacije ne pripisuje ni ovom parametru.

Verovatan razlog dobijanja rezultata koji pokazuju pad efikasnosti uklanjanja azota nakon određenog perioda odvijanja procesa je pad aktivnosti nitrifikacionih bakterija usled nagomilavanja ćelijskih ostataka, što rezultuje povećanjem debljine biofilma. Izgled formiranog biofilma u koloni 100-tog dana procesa je prikazan na slici 7.6.

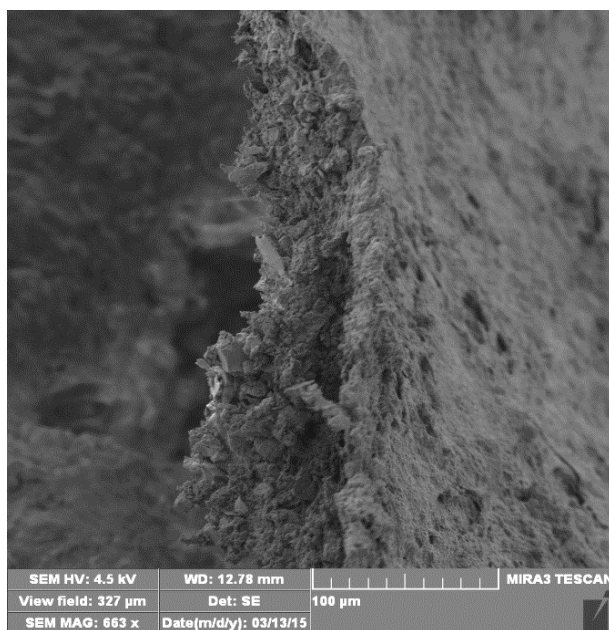




a)



b)



c)

Slika 7.6. a) Keramička kuglica bez biofilma; b) Keramička kuglica sa biofilmom; c) Izgled biofilma

Na osnovu istraživanja procesa nitrifikacije u reaktorima sa nosačima može se reći da je ključni parametar aktivnost biofilma (*Liu i Capdeville, 1996*). Brzina biohemijske transformacije direktno je zavisna od metaboličke aktivnosti mikrobiološke zajednice, a ne od ukupne biomase u reaktoru. Akumulacija neaktivnih materija unutar biofilma veoma utiče na fiziološko stanje biofilma. Prisustvo neaktivnih materija nameće promene mikrobnog metabolizma koji dalje utiče na promene mikrobiološke aktivnosti kao i na rast mikroorganizama. Kao što je prethodno navedeno, tanji biofilmovi se karakterišu maksimalnom mikrobiološkom aktivnošću (*Liu i Capdeville, 1996*), za razliku od debljih biofilmova. Glavnu ulogu u formiranju određene debljine biofilma ima hidrodinamika sistema, odnosno sistemi sa pokretnim slojem nosača dovode do formiranja tanjih biofilmova. Ovo ističe niz prednosti sistema sa pokretnim slojem čestica poput bolje kontrole debljine biofilma, sprečavanja mogućnosti od začepeljivanja, ostvarivanja boljeg prenosa mase i drugih. U prilog tome su ispitivanja vršena u reaktoru sa turbulentnim režimom gde nije zabeležen značajan pad specifične aktivnosti biofilma i nakon dužeg rada ovog sistema, za razliku od reaktora sa pakovanim slojem u kom je zabeležen pad aktivnosti u debljem formiranom biofilmu (*Lazarova i dr., 1994*), što je slučaj i sa ispitivanim sistemom sa pakovanim slojem keramičkih nosača biofilma.

Eksperimentalnim istraživanjima utvrđeno je da se tanji biofilmovi formiraju pod dejstvom većih smicajnih sila u sistemu. Formirani tanji biofilmovi se odlikuju većom stabilnošću i većom koncentracijom aktivne biomase, odnosno visokom aktivnošću biofilma koja predstavlja ključni parametar u optimizaciji operativnih karakteristika reaktora (*Alves i dr., 2002*).

Na osnovu prethodno navedenih prednosti tanjih biofilmova kao i prethodno navedenih prednosti fontansko-fluidizovanih slojeva formiran je dalji tok eksperimentalnih istraživanja.

## 8. FONTANSKO-FLUIDIZOVANI SLOJ SA CENTRALNOM CEVI

### 8.1. ISPITIVANJE PRENOSA MASE KISEONIKA U FONTANSKO-FLUIDIZOVANOM SLOJU SA CENTRALNOM CEVI

U aerobnim procesima za adekvatno odvijanje procesa uklanjanja zagađujućih materija iz otpadne vode, limitirajući faktor je koncentracija rastvorenog kiseonika. U reaktorima sa imobilisanim mikroorganizmima na nosačima zbog difuzije i gradijenta koncentracije u biofilmovima, neophodno je da koncentracija rastvorenog kiseonika u masi vode bude veća nego što je to bio slučaj u reaktoru sa suspendovanom mikroflorom. Kao što je već rečeno, autotrofne bakterije su veoma osetljive na koncentraciju rastvorenog kiseonika u reaktorima i ukoliko ga nema dovoljno proces nitrifikacije biva inhibiran. Pošto aeracija predstavlja energetska najskuplji deo procesa neophodno je odrediti optimalnu vrednost koncentracije rastvorenog kiseonika kako se ne bi narušila ni jedna karakteristika procesa. Koncentracija rastvorenog kiseonika takođe ima veoma važnu ulogu u sistemima u kojima se simultano uklanja organsko zagađenje i azot, jer imobilisani heterotrofi i autotrofi se pored kompeticije za prostor u biofilmovima (*Ohashi i dr., 1995; Tijhuis i dr., 1994; van Benthum i dr., 1997*), bore i za zajednički akceptor elektrona, kiseonik, pa i za elektron donor (*Morgenroth i Wilderer, 2000; Okabe i dr., 1995; Rittmann i Manem, 1992; Rittman i dr., 2002*). Ukoliko rastvorenog kiseonika nema dovoljno struktura biofilma može biti narušena, a samim tim i ceo proces.

Efikasnost prenosa mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu, najbolje se opisuje preko vrednosti zapreminskog koeficijenta prenosa mase  $k_L a$  (*Benyhaia i dr., 1996*).

U različitim tipovima trofaznih sistema sa fluidizovanim slojem, biofilterima i airlift reaktorima, brojni istražvači ispitivali su uticaj brzine gasa i tečnosti, uticaj distributora vazduha, karakteristika i količine čvrste faze u sistemu, viskoziteta tečnosti, na zapreminski koeficijent prenosa mase (*Chen i Leu, 2001; Freitas i Teixeira, 2001; Hamdad i dr., 2007; Maldonado i dr., 2008; Miura i dr., 2012*).

Kao čvrsta faza korišćene su čestice različitih prečnika i gustina, poput staklenih, polietilenskih, čestica silicijum-dioksida, Ca-alginata, prahova nikla (*Bukur i dr., 1990; Chen i Leu, 2001; Freitas i Teixeira, 2001; Hamdad i dr., 2007; Herskowitz i Merchuk, 1986; Lee i dr., 1993; Schumpe i dr., 1989; Sivasubramanian, 2010; Vandu i Krishna, 2004; Yang i dr., 2001*).

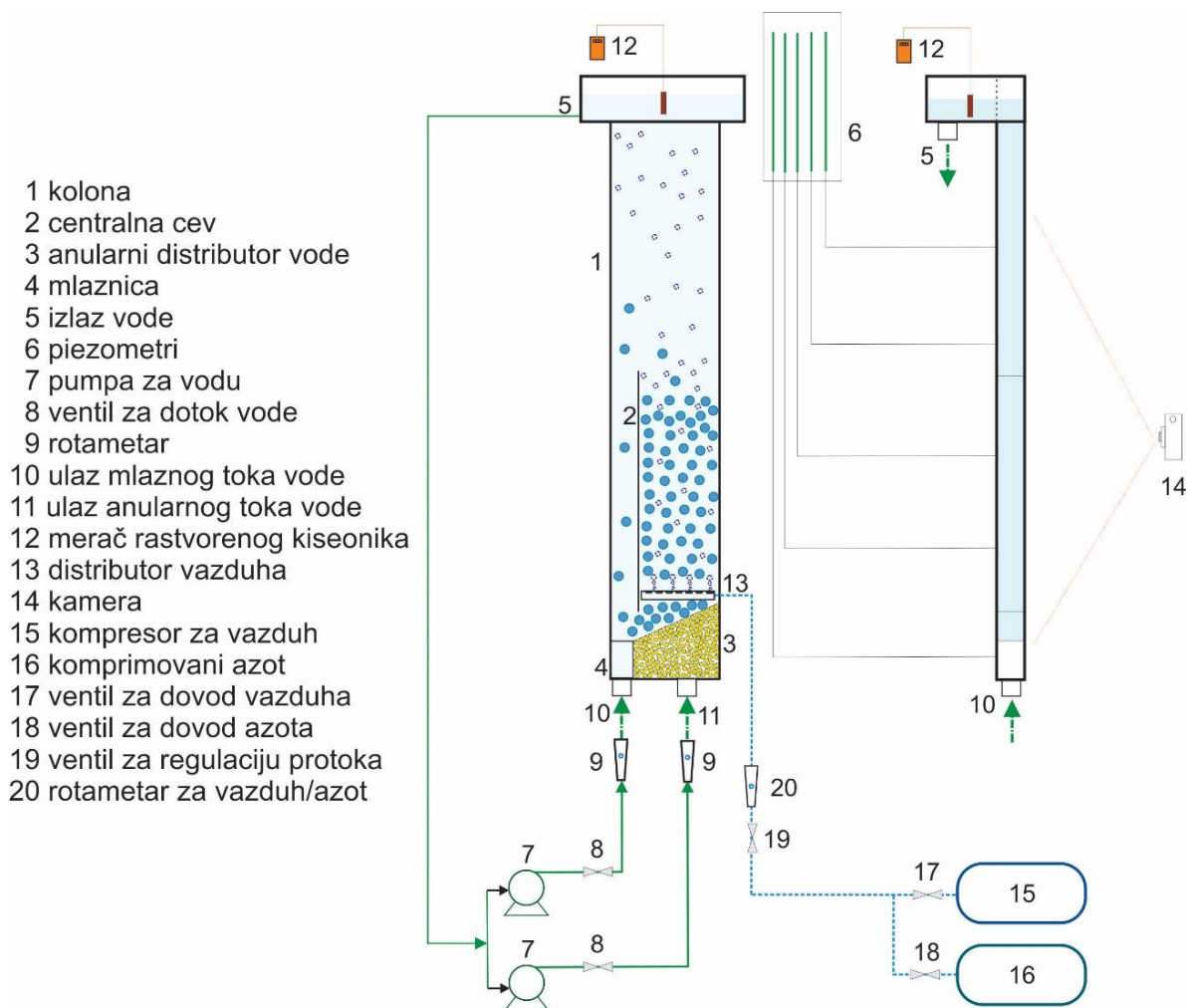
Kao tečna faza korišćena je česmenska voda, etanol, parafinsko i telus ulje, CMC, tetradekan (*Freitas i Teixeira, 2001; Hamdad i dr., 2007; Vandu i Krishna, 2004*).

Pregledom literature, može se uočiti dosta suprotstavljenih rezultata i različitih tumačenja uticaja ispitivanih parametara na prenos mase kiseonika u trofaznim sistemima. Međutim, ono što su istraživanja pokazala je da zapreminski koeficijent prenosa mase zavisi od distribucije i veličine mehurova u sistemu (*Camarasa i dr., 1999*) kao i da ponašanje mehurova u sistemu, koje je uglavnom uslovljeno načinom disperzije, ima direktan uticaj na prenos mase i hidrodinamiku sistema (*Deckwer i Schumpe, 1993*). Kako će koji parametar da utiče na formiranje mehurova, odnosno prenos mase, zavisi od fluido-mehaničkih karakteristika ispitivanog sistema.

Da bi se reaktor sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi mogao primeniti pri aerobnom tretmanu otpadnih voda, u nitrifikacionim procesima, neophodno je ispitiati uticaj njegovih fluido-mehaničkih karakteristika na prenos mase kiseonika.

### 8.1.1. EKSPERIMENTALNI SISTEM

Ekperimentalna ispitivanja fluido-mehaničkih karakteristika reaktora sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi na prenos mase kiseonika su izvedena u 2D polukoloni od pleksiglasa, dimenzija 200 x 50 mm, ukupne visine 1000 mm, sa centralnom cevi dužine 400 mm, kvadratnog poprečnog preseka 50 x 50 mm, postavljene na 40 mm od vrha mlaznice, slika 8.1.1.1.



Slika 8.1. Šema eksperimentalnog sistema

Voda je uvođena kroz mlaznicu, dimenzija  $50 \times 50 \text{ mm}$  i u anulus preko raspodeljivača koga je činio pakovani sloj staklenih sfera prečnika  $6 \text{ mm}$ . Dno anularnog dela kolone je postavljeno pod uglom od  $30^\circ$ , radi sprečavanja pojave mrtvih zona pri cirkulaciji čestica. Anularni i mlazni tokovi su uvođeni pomoću dve odvojene pumpe, snage  $350 \text{ W}$ , sa maksimalnim radnim protokom od  $7,5 \text{ m}^3/\text{h}$  i pritiskom od  $1 \text{ bar}$ . Za snabdevanje vazduhom korišćen je kompresor. Vazduh je uvođen na dnu anulusa pomoću cevnog distributara, sa otvorima prečnika  $1 \text{ mm}$ . Protoci fluida su mereni preko odgovarajućih rotametara.

Protok vode kroz mlaz je iznosio  $2,5 \text{ m}^3/\text{h}$ , a protoci vode kroz anulus su iznosili  $0,5, 1,0, 1,5, 2,0 \text{ m}^3/\text{h}$ . Ove vrednosti protoka su korišćene za sve tipove ispitivanih čestica da bi se pod istim eksperimentalnim uslovima ispitaio uticaj prečnika čestica na prenos mase kiseonika. Tečnost je recirkulisala kroz kolonu. Protoci vazduha su se menjali od  $300$  do  $800 \text{ L/h}$ .

Uticaj protoka tečnosti na cirkulaciju čestica kroz centralnu cev se ispitivao merenjem mase čestica koja cirkuliše iz centralne cevi ka anulusu, pri određenom protoku vode. Određena masa čestica je prikupljana pomoću specijalno dizajniranog hvatača koji je pomoću konzole postavljan na površinu anulusa, pružajući zanemarljiv otpor i ne remeteći protoke fluida niti čestica. Konzola je omogućavala spuštanje i podizanje hvatača u tačno određenom vremenu. Maseni protok čestica je određivan na osnovu prikupljene mase čestica u određenom vremenu.

Ispitivanja prenosa mase kiseonika rađena su sa česmenskom vodom, na sobnoj temperaturi, iz koje je pomoću gasovitog azota uklanjan rastvoren kiseonik do koncentracija ispod  $1 \text{ mg/L}$ . Nakon uklanjanja rastvorenog kiseonika, u kolonu se istim tokom kojim je uvođen azot, uvodio vazduh do dostizanja koncentracije rastvorenog kiseonika koja je iznosila  $95\%$  od saturacione na radnoj temperaturi. Promena koncentracije rastvorenog kiseonika u koloni sa vremenom merena je pomoću oksimetra, *WTW Oxi 340i*, čija se sonda nalazila na vrhu kolone. Zapreminski koeficijent prenosa mase,  $k_L a$  je određivan pomoću dinamičke metode (*Letzel i dr., 1999; Vandu i Krishna, 2004*) uz pretpostavku da je tečnost bila idealno izmešana. Ova pretpostavka je bila potvrđena ubrizgavanjem metil ljubičastog u mlazni i anularni tok i vizuelnim zapažanjem izmešanosti ove dve struje u delu gde je bila postavljena oksidna sonda. Takođe, pretpostavka da je tečnost u koloni bila idealno izmešana je potvrđena dobijanjem sličnih izmerenih vrednosti koncentracije rastvorenog kiseonika na dnu i vrhu kolone.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C_t) \quad (8.1)$$

U jednačini (8.1),  $C^*$  predstavlja koncentraciju saturacije kiseonikom, a  $C_t$  koncentraciju rastvorenog kiseonika u trenutku vremena. Integracijom jednačine (8.1) uz pretpostavku da je  $C_0$  koncentracija rastvorenog kiseonika u vremenu  $t = 0$ :

$$\ln(C^* - C_t) = \ln(C^* - C_0) - k_L a \cdot t \quad (8.2)$$

Vrednost  $\ln(C^* - C_t)$  u funkciji od vremena je linearna, pa se iz nagiba dobijene prave izračunava vrednost  $k_L a$ . Kao punjenje korišćene su čvrste čestice od stakla, prečnika  $3, 4, 5, 6 \text{ mm}$ , gustine  $2540 \text{ kg/m}^3$ . Količina korišćenih čestica u koloni je iznosila  $3$  i  $4 \text{ kg}$ . Radi poređenja uticaja čvrste faze na prenos mase kiseonika, vrednosti  $k_L a$  su određivane i u dvofaznom sistemu, bez prisustva čestica.

Na 35 mesta na koloni, po aksijalnom i radijalnom pravcu, mereni su pritisci preko piezometara u zavisnosti od vrednosti protoka vode i vazduha u mlaznom i anularnom toku, za svaki tip ispitivanih čestica, slika 8.2. Za određivanje rezultujuće količine tečnosti koja prostrujava preko ulaznog regiona iz centralne cevi u anulus i obrnuto, korišćen je baždarni dijagram. On je obrazovan merenjem padova pritisaka kroz nasut sloj ispitivanih čestica u anulusu, pri određenim ulaznim protocima kroz anulus  $Q_A(0)$ , kada je ulazni region bio mehanički zatvoren. Za uspostavljen fontansko-fluidizovani sloj, merenjem padova pritisaka, za određene vrednosti su iz baždarnog dijagrama očitavane vrednosti odgovarajućeg protoka u anulusu,  $Q_A$ .

Radi određivanja intenziteta prostrujavanja tečnosti između anularne zone i centralne cevi, u mlazni i anularni tok je impulsno ubrizgavana boja, rastvor metil-ljubičaste, a potom je analizom fotografija uočavana razmena tečnosti između ta dva toka, pri određenim operativnim uslovima.

Radi poređenja uticaja kretanja čestica na prenos mase kiseonika u fontansko-fluidizovanom sloju,  $k_L a$  vrednosti su određivane u sistemu kada je česticama onemogućeno cirkulaciono kretanje ubacivanjem mehaničke barijere između centralne cevi i anulusa, pri istim ulaznim protocima fluida.



Slika 8.2. Merenje pritiska

Pozicije merenja pritiska gledano od  $z=0$  (izlaz mlaza) i  $r=0$  (od mlaza ka anulusu)

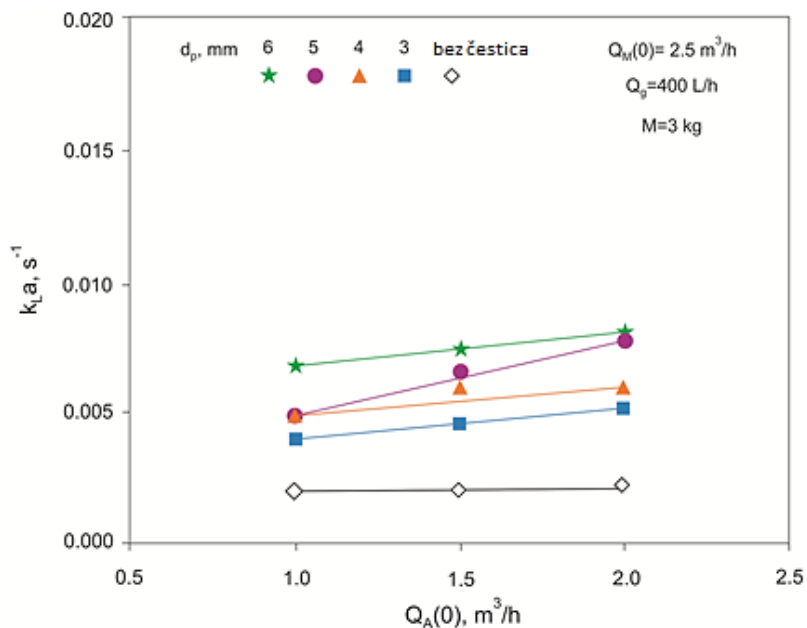
### 8.1.2. REZULTATI I DISKUSIJA

Tokom izvođenja eksperimenata nije uočena nestabilnost pri radu trofaznog sistema voda-vazduh-čestice i nije bilo moguće uočiti uticaj rastojanja centralne cevi od dna kolone (visina ulaznog regiona) na stabilnost fontanovanja. Na osnovu istraživanja koničnog fontanskog sloja, čiji se ugao baze kretao od  $28 - 45^\circ$  u sistemu gas-čestice (niskih gustina) (*Epstein i Grace, 2011; San José i dr., 2007*), definisan je kao uslov stabilnosti da odnos rastojanja centralne cevi i prečnika čestica bude manji od 10. U našem sistemu taj odnos se kretao od 6,66 do 13,33 i pri tome nije uočena nikakva nestabilnost u radu fontansko-fluidizovanog sloja.

#### **Uticaj prisustva čestica i njihovog prečnika na zapreminski koeficijent prenosa mase**

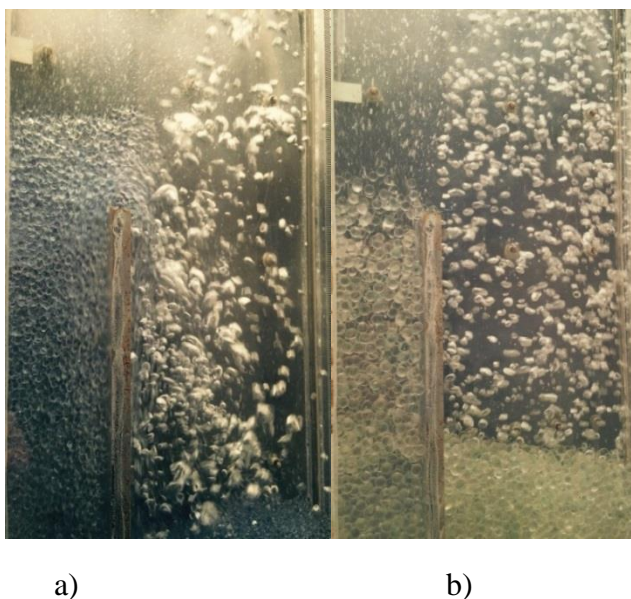
Jedan od osnovnih ciljeva istraživanja prenosa mase kiseonika u trofaznom sistemu je bilo ispitivanje uticaja čestica punjenja u fontansko-fluidizovanom sloju voda-vazduh-staklene sfere, na prenos mase kiseonika iz gasovite u tečnu fazu. Dobijeni rezultati, izraženi preko zapreminskog koeficijenta prenosa mase kiseonika, pokazuju da čestice značajno doprinose povećanju efikasnosti prenosa, slika 8.3. Poređenjem sistema bez čestica i sistema sa česticama punjenja, pokazano je da su veće vrednosti zapreminskog koeficijenta prenosa mase,  $k_L a$ , dobijene u trofaznom sistemu, nego u dvofaznom sistemu bez prisustva čestica. Jedno od objašnjenja uticaja čestica na bolji prenos mase vezuje se za smanjenje otpora prenosu mase, izraženom preko koeficijenta prenosa mase u tečnoj fazi,  $k_L$ , stalnim obnavljanjem površine za prenos mase između dva fluida (*Lee i dr., 2013*). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima eksperimentalnih istraživanja izvođenim u fluidizovanoj koloni sa staklenim česticama prečnika, 3,5 i 7 mm, gde je kao tečna faza korišćen i Njutnovski i Nenjutnovski fluid (*Miura i dr., 2012*), u airlift reaktoru sa različitim tipovima čestica, poroznim (alumina čestice) i neporoznim (keramičke čestice), sferičnim i cilindričnim, prečnika od 1,7 – 8,6 mm (*Herskowitz i Merchuk, 1986*), barbotажnoj koloni sa česticama gvožđe oksida i silicijuma (*Bukur i dr., 1990*).

Koliko i na kakav način će čestice doprineti boljem prenosu mase između gasa i tečnosti zavisi od njihovih karakteristika i sistema u kome se nalaze. Rezultati naših ispitivanja, pokazuju da vrednost  $k_L a$ , raste sa povećanjem prečnika čestica u ispitivanom opsegu od 3 do 6 mm, što je i slučaj kod ispitivanog sistema sa fluidizovanim slojem staklenih čestica prečnika 3,5 i 7 mm (*Miura i dr., 2012*).



Slika 8.3. Uticaj prečnika čestica na vrednost  $k_L a$

Sa povećanjem prečnika čestica raste inercijalna sila i moment koji doprinose boljem cepanju mehurova. Smanjivanjem prečnika mehurova, povećava se i specifična površina, a sa tim se povećava i vrednost zapreminskog koeficijenta prenosa mase (*Han i dr., 1998; Kim i Kang, 1997; Kim i Kang, 2006*). Kod sitnijih čestica povećani pad pritiska uslovljava kompresiju vazduha na dnu sloja, što izaziva srastanje mehurova, a time i „by pass“ vazduha kroz nasut sloj, slika 8.4. Veliki mehurovi imaju manju specifičnu površinu, veće brzine dizanja kroz kolonu i kraće vreme zadržavanja, što dovodi do smanjenog prenosa mase kiseonika.



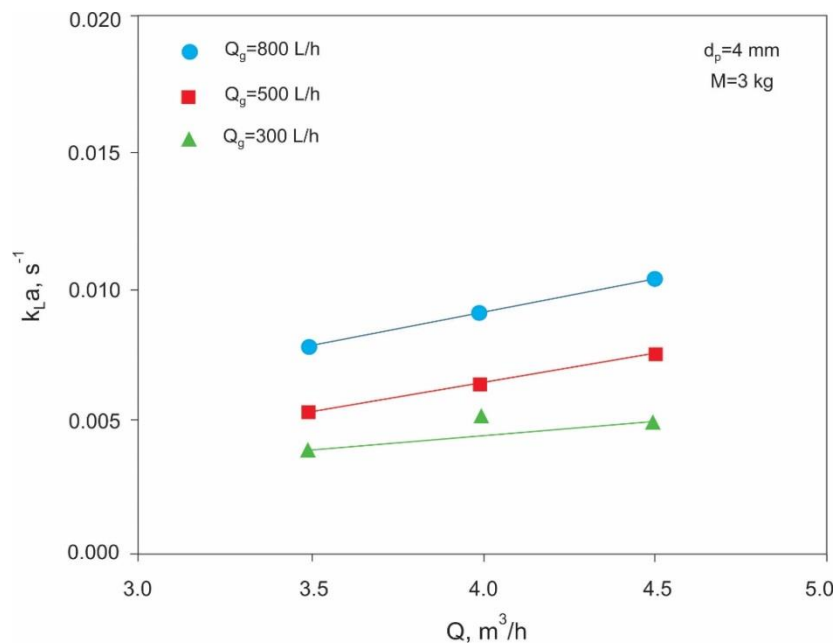
Slika 8.4. Oblici formiranih mehurova u koloni, uvođenjem vazduha kroz anulus, sa česticama različitog prečnika a)  $d_p = 3$  mm, b)  $d_p = 6$  mm, a istom masom čestica u sloju od 3 kg,

$$Q_g = 300 \text{ L/h}, Q_M(0) = 2,5 \text{ m}^3/\text{h}, Q_A(0) = 1,5 \text{ m}^3/\text{h}$$



## Uticaj protoka vazduha i protoka tečnosti na $k_L a$

Povećanjem protoka vazduha, pri konstantnom ukupnom protoku vode, izraženom kao zbir mlaznog i anularnog toka u fontansko-fluidizovanom sloju, povećava se vrednost  $k_L a$ , što pokazuju rezultati prikazani na 8.5. Dobijeni rezultati su u skladu sa ispitivanjima drugih trofaznih sistema, poput sistema sa fluidizovanim slojem gde su karbonatni/bikarbonatni puferski rastvor, ugljen dioksid i staklene čestice (1,7 – 6,0 mm) korišćeni kao tečna, gasna i čvrsta faza, respektivno, (Chang i dr., 1986), potom fluidizovanog sloja Ni-puder čestica srednjeg prečnika 0,194 mm, gde je kao tečna faza korišćen rastvor karboksimetil celuloze (CMC) (Chen i Leu, 2001), fluidizovani sloj sa recirkulacijom u kom je kao tečna faza korišćena voda, vazduh kao gasovita, a staklene čestice prečnika 0,4 mm kao čvrsta faza (Yang i sar., 2001).



Slika 8.5. Zavisnost vrednosti  $k_L a$  od protoka vazduha i ukupnog protoka tečnosti kroz kolonu

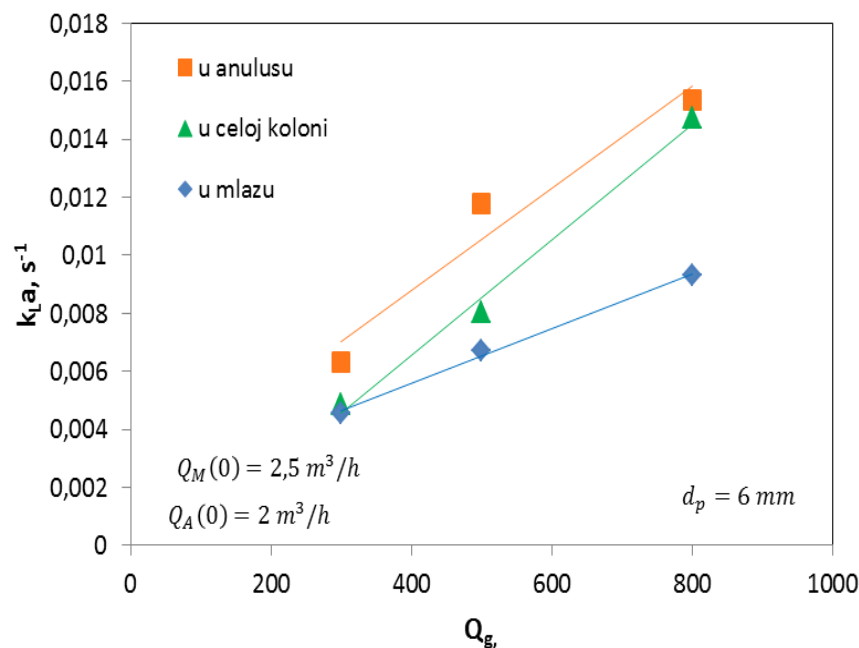
Sa povećanjem protoka vazduha, pri istim ostalim operativnim uslovima, dolazi do povećanja „hold-up“ gasa, odnosno povećava se količina mehurova u sistemu što utiče na povećanje specifične površine,  $a$ , koja doprinosi povećanju vrednosti  $k_L a$  (Chang i dr., 1986; Lee i dr., 2013).

Povećanje brzine tečnosti pospešuje turbulenciju u trofaznom sistemu, učestaliji je kontakt faza, povećava se obnavljanje površine između gasa i tečnosti, što doprinosi efikasnijem prenosu mase kiseonika. Povećanje protoka tečnosti kroz sloj čestica u koloni, odnosno intenziviranje promene brzine i smera kretanja tečnosti pri opstrujavanju čestica u sloju, doprinosi povećanju zapreminskog koeficijenta prenosa mase, slika 8.5. To se pripisuje boljem cepanju i drobljenju mehurova, što utiče na povećanje specifične površine  $a$  (Kang i dr., 2003).

Nasuprot ovome, podaci *Lee i dr., (2013)* pokazuju da povećanje brzine tečnosti značajno utiče i na smanjenje vremena boravka turbulentnih vrtloga, pa je ukupni doprinos povećanja brzine tečnosti na povećanje vrednosti  $k_L a$  mali, dok rezultati *Miura i dr., (2012)* pokazuju da vrednost  $k_L a$  čak i opada sa porastom brzine tečnosti, bilo da je u pitanju Njutnovski ili Nenjutnovski fluid. Sve ovo govori da specifičnost svakog ispitivanog sistema u pogledu geometrije i fluido-mehaničkih karakteristika ima značajan uticaj i na vrednosti  $k_L a$ .

### Uticaj mesta uvođenja vazduha u kolonu na $k_L a$

Efikasnost prenosa mase kiseonika zavisi od karakteristika sistema u kome se određuje. Takođe, efikasnost prenosa mase može da se razlikuje i u pojedinim delovima istog sistema, zbog tipa i načina rada tog sistema, što je potvrđeno od strane *Liu i dr., (2010)* koji su vršili ispitivanja prenosa mase u air-lift reaktoru sa prinudnom cirkulacijom, u šest delova sistema i računali doprinos prenosa mase svakog regiona na ukupni prenos mase u sistemu. U sistemu sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi zbog uvođenja dva nezavisna toka tečnosti i njihove međusobne interakcije koja se ostvaruje preko ulaznog regiona i cirkulacije čestica, ne ostvaruju se uniformni uslovi za prenos mase kiseonika u celom sistemu. Zbog ovakve fluido- mehanike, zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika je određivan i kada je vazduh dovođen samo u mlazni tok odnosno centralnu cev i kada je uvođen kroz celu kolonu, u sistemu sa staklenim česticama prečnika 6 mm i mase sloja 3 kg. Kada je vazduh uvođen kroz celu kolonu, protok vazduha kroz mlaz je iznosio jednu trećinu od ukupnog uvođenog protoka, a kroz anulus je uvođen ostatak odnosno dve trećine od ukupnog uvođenog protoka. Dobijeni rezultati su upoređeni sa vrednostima  $k_L a$  dobijenim pri aeraciji anularnog toka pri istim operativnim uslovima, slika 8.6.



Slika 8.6. Uticaj mesta uvođenja vazduha na  $k_L a$

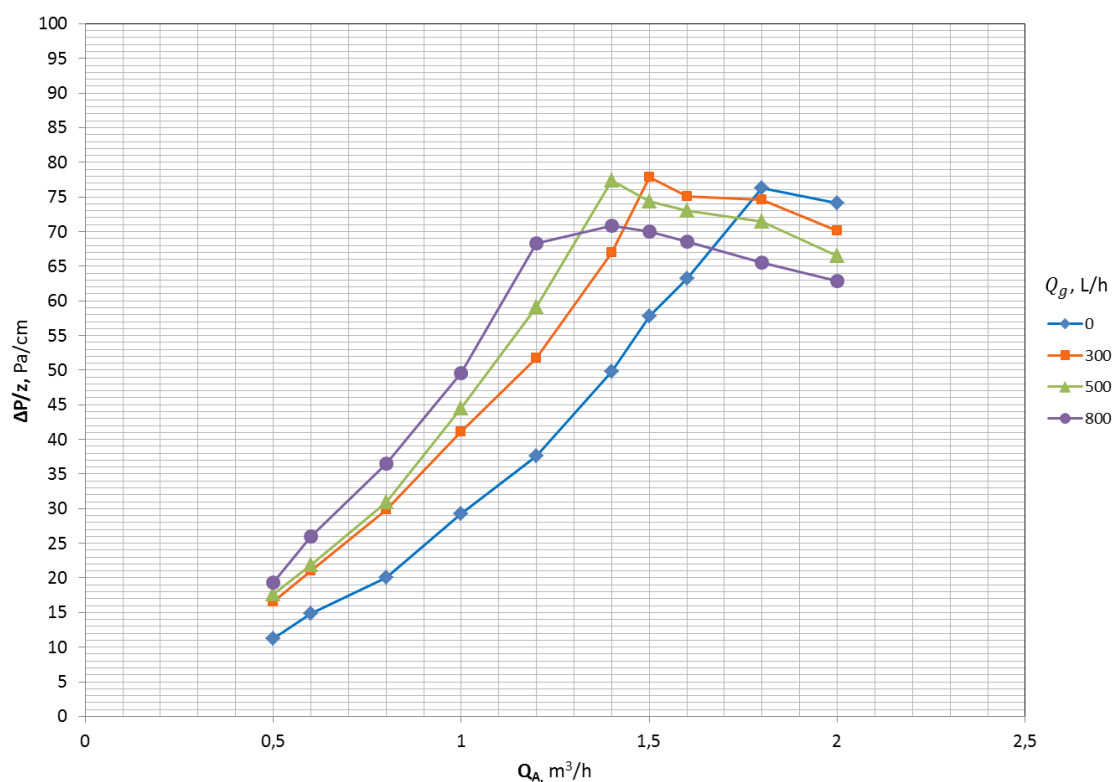
Dobijeni rezultati pokazuju da je najbolji prenos ostvaren kada je vazduh uveden samo kroz anulus. Uvođenjem vazduha samo kroz anulus, postiže se veća vrednost  $k_L a$ , od vrednosti dobijene kada je isti protok vazduha uveden samo kroz centralnu cev. Pri obrazovanju fontansko-fluidizovanog sloja kroz centralnu cev prolazi veća količina fluida koja potiče od mlaznog toka, a delom i od ulaznog anularnog protoka usled prostrujavanja. Zbog ovoga bi se očekivalo da se bolji prenos mase kiseonika ostvaruje kada se vrši aeracija centralne cevi od aeracije anulusa jer veća količina tečnosti dolazi u kontakt sa vazduhom. Međutim, dobijeni rezultati pokazuju da se to nije dogodilo. Verovatan razlog je u brzini tečnosti. Poprečni presek anulusa je veći od poprečnog preseka centralne cevi, pa se i zbog većeg protoka tečnosti kroz centralnu cev ostvaruju znatno veće brzine tečnosti kroz nju nego kroz anulus. Brzina tečnosti, dvojako deluje na prenos mase, kao što je prethodno diskutovano. U ovom slučaju negativni efekat brzine tečnosti je nadvladao, jer zbog dostignutih brzina tečnosti u centralnoj cevi onemogućeno dostizanje potrebnog vremena kontakta tečne i gasovite faze, pa je samim tim ostvaren lošiji prenos, u odnosu kada je vršena aeracija samo anularnog dela kolone.

Takođe očekivalo bi se da se uvođenjem vazduha po čitavom poprečnom preseku kolone dobije nabolji prenos mase kiseonika od tri ispitivana slučaja uvođenja vazduha, zbog toga što se u ovom slučaju cela količina tečnosti dovodi u kontakt sa vazduhom. Međutim, zbog fluido-mehanike ovakvog sistema, dobijeni rezultati pokazuju da se ni to nije dogodilo. Prethodnim razmatranjem uvođenja vazduha samo kroz centralnu cev naveden je verovatan razlog lošijeg prenosa mase nego uvođenjem vazduha samo kroz anulus, pa istovremenim uvođenjem vazduha kroz celu kolonu, dobija se efikasnost prenosa koja se nalazi između efikasnosti dobijene kada je uveden vazduh u svakom delu posebno.

### **Uticaj ulaznog anularnog protoka i protoka vazduha na prostrujavanje tečnosti preko ulaznog regiona**

Kod sistema sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi dolazi do prostrujavanja fluida iz anulusa u mlaz i obrnuto, preko ulaznog regiona (*Povrenović 1996; Erbil, 2003*). Primena fontansko-fluidizovanog sloja sa centralnom cevi sa dve ulazne struje tečnosti, od kojih se anularna struja aeriše, a mlazna ne, zahteva poznavanje protoka tečnosti koji je u anulusu u kontaktu sa vazduhom. Odnos ulaznog protoka tečnosti na dnu anulusa u odnosu na protok tečnosti kroz anulus, direktno je povezan sa intenzitetom prostrujavanja iz anulusa ka mlazu i obratno, odnosno njihovom rezultujućom vrednošću. Ovo je veoma važan fenomen sa aspekta primene ovakvih sistema u biološkom tretmanu otpadnih voda, kod kojih bi se napojna otpadna voda uvodila u anulus, a cirkulacija čestica u sloju sa imobilisanim mikroorganizmima se obezbeđivala pomoću toka prečišćene otpadne vode kroz centralnu cev.

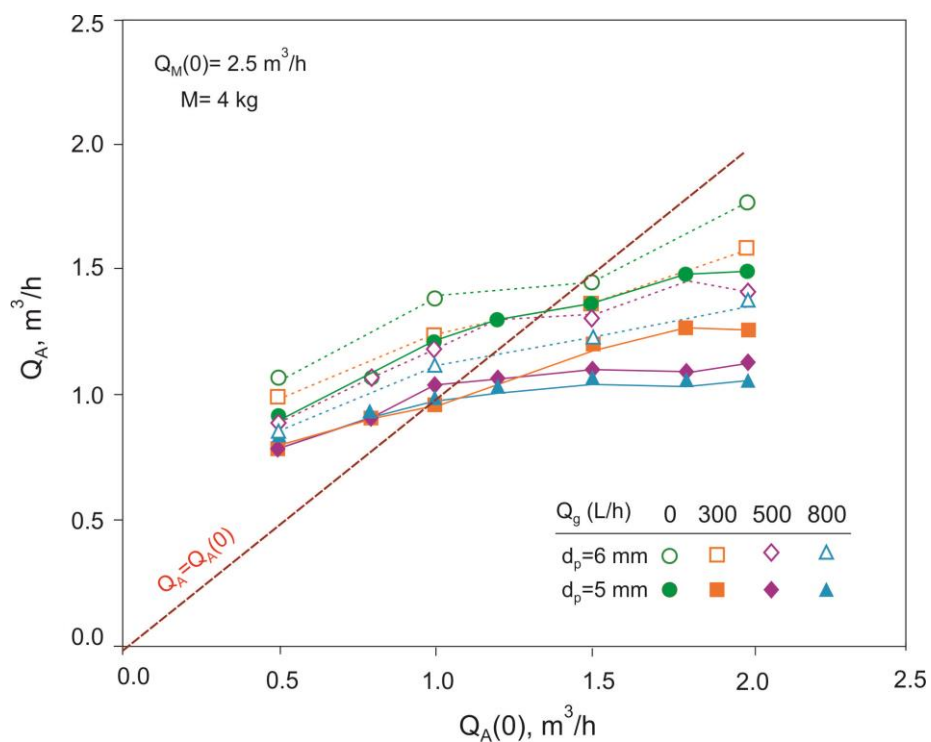
Na način koji je opisan u poglavlju 8.1.1. dobijeni su baždarni dijagrami za svaki ispitivani prečnik čestica i mase sloja, pomoću kojih su dobijene vrednosti protoka tečnosti u anulusu, odnosno dobijena rezultanta prostrujavanja. Baždarni dijagram za staklene čestice prečnika 5 mm je prikazan na slici 8.7.



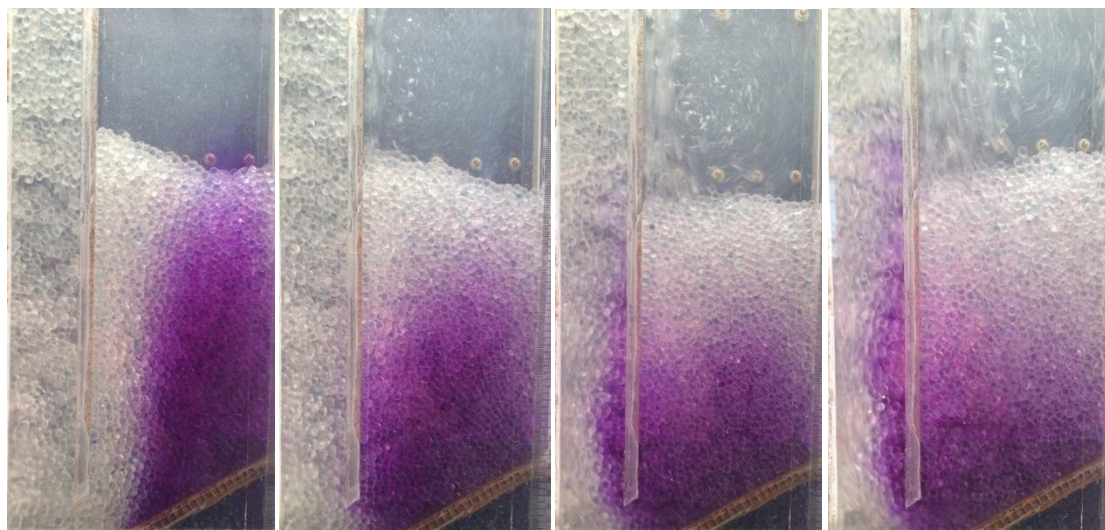
Slika 8.7. Baždarni dijagram za staklene sfere prečnika 5 mm, mase sloja 3 kg

Rezultanta prostrujavanja tečnosti u ispitivanom sistemu, bez protoka vazduha i sa protokom vazduha u anulusu je prikazana na slici 8.8. U sistemu voda-čestice sa povećanjem ulaznog anularnog toka, pri konstantnom ulaznom protoku u mlazu, dolazi do povećanja prostrujavanja iz anulusa u centralnu cev. Ovo je potvrđeno ubrizgavanjem boje u anularni tok, slika 8.9.

Prisustvo vazduha u anulusu doprinelo je dodatnom povećanju količine tečnosti koja prostrujava iz anulusa preko ulaznog regiona u centralnu cev. Ispitivanjima vršenim u cilindričnoj koloni sa ravnim dnom, gde je prostrujavanje fluida u fontansko-fluidizovanim sloju sa centralnom cevi, detektovano pomoću „tracer“ metode, takođe je pokazano da vazduh ima uticaj na prostrujavanje tečnosti (Erbil, 2006).



Slika 8.8. Uticaj protoka gasa na rezultantu prostrujavanja za sistem sa česticama prečnika, 5 mm (pune linije) i 6 mm (isprekidane linije)



a)

b)

c)

d)

Slika 8.9. Prikaz prostrujavanja tečnosti iz anulusa u mlaz ubrizgavanjem boje u anularni tok,  $d_p = 5 \text{ mm}$ ,  $M = 3 \text{ kg}$ , a)  $Q_A(0) = 0,5 \text{ m}^3/\text{h}$ , b)  $Q_A(0) = 1,0 \text{ m}^3/\text{h}$ , c)  $Q_A(0) = 1,5 \text{ m}^3/\text{h}$ , d)  $Q_A(0) = 2,0 \text{ m}^3/\text{h}$

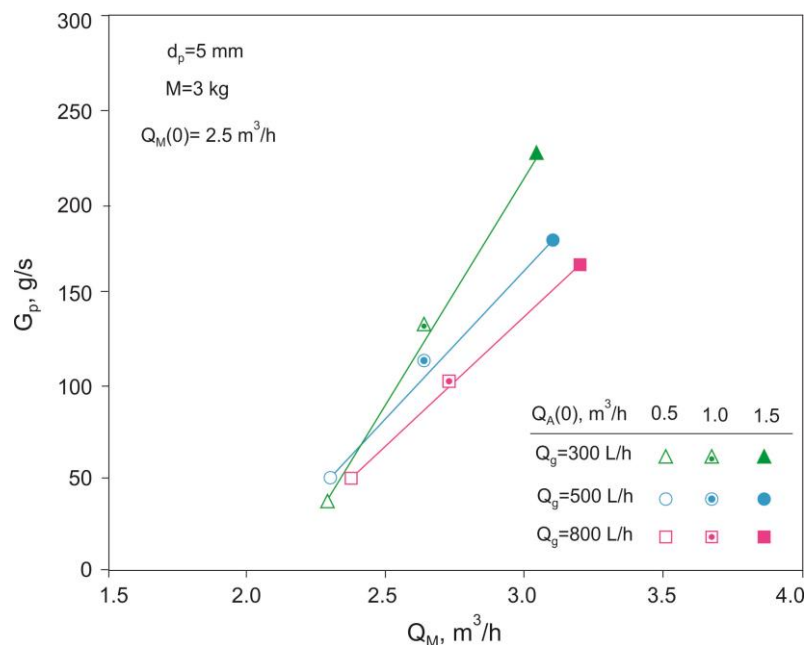
Rezultati prikazani na slici 8.8 pokazuju da je manje prostrujavanje zabeleženo u sistemu sa česticama većeg prečnika. Sloj čestica manjeg prečnika se odlikuje manjom poroznošću sloja u odnosu na sloj čestica većeg prečnika. Smanjenom poroznošću sloja je povećan otpor prolasku tečnosti, pa se zbog toga javlja i veće prostrujavanje tečnosti iz anulusa u centralnu cev u sistemu sa česticama manjeg prečnika, nego u sistemu sa česticama većeg prečnika. Ovo je omogućavalo da veća količina ulazne anularne tečnosti bude podvrgnuta aeraciji, što dodatno doprinosi povećanju vrednosti  $k_L a$  pored prethodno utvrđenog da krupnije čestice bolje drobe mehurove gasa.

### Uticaj cirkulacije i mase sloja čestica na $k_L a$

Povećanjem protoka tečnosti kroz centralnu cev, usled prostrujavanja iz anulusa, povećan je intenzitet cirkulacije čestica, a samim tim i njihova brzina kretanja naniže u anulusu. Ovo je dovelo do povećanog inteziteta i učestalosti kontakta između fluida i čestica, odnosno boljeg prenosa mase iz gasne u tečnu fazu.

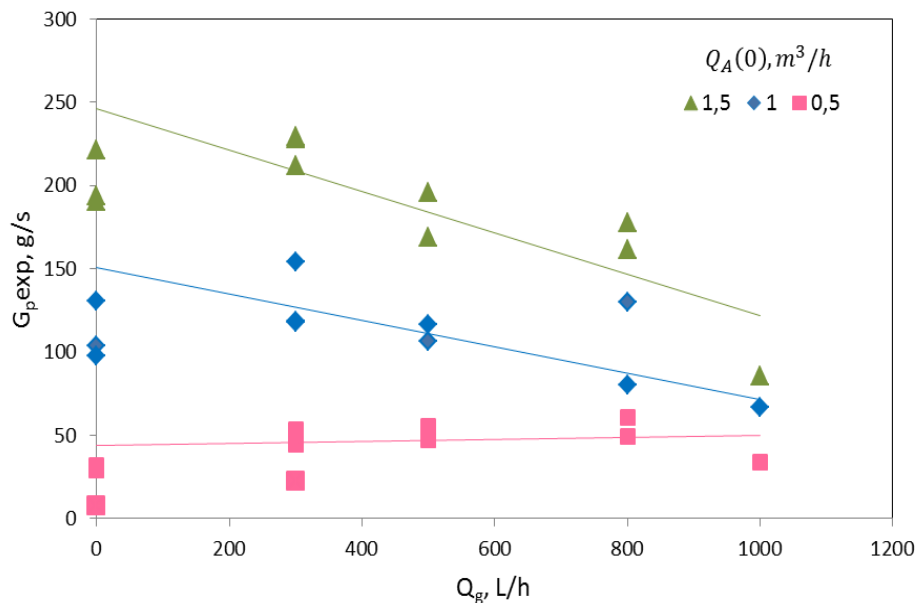
Doprinos povećane cirkulacije čestica povećanju  $k_L a$  vrednosti je uočen i u različitim ispitivanim tipovima trofaznih sistema sa fluidizovanim slojem i cirkulacijom, (Lee i dr., 2013; Son i dr., 2007; Son i dr., 2008; Son i dr., 2009).

Prisustvo vazduha u anulusu, iako je doprinelo povećanom prostrujavanju tečnosti iz anulusa u centralnu cev zbog čega bi se očekivala i povećana cirkulacija čestica, uticalo je na smanjenje protoka čestica kroz centralnu cev, slika 8.10. Mehurovi gasa koji se kreću suprotnostrujno od kretanja čestica otežavali su kretanje čestica naniže u anulusu ka ulaznom regionu. U prisustvu vazduha bila je zabeležena i ekspanzija sloja čestica u anulusu. Smanjenje cirkulacije čestica usled prisustva vazduha u anulusu pokazano je i u drugim istraživanjima (Erbil, 2006).



Slika 8.10. Uticaj protoka vazduha i protoka tečnosti kroz centralnu cev na maseni protok čestica, pri  $Q_M(0) = 2,5$   $m^3/h$ ,  $Q_A(0) = 0,5; 1,0; 1,5$   $m^3/h$

Ekperimentalni rezultati prikazani na slici 8.11. pokazuju da uticaj protoka gasa na cirkulaciju čestica zavisi od vrednosti ulaznog protoka kroz anulus. Prisustvo vazduha u sistemu deluje dvojako. Sa jedne strane utiče na veće prostrujavanje tečnosti iz anularnog dela u centralnu cev koja sa sobom povlači i veću količinu čestica, dok sa druge strane mehurovi gasa krećući se suprotnostrujno od čestica otežavaju njihovo kretanje naniže, smanjujući time cirkulaciju. Kada je ulazni protok kroz anulus  $0,5 \text{ m}^3/\text{h}$  tada je uticaj gasa na kočenje čestica zanemarljiv, jer sa porastom protoka gasa maseni protok čestica blago raste. Za veće ulazne protoke kroz anulus  $1,0$  i  $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$ , sa povećanjem protoka gasa njegov uticaj na ometanje kretanja čestica naniže postaje dominantniji pa se beleži opadanje vrednosti masenog protoka čestica.



Slika 8.11. Uticaj gasa na maseni protok čestica u zavisnosti od ulaznog protoka kroz anulus,

$$d_p = 5 \text{ mm}$$

Vrednosti za maseni protok čestica  $G_p$  su određene i računski preko jednodimenzionog vertikalnog modela transporta za sistem voda-čestice (*Grbavčić i dr., 1992*), uz pretpostavku, vizuelno potvrđenu, da vazduh koji je uvođen u anulus nije prolazio kroz centralnu cev čak i pri najvećim protocima. Pomoću modela dobijene su i vrednosti poroznosti i brzine čestica u centralnoj cevi pri operativnim uslovima. Pored ovoga vertikalni model transporta omogućava izračunavanje međufaznog koeficijenta trenja fluid-čestice, fluid-zid, čestice-zid i uspostavljanje odnosa između protoka fluida i čestica, poroznosti i gradijenta pritiska u centralnoj cevi. Pomoću ovog modela poznavanjem površinske brzine fluida u centralnoj cevi i dinamičkog gradijenta pritiska u centralnoj cevi (ne uključujući zonu ubrzanja) može se izračunati maseni fluks čestica kroz centralnu cev. Primenjene jednačine vertikalnog modela su sledeće (*Grbavčić i dr., 1992a; Grbavčić i dr., 1992b*):

$$U_d \cdot A_d + U_A \cdot A_A = Q \quad (8.3)$$

$$u_s = u_d - v_d = u_F \sqrt{F^*} \quad (8.4)$$

$$u_F = \frac{U_{mf}}{\varepsilon_d} \sqrt{\frac{\varepsilon_d^3(1-\varepsilon_d)\beta_{mf}}{\varepsilon_{mf}^3(1-\varepsilon_{mf})\beta_d}} \quad (8.5)$$

$$\beta_{mf} = \frac{\varepsilon_{mf}^3(1-\varepsilon_{mf})(\rho_p-\rho_f)g}{U_{mf}^2} \quad (8.6)$$

$$\frac{\beta_d}{\beta_{mf}} = 1 - C_2 + \frac{1}{\lambda} \left[ 1 - \left( \lambda \frac{\varepsilon_d - \varepsilon_{mf}}{1 - \varepsilon_{mf}} + C_1 \right)^2 \right]^{1/2} \quad (8.7)$$

$$C_1 = \left( 1 + \left( \frac{U_{mf}^2}{\varepsilon_{mf}^3 U_t^2} \right)^2 \right)^{-0,5} \quad (8.8)$$

$$C_2 = \frac{1}{\lambda} \sqrt{1 - C_1^2} \quad (8.9)$$

$$\lambda = \sqrt{1 - C_1^2} - C_1 \quad (8.10)$$

$$F^* = 1 + F_p^* - \frac{1-\varepsilon_d}{\varepsilon_d} F_f^* \quad (8.11)$$

$$F_p^* = \frac{F_p}{(1-\varepsilon_d)(\rho_p-\rho_f)g} \quad F_p \equiv \frac{2f_p(1-\varepsilon_p)\rho_p v_d^2}{D_d} \quad (8.12)$$

$$F_f^* = \frac{F_f}{(1-\varepsilon_d)(\rho_p-\rho_f)g} \quad F_f \equiv \frac{2f_f \varepsilon_d \rho_f u_d^2}{D_d} \quad (8.13)$$

$$-\frac{dP_d}{dz} = (1 - \varepsilon_d)(\rho_p - \rho_f)g + F_w \quad (8.14)$$

$$F_w = F_f + F_p \quad (8.15)$$

$$f_p = 0,0311g \frac{D_d}{v_d^2} \quad (8.16)$$

$$f_f = 0,0791Re_d^{-0,25} \quad (8.17)$$

$$Re_d = \frac{D_d U_d \rho_f}{\mu_f} \quad (8.18)$$

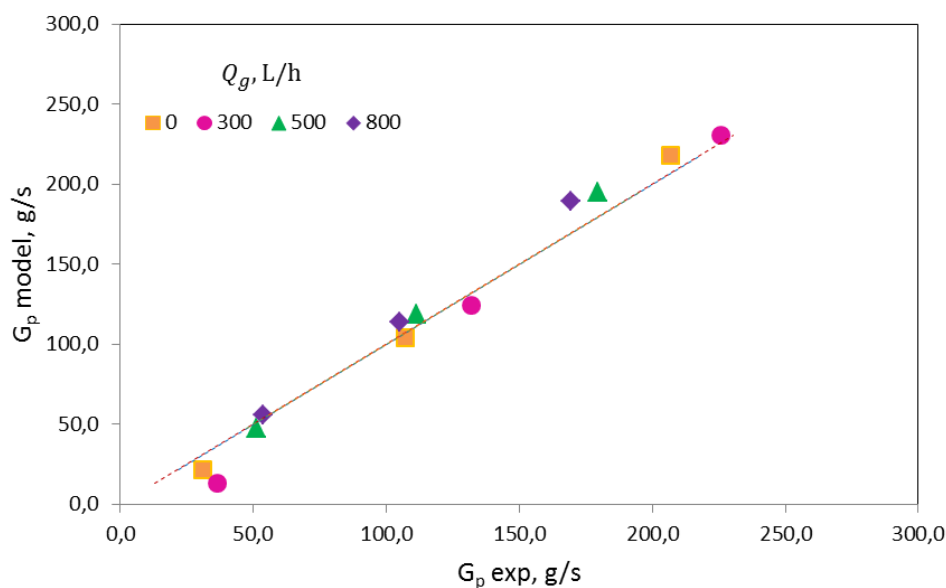
Primenom prikazanih jednačina vertikalnog modela i eksperimentalno dobijenih vrednosti padova pritiska i vrednosti protoka kroz anulus i mlaz u ispitivanoj 2D koloni sa fontansko-fluidizovanim slojem staklenih sferičnih čestica prečnika 5 mm i mase sloja 3 kg, dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 8.1.



Tabela 8.1. Rezultati dobijeni primenom vertikalnog modela

$Q_M(0)$ $m^3/h$	$Q_A(0)$ $m^3/h$	$Q_M$ $m^3/h$	$Q_A$ $m^3/h$	$Q_g$ $L/h$	$\frac{dP_d}{dz}$ $Pa/m$ (exp.)	$U_d$ $m/s$ (exp.)	$(1 - \epsilon_d)$ (cal.)	$v_d$ $m/s$ (cal.)	$W_d$ $kg/m^2s$ (cal.)	$G_p$ $(g/s)$ (cal.)	$G_p$ $(g/s)$ (exp.)
2,5	0,5	2,25	0,75	0	2243	0,250	0,170	0,020	8,677	21,69	31,14
2,5	1,0	2,50	1,00		3243	0,278	0,200	0,083	41,53	103,8	107,3
2,5	1,5	2,87	1,13		3838	0,319	0,222	0,157	87,33	218,3	206,9
2,5	0,5	2,28	0,72	300	2595	0,253	0,158	0,013	5,205	13,01	36,35
2,5	1,0	2,63	0,87		3405	0,292	0,199	0,100	49,86	124,6	132,0
2,5	1,5	3,04	0,96		3919	0,338	0,214	0,172	92,20	230,5	225,8
2,5	0,5	2,30	0,70	500	2703	0,256	0,185	0,041	19,05	47,6	51,30
2,5	1,0	2,64	0,86		3486	0,293	0,195	0,097	47,61	119,0	111,4
2,5	1,5	3,10	0,90		3757	0,344	0,195	0,160	77,99	195,0	179,6
2,5	0,5	2,36	0,64	800	2757	0,262	0,184	0,048	22,29	55,73	54,00
2,5	1,0	2,73	0,77		3486	0,303	0,184	0,099	45,66	114,1	105,1
2,5	1,5	3,20	0,80		3702	0,356	0,185	0,163	75,65	189,1	169,3

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 8.12. vidi se dobro slaganje eksperimentalno dobijenih vrednosti sa vrednostima dobijenim primenom modela za maseni protok čestica.

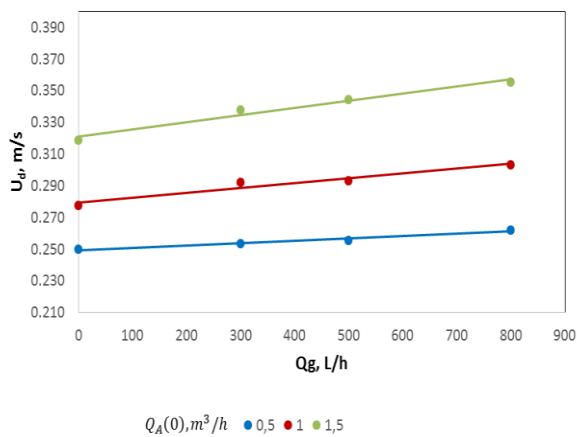


Slika 8.12. Poređenje vrednosti  $G_p$  dobijenih eksperimentalno i primenom modela

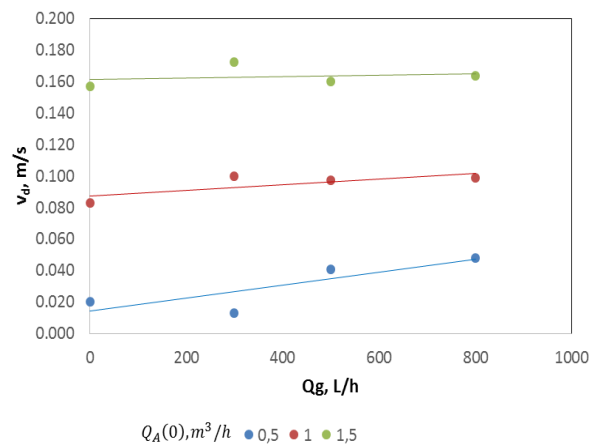
Rezultati prikazani na slikama 8.13, 8.14, 8.15, 8.16, pokazuju da povećavanjem ulaznog anularnog protoka, pri konstantnoj vrednosti ulaznog protoka kroz mlaz i bez protoka vazduha, zbog povećanog prostrujavanja, povećava se i pad pritiska duž centralne cevi iznad zone ubrzanja.

Rezultat povećanog pada pritiska je povećana vrednost  $U_d$ , kao i povećanje  $(1 - \varepsilon_d)$  i  $v_d$ . Povećanjem ovih vrednosti povećava se i maseni protok čestica.

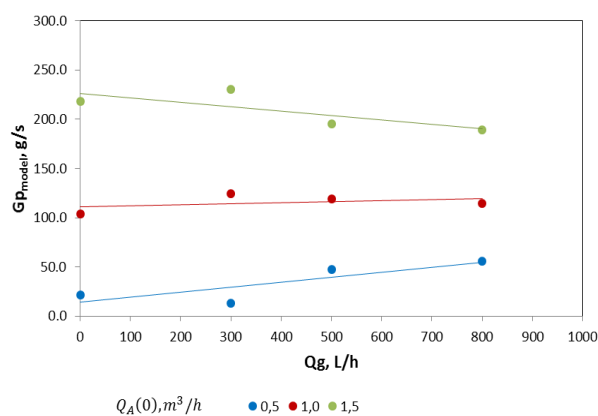
Uvođenjem vazduha u sistem, kao što je prethodno eksperimentalno potvrđeno, dolazi do smanjivanja vrednosti masenog protoka čestica pri ulaznim protocima kroz anulus od 1,0 i 1,5  $m^3/h$ . Povećavanjem protoka vazduha pri većim ulaznim protocima kroz anulus, iako  $U_d$  raste zbog povećanog prostrujavanja iz anulusa ka centralnoj cevi, a raste i  $v_d$ , jer su ove dve veličine povezane preko slip brzine, vrednost  $G_p$  opada jer opada i vrednost  $(1 - \varepsilon_d)$ , koja ima veći uticaj na maseni protok čestica. Za vrednost ulaznog protoka kroz anulus od 0,5  $m^3/h$ , sa povećanjem protoka vazduha dolazi do povećanja i  $(1 - \varepsilon_d)$  i  $v_d$ , odnosno do povećanja vrednosti  $G_p$ .



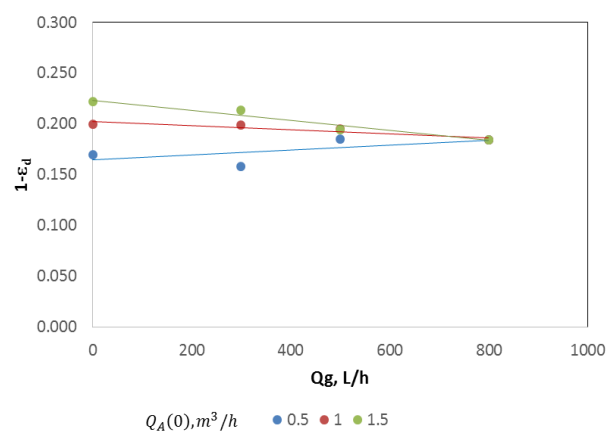
Slika 8.13. Uticaj  $Q_g$  na  $U_d$



Slika 8.14. Uticaj  $Q_g$  na  $v_d$

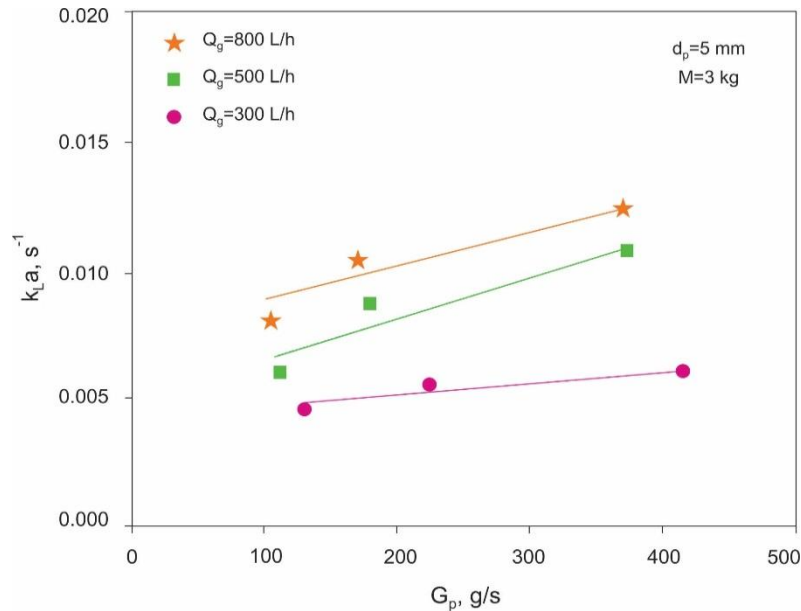


Slika 8.15. Uticaj  $Q_g$  na  $G_{pmodel}$



Slika 8.16. Uticaj  $Q_g$  na  $(1 - \varepsilon_d)$

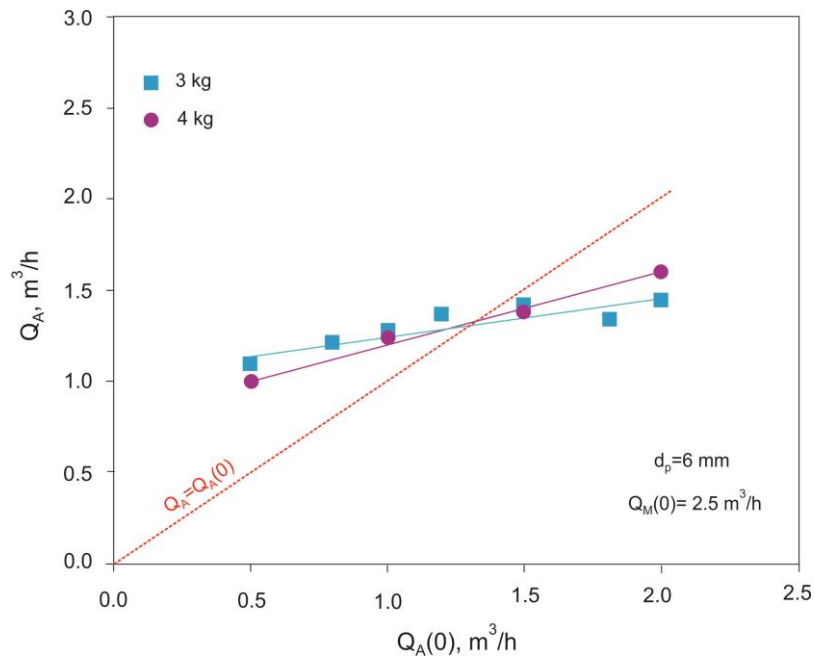
Zbirni efekat dešavanja u sloju pri ovakvim operativnim uslovima je da na povećanje vrednosti  $k_L a$  utiče povećanje protoka gasa kroz anulus i povećanje cirkulacije čestica kroz centralnu cev, slika 8.17.



Slika 8.17. Uticaj masenog protoka čestica  $G_p$ , na vrednost  $k_L a$ , u zavisnosti od protoka vazduha, pri ulaznim protocima kroz mlaz  $2,5 \text{ m}^3/h$ , i anulus  $1,0; 1,5; 2,0 \text{ m}^3/h$

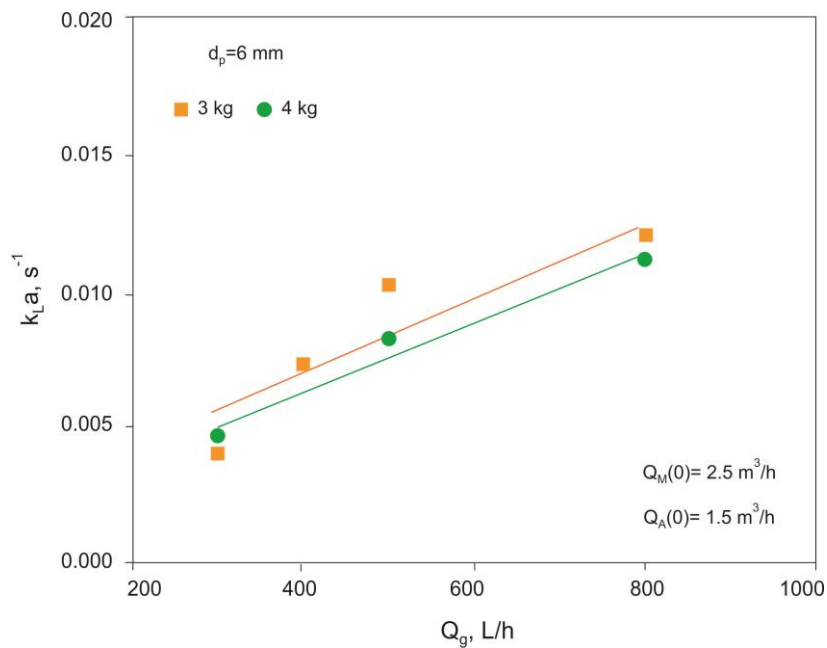
Količina čestica u sistemu takođe ima značajan uticaj na formiranje mehurova gasa. Postoje rezultati istraživanja trofaznih sistema koji ukazuju na povećanje vrednosti  $k_L a$  sa povećanjem količine čestica u sistemu (Miura i dr., 2012), ali postoje i rezultati koji pokazuju suprotno, da povećanje količine čestica uzrokuje značajan pad vrednosti  $k_L a$  (Freitas i Teixeira, 2001), kao razlog navodeći bolje drobljenje mehurova, u jednom, odnosno izraženiju koalescenciju mehurova, u drugom slučaju.

Sa povećanjem količine čestica u sloju, javlja se veći otpor proticanju fluida. Rezultati na slici 8.18. pokazuju da pri malim vrednostima ulaznog protoka kroz anulus, kada je rezultanta prostrujavanja u pravcu mlaz-anulus, manja količina tečnosti prostrujava iz mlaza u anulus u sistemu sa  $4 \text{ kg}$  nego sa  $3 \text{ kg}$  čestica. Pri većim vrednostima ulaznog protoka kroz anulus, kada je rezultanta prostrujavanja u pravcu anulus – mlaz, veća količina tečnosti prostrujava iz anularnog dela ka centralnoj cevi u sistemu sa  $4 \text{ kg}$  nego sa  $3 \text{ kg}$  čestica. Posledica ovakvog uticaja čestica na razmenu tečnosti preko ulaznog regiona je da se u sistemu sa  $3 \text{ kg}$  čestica, veća količina tečnosti podvrgava aeraciji nego u sistemu sa  $4 \text{ kg}$  čestica. Na osnovu ovoga, dobijeni rezultati u našem ispitivanom sistemu sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi pokazuju da sa povećanjem visine nasutog sloja iznad minimalno potrebnog za obrazovanje stabilnog fontansko-fluidizovanog sloja, vrednost  $k_L a$  blago opada, slika 8.19.



Slika 8.18. Uticaj količine čestica u sistemu na rezultantu prostrujavanja

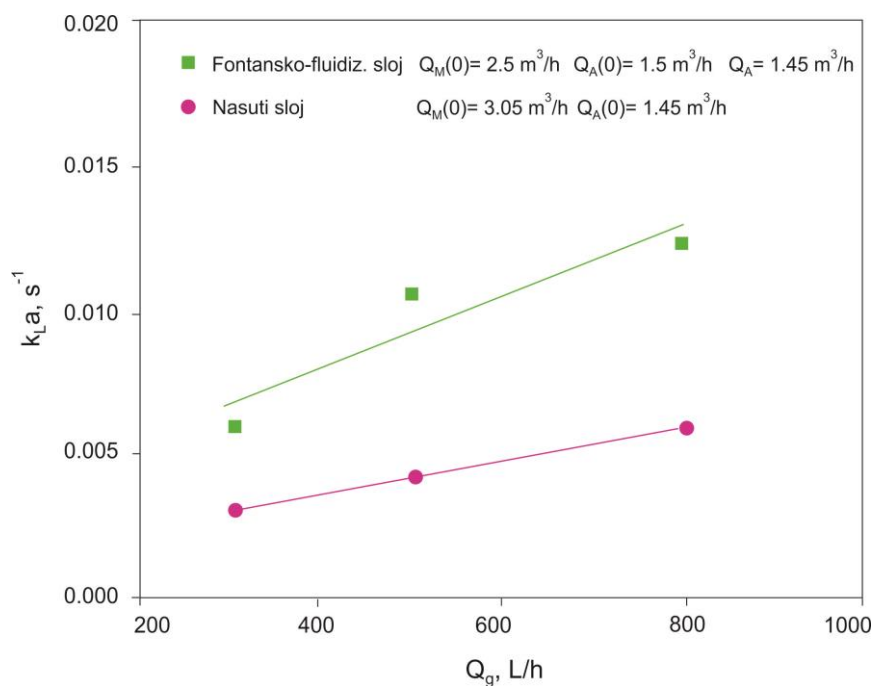
Ovakvo ponašanje se pre svega može pripisati fluido-mehaničkim uslovima na dnu sloja i na granici mlaz-anulus ispod centralne cevi, a ne uticaju visine sloja na sam proces prenosa mase.



Slika 8.19. Uticaj količine čestica u sistemu na vrednost  $k_L a$

Međutim, iako se u sistemu sa većom masom čestica javlja veće prostrujavanje ono se kompenzuje drugim efektom koji se u tom slučaju javlja, a to je povećana cirkulacija čestica koja doprinosi povećanju vrednosti  $k_L a$ , pa su razlike u vrednosti  $k_L a$  u zavisnosti od mase čestica u sloju male.

Kod fontansko-fluidizovanog sloja sa centralnom cevi cirkulacija čestice se obezbeđuje tako što se one kreću naniže u anulusu do ulaznog regiona gde bivaju „usisane“ u centralnu cev i transportovane naviše gde u zoni fontane ponovo padaju na vrh anulusa. Doprinos načina kretanja čestica u sloju, na zapreminski koeficijent prenosa mase, je ispitan tako što su poređena dva sistema sa istim česticama i istim ulaznim protocima fluida. U prvom slučaju ispitan je fontansko-fluidizovan sloj sa cirkulacijom čestica, dok je u drugom ispitanom sistemu pregradom u zoni ispod centralne cevi onemogućeno kretanje čestica iz anulusa ka mlazu. Dobijeni rezultati su prikazani slika 8.20. Može se uočiti značajna razlika u vrednosti  $k_L a$  kada je uspostavljeno fontansko-fluidizovano stanje sloja i kada je mehanički onemogućen prelazak čestica i tečnosti iz anulusa u centralnu cev i obrnuto, pri istim operativnim uslovima. Veća vrednost zapreminskog koeficijenta prenosa mase  $k_L a$ , koja je dobijena u razvijenom fontansko-fluidizovanom sloju ukazuje na doprinos cirkulacije čestica boljem prenosu mase kiseonika između gasne i tečne faze.



Slika 8.20. Efekat cirkulacije čestica na  $k_L a$

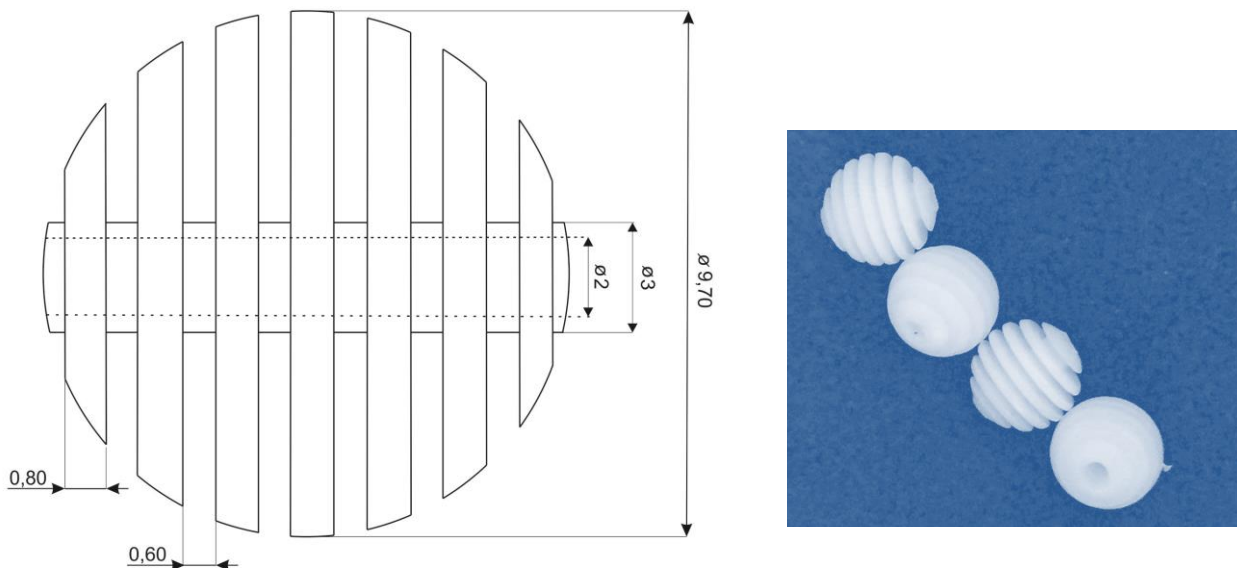
U dostupnoj literaturi nije nađeno da su se vršila određivanja zapreminskog koeficijenta prenosa mase u sistemu sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi, te stoga nije moguće izvršiti poređenje dobijenih rezultata u našim eksperimentima sa sličnim sistemima. U različitim tipovima trofaznih sistema u kojima je određen zapreminski koeficijent prenosa mase vrednosti  $k_L a$  su se kretale u intervalima,  $0,005 - 0,0075 \text{ s}^{-1}$  (Mena i dr., 2011),  $0,008 - 0,07 \text{ s}^{-1}$  (Lee i dr., 2013),  $0,007 - 0,068 \text{ s}^{-1}$  (Chang i dr., 1986),  $0,008 - 0,057 \text{ s}^{-1}$  (Hamdad i dr., 2007),  $0,07 - 0,22 \text{ s}^{-1}$  (Miura i dr., 2012).

Kako je osnovni cilj ovih eksperimentalnih istraživanja bio dobijanje podataka koji bi se kasnije koristili u razvoju sistema za tretman otpadnih voda u fontansko-fluidizovanim slojevima, to se dobijene vrednosti  $k_L a$ , u ovako koncipiranom sistemu, mogu koristiti kao referne vrednosti pri definisanju uslova za prenos mase kiseonika i obezbeđenje aerobnih uslova u reaktoru.

## 8.2. UKLANJANJE AZOTA U TROFAZNOM SISTEMU SA FONTANSKO-FLUIDIZOVANIM SLOJEM I CENTRALNOM CEVI

### 8.2.1. EKSPERIMENTALNI SISTEM

Nakon fluido-mehaničkih ispitivanja 2D polukolone sa fontansko-fluidizovanim slojem (slika 8.1) prešlo se na ispitivanje mogućnosti odigravanja nitrifikacionog procesa u ovakvom tipu sistema koji do sada nije bio korišćen u tretmanu otpadnih voda. Geometrijska izmena sistema je bila u sužavanju centralne cevi na  $30 \times 50 \text{ mm}$ , da bi se omogućilo stabilno fontanovanje u sistemu. Kao nošači mikroorganizama korišćeni su sferični plastični nosači, slika 8.21, čije su karakteristike date u tabeli 8.2.

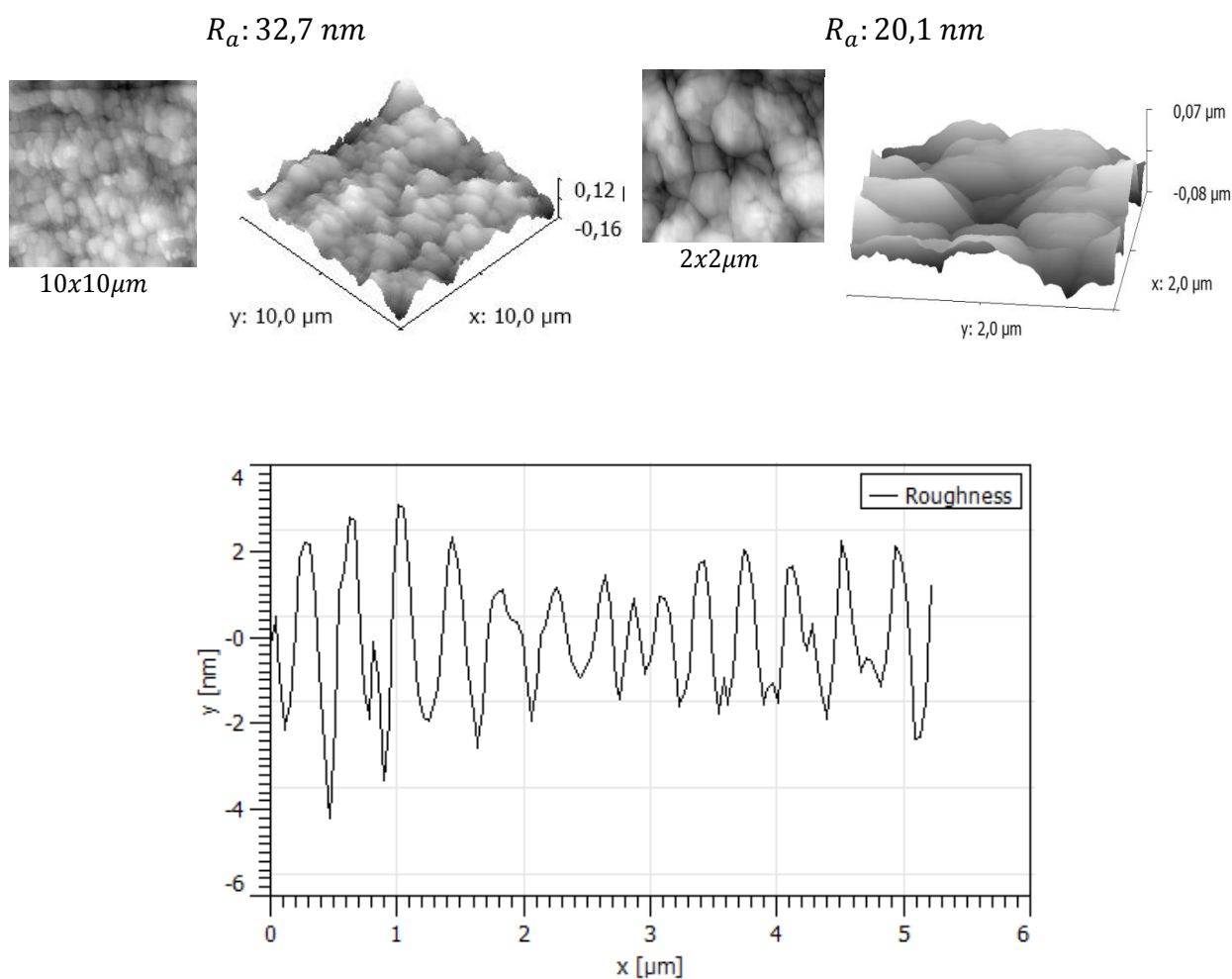


Slika 8.21. Plastični nosač

Tabela 8.2. Karakteristike plastičnog nosača

Masa	0,36 g
Gustina	1 410 kg/m <sup>3</sup>
Prečnik	9,70 mm
Površina	859 mm <sup>2</sup>
Zapremina	270 mm <sup>3</sup>
Tip plastike	POM kopolimer, C 9021

Struktura nosača je omogućavala veliku površinu za rast mikroorganizama od 1000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>. Hrapavost površine materijala nosača ili topografija je određena pomoću mikroskopa atomskih sila, AFM, (Stephenson i dr., 2013) i u zavisnosti od zadatog x-y rastojanja je iznosila 20,1 nm (2x2 μm) odnosno 32,7 nm (10x10 μm), slika 8.22.



Slika 8.22. Hrapavost površine materijala nosača

Zapremina nosača u koloni je iznosila 2,5 L, odnosno nosači su ispunjavali oko 30% zapremine kolone. Kao otpadna voda korišćena je sintetička otpadna voda, čiji je sastav prikazan u tabeli 8.3. Za izvor azota korišćen je  $NH_4Cl$  čija je koncentracija menjana sa vremenom. Ukupna zapremina vode u sistemu je iznosila 24 L. Sistem je radio šaržno, odnosno na dnevnom nivou je ispuštana voda i uvođena je nova sintetička otpadna voda određenog hemijskog sastava. Protok vode kroz anulus je tokom svih faza eksperimentalnih istraživanja održavan na konstantnoj vrednosti od  $0,6 m^3/h$ , dok je protok kroz centralnu cev, mlazni tok, varirao od 1 do  $1,8 m^3/h$ . Vazduh je uvođen u sistem protokom oko  $200 L/h$  na četiri mesta preko otvora prečnika  $1 mm$  lociranih na zidu kolone u anularni sloj čestica.

Tabela 8.3. Sastav sintetičke otpadne vode

Supstanca	Koncentracija, mg/L
$NH_4Cl - N$	100-800
$NaCl$	100-800
$MgSO_4$	250-2000
$KCl$	50-400
$CaCl_2$	80-640
$NaHPO_4$	450-3600
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03
$ZnCl_2$	0,1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,004
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,72
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1,55

Koncentracija rastvorenog kiseonika u sistemu se kretala od  $3,5 - 5,5 mg/L$  u zavisnosti od aktivnosti mikroorganizama i temperature vode koja je varirala od  $24$  do  $37^\circ C$  u zavisnosti od ambijentalne temperature. U kolonu je tokom procesa konstantno dodavan rastvor natrijum bikarbonata kako bi se  $pH$  vrednost održavala oko  $7,5$ , a ujedno da bi se izbegla limitiranost u alkalitetu.

Vrednosti rastvorenog kiseonika,  $pH$  i temperatura su mereni pomoću oksimetra *WTW oxl 340i*. Koncentracije  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ , alkalitet, su mereni fotometrijski (*Lovibond MD 600*). Svi uzorci su pre analize profiltrirani kroz filter veličine pora  $0,45 \mu m$ . Imobilisana masa u jedinicama  $gVS/nosaču$  je određivana soniciranjem nosača u  $1N$  rastvoru  $NaOH$ , u ultrazvučnoj kadi ( $100W$ ) na povišenoj temperaturi, određeno vreme (oko  $30 min - 1h$ ) i određivanjem  $COD$  rastvora nakon odvajanja biofilma sa nosača (*Liu i Capdeville, 1996*). Preko  $COD$  ekvivalenta,  $1,42 g COD/g C_5H_7O_2N$  dobijena je tražena vrednost u jedinicama  $gVS/nosaču$ . Za vizuelizaciju i određivanje debljine biofilma korišćen je  $FE - SEM$ , *TESCAN MIRA 3 XMU*, a uzorci za njegovu primenu su pripremani prema proceduri opisanoj u poglavlju 7.



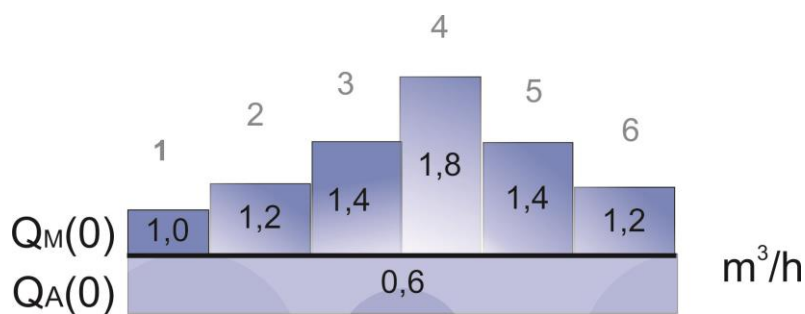
Analiza prisutnih mikrobioloških vrsta imobilisanih na nosačima je rađena u Institutu za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo (IMGGI).

Kolona je zasejana pomoću 1L suspenzije mikroorganizama, mehanički skinutih sa keramičkih nosača iz kolone sa pakovanim slojem koja je prethodno bila u radu preko 200 dana, pod uslovima opisanim u poglavlju 7.

### 8.2.2. REZULTATI I DISKUSIJA

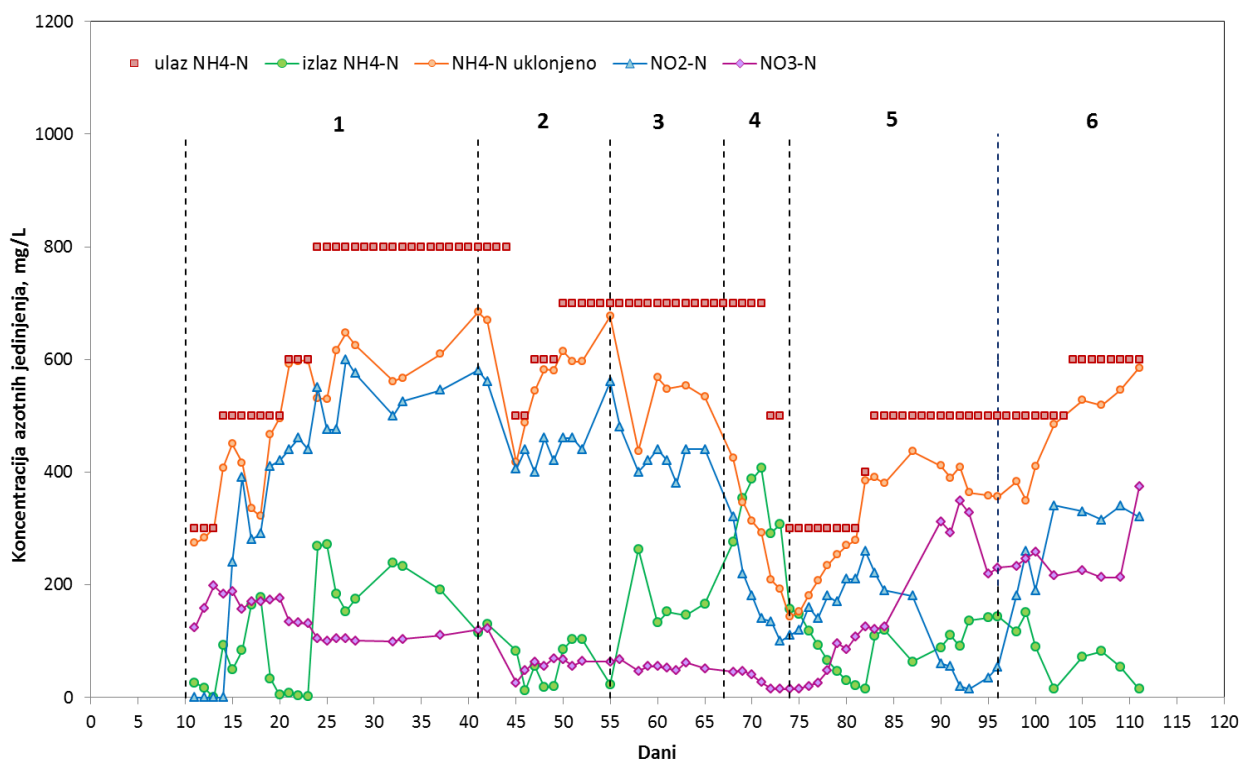
Formiranje, struktura i metabolizam imobilisane mikrobiološke zajednice je u bliskoj vezi sa hidrodinamičkim silama trenja unutar reaktora. Istraživanjima je pokazano da sile trenja imaju značajan uticaj na strukturu, prenos mase, produkciju EPS, metaboličko/genetičko ponašanje biofilma (*Liu i Tay, 2002*). U biološkim reaktorima sile trenja se smatraju jednim od odlučujućih faktora u formiranju biofilma i mogu biti rezultat proticanja fluida ili otiranja čestice o česticu. Stacionarno stanje biofilma veoma zavisi od sila trenja koje uspostavljaju balans između otiranja biofilma i rasta bakterija na površini nosača, odnosno uspostavljaju neto rast. Istraživanja su pokazala da visoke hidrodinamičke sile trenja utiču na stvaranje tanjeg, kompaktnijeg i čvršćeg biofilma, za razliku od formiranih biofilmova u sistemima sa slabijim hidrodinamičkim silama trenja koji su porozniji i slabije strukture (*Chang i dr. 1991; Kwok i dr., 1998; Rittmann, 1982; Van Loosdrecht i dr., 1995*). Odgovarajuće sile trenja zapravo su neophodne u sistemu sa biofilmom da bi došlo do stvaranja kompaktne i stabilne strukture biofilma, odnosno veće sile trenja utiču na stvaranje glatkog i gušćeg biofilma. Može se i reći da hidrodinamičke sile trenja predstavljaju efikasan alat za manipulaciju strukturom biofilma, a samim tim celim procesom.

Jedan od osnovnih ciljeva ovog istraživanja je bio ispitivanje mogućnosti rasta mikroorganizama na nosačima pri određenim fluido-mehaničkim uslovima, odnosno mogućnosti korišćenja sistema sa fontansko-fluidizovanim slojem sa centralnom cevi u procesu uklanjanja azota iz otpadnih voda. Ovaj tip sistema je karakterističan zbog svoje fluido-mehanike koja preko protoka fluida, cirkulacije čestica i ostalih fenomena koji se javljaju može značajno uticati na formiranje biofilma odnosno na sam proces. S tim u vezi je istraživanje izvođeno pri različitim protocima tečnosti kroz sistem. Protok kroz mlaz je menjan i u zavisnosti od faze istraživanja, imao je vrednosti od 1,0, 1,2, 1,4, 1,8, na osnovu čega je formirano šest faza procesa, slika 8.23. Ulazni protok vode kroz anulus i protok vazduha su održavani na vrednostima od 0,6 m<sup>3</sup>/h i oko 200 L/h, respektivno. Zasejavanje odnosno proces imobilizacije mikroorganizama na nosače je trajao 10 dana, nakon čega je otpočeo šaržni proces uklanjanja azota iz otpadne vode u ispitivanom sistemu.



Slika 8.23. Promene protoka tečnosti u koloni sa fontansko-fluidizovanog sloja sa centralnom cevi tokom šest faza procesa ispitivanja

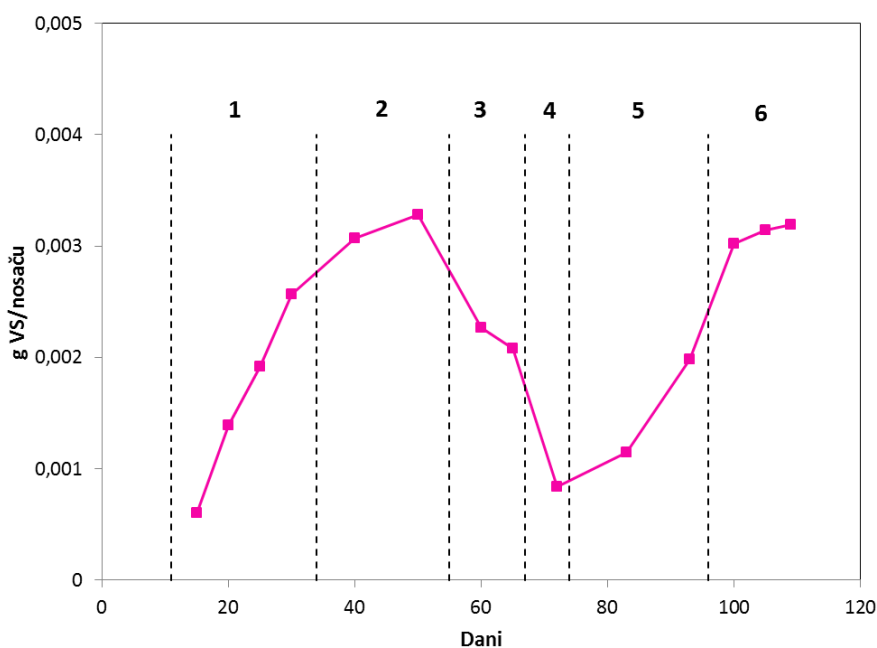
Rezultati uklanjanja azota iz otpadne vode u 2D polukoloni sa fontansko-fluidizovanim slojem tokom svih šest faza procesa prikazani su na slici 8.24.



Slika. 8.24. Promene koncentracije azotnih jedinjenja tokom procesa u 2D polukoloni sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi

U prvoj fazi procesa protocima  $Q_M(0) = 1,0 \text{ m}^3/\text{h}$  i  $Q_A(0) = 0,6 \text{ m}^3/\text{h}$  obezbeđeno je minimalno fontanovanje ispitivanog sloja plastičnih nosača. Rezultati prikazani na slici 8.24, pokazuju da je nakon faze zasejavanja sistema, prvih nekoliko dana uspostavljeno prevođenje amonijum jona preko nitrita do nitrata, međutim, petog dana uspostavljanja šaržnog režima rada sistema, došlo je do drastične promene u koncentraciji nitrita, odnosno, njihove akumulacije u sistemu. Ovo se može dovesti u vezu sa mogućnošću opstanka nitrit oksidujućih bakterija i njihovog vezivanja za nosače pri datim operativnim uslovima u sistemu. Zapravo, dan pre nego što je detektovan drastični porast koncentracije nitrata, bilo je izvršeno čišćenje zidova kolone, cevovoda i pumpi, pa se pretpostavlja da su se nitrit oksidujuće bakterije više zadržavale u delovima sistema gde su smicajne sile bile manje. Tokom trajanja prve faze, postepeno je rasla efikasnost ukanjanja amonijum jona odnosno njegovog prevođenja u nitrite, dok je koncentracija nitrata bila relativno konstantna, uz blago opadanje tokom trajanja ove faze. Odnosno, sa povećanjem ulaznog opterećenja azotom, rasla je i aktivnost amonijum oksidujućih bakterija (*AOB*) što nije bio slučaj sa nitrit oksidujućim bakterijama (*NOB*) čija je aktivnost blago opala sa povećanjem ulaznog opterećenja.

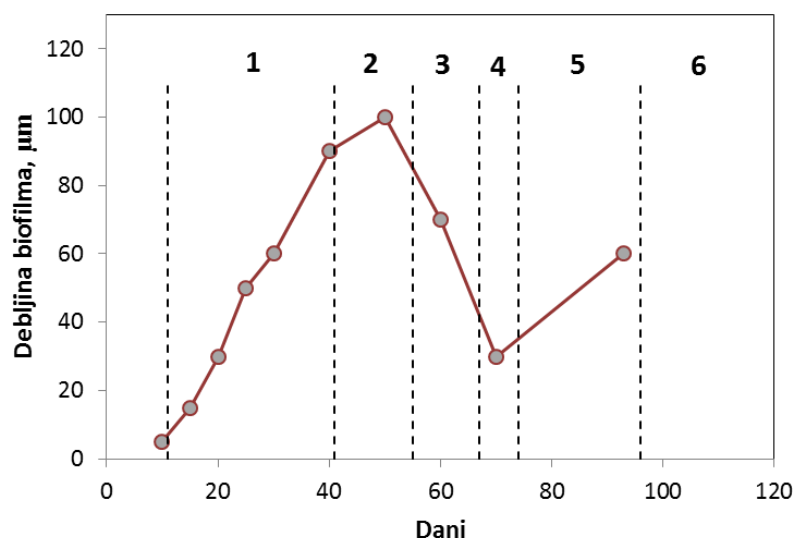
U ovoj fazi je biomasa dostigla vrednost od  $0,00257 \text{ g VS/nosaču}$ , odnosno ukupna biomasa u sistemu je iznosila oko  $7,45 \text{ g}$  uz mogućnost uklanjanja oko  $650 \text{ mg N/L}$ , odnosno  $15,6 \text{ g N/d}$ . Rezultati prikazani na slici 8.25 pokazuju promene u količini imobilisane biomase po nosaču tokom trajanja celog procesa ispitivanja.



Slika 8.25. Promena količine imobilisane biomase u g po nosaču kroz faze procesa

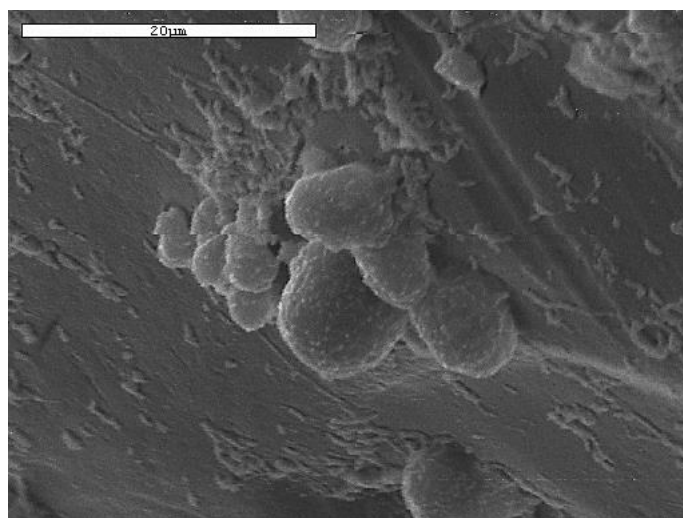
Istraživanja su pokazala da su u pakovanim slojevima za biooksidaciju supstrata jedino odgovorni aktivni mikroorganizmi, a ne ukupna biomasa prisutna u bioreaktoru (*La Motta, 1976; Lazarova i dr., 2004*). Samim tim, maksimalna mikrobiološka aktivnost će biti prisutna kod tankih biofilmova (*Liu i Capdeville, 1996*). Kontrolisanje aktivnosti biofilma preko debljine biofilma, koja je u funkciji erozionog faktora, odnosno u funkciji fluido-mehanike sistema se smatra dobrim pristupom za unapređenje efikasnosti procesa (*Liu i Capdeville, 1996*). Ispitivanjima aktivnosti heterotrofnog biofilma je pokazano da aktivnost biofilma opada za 82 – 89% za debljinu biofilma od 10 do 20 $\mu\text{m}$ , a 5 – 11% za debljinu biofilma od 500 $\mu\text{m}$  (*Zhang i Bishop, 1994c*). Ovaj rezultat direktno govori da su tanji biofilmovi metabolički aktivniji. Debljina biofilma na plastičnim nosačima u ispitivanom sistemu koja je određena primenom *FE – SEM* je rađena radi dobijanja reda veličine o formiranoj debljini pri određenim operativnim uslovima. Rezultati promene debljine biofilma sa promenom operativnih uslova su prikazani na slici 8.26. U prvoj fazi procesa sa povećanjem količine uklonjenog amonijum jona dolazi i do povećanja debljine biofilma što je rezultat akumulacije aktivnih mikroorganizama tokom dinamičke faze rasta. Nakon prve faze dostignuta srednja vrednost debljine biofilma je iznosila oko 90 $\mu\text{m}$ .

Zavisnost debljine biofilma od specifične stope uklonjenog supstrata ( $\text{mg NH}_4 - \text{N} / \text{mg VS} \cdot \text{d}$ ) je takođe važna zbog utvrđivanja odnosa prisutnih aktivnih mikroorganizama, odnosno aktivne debljine biofilma i akumulacije inertnih materija unutar biofilma. Da bi se o tome moglo govoriti za ispitivan sistem potrebna su dodatna istraživanja. Debljina biofilma je važna i zbog mogućnosti difuzije supstrata i ostalih komponenata unutar biofilma. Prilikom povećanja hidrodinamičkih sila trenja dolazi do formiranja gušćih biofilmova (*Chang i dr., 1991; Kwok i dr., 1998; Vieira i dr., 1993; Zhang i Bishop, 1994b*), o čemu je u uvodnom delu već bilo reči. Takođe za dobijanje ovih informacija za ispitivan sistem je potrebno sprovesti dodatna istraživanja.

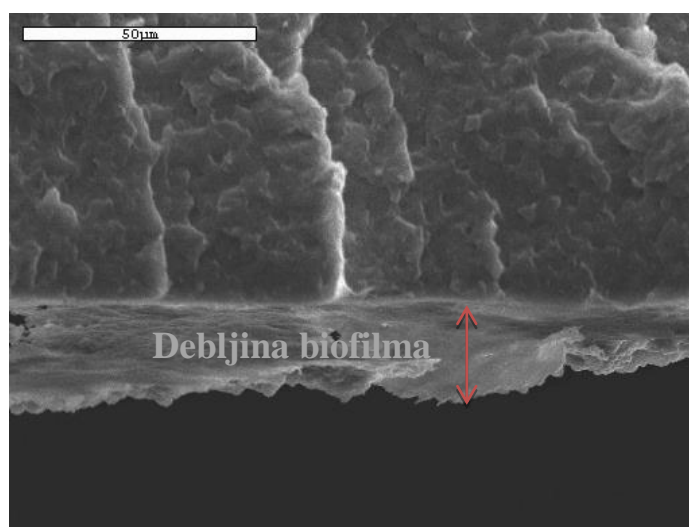


Slika 8.26. Debljina biofilma na plastičnim nosačima u zavisnosti od operativnih uslova

Na slici 8.27 dobijenoj pomoću *FE – SEM*, vide se formirane izbočine (engl. „clusters“) biofilma na određenom mestu na nosaču, a slika 8.28, prikazuje već formiranu određenu debljinu biofilma.



Slika 8.27. Formiranje biofilma, 10-ti dan procesa

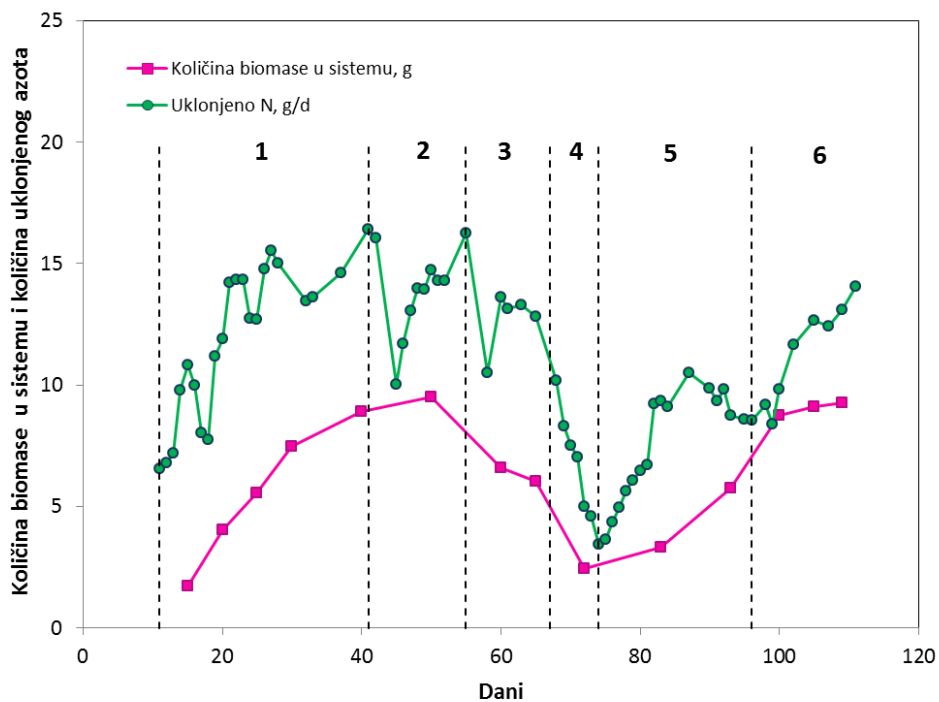


Slika 8.28. Izgled biofilma, 20-ti dan procesa

Nakon četrdeset dana procesa, protok kroz mlaz je povećan na  $1,2 \text{ m}^3/\text{h}$ . Pad koji je neposredno nastupio, (slika 8.24, faza 2), može biti reakcija mikroorganizama na neprilagođenost povećanim vrednostima smicajnih sila usled povećanja protoka tečnosti kroz centralnu cev. Nakon pada usledio je postepeni porast količine uklonjenog azota iz otpadne vode, pa je za vreme trajanja druge faze postignuto uklanjanje od oko  $600 \text{ mg N/L}$ , malo manje nego tokom prve faze procesa. Iako je u ovoj fazi uklonjena manja količina azota iz otpadne vode, količina biomase na nosačima je povećana na  $0,0033 \text{ g VS/nosaču}$ , slika 8.25.

Sve faze procesa nisu trajale do dostizanja stacionarnog stanja biofilma, kada debljina biofilma postaje konstantna tokom vremena zbog uspostavljanja ravnoteže između procesa rasta, inaktivacije, odumiranja i otiranja biomase, jer je istraživanje izvođeno u cilju ispitivanja mogućnosti rasta biomase pod određenim fluido-mehaničkim uslovima u sistemu. Debljina biofilma nakon ove faze je iznosila oko  $100\mu\text{m}$ , slika 8.26.

Količina uklonjenog azota u odnosu na količinu biomase u sistemu tokom trajanja celog procesa istraživanja prikazana je na slici 8.29. I u ovoj drugoj fazi se zadržala akumulacija nitrita čije vrednosti koncentracije su se kretale oko  $450\text{ mg NO}_2^- - \text{N/L}$ , dok je koncentracija nitrata i dalje bila niska i kretala se oko  $60\text{ mg NO}_3^- - \text{N/L}$ .



Slika 8.29. Promena količine biomase i količine uklonjenog azota tokom trajanja celog procesa

Daljim povećanjem protoka vode kroz mlaz na  $1,4\text{ m}^3/\text{h}$  takođe je neposredno po povećanju, nastupio pad u količini uklonjenog azota po litri otpadne vode u toku dnevnog ciklusa (slika 8.24, faza 3). Nakon relativno brzog prilagođavanja biofilma na nove hidrodinamičke uslove beležio se postepeni rast u efikasnosti, međutim, niži nego što je bio u prethodnom režimu rada fontansko-fluidizovanog sloja. Povećana cirkulacija koja je usledila povećanjem protoka kroz mlaz negativno se odrazila na količinu biomase po nosaču jer je njena vrednost tokom ove faze opala (slika 8.25, faza 3). Pad u količini uklonjenog azota se odrazio preko pada koncentracije nitrita, dok je koncentracija nitrata prilično ostala na konstantnoj vrednosti, kao i u prethodnoj fazi. Razlog ovakvih rezultata može biti u pozicioniranju bakterija unutar slojeva biofilma. Odnosno, da su amonijum oksidujuće bakterije više bile smeštene u spoljašnjim slojevima biofilma jer je zbog povećanja smicajnih sila usled povećanja brzine tečnosti došlo do skidanja površinskih slojeva.

Debljina biofilma tokom treće faze je opala i iznosila je oko  $70\mu\text{m}$ , slika 8.26, što je u skladu sa rezultatima o uklanjanju biomase po nosaču, slika 8.25, usled povećanja ulaznog protoka kroz mlaz.

Daljim povećanjem protoka kroz mlaz na  $1,8\text{ m}^3/\text{h}$  usledio je konstantan pad kako u količini uklonjenog amonijum jona tako i u količini nastalih nitrita (slika 8.24, faza 4). I u ovoj četvrtoj fazi, količina biomase u sistemu je drastično opala (slika 8.25, faza 4). Nakon nekoliko dana rada sistema pod ovakvim uslovima došlo je i do opadanja koncentracije nitrata. Skidani delovi biofilma tokom treće i četvrte faze mogli su se uočiti i na filterima pumpe koji su se čistili svakog dana pre otpočinjanja novog šaržnog procesa, slika 8.30.



Slika 8.30. Filteri pumpe (59-ti dan procesa)

Istraživanja su pokazala da postoji stratifikacija u kohezivnosti biofilmova. Površinski slojevi biofilma, bliži masi tečnosti, odlikuju se manjom kohezivnošću pa su potrebne manje hidrodinamičke sile da bi se ovi slojevi odvojili, dok su bazalni slojevi biofilma mnogo kohezivniji i mogu da izdrže veće hidrodinamičke sile (*Derlon i dr., 2008*).

U unutrašnjim slojevima može doći do limitiranosti supstratom ili rastvorenim kiseonikom, ali su te bakterije u unutrašnjosti zaštićene od spoljašnjeg otiranja biomase (*Furumai i Rittmann, 1994*). Međutim, intenzitet smicajnih sila pri ulaznom protoku kroz mlaz od  $1,8\text{ m}^3/\text{h}$  je narušio čak i stabilnost bazalnih delova biofilma. Kao potvrda ovome može biti pad u koncentraciji nitrata nakon nekoliko dana trajanja procesa pod ovakvim hidrodinamičkim uslovima. Takođe ovim se može pretpostaviti da su spororastuće nitrit oksidujuće bakterije bile smeštene više u unutrašnjim slojevima biofilma.

Dokaze o pozicioniranju određenih bakterija unutar biofilma je moguće izvršiti primenom FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) metode koja se zasniva na označavanju ciljanih 16S rRNA oligonukleotidnih proba pomoću fluorescentnih jedinjenja (Aoi i dr., 2000; Chae i dr., 2008; Wagner i dr., 1995). Prilikom izvođenja eksperimentalnih istraživanja u ovom radu, ova metoda nije bila dostupna u bliskom okruženju.

Spororastući biofilmovi, kao što su biofilmovi formirani od autotrofne biomase, balansirani su erozijom koja dovodi do formiranja tanjih i gušćih biofilmova (Tijhuis i dr., 1995). Veće vrednosti smicajnih sila dovode do stvaranja gušćih i tanjih biofilmova koji su mnogo kompaktniji (Derlon i dr., 2008), a sama promena u sili trenja utiče više nego sama sila trenja uopšte na odvajanje manje kohezivnih površinskih slojeva biofilma (Choi i Morgenroth, 2003).

Pored erozije (sile trenja fluid-čestice) i abrazija (sile trenja čestice-čestice) utiče na skidanje biofilma sa površine nosača. Abrazija je glavni fenomen koji se dešava u fluidizovanim slojevima (Trinet i dr., 1991). Otiranje biofilma abrazijom je u vezi sa učestanošću sudara među česticama i pritiska koji se javlja prilikom sudara njihovih površina. Efikasnije uklanjanje  $NH_4^+ - N$  u reaktoru sa fluidizovanim slojem, pozicioniranog nakon procesa sa aktivnim muljem je postignuto kada su polipropilenski nosači ispunjavali 75% zapremine reaktora, nego kada su ispunjavali samo 10% zapremine reaktora. Pri niskoj koncentraciji nosača u reaktoru nije postignuto značajnije trenje među česticama, pri tome je došlo do formiranja debljeg biofilma, da bi nakon nekoliko nedelja rada sistema pod ovakvim uslovima došlo do vezivanja za površinu nosača drugih organizama poput protozoa, rotifera, filamentoznih bakterija (Kloep i dr., 2000). Međutim, u ispitivanoj koloni sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi zbog strukture sferičnih upotrebljenih nosača, (slika 8.21), može se pretpostaviti da sudari odnosno trenje među česticama nije toliko uticalo na otiranje biofilma koji je bio smešten na unutrašnjim površinama nosača, slika 8.31, za razliku od uticaja sila trenja izazvanih protokom fluida.



Slika 8.31. Uzorci nosača izvađeni iz kolone određenog dana procesa. Promena boje nosača je u vezi sa količinom imobilisane biomase

Zbog ovako drastičnog pada u efikasnosti, na oko  $100 \text{ mg N/L}$ , i debljine biofilma na oko  $30 \mu\text{m}$ , da bi se izbegao eventualni gubitak čitave biomase u sistemu, ulazni protok kroz mlaz je smanjen na  $1,4 \text{ m}^3/\text{h}$ .

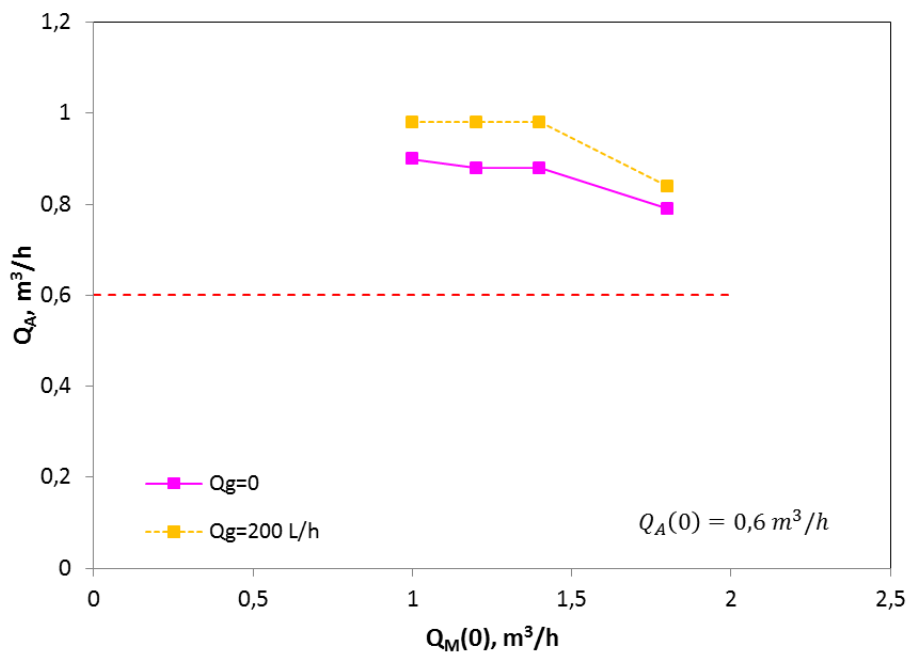


Uticaj smicajnih sila (engl. „*shear stress*”) na otiranje biofilma ispitivano je i u drugim sistemima (Celmer i dr., 2008; Elenter i dr., 2007; Peyton, 1992). Takođe su razvijani i modeli za predviđanje koncentracije biomase u sistemu, odnosno za određivanje otiranja biofilma pri različitim operativnim uslovima (Chang i dr., 1991; Rittman, 1982; Stewart, 1993).

Efekat smicajnih sila na otiranje biofilma je korišćen i u cilju kontrole debljine biomase u aerobnom fluidizovanom reaktoru koji je u jednom delu posedovao turbulentnu zonu formiranu pomoću cilindrične pregrade (Safferman i Bishop, 1996). Turbulentna zona u sistemu je omogućavala da se održi odgovarajuća debljina biofilma bez potrebe za mehaničkim čišćenjem ili rekuperacijom biomase u kontinualnom režimu rada sistema.

Zapravo, različiti mehanizmi otiranja mogu biti dominantni u različito vreme u posmatranom sistemu i oni će zavisiti od širokog opsega parametara uključujući, mikrobiološku zajednicu, sastav ekstracelularnih polimernih supstanci, fiziološko stanje organizama, strukturu biofilma i smicajne sile (Elenter i dr., 2007).

Za sistem sa plastičnim sferičnim nosačima i formiranim biofilmom na njima, preko baždarnih dijagrama je određena rezultanta prostrujavanja tečnosti, slika 8.32.



Slika 8.32. Rezultanta prostrujavanja za sistem sa plastičnim nosačima i formiranim biofilmom.

Prikazani rezultati pokazuju da za ispitivane protoke tečnosti kroz mlaz, pri konstantnom ulaznom protoku kroz anulus, uvek prostrujava određena količina tečnosti u anulus, s tim da se sa određenim povećanjem protoka kroz mlaz može javiti i Venturi efekat u zoni ispod centralne cevi i da se smanji količina tečnosti koja se kreće kroz anularni deo sloja.

Ispitivanjem prostrujavanja tečnosti preko ulaznog regiona u 2D polukoloni sa staklenim kuglicama je takođe dobijeno da pri nižim ulaznim protocima kroz anulus veća količina tečnosti prostrujava iz mlaza u anulus, a sa povećanjem ulaznog protoka kroz anulus pri konstantnom protoku kroz mlaz veća količina tečnosti prostrujava iz anularnog regiona u centralnu cev. Prisustvo vazduha u anulusu pri ispitivanim operativnim uslovima, doprinosi povećanju količine tečnosti koja prostrujava iz mlaznog toka u anulus, slika 8.32.

Razmatranje fluido-mehaničkih karakteristika sistema sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi, odnosno prostrujavanja tečnosti iz mlaza u anulus i obrnuto je važno sa aspekta određivanja realnih protoka kroz centralnu cev i anulus,  $Q_M, Q_A$ , zbog brzina fluida koje utiču na otiranje biofilma na nosačima preko smicajnih sila.

Tokom pete faze procesa, kada je ulazni protok kroz mlaz smanjen na  $1,4 \text{ m}^3/\text{h}$  beleži se konstantan rast koncentracije kako nitrita tako i nitrata, kao i povećanje imobilisane biomase po nosaču, (slika 8.25), i debljine biofilma, (slika 8.26). Rezultati prikazani na slici 8.24, faza 4, pokazuju da je došlo do oporavljanja i rasta kako amonijum tako i nitrit oksidujućih bakterija. Koncentracija nitrata u ovoj fazi je dostigla najveće vrednosti od početka trajanja procesa, oko  $350 \text{ mg NO}_3^- - \text{N/L}$  prilikom uklanjanja amonijum jona od oko  $400 \text{ mg N/L}$ . Zapravo pred kraj ove faze je skoro bila dostignuta nitrifikacija sa veoma malom koncentracijom nitrita u efluentu u odnosu na prethodne faze, oko  $15 \text{ mg NO}_2^- - \text{N/L}$ . Razlog za ovakav oporavak nitrit oksidujućih bakterija je usledio nakon prethodne faze u kojoj je ulazni protok kroz mlaz bio  $1,8 \text{ m}^3/\text{h}$ , i u kojoj je došlo do intenzivnog uklanjanja formiranih slojeva biofilma i stvaranje prostora za formiranje nove strukture biofilma.

Učestalost i jačina skidanja biofilma sa površine nosača može da ima značajan uticaj na kompeticiju unutar nitrifikacionih biofilmova, odnosno na distribuciju organizama unutar biofilmova (*Morgenroth i Wilderer, 2000*).

Uslovi sredine za bakteriju unutar biofilma zavise od pozicije gde se bakterija nalazi u njemu. U biofilmovima koji se sastoje od heterotrofa i autotrofa, njihova distribucija unutar biofilma je određena individualnim strategijama organizama za kompeticiju za kiseonik i za prostor (*Lee i dr., 2004*). Istraživanja su pokazala da postoji i kompeticija između amonijum i nitrit oksidujućih bakterija (*Wik i Breitholtz, 1996*). Poređenjem rezultata dobijenih tokom treće i pete faze procesa kada su protoci fluida kroz sistem bili isti, a vrednosti parametara  $pH, DO$ , temperature, imali približno slične vrednosti, uočava se drugačija mikrobiološka aktivnost, odnosno zabeležen je drugačiji trend koncentracija nitrita i nitrata. Mogući razlog ovako dobijenih različitih rezultata u ove dve faze procesa može biti upravo mikrobiološke prirode, u reakciji mikroorganizama na fluido-mehaničke promene u sistemu.

Šesta faza je nastupila 96-tog dana procesa kada je ulazni protok kroz mlaz smanjen na  $1,2 \text{ m}^3/\text{h}$ . Može se uočiti da sukcesivno smanjivanje ulaznog protoka kroz mlaz, (5 i 6 faza procesa), nije uticalo da smanjivanje efikasnosti uklanjanja amonijum jona, već je ona konstantno nastavljala da raste. Prilikom povećavanja ulaznog protoka kroz mlaz, (2, 3 i 4 faza), reakcije biomase su bile drugačije, prvo je usledio pad u efikasnosti, nakon koga je količina uklonjenog amonijum jona po danu nastavljala da raste.

Rezultati prikazani na slici 8.24, faza 6, pokazuju da ponovo dolazi do promene odnosa u koncentracijama nitrita i nitrata u efluentu. U odnosu na prethodnu fazu, koncentracija nitrita je porasla, a koncentracija nitrata je opala. Ovo govori i o različitoj aktivnosti amonijum i nitrit oksidujućih bakterija. Poređenjem rezultata sa drugom fazom kada su protoci fluida kroz sistem imali iste vrednosti, uz slične vrednosti  $DO$  i temperature, pri istim vrednostima ulazne koncentracije amonijum jona beleže se različite vrednosti koncentracija nitrita i nitrata.

Razlike u koncentraciji nitrita i nitrata u drugoj fazi su bile znatno veće, gde je skoro ceo amonijum jon prevođen u nitritni, dok su se u šestoj fazi koncentracije nitrita kretale oko  $300 \text{ mg NO}_2^- - \text{N/L}$ , a nitrata oko  $200 \text{ mg NO}_2^- - \text{N/L}$ , pri ulaznom opterećenju  $500 - 600 \text{ mg NH}_4^+ - \text{N/L}$ .

Razlog ovome se i u ovoj fazi možda može pripisati mikrobiološkim zakonima i drugačijoj raspodeli mikrobiološke populacije unutar biofilma. Istraživanja su pokazala da dinamička skidanja biomase sa nosača rezultiraju mnogo homogenijom raspodelom aktivnih bakterija unutar čitave debljine biofilma (*Morgenroth i Wilderer, 2000*).

Smanjivanjem protoka kroz mlaz sa  $1,4 \text{ m}^3/\text{h}$  na  $1,2 \text{ m}^3/\text{h}$ , smanjen je i intezitet otiranja biomase, pa je zabeležen porast biomase po nosaču. Količina imobilisane biomase po nosaču je u fazi 2 i 6 dostigla približno iste vrednosti, pri tome je i dostignuta skoro ista količina ukonjenog  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ . Kao što je prethodno navedeno, nisu nastale iste količine nitrita i nitrata u obe ove faze što ukazuje na drugačiju strukturu i mikrobiološki sadržaj unutar biofilma.

Zbog moguće drugačije raspodele mikroorganizama unutar biofilma, moguće je da su i u šestoj fazi nitrit oksidujuće bakterije bile zastupljene i u spoljašnjim slojevima gde su im rastvoreni kiseonik i supstrat bili dostupniji.

Prilikom određivanja imobilisane biomase po nosaču, u petoj i šestoj fazi procesa, primećuje se otežano skidanje biofilma sa nosača primenom ultrazvuka. Da bi se skinula imobilisana biomasa proces sonikacije je trajao znatno duže od prethodnih puta, oko sat vremena. Ovo možda govori o formiranju drugačijeg sastava ekstracelularne polimerne matrice, koja je usledila nakon hidrauličkog šoka. Poprečni presek plastičnog nosača sa biofilmom je prikazan na slici 8.33. Visoki hidraulički udari mogu da utiču kao stimulans na proizvodnju ekstracelularnih polimernih supstanci koje stabilizuju biofilm (*Lazarova i dr., 1994*). Druga istraživanja su pokazala da sile trenja utiču na hiperprodukciju ekstracelularnih polimernih supstanci, (*EPS*), koje se uglavnom sastoje od eksopolisaharida (*Pratt i Kolter, 1999; Trinet i dr., 1991*). Ovim se ističe još jedna od važnih karakteristika sila trenja koje utiču na strukturu biofilma. Eksopolisaharidi mogu posredovati i koheziji i adheziji ćelije i imaju ključnu ulogu u održavanju strukturalnog integriteta matriksa biofilma (*Davies i dr., 1998; O'Toole i dr., 2000*). Istraživanjima izvođenim u trofaznom fluidizovanom sloju pokazano je da je sadržaj polisaharida u biofilmu 4 – 5 puta veći od sadržaja proteina u biofilmu pri većim vrednostima protoka gasa (*Lertpocasombut, 1991*). I drugim istraživanjima je pokazano da sile trenja utiču na udeo proteina i ugljenih hidrata u *EPS* (*Adav i dr., 2007; Ramasamy i Zhang, 2005; Shin i dr., 2001*).

Generalno je zapaženo da veće sile trenja mogu da izazovu biofilm na veće lučenje eksopolisaharida što dovodi do izbalansirane strukture biofilma pod datim hidrodinamičkim silama trenja (*Chen i dr., 1998; Ohashi i Harada, 1994*).



Slika 8.33. Poprečni presek plastičnog nosača sa biofilmom (111-ti dan procesa)

Može se reći da je tokom trajanja svih šest faza procesa, oksidacija amonijum jona najvećim delom išla do nitritnog jona. Oksidacija nitrita je znatno brži proces od oksidacije amonijaka, pa zbog toga visoke koncentracije nitrita se retko mogu javiti kako u prirodnom okruženju tako i u otpadnim vodama, odnosno njihovo prisustvo ukazuje da je došlo do narušavanja nekog od parametara procesa.

U drugim ispitivanim sistemima sa biofilmovima poput tubularnog reaktora (*Elenter i dr., 2007*), turbulentnog inverznog reaktora (*Bougard i dr., 2005*), airlift reaktora (*Garrido i dr., 1997*) je takođe dolazilo do akumulacije nitrita, odnosno parcijalne nitrifikacije.

Kao razlog ovome je navedena niska koncentracija kiseonika (*Elenter i dr., 2007*), visoka temperatura (*Bougard i dr., 2005*), kompeticija amonijum i nitrit oksidujućih bakterija za prostor (*Wik i Breitholtz, 1996*) i slično.

Visoka osetljivost nitrit oksidujućih bakterija na određene parametre procesa omogućava i da se ciljano postigne parcijalna nitrifikacija koju prati ANAMMOX proces (*Daverey i dr., 2013; Schmidt i dr., 2003*). Ovi tipovi procesa uklanjanja azota iz otpadnih voda spadaju u novije sisteme koji se sve više ispituju i razvijaju zbog niza prednosti koje pružaju (*Siegrist i dr., 2008; Van Graaf i dr., 1996*).

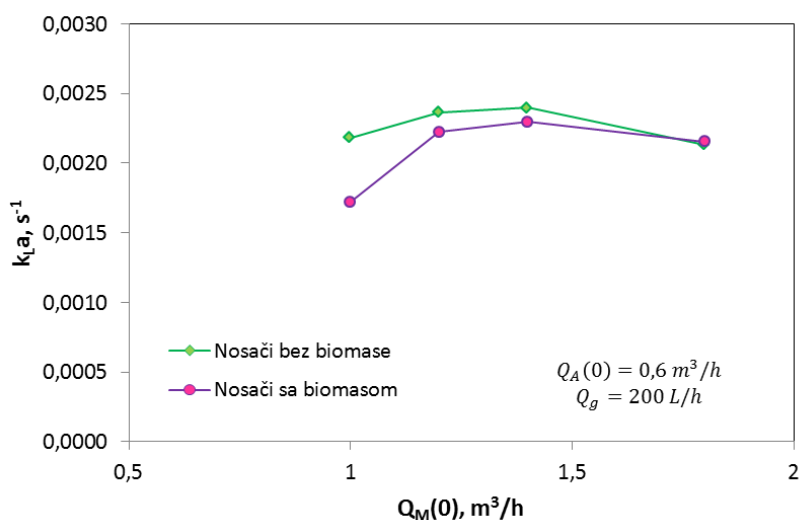
U cilju dostizanja parcijalne nitrifikacije predložene su različite strategije poput: regulacije *pH* jer određene koncentracija slobodnog amonijaka (*FA*) ili slobodne azotaste kiseline (*FNA*) utiču inhibitorno na nitrit oksidujuće bakterije (*Zekker i dr., 2011*); kontrole koncentracije rastvorenog kiseonika u reaktorima sa biofilmom (*DO*) (*Bernet i dr., 2001; Garrido i dr., 1997*) jer su nitrit oksidujuće bakterije mnogo više osetljive na niske koncentracije rastvorenog kiseonika od amonijum oksidujućih bakterija (*Jayamohan i dr., 1988*); kontrola temperature, koja na vrednostima između 35 – 40°C je pogodna za akumulaciju nitrita (*Hellinga i dr., 1998; Peng i Zhu, 2006*).

Istraživanja su pokazala i da niska frekvencija (40 kHz) i gustina ultrazvuka (0,027 W/mL) sa vremenom iradijacije od 2h, efektivno stimuliše parcijalnu nitrifikaciju u SBR sistemu (Zeng i dr., 2013). Pretpostavlja se da tretiranje ultrazvukom može da omogući odgovarajuće uslove za rast AOB, a uništi zajednicu NOB.

U ispitivanom sistemu sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi tokom čitavog procesa koncentracija rastvorenog kiseonika (DO) se kretala u intervalu od 3,5 – 5,5 mg/L, što se smatra visokom koncentracijom koja ne bi trebalo da utiče na akumulaciju nitrita. Istraživanjima je pokazano da koncentracije rastvorenog kiseonika koje utiču na akumulaciju nitrita se kreću oko 0,5 – 1,5 mg/L (Bae i dr., 2002; Kim i dr., 2003; Ruiz i dr., 2006). Međutim, ne može se odbaciti ni mogućnost da je u dubljim slojevima biofilma, gde su pod pretpostavkom više bile pozicionirane nitrit oksidujuće bakterije možda dolazilo do limitiranosti u koncentraciji rastvorenog kiseonika. Suprotno ovome amonijum oksidujuće bakterije su više bile smeštene u spoljašnjim slojevima gde im je bio dostupniji kako supstrat tako i rastvoren kiseonik (Okabe i dr., 1999; Regmi i dr., 2011).

Sa druge strane ova limitiranost se dovodi u pitanje jer je akumulacija nitrita nastala već 15-tog dana procesa, kada je koncentracija rastvorenog kiseonika iznosila oko 5 mg/L, a količina imobilisane biomase svega 0,0006 g VS/nosaču, odnosno debljina biofilma je iznosila oko 15µm.

Zapreminski koeficijent prenosa mase kiseonika,  $k_La$ , je određivan i u sistemu sa plastičnim čistim nosačima bez oformljenog biofilma i kada je biomasa po nosaču iznosila 0,003 g VS, odnosno kada je zabeležen najviši prirast biomase na nosačima u toku trajanja eksperimentalnog istraživanja. Oba određivanja  $k_La$  su rađena sa česmenskom vodom, radi poređenja, jer je poznato da  $k_La$  otpadne vode ima nižu vrednost od  $k_La$  vrednosti za čistu vodu (Povrenović i Knežević, 2013). Rezultati prikazani na slici 8.34. pokazuju da količina biomase nije uticala na zapreminski koeficijent prenosa mase za ispitivani opseg protoka fluida kroz sistem.



Slika 8.34. Poređenje vrednosti  $k_La$  u sistemu sa plastičnim nosačima, sa i bez formiranog biofilma na njima

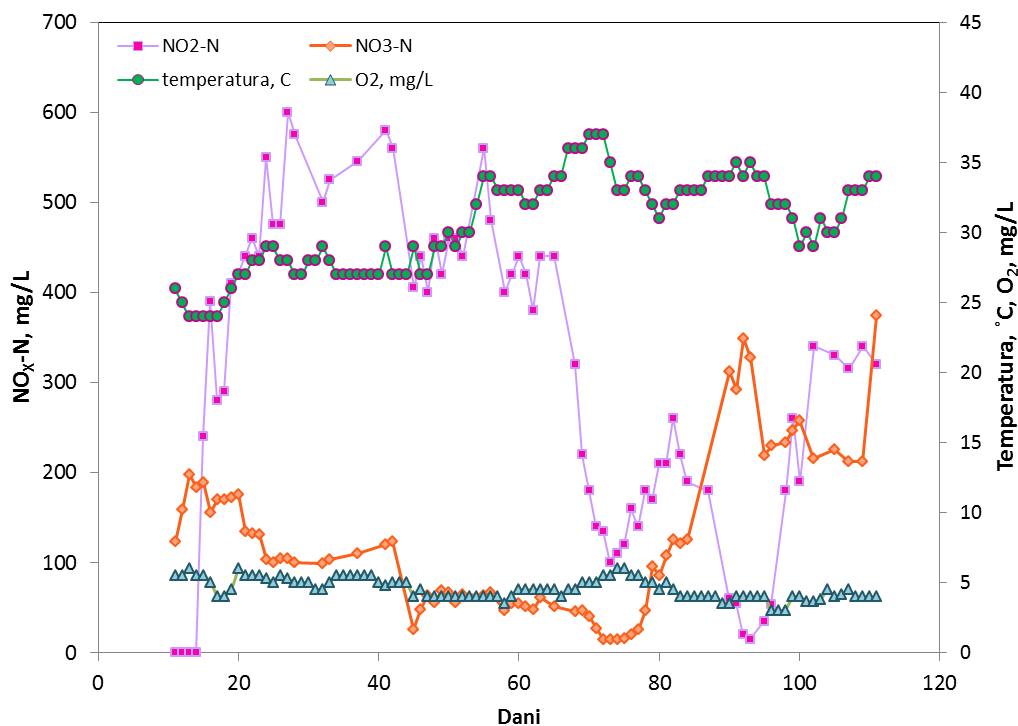
Ukupna imobilisana masa na oko 1100 g nosača u sistemu, određena pomoću sonikacije i sušenja kuglica, je iznosila oko 100 g, što i ne predstavlja količinu koja bi mogla značajno da promeni uslove za prenos mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu u ovakvom sistemu. Ovi dobijeni rezultati potvrđuju iznesene razloge prethodno dobijenih rezultata u sistemu sa staklenim sferičnim kuglicama o uticajima protoka fluida na  $k_L a$ . Zapravo, rezultati na slici 8.34. pokazuju da povećan protok tečnosti od 1,0 do 1,4  $m^3/h$  doprinosi povećanju vrednosti zapreminskog koeficijenta prenosa mase, dok sa daljim povećanjem protoka tečnosti kroz mlaz na 1,8  $m^3/h$  efikasnost prenosa mase kiseonika opada. Ovo je veoma važno sa aspekta optimizacije aerobnog mikrobiološkog procesa, da se sa odgovarajućim protocima tečnosti omogući što bolji prenos mase kiseonika, a da se pri tome ne naruši neto rast biomase na nosačima.

Vrednost  $pH$  je u 2D polukoloni uvek održavana na vrednosti oko 7,5 dodavanjem  $NaHCO_3$  tako da vrednostima ovog parametra nije omogućeno postojanje koncentracije slobodnog amonijaka ili azotaste kiseline koja bi mogla inhibitorno da deluje na nitrit oksidujuće bakterije.

Temperatura vode u sistemu je zavisila od ambijentalne temperature, pa je varirala od 24 do 37°C. U prvoj fazi temperatura se kretala između 24 – 29°C, u drugoj 27 – 32°C i trećoj 32 – 34°C, što su vrednosti niže od onih predloženih u literaturi koje utiču na akumulaciju nitrita. U četvrtoj fazi temperatura je varirala između vrednosti 35 i 37°C, koje su mogle da utiču na akumulaciju nitrita. Međutim, zbog dominantnog uticaja fluido-mehanike u ovoj fazi ovo nije moglo da se uoči.

U poslednjim fazama, četvrtoj i petoj, temperatura nije prelazila 35 °C, s tim što su u ovim fazama izmerene najveće vrednosti koncentracije nitrata u efluentu tokom trajanja celog procesa.

Promene koncentracije nitrita i nitrata u zavisnosti od koncentracije rastvorenog kiseonika i temperature tokom trajanja celog procesa ispitivanja prikazane su na slici 8.35.



Slika 8.35. Promena koncentracije nitrita i nitrata u zavisnosti od koncentracije rastvorenog kiseonika i temperature tokom celog procesa ispitivanja

U biofilmovima koji se sastoje od različitih vrsta mikroorganizama formiraće se slojevi datih vrsta mikroorganizama sa različitim ekofiziološkim karakteristikama i mogućnostima da prežive. Pored različitih tipova mikroorganizama, poput amonijum oksidujućih (*AOB*) i nitrit oksidujućih bakterija (*NOB*), takođe u biofilmovima mogu da koegzistiraju različite vrste istog tipa (*Downing i Nerenberg, 2008; Schramm i dr., 1998; Terada i dr., 2010*). U ispitivanjima kapajućeg nitrifikacionog filtera pokazalo se da dve populacije *AOB*, *Nitrosomonas oligotropha*, su različito raspoređene unutar biofilma, ukazujući time na njihovu različitost u ekofiziološkim karakteristikama, iako pripadaju istoj lozi *AOB* (*Vannecke i dr., 2014*).

Takođe je eksperimentalno potvrđeno u pilot postrojenju sa pokretnim slojem i pilot postrojenju sa kapajućim filterom, da je jedna od razlika između ove dve dominantne *Nitrosomonas oligotropha* populacije i u njihovim reakcijama na promenu opterećenja amonijakom (*Almstrand i dr., 2013*). U reaktorima koji su visoko opterećeni, pri smanjivanju ulazne količine amonijum jona otpočinja se akumulacija nitrata zbog prisustva *Nitrospira*. Pritom je akumulacija nitrata praćena zbog prisustva različite *AOB* populacije, poput *Nitrosomonas sp.* koja raste na račun *N. europea* (*Volcke i dr., 2008*).

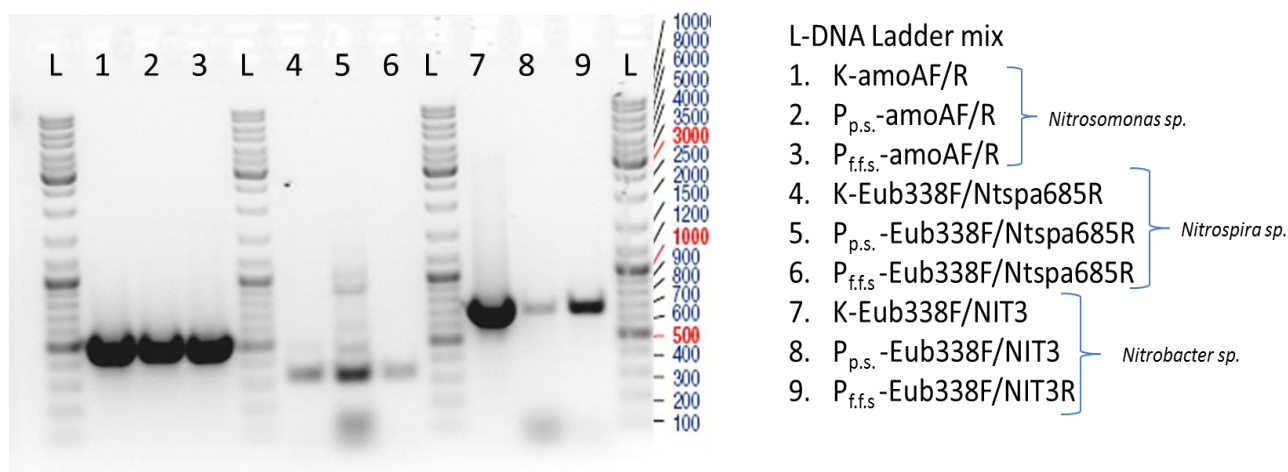
Pretpostavlja se da se ova promena u populaciji desila zbog promene u pritisku koji je kontrolisan promenom koncentracije rastvorenog kiseonika koja je nastala smanjivanjem opterećenja amonijum jonom u reaktoru. *Nitrosomonas europaea* su bakterije sa niskom stopom rasta i visokim afinitetom za kiseonikom dok *Nitrosomonas sp.* imaju relativno visoku stopu rasta i nizak afinitet za kiseonikom (Andrews i Harris, 1986).

Različite vrste amonijum oksidujućih bakterija iz rodova *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, su pronađene kao dominantne u različitim postrojenjima za tretman otpadnih voda. O njihovim različitostima i mogućnostima pokazuje *Nitrosomonas eutropha* koja predstavlja jednu od najспособnijih nitrifikacionih bakterija koje mogu da vrše i denitrifikaciju. SHARON proces (reaktor za uklanjanje visoke koncentracije amonijum jona preko nitrita) se najvećim delom obavlja pomoću ove bakterije *Nitrosomonas eutropha* (Logemann i dr., 1998). Takođe je pokazano da se gubici azota u drugom ispitivanom sistemu mogu pripisati nađenoj vrsti *Nitrosomonas europaea* koja ima mogućnost obavljanja autotrofne denitrifikacije (Bock i dr., 1995; Poth i Focht, 1985).

U nitrit oksidujuće bakterije spadaju članovi rodova *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, stin što se smatra da je *Nitrospira* najspecijalizovanija u oksidaciji nitrita. Pokazano je da hidroksilamin, amonijak i NO mogu da dovedu do inhibicije nitrit oksidujućih bakterija (Sundermeyer i Bock, 1981).

Sve ovo govori o kompleksnosti biološkog sistema, povezanosti i uticaju mnogobrojnih mikrobioloških parametara i potrebno je još mnogo istraživanja da bi se u potpunosti razumele njihove uloge u biološkim sistemima za prečišćavanje otpadnih voda.

Na slici 8.36 i u tabeli 8.4. su prikazani rezultati analize prisutne mikrobiološke populacije u ispitivanim sistemima sa keramičkim i plastičnim nosačima.



Slika 8.36. Rezultati detektovanja nitrifikacionih bakterija u ispitivanim eksperimentalnim sistemima; K (keramički nosači); P<sub>p.s.</sub> (plastični nosači u pakovanom sloju); P<sub>f.f.s.</sub> (plastični nosači u fontansko-fluidizovanom sloju)



Tabela 8.4. Mikrobiološka populacija u ispitivanim eksperimentalnim sistemima

<b>Kultivisani sojevi</b>		
Pakovani sloj -keramičke kuglice	Pakovani sloj- plastične kuglice	Fontansko-fluidizovani sloj -plastične kuglice
<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>	<i>Gordonia</i> sp.	<i>Aurantimonas altamirensis</i>
<i>Acinetobacter venetianus</i>	<i>Acinetobacter venetianus</i>	<i>Pseudaminobacter defluvii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Denitrobacter</i> sp.		<i>Acinetobacter junii</i>
<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus cereus</i>		<i>Delftia tsuruhatensis</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>		<i>Exiguobacterium</i> sp.
<i>Lactococcus lactis</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<b>Sojevi identifikovani PCR metodom</b>		
Pakovani sloj -keramičke kuglice	Pakovani sloj- plastične kuglice	Fontansko-fluidizovani sloj -plastične kuglice
<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
<i>Nitrospira</i> sp.	<i>Nitrospira</i> sp.	<i>Nitrospira</i> sp.
<i>Nitrobacter</i> sp.	<i>Nitrobacter</i> sp.	<i>Nitrobacter</i> sp.

Pored nitrifikacionih bakterija, izolovane su i različite vrste heterotrofnih bakterija (tabela 8.4.) od kojih je zanimljivo izdvojiti *Acinetobacter* za koju su pronađeni literaturni podaci novijeg datuma da ima sposobnost obavljanja heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije (Huang i dr., 2013; Yao i dr., 2013).

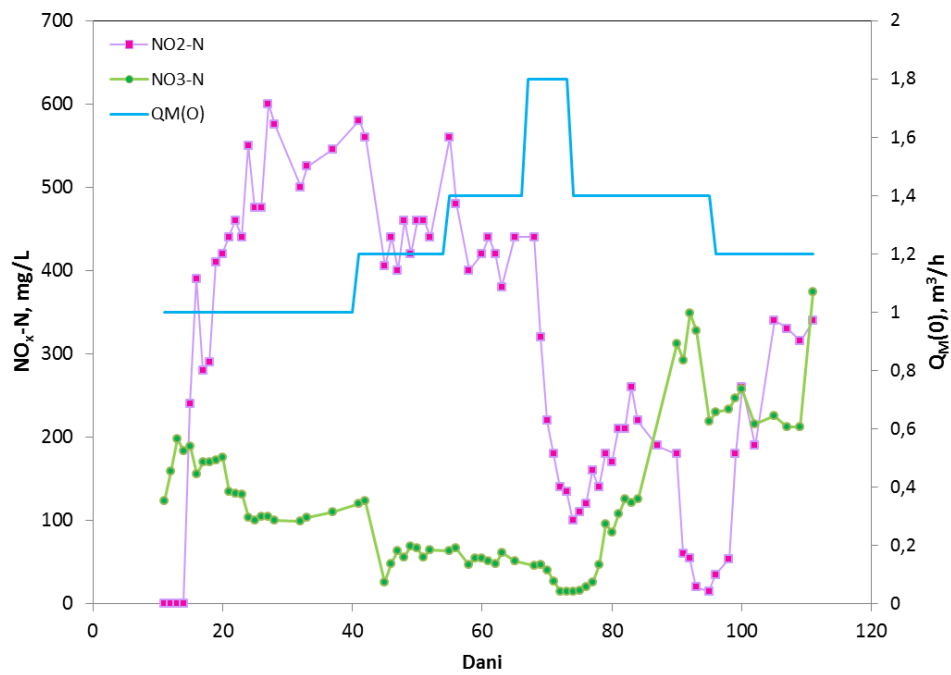
Takođe je u literaturi pronađeno da su indentifikovane i druge heterotrofne bakterije koje imaju mogućnost obavljanja heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije, *Alcaligenes faecalis* C16 (Liu i dr., 2015), *Pseudomonas stutzeri* YG-24 (Li i dr., 2015), *Rhodococcus* sp. CPZ24 (Chen i dr., 2012), *Diaphorobacter* sp. PD-7 (Ge i dr., 2015).

Sintetička otpadna voda koja je korišćena za eksperimentalna istraživanja nije sadržala organski ugljenik, samo neorganski u obliku bikarbonata, pa se postavlja pitanje kako su pronađeni heterotrofi opstali u koloni, pored mogućnosti korišćenja ugljenika od odumrlih ćelija. Međutim, rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazali su da *Acinetobacter* sp. Y16, može da uklanja amonijum jon kako sa organskim tako i sa neorganskim izvorom ugljenika, s tim što se efikasnost u uklanjanju amonijum jona razlikuje u zavisnosti od korišćenog izvora ugljenika (Huang i dr., 2013). Zapravo o fiziologiji heterotrofnih nitrifikacionih bakterija i o uslovima formiranja nitrifikacionih proizvoda se veoma malo zna.

Pored mogućnosti određenih heterotrofnih vrsta da obavljaju heterotrofnu nitrifikaciju, heterotrofi su često nađeni zajedno sa nitrifikacionim bakterijama u autotrofnim nitrifikacionim biofilmovima (Kindaichi i dr., 2004; Mastumatoi dr., 2010; Okabe i dr., 1999), takođe i sa nitrit oksidujućim bakterijama (NOB) u nitrit oksidujućim granulama bez eksternog dodavanja organskog supstrata (Ni i dr., 2011a; Ni i dr., 2011b). Ovaj fenomen je povezan sa činjenicom da heterotrofi mogu da rastu uz pomoć rastvorenih mikrobioloških proizvoda (SMP) koje proizvode autotrofi (Kindaichi i dr., 2004; Kang i dr., 2014; Merkey i dr., 2009; Mastumato i dr., 2010; Ni i dr., 2011a; Ni i dr., 2011b)

Sve ove dostupne informacije ukazuju na dodatnu kompleksnost bioloških sistema za tretman otpadnih voda kao i niz potrebnih istraživanja.

Razlog akumulacije nitrita tokom trajanja procesa verovatno leži u povezanosti fluidomehanike sistema sa prirodom funkcionisanja mikroorganizama odnosno samih biofilмова kao i u samoj prirodi prisutne mikrobiološke populacije u datom sistemu. Rezultati prikazani na slici 8.37 prikazuju promenu koncentracije nitrita i nitrata sa promenom ulaznog protoka kroz mlaz uz prethodno data obrazloženja pojedinih dešavanja tokom ispitivanih faza.

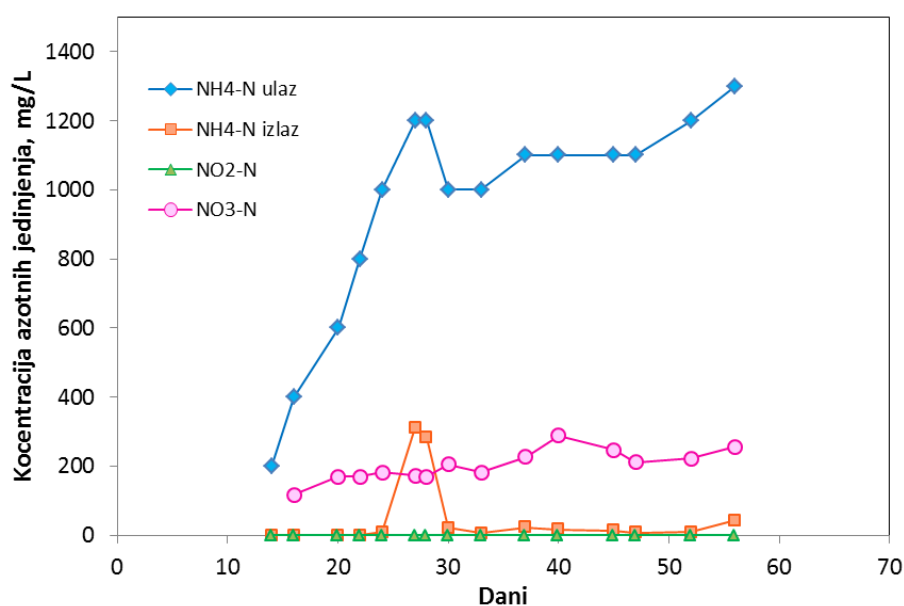


Slika 8.37. Promena koncnetracije nitrita i nitrata sa ulaznim protokom kroz mlaz tokom trajanja procesa

### 8.2.3. UKLANJANJE AZOTA U PAKOVANOM SLOJU

Radi dodatnog ispitivanja uticaja fluido-mehanike fontansko-fluidizovanog sloja sa centralnom cevi na proces uklanjanja azota iz otpadne vode, ispitivanja ovog procesa su rađena i u staklenoj koloni, visine 660 mm i prečnika 45 mm, sa pakovanim slojem istog tipa nosača. Zapremina nosača u koloni je iznosila 0,6 L, a količina otpadne vode 600 mL. Sa dna kolone preko raspodeljivača je uveden vazduh, a proces je vođen šaržno. Koncentracija kiseonika se kretala oko 6 mg/L, a temperatura je varirala u zavisnosti od ambijentalne u opsegu 24 – 32 °C. Tokom procesa je konstantno dodavan natrijumbikarbonat kako bi se pH vrednost održavala na vrednosti oko 7,5 i kako bi se izbegla limitiranost alkaliteta. Sastav sintetičke otpadne vode je bio isti kao i u koloni sa fontansko-fluidizovanim slojem sa odgovarajućim koncentracijama  $NH_4Cl$ . Kolona sa pakovanim slojem je zasejana na isti način kao i kolona sa fontansko-fluidizovanim slojem, pomoću biomase koja je mehanički skinuta sa keramičkih nosača iz kolone koja je radila preko 200 dana (poglavlje 7), tako da je isti mikrobiološki sastav unešen u obe kolone.

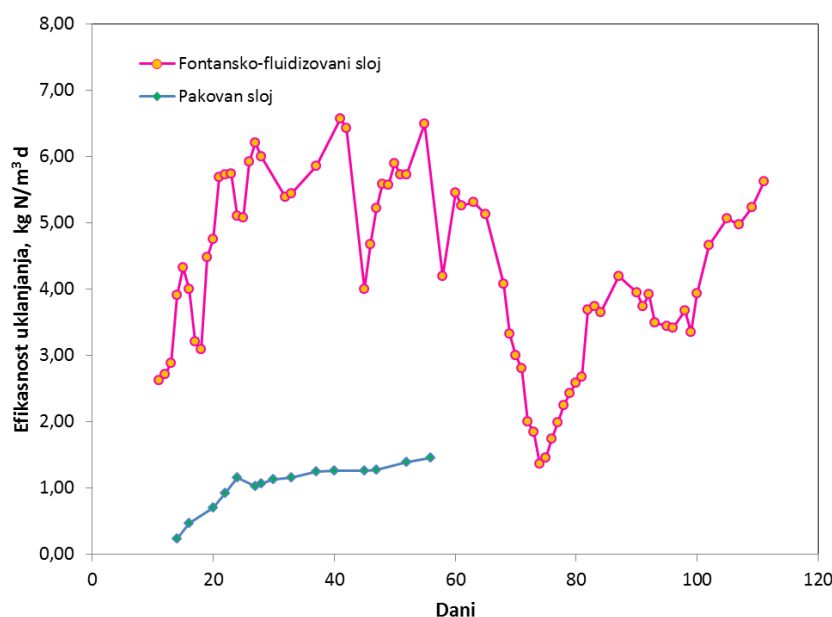
Rezultati ispitivanja procesa uklanjanja amonijum jona tokom vremena u koloni sa pakovanim slojem plastičnih nosača prikazani na slici 8.38., pokazuju da se proces nitrifikacije odvijao tokom čitavog trajanja procesa ispitivanja.



Slika 8.38. Promene koncentracije azotnih jedinjenja tokom procesa u koloni sa pakovanim slojem plastičnih nosača

U koloni nije dolazilo do akumulacije nitrita, čija koncentracija nije prelazila  $0,2 \text{ mg/L}$ . Ovaj rezultat može biti još jedna potvrda da fluido-mehanika fontansko-fluidizovanog sloja može biti jedan od ključnih parametara u regulaciji procesa uklanjanja azota iz otpadnih voda.

Takođe se poređenjem količine uklonjenog azota po  $\text{m}^3$  nosača i danu, slika 8.39, pokazuje da je veća efikasnost postignuta u koloni sa fontansko-fluidizovanim slojem nego sa pakovanim slojem. U tabeli 8.5. su prikazane dostignute efikasnosti uklanjanja azota u drugim ispitivanim sistemima.



Slika 8.39. Poređenje efikasnosti uklanjanja azota u koloni sa pakovanim slojem i koloni sa fontansko-fluidizovanim slojem plastičnih nosača

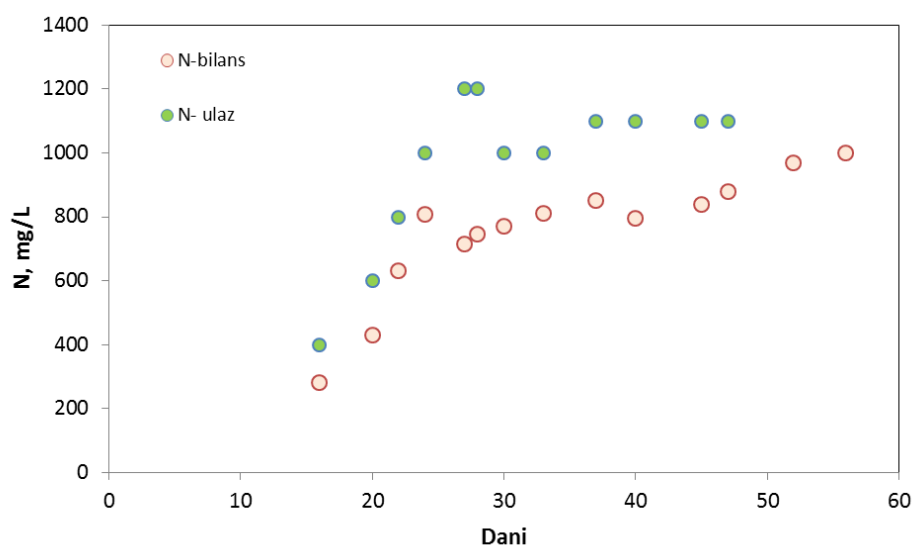
Tabela 8.5. Efikasnost uklanjanja azota u drugim ispitivanim sistemima

$\text{kg N/m}^3 \text{ d}$	Tip sistema	Referenca
0,6-1,3	Nitrifikacioni mulj	(Arnold i dr., 2000)
0,8-1,0	SBR sa nitrifikacionim muljem	(Carrera i dr., 2003)
5	Air-lift reactor	(Arnold i dr., 2000)
3,5	Inverzni turbulentni reaktor	(Tijhuis i dr., 1995)
1,74	Ultra-Compact biofilm reaktor	(Bougard i dr., 2006)
		(Lee i dr., 2004)

Drastično povećanje količine zaostalog azota u efluentu između 25 i 30-tog dana procesa, potiče od prevelikog povećanja ulazne koncentracije  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  za  $200 \text{ mg/L}$ , sa  $1000 \text{ mg/L}$  na  $1200 \text{ mg/L}$ . Ovo povećanje je nepovoljno delovalo na bakterije koje su do tog trenutka uklanjale  $1000 \text{ mg/L}$ , a nakon ovog povećanja ulazne koncentracije njihova mogućnost uklanjanja je pala na oko  $900 \text{ mg/L}$ .

Nakon pada u efikasnosti ulazna koncentracija  $NH_4^+ - N$  je vraćena na vrednost od  $1000 \text{ mg/L}$ , nakon koje je periodično povećavana za  $100 \text{ mg/L}$  uz konstantno povećanje količine uklonjenog azota da bi na kraju procesa ispitivanja količina uklonjenog azota u ovoj koloni iznosila  $0,8 \text{ g/d}$ . Ono što se primetilo za vreme trajanja procesa ispitivanja u koloni sa pakovanim slojem plastičnih nosača je da nije periodično dolazilo do pada u efikasnosti usled nagomilavanja biomase i ćelijskih ostataka kao što je to bilo zabeleženo kod ispitivane kolone sa pakovanim slojem keramičkih nosača. Razlog može biti u tipu upotrebljenih nosača, poroznosti pakovanog sloja, kao i u debljini formiranog biofilma.

Iako su uglavnom nađene iste mikrobiološke vrste u obe ispitivane kolone, uz primenu istog sastava sintetičke otpadne vode, isti rezultati nisu bili zabeleženi. Rezultati uklanjanja azota u 2D polukoloni pokazuju da je dolazilo do oscilacije u količini nastalih azotnih vrsta kao i oscilaciji njihovih odnosa u efluentu pri različitim operativnim uslovima. U koloni sa pakovanim slojem se na osnovu bilansa azota prikazanog na slici 8.40, koji predstavlja razliku između ulazne količine azota i količine neoksidovanog azota, količine nastalih oksida i količine azota koja se inkorporira u ćelije (u ovom slučaju zanemarena), vidi da prilična količina azota nedostaje. Ukoliko se samo proces uklanjanja azota dešava u koloni bilans mora biti zadovoljen. Kao razlog nastalih razlika u količini azota se može pretpostaviti da je dolazilo do stvaranja gasovitog azota. Potvrdu ovoga je potrebno izvršiti merenjem količine izdvojenog gasa iz kolone tokom procesa gasnim hromatografom. Kao što je već pomenuto, pored nitrifikacionih bakterija u kolonama je nađena bakterija roda *Acinetobacter* za koje postoje literaturni podaci da ima mogućnost obavljanja heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije. Ovo otvara dodatna pitanja i mogućnosti za dalja istraživanja.



Slika 8.40. Bilans azota u koloni sa pakovanim slojem

Dobijeni rezultati još jednom potvrđuju da fluido-mehanika sistema igra značajnu ulogu u funkcionisanju bioloških sistema za tretman otpadnih voda.

## 9. ZAKLJUČAK

Eksperimentalna istraživanja su pokazala da je karakteristika fontansko-fluidizovanog sloja sa centralnom cevi prostrujavanje tečnosti preko ulaznog regiona iz anulusa u centralnu cev i obrnuto. Prostrujavanje se dešava i kada je u sistemu prisutan vazduh, odnosno, uvek će dolaziti do razmene tečnosti između centralne cevi i anulusa, a količina tečnosti koja prostrujava zavisiće od protoka fluida, geometrije sistema i karakteristika čvrste faze.

Dobijeni rezultati pokazuju da povećanje prečnika upotrebljenih staklenih kuglica od 3 do 6 mm utiče na povećanje zapreminskog koeficijenta prenosa mase,  $k_L a$ . Povećanju vrednosti ovog koeficijenta doprinosi i povećanje cirkulacije čestica u sistemu kao i povećanje vrednosti protoka tečnosti i gasa. U zavisnosti od operativnih uslova u ovom eksperimentalnim istraživanjima vrednosti  $k_L a$  su se kretale od 0,0022 do 0,0153  $s^{-1}$ .

Uklanjanje azota iz otpadne vode u sistemu sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi koji do sada nije bio upotrebljen u te svrhe, pokazalo se mogućim, što je i bio jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja. Sistem sa fontansko-fluidizovanim slojem i centralnom cevi se pokazao i veoma efikasnim u uklanjanju azota iz otpadne vode, dostizanjem vrednosti oko 700 mg N/L, odnosno oko 7 kg N/m<sup>3</sup> · d, uz mogućnost dostizanja i viših vrednosti koje bi se postigle odgovarajućim protocima fluida i konstrukcijom sistema, odnosno odgovarajućim operativnim uslovima. Pokazalo se i da je fluido-mehanika jedan od ključnih parametara u kontroli procesa sa biofilmovima. U inženjerskom smislu, hidrodinamikom sistema se može manipulirati kao kontrolni parametar i time uticati na poboljšavanje mikrobiološkog procesa u tretmanu otpadnih voda. Reaktor sa fontansko-fluidizovanim slojem ima niz prednosti koje je potrebno uskladiti sa mikrobiološkim procesima i omogućiti ga konkurentnim i visoko efikasnim sistemom kako za različite procese uklanjanja azota iz otpadne vode tako i ugljeničnog i ostalog zagađenja, a u tom pravcu će se kretati naša dalja istraživanja.

Istraživanja i dobijeni rezultati su patentabilni i primenljivi u procesima prečišćavanja otpadnih voda kao inovativna tehnologija.

## LISTA SIMBOLA

$A_A$	Površina poprečnog preseka anulusa, $m^2$
$A_d$	Površina poprečnog preseka centralne cevi, $m^2$
$C^*$	Koncentracija saturacije kiseonikom, $mg/L$
$C_0$	Koncentracija rastvorenog kiseonika u vremenu $t = 0$ , $mg/L$
$C_1$	Konstanta, definisana jednačinom 8.1.1.8
$C_2$	Konstanta, definisana jednačinom 8.1.1.9
$C_t$	Koncentracija rastvorenog kiseonika u vremenu $t$ , $mg/L$
$D_d$	Prečnik centralne cevi, $m$
$F^*$	Bezdimenzioni faktor trenja definisan jednačinom 8.1.1.11
$F_f$	Gradijent pritiska usled trenja između fluida i zida u centralnoj cevi, $Pa/m$
$F_f^*$	Definisan jednačinom 8.1.1.13
$F_p$	Gradijent pritiska usled trenja između čestica i zida u centralnoj cevi, $Pa/m$
$F_p^*$	Definisan jednačinom 8.1.1.12
$F_w$	$F_f + F_p$
$G_p$	Maseni protok čestica, $g/s$
$K_I$	Koeficijent inhibicije, $mg/L$
$K_N$	Koeficijent zasićenja azotom iz amonijaka (amonijak-N), $mg/L$
$P_d$	Dinamički pritisak u centralnoj cevi, $Pa$
$Q_A$	Protok tečnosti u anulusu, $m^3/h$
$Q_A(0)$	Ulazni protok tečnosti u anulus, $m^3/h$
$Q_M$	Protok tečnosti u centralnoj cevi, $m^3/h$
$Q_M(0)$	Ulazni protok tečnosti u centralnu cev, $m^3/h$
$Q_g$	Protok vazduha u anulusu, $L/h$
$R_a$	Hrapavost površine, $nm$
$R_A$	Polureakcija za akceptor elektrona



$R_C$	Polureakcija za ćelijski material
$R_D$	Polureakcija za donor elektrona
$Re_d$	Rejnoldsov broj
$S_I$	Koncentracija inhibitorne supstance, $mg/L$
$S_N$	Koncentracija azota (amonijak-N), $mg/L$
$S_{mp}$	Koncentracija mikrobioloških produkata, $mg/L$
$S_{p2}$	Koncentracija partikulativnog supstrata nastao odumiranjem ćelija, $mg/L$
$S_{s1}$	Ulazna koncentracija rastvorenog supstrata, $mg/L$
$S_{s2}$	Koncentracija rastvorenog supstrata nastala odumiranjem ćelija, $mg/L$
$U_A$	Površinska brzina tečnosti u anulusu, $m/s$
$U_d$	Površinska brzina tečnosti u centralnoj cevi, $m/s$
$U_{mf}$	Minimalna brzina fluidizacije, $m/s$
$U_t$	Terminalna brzina jedne čestice, $m/s$
$W_d$	Maseni fluks čestica kroz centralnu cev, $kg/m^2 \cdot s$
$X_D$	Koncentracija ćelijskih ostataka, $mg/L$
$X_a$	Koncentracija aktivnih mikroorganizama, $mg/L$
$X_i$	Koncentracija inertnog dela biomase, $mg/L$
$Y_n$	Neto prinos biomase, $mg/mg$
$d_p$	Prečnik čestice, $mm$
$f_d$	Biorazgradiva frakcija aktivne biomase
$f_e$	Udeo elektrona koji učestvuju u stvaranju energije ćelije
$f_f$	Koeficijent trenja fluid-zid
$f_p$	Koeficijent trenja čestice-zid
$f_s$	Udeo elektrona koji učestvuju u sintezi ćelije
$k_L a$	Zapreminski koeficijent prenosa mase, $s^{-1}$
$\hat{q}$	Maksimalna specifična brzina iskorišćenja supstrata, $mg/mg \cdot h$
$r_d$	Brzina odumiranja biomase, $mg / L \cdot h$

$r_g$	Brzina rasta bakterija, $mg/h \cdot L$
$r_{ut}$	Brzina iskorišćavanja supstrata, $mg/L \cdot h$
$u_F$	Slip brzina između fluida i čestica u centralnoj cevi koja je jednaka brzini u fluidizovanom sloju pri istoj poroznosti kao u centralnoj cevi, $m/s$
$u_d$	Intersticijalna brzina tečnosti u centralnoj cevi = $U_d/\varepsilon_d$
$u_s$	Slip brzina između fluida i čestica ( $u_d - v_d$ ) iznad zone ubrzanja, $m/s$
$v_d$	Brzina čestica u centralnoj cevi iznad zone ubrzanja, $m/s$
$C$	Koncentracija rastvorenog kiseonika, $mg/L$
$K$	Konstanta zasićenja supstratom, $mg/L$
$M$	Masa čestica u sistemu, $kg$
$Q$	Ukupni protok kroz kolonu, $m^3/h$
$S$	Koncentracija rastvorenog supstrata, $mg/L$
$T$	Temperatura, $^{\circ}C$
$X$	Koncentracija biomase, $mg/L$
$Y$	Stvarni prinos biomase, $mg/mg$
$b$	Koeficijent odumiranja biomase, $mg/mg \cdot h$
$m$	Energija za održavanje života, $h^{-1}$
$q$	Specifična brzina iskorišćenja supstrata, $mg/mg \cdot h$
$t$	Vreme, $s$
$z$	Aksijalno rastojanje, $m$

#### Grčka slova

$\beta_d$	Koeficijent trenja između čestica i fluida u centralnoj cevi, $kg/m^4$
$\beta_{mf}$	Koeficijent trenja između čestica i fluida u fluidizovanom sloju pri minimalnoj fluidizaciji, $kg/m^4$
$\varepsilon_d$	Poroznost sloja u centralnoj cevi iznad zone ubrzanja
$\varepsilon_{mf}$	Poroznost sloja pri minimalnoj fluidizaciji

$\mu_f$	Viskozitet fluida, $N \cdot s/m^2$
$\mu$	Specifična brzina rasta mikroorganizama, $h^{-1}$
$\hat{\mu}$	Maksimalna specifična brzina rasta mikroorganizama, $h^{-1}$
$\hat{\mu}_A$	Maksimalna specifična brzina rasta autotrofa, $h^{-1}$
$\hat{\mu}_{A0}$	Maksimalna specifična brzina rasta autotrofa pri optimalno vrednosti $pH$ , $h^{-1}$
$\mu_A$	Specifična brzina rasta autotrofa, $h^{-1}$
$\mu_{dec}$	Brzina odumiranja mikroorganizama, $h^{-1}$
$\mu_{syn}$	Specifična brzina rasta koja je u vezi sa sintezom biomase, $h^{-1}$
$\rho_f$	Gustina fluida, $kg/m^3$
$\rho_p$	Gustina čestice, $kg/m^3$
$\theta$	Korekcionni faktor temperature
$\lambda$	Konstanta, definisana jednačinom 8.1.1.10

### Skraćenice

<i>AFM</i>	Atomic force microscope
<i>ANAMMOX</i>	Anaerobic ammonium oxidation
<i>AOB</i>	Amonijum oksidujuće bakterije
<i>BOD</i>	Biological oxygen demand, Biološka potrošnja kiseonika, $mg O_2/L$
<i>CANON</i>	Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite
<i>COD</i>	Chemical oxygen demand, Hemijska potrošnja kiseonika, $mg O_2/L$
<i>DO</i>	Dissolved oxygen, Rastvoren kiseonik, $mg O_2/L$
<i>EPS</i>	Ekstracelularne polimerne supstance
<i>FE – SEM</i>	Field emission scanning electron microscope
<i>NOB</i>	Nitrit oksidujuće bakterije
<i>OLAND</i>	Oxygen limited autotrophic nitrification/denitrification
<i>QS</i>	Quorum sensing

<i>SHARON</i>	Stable high rate ammonia removal over nitrite
<i>SRT</i>	Vreme zadržavanja ćelija u reaktoru, <i>h</i>
<i>TKN</i>	Total Kjeldahl nitrogen, Ukupni Kjeldalov azot, <i>mg/L</i>
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction

## LITERATURA

- Abbassi, R., Yadav, A.K., Huang, S., Jaffé, P.J., 2014. Laboratory study of nitrification, denitrification and anammox processes in membrane bioreactors considering periodic aeration. *Journal of Environmental Management* 142, 53-59.
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y. 2007. Effect of aeration intensity on formation of phenol-fed aerobic granules and extracellular polymeric substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 175-82.
- Aguado, R., Prieto, R., San José, M. J., Alvarez, S., Olazar, M., Bilbao, J., 2005. Defluidization modelling of pyrolysis of plastics in a conical spouted bed reactor. *Chemical Engineering and Processing* 44, 231–235.
- Ahn, J. H., Kwan, T., Chandran K., 2011. Comparison of partial and full nitrification processes applied for treating high-strength nitrogen wastewater: microbial ecology through nitrous oxide production. *Environmental Science and Technology* 45, 2734-2740.
- Ahn, Y. H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry* 41, 1709-1721.
- Almstrand, R., Lydmark, P., Lindgren, P. E., Sörensson, F., Hermansson, M., 2013. Dynamics of specific ammonia oxidizing bacterial populations and nitrification in response to controlled shifts of ammonium concentrations in wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (5), 2183–2191.
- Altzibar, H., Lopez, G., Alvarez, S., Jose, M., Barona, A., Olazar, M., 2008. A draft-tube conical spouted bed for drying fine particles, *Drying Technology* 26(3), 308-314.
- Alves, C.F., Melo, L.F., Vieira, M.J., 2002. Influence of medium composition on the characteristics of a denitrifying biofilm formed by *Alcaligenes denitrificans* in a fluidized bed reactor. *Process Biochemistry* 37, 837-845.
- An, Y.H., Friedman, R.J., 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 43 (3), 338-348.
- Andalib, M., Nakhla, G., Sen, D., Zhu, J., 2011. Evaluation of biological nutrient removal from wastewater by Twin Circulating Fluidized Bed Bioreactor (TCFBBR) using a predictive fluidization model and AQUIFAS APP, *Bioresource Technology* 102, 2400–2410.
- Andrews, J. F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 10:707-723.
- Andrews, J.H., Harris, R. F., 1986. R-selection and K-selection and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology* 9, 99 –147.

- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *Journal of Water Pollution Control Federation* 48, 835-852.
- Aoi, Y., Miyoshi, T., Okamoto, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Kitayama, A., Nagamune, T., 2000. Microbial Ecology of Nitrifying Bacteria in Wastewater Treatment Process Examined by Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 234-240.
- Aquino, S.F., Stuckey, D.C., 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research* 38, 255-66.
- Arnold, E., Bohm, B., Wilderer, PA., 2000. Application of activated sludge and biofilm sequencing batch reactor technology to treat reject water from sludge dewatering systems: a comparison. *Water Science Technology*, 41:115.
- Arnold, E., Bohm, B., Wilderer, PA., 2000. Application of activated sludge and biofilm sequencing batch reactor technology to treat reject water from sludge dewatering systems: a comparison. *Water Science Technology*, 41:115.
- Arsenijević, Z., Grbavčić, Ž., Garić-Grulović, R., 2002. Drying of Solutions and Suspensions in the Modified Spouted Bed with Draft tube. *Thermal Science* 2, 47-70.
- Aslan S., E. Simsek, 2012. Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. *Bioresource Technology* 118, 24-29.
- Aslan, S., Dahab, M., 2008. Nitrification and denitrification of ammonium rich wastewater using fluidized-bed biofilm reactors. *Journal of Hazardous Materials* 156, 56–63.
- Aslan, S., Dahab, M., 2008. Nitritation and denitritation of ammonium-rich wastewater using fluidized-bed biofilm reactors. *Journal of Hazardous Materials* 156, 56-63.
- Bader, F. G., Kinetics of double-substrate limited growth. In *Microbial Population Dynamics*, M. J. Bazin ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1-32, 1982.
- Bae, W., Baek, S., Chung, J., Lee, Y. 2002. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation*, 12(5), 359–366.
- Bahat-Samet, E., Castro-Sowinski, S., Okon, Y., 2004. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Letters* 237 (2), 195-203.
- Baltzis, B.C., Fredrickson, A. G., 1988. Limitation of growth rate by two complementary nutrients: Some elementary but neglected considerations. *Biootechnology and Bioengineering* 31, 75-86.

- Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A.S., Van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M., 2012. Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnology* 93, 1281-1294.
- Benyhaia, Jones, L., Plantaz, D., 1996. Mass transfer studies in pneumatic reactors. *Chemical Engineering and Technology* 19, 425–431.
- Berghel, J., Renström, R., 2014. An Experimental Study on the Influence of Using a Draft Tube in a Continuous Spouted Bed Dryer, *Drying Technology* 32(5), 519-527.
- Bernet N., Peng D., Delgenes JP, Moletta R., 2001. Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. *Journal of Environmental Engineering* 127:266.
- Bernstein, R., Belfer, S., Freger, V., 2011. Bacterial attachment to RO membranes surface-modified by concentration-polarization-enhanced graft polymerization. *Environmental Science and Technology* 45, 5973–5980.
- Blanc, J., Audic, J. M., Faup, G.M., 1986. Enhancement of Nitrobacter activity by heterotrophic bacteria. *Wastewater Research* 20, 1375-1381.
- Boaventura, BAR, Rodrigues, AE., 1997. Denitrification kinetics in a rotating disk biofilm reactor. *Chemical Engineering Journal*, 65 (3), 227-235.
- Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R., 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.
- Bougard, D., Bernet, N., Cheneby, D., Delgenes, J. P., 2005. Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: Effect of temperature on nitrite accumulation. *Process Biochemistry* 41, 106-113.
- Bougard, D., Bernet, N., Cheneby, D., Delgenes, J.P., 2006. Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: Effect of temperature on nitrite accumulation. *Process Biochemistry* 41, 106-113.
- Branda, SS., Vik, S., Friedman, L, Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13 (1), 20-26. 27.
- Bukur, D.B., Patel, S.A., Daly, J.G., 1990. Gas holdup and solids dispersion in a three phase slurry bubble column. *AIChE Journal* 36 ,1731–1735.
- Busscher, H.J., Bos, R., Vandermei, H.C., 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 128 (3), 229-234.
- Camarasa, E., Vial, C., Poncin S., Wild, G., Midoux, N., Bouillard, J., 1999. Influence of coalescence behaviour of the liquid and of gas sparging on hydrodynamics and bubble characteristics in a bubble column. *Chemical Engineering and Processing* 38, 329–344.

- Carrera, J., Baeza, Ja., Vicent, T., Lafuente, J., 2003. Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Research* 37:4211.
- Celmer, D., Oleszkiewicz, J. A., Cicek, N., 2008. Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Research* 42, 3057-3065.
- Celmer, D., Oleszkiewicz, J.A, Cicek, N., 2008. Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Research* 42, 3057-3065.
- Chae, K.J., Rameshwar, T., Jang, A., Kim, S.H., Kim, I.S., 2008. Analysis of the nitrifying bacterial community in BioCube sponge media using fluorescent in situ hybridization (FISH) and microelectrodes. *Journal of Environmental Management* 88, 1426-1435.
- Chambless, J.D., Stewart, P.S., 2007. A three-dimensional computer model analysis of three hypothetical biofilm detachment mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering* 97 (6) 1573-1584.
- Chang, H.T., Rittman, B.E., Amar, D., Heim, R., Ehlinger, O., Lestly, Y., 1991. Biofilm detachment mechanisms in a liquid-fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 499-506.
- Chang, H.T., Rittman, B.E., Amar, D., Heim, R., Ehlinger, O., Lestly, Y., 1991. Biofilm detachment mechanisms in a liquid fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 499-506.
- Chang, S.K., Kang, Y., Kim, S.D., 1986. Mass transfer in two and three-phase fluidized Beds. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 18, 524-530.
- Chen, C.M., Leu, L.P., 2001. A highly elevated mass transfer rate process for three-phase, liquid-continuous fluidized beds. *Chemical Engineering Journal* 81, 223-230.
- Chen, C.Y., Chen, S.D., 2000. Biofilm characteristics in biological denitrification biofilm reactors. *Water Science and Technology* 41 (4), 147-154.
- Chen, G.H., Wong, M.T., Okabe, S., Watanabe, Y., 2003. Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chloride concentration. *Water Research* 37, 3125-3135.
- Chen, M.J., Zhang, Z., Bott, T.R., 1998. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnol Tech* 12, 875-80.
- Chen, P., Li, J., Li, Q.X., Wang, Y., Li, S., Ren, T., Wang, L., 2012b. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus sp.* CPZ24. *Bioresource Technology* 116, 266-270.



- Chen, P., Li, J., Li, Q.X., Wang, Y., Li, S., Ren, T., Wang, L., 2012. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresource Technology* 116, 266-270.
- Chen, Q., Ni, J., 2012a. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 619–623.
- Chen, Y., Zhang, P., Guo, J.S., Fang, F., Gao, X., Li, C., 2013. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. *Chemosphere* 92, 633-638.
- Choi, Y.C., Morgenroth, E., 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Science and Technology* 47, 69-76.
- Christensson, M., Welander, T., 2004. Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area. *Wat. Sci. Tech.* 49 (11-12), 207- 214.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott, 1995. Microbialbiofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745.
- Crutzen, P.J., 1979. The role of *NO* and *N<sub>2</sub>O* in the chemistry of the troposphere and stratosphere. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 7, 443-472.
- Daverey, A., Chen, Y.C., Dutta, K., Huang, Y.T., Lin, J.G., 2015. Start-up of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in sequencing batch biofilm reactor using novel biomass carriers. *Bioresource Technology* 190, 480-486.
- Daverey, A., Su, S. H., Huang, Y. T., Chen, S. S., Sung, S., Lin, J.G., 2013. Partial nitrification and anammox process: A method for high strength optoelectronic wastewater treatment. *Water Research* 47, 2929-2937.
- Davey, M.E., O'Toole G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4), 847-867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell- to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–8.
- De Lancey Pulcini, E., 2001. Bacterial Biofilms: a review of current research. *Néphrologie* 22 (8) 439-441.
- Deckwer, W.D., Schumpe, A., 1993. Improved tools for bubble column reactors design and scale-up. *Chemical Engineering Science* 48, 889–911.
- Della Rocca, C., Belgiorno, V., Meric, S., 2006. An heterotrophic/autotrophic denitrification (HAD) approach for nitrate removal from drinking water. *Process Biochemistry* 41, 1022–1028.

- Derlon, N., Masse, A., Escudie, R., Bernet, N., Paul, E., 2008. Stratification of the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Research* 42, 2102-2110.
- Di Capua, F., Papirio, S., Lens, P.N.L, Esposito, G., 2015. Chemolithotrophic denitrification in biofilm reactors. *Chemical Engineering Journal* 280, 643-657.
- Dimitrov, D., Hadjiev, D., Nikov, I., 2007. Optimisation of support medium for particle-based biofilm reactors. *Biochemical Engineering Journal* 37, 238-245.
- Ding, Y., Song, X., Wang, Y., Yan, D., 2012. Effects of dissolved oxygen and influent COD/N ratios on nitrogen removal in horizontal subsurface flow constructed wetland. *Ecological Engineering* 46, 107-111.
- Dong, Y., Zhang, Z., Jin, Y., Li, Z., Lu, J., 2011. Nitrification performance of nitrifying bacteria immobilized in waterborne polyurethane at low ammonia nitrogen concentrations, *Journal of Environmental Sciences* , 23(3) 366–371.
- Downing, L. S. & Nerenberg, R., 2008. Effect of oxygen gradients on the activity and microbial community structure of a nitrifying, membrane-aerated biofilm. *Biotechnology and Bioengineering* 101 (6), 1193–1204.
- Dunne, W.M, Jr. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2) 155-166.
- Elenter, D., Milferstedt, K., Zhang, W., Hausner, M., Morgenroth, E., 2007. Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water Research* 41, 4657-4671.
- Elenter, D., Milferstedt, K., Zhang, W., Hausner, M., Morgenroth, E., 2007. Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water Research* 41, 4657-4671.
- Epstein, Grace., 2011. Spouted and spout fluid beds. Cambridge university press.
- Erbil, A. C., 2003. Annulus leakage and distribution of the fluid flow in a liquid spout-fluid bed with a draft tube. *Chemical Engineering Science* 58, 4739-4745.
- Erbil, A. C., 2006. Effect of the annulus aeration on annulus leakage and particle circulation in a three-phase spout-fluid bed with a draft tube. *Powder Tehnology* 162, 38-49.
- Esparza-Soto, M., Westerhoff, P., 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Water Research* 37, 2301-10.
- Fang, H.H.P, Xu, L.C., Chan, K.Y., 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilms on biofilms and biocorrosion. *Water Research* 36, 4709-16.

- Fenel, Z., Theoretical analysis of continuous culture systems. In *Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms*. I. Malek and Z. Fenel eds, Academic Press, New York, NY, 67-153, 1966.
- Feng L., Wu, Z., Yu, X., 2013. Quorum sensing in water and wastewater treatment biofilms. *Journal of Environmental Biology* 34, 437-444.
- Fernandez-Akarregi, A. R., Makibar, J., Lopez, G., Amutio, M., Olazar, M., 2013. Design and operation of a conical spouted bed reactor pilot plant (25 kg/h) for biomass fast pyrolysis. *Fuel Processing Technology* 112(0), 48-56.
- Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology* 189 (22), 7945-7947.
- Freitas, C., Teixeira, J.A., 2001. Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. *Chemical Engineering Journal* 84, 57–61.
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using carbon exchange resin. *Water Resource* 30, 1749-58.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176, 269.
- Furumai, H., Rittmann, B. E., 1994. Evaluation of multiple-species biofilm and floc processes under a simplified aggregate model. *Water Science and Technology* 29(10-11), 439-446.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z., 2008. Characterisation of bacterial adhesion and removal in a flow chamber by micromanipulation measurements. *Biotechnology Letters* 30 (3) 427- 433.
- Garrido, J.M, Van Benthum, W. A. J., Van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J.J., 1997. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 53(2),168-78.
- Ge, Q., Yue, X., Wang, G., 2015. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high initial phenol concentration by isolated bacterium *Diaphorobacter* sp. PD-7. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 23, 835-841.
- Ge, S., Peng, Y., Qiu, S., Zhu, A., Ren, N., 2014. Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions in a continuous plug-flow step feed process. *Water Research* 55, 95-105.
- Gerardi, H. M. *Nitrification and denitrification in activated sludge process*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 2002.

- Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ., 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology* 310, 523-534.
- Grady, L. C. P., Jr., G. T. Daigger, H. C. Lim, *Biological Wastewater Treatment*. Marcel Dekker, 1999.
- Grbavčić, Z.B., Garić, R.V., Vuković, D.V., Hadzismajlović, Dz.E., Littman, H., Morgan III, M.H., Jovanović, S.Dj., 1992a. Hydrodynamic modeling of vertical liquid-solids flow. *Powder Technology* 72, 183-191.
- Grbavčić, Z.B., Garić, R.V., Vuković, D.V., Hadzismajlović, Dz.E., Littman, H., Morgan, III M.H., 1992b. Fluid flow pattern and solids circulation rate in a liquid phase spout-fluid bed with draft tube, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 70, 895-903.
- Guisasola, A., Petzet, S., Baeza, J.A., Carrera, J., Lafuente, J., 2007. Inorganic carbon limitations on nitrification: Experimental assessment and modelling, *Water Research* 41, 277-286.
- Ha, J., Gelabert, A., Spormann, A. M., Brown, G.E., 2010. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis* batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR and EXAFS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 1-15.
- Hamdad, I., Hashemi, S., Rossi, D., Macchi, A., 2007. Oxygen transfer and hydrodynamics in three-phase inverse fluidized beds. *Chemical Engineering Science* 62, 7399 – 7405.
- Hamoda, M.F., Zeidan, M.O., Al-Haddad, A.A., 1996. Biological nitrification kinetics in a fixed-film reactor. *Bioresource Technology* 58, 41-48.
- Han, K., A, Levenspiel, O., 1988. Extended Monod kinetics for substrate, products and cell inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 430-437.
- Han, S., Zhou, J., Jin, Y., Loh, K. C., Wang, Z., 1998. Liquid dispersion in gas-liquid-solid circulating fluidized beds. *Chemical Engineering Journal* 70, 9-14.
- He, S., Xue, G., Wang, B., 2009. Factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* 168, 704-710.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R., Weltevrede, R., Mulder, A., 1993. Development and scale-up of an aerobic biofilm air-lift suspension reactor. *Water Science and Technology* 27, 253–261.

- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C, Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 1998. The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich waste water. *Water Science and Technology*, 37(9), 135-42.
- Hem, L. J., Rusten, B., Odegaard, H., 1994. Nitrification in a moving bed biofilm reactor, *Water Research* 1425-1433.
- Hermanowicz, S. W., Ganczarczyk, J.J., 1985. Mathematical modeling of biological packed and fluidized bed reactors. *Mathematical Models in Biological Waste Water Treatment*, S. E. Jorgensen and M. J.Gromiec, eds. Elsevier, 473-524.
- Herskowitz, M., Merchuk, J.C., 1986. A loop three-phase fluidized bed reactor. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 64, 57-61.
- Heukelekian, H., 1947. The effect of carbonaceous materials on nitrification. *Proceedings of the 4th International Congress on Microbiology*, 460.
- Hockenbury, M. R., G. T., Daigger and C. P. L. Grady Jr, 1977a. Factors affecting nitrification. *Journal of the Environmental Engineering Division, ASCE*, 103, 9-19.
- Hockenbury, M. R., C. P. L. Grady Jr., 1977b. Inhibition of nitrification-effects of selected organic compounds. *Journal, Water Pollution Control Federation* 49, 768-777.
- Horn, H., Morgenroth, E., 2006. Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chemical Engineering Science* 61 (5), 1347-1356.
- Huang, G., Huang, Y., Hu, H., Liu, F., Zhang, Y., Deng, R., 2015. Remediation of nitrate-nitrogen contaminated groundwater using a pilot-scale two-layer heterotrophic-autotrophic denitrification permeable reactive barrier with spongy iron/pine bark. *Chemosphere* 130, 8-16.
- Huang, X., Li, W., Zhang, D., Qin, W., 2013. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology* 146, 44-50.
- Huang, X., Li, W., Zhang, D., Qin, W., 2013. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology* 146, 44-50.
- Huang, X., Li, W., Zhang, D., Qin, W., 2013. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology* 146, 44-50.
- Ijichi, K., Uemura, Y., Hatate, Y., 2000. Coating of particles with finer particles using a draft-tube spouted-bed. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 33(3), 526-528.
- Imat T., Kusuda T., Furumat H., 1993. Kinetic study and mathematical modeling of biofilm in an anaerobic fluidized bed. In: *Proc. 2nd Int. Specialized Conf. On Biofilm Reactors*, 463-470, Paris, France.

IPCC, 2007. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p. 996.

Ista, L.K., Callow, M.E., Finlay, J.A., Coleman, S.E., Nolasco, A.C., Simons, R.H., Callow, J.A., Lopez, G.P., 2004. Effect of substratum surface chemistry and surface energy on attachment of marine bacteria and algal spores. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7), 4151-4157.

Jafari, J.S., Moussavi, G., Yaghmaeian, K., 2015. High-rate biological denitrification in the cyclic rotating-bed biological reactor: Effect of  $COD/NO_3^-$ , nitrate concentration and salinity and the phylogenetic analysis of denitrifiers. *Bioresource Technology* 197, 482-488.

Jayamohan, S., Ohgaki, S., Hanaki, K., 1988. Effect of DO on kinetics of nitrification. *Water supply* 6:141.

Jayaraman, A., Wood, T.K., 2008. Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering* 10, 145-167.

Jin, R.C., Xing, B.S., Ni, W.M., 2013. Optimization of partial nitrification in a continuous flow internal loop airlift reactor. *Bioresource Technology* 147, 516-524.

Joshi, K., Rajan, R., Srinikethan, G., Saidutta, M.B., 2014. Biological denitrification with immobilized *Pseudomonas syringae* on granular activated carbon using three phase draft tube spouted bed reactor. *International Journal of Current Engineering and Technology* 4, 3304-3309.

Kang, J., Du, G., Gao, X., Zhao, B., Guo, J., 2014. Soluble microbial products from water biological treatment process: a review. *Water Environmental Research* 86 (3), 223-231.

Kang, Y., Cho, Y.J., Lee, C.G., Song, P.S., Kim, S.D., 2003. Radial liquid dispersion and bubble distribution in three-phase circulating fluidized beds. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 81, 1130-1138.

Keener, W.K., Arp, D.J., 1993. Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in optimized whole-cell assay. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2501-2510.

Keshava, J., Reshma, R., Srinikethan, G., Saidutta, M.B., 2014. Biological denitrification with immobilized *Pseudomonas syringae* on granular activated carbon using three phase draft tube spouted bed reactor. *International Journal of Current Engineering and Technology* 4, 3304-3309.

- Khan, M. Md. T., Chapman, T., Cochran, K., Schuler, A. J. 2013. Attachment surface energy effects on nitrification and estrogen removal rates by biofilms for improved wastewater treatment. *Water Research* 47, 2190-2198.
- Khan, M.M.T., Ista, L.K., Lopez, G.P., Schuler, A.J., 2011. Experimental and theoretical examination of surface energy and adhesion of nitrifying and heterotrophic bacteria using self-assembled monolayers. *Environmental Science and Technology* 45 (3), 1055-1060.
- Kim, D.J., Chang, J.S., Lee, D.I., Han, D.W., Yoo, I.K., Cha, G.C., 2003. Nitrification of high strength ammonia wastewater and nitrite accumulation characteristics. *Water Science and Technology*, 47(11): 45–51.
- Kim, S.D., Kang, Y., 1997. Heat and mass transfer in three-phase fluidized-bed reactor: an overview. *Chemical Engineering Science* 52, 3639–3660.
- Kim, S.D., Kang, Y., 2006. Hydrodynamics, heat and mass transfer in inverse and circulating three-phase fluidized-bed reactors for waste treatment. *Studies in Surface Science and Catalysis* 159, 103–108.
- Kim, Y.H., Cho, J.H., Lee, Y.W., Lee, W.K., 1997. Development of a carrier for adhesion of nitrifying bacteria using a thermodynamic approach. *Biotechnology Techniques* 11(11), 773-776
- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S., 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3), 1641-1650.
- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S., 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3), 1641-1650.
- Kloep, F., Roske, I., Neu, T.R., 2000. Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. *Water Research*, 311-319.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441 (7091), 300-302.
- Kong, Q., Liang, S., Zhang, J., Xie, H., Miao, M., Tian, L., 2013.  $N_2O$  emission in a partial nitrification system: Dynamic emission characteristics and the ammonium-oxidizing bacteria community. *Bioresource Bioresource Technology* 127, 400-406.
- Kuai, L.P., Verstraete, W., 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11), 4500–4506.

- Kumar, A.S, Mody, K., Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides - a perception. *Journal of Basic Microbiology* 47(2), 103-117.
- Kwok, W. K., Picioreanu C., Ong S. L., van Loosdrecht M. C. M., Ng, W. J., Heijnen, J. J., 1998. Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 58 (4), 400-7.
- La Motta, E.J., 1976. Kinetics of growth and substrate uptake in a biological system. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 286-293.
- Lackner, S., Holmberg, M., Terada, A., Kingshott, P., Smets, B.F., 2009. Enhancing the formation and shear resistance of nitrifying biofilms on membranes by surface modification. *Water Research* 43 (14), 3469-3478.
- Lakshmi, K., Muthukumar, T., Doble, M., Vedaprakash, L., Kruparathnam, Dineshram, R., Jayaraj, K., Venkatesan, R., 2012. Influence of surface characteristics on biofouling formed on polymers exposed to coastal sea waters of India. *Colloids and Surfaces B: 91*, 205–211.
- Lan, C.J., Kumar, M., Wang, C.C., Lin, J.G., 2011. Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor. *Bioresource Technology* 102, 5514-5519.
- Lawrence, A.W., McCarty, P.L., 1970. Unified basis for biological treatment design and operation. *Journal of the Sanitary Engineering Division, ASCE* 96, 757-778.
- Lazarova V., Pierzo V., Fontvielle D., Manem J., 1994. Integrated approach for biofilm characterization and biomass activity control. *Water Science and Technology* 29,345-354.
- Lazarova, V., Manem, J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment, *Water Research* 29, (10): 2227-2245.
- Lazarova, V., Manem, J., 2000. Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment, in *Biofilms II: process analysis and applications*, Bryers JD, Editor. Wiley-Liss: New York. p. 159-206.
- Lee, D.H. , Kim, J.O., Kim, S.D., 1993. Mass transfer and phase holdup characteristics in three-phase fluidized beds. *Chemical Engineering Communication* 119, 179–196.
- Lee, J.S., Jin, H.R., Lim, H., Lim, D. H., Kang, Y., Kim, S. D., Jun, K.W., 2013. Interfacial area and liquid-side and overall mass transfer coefficients in a three-phase circulating fluidized bed. *Chemical Engineering Science* 100, 203–211.
- Lee, K., Rittmann, B.E., 2002. Applying a novel autohydrogenotrophic hollow-fiber membrane biofilm reactor for denitrification of drinking water. *Water Res.* 36, 2040–2052.



- Lee, L.Y., Ong, S.J., Ng, W.J., 2004. Biofilm morphology and nitrification activities: recovery of nitrifying biofilm particles covered with heterotrophic outgrowth. *Bioresource Technology* 95, 209-214.
- Lee, L.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., 2004. Biofilm morphology and nitrification activities: recovery of nitrifying biofilm particles covered with heterotrophic outgrowth. *Bioresource Technology* 95, 209-214.
- Lertpocasombut, K. Epuration carbonée par film biologique mince dans un réacteur "à lit fluidisé triphasique. Ph.D. Thesis, INSA-Toulouse, France, 1991.
- Letzel, H.M., Schouten, J.C., Krishna, R., van den Bleek, C.M., 1999. Gas holdup and mass transfer in bubble column reactors operated at elevated pressure. *Chemical Engineering Science* 54, 2237–2246.
- Li, C., Yang, J., Wang, X., Wang, E., Li, B., He, R., Yuan, H., 2015. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. *Bioresource Technology* 182, 18-25.
- Li, M., Nakhla, G., Zhu, J., 2011. Simultaneous carbon and nitrogen removal with enhanced bioparticle circulation in a Circulating Fluidized Bed Biofilm Reactor. *Chemical Engineering Journal*, 181-182, 35-44.
- Liang, Y., Li, D., Zeng, H., Zhang, C., Zhang, J., 2015. Rapid start-up and microbial characteristics of partial nitrification granular sludge treating domestic sewage at room temperature. *Bioresource Technology* 196, 741-745.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Droppo, I.G., Leppard, G.G., Liss, S.N. 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research* 35, 339-50.
- Lieu Y., 1994. Dynamique de croissance de biofilms nitrifiants appliqués aux traitements des eaux. Ph. D. Thesis. Institute National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- Lispidou, C.S., Rittman, B.E. 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products and active and inert biomass. *Water Resource* 36, 2711-20.
- Littman, H., Paccione, J.D., Plawsky, J.L., 2009. New type of draft tube spout-fluid bed. part 1: Hydraulic transport of 1.94 mm glass particles in water. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48, 9286–9298.
- Liu, M., Lu, C., Shi, M., Yan, C., Fan, Y., 2010. Region-dependent mass transfer behavior in a forced circulation airlift loop reactor. *Powder Technology* 201, 93–103.
- Liu, F., Huang, G., Fallowfield, H., Guan, H., Zhu, L., Hu, H., 2014. Study on Heterotrophic-Autotrophic Denitrification Permeable Reactive Barriers (HAD PRBs) for Groundwater In Situ Remediation. Springer, Germany.

- Liu, J.R., Liu, C.T., Edwards, E.A., Liss, S.N., 2006. Effect of phosphorus limitation on microbial floc structure and gene expression in activated sludge. *Water Science and Technology* 54, 247-55.
- Liu, Y., 1995. Adhesion kinetics of nitrifying bacteria on various thermoplastic supports. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 5, 213-219.
- Liu, Y., Capdeville, B., 1996. Specific activity of nitrifying biofilm in water nitrification process. *Water Research* 30, 1645-1650.
- Liu, Y., Tay, J.H., 2002. The essential role of hydrodynamics shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36 (7), 1653-1665.
- Liu, Y., Wang, Y., Li, Y., An, H., Lv, Y., 2015. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* C16. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 23, 827-834.
- Liu, Y.Q., Liu, Y., Tay, J.H., 2004. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 143-8.
- Liu, Y., Capdeville, B., 1996. Specific activity of nitrifying biofilm in water nitrification process. *Water Research* 30, 1645-1650.
- Logemann, S., Schantl, J., Bijvank, S., Van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G. and Jetten, M. 1998. Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 239-249.
- Lorenzo, C. C, M. Rodríguez-Díaz, D. Sipkema, B. Juárez-Jiménez, B. Rodelas, H. Smidt, J. López, G., 2015. Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 266, 233-240.
- Makibar, J., Fernandez-Akarregi, A. R., Alava, I., Cueva, F., Lopez, G., Olazar, M., 2011. Investigations on heat transfer and hydrodynamics under pyrolysis conditions of a pilot-plant draft tube conical spouted bed reactor. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 50(8), 790-798.
- Maldonado, J.G. G., Bastoul, D., Baig, S., Roustan, M., Hebrard, G., 2008. Effect of solid characteristics on hydrodynamic and mass transfer in a fixed bed reactor operating in co-current gas-liquid up flow. *Chemical Engineering and Processing* 47, 1190-1200.
- Mason, C.A, Hamer, G., Bryers, J.D., 1986. The death and lysis of microorganisms in environmental processes, *FEMS Microbiology Reviews* 89, 373-401.
- Mastumato, S., Katoku, M., Saeki, G., Terada, A., Aoi, Y., Tsuneda, S., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. *Environmental Microbiology* 12 (1), 192-206.

- Mastumato, S., Katoku, M., Saeki, G., Terada, A., Aoi, Y., Tsuneda, S., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. *Environmental Microbiology* 12 (1), 192-206.
- Mašić, A., Bengtsson, J., Christensson, M., 2010. Measuring and modeling the oxygen profile in a nitrifying Moving Bed Biofilm reactor. *Mathematical Biosciences* 227, 1-11.
- Mc Carty, P.L., 1975. Stoichiometry of biological reactions. *Process in Waste Technology* 7(1), 157-172.
- Melo, L.F., Boot, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., 1992. *Biofilms- Science and Technology*. NATO Advanced Study Institute, Portugal.
- Mena, P., Ferreira, A., Teixeira, J.A., Rocha, A., 2011. Effect of some solid properties on gas-liquid mass transfer in a bubble column. *Chemical Engineering and Processing* 50, 181-188.
- Mendoza-Espinosa, L., Stephenson, T., 1999. A review of biological aerated filters (BAFs) for wastewater treatment. *Environmental Engineering Science* 16 (3), 201-216.
- Merchuk, J.C., Siegel, M.H., 1988. Airlift reactors in chemical and biological technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 41, 105-120.
- Merkey, B.V., Rittmann, B.E., Chopp, D.L., 2009. Modeling how soluble microbial products (SMP) support heterotrophic bacteria in autotroph-based biofilms. *Journal of Theoretical Biology* 259, 670-683.
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, 165-199.
- Miura, H., Katoh T., Kawase, Y.I, 2012. Gas-liquid mass transfer in co-current three-phase fluidized beds with non-Newtonian fluids: Theoretical models based on the energy dissipation rate. *Chemical Engineering Journal* 185-186, 337- 346.
- Moon, H.S., Shin, D.Y., Nam, K., Kim, J.Y., 2008. A long-term performance test on an autotrophic denitrification column for application as a permeable reactive barrier. *Chemosphere* 73, 723-728.
- Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A., 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* 35, 157-168.
- Morgenroth, E., Wilderer, P.A., 2000. Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Resources* 34 (2), 417-426.
- Moussa, M.S., Sumanasekera, D.U., Irahim, S.H., Lubberding, H. J., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J., Van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Long term effects of salt on activity population structure and floc characteristics in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research* 40, 1377-1388.

- Mulcahy, L.T., LaMotta, E.J., 1978. Mathematical Model of the Fluidized Bed Biofilm Reactor. Report No. 58-78-2, Department of Civil Engineering, University of Massachusetts at Amherst.
- Ni, B.J, Zeng, R.J., Fang, F., Xie, W.M., Xu, J., Sheng, G.P., Sun, Y.J., Yu, H.Q., 2011a. Evaluation on factors influencing the heterotrophic growth on the soluble microbial products of autotrophs. *Biotechnology and Bioengineering* 108 (4), 804-812.
- Ni, B.J., Xie, W.M., Chen, Y.P., Fang, F., Liu, S.Y., Ren, T.T., Sheng, G.P., Yu, H.Q., Liu, G., Tian, Y.C., 2011b. Heterotrophs grown on the soluble microbial products (SMP) released by autotrophs are responsible for the nitrogen loss in nitrifying granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 108 (12), 2844-2852.
- Nielsen, P.H., Frolund, B., Keiding, K., 1996. Changes in the composition of extracellular polymeric substances in activated sludge during anaerobic storage. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 823-30.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., 1999. Extraction of EPS. In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H. C., editors. *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 49-72.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., Palmgren, R., 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology* 36 (1), 11-19.
- Nogueira, R., Melo, L.F., Purkhold, U., Wuertz, S., Wagner, M. 2002. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon, *Water Research* 36, 469–481.
- O'Toole, G.A., Gibbs, K.A., Hager, P.W., Phibbs, P.V., Kolter, R. 2000. The global carbon metabolism regulator *Crc* is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182:425–31.
- Ødegaard, H., Gisvold, B., Strickland, J., 2000. The influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. *Wat. Sci. Tech.* 41 (4-5): p. 383-391
- Oga, T., Suthersan, S., Ganezarezyk, J.J., 1991. Some properties of aerobic biofilms, *Environmental Technology* 12. 431-440.
- Ohashi, A, Harada, H., 1994. Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Water Science and Technology* 29:10–1.
- Ohashi, A., Viraj de Silva, D.G., Mobarry, B., Manem, J. A., Stahl, A. D., Rittmann, E. B., 1995. Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. *Water Science and Technology* 32, (8), 75-84.
- Okabe, S., Hirata, K., Watanabe, Y., 1995. Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed- population biofilms: experimental results and model simulation. *Water Science and Technology* 32 (8), 67–74.

- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *App. Environ. Microbiol.* 65 (7), 3182-3191.
- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7), 3182-3191.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* . 34 (9) 577-588
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.*, 13, 27-33.
- Peng, Y.Z., Zhu, G.B., 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 15-26.
- Peyton, B.M. Kinetics of biofilm detachment. Doctoral thesis, Montana State University, 1992.
- Plawsky, J.L., Littman, H., Paccione, J.D., 2010. Design, simulation, and performance of a draft tube spout fluid bed coating system for aerogel particles. *Powder Technology* 199, 131–138.
- Poth, M., Focht, DD., 1985. N kinetic analysis of  $N_2O$  production by *Nitrosomona europaea*: an examination of nitrifier denitrifier denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1134.
- Povrenović, D., Knežević, M., Osnove tehnologije prečišćavanja otpadnih voda. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd 2013.
- Povrenović, D.S., 1996. Fluidmechanical characteristics and stability of a large diameter spout-fluid bed with a draft tube. *Journal of the Serbian Chemical Society* 61 (45), 355-365.
- Povrenović, D.S., Grbavčić, Ž.B., Hadžismajlović, Dž.E., Vuković, D.V., Littman, H., 1992. Fluid mechanical and thermal characteristics of spout-fluid drier with a draft tube. *Drying Technology* 117, 343-351.
- Pratt, L.A, Kolter, R., 1999. Genetic analysis of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* 2, 598–603.
- Priester, J.H., Olson, S.G., Webb, S.M., Neu, M.P., Hersman, L.E., Holden, P.A., 2006. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Appl Environ. Microbiol.* 72, 1988-96.
- Publio, M.C.P., Oliveira, W.P., 2004. Effect of the equipment configuration and operating conditions on process performance and on physical characteristics of the product during coating in spouted bed. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 82(1), 122-133.

- Qingjuan, M., Fenglin, Y., Lifan, L., Fangang, M., 2008. Effects of COD/N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. *Journal of Environmental Science* 20, 933-939.
- Ramasamy, P., Zhang, X., 2005. Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Science and Technology* 52 (7):217-23.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., Portmann, R.W., 2009. NitrousOxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 326 (5949), 123-125;
- Regmi, P., M.W., Miller, B., Holgate, R., Bunce, H., Park, K., Chandran, B., Wett, S., Murthy, C. B., Bott, 2014. Control of aeration, aerobic SRT and COD input for mainstream nitritation/denitritation. *Water Research* 57, 162-171.
- Regmi, P., Thomas, W., schafraan, G., Bott, C., Rutherford, B., Waltrip, D., 2011. Nitrogen removal assessment through nitrification rates and media biofilm accumulation in an IFAS process demonstration study. *Water Research* 45 (20), 6699-6708.
- Renner, L.D., Weibel, D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin* 36, 347–355.
- Rittenberg, S.C., 1969. The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 3: 159-196.
- Rittman, B. E., 1982. Effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 501-506.
- Rittmann, B.E., 1987. Aerobic biological treatment. *Environ. Sci. Technol.* 21: 128-136;
- Rittmann, B.E., Snoeyink, V.L. 1984. Achieving biologically stable drinking water. *J. Am. Water Works Assn.* 76: 106-114.
- Rittmann, B.E., Manem, J.A., 1992. Development and experimental evaluation of a steady-state, multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering* 39 (9), 914–922.
- Rittmann, B.E., P. L. McCarty, 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering.
- Rittmann, B.E., Snoeyink, V.L., 1984. Achieving biologically stable drinking water. *Journal American Water Works Association* 76 (10), 106-114.
- Rittmann, B.E., Stilwell, D., Ohashi, A., 2002. The transient-state, multiple-species biofilm model for biofiltration processes. *Water Resources* 36 (9), 2342–2356.
- Rittmann, BE., 1982. The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 501–6.

- Rodríguez, D.C., Pino, N., Peñuela, G., 2011. Monitoring the removal of nitrogen by applying a nitrification–denitrification process in a Sequencing Batch Reactor (SBR). *Bioresource Technology* 102, 2316-2321.
- Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., Ciudad, G., Chamy, R., 2006. Nitrification–denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresource Technology* 97, 330–335.
- Safferman, S.I., Bishop, P.L., 1996. Aerobic fluidized bed reactor with internal media cleaning. *Journal of Environmental Engineering* 122, 284-291.
- Safont, B., Vitas, A.I., Penas, F.J., 2012. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria immobilized onto cyclodextrin-hydrogel particles within a draft tube spouted bed reactor. *Biochemical Engineering Journal* 64, 69-75.
- San José, M.J., Alvarez, S., Ortiz de Salazar, A., Olazar, M., Bilbao, J., 2007. Operating Conditions of Conical Spouted Beds with a Draft Tube. Effect of the Diameter of the Draft Tube and of the Height of Entrainment Zone. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 46, 2877-2884.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., Strous, M., 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 481-492.
- Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. & Amann, R., 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (9), 3480–3485.
- Schumpe, A., Deckwer, W.-D., Nigam, K.D.P. , 1989. Gas–liquid mass transfer in threephase fluidized beds with viscous pseudoplastic liquids. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 67, 873–877.
- Sesay, M.L., Ozcengiz, G., Sanin, F.D., 2006. Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on biofloculations. *Water Research* 40,1359-66.
- Shalini, S.S., Joshep, K., 2012. Nitrogen management in landfill leachate: Application of SHARON, ANAMMOX and combined SHARON-ANAMMOX process. *Waste Management* 32, 2385-2400.
- Sharma, B., Ahlert, R.C. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Water Research* 11, 897-925.
- Shen, Z., Zhou, Y., Hu, J., Wang, J., 2013a. Denitrification performance and microbial diversity in a packed-bed bioreactor using biodegradable polymer as carbon source and biofilm support. *Journal of Hazardous Materials* 250, 431–438.

- Sheng, G.P., Yu, H.Q., Li, X. Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances* 28, 882-894.
- Sheng, G.P., Zhang, M.L., Yu, H.G., 2008. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids Surf B.* 62, 83-90.
- Shin, H.S., Kang, S.T., Nam, S.Y., 2001. Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Science and Technology*, 43(6):193-6.
- Shore, J.L., M'Coy, W.S., Gunsch, C.K., Deshusses, M.A., 2012. Application of a moving bed biofilm reactor for tertiary ammonia treatment in high temperature industrial wastewater. *Bioresource Technology* 112, 51-60.
- Siegrist, H., Gujer, W., 1987. Demonstration of mass transfer and pH effects in a nitrifying biofilm. *Water Research* 21, (12): 1481-1487.
- Siegrist, H., Salzgeber, D., Eugster, J., Joss, A., 2008. Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increase biogas production and reduced aeration energy for N-removal. *Water Science and Technology* 57, 383-388.
- Sinclair, C.G., Ryder, D.N., 1975. Models for the continuous culture of microorganism under both oxygen and carbon limiting conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 17: 375-398.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14 (9) 389-397.
- Sivasubramanian, V., 2010. Gas-liquid mass transfer in three-phase inverse fluidized bed reactor with Newtonian and non-Newtonian fluids, *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 5, 361-368.
- Son, S.M., Kang, S.H., Kang, T.G., Song, P.S., Kim, U.Y., Kang, Y., Kang, H.K., 2007. Gas holdup and gas-liquid mass transfer in three-phase circulating fluidized bed bioreactors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 13, 14-20.
- Son, S.M., Kang, S.H., Kim, U.Y., Shin, I.S., Kang, Y., Kim, S.D., 2008. Oxygen transfer in a three-phase circulating fluidized bed with viscous liquid medium. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 41, 655-661.
- Son, S.M., Kim, U.Y., Shin, I.S., Kim, S.D., Jung, H., 2009. Enhancement of gas holdup and oxygen transfer in three-phase circulating fluidized-bed bioreactors with swirling flow. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 42, 142-148.
- Song, Y., Ishii, S., Rathnayake, L., Ito, T., Satoh, H., Okabe, S., 2013. Development and characterization of the partial nitrification aerobic granules in a sequencing batch airlift reactor. *Bioresource Technology* 139, 285-291.



Sousa, M., Azeredo, J., Feijo, J., Oliveira, R., 1997. Polymeric supports for the adhesion of a consortium of autotrophic nitrifying bacteria. *Biotechnology Techniques* 11, 751–754.

Spath R., Flemming HC, Wuertz S., 1998. Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology* 37, 207-10.

Stensel, H.D., 2006. Sidestream treatment for nitrogen removal. 11th Annual Education Seminar Central States Water Environment Association.

Stephenson, T., E., Reid, L. M., Avery, B. Jefferson, 2013. Media surface properties and the development of nitrifying biofilms in mixed cultures for wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection* 91, 321-324.

Stewart, P.S., 1993. A model of biofilm detachment. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 111-117.

Stewart, P.S., Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276):135–138.

Stijn, W.H., Van Hulle, Vandeweyer, H. J. P., Meesschaert, B.D., Vanrolleghem, P.A., Pascal, D., Dumoulin, A., 2010. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams, *Chemical Engineering Journal* 162, 1-20.

Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., 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 (5), 589-596.

Stüven, R., Vollmer, M., Bock, E., 1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* 158 (6), 439-443.

Su, J.F., Zheng, S.C., Huang, T.L., Ma, F., Shao, S.C., Yang, S.F., Zhang, L.N, 2015. Characterization of the anaerobic denitrification bacterium *Acinetobacter sp.* SZ28 and its application for groundwater treatment. *Bioresource Technology* 192, 654-659.

Sudarno, U., Winter, J., Gallert, C., 2011. Effect of varying salinity, temperature, ammonia, nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors, *Bioresource Technology* 102, 5665-5673.

Sun, S., Cheng, X., Sun, D., 2013. Emission of  $N_2O$  from a full-scale sequencing batch reactor wastewater treatment plant: Characteristics and influencing factors. *International Biodeterioration and Biodegradation* 85, 545-549.

Sundermeyer, H., Bock, E., 1981. Energy metabolism of autotrophically and heterotrophically grown cells of *Nitrobacter winogradskyi*. *Archives of Microbiology* 130, 250-254.

- Sutherland IW, 2000. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9(5), 222-227.
- Sutherland, I., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147 (Pt 1), 3-9.
- Sykes, R.M., Identification of the limiting nutrient and specific growth rate. *Journal, Water Pollution Control Federation* 45: 888-895, 1073.
- Tak, W.M. Effect of increasing salinity on nitrification. Thesis (M. Phil.), Hong Kong University of Science and Technology, 2000.
- Tartakovsky, B., Kotlar, E., Sheintuch, M., 1996. Coupled nitrification-denitrification processes in a mixed culture of coimmobilized cells: analysis and experiment. *Chemical Engineering Science*, 51, 2327-2336.
- Terada, A., Lackner, S., Kristensen, K., Smets, B.F. 2010. Inoculum effects on community composition and nitrification performance of autotrophic nitrifying biofilm reactors with counter-diffusion geometry. *Environmental Microbiology* 12 (10), 2858–2872.
- Tijhuis, L., Huisman, J.L., Hekkelman, H.D., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1995. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnological Bioengineering* 47, 585-595.
- Tijhuis, L., Rekswinkel, H.G., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1994. Dynamics of population and biofilm structure in the biofilmairlift suspension reactor for carbon and nitrogen removal. *Water Science and Technology* 29:377–84.
- Trigo, C., Campos, J.L., Garrido, J.M., Mendez, R., 2006. Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor. *Journal of Biotechnology* 126 (4), 475-487.
- Trinet, F., Heim, R., Amar, D., Chang, H.T., Rittmann, B.E., 1991. Study of biofilm and fluidization of bioparticles in a three-phase liquid-fluidized bed reactor. *Water Science and Technology* 23,(7-9) 1347-1354.
- Uygur, A., Kargi, F., 2004. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactors. *Enzyme Microbial Technology* 34, 313-318.
- Van Benthum, W.A.J., Van Loosdrecht, M.C.M, Heijnen, J.J., 1997. Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 53(4), 397–405.
- Van der Star, W.R., Miclea, A.I., van Dongen, U.G., Muyzer, G., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C., 2008. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 286-294.
- Van Graaf, A.A., Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., 1996. Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidising micro-organisms in a fluidized-bed reactor. *Microbiology (UK)* 142, 2187-2196.

- van Graaf, A.A., Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., 1996. Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidising micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (UK)* 142, 2187-2196.
- Van Hulle, S. W. H., Vandeweyer, H.J.P., Meesschaert, B. D., Vanrolleghem, P. A., Dejans, P., Dumoulin, A., 2010. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chemical Engineering Journal* 162, 1-20.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., Heijnen, J.J., 1995. Biofilm structures. *Water Science and Technology* 32:35-43.
- van Rijn, J., Tal, Y., Schreier, H.J., 2006. Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquacult. Eng.* 34, 364-376.
- Vandu, C.O., Krishna, R., 2004. Volumetric mass transfer coefficients in slurry bubble columns operating in the churn-turbulent flow regime. *Chemical Engineering and Processing* 43, 987-995.
- Vannecke, T.P.W., Bernet, N., Steyer, J.P., Volcke, E.I.P., 2014. Modelling ammonium-oxidizing population shifts in a biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 69.1.
- Verma, M., Brar, S., Blais, J., Tyagi, R., Surampalli, R., 2006. Aerobic Biofiltration Processes - Advances in Wastewater Treatment. *Pract. Periodical of Haz., Toxic, and Radioactive Waste Mgmt.* 10 (4), 264-276.
- Verstraete, W., Philips, S., 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution* 102, 717-726.
- Vieira, M.J., Melo, L.P., Pinheiro, M.M., 1993. Biofilm formations: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 7, 67-80.
- Villaverde, S., Garcia-Encina, P.A., Fdz-Polanco, F., 1997. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Research* 31, 1180-1186.
- Viridis, B., Read, S.T., Rabaey, K., Rozendal, R.A., Yuan, Z., Keller, J., 2011. Biofilm stratification during simultaneous nitrification and denitrification (SND) at a biocathode. *Bioresource Technology* 102, 334-341.
- Volcke, E.I.P., Sanchez, O., Steyer, J.P., Dabert, P., Bernet, N. 2008. Microbial population dynamics in nitrifying reactors: Experimental evidence explained by a simple model including interspecies competition. *Process Biochemistry* 43 (12), 1398-1406.
- Von Bodman, S.B., Willey, J.A., Diggle, S.P., 2008. Cell-cell communication in bacteria: United we stand. *J. Bacteriol.* , 190, 4377-4391.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P., Schleifer, K.-H., 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 18 (2), 251-264.

- Wang, B., Wang, W., Han, H., Hu, H., Zhuang, H., 2012. Nitrogen removal and simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized bed step-feed process. *Journal of Environmental Sciences* 24(2), 303–308.
- Wanner, O., Gujer, W., 1984. Competitions in biofilms. *Water Science and Technology* 17 (2/3), 27-44.
- Wanner, O., Gujer, W., 1986. A multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 314-328.
- Webb, J.S., 2007. Differentiation and Dispersal in Biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 9.3 ,165-74.
- Wei, D., Shi, L., Yan, T., Zhang, G., Wang, Y., Du, B., 2014a. Aerobic granules formation and simultaneous nitrogen and phosphorus removal treating high strength ammonia wastewater in sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 171, 211-216.
- Wett, B., Rauch, W., 2002. The role of inorganic carbon limitation in biological removal of extremely ammonia concentrated wastewater. *Water Research* 37, 1100-1110.
- Wik, T., Breitholtz, C., 1996. Steady-state solution of a two-species biofilm problem. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(6), 675-86.
- Wilderer, P.A., McSwain, B.S., 2004. The SBR and its biofilm application potentials. *Water Science and Technology* 50 (10), 1-10.
- Windey, K., Bo, I.D., Verstraete, W., 2005. Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater. *Water Research* 39, 4512–4520.
- Wosiack, P.A., Lopes, D. D., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E., Granato, D., Barana, A. C. 2015. Removal of COD and nitrogen from animal food plant wastewater in an intermittently-aerated structured-bed reactor. *Journal of Environmental Management* 154, 145-150.
- Wunderlin, P., Mohn, J., Joss, A., Emmenegger, L., Siegrist, H., 2013. Mechanisms of  $N_2O$  production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research* 46, 1027-1037.
- Wunderlin, P., Mohn, J., Joss, A., Siegrist, H., 2010.  $N_2O$  emission from biological WWT -Global relevance and pathway identification with isotopes. In: *Proceedings of 7th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies Phoenix, AZ, USA (June)*.
- Xing, B.S., Ji, Y.X., Yang, G.F., Chen, H., Ni, W.M., Jin, R.C., 2013. Start-up and stable operation of partial nitritation prior to ANAMMOX in an internal-loop airlift reactor. *Separation and Purification Technology* 120, 458-466.

- Yang, W., Wang, J., Wang, T., Jin, Y., 2001. Experimental study on gas–liquid interfacial area and mass transfer coefficient in three-phase circulating fluidized beds. *Chemical Engineering Journal* 84, 485–490.
- Yao, S., Ni, J., Ma, T., Li, C., 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology* 139, 80-86.
- Yu, R., Kampschreur, M.J., van Loosdrecht, M.C.M., Chandran, K., 2010. Mechanisms and specific directionality of autotrophic nitrous oxide and nitric oxide generation during transient anoxia. *Environmental Science & Technology* 44 (4), 1313-1319.
- Zekker, I., Rikmann, E., Tenno, T., Menert, A., Lemmiksoo, V., Saluste, A., Tenno, T., Tomingas, M., 2011. Modification of nitrifying biofilm into nitritating one by combination of increased free ammonia concentrations, lowered HRT and dissolved oxygen concentration. *Journal of Environmental Sciences* 23(7)1113-1121.
- Zeng, W., Wang, X.D., Li, B.X., Bai, X.L., Peng, Y.Z., 2013. Nitritation and denitrifying phosphorus removal via nitrite pathway from domestic wastewater in a continuous MUCT process. *Bioresource Technology* 143, 187–195.
- Zhang, D.Y., Wang, J.L., Pan, X.L., 2006. Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *J. Hazard Mater* 138, 589-93.
- Zhang, H., Xiao, R., Pan, Q., Song, Q., Huang, H., 2009. Hydrodynamics of a novel biomass autothermal fast pyrolysis reactor: Flow pattern and pressure drop. *Chemical Engineering and Technology* 32(1), 27-37.
- Zhang, J.B., Wu, P.X., Hao, B., Yu, Z.N., 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource Technology* 102 (21), 9866-9869.
- Zhang, Q.L., Liu, Y., Ai, G.M., Miao, L.L., Zheng, H.Y., Liu, Z.P., 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology* 108, 35–44.
- Zhang, T. C., Bishop, P. L., 1994b. Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Research* 28, 2267-77.
- Zhang, T. C., Bishop, P. L., 1994c. Structure, activity and composition of biofilms. *Water Science and Tecnology* 29, 335-344.
- Zhang, T. C., Bishop, P.L., 1994a. Experimental determination of the dissolved oxygen boundary layer and mass transfer resistance ner the fluid-biofilm interface. *Water Science and Tecnology* 30 (11), 47-58.
- Zhang, X. Q., Bishop, P.L., 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 50 (1), 63-69.

Zhang, X.Q., Bishop, P.L., 2001. Spatial distribution of extracellular polymeric substances in biofilm. *Journal of Environmental Engineering* 127, 850-6.

Zhao, B., He, Y.L., Hughes, J., Zhang, X.F., 2010. Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR. *Bioresource Technology* 101, 5194–5200.

Zumft, W.G., 1993. The biological role of nitric-oxide in bacteria. *Archives of Microbiology* 160 (4), 253-264.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а – Милена Кнежевић

број индекса – 4006/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Уклањање азотних једињења из отпадних вода у дисперзним системима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, септембар, 2015.г.

Кнежевић Милена

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора – Милена Кнежевић

Број индекса – 4006/2010

Студијски програм - Инжењерство за заштиту животне средине

Наслов рада - Уклањање азотних једињења из отпадних вода у дисперзним системима

Ментор - Повреновић Драган

Потписани/а – Милена Кнежевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, септембар, 2015.г.

  
\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Уклањање азотних једињења из отпадних вода у дисперзним системима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, септембар, 2015.г.



## **Biografija autora**

Milena, Milorad, Knežević-rođena 14.09.1985. godine u Beogradu.

Matični broj: 1409985715016

Broj l.k.: 006528829, izdata od strane PS Vračar.

Državljanin Srbije

Diplomirala 2010.g. na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu na Katedri za Inženjerstvo zaštite životne sredine sa prosečnom ocenom 8,87 i stekla zvanje diplomirani inženjer tehnologije.

Upisana na doktorske studije školske 2010/2011.g. Završila treću godinu doktorskih studija, na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, na Katedri za Inženjerstvo zaštite životne sredine, sa prosečnom ocenom 9,58.

Od školske 2011/2012 angažovana je u nastavi u okviru računskih vežbi iz predmeta koji se bave tehnologijom vode i otpadnih voda i bioprocenim inženjerstvom.

Položen stručni ispit u Inženjerskoj komori Srbije, 2013.

Koautor univezitetskog udžbenika „Osnove tehnologije prečišćavanja otpadnih voda“, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd 2013.

## Spisak objavljenih naučnih radova

### Kategorija M21

1. **Milena Knežević**, Dragan Povrenović, Influence of fluid-mechanical parameters on volumetric mass transfer coefficient in a spout-fluid bed with a draft tube, Chemical Engineering Science, 2015, DOI: 10.1016/j.ces.2015.04.030, IF (2014) 2,337

### Kategorija M23

1. **Milena Knežević**, Dragan Povrenović, Influence of fluid-mechanical characteristics of the system on the volumetric mass transfer coefficient and gas dispersion in three-phase system, Hemijska industrija , 2014 68(4):483-490, DOI:10.2298/HEMIND130629072K, IF(2013) 0,562
2. Slavica Tomić, **Milena Knežević**, Nevenka Rajić, Dragan Povrenović, Removal of magnesium in spring water using the natural zeolite in a continuous flow system, Hemijska industrija, 2014 68(4):475-482, DOI:10.2298/HEMIND130709073T, IF (2013) 0,562

### Kategorija M51

1. **Milena Knežević**, Marija Kicošević, Milena Stojičić, Jana Vidaković, Dragan Povrenović, *Uticaj karakteristika čestica i fluida na prenos mase kiseonika iz gasne u tečnu fazu i distribuciju mehurova u trofaznom sistemu*, Voda i sanitarna tehnika, 45-56, 4-5/ 2013. ISSN 0350-5049
2. **Milena Knežević**, Dragan Povrenović, *Efikasnost procesa nitrifikacije u reaktoru sa pakovanim slojem nosača biofilma*, Voda i sanitarna tehnika 23-32, 2015, UDK: 628.31:631.461.3, ISSN 0350-5049

### Kategorija M63

1. **Milena Knežević**, Slavica Tomić i Dragan Povrenović, *Primena prirodnog klinoptiolita u cilju smanjenja sadržaja Mg u vodi za piće i mogućnost njegove dalje upotrebe kao nosača fosfat-akumulirajućih bakterija*, 11. Međunarodna konferencija „Vodovodni i kanalizacioni sistemi, 25-27 maj, Jahorina 2011., 170-175.
2. **Milena Knežević**, Vladimir Pavićević, Dragan Povrenović, *Uklanjanje azotnih jedinjenja iz industrijskih otpadnih voda*, Kvalitet vode u sistemima vodovoda i vode u industriji, 125-132, 8-9 novembar, Beograd, 2012.
3. Vladimir Pavićević, Sonja Milićević, **Milena Knežević**, Dragan Povrenović, *Vrednovanje projekata prečišćavanja komunalnih i industrijskih otpadnih voda*, Kvalitet vode u sistemima vodovoda i vode u industriji, 115-124, 8-9 novembar, Beograd, 2012.
4. Dragan Povrenović, **Milena Knežević**, Vladimir Pavićević, *Karakteristike i tretman idustrijskih otpadnih voda*, Kvalitet vode u sistemima vodovoda i vode u industriji, 109-113, 8-9 novembar, Beograd, 2012.
5. **Milena Knežević**, Dragan Povrenović, *Disperzija vazduha u trofaznom fluidizovanom sloju*, Vodovodni i kanalizacioni sistemi, Jahorina, maj 2013., 267-272.
6. Dragan Povrenović, **Milena Knežević**, *Analiza stanja i projektovanje postrojenja za tretman otpadnih voda*, Vodovodni i kanalizacioni sistemi, Jahorina maj 2013.
7. **Milena Knežević**, Dragan Povrenović, *Prenos mase kiseonika u trofaznom fontansko-fluidizovanom sloju sa centralnom cevi*, Vodovodni i kanalizacioni sistemi, Jahorina maj 2014., 61-66.
8. **Milena Knežević**, Natalija Zdravković, Slavica Tomić, Dragan Povrenović, *Međusobni uticaj tokova fluida na ponašanje trofaznog fontansko-fluidizovanog sloja*, Vodovodni i kanalizacioni sistemi, Jahorina maj 2014., 67-73.
9. Slavica Tomić, **Milena Knežević**, Natalija Zdravković, Dragan Povrenović, *Prednosti u primeni PAC-a kao koagulanta u procesima prerade vode u PPV Kopaonik i Raška*, Vodovodni i kanalizacioni sistemi, Jahorina maj 2014., 74-77.
10. Natalija Zdravković, **Milena Knežević**, Slavica Tomić, Dragan Povrenović, *Anaerobni tretman otpadnih voda mleinarske industrije*, Vodovodni i kanalizacioni sistemi, Jahorina maj 2014., 353-358.

## **Učešće u projektima finansiranim od strane nadležnog Ministarstva**

1. Projekat Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije- „Razvoj efikasnijih hemijsko-inženjerskih procesa zasnovan na istraživanjima fenomena prenosa i principima intezifikacije procesa“, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu (Rukovodilac prof. Dr Željko Grbavčić), 172022.