

Uklanjanje fosfata iz otpadne vode fosfat-akumulirajućim bakterijama i crvenicom

Giro, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2012

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:293130>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Sandra Giro

**Uklanjanje fosfata iz otpadne vode fosfat-akumulirajućim
bakterijama i crvenicom**

Diplomski rad

Zagreb, 2012

Ovaj rad, izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka 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.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Jasni Hrenović na pruženoj prilici za rad na ovom istraživanju.

Također veliko hvala mojoj kolegici Tihani Arapović koja je bila uz mene za vrijeme nastajanja ovog rada, te se posebno zahvaljujem mojoj dragoj obitelji na velikom strpljenju, odricanju i podršci koju su mi pružali tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UKLANJANJE FOSFATA IZ OTPADNE VODE FOSFAT- AKUMULIRAJUĆIM BAKTERIJAMA I CRVENICOM

Sandra Giro

Zavod za mikrobiologiju, Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Fosfat-akumulirajuće bakterije primjenjuju se u procesu poboljšanog biološkog uklanjanja fosfata iz otpadne vode. Imobilizacijom fosfat-akumulirajućih bakterija na prirodne nosače postiže se veća koncentracija, a time i uspješnije uklanjanje fosfata iz otpadnih voda. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sposobnost fosfat-akumulirajuće bakterije *Acinetobacter junii* i mineralnog nosača crvenice za uklanjanje fosfata iz otpadne vode. Korištena su četiri različita uzorka crvenice. Crvenica je pokazala relativno veliki postotak uklanjanja fosfata (25,7 -31,1 %), a u kombinaciji s fosfat-akumulirajućim bakterijama *A. junii* taj postotak je dvostruko veći (50,0 – 55,6 %).

(30 stranica, 8 slika, 5 tablica, 62 literarna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: fosfat-akumulirajuće bakterije, mineralni nosač, otpadna voda, crvenica, *Acinetobacter junii*

Voditelj: Dr.sc. Jasna Hrenović, prof.

Ocjenitelji: Dr.sc. Jasna Hrenović, prof.

Dr.sc. Mirjana Kalafatić, prof.

Dr.sc. Vesna Benković, doc.

Rad prihvaćen: siječanj 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

PHOSPHATE REMOVAL FROM WASTEWATER WITH PHOSPHATE-ACCUMULATING BACTERIA AND RED SOIL

Sandra Giro

Department of microbiology, Department of Biology, Roosevelt trg 6, Zagreb

Phosphate-accumulating bacteria have their use in the process of enhanced biological phosphorus removal from wastewater. The immobilization of phosphate-accumulating bacteria on mineral carriers leads to a higher concentration that enables a more effective phosphate removal from wastewater. The aim of this study was to determine the ability of phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii* and mineral carrier to remove phosphate from wastewater. Four different samples of red soil were used. Red soil showed a relatively high percentage of phosphate removal (25,7-31,1 %), in combination with a phosphate-accumulating bacteria *A. junii* this percentage is two times higher (50,0 – 55,6 %).

(30 pages, 8 figures, 5 tables, 62 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: phosphate-accumulating bacteria, mineral carrier, wastewater, red soil,

Acinetobacter junii

Supervisor: Dr.sc. Jasna Hrenović, Prof.

Reviewers: Dr.sc. Jasna Hrenović, Prof.

Dr.sc. Mirjana Kalafatić, Prof.

Dr. Vesna Benković, Asst. Prof

Thesis accepted: January, 2012.

1. UVOD	1
1.1. Otpadne vode.....	1
1.2. Biološko uklanjanje fosfata.....	2
1.3. Fosfat-akumulirajuće bakterije.....	3
1.3.1. Rod <i>Acinetobacter</i>	4
1.3.1.1. Široka primjena roda <i>Acinetobacter</i>	5
1.4. Crvenica.....	7
1.5. Cilj istraživanja.....	9
2. MATERIJALI I METODE	10
2.1. Materijali.....	10
2.1.1. Bakterijska kultura.....	10
2.1.2. Sintetska otpadna voda.....	10
2.1.3. Crvenica.....	11
2.2. Eksperimentalne metode.....	14
2.2.1. Dizajn pokusa.....	14
2.3. Analitičke metode.....	15
2.3.1. Mjerenje koncentracije fosfata i pH vrijednosti.....	15
2.4. Određivanje broja bakterija.....	16
2.4.1. Određivanje broja slobodnih bakterija.....	16
2.4.2. Određivanje broja imobiliziranih bakterija.....	17
2.5. Izračuni.....	18
3. REZULTATI	19
4. RASPRAVA	21
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24

1. UVOD

1.1. Otpadne vode

Otpadne vode po svom porijeklu dijelimo u četiri kategorije: sanitarne (fekalne), industrijske, atmosferske, infiltracijske. Fekalne otpadne vode nastaju u stambenim, javnim, industrijskim i drugim objektima gdje žive i rade ljudi. U ove vode ubrajamo i otpadne vode od čišćenja prostorija, spremanja hrane, pranja posuđa i rublja i sl. Količina sanitarnih otpadnih voda ovisi o specifičnoj potrošnji vode pa je jednaka ili manja od nje, otprilike 10%. Industrijske otpadne vode nastaju u industrijama i industrijskim pogonima nakon upotrebe vode u procesu proizvodnje, kao i prilikom pranja aparata, uređaja i dr. Količina i kvaliteta industrijskih otpadnih voda ovise o tehnološkim procesima proizvodnje i mijenjaju se tijekom dana, što je manje izraženo kod sanitarnih (fekalnih) voda. Atmosferske otpadne vode se formiraju kao površinski otjecaj od padalina i otopljenog snijega sa urbanog područja. U ove vode se ubrajaju i otpadne vode od pranja uličnih površina. Količina i kvaliteta ovih voda ovisi o intenzitetu i učestalosti padalina, prometu, zagađenju atmosfere, klimatskim uvjetima i sl. Praksa je da se ove vode ne pročišćavaju, jer se smatraju uvjetno čistima, što ponekad nije tako. Infiltracijske vode su podzemne vode koje dotječu u kanalizacijsku mrežu preko cijevnih spojeva, drenažnih sustava i sl. Po svojoj kvaliteti su najčišće, međutim, u većim količinama, kad razrijede sanitarne vode, mogu poremetiti biološko pročišćavanje na postrojenjima (CEE, 2011).

Zagađenje voda predstavlja najkompleksniji globalni problem. Svako zagađenje koje se emitira u životnu sredinu dospjeva do podzemnih voda, rijeka, jezera i mora.

Velike količine organske tvari koja otpadnim vodama dospjeva do rijeka, jezera i mora izaziva proces eutrofikacije. Kod eutrofikacije dolazi do cvjetanja cijanobakterija i algi što je posljedica zagađenja - nutrijentima kao što su fosfor i dušik. Ti se nutrijenti deponiraju u količinama čije koncentracije premašuju koncentracije koje su potrebne za rast tih fotosintetskih organizama (Conley, 2000). Fosfor koji se nakuplja u obliku fosfata i polifosfata (P, poli-P) smatra se većim problemom jer je većina cijanobakterija sposobna zadovoljiti svoje potrebe za dušikom fiksirajući atmosferski dušik (Kortsee i sur. 1994). Pretjerani unos fosfora u vodene medije doprinosi povećanu primarne produkcije. Eutrofikacija uzrokuje nastanak anaerobnih uvjeta koji su rezultat cijelog niza reakcija koje proizlaze jedna iz druge: smanjuje se prozirnost vode što uzrokuje smanjenje fotosinteze, to

dovodi do manjka kisika dobivenog fotosintezom što rezultira odumiranjem algi, a razgradnjom odumrle organske tvari iscrpljuje se kisik što u konačnici dovodi do anaerobnih uvjeta. Kao posljedica svega nabrojanog dolazi do masovnog ugibanja aerobnih organizama. Uklanjanje P iz otpadnih voda može se vršiti fizikalno-kemijskim i biološkim postupcima. Prije svega značajna je kontrola unosa P koja predstavlja ključnu strategiju u kontroliranju eutrofikacije.

1.2. Biološko uklanjanje fosfata

Kao što je već spomenuto ključnu ulogu u kontroli eutrofikacije danas predstavlja kontrola unosa P u otpadne vode. Ona se provodi već u samom nastanku otpadnih voda na način da se smanjuje prisutnost P u deterdžentima, sredstvima za pranje i sl. ili se P iz otpadnih voda uklanjaju biološkim ili kemijskim putem prije samog ispuštanja u vodene ekosustave. Većina pročišćivača koristi se konvencionalnim metodama koje uključuju korištenje kemikalija u procesu pročišćavanja premda se u zadnje vrijeme kako raste ekološka svijest pojedinca, a tako i zajednice, sve više pribjegava korištenju bioloških metoda. Kemijske metode pokazuju sve više nedostataka jer u svojim procesima sadržavaju produkte koji svojim prisustvom djeluju štetno na okoliš, dok sanacija i daljna obrada kao takva iziskuju visoke troškove. Biološki procesi zbog svoje učinkovitosti i ekonomičnosti danas su najoptimalnija metoda uklanjanja P. Danas se u obradi otpadnih voda najčešće koriste aerobni biološki procesi u obliku bioloških filtracija (Karamanev i sur. 1994) i aeriranih laguna (Steinmann i sur. 2003).

Postupci temeljeni na biološkom mehanizmu uklanjanja fosfora poznati pod nazivom „poboljšano biološko uklanjanje fosfora“ (eng. Enhanced Biological Phosphorus Removal – EBPR) pokazali su se kao najučinkovitiji. EBPR se temelji na sposobnosti nekih vrsta bakterija, takozvanih P-akumulirajućih bakterija, da u naizmjeničnim aerobnim i anaerobnim uvjetima iz otpadnih voda uzimaju i akumuliraju veće količine P od onih koje su im potrebne za normalan rast i metabolizam. U postrojenjima sa aktivnim muljem postoje dvije osnovne metode uklanjanja fosfora, a to su prije spomenuti EBPR i asimilacija. EBPR je dakle postupak kojim se uklanjanje P postiže akumulacijom P. P se u bakterijskim stanicama akumulira u obliku poli-P granula (Harold 1966). Poli-P je polianionski polimer koji se sastoji od mnogo ortofosfatnih monomera povezanih fosfoanhidridnim vezama visoke energije. Stupanj polimerizacije ovisi o sastavu mikrobne populacije. Sve stanice sadrže poli-P što upućuje da je neophodan za funkcioniranje same stanice (Kortsee, 1994). Poli-P

nalazimo u obliku unutarstaničnih granula (različitih kod prokariota i eukariota) koje se metilenskim ili toluidinskim plavilom boje u ružičasto pa ih nazivamo metakromatske, a također se mogu bojati i diamin fenol indolom. Premda se bojaju njihova organizacija unutar stanice još uvijek nije dovoljno jasna pa postoje tvrdnje da se poli-Pi nalaze u citoplazmi i u asocijaciji sa unutarstaničnim membranama (Hill i sur. 1989, Mino 1985) ili pak da se nalaze u kompleksu s proteinima, DNA i RNA (Bond i sur. 1999, Kornberg i sur. 1999). Danas se smatra ako P-akumulirajuće bakterije u mulju sadrže različite populacije tada svaka od njih različito skladišti poli-P. Prosječno uklanjanje P iz otpadne vode ovisi o kapacitetu soja P-akumulirajućih bakterija da unutarstanično akumuliraju P i o brojnosti tog soja u aktivnom mulju (Hrenović 2011).

Asimilacija se temelji na ugradnji fosfora u biomasu organizama (mikroorganizmi, biljke, životinje) međutim nakon ugradnje biomasa se mora ukloniti jer njenim raspadanjem bi se ponovno oslobađao fosfor, stoga se toj metodi ne pridaje veliki značaj i ona se provodi uglavnom na manjim vodenim površinama. To ne vrijedi za P-akumulirajuće bakterije jer se one prirodno nalaze u tim ekosustavima.

1.3. P-akumulirajuće bakterije

EBPR, biološka je alternativa kemijskoj precipitaciji fosfora i temelji se, kako je već spomenuto, na aktivnosti P-akumulirajućih bakterija, točnije na obogaćivanju aktivnog mulja P-akumulirajućim bakterijama. P-akumulirajuće bakterije nazivaju se još i P-uklanjajuće ili poli-P bakterije i prirodno ih nalazimo u visoko opterećenim otpadnim vodama. Te bakterije su specifične i razlikuju se od svih drugih P-akumulirajućih organizama (biljke, plankton) po tome što imaju sposobnost korištenja jednostavnih ugljikovih spojeva (kao izvor energije) i to bez prisutnosti vanjskih elektron akceptora (kao što su kisik ili nitrati), a to sve čine generirajući energiju iz unutarstanično pohranjenih P i glikogena te uzimajući P iz ekosustava u kojem se nalaze (Seviour i sur. 2003). Upravo zbog tih svojstava su pogodne za primjenu u uređajima za pročišćavanje. P-akumulirajućim bakterijama pripadaju različite filogenetske i taksonomske skupine bakterija (Mino 2000). U uređajima sa EBPR tretmanom i u aktivnom mulju dokazane su različite vrste P-akumulirajućih bakterija pa se tako pokazalo da sadrže α , β , γ - subklase koljena *Proteobacteria* (u koje spada rod *Acinetobacter*) i koljeno *Actinobacteria* (Sudiana i sur. 1999, Mino 2000, Mudaly i sur. 2000). Sojevi bakterija koji su sposobni akumulirati više od 10^{-12} mg P/ u stanici smatraju se P-akumulirajućim

bakterijama. Da bi se akumulacija P mogla uopće odvijati važno je da su zadovoljeni određeni uvjeti. U prvom redu to se odnosi na činjenicu da se bakterije moraju nalaziti u aerobnoj sredini s malom količinom organske tvari. Kako bi se postigla brojnost bakterijske populacije ovaj tretman je potrebno izlagati naizmjenično aerobnim i anaerobnim uvjetima. Kod anaerobnih uvjeta bakterije u stanicu transportiraju hlapive masne kiseline (acetatna, butiratna, propionatna) iz otpadnih voda i skladište ih u obliku poli-hidroksialkanoata (PHA). Korištenjem kisika u aerobnim uvjetima kataboliziraju se anaerobno dobiveni PHA. Kisik ima važnu ulogu, kao akceptor elektrona generira energiju koja je potrebna za rast stanice, nastanak i korištenje glikogena, za sintezu poli-P što u konačnici rezultira unosom P.

Otkad su bakterije roda *Acinetobacter* izolirane iz aktivnog mulja, postale su modelni organizam za EBPR tretman, a između ostalog ustanovljeno je da upravo bakterije tog roda posjeduju najveći kapacitet uklanjanja P od svih P-akumulirajućih bakterija. To je razlog zašto smo u ovom istraživanju koristili bakteriju tog roda, *Acinetobacter junii*. Osim nje P-akumulirajuće vrste izolirane iz aktivnog mulja uključuju : *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* (Carr i sur. 2003).

1.3.1. Rod *Acinetobacter*

Bakterije roda *Acinetobacter* široko su rasprostranjene u prirodi: u tlu - gdje doprinose njegovoj mineralizaciji, u vodi, u kanalizacijama (Warskow i Juni 1972). Dolaze na suhim i na vlažnim staništima, mogu se izolirati iz živih organizama, ali i sa ljudske kože (Abdel-El-Haleem, 2003). Rod *Acinetobacter* pripada razredu Gammaproteobacteria. Vrste toga roda su striktno aerobne, nepokretne, katalaza pozitivne i oksidaza negativne bakterije (Henriksen 1973, Juni 1978) koje se pod mikroskopom vide kao Gram-negativni diplokoči. Rastu na medijima poput hranjivog agara, triptikaznom sojinom agaru te ih većina pokazuje vrlo dobar rast na MacConkey-jevom agaru sa iznimkama nekih vrsta (Bergogne-Bérézin i Towner, 1996). Vrste *Acinetobacter* roda privlače sve veću pozornost zbog mogućnosti primjene u okolišu, medicini i biotehnologiji. Za neke sojeve ovog roda se zna da su uključeni u razgradnju i uklanjanje organskih i anorganskih opasnih zagađivača, kao što su: bifenili i klorirani bifenili, toluen, benzen, aminokiseline, fenoli, benzoati, nafta, fosfati i teški metali (Abdel-El-Haleem, 2003).

1.3.1.1. Široka primjena roda *Acinetobacter*

Uklanjanje P biološkim putem iz otpadnih voda je jeftinija i učinkovitija metoda u usporedbi sa kemijskom precipitacijom fosfora. Ova metoda pročišćavanja temelji se na recikliranju aktivnog mulja kroz aerobne i anaerobne zone. Metoda je također ovisna o obogaćivanju mulja P-akumulirajućim bakterijama roda *Acinetobacter*. Dokazano je da ove bakterije mogu apsorbirati i do 100mg fosfora/g suhe biomase za vrijeme aerobnih uvjeta i otpuštaju je u anaerobnim uvjetima (Timmerman 1984, van Groenestijn i sur.1989). Provedena su istraživanja koja potvrđuju da je rod *Acinetobacter* primarno odgovoran za biološko odstranjivanje P (Auling i sur.1991, Wagner i sur. 1994), međutim različita istraživanja na uređajima za pročišćavanje otpadnih voda oprečne su u tezama koje se tiču postotka zastupljenosti bakterija tog roda. Rezultati određenog istraživanja su tako pokazali da je od ukupne populacije bakterija izoliranih iz aktivnog mulja 90% pripadalo bakterijama roda *Acinetobacter* (Wentzel i sur. 1988), dok je u drugim istraživanjima taj postotak iznosio 50-70 % (Buchan 1983, Lotter i Murphy 1985, Beacham i sur.1990) ili čak manje od 9% (Mudaly i sur. 2000). Bez obzira što su *Acinetobacter* spp. zastupljene u jako malom do neznatnom postotku važna je činjenica da je njihov kapacitet da unutarstanično akumuliraju P bio najveći od svih bakterija izoliranih iz aktivnog mulja (Sidat i sur. 1999).

Fuhs i Chen (1975) zaključili su da su bakterije roda *Acinetobacter* glavni posrednici u procesu uklanjanja fosfora na način da akumuliraju fosfor u obliku poli-P i poli- β -hidroksibutirata (PHB). Također su nagađali da uskladišteni PHB služi kao izvor energije i ugljika što se u konačnici pokazalo točnim (Nicholls i Osborn 1979). Većina izolata nije bila u stanju reducirati nitrata. To su naime obilježja koja su poželjna kod organizama odgovornih za EBPR. Iz različitih uređaja sa EBPR ili bez njega najčešća izolirana vrsta je bila *Acinetobacter jonsonii* (Kim i sur. 1997).

Kao što je već spomenuto vrste roda *Acinetobacter* su striktno aerobne pa kako prolaze izmjenično aerobno/anaerobne uvjete, podvrgnute su stresu i u takvim uvjetima pokazuju povećanu akumulaciju fosfora u stanicama. Kisik im služi kao akceptor elektrona za kataboliziranje PHA, ali u nedostatku istoga hidrolizom uskladištenog poli-P dobivaju energiju za sintezu PHA. Zbog te činjenice bakterije ovog roda nisu prisiljene na kompeticiju s drugim vrstama u aktivnom mulju te u uređajima za pročišćavanje (Nicholls i Osborn 1979).

Danas dostupne spoznaje ukazuju da mnogi sojevi *Acinetobacter* roda akumuliraju P korištenjem hlapivih masnih kiselina kao što su acetatna, butiratna, izobutiratna, propionatna. Po jednom od istraživanja Rustriana i sur. (1996) najbolja stopa unosa fosfora postignuta je butiratom kiselinom koje su dvije vrste roda *Acinetobacter* koristile kao izvor ugljika.

Rod *Acinetobacter* ima značajnu ulogu u uklanjanju teških metala što je dokazano u istraživanjima Boswella i sur. (2001) gdje je vrsta roda *Acinetobacter* korištena u uklanjanju lantana iz otopine precipitacijom lantan P. Dodavanjem lantana u anaerobnu komoru za vrijeme recikliranja uzrokovalo je uklanjanje čak 95% lantana iz 0.1 mM otopine.

Vrsta *Acinetobacter baumannii* između ostalog pokazala se kao potencijalni „čistač“ otpadnih voda zagađenih niklom, doduše taj tretman bi se mogao provoditi jedino kad bi se nikal pojavljivao u visokim koncentracijama ranga mg/L (Rodriguez i sur. 2006).

Klasične metode koje se koriste fizičkim ili kemijskim procesima u izrazito skupe i dugotrajne pa se u skladu s tim danas sve više inzistira na bioremedijaciji. To je proces u kojem se djelovanjem mikroorganizama postiže konverzija opasnih i toksičnih zagađivača u oblike koji su manje toksični ili potpuno netoksični (Adams i Ribbons 1988), a u tu svrhu se koriste i bakterije roda *Acinetobacter* jer je utvrđeno da su sposobne razgraditi široki spektar organskih i anorganskih spojeva.

Benzen, toluen, fenol, stiren su ksenobiotički zagađivači koji se često prisutni u otpadnim vodama. Njihova prisutnost je ipak najčešće obilježena malim koncentracijama, dok ih u većim koncentracijama nalazimo u blizini napuštenih industrijskih postrojenja. Njihova sanacija je teška, skupa i dugotrajna jer se radi o visoko toksičnim spojevima.

Velik broj istraživanja bio je usredotočen na bioremedijaciju fenola aktivnošću mikroorganizama. Među njima se nalaze sojevi *Acinetobacter* roda koji mogu koristiti fenol kao izvor energije i ugljika (Briganti i sur.1997). Neki od spojeva kao npr. 4-hidroksimandelična i 4-hidroksi-3-metoksimandelična kiselina (Rusansky i sur. 1987), 4-klorobenzoat (Adriaens i Focht, 1991), 4-hidroksibenzoat (Allende i sur. 2000) se također mogu metabolizirati u odgovarajuće benzoate koje koriste vrste roda *Acinetobacter*.

Opaženo je da su *Acinetobacter* sojevi sposobni iskorištavati i bifenile, pa je tako od ispitivanih 36 čistih izomera polikloriranih bifenila, 33 su bili metabolizirani bakterijama soja P6 (Singer i sur.1985) dok su neki sojevi izolirani iz miješanih kultura bili uspješni u potpunoj mineralizaciji monohalogeniranih bifenila (Schields i sur. 1985). Dokazano je da sudjeluju u

razgradnji aminokiselina (Kim i sur.2001) te su uspješni razgrađivači ulja (Rusansky i sur.1987). Široka primjena roda *Acinetobacter* razvidna je u sintezi bioemulzifikatora (Rosenberg i Ron 1998), amfipatskih molekula koje služe za stabilizaciju emulzija. Neki sojevi se koriste za proizvodnju polisaharida. U relativno skorije vrijeme uspješno je i konstruiran bioluminiscentni soj *Acinetobacter* sp. DF4 u službi detekcije fenola (Abd-El-Haleem i sur. 2002b). Taj soj u prisutnosti fenola pri koncentraciji 5,0 do 100 ppm proizvodi bioluminiscirajući odgovor jer je bakterijska stanica genetički dizajnirana da producira signal kao odgovor na prisutnost specifične kemikalije.

1.4. Crvenica

Crvenica je naziv za crvena rezidualna tla, posebice raširena u području krša oko Mediterana. Smatra se da je crvenica tip reliktnog tla nastala u toplijim klimatskim uvjetima od današnjih, točnije od od miocena do kasnog pleistocena zbog velikih klimatskih fluktuacija u tim periodima (Atalay 1998). U geološkom smislu crvenica je naziv za crvenkasta, smeđe-crvena i crvenonarančasta glinovito-prašinstva koja pokrivaju vapnence i dolomite. Karakteristična crvenkasta obojenost potječe od amorfnih željeznih hidroksida (Slika 1). Većina autora smatra da je crvenica nastala je u procesu okršavanja iz netopivog ostatka karbonatnih stijena (Tućan, 1912; Kišpatić, 1912; Kubić, 1953; Marić, 1964; Ćirić i Aleksandrović 1959; Plaster i Sherwood 1971; Škorić 1979, 1987; Bron-Ger i sur. 1983; Moresi i Mongelli, 1988). Kao i većina glinenih tla crvenica ima dobra drenažna svojstva, stoga je povoljna za uzgoj vinove loze i voća.



Slika 1. Crvenica

U specifičnoj zemlji crvenici ima različitih mineralnih faza: kvarc, kalcit, kaolinit i hematit. Hrenović i sur. (2005) u svom su istraživanju između ostalog ispitivali kvarc kao prirodni nosač bakterije *Acinetobacter calcoaceticus*. Rezultati su pokazali da je broj imobiliziranih bakterija bio veći na uzorku manjih veličinskih frakcija (manjih od 0,25mm) premda se glatka površina kvarcnog pijeska ne karakterizira kao idealno mikrostanište za apsorpciju bakterija. Usprkos tome kvarc se može uspješno koristiti za imobilizaciju P-akumulirajućih bakterija i služiti kao alternativa komercijalnim sintetičkim nosačima.

Bissett i sur. (2011) godine proveli su seriju pokusa kako bi istražili moguću ulogu bakterija u otapanju biogenog karbonata koristeći praživotinje krednjake (*Foraminifera*) i školjke kamenice. Njihove kućice ili skeleti izgrađeni su upravo od kalcita, minerala građenog od kalcijevog karbonata. Unatoč brzom i gustom kolonizaciji bakterija na površinu uzoraka, mikrosenzorima nije zabilježen gubitak Ca^{2+} . Rezultati su pokazali da otapanje nije izazvano mikrobiološkim utjecajem odnosno bakterijska kolonizacija nije imala nikakav utjecaj na otapanje. Kako bi se ubrzao rast mikroorganizama u medij je dodavan i ekstrakt kvasca za kojeg se pretpostavljalo da je spriječio otapanje kalcita. Ta pretpostavka nije bila uvijek jer otapanje kalcita nije bilo zabilježeno ni u mediju sa malo nutrijenata.

Ohnuki i sur. (2005) godine radili su na međudjelovanju urana sa bakterijama i kaolinitnom glinom. Korištena bakterija *Bacillus subtilis* bila je suspendirana u kaši kaolinitne gline. Premda je cilj istraživanja bio razjasniti ulogu bakterije na pokretljivost urana, nigdje nije navedeno nikakvo štetno međudjelovanje bakterija i kaolinita.

Ojeda i sur. (2008) su došli do zaključka kako površinski kemizmi bakterije utječu na prijanjanje bakterijske stanice na površinu minerala. Mineralni nosač u njihovom istraživanju bio je hematit, a bakterija *Pseudomonas putida*. Adhezija bakterije na čvrstu površinu materijala nije posredovana samo elektrostatskim interakcijama i van der Waals-ovim silama već i direktnim vezivanjem staničnih površina makromolekula na funkcionalne skupine mineralne površine.

Kako niti jedan od minerala koji čine crvenicu nije toksičan za bakterije tj. nema baktericidno djelovanje to nas navodi na zaključak da je crvenica pogodna kao nosač za bakterije.

1.5. Cilj istraživanja

Problem otpadnih voda danas je jedan od ključnih zagađenja u okolišu te se u tom smislu EBPR tretman se nameće kao najučinkovitija metoda uklanjanja P. Poli-P ili P-akumulirajuće bakterije su od osobite važnosti jer se na njima zasniva biološko pročišćavanje otpadnih voda pri čemu se imobilizacijom na mineralne nosače postiže što veća koncentracija bakterijskih stanica.

Cilj ovog istraživanja je bilo utvrditi u kojoj količini P-akumulirajuća bakterija *A. junii* uklanja P iz otpadnih voda te kolika je sposobnost crvenice na uklanjanje P iz otpadnih voda. U konačnici, utvrđivali smo međuodnos crvenice kao mineralnog nosača (i) spomenute bakterije na uklanjanje P iz otpadnih voda.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Bakterijska kultura

Liofilizirana kultura P-akumulirajuće bakterije *A. junii* soj DSM 1532 dobivena je iz Deutsche Sammlung von Microorganismem und Zellkulturen GmbH banke mikroorganizama. Soj je odrađavan na hranjivog agaru (Biolife, Italija), mjesečno precjepljivan i čuvan na 4°C (Slika 2.). Sastav hranjivog agara: 15,0 g agara, 5,0 g peptona, 3,0 g goveđeg ekstrakta, 1L destilirane vode. Prije sterilizacije autoklaviranjem (121°C/15min) pH vrijednost medija je namještena na neutralni pH 7,0±0,2.



Slika 2. Kolonije *A. junii* na hranjivom agaru nakon 24 h inkubacije

2.1.2. Sintetska otpadna voda

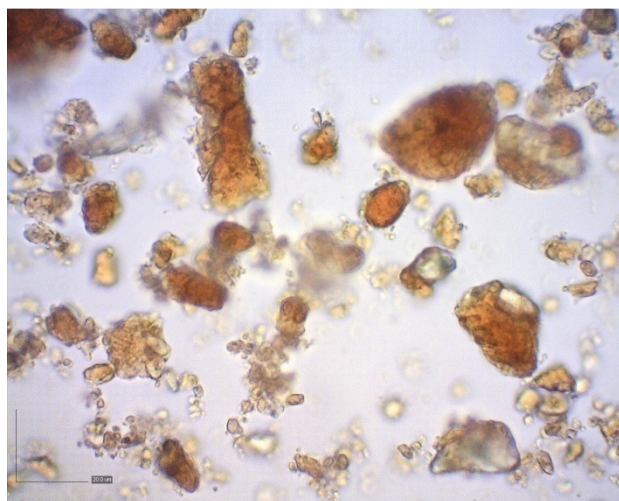
Kao zamjena za realnu otpadnu vodu korištena je kemijski pripremljena vodena otopina sljedećeg sastava (u mg/L destilirane vode): Na- propionat 300; pepton 100; MgSO₄ 10; CaCl₂ 6; KCl 30; ekstrakt kvasca 20; KH₂PO₄ 88. pH sintetske vode je podešen na 7,00 ±0,04 s 1 M NaOH ili 1 M HCl prije autoklaviranja (121°C/15 min). pH je izmjeren WTW 330 pH metrom.

2.1.3. Crvenica

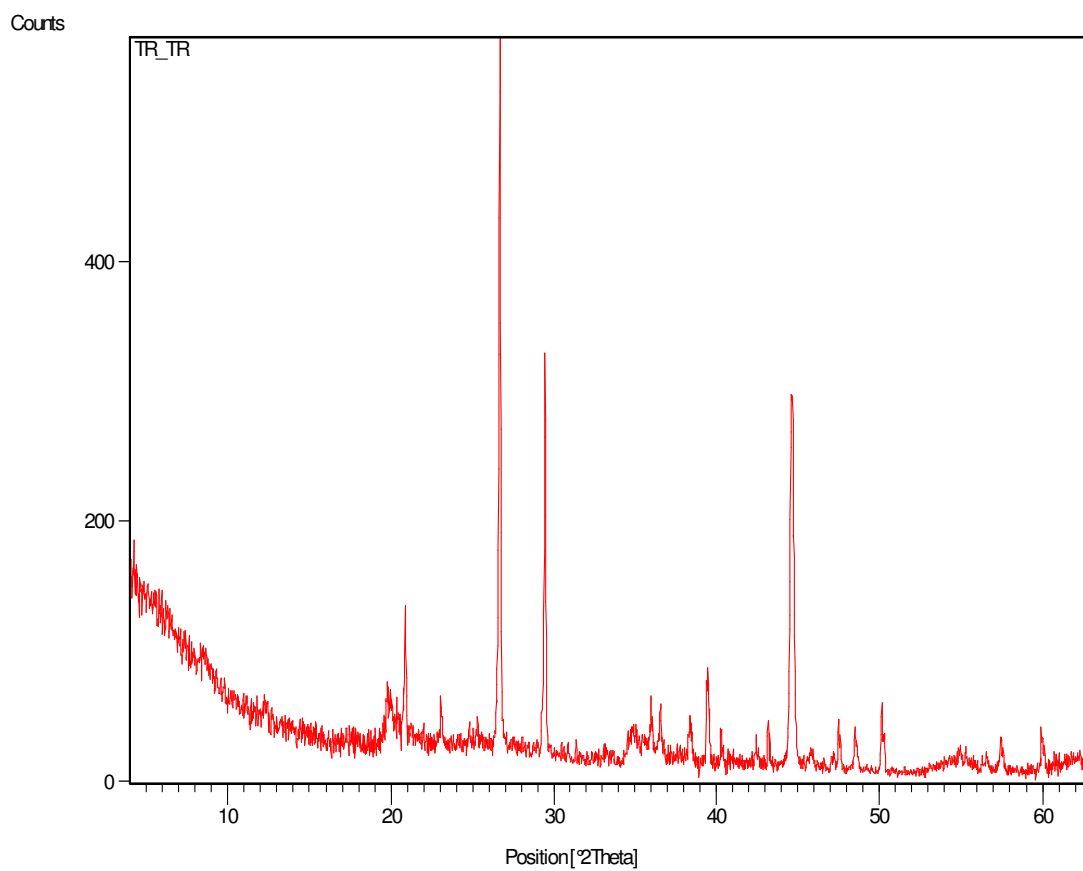
U ovom istraživanju korištena su 4 uzorka crvenice od kojih je uzorak 1 bio iz Izmir (Turska), a ostala 3 iz Istre te su dubine sa kojih su uzeti vidljivi u Tablici 1. Svi uzorci imali su jednaku veličinsku frakciju, manju od 125 μ m. Kvalitativna fazna analiza provedena je metodom difrakcije rentgenskih zraka na praškastim uzorcima na Philipsovom vertikalnom rentgenskom goniometru (tip X-Pert), uz upotrebu Cu-cijevi (40 kV i 40 mA) čije je zračenje monokromatizirano grafitnim monokromatorom. Rezultati pokazuju da su glavni sastojci kvarc i kalcit, a u manjem postotku pojavljuju se i kaolinit i hematit. U tragovima su možebitno prisutni anatas i pirit. Kako crvenica izgleda pod mikroskopskim uvećanjem od 400X razvidno je iz slike (Slika 3). Rentgenska analiza crvenice iz Izmir vidljiva je slici (Slika 4), a mineralni sastav u Tablici 2.

Tablica 1. Uzorci crvenice

Uzorak crvenice	Porijeklo	Dubina (m)
1	Izmir (Turska)	0,1- 0,3
2	Istra	0,1- 0,3
3	Istra	1,05-1,3
4	Istra	1,12- 1,5



Slika 3. Crvenica pod mikroskopskim uvećanjem od 400X



Slika 4. Rentgenska analiza crvenice iz Izmira (Turska)

Tablica 2. Mineralni sastav crvenice iz Izmir (Turska)

Pozicija [°2 θ .]	d-razmak [Å]	Rel. Int. [%]	Pripadnost
12,2779	7,20907	6,84	Kaolinit
19,8767	4,46691	6,26	Kaolinit
20,3713	4,35956	8,11	Kaolinit
20,8862	4,25323	19,60	Kvarc
21,2520	4,18085	5,53	Kaolinit
23,0755	3,85442	6,03	kalcit; kaolinit
24,7731	3,59401	6,25	Kaolinit
25,2928	3,52132	7,84	anatas?
26,6617	3,34356	100,00	Kvarc
29,4316	3,03489	60,26	Kalcit
33,2240	2,69663	0,59	Hematit
34,8891	2,56950	3,47	Kaolinit
35,5019	2,52866	6,18	kaolinit; hematite
36,0177	2,49362	7,36	kalcit; kaolinit
36,5828	2,45639	7,85	Kvarc
38,4603	2,34069	4,86	kaolinit; nosač uzorka
39,4611	2,28360	12,06	kvarc; kalcit; kaolinit
40,3458	2,23555	3,43	kvarc; kaolinit
42,4929	2,12743	1,63	kvarc; kaolinit
43,1765	2,09531	6,83	kalcit; kaolinit
44,5869	2,03226	45,97	nosač uzorka
45,8161	1,98055	3,08	kvarc; kaolinit
47,0774	1,93039	2,17	kalcit; kaolinit
47,4889	1,91462	7,46	Kalcit
48,5251	1,87613	5,23	Kalcit
50,1572	1,81734	9,41	Kvarc
54,9450	1,66976	3,80	kvarc; kaolinit
55,3254	1,65918	1,99	kvarc; kaolinit
56,3064	1,63258	1,45	pirit?
56,5666	1,62568	2,36	kalcit; kaolinit
57,4917	1,60170	3,59	Kalcit
59,9627	1,54147	5,25	kvarc; kaolinit
62,1921	1,49146	1,99	Kaolinit

2.2. Eksperimentalne metode

2.2.1. Dizajn pokusa

Bakterije uzgojene na neselektivnoj hranjivoj podlozi-hranjivom agaru (Biolife, Italy) suspendirali smo u 0,05M sterilne otopine natrijeva klorida i inokulirali po 1 mL u Erlenmeyerove tikvice u kojima je bilo pripremljeno 100 mL otopine sintetske vode. Uz *A. junii* u svaku od tikvica smo dodali po 1g odabranog materijala steriliziranog autoklaviranjem (121°C/15min). Tikvice smo zatim začepili plastičnom folijom i inkubirali u vodenoj kupelji Memmert WNB (Slika 5) na 30°C kroz 24 sata uz konstantno mješanje od 70 rpm. Za dovod sterilnog zraka koristili smo akvarijske pumpe na koje smo pričvrstili serološke pipete (1L zraka/min). Kako bismo ustanovili postotak uklanjanja P od strane same crvenice, isti postupak smo napravili bez dodavanja bakterija.



Slika 5. Memmert WNB vodena kupelj s mješalicom

2.3. Analitičke metode

2.3.1. Mjerenje koncentracije fosfata i pH vrijednosti

Koncentraciju P u sintetskoj vodi izmjerili smo spektrofotometrijski u DR/2500 Hach spektrofotometru koristeći molibdovanat metodu (Hach metoda 8114, Slika 6). Uzimali smo po 10 mL otopine sintetske vode iz svake od Erlenmeyerovih tikvica te 1 mL reagensa uz nadopunu do 25 mL destiliranom vodom u svakoj kivetu spektrofotometra. Prva proba je slijepa od samo destilirane vode. Na spektrofotometru smo očitavali mg/L P-PO₄ pri čemu se nakon dodatka molibdovanatnog reagensa razvila žuta boja koja je proporcionalna koncentraciji P. Koncentraciju P smo direktno očitavali u mg/L. Početna vrijednost pH izmjerena je posebno za svaki uzorak WTW 330 pH metrom.

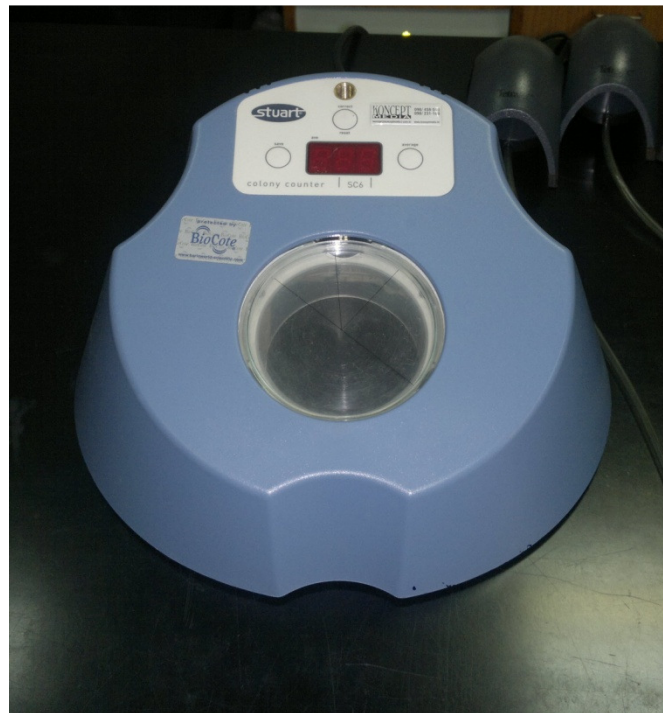


Slika 6. DR/2500 Hach spektrofotometar

2.4. Određivanje broja bakterija

2.4.1. Određivanje broja slobodnih bakterija

Uzorak od 1 mL supernatanta iz svake od Erlenmeyerovih tikvica sa sintetskom vodom i odabranim materijalom serijski smo razrijedili od 10^{-1} do 10^{-7} . Metodom širenja razmaza (spread plate method) inokulirali smo 0,1 mL na hranjivi agar. Nakon inkubacije od 24 sata na 30°C prebrojali smo bakterijske kolonije i preračunali ih u broj jedinica koje formiraju kolonije (vijabilne stanice) odnosno CFU/L (CFU eng. Colony Forming Units). Ploče sa vidljivim brojem kolonija od 10-300 smo uzimali kao brojive te ih brojali uz pomoć brojača kolonija (Stuart Colony counter SC6, Slika 7).



Slika 7. Stuart Colony counter SC6 – brojač kolonija

2.4.2. Određivanje broja imobiliziranih bakterija

Nakon odvajanja supernatanta iz Erlenmeyerove tikvice, ostatak s materijalom (nosačem) prebacili smo u plastičnu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Epruvetu smo tresli 3 minute (40 Hz) na Kartell TK3S homogenizatoru (Slika 8). Tako smo odvojili imobilizirane bakterije s površine nosača (crvenica) i mobilizirali ih u supernatantu (fiziološka otopina) koji smo tad serijski razrijedili od 10^{-1} do 10^{-8} . Zatim smo inokulirali 0,1 mL na hranjivi agar metodom širenja razmaza i stavili na inkubaciju od 30 °C/24 h. Nakon inkubacije prebrojili smo bakterijske kolonije i preračunali ih u broj jedinica koje formiraju kolonije po gramu suhog materijala. Ploče sa vidljivim brojem kolonija od 10-300 smo uzimali kao brojive.

Za određivanje broja imobiliziranih bakterija materijal iz epruveti smo prebacili u petrijevke (materijal smo prikupili ispiranjem posude) i stavili sušiti u sušionik na 105°C/2 h. Nakon sušenja smo izvagali na analitičkoj vagi i preračunali u broj bakterija po gramu suhog materijala.



Slika 8. Kartell TK3S homogenizator (odvajanje imobiliziranih bakterijskih stanica sa crvenice)

2.5. Izračuni

Nakon dobivenih vrijednosti uvrštenih u tablicu, izračunali smo vrijednosti bitne za tumačenje rezultata. To su:

- ❖ količina uklonjenog P iz sintetske otpadne vode (razlika količine P prije i poslije pokusa)
- ❖ postotak uklonjenog P iz sintetske otpadne vode (dobiven omjerom količine P prije i poslije inkubacije i izraženim u postocima)
- ❖ stopa uzimanja P po bakterijskoj stanici (dobivena dijeljenjem ukupne količine uklonjenog P u sintetskoj otpadnoj vodi i ukupnim brojem bakterija u sintetskoj otpadnoj vodi)
- ❖ količina uklonjenog P po gramu materijala (vrijednost dobivena dijeljenjem količine uklonjenog P iz sintetske otpadne vode s ukupnom količinom materijala u pokusu)
- ❖ ukupni broj bakterija (CFU/L) (dobiven zbrojem CFU/L slobodnih i CFU/L imobiliziranih bakterija)
- ❖ broj imobiliziranih bakterija (CFU/g materijala) preračunat s točnom količinom materijala nakon mjerenja broja imobiliziranih bakterija

3. REZULTATI

Nakon 24 h inkubacije samo crvenice i sintetske otpadne vode dobili smo rezultate prikazane u Tablici 3. Rezultati prikazuju da je uzorak 1 uklonio 26,2% P, uzorak 2 31,1 % i uzorak 3 31,0% su približno uklonili podjednaki postotak, dok je uzorak 4 uklonio 25,7% P. Iz ovoga je vidljivo da nije riječ o značajnim razlikama među postocima uklonjenog P.

Tablica 3. Koncentracija P prije i poslije inkubacije od 24 h u suspenziji sintetske otpadne vode s 1g crvenice/100 mL bez fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii*

START	1	2	3	4
C ₀ (P-PO ₄ (mg/L))	21,4	22,5	22,6	21,0
NAKON 24 h	1	2	3	4
C ₁ (P-PO ₄ (mg/L))	15,8	15,5	15,6	15,6
Uklonjeni P-PO ₄ (%)	26,2	31,1	31,0	25,7

Vrijednosti dobivene u reaktoru s crvenicom i bakterijom *A. junii* te kontrolne vrijednosti (samo *A. junii* bez crvenice) su vidljive u Tablici 4. Nakon inkubacije od 24 h vidljivo je da je koncentracija imobiliziranih bakterija za uzorak 1 bila $10,05 \times 10^9$ CFU/g što je najveća vrijednost imobiliziranih bakterija na crvenicu za razliku od uzorka 2 koji je imao $2,89 \times 10^9$ CFU/g. Broj ukupnih bakterija u reaktoru bio je približno jednaki za sve uzorke crvenice.

Stopa uklonjenog P s bakterijama iznosi redom: uzorak 1: $5,05 \times 10^{-11}$ mg P/CFU, uzorak 2: $3,81 \times 10^{-11}$ mg P/CFU, uzorak 3: $4,05 \times 10^{-11}$ mg P/CFU te uzorak 4: $2,96 \times 10^{-11}$ mg P/CFU što je također razvidno u Tablici 4. Postotak uklonjenog P (od ukupno uklonjenog P) koji otpada samo na bakterije što je ekvivalentno u gramima iznosilo je uzorak 1 55,2% (6,9 mg/L), za uzorak 2 je 40,6 % (4,8 mg/L), za uzorak 3 36,36% (4,0 mg/L), a za uzorak 4 je 52,21 % (5,9 mg/L). Od ukupno uklonjenog P najveći postotak imao je uzorak 1 i on je iznosio 55,6%, te nakon njega redom: uzorak 2 sa 55,4%, uzorak 4 sa 53,1% i uzorak 3 sa 50,0%.

Također vidimo i odnos planktonskih i imobiliziranih stanica na nosače. Vidljivo je da je na uzorak 1 imobiliziran najveći postotak P-akumulirajuće bakterije *A. junii* koji je iznosio 40,73% , dok je na uzorak 2 imobilizirano daleko manje bakterija i to 9,36% . Pri usporedbi postotaka imobiliziranih bakterija vidljiva je značajna razlika.

Uspoređujući rezultate uklanjanja P bez djelovanja bakterije *A. junii* (dodavanjem 1,0 g materijala u 100 mL sintetske otpadne vode) s rezultatima uklanjanja P s dodatkom P-akumulirajuće bakterije *A. junii* možemo reći da bakterija ima veći kapacitet uklanjanja P od same crvenice.

Tablica 4. Parametri mjereni u reaktorima s *A. junii* (kontrola), te *A. junii* s dodatkom 1g crvenice/100 mL nakon 24 sata inkubacije. C_0 CFU (10^6 /mL) = $7,99 \pm 2,10$; C_0 P-PO₄ (mg/L) = $21,9 \pm 0,6$.

PARAMETRI 24h	Kontrola	1 + <i>A. junii</i>	2 + <i>A. junii</i>	3 + <i>A. junii</i>	4 + <i>A. junii</i>
pH	6,79	7,90	7,89	7,90	7,93
PO ₄ -P (mg/L)	17,4	10,0	9,5	11,0	10,0
P ukupno uklonjeni (mg/L)	4,8	12,5	11,8	11,0	11,3
P uklonjeni samo bakterijama (mg/L)	4,8	6,9	4,8	4,0	5,9
Stopa uklanjanja P (mg P/CFU)	$7,74 \times 10^{-11}$	$2,79 \times 10^{-11}$	$1,55 \times 10^{-11}$	$1,47 \times 10^{-11}$	$1,54 \times 10^{-11}$
Uklonjeni P (%)	21,6	55,6	55,4	50,0	53,1
Planktonske bakterije (CFU/mL)	$6,20 \times 10^7$	$1,47 \times 10^8$	$2,81 \times 10^8$	$2,16 \times 10^8$	$2,84 \times 10^8$
Imobilizirane bakterije (CFU/g)	-	$10,05 \times 10^9$	$2,89 \times 10^9$	$5,61 \times 10^9$	$9,81 \times 10^9$
Planktonske stanice (%)	-	59,27	90,64	79,41	74,34
Imobilizirane stanice (%)	-	40,73	9,36	20,59	25,66
Ukupne bakterije (CFU/mL)	$6,20 \times 10^7$	$2,48 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	$2,72 \times 10^8$	$3,82 \times 10^8$
Umnažanje bakterija (CFU 24h/CFU start)	7,75	26,62	43,34	54,33	36,39

4. RASPRAVA

Nakon 24 sata sa crvenicom dio bakterija imobilizira se na nosač, a dio predstavlja slobodne planktonske bakterije nevezane za nosač. Iz dobivenih rezultata je razvidno da se broj imobiliziranih bakterija razlikuje za pojedini uzorak crvenice. Primjećujemo da se najviše bakterija imobilizirano na uzorak 1, a najmanje na uzorak 2 što je vidljivo u Tablici 5. Stopa umnažanja za pojedine uzorke govori nam da je broj bakterija u reaktorima veći nego početni. Veća koncentracija bakterijskih stanica omogućava uspješniji proces uklanjanja P. Najveća stopa umnažanja bila kod uzorka 3 a najmanja za uzorak 1.

Hrenović i sur. (2010.) su ispitivali sepiolit kao nosač P-akumulirajuće bakterije *A. junii*. Imobilizirane bakterije bile su metabolički aktivne i uklanjale su P iz sintetičke otpadne vode. Stopa uklanjanja P u kombinaciji sepiolita i *A. junii* ($5,84 \times 10^{-11}$ mgP/CFU) je bila značajno viša nego u kontrolnom reaktoru bez bakterija ($4,05 \times 10^{-11}$ mgP/CFU). Također, značajno veće uklanjanje P postignuto je u reaktorima sa sepiolitom (28%), za razliku od kontrolnog reaktora bez bakterija (17%). Dokazano je da povećana koncentracija Mg^{2+} u otpadnoj vodi povećava umnažanje *A. junii* (Hrenović i sur. 2010). Sepiolit je bogat Mg^{2+} ionima i dobar je izvor magnezija za *A. junii* koje stoga povećavaju doprinos biomasi.

U usporedbi sepiolita sa crvenicom, gledajući stope uklanjanja P možemo reći da *A. junii* u kombinaciji sa crvenicom ($1,47-2,79 \times 10^{-11}$ mgP/CFU) ima manju stopu uklanjanja P nego ista bakterija imobilizirana na sepiolit ($5,84 \times 10^{-11}$ mgP/CFU) što je također razvidno u Tablici 5. Iako je vidljivo da je stopa uklanjanja P veća za sepiolit u usporedbi sa crvenicom, nailazimo na razliku u postotku uklonjenog P. Postotak uklonjenog P u reaktorima s crvenicom varira od 50,0 do 55,6 %, dok je postotak uklonjenog P u reaktorima sa sepiolitom bio 28%. Iz ovoga je vidljivo da je crvenica u kombinaciji s imobiliziranim bakterijama *A. junii* (26,62 - 54,33 CFU 24h/CFU start) uklonila više P nego sepiolit s imobiliziranim bakterijama (6,37 CFU 24h/CFU start), a razlog tome možemo navesti veću stopu umnažanja bakterijskih stanica imobiliziranih na nosač.

U svojem istraživanju Hrenović i sur. (2009) koriste gline kao dobre nosače fosfat-akumulirajućih bakterija te su koristili bentonit kao mineralni nosač P-akumulirajuće bakterije *A. junii*. Stopa uklanjanja P u reaktoru s prirodnim bentonitom bila je $0,75 \times 10^{-10}$ mgP/CFU. Postotak uklonjenog P u reaktoru s bentonitom i imobiliziranim bakterijama *A. junii* iznosio je 31%. Broj imobiliziranih bakterija na bentonit bio je $4,79 \times 10^9$ CFU/g.

Pri usporedbi bentonita čija je stopa uklanjanja P iznosila $0,75 \times 10^{-10}$ mgP/CFU sa crvenicom kao nosačem bakterije *A. junii* možemo reći da je stopa uklanjanja P manja u kombinaciji crvenice i spomenute bakterije ($0,15 - 0,28 \times 10^{-10}$ mgP/CFU), a to je vidljivo u Tablici 5. Stopa uklanjanja P nije u skladu s postotkom uklonjenog P gdje je jedino kod bentonita (31%) uklonjeno manje P nego kod crvenice (50,0 – 55,6 %).

Također, budući da je crvenica prirodni materijal, pri usporedbi s sepiolitom i bentonitom, vidljivo je da crvenica pokazuje manje stope uklanjanja P. Međutim, razvidno je i da je postotak uklanjanja P veći kod crvenice nego kod spomenutih materijala te iz toga možemo zaključiti da je razlog tomu veća stopa umnažanja bakterijskih stanica imobiliziranih na crvenicu.

Tablica 5. Prikaz usporedbe stope uklanjanja P, uklonjenog P (%) i broja imobiliziranih bakterija *A. junii*

Materijal	Stopa uklanjanja P (10^{-11} mgP/CFU)	Uklonjeni P (%)	Broj imobiliziranih bakterija (CFU/g)	Referenca
Prirodni sepiolit	5,84	28	$4,79 \times 10^9$	Hrenović i sur. (2010)
Prirodni bentonit	7,5	31	$5,57 \times 10^9$	Hrenović i sur. (2009)
Uzorak 1	2,79	55,6	$10,05 \times 10^9$	
Uzorak 2	1,55	55,4	$2,89 \times 10^9$	
Uzorak 3	1,47	50,0	$5,61 \times 10^9$	
Uzorak 4	1,54	53,1	$9,81 \times 10^9$	

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja u kojoj količini P-akumulirajuća bakterija *A. junii* i crvenica uklanjaju fosfate iz otpadne vode te utjecaj imobiliziranih bakterija na postupak uklanjanja fosfata dolazimo do sljedećih zaključaka:

Crvenica pokazuje relativno veliki postotak uklanjanja fosfata iz otpadnih voda u prosjeku od 25%. Također, crvenica se pokazala kao dobar nosač fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* pri kojem srednja vrijednost imobiliziranih bakterija na istu iznosi $7,09 \times 10^9$ CFU/g. Iako i sama crvenica pokazuje visoki postotak uklanjanja fosfata (25,7- 31,1 %), u kombinaciji s fosfat-akumulirajućim bakterijama *A. junii* taj postotak je dvostruko veći (50,0- 55,6 %).

Zaključujemo da se crvenica može koristiti kao pogodan nosač u bioreaktorima za pročišćavanje otpadnih voda. Upotreba fosfat-akumulirajuće bakterije *A. junii* imobilizirane na crvenicu za uklanjanje fosfata ima veliku perspektivu u budućnosti.

6. LITERATURA

1. Abd-El- Haleem D. (2003). *Acinetobacter*: Environmental and biotechnological applications. African J. Biotechnol. 2:71-74
2. Abd-El-Haleem D., Ripp S., Scott C., Sayler G. (2002b). A luxCDABE-Based bioluminescent bioreporter for the detection of phenol. J. Ind: Biotechnol. 29:233-237
3. Adams D., Ribbons D. (1988). The metabolism of aromatic ring fission products by *Bacillus stearothermophilus* IC3. J. Gen. Microbiol. 134:3179-3185
4. Adriens P., Focht D. (1991). Cometabolism of 3,4-dichlorobenzoate by *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1. Appl. Environ. Microbiol. 5:173-179
5. Allende L., Gibello A., Fortun A., Mengers G., Ferrer E., Martin M. (2000). 4-Hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp. Curr. Microbiol. 40:34-39
6. Atalay I. (1998) "Paleoenvironmental Conditions of the Late Pleistocene and Early Holocene in Anatolia, Turkey" In Alsharhan A.S., Glennie K.W., Whittle G.L., and St. Kendall C.G. *Quaternary Deserts & Climatic Change: Proceedings of an International conference on Quaternary Deserts and Climatic Change at Al Ain UAE, December 9-11, 1995*. Taylor & Francis. pp. 229
7. Auling G., Pilz F., Busse H.j., Karrasch S., Streichan M., Schon G. (1991). Analysis of polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic/aerobic activated sludge system by using diaminopropane as biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. 57:3585-3592
8. Beacham A. M., Seviour R. J., Lindrea K. C., Livingston L. (1990). Genospecies diversity of *Acinetobacter* isolates obtained from a biological nutrient removal pilot plant of a modified uct configuration. Water Res. 24:23-29
9. Bergogne-Bérézin E., Towner K. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9:148-165

10. Bissett A., Neu T.R., de Beer D. (2011). Disolution of calcite in the twilight zone : Bacterial control of dissolution of sinking planktonic carbonates is unlikely. Plos One. 6: e26404. doi:10.1371/journal.pone.0026404

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

12. Boswell C.D., Dick R.E., Eccles H., Macaskie L.E. (2001). Phosphate uptake and release by *Acinetobacter johnsonii* in continuous culture and coupling of phosphate release to heavy metal accumulation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26:333-340

13. Briganti F., Pessione E., Giunta C., Scozzofava A. (1997). Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. FEBS Lett. 416:61-64

14. Bronger A., Enslin J., Gutlich P., Spiering H. (1983). Rubification of terrae rossae in Slovakia: a Mösbauer effect study.– Clays Clay Miner. 31: 269–276

15. Buchan L. (1983). Possible biological mechanism of phosphorus removal. Water Sci. Techol. 15:87-103

16. Carr E.L., Kampfer P., Patel B.K.C., Gurtler V., Seviour R.J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:953-963

17. Conley D.J. (2000). Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management strategies. Hydrobiologia 410:87-96

18. Ćirić M., Aleksandrović D. (1959). A view on the genesis of terra rossa.– Zbornik radova Poljoprivrednog fakulteta, 7:1–12, Beograd.

19. Fuhs G. W., Chen M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbiol. Ecology*. 2:119-138
20. Harold F.M. (1966). Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism and function. *Bacteriol.Rev.* 30:772-794
21. Henriksen S.D. (1973). *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.* 37:522-561
22. Hill W.E., Beneceld L.D., Jing S.R. (1989). ³¹P_NMR spectroscopy characterization of polyphosphates in activated sludge exhibiting enhanced phosphorus removal. *Water Res.* 23:1177-1181
23. Hrenovic J., Tibljas D., Orhan Y., Buyukgungor H. (2005). Immobilisation of *Acinetobacter calcoaceticus* using natural carriers. *Water SA*. 31:261-266
24. Hrenović J., Rozić M., Ivanković T., Farkaš A. (2009). Biosorption of phosphate from synthetic wastewater by biosolids. *Centr. Eur. J. Biol.* 4(3):397-403
25. Hrenović J., Ivanković T., Rozić M. (2010a). Requirement of *Acinetobacter junii* for magnesium, calcium and potassium ions. *J. Biosci. Bioeng.* 110:180-186
26. Hrenović J., Tibljaš D., Ivanković T., Kovačević D., Sekovanović L. (2010b). Sepiolite as carrier of the phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*. *Appl. Clay Sci.* 50:582-587
27. Hrenović J. (2011). Bacteria responsible for the biological phosphate removal from wastewater. *Hrvatske vode-časopis za vodno gospodarstvo*. 77:133-200
28. Juni E. (1978). Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Ann.Rev. Microbiol.* 32:349-371
29. Karamanev D. G., Bélanger M.-C., Chavarie C., Chaouki J., Talbot P., Mayer R. (1994). Hydrodynamic characteristics of a trickling bed of peat moss used for biofiltration of wastewater. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 72:411-417

30. Kim M. H., Hao O. J., Wang N. S. (1997). *Acinetobacter* isolates from different activated sludge processes: characteristics and neutral network identification. FEMS Microbiol.Ecol. 23:217-227
31. Kišpatić, M. (1912). Bauxites des Kroatischen Karstes und ihre Einstehung.– N. Jb. Min. Geol. Pal., 34:513–552.
32. Kornberg A., Rao N.N., Ault-Riche D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu. Rev. Biochem. 68:89-125
33. Kortsee G.J.J., Appeldorn K.J., Bonting C.F.C., van Niel E.W.J., van Veen H.W. (1994). Biology of phosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. FEMS Microbiol.Rev. 15:137-153
34. Kubiěna W.L. (1953). The Soils of Europe.– Thomas Murby and Co., London, 317 p.
35. Lotter L.H., Murphy M. (1985). The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge with particular reference to polyphosphate accumulation. Water SA. 11:179-184
36. Marić L. (1964). Terra Rossa u karstu Jugoslavije.– Acta geologica, 4:19–72, Zagreb.
37. 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
38. Mino T., Kawakami T., Matsuo T. (1985). Behaviour of intracellular polyphosphate in biological phosphate removal process. Water Sci. Technol. 17:11-21
39. Moresi M., Mongelli G. (1988). The relation between the terra rossa and the carbonate-free residue of the underlying limestones and dolostones in Apulia, Italy.– Clay Minerals. 23: 439–446

40. Mudaly D.D., Atkinson B.W., Bux F. (2000). 16S rRNA probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal. *Water Sci. Technol.* 43:91-98
41. Nicholls H. A., Osborn D. W. (1979). Bacterial stress: prerequisite for biological removal of phosphorus. *Journal Water Pollution Control Federat.* 51:557-569
42. Ohnuki T., Yoshida T., Ozaki T., Samadfam M., Kozai N., Yubuta K., Mitsugashira T., Kasama T., Francis A.J. (2005). Interactions of uranium with bacteria and kaolinite clay. *Chemical Geology.* 220:237-243
43. Ojeda J. J., Romero-Gonzalez J. J., Pouran H. M., Banwart S. A. (2008). In situ monitoring of the biofilm formation of *Pseudomonas putida* on hematite using flow-cell ATR-FTIR spectroscopy to investigate the formation of inner-sphere bonds between the bacteria and the mineral. *Mineralogical Magazine.* 72:101-106
44. Plaster R.W., Sherwood W.C. (1971). Bedrock weathering and residual soil formation in Central Virginia.– *Geol. Soc. Am. Bull.* 82: 2813–2826
45. Rodriguez C.E., Quesada A., Rodriguez E. (2006). Nickel biosorption by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from industrial wastewater. *Braz. J. Microbiol.* 37:465-467
46. Rosenberg E., Ron Z. (1998). Surface active polymers from the genus *Acinetobacter*, In D. L. Kaplan (ed.), *Biopolymers from renewable resources*. Springer, New York, N.Y. pp. 281-289
47. Rusansky S., Avigad R., Michaeli S., Gutnick D.L. (1987). Involvement of a plasmid in growth on and dispersion of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* RA57. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1918-1923

48. Rustrian E., Delgenes J. P., Moletta R. (1996). Effect of the volatile fatty acids on phosphate uptake parameters by pure cultures of *Acinetobacter*. Lett. in Applied Microbiol. 23:245-248
49. Seviar R.J., Mino T., Onuki M. (2003). The microbiology of phosphorus removal in activated sludge systems. FEMS Microbiol.Rev. 27:99-127
50. Shields M. S., Hooper S. W., Sayler G. S. (1985). Plasmid-mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. J. Bacteriol. 163:882-889
51. Sidat M., Bux F., Kasan H. C. (1999). Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from active sludge. Water SA. 25:175-179
52. Singer M. E, Tyler S. M., Finnerty W.R. (1985). Growth of *Acinetobacter* sp. strain HO1-N on n-hexadecanol: physiological and ultrastructural characteristics. J. Bacteriol. 162:162-169.
53. Steinmann C.R., Weinhart S., Melzer A. (2003). A combined system of lagoon and constructed wetland for an effective wastewater treatment. Water Res. 37:2035-2042
54. Sudiana L.M., Mino T., Satoh H., Nakamura K., Matsuo T. (1999). Metabolism of enhanced biological phosphorus removal and non-enhanced biological phosphorus removal sludge with acetate and glucose as carbon source. Water Sci. Technol. 39:29-35
55. Škorić A. (1979). Dvoslojni profili tla na području terra rosse u Istri.– Zemljište i biljka. 28:111–131
56. Timmerman M.W. (1984). Biological phosphorus removal in wastewater treatment. Microbiol. 1:149-152
57. Tućan, F. (1912). Terra Rossa, deren Natur and Entstehung.– Jahrbuch Min. Geol. Pal., XXXIV Beilage, 401–430

58. van Groenestijn J.W., Bentvelsen M.M., Deinema M.H., Zehnder A.J. (1989). Polyphosphate-degrading enzymes in *Acinetobacter* spp. and activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 55:219-223
59. Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., Schleifer K.H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 60:792-800
60. Warskow A.L., Juni E. (1972). Nutritional requirements of *Acinetobacter* strains isolated from soil, water, and sewage. J. Bacteriol 112:1014-1016
61. Wentzel M.C., Loewenthal R. E., Ekama G. A., Marais G. V. R. (1988). Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems-Part I:Enhanced culture development. Water Sa 14:81-92
62. CEE(2011): CEE- Centar za ekologiju i energiju
<http://ekologija.ba/index.php?w=c&id=26> ; pristupljeno 22.12.2011.