

Priprema biočestica imobilizacijom bakterije *Acinetobacter junii* na zeolitni tuf

Ulični, Olja

Master's thesis / Diplomski rad

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:395370>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Olja Ulični

Priprema biočestica imobilizacijom bakterije
Acinetobacter junii na zeolitni tuf

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Hrenović na pomoći i stručnom vodstvu te dipl. ing. Tomislavu Ivankoviću s kojim sam radila praktični dio istraživanja.

Puno hvala mojim roditeljima i braciki Lavu (i čak Mukiju), na velikoj potpori, pomoći i razumijevanju tijekom cijelog studija, a pogotovo na kraju i žao mi je što je sve toliko potrajalo.

Najviše zahvaljujem svim prijateljima i kolegama s fakulteta koji su uz mene prolazili iste muke, nesebično mi pomagali svladati iste i dijelili skripte. Posebno moram spomenuti:

- ekipu sa Save: Vlatka, Nena, Niki, Dane, Mare - moje cure koje su mi otvorile svijet i glad za životom te pokazale što znači biti konstantan dio nekog drugog bića i zajednički živjeti kroz sve godine, te sve divne i lude ljude koje sam upoznala tamo i koji su mi to iskustvo učinili najboljim u životu,

- ekipu s faxes: Fress, Šegi, Darac, Vex, Damir, Martina, Zube, Nina - zbog kojih sam zavoljela sve praktikume, kave u kantini, duge analize svega, masovna okupljanja, sam Zagreb i zajednička putovanja kojih će nadam se biti još mnogo,

- ekipu iz Kosijenke: Zrinka, Ljilja, Johnny i Vesna - koji su uz mene već više 10 godina i koji su me pratili i sudjelovali u mom odrastanju i naučili me dugotrajnim prijateljstvima na koja se možeš osloniti i koja su uvijek dio tebe iako se ne vidate često,

- te Nikšiću (kojeg ne mogu nigdje svrstati i ostaje individualan) za svu pomoć u školovanju od osnovne preko srednje do stručne prakse i fakulteta i sve prilike kad me saslušao pri analizama sebe i raznih problema i dao razuman odgovor i mišljenje.

Hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

Priprema biočestica imobilizacijom bakterije
Acinetobacter junii na zeolitni tuf

Olja Ulični

Cilj ovog rada bio je utvrditi najbolji vodeni medij i masenu koncentraciju zeolita u svrhu dobivanja biočestica za uklanjanje fosfata iz otpadnih voda. Biočestice su formirane imobilizacijom fosfat-akumulirajuće bakterije *Acinetobacter junii* na zeolitni tuf. Optimalna koncentracija zeolitnog tufa za imobilizaciju bakterija u oba ispitivana medija, sintetskoj vodi i Nutrient broth, bila je 1 g L^{-1} .

(45 stranica, 18 slika, 7 tablica, 65 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: biočestice, fosfat-akumulirajuće bakterije, pojačano biološko uklanjanje fosfata (EBPR), zeolit, *Acinetobacter junii*

Voditelj: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Jasna Hrenović
doc. dr. sc. Zoran Tadić
prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica
prof. dr. sc. Mladen Kerovec

Rad prihvaćen: 14.09.2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Graduation Thesis

Preparation of biosolids by immobilization of bacteria
Acinetobacter junii onto zeolitized tuff

Olja Ulični

The aim of this study was to determine the best water medium and weight percentage of zeolite for the purpose of preparation of biosolids required for phosphate removal in wastewaters. Biosolids were prepared by the immobilization of phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii* onto zeolite tuff. Optimal concentration of zeolite tuff for immobilization of bacterias in both tested mediums, synthetic water and Nutrient broth, was 1 g L⁻¹.

(45 pages, 18 figures, 7 tables, 65 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: biosolids, phosphate-accumulating bacteria, Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR), zeolite, *Acinetobacter junii*

Supervisor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Reviewers: prof. dr. sc. Jasna Hrenović
doc. dr. sc. Zoran Tadić
prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica
prof. dr. sc. Mladen Kerovec

Thesis accepted: 14.09.2011.

SADRŽAJ:

1. UVOD...-	1
1.1. ONEČIŠĆENJE VODE.....	1
1.2. FOSFOR U VODI.....	2
1.3. UKLANJANJE FOSFATA IZ OTPADNIH VODA.....	6
1.3.1. UKLANJANJE FOSFATA KEMIJSKIM TALOŽENJEM.....	7
1.3.2. BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFATA.....	10
1.3.2.1. ASIMILACIJA.....	11
1.3.2.2. POJAČANO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFATA.....	11
1.4. POLIFOSFATNE GRANULE.....	14
1.5. ROD <i>ACINETOBACTER</i>	15
1.6. PRIRODNI ZEOLITNI TUF.....	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. PRIRODNI ZEOLITNI TUF.....	22
3.2. UZGOJ BAKTERIJE.....	22
3.3. VODENI MEDIJI.....	23
3.3.1. SINTETSKA VODA.....	23
3.3.2. NUTRIENT BROTH.....	24
3.4. DIZAJN POKUSA.....	24
3.5. ANALITIČKE METODE.....	25
3.5.1. ODREĐIVANJE POČETNOG BROJA BAKTERIJA.....	25
3.5.2. ODREĐIVANJE BROJA IMOBILIZIRANIH BAKTERIJA.....	26
3.5.3. BOJANJE KARBOL FUKSINOM.....	27
3.5.4. MJERENJE pH VRIJEDNOSTI.....	28
3.5.5. STATISTIČKA ANALIZA.....	29
4. REZULTATI.....	30
5. RASPRAVA.....	36
6. ZAKLJUČAK.....	39
7. LITERATURA.....	40

Popis kratica korištenih u tekstu:

- ADP (eng. Adenosine diphosphate) - adenzin difosfat
- ATP (eng. Adenosine triphosphate) - adenzin trifosfat
- CFU (eng. Colony Forming Units) - broj jedinica bakterija koje formiraju kolonije
- DNA (eng. Deoxyribonucleic acid) - deoksiribonukleinska kiselina
- EBPR (eng. Enhanced Biological Phosphorus Removal) - pojačano biološko uklanjanje fosfora
- PAO (eng. Phosphorus Accumulating Organism) - fosfor akumulirajući organizmi
- PAB (eng. Phosphorus Accumulating Bacteria) - fosfor akumulirajući bakterija
- PHA (eng. Polyhydroxyalkanoate) - poli-hidroksi-alkanoat
- PHB (eng. Polyhydroxybutyrate) - poli-hidroksi-butirat
- RNA (eng. Ribonucleic acid) - ribonukleinska kiselina
- SEM (eng. Scanning Electron Microscopy) - skenirajuća elektronska mikroskopija
- VFA (eng. Volatile Fatty Acids) - hlapljive masne kiseline

1. UVOD

1.1. ONEČIŠĆENJE VODE

Onečišćenje okoliša je jedan od najvećih problema današnjice. Radi se o uvođenju zagađivača u okoliš koji uzrokuje nestabilnost, nered, oštećenja ili nelagodu u ekosustavu bilo fizikalnim sustavima ili živim organizmima. U današnje vrijeme su zagađivači većinom nastali ljudskom djelatnošću i čovjekovim sve većim uplitanjem u okoliš. Onečišćenje okoliša je svaka kvantitativna i kvalitativna promjena fizikalnih, kemijskih i bioloških karakteristika osnovnih sastavnica okoliša (zrak, voda, tlo, hrana), što dovodi do narušavanja zakonitosti u ekosustavu, temeljenih na mehanizmima samoregulacije. Pod pojmom kemijskog onečišćenja podrazumijeva se ispuštanje u okoliš bilo namjerno ili nenamjerno kemijske tvari koja nije svojstvena okolišu, te svojim djelovanjem mijenja fizikalne, kemijske i biološke karakteristike okoliša.

Onečišćenje voda je promjena kakvoće voda koja nastaje unošenjem, ispuštanjem ili odlaganjem u vode hranjivih i drugih tvari, utjecajem energije ili drugih uzročnika, u količini kojom se mijenjaju korisna svojstva voda, pogoršava stanje vodenih ekosustava i ograničuje namjenska uporaba voda. Kod voda najčešće dolazi do zagađenja ispuštanjem otpadnih proizvoda i zagađivača i njihovim površinskim otjecanjem u riječne drenažne sustave, zatim ispiranjem u podzemne vode, izlivanjem tekućina, otpadnih ispusta, eutrofikacijom i bacanjem otpada izravno u vode. Zaštita voda ostvaruje se nadzorom nad stanjem kakvoće voda i izvorima onečišćavanja, sprečavanjem, ograničavanjem zabranjivanjem radnji i ponašanja koja mogu utjecati na onečišćenje voda i stanje okoliša u cjelini te drugim djelovanjima usmjerenim očuvanju i poboljšavanju kakvoće i namjenske uporabljivosti voda.

1.2. FOSFOR U VODI

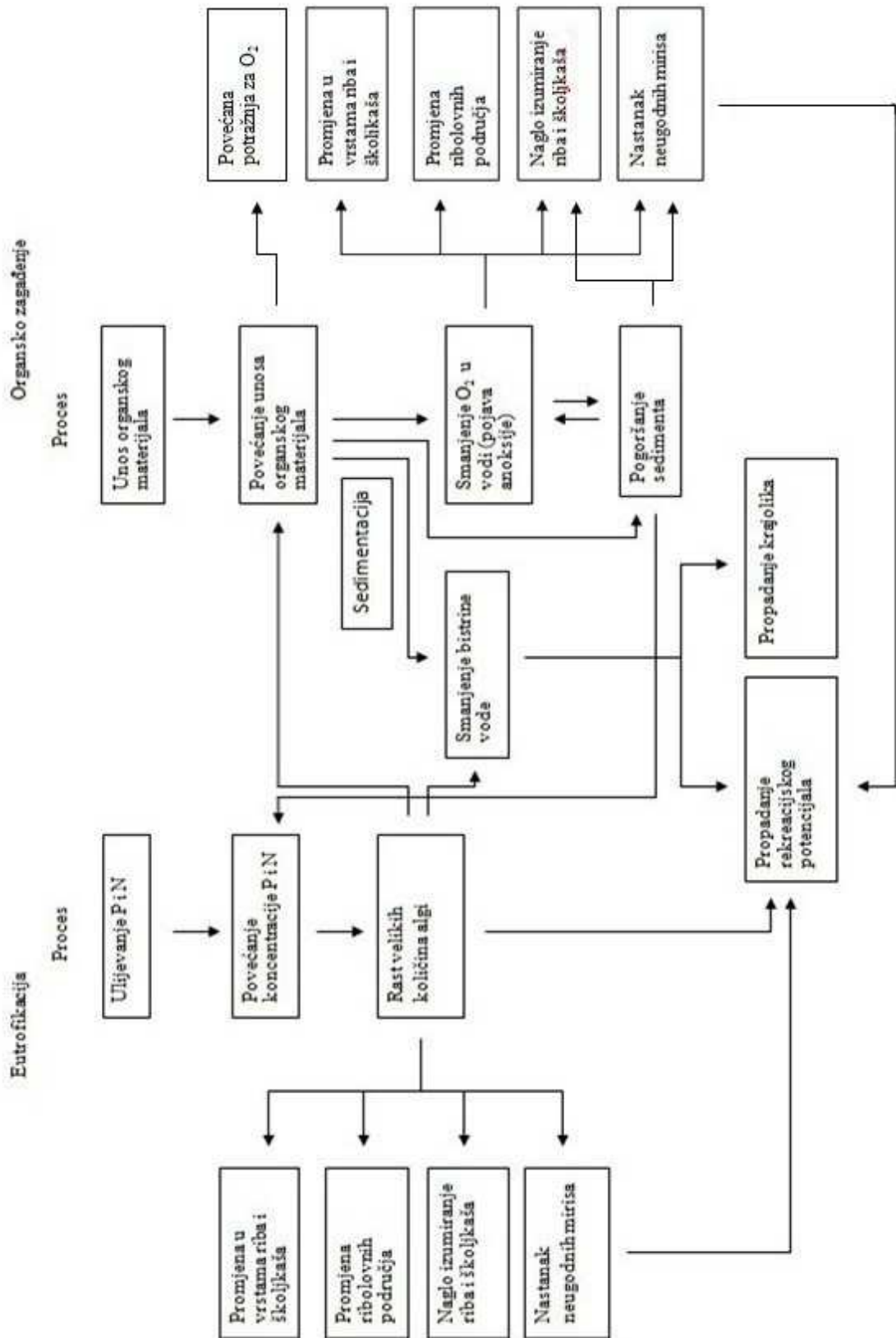
Fosfor je veoma značajan element, koji se javlja u biosferi u različitim organskim i anorganskim oblicima. To je esencijalni nutrijent za biljke i životinje u formi fosfatnih iona PO_4^{3-} i HPO_4^{2-} . Sudjeluje u važnim biokemijskim procesima u organizmu (fotosinteza, glikoliza, disanje) gdje je najvažniji sakupljač i prenositelj energije. Sastavni je dio mnogih enzima, koenzima, fosfatida, nukleotida i nukleinskih kiselina.

Fosfor dolazi u vode iz raznih izvora: klizanja tla, odrona zemlje, životinjskog otpada, truljenja bilja, kanalizacijskog otpada... Fosfor se u vodi nalazi u različitim oblicima, ali najvažniji je kao ortofosfat (PO_4^{3-}) koji nastaje oksidacijom u procesima mineralizacije organskih materija koje sadrže fosfor. U otpadnim vodama ga možemo naći isključivo u obliku spojeva, a ne u elementarnom stanju.

Smatra se glavnim nutrijentom koji ubrzava proces eutrofikacije (Slika 1). Eutrofikacija je proces obogaćivanja vode nutrijentima, što rezultira povećanom primarnom proizvodnjom, odnosno povećanom produkcijom vodenih biljaka i algi (Slika 2) što dovodi do povećanog sadržaja organskih tvari koje se bakterijski razlažu proizvodeći neugodne mirise, trošeći raspoloživi kisik te utječući na razvoj drugih vodenih organizama. Sniženi stupanj potrošnje kisika, posebno u hladnijim, dubljim vodama, gdje se raspadnute organske tvari mogu nakupiti, može reducirati kvalitetu ribljih staništa i potaknuti razmnožavanje riba koje su prilagođene na uslove sa manje kisika ili na toplije površinske vode. Dolazi do dominacije pojedinih vrsta organizama čime se remeti biološka ravnoteža sustava i smanjuje se ukupna bioraznolikost. Anoksija je najčešća nepovoljna posljedica eutrofikacije čiji anaerobni uvjeti mogu prouzrokovati oslobađanje dodatnih nutrijenata iz područja najnižih sedimenata.

Eutrofikacija može nastati:

- prirodnim putem - proces koji se događa kao rezultat geološkog starenja i ispiranja s okolnog slivnog područja. Porast hranjivih tvari čini da jezero postepeno prelazi iz oligotrofnog i mezotrofnog u eutrofno stanje i na kraju biva potpuno zatrpano.
- umjetnim putem - pod utjecajem čovjeka ovaj proces se znatno ubrzava, a izvori nutrijenata su otpadne vode iz domaćinstava, raznih grana industrije, turizma...



Slika 1. Uzroci i posljedice eutrofikacije i onečišćenja vode, izvor <http://www.emecs.or.jp/99cd-rom/file/chap2/kankyo/eiyo-e.htm>

Najzastupljeniji spojevi fosfora u otpadnim vodama su:

- organski fosfati (-P-O-C- veze) - čine oko 4% ukupne količine fosfora, a imaju važnu ulogu u prirodi prvenstveno u biološkim procesima kao što su održavanje kiselo-bazne ravnoteže u organizmu, sastavni su dio DNA i RNA, a kao fosfolipidi sudjeluju u izgradnji stanične membrane. Sastavni su dio molekula adenzin difosfata (ADP) i adenzin trifosfata (ATP) koji služe za pohranu i prijenos energije u organizmu. Njihova povećana koncentracija u okolišu može biti rezultat razgradnje organskih pesticida koji u svojoj strukturi sadrže fosfor, a nalaze se i u spojevima koji se koriste za izradu plastike ili proizvodnju pesticida.,

- anorganski ortofosfati (PO_4^{3-} i HPO_4^{2-}) - topljivi oblici fosfora koji nastali su najčešće prirodnim procesima, a nalaze se u sedimentima, prirodnim i otpadnim vodama.,

- kondenzirani anorganski fosfati (-P-O-P- veze) - uključujući i lančano povezane polifosfate i ciklički povezane metafosfate. U vodenoj otopini hidrolizom mogu prijeći u ortofosfate i u tom obliku postaju raspoloživi za organizme. Koji će se ion nalaziti u otopini ovisi o pH vrijednosti otopine. Polifosfati su osnovni sastojak deterdženata i omekšivača vode, a najčešći su kondenzirani anorganski fosfat u otpadnim vodama iz domaćinstava.

Zbog svog štetnog djelovanja na okoliš, a time i na čovjeka, zakonom su točno propisane maksimalne dopuštene koncentracije fosfora u vodama za piće kao i u ostalim vodama (Narodne novine 40/99, Narodne Novine 6/01). U vodi za piće maksimalna dopuštena koncentracija ortofosfata je $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. Granične vrijednosti pokazatelja i dopuštene koncentracije fosfata u tehnološkim otpadnim vodama utvrđene su prema mjestu ispuštanja bilo u prirodni prijemnik (prema kategoriji voda koje isti sadrži) ili sustav javne odvodnje otpadnih voda (Tablica 1) prema Pravilniku o graničnim vrijednostima pokazatelja, opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama i njegovim izmjenama i dopunama. Granične vrijednosti pokazatelja u otpadnim vodama koje se ispuštaju u prirodni prijemnik iz uređaja za pročišćavanje nakon određenog stupnja pročišćavanja su za ukupni fosfor 2 mg P L^{-1} po 10 000 - 100 000 ekvivalentnih stanovnika i 1 mg P L^{-1} ako se radi o više od 100 000 ekvivalentnih stanovnika.

Tablica 1. Maksimalne dopuštene koncentracije fosfata u vodama (NN 40/99) :

Pokazatelji i tvari	Voda za piće	Voda za ispuštanje u prirodni spremnik				Voda za ispuštanje u sustav javne odvodnje
		II. kat.	III. kat.	IV. kat.	V. kat.	
Ukupni P mg P L ⁻¹		1	2	4	8	10
Ortofosfati mg P L ⁻¹	0,3	1	2	3	4	-



Slika 2. Eutrofikacija u potoku Srednjak

1.3. UKLANJANJE FOSFATA IZ OTPADNIH VODA

Između 1850–tih i 1940–tih glavni cilj pročišćavanja voda je bilo uklanjanje suspendiranih čestica i organske tvari, a samo uklanjanje hranjivih tvari kao što je fosfor je počelo slučajno. Fosfor je u otpadnim vodama prisutan u otopljenom obliku i samo oko 15% ukupnog fosfora može se ukloniti primarnom sedimentacijom (Balmer i Hultman, 1988.). Tako da bi se uklonio fosfor iz vode mora se prvo prevesti u netopljive soli fosfata i onda tek treba ukloniti te soli iz vode. Fosfor se može prevesti u čvrstu fazu na više načina:

- kemijskim taloženjem i adsorpcijom,
- biološki izravnim uzimanjem fosfata i/ili pojačanim uzimanjem (stvaranje polifosfata) od strane bakterija.

Ne postoji oštra granica između samih kemijskih i bioloških metoda, a čak postoji i kombinacija. Na rješavanje problema uklanjanja fosfata iz otpadnih voda prije ispuštanja u prirodne prijamnike (rijeke, jezera, mora) troše se znatne količine sredstava, a većinom se to danas postiže kemijskim taloženjem, što je skupa metoda koja uz to dovodi i do povećanja količine mulja dobivenog tijekom cjelokupnog postupka čišćenja vode. Danas se prednost daje biološkim metodama, a najzastupljenija biološka metoda je uklanjanje fosfora u pogonima s aktivnim muljem. Biološkim uklanjanjem fosfora dobije se manje mulja nego upotrebom kemijskih metoda, a takav mulj je pogodniji i za zemljišnu upotrebu.

1.3.1. UKLANJANJE FOSFATA KEMIJSKIM TALOŽENJEM

Kemijsko taloženje se koristi za uklanjanje anorganskih formi fosfata dodatkom koagulanta u otpadne vode. Multivalentni metalni ioni koji se najčešće koriste su kalcijevi, aluminijski i željezni ioni. Oni se koriste u obliku njihovih soli i te soli u vodenim otopinama stvaraju ortofosfate precipitate. U ovoj reakciji dolazi do stvaranja netopivih metalnih hidroksida uz sniženje pH-vrijednosti. Ovo je jako djelotvorna i pouzdana metoda, ali prekomjerna količina kemijskih spojeva može dovesti do toksičnosti mikroorganizama (izvor <http://www.lenntech.com/phosphorous-removal.htm>). Glavni načini kojima se provodi uklanjanje fosfata kemijskim taloženjem su (Slika 3):

- izravno taloženje (obrada primarne otpadne vode) - uključeno je u ukupnu kategoriju procesa kemijskog taloženja i ne uključuje daljnju biološku obradu. Obično se primjenjuje kada recipijent može primiti relativno visoku koncentraciju ugljikovih i dušikovih tvari. Fosfati se uklanjaju sa 90 % efikasnosti i konačna koncentracija fosfata je niža od 0.5 mg L^{-1} . Nedostatak je potreba za većom dozom kemikalija i rezultira odlaganjem veće količine mulja. Na ovaj način uklanjaju se samo ortofosfati jer se drugi oblici fosfata neće istaložiti.

- post-taloženje (obrada vode koja nastaje nakon konačne obrade biološkim taloženjem - standardni oblik obrade vode koja je nastala sekundarnom obradom. Ovo je proces sa najvišom efikasnošću uklanjanja fosfata, koja doseže i 95%, a sama koncentracija fosfata je ispod 0.5 mg L^{-1} . Njena prednost je i to što garantira efikasnost pročišćenja do određene mjere čak ako i biološki procesi, koji joj prethode, nisu učinkoviti zbog nekog razloga. Sama akcija kemikalija je jača pošto su prijašnji biološki procesi promijenili dio organskih fosfata u ortofosfate. Nedostaci su visoki troškovi pri izvedbi takvih postrojenja i ponekad prerazrijeđen proizvod.

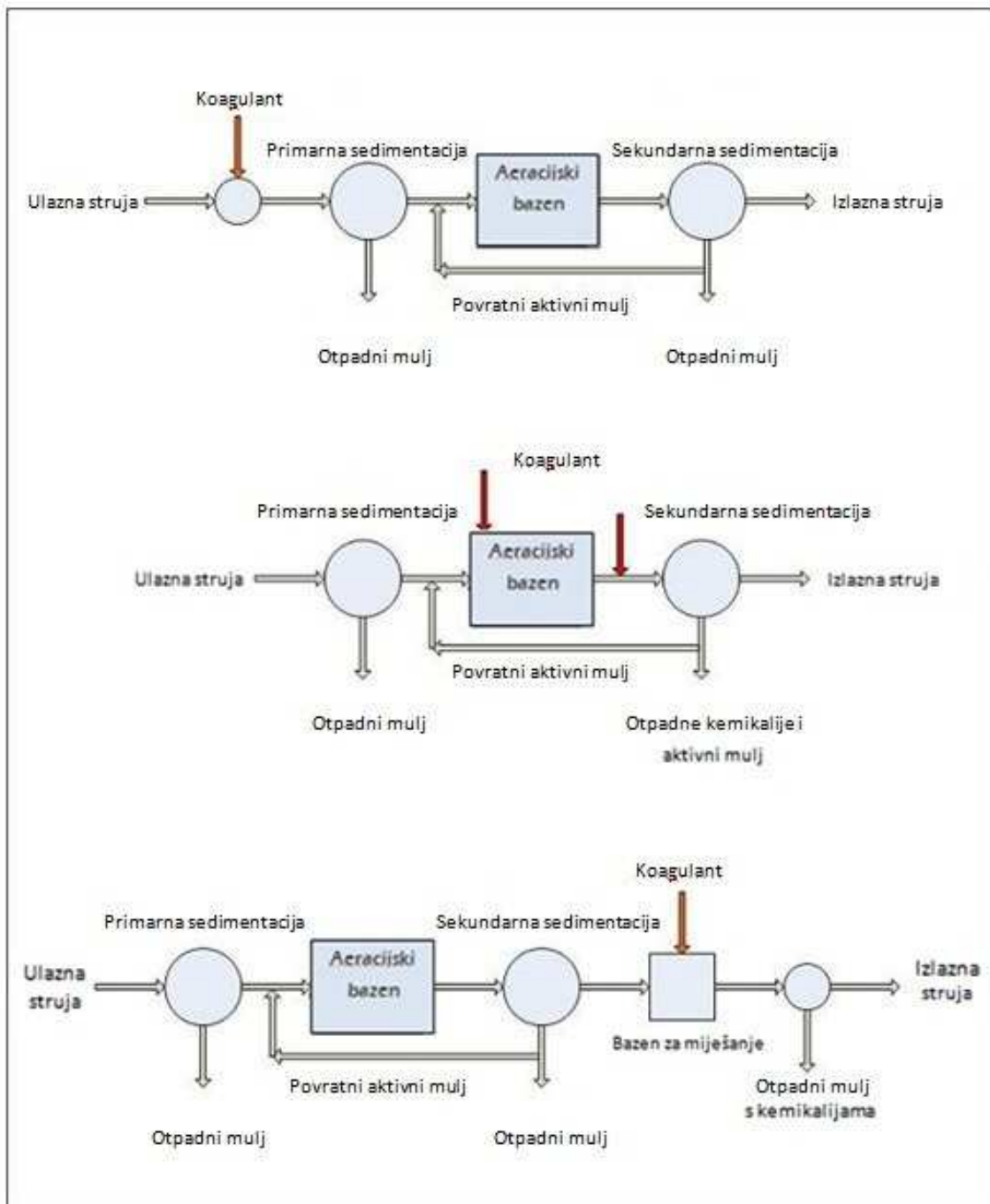
- simultano taloženje (obrada vode koja se odvija u isto vrijeme s biološkim reakcijama) - pogodno je za uređaje s aktivnim muljem, gdje se soli za taloženje dodaju direktno u bazene. Uklanjanje fosfata postiže se nastajanjem suviška mulja. Polifosfati i organski fosfor pretvaraju se tijekom aeracije u ortofosfate. U kombinaciji s biološkom metodom uklanjanja fosfora treba biti oprezan pri izboru kemikalije. Prednosti ove metode su zahtijevanje manje količine kemikalija zbog istodobnog odvijanja s biološkim procesima i upotreba jeftinih kemikalija kao što su željezni klorid ili željezni sulfat, a i sve se događa u jednom bazenu i nema potrebe za

gradnjom drugog. Ipak postoje i nedostaci kao su pad učinkovitost ispod 85% zbog istodobnog odvijanja bioloških i kemijskih procesa, koncentracija fosfora na kraju je oko 1 mg L^{-1} , kemijski i biološki mulj su pomiješani i ne mogu se odvojiti u sljedećim koracima., stvaranje dodatnih količina mulja, čak za 10-30%, te pad brzine i razine turbulencije koji su daleko ispod idealnih uvjeta za brzo miješanje i flokulaciju.

- pred-taloženje – odvija se prije svih bioloških procesa, a sastoji se od dodavanja soli nakon čega slijedi brzo miješanje, flokulacija i taloženje. Ponekad se prije flokulacije dodaju anionski polimeri kako bi se pospješilo odvajanje krute tvari. Također se između dodavanja Fe(II) i polimera dodaju jake baze kako bi se spriječilo snižavanje pH.

Sve ove metode mogu se kombinirati u taloženje od dva koraka koje se uvijek pokazalo učinkovitijim u uklanjanju fosfata od taloženja od samo jednog koraka, a osim toga u jednom uređaju se mogu dodavanjem soli metala na različitim točkama postići dva ili više oblika taloženja (Metcalf i Eddy, 2003.).

Kemijsko taloženje fosfora iz otpadnih voda je široko korištena i djelotvorna metoda koja je ipak pokazala određene nedostatke u usporedbi s biološkim uklanjanjem. Neki od nedostataka su proizvodnja velike količine kemijskog mulja s visokim udjelom teških metala, skupe kemikalije te visoki troškovi zbrinjavanja nastalog mulja.



Slika 3. Načini uklanjanja fosfata kemijskim taloženjem, od gore prema dolje: 1. izravno taloženje, 2. post-taloženje i 3. simultano taloženje,

izvor <http://www.lenntech.com/phosphorous-removal.htm>

1.3.2. BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFATA

Postoji više načina biološkog uklanjanja fosfata, kao i kod kemijskog taloženja, a neki od njih su postrojenja s aktivnim muljem, razni oblici biološke filtracije te aerirane lagune.

Aktivni mulj je proces djelovanja i tretmana kanalizacije i industrijskih otpadnih voda razvijen između 1912. - 1914. To je biomasa koja nastaje u sirovoj otpadnoj vodi kao posljedica metaboličke aktivnosti mikroorganizama i njihove flokulacije u bazenima za prozračivanje (vrši se upuhivanje zraka ili kisika) tijekom pročišćavanja otpadnih voda. Ti mikroorganizmi koriste organsku tvar u otpadnoj vodi obogaćenju zrakom za svoje metaboličke procese, pri čemu se organska tvar razlaže do najjednostavnijih spojeva poput CO₂ i vode. Proces se odvija tako da se prozračuje i miješa otpadna voda i aktivni mulj u bazenu za prozračivanje, nakon čega se aktivni mulj sliježe u za to predviđenim bazenima, a pročišćeni supernatant odvaja i šalje na daljnje pročišćavanje, dok se aktivni mulj može ponovo primijeniti i vraća se u bazen za prozračivanje.

Bakterije čine 90% biomase mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju dok ostatak čine gljivice, praživotinje i kolnjaci. U aktivnom mulju možemo naći predstavnike autotrofnih bakterija iz rodova *Nitrobacter* i *Nitrosomonas*. Međutim, većina bakterija pripada heterotrofnim rodovima *Achromobacter*, *Acaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* i *Zoogloea* (Jenkins i sur. 1991).

Količina mulja na kraju biološkog uklanjanja fosfata je manja nego nakon kemijskog procesa te ne sadrži toliko visok udio teških metala, a i ova tehnika je jeftinija jer ne treba kemikalije i ne treba poslije zbrinjavati velike količine mulja. Naravno svaka metoda uvijek ima i svoje mane kao što je visoka cijena izgradnje postrojenja, visoka cijena rada, zahtjevna kontrola procesa, a osim toga što je klima hladnija proces je neučinkovitiji.

Biološke metode uklanjanja fosfata uključuju:

- asimilaciju,
- pojačano biološko uklanjanje fosfata.

1.3.2.1. ASIMILACIJA

Asimilacija je biološka metoda uklanjanja fosfora u kojoj se fosfor, u obliku fosfata, kao esencijalni element ugrađuje u biomasu rastom i razvojem mikroorganizama, algi i viših biljaka. Ovo se postiže preko tretiranih bazena koji sadrže planktonske i bentoske alge i ukorijenjene ili plutajuće biljke. Za ovaj proces važno je ukloniti neto biomasu rasta da bi se spriječilo raspadanje odnosno truljenje biomase i ponovno otpuštanje fosfora. Zemljišta primjena otpadnih voda tijekom sezone rasta vegetacije je isto bila korištena, a izgrađene su močvare sada uobičajena praksa (Strom, 2006.). Asimilacija nije važan proces jer nema velik potencijal uklanjanja fosfora.

1.3.2.2. POJAČANO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFATA (EBPR)

Glavni princip rada pojačanog biološkog uklanjanja fosfata (EBPR – eng. Enhanced Biological Phosphorus Removal) je povećanje prirodne sposobnosti pojedinih bakterijskih sojeva pri akumulaciji velikih količina otopljenog fosfora koji pohranjuju unutar stanice u obliku netopljivih polifosfatnih granula poznatih kao volutin (Lotter i Murphy, 1985). Zbog tog svojstva se nazivaju još i fosfat-uklanjajuće bakterije ili polifosfatne-bakterije (PAO – eng. Polyphosphate Accumulating Organisms). Njihova sposobnost akumuliranja fosfata neovisna je o njihovim metaboličkim potrebama. Na učinkovitost ovog procesa djeluju razni čimbenici poput pH vrijednosti vodenog okoliša, količine dostupne organske tvari u vodi, količine otopljenog kisika i temperature (Donnert i Salecker, 1999).

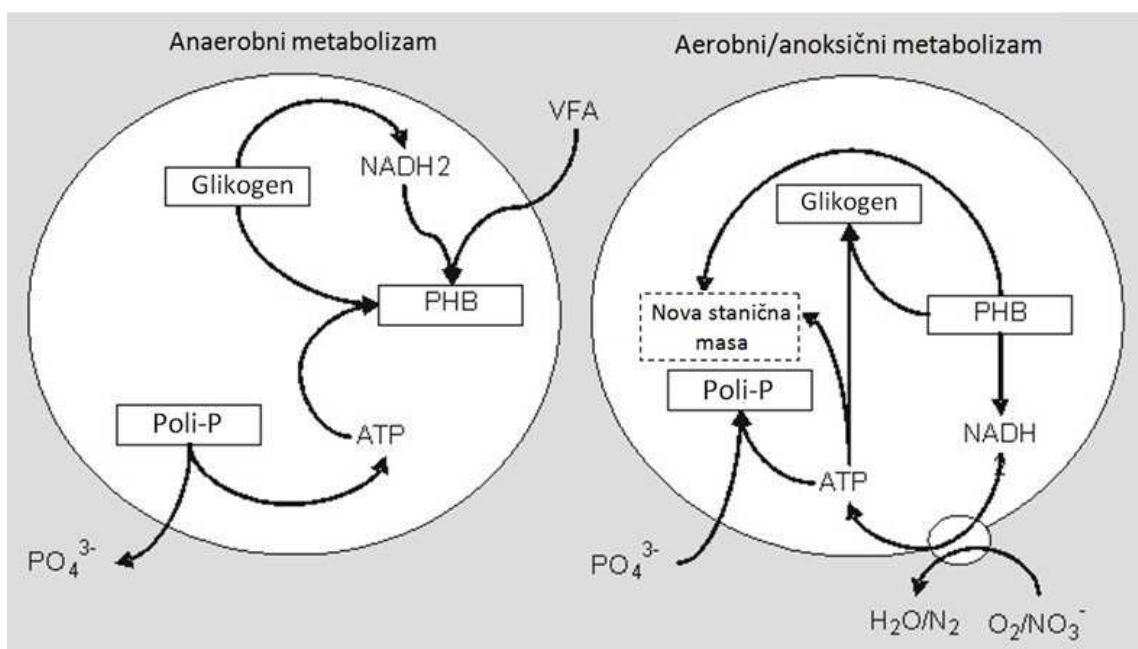
EPBR karakterizira prolazak aktivnog mulja kroz dvije naizmjenične faze:

- anaerobnu, bogatu ugljikom - fosfat-akumulirajuće bakterije transportiraju u stanicu hlapive masne kiseline (propionatna, acetatna i butiratna) (VFA eng. – Volatile Fatty Acids), koje su ili već prisutne ili su produkt metabolizma heterotrofnih populacija u otpadnim vodama, te ih naknadno pretvaraju i skladište u obliku poli-hidroksi-alkanoata (PHA, eng. – Polyhydroxyalkanoat), npr. poli-hidroksi-

butirat. Istodobno sa unosom acetata je otpuštanje ortofosfata kao i magnezijevih, kalijevih i kalcijevih kationa. PHA udio u PAO se povećava kako se polifosfati smanjuju. Energija za ovaj transport i skladištenje se dobiva hidrolizom intracelularnih polifosfata u ortofosfate, koji se otpuštaju iz stanice u tekućinu ili konverzijom glikogena do PHA (izvor <http://www.oilgae.com/algae/cult/sew/new/pho/pho.html>).

- aerobnu, siromašnu ugljikom - energija oslobođena oksidacijom poli-hidroksi-butirata se koristi za formiranje polifosfata uklapanjem topivih ortofosfata u bakterijsku stanicu čime se odmah smanjuje njihova koncentracija u otopini (Slika 4).

Uzeti fosfor nakuplja se u stanicama u obliku osmotski inertnih granula polifosfata. Iako se u anaerobnoj fazi polifosfati razgrađuju, njihova količina u aerobnoj fazi koja slijedi je veća od one prethodne razgrađene, što konačno rezultira uklanjanjem fosfora. Sama akumulacija polifosfata u stanici služi kao zaliha energije u aerobnim i anaerobnim uvjetima.



Slika 4. Metabolizam fosfat-akumulirajuće bakterije u anaerobnim i aerobnim uvjetima, izvor <http://knowhowtogmo.wordpress.com/2011/02/01/biological-phosphorus-removal-from-waste-water>

Temeljni princip ove metode je uvođenje anaerobne faze prije standardnog aerobnog sustava za obradu otpadne vode s aktivnim muljem, nakon čega slijede sekundarne ili čak tercijarne anaerobne faze naizmjenično sa aerobnim.

Sam EPBR proces sastoji se od nekoliko dijelova. U početnom dijelu prvi bazen puni se otpadnom vodom. Nakon punjenja, sadržaj bazena miješa se bez prozračivanja kako bi se postigla fermentacija potrebna za otpuštanje fosfora i uzimanja produkata fermentacije od strane mulja. Sljedeća faza je prozračivanje u kojoj se odvija uzimanje fosfora od strane fosfor-akumulirajućih bakterija u aktivnom mulju. Za vrijeme taloženja prozračivanje i miješanje se prekidaju nakon čega se obrađena otpadna voda ispušta iz bazena. Fosfati u EPBR-u uklanjaju se s otpadnim muljem koji može sadržavati 5% ili više fosfora, u odnosu na 2-3 % u muljevima koji nisu korišteni u ovoj metodi. Višak mulja koji sadrži visok udio fosfora uklanja se iz sustava, a dio ostaje u sustavu da bi se ponovno upotrijebio (Johnsen i Jorgensen, 1981.). Kapacitet uređaja može se povećati dodavanjem materijala kao što su prirodni zeoliti (Hrenović, 2002).

U aktivnom mulju i uređajima sa EBPR tretmanom su dokazane mnoge različite vrste fosfat-akumulirajućih bakterija (Mino, 2000) koje su odgovorne za pojačano uklanjanje fosfata, što ovisi o samom sastavu bakterijske populacije. Pokazalo se da muljevi s EBPR sadrže α -, β -, i γ - subklase koljena *Proteobacteria* i koljena *Actinobacteria* (Mino 2000, Mudaly i sur. 2000). EBPR zajednice ne moraju biti iste u različitim EBPR sustavima i mogu se mijenjati s vremena na vrijeme i od mjesta do mjesta (Mino i sur. 1998). Sojevi bakterija koji mogu akumulirati više od 10^{-12} mg fosfata u stanici se smatraju fosfat-akumulirajućim bakterijama. Te zajednice obuhvaćaju različite taksonomske i filogenetske skupine bakterije kao što su :

- Gram-negativne vrste: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Lampropedia*, *Moraxella*, *Pseudomonas* (Fuhs i Chen 1975; Sidat i sur.1999),
- Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* (Sidat i sur. 1999).

Bakterije roda *Acinetobacter* postale su modelni organizmi za EBPR tretman otkad su izolirane iz aktivnog mulja te se ustanovilo da imaju najveći kapacitet uklanjanja fosfata od svih fosfat-akumulirajućih izolata (Sidat i sur. 1999) te smo zbog toga u ovom istraživanju koristili bakteriju upravo tog roda, *Acinetobacter junii*.

1.4. POLIFOSFATNE GRANULE

Biološko uklanjanje fosfora se temelji na mikrobiološkoj aktivnosti, a učinkovitije uklanjanje fosfata je postignuto činjenicom da se mikrobne populacije potiče na akumulaciju fosfora u bakterijskim stanicama u obliku polifosfatnih granula koje premašuju količine potrebne za rast tih stanica.

Polifosfat je polianionski polimer koji se sastoji od mnogo ortofosfatnih monomera povezanih fosfoanhidridnim vezama visoke energije, te se nivo polimerizacije mijenja ovisno o sastavu mikrobne populacije. Sve stanice sadrže polifosfate, što sugerira da su esencijaleni za funkcioniranje same stanice, iako ih ne možemo lako detektirati (Kortsee i sur., 1994).

Koncentracija kationa i sastav otpadnih voda koje ulaze u biološki sustav za pročišćavanje, igraju važnu ulogu u održavanju stabilnosti ovih sustava i učinkovito uklanjanje fosfata. Od metalnih iona najčešće su kalij, kalcij i magnezij dio strukture polifosfatnih granula. Udjel pojedinog iona u granulama ovisi o njegovu udjelu u tretiranoj otpadnoj vodi. Ovi metalni ioni služe kao protu-ioni fosfatnim anionima u polifosfatnim lancima. Ipak istraživanja pokazuju (Schonborn i sur., 2001.) da su kalijeve i magnezijeve polifosfate nestabilni i vrlo brzo se raspadaju pod anaerobnim uvjetima.

Ipak prijašnji podaci daju naslutiti da je fosfat u EBPR biomasi organiziran kao intracelularni polimerni polifosfat koji nije kemijski istaložen na površinu stanice kao anorganski depozit ili vezan na ekstracelularnim polimernim supstancama koje se asociraju sa flokulama (Levin i Shapiro, 1965). Organizacija unutar fosfat-akumulirajućih bakterija još je manje sigurna, te postoje neke tvrdnje da je lokacija polifosfata u citoplazmi, periplazmi ili da su asocirani s unutarstaničnim membranama (Streichan i Schön 1991, Mino 1985) ili pak u kompleksu s proteinima te DNA i RNA (Bond i Rees. 1999, Kornberg i sur. 1999). Danas se smatra da ako fosfat-akumulirajuće bakterije u mulju sadrže različite populacije, svaka će različito skladištiti polifosfate.

1.5. ROD *ACINETOBACTER*

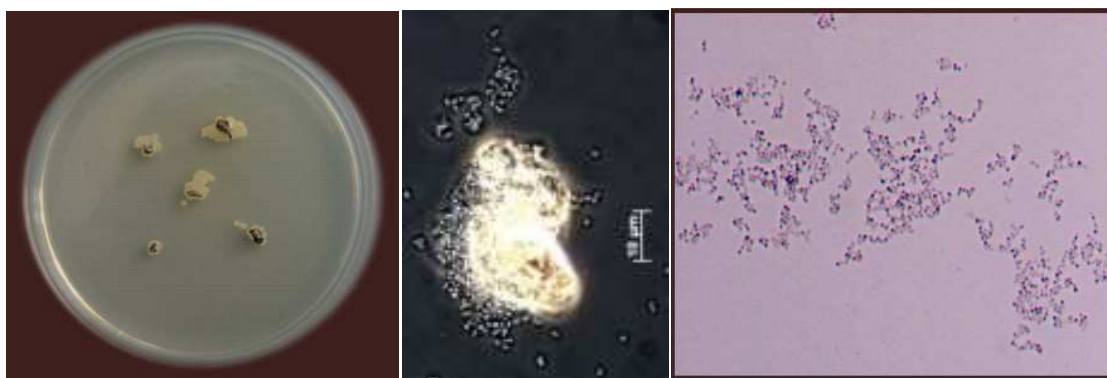
Acinetobacter je rod bakterija iz razreda *Gammaproteobacteria*. Vrste iz roda *Acinetobacter* su široko rasprostranjene u prirodi i žive u različitim staništima. Procijenjeno je da predstavnici roda *Acinetobacter* čine oko 0,001% heterotrofne aerobne bakterijske populacije u tlu i vodi (Baumann, 1968). Prve sojeve roda *Acinetobacter* izolirao je iz zemlje M. W. Beijerinck 1911. i nazvao ih *Micrococcus calcoaceticus*. Od tada se bili često predmet istraživanja i nekoliko puta im je promijenjeno ime dok konačno 1954. J. Brison i A. R. Prevot nisu uveli naziv roda *Acinetobacter*. *Acinetobacter* je postao model organizma za biološko uklanjanje fosfata jer je prvi izoliran iz postrojenja za uklanjanje fosfora putem aktivnog mulja (Fuhs i Chen, 1975).

Bakterije iz roda *Acinetobacter* se smatraju nepatogenim za zdrave ljude, dok kod imunokompromitiranih bolesnika mogu uzrokovati teške za život opasne infekcije. Često su prisutne u bolničkoj sredini (umivaonici, kateteri, zrak...).

Bakterija tog roda, a tako onda i *Acinetobacter junii*, su Gram-negativne, oksidaza-negativne i katalaza-pozitivne bakterije. One se u stacionarnoj fazi pojavljuju kao nepokretni koki ili kratki bacili bez bičeva, često u parovima ili povezani u duže lance. Ne stvaraju spore. Obligatni su aerobni koji mogu koristiti razne spojeve kao izvore ugljika i energije, a otporan metabolizam im uz to daje visoku sposobnost prilagođavanja što objašnjava sposobnost preživljavanja u različitim tipovima okoliša i relativno jednostavnom mediju. Nađene su tako u vodi, tlu, živim organizmima, pa čak i na ljudskoj koži. Bakterijske kolonije uspijevaju rasti na različitim temperaturama od 20°C pa sve do 44°C, ali za većinu je optimalna temperatura 33 - 35°C (Towner, 2006) (Huddedar i sur., 2002).

Mnogim znanstvenim radovima pokazano je da su uklanjanje i oslobađanje fosfora u sustavima s muljevima rezultat dominacije upravo ovog roda bakterije, a posebno se ističe vrsta *Acinetobacter calcoaceticus* (Buchan, 1983.). *Acinetobacter* spp. imaju sposobnost akumulirati veće količine fosfora nego što im je potrebno za staničnu sintezu. Bakterije roda *Acinetobacter* akumuliraju fosfat uz korištenje VFA (aceton, propionat, butirat, izobutirat, valerična i izovalerična kiselina) kao supstrata koji je prisutan ili može biti produciran iz otpadne vode.

Neki istraživači koji su vodili studije na uređajima za pročišćavanje otpadne vode izvijestili su da su *Acinetobacter* spp. činile 50-70 % ukupne populacije izolirane iz aktivnog mulja (Beacham i sur. 1990). Identifikacija EBPR aktivnog mulja pokazala je da je više od 90% bakterijske populacije sastavljeno od *Acinetobacter* spp. (Wentzel i sur. 1988). Fosfat-akumulirajuće bakterije roda *Acinetobacter* ipak možda nemaju glavnu ulogu u baterijskoj biomasi aktivnog mulja međutim, ali njihov mali postotak u aktivnom mulju još uvijek znači prisutnost nekoliko milijuna stanica po gramu biomase. *Acinetobacter* može akumulirati do 100 mg fosfata po gramu suhe biomase što ga čini značajnim dodatkom za EBPR proces (van Groenestijn i sur. 1989, Timmerman 1984) (Slika 5). Bakterije kao što su *Pseudomonas* spp., *Aerobacter* spp., *Moraxella* spp., *Escherichia coli*, *Mycobacterium* spp., *Beggiatoa* spp. i *Klebsiella* spp. također imaju sposobnost akumulacije fosfora koji im čini 1-3 % suhe stanične mase (Bitton, 1994).



Slika 5. (1) *Acinetobacter junii* uzgojena oko čestica zeolitnog tufa, (2) stanice *A. junii* imobilizirane na zeolitnom tufu, (3) plava zrnca polifosfata u stanicama *A. junii*, (Hrenović i sur. 2009.)

Fosfat-akumulirajuće bakterijske vrste roda *Acinetobacter* uključuju: *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. boufettii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. jazonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae* i *A. townneri* (Carr i sur., 2003.).

Nijedna od izoliranih *Acinetobacter* bakterija, uključujući i *A. junii* korištenu u našem istraživanju (Slika 6), ne posjeduje tipičnu metaboličku karakteristiku fosfat-akumulirajućih bakterija. Mikroorganizmi iz roda *Acinetobacter* preferiraju kao supstrat većinom organske kiseline, kao što su acetat, propionat, butirat, izobutirat, valerična, izovalerična i mravlja kiselina. Uglavnom oni ne mogu akumulirati poli-hidroksi-

alkanoate iz izvanstaničnih organskih kiselina u anaerobnim uvjetima rasta. Stope potrošnje organskih kiselina, otpuštanja i asimilacije fosfata su ovisne o vrsti bakterije, fazi rasta stanica i vrsti dostupnih organskih kiselina.

Jednostavniji oblik ove metode je uklanjanje fosfata upotrebom čistih kultura u isključivo aerobnim uvjetima i upravo ta metoda korištena je u ovom istraživanju.

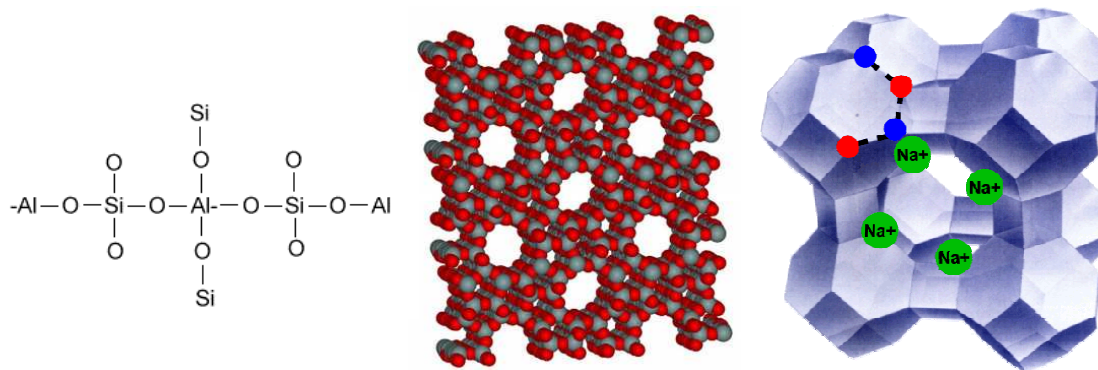


Slika 6. Kultura bakterije *Acinetobacter junii* DSMZ 1532 uzgojena na hranjivom agaru

1.6. PRIRODNI ZEOLITNI TUF

Zeoliti su vrsta aluminosilikatnih minerala koji se najčešće upotrebljavaju u komercijalne svrhe kao adsorbensi. Prvi prirodni zeolitni mineral stilbit otkrio je švedski mineralog Freiherr Axel Fredrick Cronstedt 1756. godine. Budući da je mineral bubrio kada se grijao u plamenu puhaljke, nazvao ga je zeolit, što dolazi od grčkih riječi *zeo* i *lithos* koje znače kipjeti i kamen. Nakon 1950. pokazalo se da zeoliti čine više od 90 % mnogih sedimentnih stijena vulkanskog porijekla i da su široko rasprostranjeni u cijelom svijetu. U Hrvatskoj su veća nalazišta u Hrvatskom Zagorju (Donje Jesenje, Macelj).

Prirodni zeolit ili zeolitni tuf je trodimenzionalni aluminosilikatni mikroporozni mineral s dobro definiranom strukturom koja uključuje aluminij, silicij i kisik u pravilnoj strukturi dok su kationi i voda smješteni u porama (Slika 7). Zeolitna voda lako izlazi iz rešetke bez narušavanja strukture pri temperaturi od oko 500°C (Breck, 1984., Kesraoui-Ouki i sur., 1994.). Osim vode u šupljinama se može smjestiti i velik broj kationa kao što su npr. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i drugi.

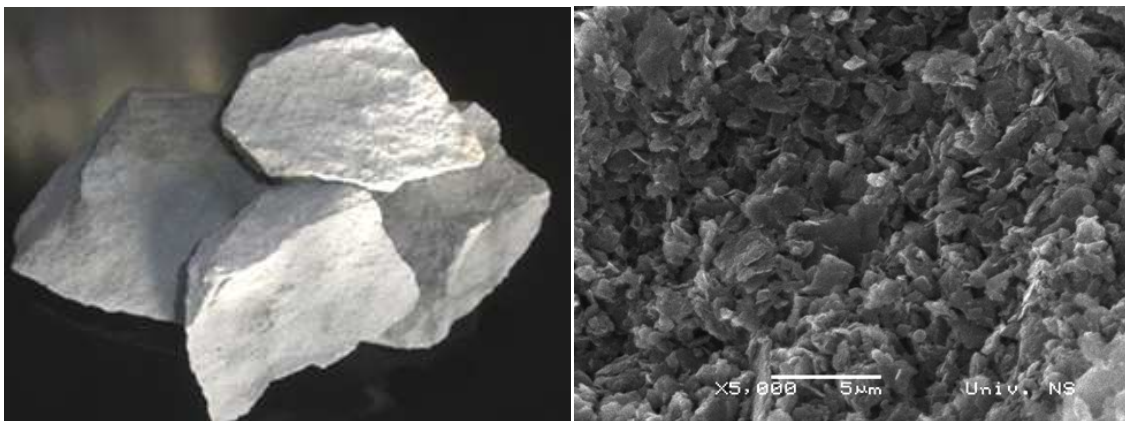


Slika 7. Osnovna struktura i prikaz kristalne rešetke zeolita,

izvor http://www.molecularsieve.org/Zeolite_Molecular_Sieve.htm

Kristalografsku strukturu zeolita čine tetraedri aluminijevog oksida (Al_2O_3) i silicijevog dioksida (SiO_2). Struktura zeolita razlikuje se od ostalih alumosilikata i drugih kristalnih materijala u postojanju strukturnih šupljina međusobno povezanih kanalima određenog oblika i veličine (Breck, 1984.). Zeoliti imaju negativno nabijeni kostur strukture koji balansira pozitivno nabijenim kationima u snažnom elektrostatskom polju na unutrašnjoj površini. Ovi kationi se mogu zamijeniti kationima kvarternih amina da bi se fino podesila veličina pora i poboljšale upijajuće karakteristike zeolita. Dokazano je da su takvi modificirani zeoliti djelotvorni sorbensi za uklanjanje anorganskih kationa, anorganskih aniona i nepolarnih organskih molekula. Zbog takvi modificirani zeoliti imaju potencijal za obradu pitkih voda, otpadnih voda i zagađenih podzemnih voda u kojima i jesu obično prisutne različite vrste zagađivača te služe kao selektivni katalizatori, ionski izmjenjivači, adsorbenti i "molekularna sita" (Rožić i sur., 2003.).

Do danas je pronađeno 197 jedinstvenih struktura zeolita (izvor <http://izasc-mirror.la.asu.edu/fmi/xsl/IZA-SC/ft.xsl>). Kristaliziraju u različite sustave i češće ih nalazimo u agregatima nego kao zasebne kristale. Iako je u prirodi pronađeno gotovo 50 zeolitnih minerala, samo ih šest ima u znatnim količinama u sedimentnim naslagama, a to su habazit, klinoptilolit, mordenit, erionit, hojlandit i filipsit (Slika 8). Relativna tvrdoća po Mohsu im iznosi 3,5 – 5,5, relativna gustoća 2,1 – 2,4 (Rožić i sur., 2003.).



Slika 8. Mineralni zeolit i SEM slika klinoptilolita, najčešće vrste zeolita,

izvor arhiva prof. Hrenović

Prirodni zeoliti su rijetko bez primjesa i obično se obično pojavljuju s drugim mineralima te se zbog toga manje upotrebljavaju u komercijalne svrhe od sintetskih zeolita. Prirodni zeoliti se danas koriste u poljoprivredi i imaju industrijsku i okolišnu primjenu. U hortikulturi se upotrebljavaju zbog sposobnosti zadržavanja vlage u tlu. Također ih koriste kao gnojivo, životinjsku hranu, u higijenskim produktima, mineralnim punjenjima i medijima za filtraciju zraka. Zbog svojstva adsorpcije i kationske izmjene koriste se kao adsorbensi u proizvodnji naftnih derivata, odlagalištima radioaktivnog otpada, za uklanjanje ulja s vodenih površina te obradu voda i otpadnih voda. Koriste se i kod uređaja za grijanje i hlađenje kao solarni termalni kolektori i kao adsorbenti kod hladnjaka, u industriji deterdženata, kod gradnje kao aditivi u procesu vruće produkcije asfaltnog betona. Neki od rjeđih minerala (tomsoniti) se cijene kao drago kamenje. Zeoliti se koriste kao molekularno sito u kriosorpcijskim pumpama za vakuum kod testiranja svemirskih tehnologija. Upotreba uključuje i aditive kod filtra u akvarijima te kao komercijalni pijesak za mačke. Zbog povećane potražnje za zeolitima, počeli su se proizvoditi i sintetski zeoliti. Sintetski zeoliti se u petrokemijskoj industriji koriste kao katalizatori nekih procesa, a u nuklearnoj industriji za učinkovito uklanjanje produkata fisije iz nuklearnog otpada. Prije otprilike 25 godina u svijetu se godišnje proizvodilo oko 300 000 t prirodnih zeolita, a 1997. čak oko 3 600 000 t i to uglavnom klinoptilolita i habazita, od čega 2/3 od ukupne proizvodnje u Kini, te se predviđa povećanje proizvodnosti od 10% godišnje (Rožić i sur., 2003.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Fosfat-akumulirajuće bakterije su najvažnije u EPBR procesu. Njihovom imobilizacijom na mineralne nosače u bioreaktorima pokušava se postići što veća koncentracija bakterijskih stanica te samim time i što bolji proces pročišćavanja otpadnih voda odnosno uklanjanja fosfata u ovom slučaju. Tako se danas rade istraživanja upravo na području međudjelovanja fosfat-akumulirajućih bakterija i mineralnih nosača, što je bio premet i ovog istraživanja.

Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi:

- u kojem mediju je najbolje pripremiti biočestice za uklanjanje fosfata pomoću bakterije *Acinetobacter junii*,
- u kojoj masenoj koncentraciji je najbolje dodati zeolit za optimalnu pripremu biočestica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PRIRODNI ZEOLITNI TUF

Prirodni zeolitni tuf je dobiven iz kamenoloma koji se nalazi u mjestu Donje Jesenje, Hrvatska. Sadrži više od 50% zeolita heulanditne grupe (klinoptilit), nešto kvarca i plagioklasnog feldspara (10-15%), K-feldspar (5%) te još neke dodatne minerale iz mica grupe (ilit-celadonit – 5%). Među izmjenjivim ionima (Ca, Mg, K i Na), natrij je dominantan u uzorku. Kemijski sastav dan je u Tablici 2. Zeolitni tuf korišten u eksperimentu je slomljen i prosijani u veličinsku frakciju 0,122-0,263 mm. Uzorak je opran demineraliziranom vodom i osušen na 105 °C kroz 16 h.

Tablica 2. Kemijska analiza zeolitnog tufa

Tip oksida	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	SO ₃	MnO ₂
Maseni udio (%)	79,6	0,1	11,5	0,8	0,5	0,8	0,5	4,8	0,2	0,065

3.2. UZGOJ BAKTERIJE

Kulturu fosfat-akumulirajuće bakterije *Acinetobacter junii* DSMZ 1532 (Bouvet i Grimot 1986) smo nabavili iz banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (Hrenovic i sur., 2003). Soj je održavan na mediju hranjivi agar, Biolife, Italija (Tablica 3), precjepljivan mjesečno i čuvan na 4 °C.

Tablica 3. Sastav hranjivog agara

Kemikalija	Količina (g)
Pepton	5,0
Mesni ekstrakt	3,0
Agar	20,0
Destilirana voda (mL)	1000

3.3. VODENI MEDIJI

3.3.1. SINTETSKA VODA

Kemijski definirana vodena otopina je korištena kao zamjena za realnu otpadnu vodu. Sastav sintetske otpadne vode je prikazan u Tablici 4.. Vrijednost pH je prije autoklaviranja (121 °C kroz 15 min) namještena na $7,0 \pm 0,2$ pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl (Kemika, Hrvatska).

Tablica 4. Sastav sintetske otpadne vode koje smo koristili u pokusu

Kemikalija	Količina (g)
Na-propionat	0,30
Pepton	0,10
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,06
KCl	0,03
Kvašćev ekstrakt	0,02
KH ₂ PO ₄	0,08
Destilirana voda (mL)	1000

3.3.2. NUTRIENT BROTH

Nutrient broth (Biolife, Italija) korišten je za rast *A. junii*. To je medij bogat hranjivim tvarima čiji je sastav prikazan u Tablici 5. Temperatura na kojoj je održavan Nutrient broth prije korištenja je 2-8°C. Prije autoklaviranja dodana je odgovarajuća količina NaCl. Vrijednost pH prije autoklaviranja je (121 °C kroz 15 min) namještena na 7,0±0,2 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl (Kemika, Hrvatska).

Tablica 5. Sastav medija Nutrient broth

Kemikalija	Količina (g)
Pepton	5,0
Mesni ekstrakt	3,0
NaCl	5,0
Destilirana voda (mL)	1000

3.4. DIZAJN POKUSA

Bakteriju uzgojenu na hranjivom agaru (Biolife, Italija), tijekom 16 sati na 30±0,1 °C, suspendirali smo u 9 ml 0,3% sterilne otopine natrijevog klorida te protresli na tresilici marke Kartell TK3S (na 45 Hz kroz 3 min) kako bi se homogenizirala suspenzija. Inokulirali smo po 3 ml suspenzije *Acinetobacter junii* u Erlenmeyerove tikvice u kojima smo pripremili 100 ml otopine sintetske vode ili mediju Nutrient Broth. Sve tikvice zatvorili smo sterilnim poklopcem sa središnjom rupom, kroz koju je omogućeno prozračivanje s filtriranim zrakom (1 L min⁻¹) kako bi se izbjegla kontaminacija mikroorganizmima prisutnih u zraku. Tikvice su inkubirane u vodenoj kupelji marke Memmert WNB22 (Slika 9) na temperaturi od 30±0,1 °C pri 70 rpm kroz 24 h. Raspon masenih koncentracija dodavanog zeolitnog tufa je bio: 1 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹ i 50 g L⁻¹.

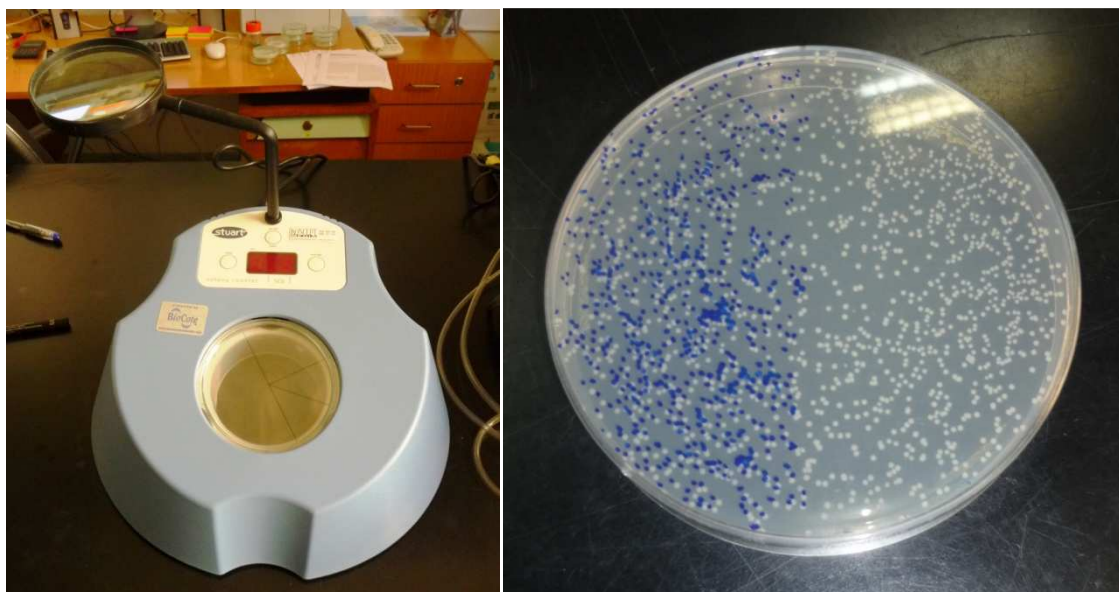


Slika 9. Vodena kupelj s tikvicama i sustavom za prozračivanje

3.5. ANALITIČKE METODE

3.5.1. ODREĐIVANJE POČETNOG BROJA BAKTERIJA

Prije dodavanja zeolita odredili smo početni broj suspendiranih bakterija u vodenom mediju (sintetskoj vodi ili Nutrient broth). Napravili smo serijska razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-5} bakterijske suspenzije u sintetskoj vodi, te volumene od 0,1 ml inokulirali na hranjivi agar metodom širenja razmaza i stavili u inkubator na $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ kroz 24 h kako bi dobili podatak o startnom broju bakterija *Acinetobacter junii* izraženom kao broj jedinica koje formiraju kolonije (CFU). Brojanje je izvršeno pomoću brojača, kolonija bakterija Colony counter /SC6/ Stuart (Slika 10).



Slika 10. a) brojač bakterijskih kolonija,
b) kolonije *Acinetobacter junii* označene zbog brojanja

3.5.2. ODREĐIVANJE BROJA IMOBILIZIRANIH BAKTERIJA

Nakon pokusa materijal smo isprali s 0,3% sterilnom otopinom NaCl dva puta. Materijal smo zatim prebacili u plastičnu epruvetu te još jednom isprali sterilnom vodom kako bi uklonili bakterije koje se nisu čvrsto imobilizirale na zeolit. U epruvetu smo dodali 9 mL 0,3% NaCl i tresli 3 minute jakošću 45 Hz na mehaničkoj miješalici Kartell TK35. Tako smo odvojili imobilizirane bakterijske kolonije s površine zeolita te ih mobilizirali u suspenziju koju smo tad serijski razrijedili od 10^{-1} od 10^{-5} . Inokulirali smo 0,1 mL na hranjivi agar metodom širenja razmaza te stavili na inkubaciju $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ kroz 24 h. Brojanje je izvršeno pomoću brojača kolonija bakterija Colony counter /SC6/ Stuart. Materijal iz epruveti za određivanje broja imobiliziranih bakterijskih kolonija smo prebacili u male Petrijeve posudice (ispiranjem smo pokupili što je više materijala moguće) i stavili u suhi sterilizator na 105°C tijekom 2 h (Slika 11). Nakon 24 h smo izvagali materijal na analitičkoj vagi kako bi mogli izračunati broj bakterija po gramu zeolita.



Slika 11. Uzorci materijala u suhom sterilizatoru

3.5.3. BOJANJE KARBOL FUKSINOM

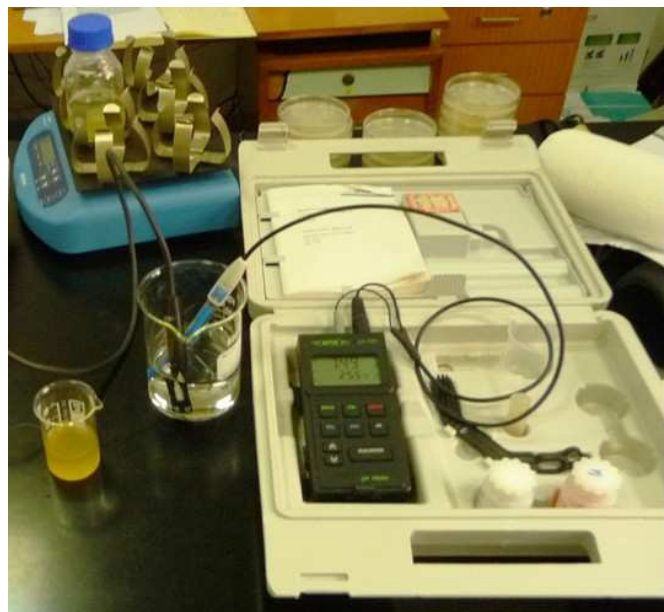
Uzorak iz svake tikvice s određenom koncentracijom zeolitnog tufa nanijeli smo na predmetno stakalce pomoću bakteriološke ušice koju smo prethodno spalili. Da se prilikom bojanja bakterije ne bi mehanički uklonile s predmetnog stakalca, preparat smo učvrstili provlačenjem kroz plamen Bunsenova plamenika, tako da je uzorak s gornje strane. Radi dokazivanja imobiliziranih bakterija *Acinetobater junii*, koja je Gram-negativna bakterija, nanijeli smo preko preparata kontrastnu crvenu boju safranin ili karbol-fuksin (Slika 12) i ostavili stakalce stajati 0,5 min. Nakon toga stakalce smo oprali pod mlazom vode da bi se uklonila crvena boja iz staničnih međuprostora. Gram-negativne bakterije stoga su postale obojene u crveno. Obojani uzorak smo osušili između filter papira, dodali kap imerzijskog ulja (cedrovo ulje ili anisol) i mikroskopirali pod imerzijskim objektivom (povećanje 1000x).



Slika 12. Kadice za bojanje karbol fuksinom

3.5.4. MJERENJE pH VRIJEDNOSTI

Mjerenje pH vrijednosti vršeno je u svim tikvicama nakon 24 h pokusa. Korišten je uređaj WTW pH 330/Set-1 pH-metar (Slika 13). Cijelo vrijeme kad nismo mjerili elektroda uređaja bila je smještena u 3 M KCl, a između mjerenja ispirali smo je destiliranom vodom da ne bi došlo do pogrešnih očitavanja.



Slika 13. pH-metar

3.5.5. STATISTIČKA ANALIZA

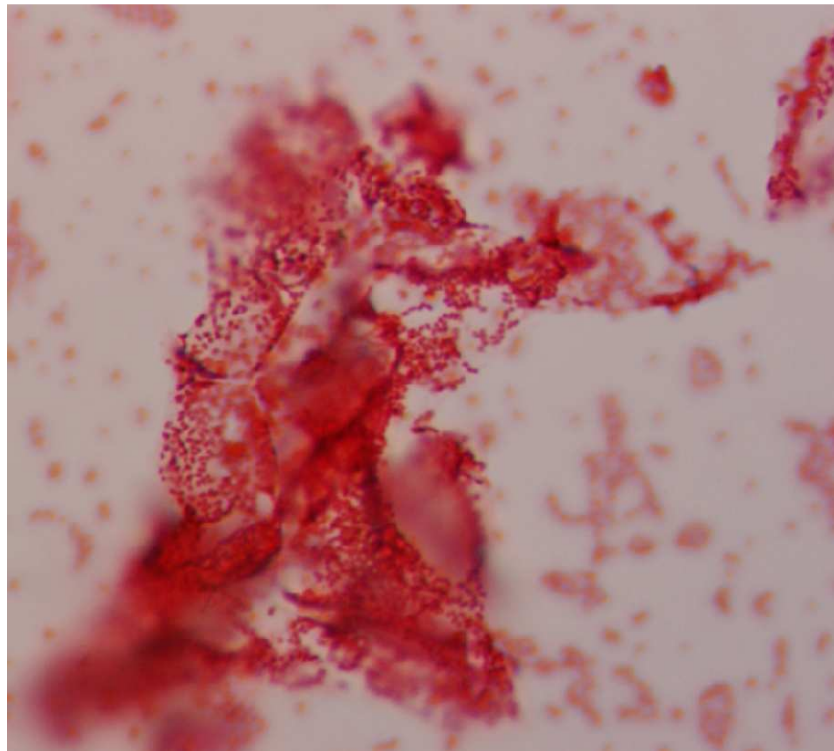
Statističku analiza izvršili smo koristeći Statistica Software 9.1 (StatSoft, Tulsa, USA). Broj imobiliziranih bakterijskih kolonija ranije je bio logaritamski transformiran kako bismo normalizirali distribuciju i kako bismo ujednačili varijaciju mjerenih parametara. Unutarnja grupna usporedba između uzoraka obavljena je jednostranom analizom odstupanja (ANOVA)) i nakon toga Duncanov post-hoc test se koristio za izračunavanja u vezi s dvostrukim usporedbama. Korelacija između varijabli je procijenjena pomoću Spearmanove korelacijske analize. Zaključci temeljeni na statističkoj analizi su doneseni na značajnoj razini $p < 0.05$.

4. REZULTATI

U ovom radu mjerili smo nekoliko parametara pomoću kojih možemo donijeti zaključke o optimalnoj metodi pripreme biočestica u različitim medijima i pri dodatku različitim masenih koncentracija mineralnog nosača, u našem slučaju zeolitnog tufa. Izmjereni i/ili izračunati parametri koji su nam bili potrebni prikazani su u grafovima i tablicama koje se nalaze ispod njih, a to su:

- početni broj bakterijskih kolonija (CFU),
- broj imobiliziranih bakterijskih kolonija (CFU),
- pH vrijednosti.

Ispitivane bakterije su se umnožile i imobilizirale na zeolitni tuf nakon 24 h pokusa što se lijepo vidi iz rezultata bojenja karbol fuksinom. Gram-negativne bakterijske stanice *Acinetobacter junii* obojile su se u crveno (Slika 14).



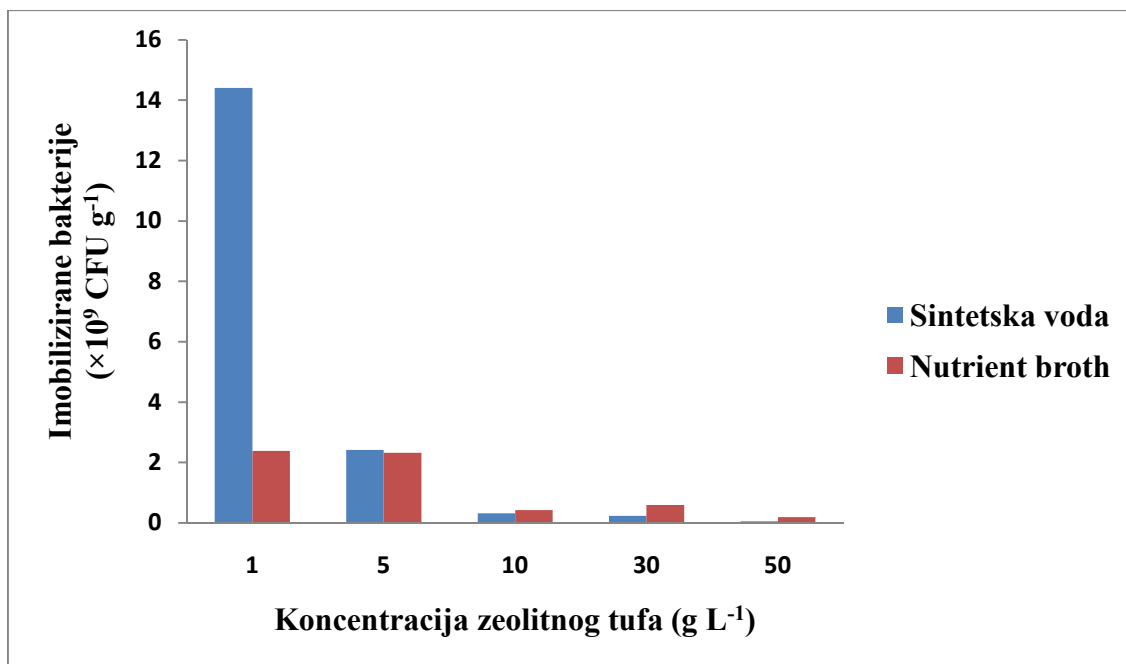
Slika 14. Crveno obojene bakterije *Acinetobacter junii* imobilizirane na čestici zeolitnog tufa (povećanje 1000×)

Iz mjerenja prije inkubacije dobili smo srednji startni broj bakterijskih kolonija *Acinetobacter junii* koji iznosi $4,97 \pm 0,17 \times 10^7$ CFU mL⁻¹. Izmjerena količina imobiliziranih bakterijskih kolonija (Tablica 6) u uzorcima jasno pokazuje da se tijekom 24 h inkubacije broj bakterija višestruko povećao i da su se bakterije intenzivno umnožavale, te da je došlo do imobilizacije bakterija na mineralne nosače. Stupanj imobilizacije ovisio je o koncentraciji mineralnog nosača te o mediju u kojem smo inkubirali bakteriju.

Tablica 6. Podaci o imobiliziranim CFU bakterijama *A. junii* i promjeni pH vrijednosti medija nakon 24 h pokusa

Koncentracija zeolitnog tufa (g L ⁻¹)	Sintetska voda		Nutrient broth	
	Imobilizirane bakterije (×10 ⁹ CFU mL ⁻¹)	pH	Imobilizirane bakterije (×10 ⁹ CFU mL ⁻¹)	pH
1	14,40±1,88	7,04	2,38±0,57	6,93
5	2,42±1,72	7,03	2,32±0,40	6,97
10	0,31±0,04	7,01	0,41±0,29	7,0
30	0,23±0,18	7,13	0,59±0,43	6,99
50	0,05±0,03	7,14	0,19±0,13	6,86

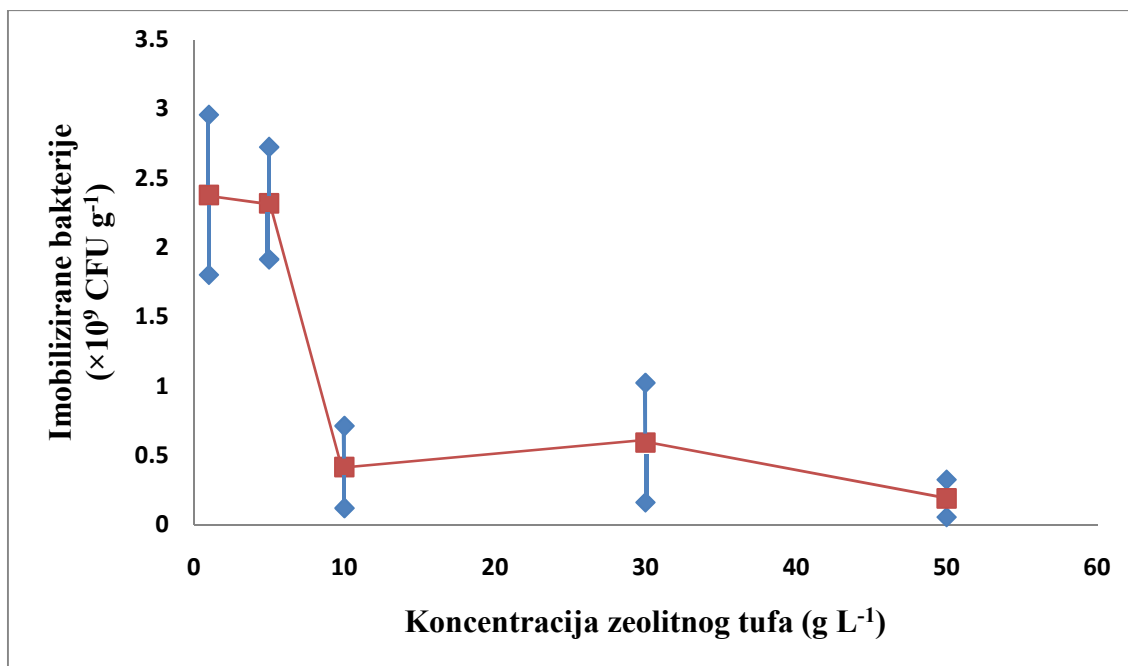
Srednja vrijednost broja imobiliziranih bakterijskih kolonija bila je maksimalna u uzorku sa sintetskom vodom kojoj je dodano 1 g L⁻¹ zeolitnog tufa i iznosi $14,40 \pm 1,88 \times 10^9$ CFU mL⁻¹. Svi ostali uzorci i sa sintetskom vodom i s Nutrient broth-om imali su značajno ($p < 0,05$) manji broj imobiliziranih bakterijskih kolonija (Slika 15). Za Nutrient broth značajno najveća vrijednost također je postignuta pri koncentraciji od 1 g L⁻¹ zeolitnog tufa u uzorku i iznosi $2,38 \pm 0,57 \times 10^9$ CFU mL⁻¹ (Slika 16), ali opet je nekoliko puta manja nego količina imobiliziranih bakterijskih kolonija pronađenih u sintetskoj vodi pri istoj količini zeolitnog tufa (Slika 17).



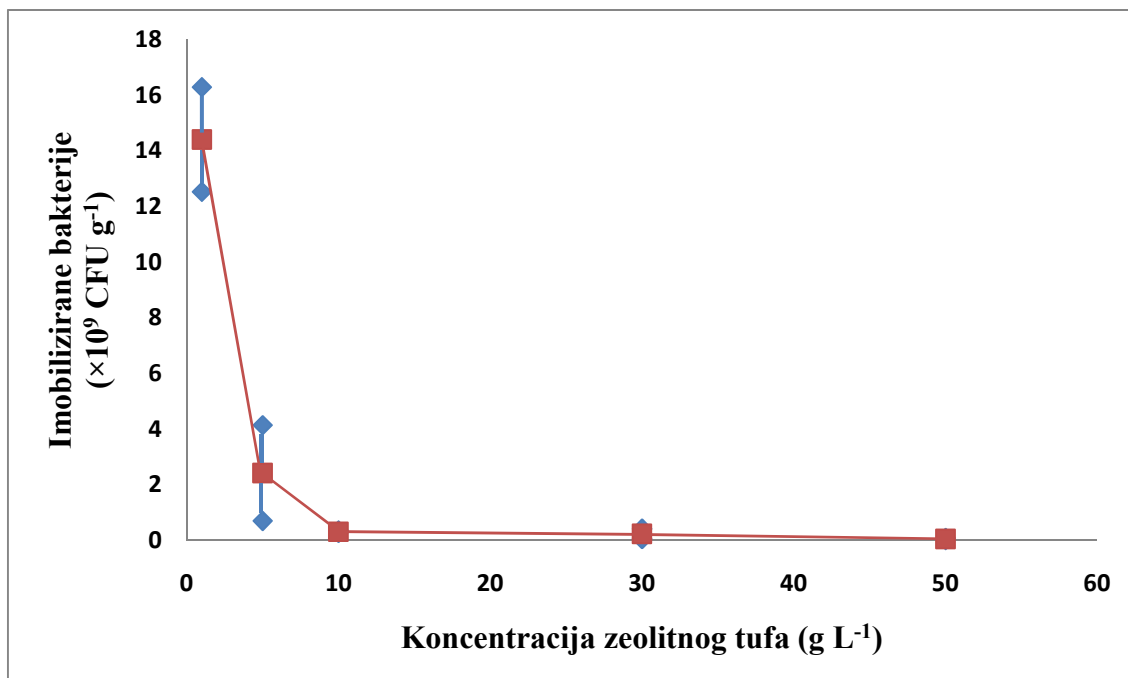
Slika 15. Prikaz usporedbe broja imobiliziranih bakterija *A. junii* pri različitim koncentracijama zeolitnog tufa u uzorcima sa sintetskom vodom i s Nutrient broth

Značajno najniža koncentracija imobiliziranih bakterijskih kolonija uočena je uzorku sa sintetskom vodom pri koncentraciji 50 g L⁻¹ zeolitnog tufa i iznosi 0,05±0,03 × 10⁹ CFU mL⁻¹. Najniža koncentracija imobiliziranih bakterijskih kolonija uočena u uzorcima s Nutrient broth koja iznosi 0,41±0,29 × 10⁹ CFU mL⁻¹ u uzorku sa 10 g L⁻¹ zeolitnog tufa.

Statističkom usporedbom među uzorcima sa sintetskom vodom uzorak koji sadrži 1 g L⁻¹ zeolitnog tufa se značajno razlikuje i veći je od uzorka koji sadrži 5 g L⁻¹ zeolita pa time i svih ostalih koji slijede poslije njega. Kod uzoraka koji sadrže Nutrient broth nema značajne razlike između uzoraka od 1 i 5 g L⁻¹. Svi ostali uzorci s Nutrient broth i većim koncentracijama zeolitnog tufa su značajno manji i razlikuju se od uzoraka s 1 i 5 g L⁻¹.



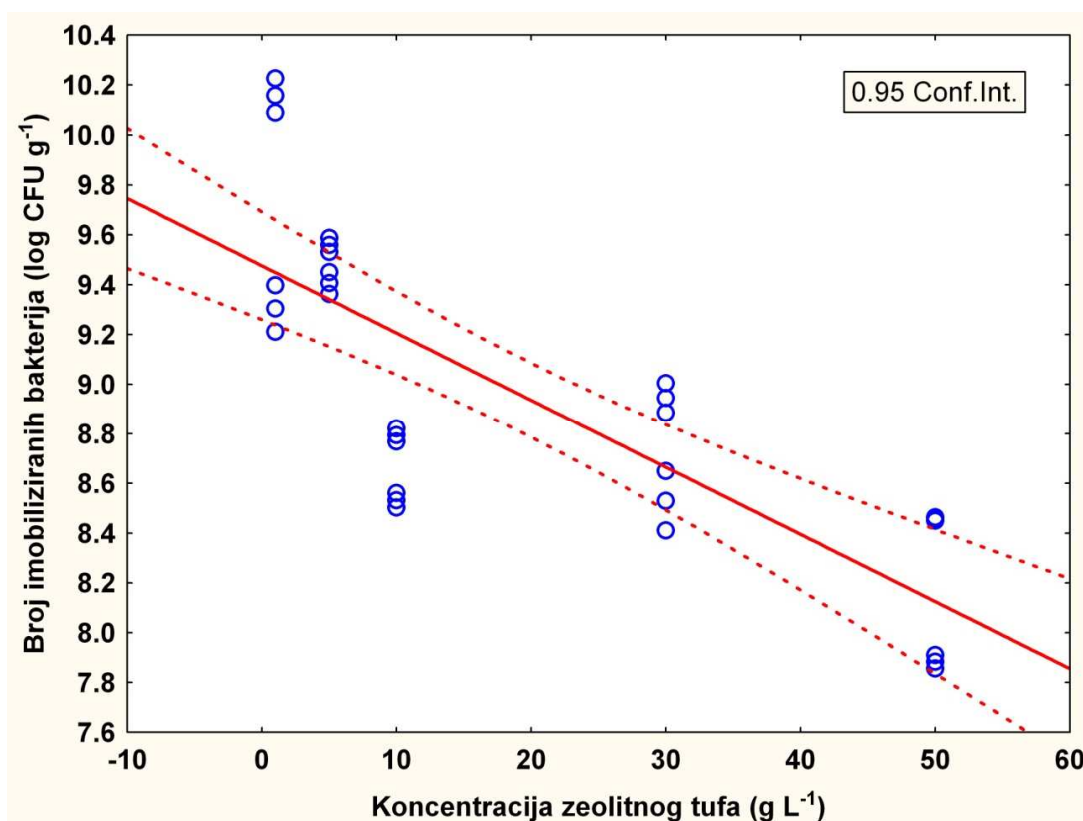
Slika 16. Broj imobiliziranih bakterija na zeolitnom tufu (srednja vrijednost CFU sa standardnom devijacijom) u odnosu na koncentracije zeolitnog tufa u Nutrient broth



Slika 17. Broj imobiliziranih bakterija na zeolitnom tufu (srednja vrijednost CFU sa standardnom devijacijom) u odnosu na koncentracije zeolitnog tufa u sintetskoj vodi

Statistički uspoređujući sintetsku vodu i Nutrient broth kao različite medije pri istim koncentracijama zeolitnog tufa dolazimo do rezultata da je kod nižih koncentracija od 1 i 5 g L⁻¹ sintetska voda bolji medij, a pri višim koncentracijama od 10, 30 i 50 g L⁻¹ bolji medij Nutrient broth.

Odredili smo i korelaciju broja imobiliziranih bakterijskih kolonija i koncentracije zeolitnog tufa (Slika 18). Dobiveni rezultat korelacije ($R = -0,789$) je bio značajno negativan što znači da povećanje jednog parametra uvjetuje smanjenje drugog što smo u našem slučaju i statistički i znanstveno dokazali da povećanjem koncentracije zeolitnog tufa u oba medija dolazi smanjenja broja imobiliziranih kolonija, a time i pripremljenih biočestica.



Slika 18. Korelacija između broja imobiliziranih bakterijskih kolonija u sintetskoj vodi i Nutrient broth i koncentracije zeolitnog tufa (program Statistica Software 9.1)

Vrijednost pH koje je pri početku pokusa bila neutralna i iznosila 7,00 nakon 24 h počinje varirati različito u svakom pojedinom uzorku, ali maksimalno odstupanje iznosi $\pm 0,14$ pa se pretpostavlja da ni nema nekog bitnog utjecaja na sam proces formiranja biočestica. Najveća odstupanja u oba smjera nalazimo pri koncentraciji od 50 g L^{-1} zeolitnog tufa i to 6,86 u uzorku Nutrient broth i maksimalnih 7,14 u uzorku sa sintetskom vodom. U svim uzorcima sa sintetskom vodom došlo je do povišenja pH i jako blagog zakiseljenja medija, a u većini uzoraka s Nutrient broth dolazi do sniženja pH i jako blage lužnatosti u odnosu na početno stanje.

5. RASPRAVA

Glavni cilj ovog rada bio je ispitati u kojem mediju je najbolje pripremiti biočestice koje su potrebne za asimilaciju fosfata pomoću bakterije *Acinetobacter junii* te u kojoj količini (koncentraciji) je najbolje dodati zeolit ispitivanim medijima za optimalnu pripremu biočestica. Odabran je prirodni zeolit kao mineralni nosač za imobilizaciju fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* s kojom zajedno tvori biočestice, a ispitivani mediji bili su sintetska voda i Nutrient broth.

Prijašnja istraživanja zeolitnog tufa upućuju na njegov potencijal kao nosača fosfat-akumulirajućih bakterija u bioreaktorima (Hrenović i sur., 2007), što je u skladu s našim dobivenim rezultatima. Spominju se izvrsne fizičke osobine zeolita kao imobilizatora anaerobnih mikroorganizama u bioreaktorima, a posebno se spominje neravna površina prirodnog zeolitnog tufa kao izvrsno svojstvo za imobilizaciju (Fernandez i sur., 2006). Tako Hrenović i sur. (2003.) u svojoj studiji ističu kako unatoč negativno nabijenoj površini prirodnog zeolita i nedostatku mjesta za adsorpciju fosfata, zeolit može sudjelovati u uklanjanju fosfata iz otpadnih voda.

U studiji Hrenović i sur. (2003) potvrđuju da zeolit doprinosi povećanju biomase bakterija roda *Acinetobacter*, što omogućuje i veći postotak uklonjenog fosfata za koji je potrebna što veća koncentracija biočestica u sustavu. Najveći broj imobiliziranih bakterijskih kolonija bio je prisutan u uzorku sintetske vode s koncentracijom zeolita od 1 g L^{-1} , dok drugi medij, Nutrient broth, postiže znatno manji broj imobiliziranih bakterijskih kolonija pri istoj koncentraciji zeolitnog tufa, mada isto tako najveći među njemu sličnim uzorcima. Zbog toga je koncentracija zeolitnog tufa od 1 g L^{-1} uzeta kao optimalna za pripremu biočestica bakterije *A. junii*. Kod nižih koncentracija od 1 i 5 g L^{-1} veći je broj imobiliziranih bakterijskih kolonija prisutan u sintetskoj vodi što je u suprotnosti s rezultatima studije Hrenović i sur. (2011), gdje je veći broj imobiliziranih bakterijskih kolonija bio prisutan u uzorcima s Nutrient broth, što nalazimo i u našem istraživanju samo kod uzoraka s višim koncentracijama zeolita od 10, 30 i 50 g L^{-1} . Naši rezultati se slažu i s dijelom rezultata navedene studije u primjeru blagog opadanja broja imobiliziranih bakterijskih kolonija u sintetskoj vodi pri dodavanju sve većih količina zeolitnog tufa nakon prijeđene njegove optimalne granice.

Rezultati imobilizacije fosfat-akumulirajućih bakterijskih kolonija dobiveni iz različitih istraživanja prikazani su u Tablici 7 (Hrenović i sur., 2008). Istoj tablici smo radi usporedbe pridružili i rezultate našeg istraživanja u sinteskoj vodi i Nutrient broth pri optimalnoj koncentraciji zeolita. Iz tablice se vidi da osim na prirodne zeolitne tufove, bakterije mogu biti imobilizirane i na sintetske zeolite (sintetski zeolit LTA, sintetski mordenit) i također su bila prisutna dva izmijenjena uzorka: klinoptilitni tuf s modificiranom površinom koja je bila prevučena surfaktatnom HDTMA (HDTMA klinoptilitni tuf) i magnezijem obogaćeni klinoptilitni tuf.

Najveći broj imobiliziranih bakterijskih kolonija prisutan je u našem istraživanju, u pokusu sa sintetskom vodom i optimalnom koncentracijom zeolita i to pokazuje značajno povećanje u odnosu na ostale uzorke. Slijedi ga magnezijem obogaćen klinoptilitni tuf i HDTMA klinoptilitni tuf. Broj imobiliziranih stanica nemodificiranih klinoptilitnih tufova iznosi $3,36 - 4,84 \times 10^9$ CFU g⁻¹. Mjerenje koje smo dobili za broj imobiliziranih bakterijskih kolonija u Nutrient broth s optimalnom koncentracijom zeolita pokazuje najveću sličnost sa uzorkom mjerenim na keramičkim nosačima.

U cilju provjere da li je dodatak zeolita inducira promjene u pH profilu uzorka, mjereno je pH prije i poslije samog dodavanja zeolita. Vrijednosti dobivene nakon formiranja biočestica i njihovog odstranjivanja dijela fosfata iz medija bile su u prosjeku više od početnih za uzorke sa sintetskom vodom čemu je uzrok metabolička aktivnost bakterija, što se podudara s rezultatima prijašnjih studija (Hrenović i sur., 2010), te manje od početnih za uzorke s Nutrient broth. Isključujemo pH kao veliki utjecaj na formaciju biočestica jer su se finalne pH vrijednosti kretale od 6,86 do 7,14 i pokazale mala odstupanja od početnih vrijednosti, maksimalno $\pm 0,14$. *A. junii* može normalno funkcionirati i biti metabolički aktivna unutar intervala 5 - 8 pH (Yavankar i sur., 2007).

Tablica 7. Prikaz usporedbe broja imobiliziranih kolonija
na različitim materijalima kao nosačima

Materijal	Bakterija	Imobilizirane bakterije ($\times 10^9$ CFU g ⁻¹)	Reference
sintetski zeolit LTA	<i>Acinetobacter junii</i>	0,00671	Hrenović i sur., 2007
alginat	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0,25	Muyima i Cloete, 1995
zeolit (Tip-Z)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,90	Durham i sur., 1994
sintetski mordenit	<i>Acinetobacter junii</i>	1,25	Hrenović i sur., 2007
klinoptilolitni tuf, Hrvatska	<i>Acinetobacter junii</i>	2,38	naše istraživanje u Nutrient broth, 2011
keramički nosači	<i>Acinetobacter</i> spp.	2,9	Kariminiaae-Hamedaani i sur., 2003
klinoptilolitni tuf, Turska	<i>Acinetobacter junii</i>	3,36	Hrenović i sur., 2008
klinoptilolitni tuf, Hrvatska	<i>Acinetobacter junii</i>	4,84	Hrenović i sur., 2005
HDTMA modificirani klinoptilolitni tuf, Turska	<i>Acinetobacter junii</i>	5,28	Hrenović i sur., 2008
Mg obogaćeni klinoptilolitni tuf, Hrvatska	<i>Acinetobacter junii</i>	6,86	Hrenović i sur., 2005
klinoptilolitni tuf, Hrvatska	<i>Acinetobacter junii</i>	14,40	naše istraživanje u sintetskoj vodi, 2011

6. ZAKLJUČAK

Zeolitni tuf koji smo koristili kao nosač za fosfat-akumulirajuću bakteriju *Acinetobacter junii* pogodan je za imobilizaciju te bakterije. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti bi bio pogodan kao nosač u bioreaktorima za pročišćavanje.

Koncentracija dodavanog zeolitnog tufa od 1 g L^{-1} pokazala se kao optimalna koncentracija za pripremu biočestica u oba medija. Daljnjim povećanjem koncentracije zeolitnog tufa preko 1 g L^{-1} broj imobiliziranih bakterijskih kolonija u blago opada u oba medija što znači da je dovoljno dodati 1% zeolitnog tufa u smjesu jer više nije ni ekonomski isplativo niti potiče daljnje povećano stvaranje bakterijskih biočestica.

Pri nižim koncentracijama zeolitnog tufa, 1 i 5 g L^{-1} , veći broj imobiliziranih bakterijskih kolonija formiran je u uzorcima sa sintetskom vodom, a pri višim koncentracijama, 10 , 30 i 50 g L^{-1} , u uzorcima s Nutrient broth.

Dodavanjem prirodnog zeolitnog tufa nije došlo do značajnih promjena vrijednosti pH pa se pretpostavlja da sam pH nema značajnijeg utjecaja na formiranje biočestica.

7. LITERATURA

- Balmér P. i Hultman B. (1988) Control of phosphorus discharges : present situation and trends. *Hydrobiologia* 170: 305-319
- Baumann P. (1968) Isolation of *Acinetobacter* from soil i water. *Journal of Bacteriology* 96: 39–42
- Beacham A.M., Seviour R.J., Lindrea K.C. i Livingston I. (1990) Genospecies diversity of *Acinetobacter* isolates obtained from a biological nutrient removal pilot plant of a modified uct configuration. *Water Research* 24: 23–29
- Bitton G. (1994) *Wastewater Microbiology*, Wiley-Liss Pub., New York
- Bond P.L. i Rees G.N. (1999) Microbiological aspects of phosphorus removal in activated sludge systems. 227-256. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Breck D.W. (1984) *Zeolite Molecular Sieves*. Krieger Publlishers ComMalabar, Florida, 29-133
- Buchan L (1983) Possible biological mechanism of phosphorus removal. *Water Science and Technology* 15: 87–103
- Carr E.L., Kämpfer P., Patel B.K.C., Gürtler V. i Seviour R.J. (2003) Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 953-963
- Donnert D. i Salecker M. (1999) Elimination of phosphorus from wastewater by crystallization. *Environmental Technology* 20: 735-742
- Durham D.R., Marshall L.C., Miller J.G. i Chmurny, A.B. (1994) Characterization of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment process. *American Society for Microbiology* 60: 3329-3335
- Fernández N., Montalvo S., Fernández-Polanco F., Guerrero L., Cortés I., Borja R., Sánchez E. i Travieso L. (2007) Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors. *Process Biochemistry* 42: 721-728
- Fuhs G.W. i Chen M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology* 2: 119-138

- Guisasola Canudas A. (2005) Modelling biological organic matter and nutrient removal processes from wastewater using respirometric and titrimetric techniques. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química B-15430-2006
- Hrenović J. (2009) Interaction of zeolites and phosphate accumulating bacteria. U T. W. Wong (ur.): Handbook of zeolites: Structure, Properties and Applications. Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge NY, SAD
- Hrenović J., Büyükgüngör H. i Orhan Y. (2003) Use of natural zeolite to upgrade activated sludge process. Food Technology and Biotechnology 41: 157–165
- Hrenović J. i Ivanković T. (2009) Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. EurAsian Journal of BioSciences 3: 144-151
- Hrenović J., Ivanković T. i Rožić M. (2010) Requirement of *Acinetobacter junii* for magnesium, calcium and potassium ions. Journal of bioscience and bioengineering 110: 180-186
- Hrenović J. Ivanković T. i Tibljaš D. (2009) The effect of mineral carrier composition on phosphate – accumulating bacteria immobilization. Journal of Hazardous Materials 166: 1377-1382
- Hrenović J., Kovačević D., Ivanković T. i Tibljaš D. (2011) Selective immobilization of *Acinetobacter junii* on the natural zeolitized tuff in municipal wastewater. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, doi:10.1016/j.colsurfb.2011.06.03
- Hrenović J., Rožić M., Sekovanović L. i Anić-Vučinić A. (2008) Interaction of surfactant-modified zeolites and phosphate accumulating bacteria. Journal of Hazardous Materials, 156: 576-582
- Hrenović J. i Tibljaš D. (2002) Phosphorus removal from wastewater by bioaugmented activated sludge with different amounts of natural zeolite addition. Studies in surface science and catalysis 142
- Hrenović J., Tibljaš D., Büyükgüngör H. i Orhan Y. (2003) Influence of support materials on phosphate removal by the pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. Food Technology and Biotechnology 41: 331-338

- Hrenović J., Tibljaš D. i Orhan Y. (2005) Increasing of the biomass of phosphate accumulating bacteria due to addition of a clinoptilolite-rich tuff from Bigadiç, Turkey. *Studies in surface science and catalysis* 158
- Hrenović J., Tibljaš D., Orhan Y. i Büyükgüngör H. (2005) Immobilisation of *Acinetobacter calcoaceticus* using natural carriers. *Water & Sewerage Journal* 31: 261-666
- Hrenović J., Tibljaš D. i Sekovanić L. (2007) Aluminosilicates as carriers of phosphate-accumulating bacteria. *Acta Chimica Slovenica* 54: 661-666
- Hrenović J., Željezić D., Kopjarb N., Sarpolac A., Bronić J. i Sekovanić L. (2010) Antimicrobial activity of commercial zeolite A on *Acinetobacter junii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials* 183: 655-63
- Huddedar S.B., Shete A.M., Tilekar J.N., Gore S.D., Dhavale D.D. i Chopade B.A.(2002) Isolation, characterization and plasmid pUPI126 mediated indole-3-acetic acid production in *Acinetobacter* strains from rhizosphere of wheat. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103: 21-29
- Jenkins D. i Hermanovicz S.W. (1991) Principles of chemical phosphate removal. U: Sedlak R. I. : Phosphorus and nitrogen and removal from municipal wastewater: principles and practice. 2nd ed. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Johnsen I. i Jorgensen S.E. (1981) Principles of environmental science and technology. Elsevier North-Holland xi, 516 p
- Kariminiaae-Hamedani H.R., Kanda K. i Kato F. (2003) Wastewater treatment with bacteria immobilized onto a ceramic carrier in an aerated system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95: 128-132
- Kesraoui-Ouki S., Cheeseman C.R., Perry R. i Chem J. (1994) Natural Zeolite Utilization in Pollution Control: A Review of Applications to Metal's Effluents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 59: 121-126
- Kornberg A., Rao N.N. i Ault-Riche, D. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* 68: 89-125
- Kortsee G.J.J., Appeldorn K.J., Bonting C.F.C., van Niel E.W.J. i van Veen H.W. (1994) Biology of phosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 15: 137-153

- Levin G.V. i Shapiro J. (1965) Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. *Journal of Water Pollution Control Federation* 37: 800-821
- Lotter L.H. i Murphy M. (1985) The identification of heterotrophic bacteria activated sludge with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water & Sewerage Journal* 11: 179-184
- Metcalf E. (2003) *Wastewater engineering: treatment and reuse*, 4th edn. McGraw-Hill, Columbus
- Mino T. (2000) Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry (Moscow)* 65: 341-348
- Mino T., Kawakami T. i Matsuo T. (1985) Behaviour of intracellular polyphosphate in the biological phosphate removal process. *Water Science and Technology* 17: 11-21
- Mino T., van Loosdrecht M.C.M. i Heijnen J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphorus removal process. *Water Research* 32: 3193-3207
- Muyima N.Y.O. i Cloete T.E. (1995) Immobilisation of *Acinetobacter johnsonii* cells within alginate beads. *Water & Sewerage Journal* 21: 239-244
- Narodne novine br. 40/99, Pravilnik o graničnim vrijednostima pokazatelja, opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama
- Narodne novine br. 6/01, Pravilnik izmjenama i dopunama pravilnika o graničnim vrijednostima pokazatelja, opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama
- Rožić M., Bolanča Z. i Cerjan-Stefanović Š. (2004) Prirodni zeoliti u kontroli grafičke industrije, *Kemijska Industrija* 53: 449-458
- Park S., Oh J. i Yoon T. (2003) The role of powdered zeolite and activated carbon carriers on nitrification in activated sludge with inhibitory materials. Elsevier Science Ltd. *Process Biochemistry* 39: 211-219
- Schonborn C., Bauer H.D. i Roske I. (2001) Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. *Water Research* 35: 3190-3196

- Seviour R., Mino T. i Onuki M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 27: 99-127
- Sidat M., Bux F. i Kasan H.C. (1999) Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. Water & Sewerage Journal 25: 175-179
- Streichan M. i Schön G. (1991) Periplasmic and intracytoplasmic polyphosphate and easily washable phosphate in pure cultures of sewage bacteria. Water Research 25: 9-13
- Timmerman M.W. (1984) Biological phosphorus removal in wastewater treatment. Microbiological Sciences 1: 149-152
- Towner K. (2006) The Genus *Acinetobacter*. Prokaryotes 6: 746–758 DOI: 10.1007/0-387-30746-x_25. CHAPTER 3.3.25
- van Groenestijn J.W., Bentvelsen M.M., Deinema M.H. i Zehnder A.J. (1989) Polyphosphate-degrading enzymes in *Acinetobacter* spp. i activated sludge. Applied and Environmental Microbiology 55: 219-223.
- van Starckenburg W., Rensink J.H. i Rijs G.B.J. (1993) Biological P-removal: State of the art in The Netherlands[J]. Water Science and Technology 27: 317–328.
- Wentzel M.C., Loewenthal R.E., Ekama G.A., i Marais G.v.R. (1988) Water & Sewerage Journal, 14: 81-92
- Yavankar S.P., Pardesi K.R. i Chopade B.A. (2007) Species distribution and physiological characterization of *Acinetobacter* genospecies from healthy human skin of tribal population in India. Indian Journal of Medical Microbiology 25: 336-345
- Enviromental Biotechnology, Biological Phosphorus Removal from Waste Water, <http://knowhowtogmo.wordpress.com/2011/02/01/biological-phosphorus-removal-from-waste-water> (04.08.2011.)
- International Zeolite Association, Database of Zeolite Structures, <http://izasc-mirror.la.asu.edu/fmi/xsl/IZA-SC/ft.xsl> (04.08.2011.)
- Lenntech, Water treatment and purification, <http://www.lenntech.com/phosphorous-removal.htm> (04.08.2011.)
- Oilgae, New Technologies in Phosphorous Removal from Wastewater, <http://www.oilgae.com/algae/cult/sew/new/pho/pho.html> (04.08.2011.)

- Strom P.H. (2006) Technologies to Remove Phosphorus from Wastewater. [Rutgers Cooperative Extension Water Resources Program, http://www.water.rutgers.edu/Projects/trading/p-trt-lit-rev-2a.pdf](http://www.water.rutgers.edu/Projects/trading/p-trt-lit-rev-2a.pdf) (04.08.2011.)
- Xinyuan Molecular Sieve, http://www.molecularsieve.org/Zeolite_Molecular_Sieve.htm (04.08.2011.)