

Preživljavanje bakterije *Acinetobacter junii* imobilizirane na zeolit pri nepovoljnim vrijednostima pH

Basić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:535554>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Basić

PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE *ACINETOBACTER JUNII*
IMOBILIZIRANE NA ZEOLIT PRI NEPOVOLJNIM VRIJEDNOSTIMA pH

Diplomski rad

Zagreb, 2019. godina

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 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 svojoj mentorici, prof. Jasni Hrenović na pomoći i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada te doc. Tomislavu Ivankoviću na pomoći i savjetima u laboratorijskom radu. Veliko hvala mojoj obitelji za podršku i strpljenje tokom cijelog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PREŽIVLJAVANJE BAKTERIJE *ACINETOBACTER JUNII* IMOBILIZIRANE NA ZEOLIT PRI NEPOVOLJNIM VRIJEDNOSTIMA pH

Jelena Basić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog rada je bio istražiti i usporediti kako fosfat-akumulirajuća bakterija *Acinetobacter junii* preživljava nepovoljne vrijednosti pH u planktonskoj formi (slobodne stanice) i imobilizirana na mineralni nosač, u ovom slučaju prirodni zeolitni tuf, (biočestice), te kako to utječe na njenu sposobnost uklanjanja fosfata iz sintetske otpadne vode. Imobilizirane bakterije su bile otpornije na nepovoljne vrijednosti pH od planktonskih, a njihova stopa umnožavanja je bila značajno veća. Metaboličku aktivnost su zadržale i planktonske i imobilizirane bakterije, no postotak uklonjenog fosfata je bio veći u slučaju biočestica. Rezultati pokazuju da je prirodni zeolitni tuf obećavajući nosač fosfat-akumulirajućih bakterija u svrhu korištenja u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda.

(33 stranice, 12 slika, 1 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Acinetobacter junii*, prirodni zeolitni tuf, biočestice, fosfati, otpadna voda

Voditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Suvoditelj: Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Jasna Hrenović, red. prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Rad prihvaćen: 2.5.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

SURVIVAL OF BACTERIA *ACINETOBACTER JUNII* IMMOBILISED ON ZEOLITE AT UNFAVORABLE pH LEVELS

Jelena Basić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to determine and compare how phosphate-accumulating bacterium *Acinetobacter junii* survives unfavorable pH levels in planktonic form (free cells) and immobilised on a mineral carrier, in this case natural zeolitic tuff, (biosolids), and also how this affects the ability to remove phosphate from synthetic wastewater. Immobilised bacteria were better at withstanding unfavorable pH levels than planktonic, and their reproduction rates were significantly higher. Both planktonic and immobilised bacteria remained metabolically active, but percentage of removed phosphate was higher for biosolids. Results show that natural zeolitic tuff is a promising carrier for phosphate accumulating bacteria to be used in wastewater treatment plants.

(33 pages, 12 figures, 1 table, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: *Acinetobacter junii*, natural zeolitic tuff, biosolids, phosphate, wastewater

Supervisor: Dr. Jasna Hrenović, Prof.

Cosupervisor: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Jasna Hrenović, Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Thesis accepted: 2.5.2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. POJAČANO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFATA.....	2
1.2. UTJECAJ VRIJEDNOSTI pH NA EBPR.....	5
1.3. ULOGA POLIFOSFATA.....	6
1.4. BAKTERIJA <i>ACINETOBACTER JUNII</i>	6
1.5. IMOBILIZACIJA BAKTERIJA NA NOSAČE.....	7
1.6. PRIRODNI ZEOLITNI TUF.....	8
2. CILJ RADA	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. BAKTERIJSKA KULTURA.....	10
3.2. SINTETSKA OTPADNA VODA.....	11
3.3. PRIRODNI ZEOLITNI TUF.....	11
3.4. PRIPREMA BIOČESTICA.....	11
3.5. EKSPERIMENTALNI POSTUPAK.....	12
3.6. ANALITIČKI POSTUPCI.....	14
3.6.1. Određivanje broja bakterija.....	14
3.6.2. Mjerenje pH.....	15
3.6.3. Mjerenje koncentracije fosfata.....	16
3.6.4. Bojanje po Gramu.....	16
3.6.5. Bojanje po Neisseru.....	17
3.7. FORMULE KORIŠTENE ZA IZRAČUNAVANJE REZULTATA.....	18
4. REZULTATI	20

5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČAK	29
7. POPIS LITERATURE	30

Popis korištenih kratica:

<u>Kratica</u>	<u>Značenje</u>
CFU	broj jedinica koje formiraju kolonije (engl. <i>Colony Forming Units</i>)
EBPR	pojačano biološko uklanjanje fosfora (engl. <i>Enhanced Biological Phosphorus Removal</i>)
GAO	glikogen akumulirajući organizmi (engl. <i>Glycogen Accumulating Organisms</i>)
KPK	kemijska potrošnja kisika
P-PO₄	fosfor iz ortofosfata
PAO	fosfat akumulirajući organizmi (engl. <i>Phosphate Accumulating Organisms</i>)
PHA	poli-β-hidroksialkanoati

1. UVOD

Istraživanja provedena 60-ih godina prošlog stoljeća na Velikim jezerima na granici SAD-a i Kanade pokazala su da je povećana koncentracija fosfata, koji je tamo dospio otpadnim vodama, glavni uzrok eutrofikacije jezera koja se očituje u pretjeranom rastu vodenog bilja, algi i cijanobakterija (tzv. cvjetanje jezera), pojava dovodi do niza negativnih posljedica koje variraju od promjene boje i mirisa vode do smanjenja kisika u vodi, smanjenja biodiverziteta (pr. nestanka brojnih vrsta riba) zbog kojeg onda može doći i do lakšeg širenja invazivnih vrsta, također može doći do pojačanog rasta nekih vrsta algi i cijanobakterija koje su toksične. Kao rezultat tih istraživanja s vremenom je došlo do prestanka korištenja deterdženata koji sadrže fosfate (povećavaju učinkovitost deterdženata tako što smanjuju tvrdoću vode) (Campbell i Reece 2002).

Usporedno s tim istraživanjima razvijala se i tehnologija za uklanjanje fosfata iz otpadnih voda. Komunalne i industrijske otpadne vode, kao i vode s poljoprivrednih površina na kojima se koriste umjetna gnojiva potrebno je prije ispuštanja u vodene ekosustave pročititi. No jedan od izvora fosfata mogu biti i ispusne vode iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Konvencionalana postrojenja koja koriste aktivni mulj prvenstveno uklanjaju organske spojeve ugljika i nešto dušika dok razine fosfata ostaju visoke (Seviour i sur. 2003). Upravo zato je razvijena metoda pojačanog biološkog uklanjanja fosfata (EBPR – engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) čiji je glavni princip bioaugmentacija aktivnog mulja fosfat-akumulirajućim bakterijama. Ovu metodu moguće je poboljšati imobilizacijom fosfat-akumulirajućih bakterija na anorganske nosače čime nastaju biočestice. Time se postiže veća gustoća bakterijskih stanica, veća metabolička aktivnost i bolje preživljavanje nepovoljnih uvjeta okoliša (Ivanković i sur. 2013).

Fosfat se iz otpadnih voda može ukloniti i fizikalno-kemijskim postupcima – ionskom izmjenom, kemijskom precipitacijom i adsorpcijom, no te metode imaju dosta nedostataka kao što su visoka cijena kemikalija koje se koriste, mulj koji nastaje sadrži teške metale i štetne spojeve pa se mora dodatno tretirati i posebno zbrinjavati što također povećava troškove (Hrenović i sur. 2001).

1.1. POJAČANO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFATA

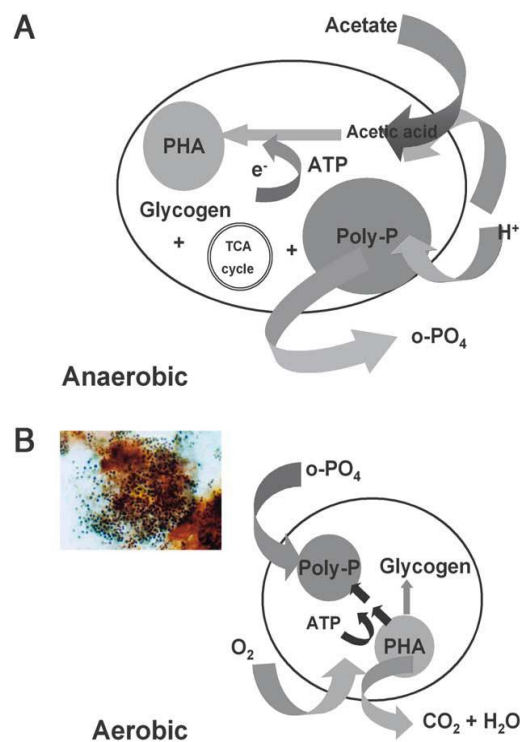
Pojačano biološko uklanjanje fosfata je proces u kojem se pomoću aktivnog mulja obogaćenog fosfat-akumulirajućim bakterijama uklanja fosfat iz otpadnih voda, odnosno fosfat se akumulira u bakterijama u obliku polifosfatnih granula, koje se nazivaju i volutinska zrnca, i to u količinama većim od normalnih metaboličkih potreba. Takvo uklanjanje fosfata su po prvi puta zabilježile dvije istraživačke grupe, neovisno jedna od druge, Srinath i sur. (1959.) u Indiji i Alarcon (1961.) u Americi, no niti jedna grupa nije objasnila kako do toga dolazi niti su razjasnili dolazi li do toga biološkim ili fizikalno/kemijskim putem. Levin i Shapiro (1965.) su dokazali biološku narav uklanjanja fosfata, a Levin je i razvio prvi komercijalni sustav nazvan PhoStrip proces, kojim se fosfat uklanja kemijskim i biološkim putem. Sustav na kojem se temelje današnji EBPR sustavi razvio je James L. Barnard 1970-ih godina u Južnoafričkoj Republici dok je nastojao poboljšati postojeći sustav za uklanjanje nitrata iz gradskih otpadnih voda. U svom istraživačkom radu otkrio je da dodavanjem anaerobnog reaktora u cijeli sustav dolazi i do uklanjanja značajne količine fosfata. Tako je razvijen Bardenpho (BARNard DENitrification and PHOosphorus removal) ili Phorodex sustav.

Svi mikroorganizmi, odnosno bakterije, koje akumuliraju više od 10^{-12} mg fosfata po stanici (Sidat i sur. 1999) nazivaju se fosfat akumulirajući organizmi ili PAO (engl. *Phosphate Accumulating Organisms*). Fuhs i Chen (1975.) su prvi napravili mikrobiološko istraživanje EBPR zajednice i kao rezultat toga predložili su rod *Acinetobacter* kao glavni, a dugo se mislilo i jedini, PAO. S vremenom su uspješno kultivirane i druge bakterije iz biomase dobivene iz EBPR postrojenja, i utvrđeno je da je sposobnost sintetiziranja unutarstaničnih poli-P granula široko rasprostranjena osobina, prisutna i kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija (Seviour i sur 2003). Neki od predloženih PAO su rodovi : *Tetrasphaera*, *Lampropedia*, *Rhodocyclus* (Seviour i sur. 2003), *Accumulibacter* (Oehmen i sur. 2007).

Prema prihvaćenom biokemijskom modelu koji objašnjava metabolizam PAO (Seviour i sur. 2003), (Slika 1.) aktivni mulj u EBPR sustavu mora proći kroz dvije faze – anaerobnu, bogatu ugljikom i aerobnu, siromašnu ugljikom. Taj "feast-famine" režim daje prednost PAO i današnji EBPR sustavi, za razliku od prvobitnih, imaju sekundarnu pa čak i tercijarnu cirkulaciju mulja kroz anaerobne/aerobne reaktore.

U anaerobnim uvjetima fosfat-akumulirajuće bakterije asimiliraju hlapljive masne kiseline s 6 ili manje C-atoma u lancu (acetatna, propionatna i sl.) i pohranjuju ih u obliku poli-hidroksi-alkanoata (PHA – pr. poli-hidroksi-butirat nastaje asimilacijom acetata). PHA služi kao zaliha energije za rast, a energija potrebna za sintezu, transport i pohranu PHA dobiva se hidrolizom polifosfata pohranjenog u stanici pri čemu dolazi do otpuštanja ortofosfata u okolni medij. Bakterije koje nisu PAO ne mogu koristiti hlapljive masne kiseline na ovaj način pa se uvođenjem anaerobne faze u EBPR sustav daje prednost PAO u odnosu na druge bakterije prisutne u aktivnom mulju.

U aerobnim uvjetima nema organskih spojeva koji bi bili izvor ugljika i energije pa se katabolizira PHA, gdje je kisik krajnji akceptor elektrona, a dobivena energija se koristi za rast, sintezu glikogena i što je najvažnije za sintezu polifosfatnih granula pri čemu se ortofosfat iz okolnog medija uzima u mnogo većim količinama nego što se otpušta u anaerobnim uvjetima.



Slika 1. Biokemijski model EBPR procesa (preuzeto iz Seviour i sur. 2003)

Glavna prednost ovakve metode, gdje se fosfat uklanja na način da se ugrađuje u biomasu koja se kasnije odvaja iz procesa, je što nema potrebe za dodatnim tretmanom mulja prije njegovog odlaganja jer on ne sadrži nikakve dodane kemikalije koje se inače koriste za precipitaciju fosfata, manji je udio teških metala, a i sama količina mulja je na kraju manja. Pokazalo se da nema nikakvih štetnih utjecaja na okoliš i cijena ovakvog načina pročišćavanja otpadnih voda je relativno niska .

Glavni nedostatak tehnologije je početni trošak izgradnje postrojenja, većina postrojenja radi nepouzdanost, često su kapaciteti rada smanjeni, a u nekim slučajevima je došlo i do propadanja cijelog sustava za pročišćavanje. Poznati su neki od uzroka koji mogu dovesti do poremećaja u radu EBPR postrojenja: prisustvo nitrata u anaerobnoj zoni (Kuba i sur. 1994), manjak kalija i/ili magnezija (Brdjanović i sur. 1996; Pattarkine i Randall 1999), pretjerana aeracija zbog pr. obilnih i jakih kiša (Brdjanović i sur. 1998), i mikroba kompeticija između PAO i glikogen-akumulirajućih bakterija (GAO - engl. *Glycogen Accumulating Organisms*), (Thomas i sur. 2003).

Prisustvo nitrata u anaerobnoj zoni je problematično jer omogućava denitrificirajućim bakterijama da iskoriste organski supstrat koji onda više nije dostupan za PAO (Seviour i sur. 2003). Iz reakcija skladištenja polifosfata (Smolders i sur. 1994a) tokom anaerobnog dijela metabolizma jasno je da su za metabolizam PAO bitni ioni kalija i magnezija, povremeni loš rad EBPR postrojenja dovodi se u vezu sa sezonskim smanjenjem koncentracije tih kationa u vodi. Manjak kalija i magnezija u otpadnoj vodi PAO mogu nadoknaditi iz nosača na koje su vezani, kao što je prirodni zeolitni tuf. Manjak kalcija u otpadnoj vodi, uz dovoljnu količinu kalija i magnezija, ne utječe negativno na rast bakterija ni na njihovu sposobnost uklanjanja fosfata, iako povećana koncentracija ima pozitivan učinak (Hrenović i sur. 2010).

Prisutnost GAO u EBPR postrojenjima predstavlja veliki problem jer u anaerobnim uvjetima često asimiliraju supstrat bolje od PAO, no u aerobnim uvjetima kada metaboliziraju PHA i sintetiziraju glikogen, pritom ne sintetiziraju polifosfate. Za određivanje dominacije PAO/GAO važan je supstrat, pH anaerobne i aerobne zone, ali i temperatura. Povećanje temperature s 20°C na 35°C dovodi do povećanja udjela GAO i smanjenja udjela PAO u aktivnom mulju, iako je značajna količina GAO prisutna i pri 20°C (Panswad i sur. 2003). Većina eksperimentalnih podataka pokazuje da temperatura od 20°C i niža pogoduje PAO, dok kod viših temperatura jača kompeticija GAO. To ukazuje na mogući problem PAO/GAO kompeticije u EBPR postrojenjima u toplim klimama i ljeti. Još jedan faktor koji utječe na

PAO/GAO kompeticiju je omjer organskog ugljika i fosfata u otpadnoj vodi ili KPK/P omjer. Kada je taj omjer visok pr. 50 mgKPK/mgP bolji rast imaju GAO (Mino i sur. 1998), dok kod niskog omjera KPK/P (10-20 mgKPK/mgP) bolji rast imaju PAO.

Za uspješno funkcioniranje EBPR sustava bitan je i supstrat koji koriste mikroorganizmi. U različitim istraživanjima korišteni su brojni spojevi i njihove mješavine (acetat, propionat, laktat, malat, citrat, piruvat, glukoza, glutamat, aspartat i brojni drugi). Utvrđeno je primjerice da korištenje glukoze kao jedinog izvora ugljika često dovodi do propadanja sustava (Cech i Hartman 1993). Acetat se često navodi kao supstrat kod kojeg su zabilježene najviše stope uklanjanja fosfata, no neka novija istraživanja pokazuju da se bolji rezultati ostvaruju korištenjem propionata (Thomas i sur. 2003; Chen i sur. 2004; Oehmen i sur. 2004; Pijuan i sur. 2004) ili čak pravilnom izmjenom između acetata i propionata kao jedinih izvora ugljika, čime se u laboratorijskim uvjetima uspjelo eliminirati GAO iz sustava (Lu i sur. 2006).

1.2. UTJECAJ VRIJEDNOSTI pH NA EBPR

Istraživanjem utjecaja pH na anaerobni i aerobni metabolizam PAO pokazalo se da anaerobni dio metabolizma, odnosno količina otpuštenog fosfata po uzetom acetatu značajno ovisi o pH (Kuba i sur. 1997; Liu i sur. 1996; Smolders i sur. 1994b), ali i da je stopa uzimanja acetata neovisna o pH u rasponu vrijednosti 6.5 do 8.5 (Filipe i sur. 2001a). Što se tiče aerobnog dijela metabolizma, utjecaj pH proučavan je za tri vrijednosti – 6.5, 7.0 i 7.5 (Filipe i sur. 2001a). Kod pH 7.0 i 7.5 stope uzimanja fosfata su bile iste, ali je zato došlo do velikog smanjenja kod pH 6.5. Za vrijeme anaerobne faze dolazi do blagog smanjenja pH zbog otpuštanja ortofosfata (iako istovremeno dolazi do uzimanja acetata i protona), dok za vrijeme aerobne faze dolazi do uzimanja ortofosfata i protona (2 mola protona se uzmu sa svakim molom fosfata) i do povećanja pH (Serralta i sur. 2004).

Osim utjecaja pH na metabolizam PAO važno je znati i njegov utjecaj na cjelokupan EBPR sustav, odnosno njegov utjecaj na GAO i određivanje dominacije PAO/GAO. Kod nižeg pH GAO imaju prednost, dok kod višeg pH (7.0 - 7.5) prevladava PAO. Za anaerobnu fazu utvrđena je kritična vrijednost pH od 7.25. Kada je pH ispod te vrijednosti GAO uzimaju hlapljive masne kiseline brže od PAO, a kada je pH iznad 7.25 dešava se obrnuti proces (Filipe i sur. 2001b). Nekoliko istraživanja je također pokazalo da se povećanjem pH anerobne i/ili aerobne faze ($s \leq 7$ na 7.5 – 8.5) postiže veće uklanjanje fosfata (Bond i sur.

1999; Jeon i sur. 2001; Schuler i Jenkins 2002; Serafim i sur. 2002) jer dolazi do promjena u sastavu mikrobne zajednice.

1.3. ULOGA POLIFOSFATA

Polifosfat je linearni polimer ortofosfata koji su povezani fosfoanhidridnom vezom bogatom energijom. Sve stanice sadrže polifosfate što ukazuje na njihovu nužnost za normalno funkcioniranje stanice. Kod PAO polifosfati su u stanici pronađeni u citoplazmi, periplazmi, povezani na unutarstanične membrane te u kompleksu sa proteinima te DNA i RNA. Različiti položaji u stanici možda ukazuju na različite stadije u sintezi polifosfata, ali je isto tako moguće da različiti PAO skladište polifosfate na različite načine (Seviour i sur. 2003).

Zbog jakog negativnog naboja polifosfat treba katione za stabilizaciju, prvenstveno magnezij i kalij, ali i kalcij. Utvrđeno je da se magnezij i kalij primaju i otpuštaju zajedno sa fosfatima, dok kod kalcija, koji je bitan za stabilizaciju polifosfata, ali ne i za anaerobno otpuštanje ortofosfata, to nije slučaj (Seviour i sur. 2003).

Neke od poznatih uloga polifosfata su: djeluju kao pufer, zamjenjuju ATP kao donor fosfatne skupine prilikom fosforilacije šećera, čine rezervu anorganskog fosfora u stanici, utječu na transkripciju i translaciju gena, djeluju kao metabolički regulatori, moduliraju odgovor na stres i čine alternativne izvore energije. Budući da vežu katione, posebno magnezij, mogu biti važan izvor magnezija kao i imati značajnu ulogu u toleranciji na teške metale, primjerice kadmij, jer ih izlučuju preko metal-fosfat transportnog sustava. Kod nekih bakterija sinteza polifosfata se dešava kao odgovor na hranidbeni i osmotski stres i služi kao signal za sintezu proteina stresa. Imaju li polifosfati tu ulogu i kod PAO nije još u potpunosti jasno, ali se zna da djeluju kao izvor energije za anaerobnu asimilaciju supstrata i sintezu PHA, a moguće je i da djeluju kao pufer u bazičnim uvjetima, odnosno njihovom razgradnjom se regulira unutarstanični pH (Seviour i sur. 2003).

1.4. BAKTERIJA *ACINETOBACTER JUNII*

Rod *Acinetobacter* svrstan je u razred *Gammaproteobacteria*, porodicu *Moraxellaceae*, spada u Gram-negativne, oksidaza negativne i katalaza pozitivne, nepokretne

obligatne aerobe. Stanice roda *Acinetobacter* su kratki bacili u logaritamskoj fazi rasta, dok se u stacionarnoj fazi pojavljuju kao koki. Do uzimanja ortofosfata i akumuliranja polifosfata dolazi kada se nalaze u lag fazi i u stacionarnoj fazi rasta, dok u log fazi akumulacije polifosfata ima vrlo malo ili ništa (Cloete i Bosch 1994).

Za vrstu *A. junii* utvrđeno je da raste u rasponu pH 5.0-8.0, te da može rasti u širokom temperaturnom rasponu (Towner 2006). Vrsta je opisana u radu Bouvet i Grimont (1986.), a ime je dobila u čast američkog bakteriologa Elliota Junia. *A. junii* je široko rasprostranjena u prirodi, nalazimo je u tlu, vodi, hrani, kanalizaciji.

Vrste roda *Acinetobacter* pa tako onda i *A. junii*, nisu dominantne u biomasi EBPR postrojenja, no čine najefikasnije vrste što se tiče akumulacije polifosfatnih granula. U nekim je slučajevima utvrđeno da čine manje od 10% ukupne bakterijske populacije (Sidat i sur. 1999), ali i taj mali postotak predstavlja količinu od nekoliko milijuna stanica po gramu suhe biomase. Iako su s vremenom otkrivene i druge vrste fosfat-akumulirajućih bakterija, vrste roda *Acinetobacter* i dalje se koriste kao glavni modelni organizmi za istraživanje EBPR-a.

Ostale fosfat-akumulirajuće vrste roda *Acinetobacter* su: *A. baumannii*, *A. bayly*, *A. bouvetii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. gimontii*, *A. lwoffii*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae* i *A. townneri* (Carr i sur. 2003). Većina ovih vrsta izolirana je iz aktivnog mulja različitih uređaja za pročišćavanje voda.

1.5. IMOBILIZACIJA BAKTERIJA NA NOSAČE

Brojna istraživanja su pokazala da se imobilizacijom PAO na različite materijale, tzv. nosače postiže veća gustoća bakterijske populacije, pojačava metabolička aktivnost i pospješuje preživljavanje perioda stresa karakterističnih za EBPR postrojenja. Imobilizacijom bakterije stvaraju biofilm, poseban omotač od izvanstaničnih polimera kojim se bakterije povezuju međusobno i za podlogu, a koji bakterijama daje i zaštitu od vanjskih čimbenika. Za imobilizaciju bakterija mogu se koristiti različiti materijali. *A. junii* je uspješno imobilizirana na gline (bentonit), perlit, i prirodni zeolit (Hrenović i sur. 2005) dok se sintetski zeolit A pokazao kao toksičan za *A. junii* (Hrenović i sur. 2007). Za imobilizaciju bakterija osim tipa čestica, najvažnija je veličina čestica nosača, što su čestice nosača veće to je manji broj imobiliziranih bakterija. Naboj površine čestica (zeta potencijal) je manje važan, a prisutnost Mg^{2+} iona na površini čestica pozitivno utječe na imobilizaciju bakterija (Hrenović i sur.

2009). Tako imobilizirane bakterije (biočestice) mogu se dodavati i uklanjati iz sustava za pročišćavanje zajedno s aktivnim muljem, čime se onda uklanja i fosfat.

1.6. PRIRODNI ZEOLITNI TUF

Zeoliti su skupina alumosilikatnih minerala karakteristične strukture sa puno šupljina i kanala u kojima se nalaze adsorpcijska voda i kationi alkalijskih i zemnoalkalijskih metala. Zbog takve strukture vrlo lako gube i primaju vodu, svojstvo zbog kojeg su i dobili ime, te lako izmjenjuju katione bez da se struktura minerala mijenja (djeluju kao ionski izmjenjivači). Osim toga djeluju i kao molekulsko sito – nakon što se ukloni voda zagrijavanjem na 350-400°C njihova mikroporozna struktura selektira molekule prema veličini. Naziv im je dao mineralog A. F. Cronstedt koji je zamijetio da naglim zagrijavanjem minerala dolazi do otpuštanja velike količine pare (grčki *zéō* = vreti i *lithos* = kamen). Tuf u nazivu znači da su vulkanskog podrijetla, nastaju na mjestima gdje vulkanske stijene i pepeo reagiraju sa lužnatom/slanom vodom (Rhodes 2010).

Primjena zeolita je mnogobrojna i raznolika. Koriste se u graditeljstvu, u petrokemijskoj industriji, u poljoprivredi i hortikulturi, kao dodatak stočnoj hrani, u akvaristici, nalaze se u sredstvima za uklanjanje vlage i neugodnih mirisa, u katalizatorima za smanjenje emisije NO_x, u aparatima za dijalizu, koriste se za pročišćavanje otpadnih voda i za uklanjanje teških metala iz vode, prilikom nuklearnih katastrofa korišteni su za uklanjanje stroncija i cezija kao npr. u Three Mile Island 1979. godine, Černobil 1986. godine, Fukushima Daiichi 2011. godine.

Klinoptilolit je jedan od najčešće primjenjivanih zeolita u pročišćavanju voda. Čestice klinoptilolita imaju negativan površinski naboj (zeta potencijal), no bakterije *A. junii* se spontano adsorbiraju na njihovu površinu u velikom broju stvarajući biofilm. Za imobilizaciju *A. junii* je i velika prednost prisustvo labavo vezanih kationa za čestice klinoptilolita (posebno K⁺ i Mg²⁺) koji su bitni za njihov metabolizam (Hrenović i sur. 2010).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je utvrditi postoje li značajne razlike u preživljavanju nepovoljnih uvjeta bakterije *A. junii* kada se nalazi u planktonskoj formi (slobodne stanice) i kada se nalazi u formi imobiliziranoj na čestice zeolita (biočestice), te kako u oba slučaja to utječe na sposobnost uklanjanja fosfata.

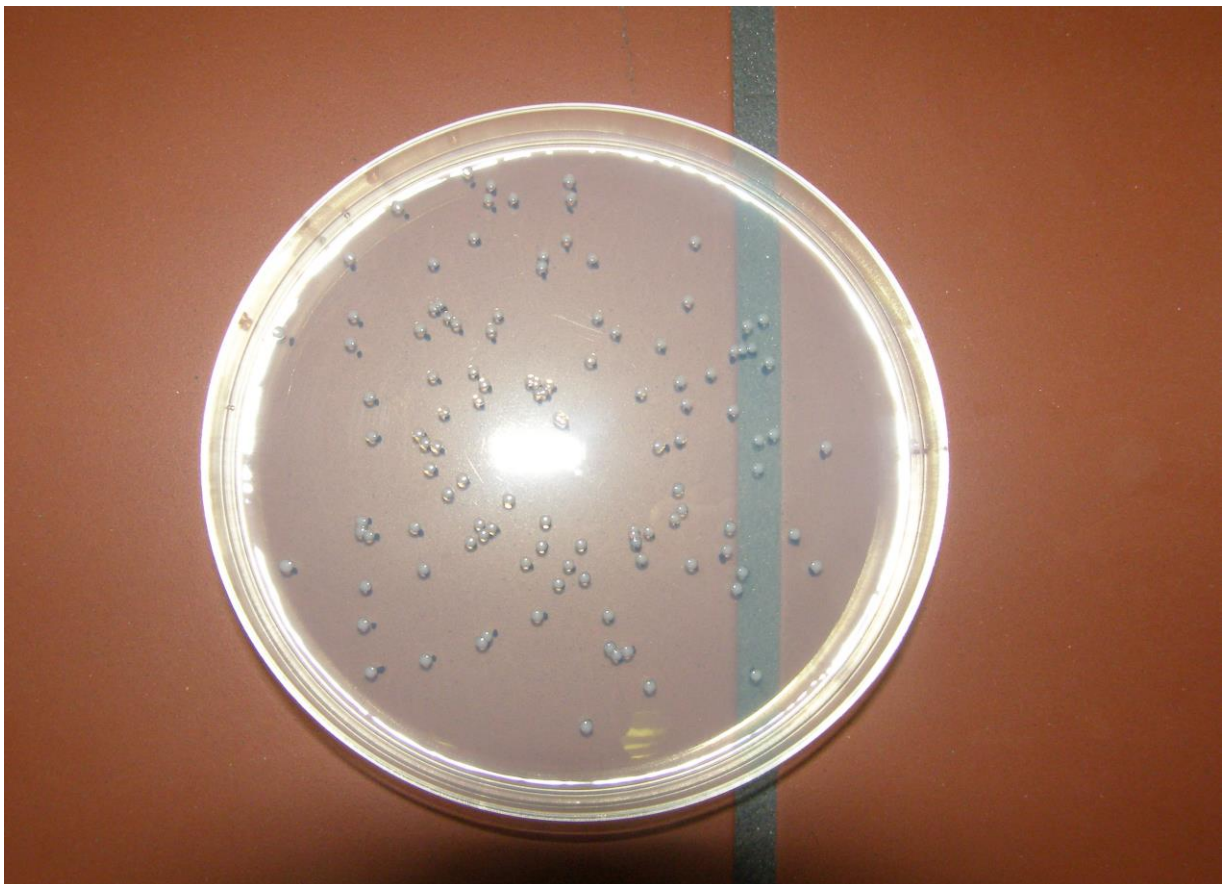
Nepovoljni uvjeti stvoreni su:

- snižavanjem pH sintetske otpadne vode na 5 ,
- povišenjem pH sintetske otpadne vode na 10 .

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BAKTERIJSKA KULTURA

U ovom pokusu korištena je Gram-negativna bakterija *Acinetobacter junii* soj DSM 1532 koja ima sposobnost uklanjanja fosfata iz otpadnih voda. Kultura *A. junii* nabavljena je iz banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH. Uzgojena je na hranjivoj podlozi (Biolife, Italija) kroz 24 h na temperaturi od $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ u termostatu (Slika 2.). Hranjivi agar se sastojao od: peptona 5.0 g, mesnog ekstrakta 3.0 g, agara 20.0 g i destilirane vode 1000 mL, a pH je bio 7.0 ± 0.02 .



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

3.2. SINTETSKA OTPADNA VODA

Sintetska otpadna voda je otopina čiji je kemijski sastav sličan pravoj otpadnoj vodi. Sastav sintetske otpadne vode korištene u ovom pokusu (u mg po 1 L destilirane vode) je: Na-propionat 300; pepton 100; MgSO₄ 10; CaCl₂ 6; KCl 30; ekstrakt kvasca 20; KH₂PO₄ 88 (Hrenović i sur. 2005). Namješten je pH na 5.0 ± 0.02 , 7.0 ± 0.02 i 10.0 ± 0.02 s 1M HCl ili 1M NaOH prije autoklaviranja (121°C/15 minuta). Sve korištene kemikalije proizvodi Kemika, Hrvatska.

3.3. PRIRODNI ZEOLITNI TUF

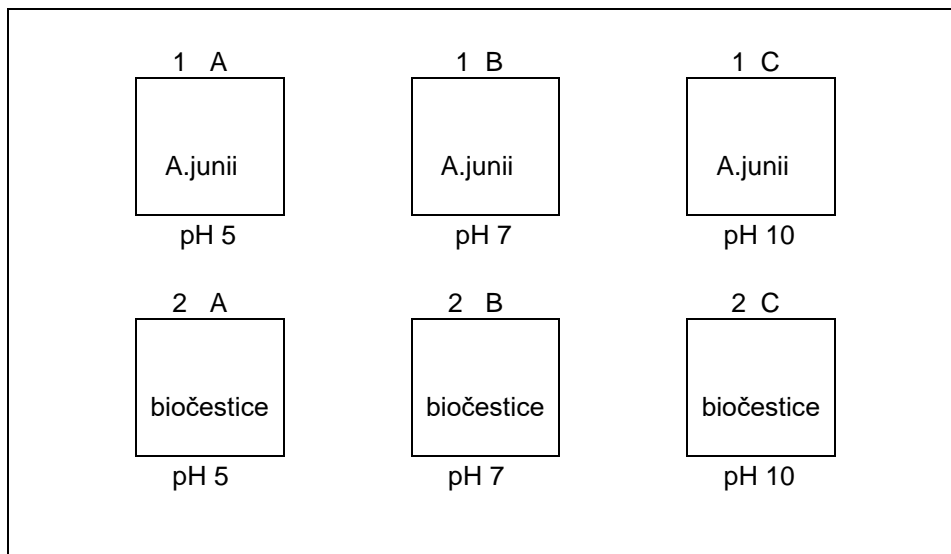
Zeolitni tuf korišten u ovom pokusu dobiven je iz Egejske regije u Turskoj. Korištena je veličina čestica od 0.25 do 0.50 mm. Materijal je ispran sa 300 mL demineralizirane vode i osušen u suhom sterilizatoru na 105°C kroz 16 h, prije početka pokusa. Prethodnom analizom utvrđeno je da većinsku mineralnu fazu ovog tufa čini klinoptilolit (više od 70%), a prateći minerali su kvarc i opal (Hrenović i sur. 2003).

3.4. PRIPREMA BIOČESTICA

Čista kultura *A. junii*, prethodno uzgojena na hranjivom agaru, suspendirana je u 9 mL 0.3% sterilne otopine natrijevog klorida i zatim protresena 3 minute na tresilici marke Kartell TK3S (na 45 Hz) kako bi se otopina homogenizirala. Po 3 mL suspenzije inokulirano je u svaku od 3 Schott boce od 300 mL u kojima se nalazilo po 100 mL sintetske vode i u svaku od 3 boce dodano je još po 1 g zeolita. Boce su začepljene plastičnim čepom te stavljene na inkubaciju na $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ tijekom 12 h prilikom čega je došlo do spontane imobilizacije bakterija na čestice nosača tj. nastanka biočestica. Sav supernatant iz boca je nakon toga odliven, a biočestice su tri puta isprane 0.3% sterilnom otopinom natrijevog klorida kako bi se isprale sve ne-imobilizirane bakterije.

3.5. EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U svim uzorcima korištena je sintetska otpadna voda, u svaku Schott bocu dodano je po 100 mL. U bocama 1A, 1B i 1C nalazila se planktonska kultura *A. junii*, a u bocama 2A, 2B i 2C nalazile su se biočestice koje su prethodno pripremljene (Slika 3.). U bocama 1A i 2A pH je namješten na 5.0 ± 0.02 , u bocama 1B i 2B početni pH je bio 7.0 ± 0.02 , a u bocama 1C i 2C pH je bio 10.0 ± 0.02 .



Slika 3. Shematski prikaz pripreme pokusa sa sintetskom otpadnom vodom.

Seriya pokusa A: sintetska otpadna voda pH 5

Seriya pokusa B: sintetska otpadna voda pH 7

Seriya pokusa C: sintetska otpadna voda pH 10

Seriya pokusa 1: planktonske *A. junii*

Seriya pokusa 2: *A. junii* imobilizirane na prirodni zeolitni tuf (biočestice)

Bakterije prethodno uzgojene na hranjivom agaru suspendirane su u 9 mL 0.3% sterilne otopine natrijevog klorida te protresene na tresilici marke Kartell TK3S (3 min/45 Hz). U boce 1A, 1B i 1C inokulirano je po 2 mL bakterijske suspenzije *A. junii*. Iz boca 1A, 1B i 1C uzeto je po 1 mL i metodom decimalnih razrjeđenja napravljena željena serija razrjeđenja (10^{-1} do 10^{-6}). Iz zadnja dva razrjeđenja nacijepljeno je po 0.1 mL uzorka na Petrijeve ploče sa hranjivom podlogom, metodom širenja razmaza, kako bi se mogao odrediti

startni CFU. U boce 2A, 2B i 2C dodane su biočestice, a prije dodavanja bakterija i biočestica u svim uzorcima izmjerena je koncentracija fosfata (mg/L).

Iz kontrolne boce s biočesticama određen je broj slobodnih i imobiliziranih bakterija. Sve Schott boce su na kraju zatvorene sterilnim poklopcima i kroz njih su stavljene sterilne serološke pipete povezane na akvarijsku pumpu za aeraciju. Boce su stavljene u vodenu kupelj marke Memmert na $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ uz aerobno miješanje (70 r/min) sa stalnim dotokom sterilnog zraka (1 L/min) kroz 24 h (Slika 4.).



Slika 4. Vodena kupelj s uzorcima.

Nakon 24 sata iz svih boca sterilnom pipetom nanijet je uzorak na predmetna stakalca koja su stavljena u suhi sterilizator na sušenje, a uzorci su zatim obojani po Gramu i po Neisseru te mikroskopirani. Iz svih boca uzeto je po 1 mL uzorka za određivanje broja slobodnih bakterija. Iz svih boca uzeto je i po 10 mL uzorka za određivanje koncentracije fosfata. Supernatant iz svih boca odliiven je u čaše i izmjeren je pH. U bocama 2A, 2B i 2C je nakon uklanjanja supernatanta ostao materijal za određivanje broja imobiliziranih bakterija.

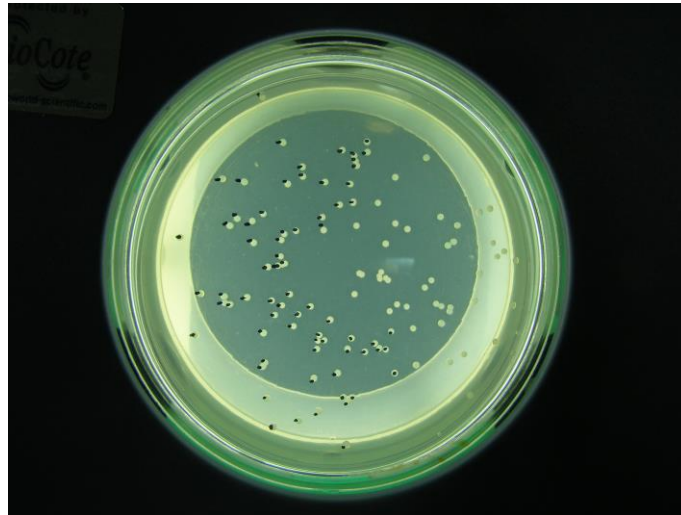
3.6. ANALITIČKI POSTUPCI

3.6.1. Određivanje broja bakterija

Kako bi se odredio broj bakterija korištena je metoda CFU (engl. Colony Forming Units) gdje je broj bakterija određen kao broj jedinica koje formiraju kolonije. Tom metodom se broje samo vijabilne bakterije koje mogu binarnom diobom stvoriti vidljivu koloniju (Slika 5.). Pretpostavka CFU metode je da svaka kolonija potječe iz jedne stanice.

ODREĐIVANJE BROJA SLOBODNIH BAKTERIJA: iz svih boca je uzeto po 1 mL supernatanta i napravljena je serija decimalnih razrijeđenja do 10^{-6} bakterijske suspenzije u sintetskoj vodi. Nakon toga je po 0.1 mL uzorka inokulirano na hranjivi agar u Petrijevim pločama metodom širenja razmaza (10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7}) i stavljeno na inkubaciju $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ kroz 24 h. Nakon 24 h izbrojan je broj kolonija koje su narasle na pločama i taj je broj preračunat u CFU/mL suspenzije čime se iskazuje ukupan broj bakterija u sustavu.

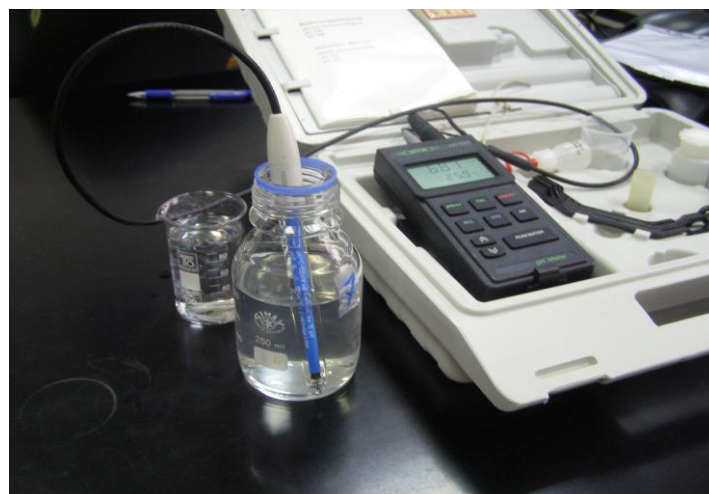
ODREĐIVANJE BROJA IMOBILIZIRANIH BAKTERIJA: iz boca 2A, 2B i 2C odliven je sav supernatant, a preostali materijal je 3 puta ispran sa 300 mL 0.3% sterilne otopine natrijevog klorida kako bi se uklonile bakterije koje se nisu vezale za nosač. Materijal je potom prebačen u plastične epruvete sa 9 mL fiziološke otopine, sterilnim staklenim štapićem zdrobljen i promiješan te protresen 3 minute na tresilici marke Kartell TK3S jakošću 45 Hz. Na taj način su bakterije odvojene od nosača te mobilizirane u supernatant koji je potom serijski razrijeđen do 10^{-7} . Inokulirano je po 0.1 mL uzorka na hranjivi agar metodom širenja razmaza (10^{-6} i 10^{-7}) te stavljeno na inkubaciju $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ kroz 24 h. Preostali materijal iz epruveta prebačen je na prethodno izvagane Petrijeve ploče i stavljen u suhi sterilizator 105°C kroz 24 h. Nakon 24 h uzorci su izvagani na analitičkoj vagi kako bi se mogao odrediti CFU po gramu suhog nosača (zeolita). S obzirom da je pokus proveden u 100 mL otopine, dijeljenjem vrijednosti CFU/g sa 100 dobiva se vrijednost CFU/mL.



Slika 5. Brojanje CFU na brojaču kolonija.

3.6.2. Mjerenje pH

Za mjerenje pH vrijednosti korišten je uređaj WTW pH 330/Set-1 pH-metar (Slika 6.). Prije i nakon upotrebe elektroda je isprana destiliranom vodom, a nakon upotrebe je stavljena u 3M KCl. Tokom mjerenja elektroda ne smije dodirivati stjenke čaše niti se uzorak smije miješati, inače dolazi do pogrešnog rezultata.



Slika 6. Mjerenje vrijednosti pH nakon 24 h pokusa.

3.6.3. Mjerenje koncentracije fosfata

Koncentracije fosfora iz ortofosfata ($P-PO_4$) mjerene su pomoću HACH DR/2500 spektrofotometra koristeći molibdovanadatnu metodu (Hach metoda 8114). Ortofosfat iz otopine reagira sa molibdatom u kiselom mediju i nastaje fosfat/molibdat kompleks. Uz prisustvo vanadija nastaje molibdovanadofosforna kiselina koja daje žuto obojenje, a intenzitet obojenja odgovara koncentraciji fosfata u otopini. Prije svakog mjerenja kivete su isprane sa 1M HCl i destiliranom vodom kako bi se uklonili svi tragovi zaostalog fosfora.

U tri kivete za spektroskopiju stavljeno je po 10 mL uzorka iz boca, nadopunjeno do 25 mL destiliranom vodom, te je dodan 1 mL reagensa. Jedna kiveta je korištena kao slijepa proba pa je u nju stavljeno 25 mL destilirane vode. Kod mjerenja koncentracije fosfata nakon 24 h uzorke je prije stavljanja u kivetu potrebno profiltrirati. Za filtraciju je korišten Sartorius nitrocelulozni filter sa porama veličine 0.2 μm kroz koje ne prolaze bakterije.

3.6.4. Bojanje po Gramu (Hans Christian Gram, 1884)

Sterilnom serološkom pipetom uzet je uzorak iz svih boca nakon 24 h inkubacije i razmazan na predmetna stakalca koja su se zatim osušila na sobnoj temperaturi. Nakon što se uzorak posuši treba ga učvrstiti kako prilikom bojanja ne bi došlo do mehaničkog uklanjanja bakterija s predmetnog stakalca pod mlazom vode. Stakalce se dva do tri puta provuče kroz plamen na način da je uzorak okrenut prema gore te se bakterije zbog termičkog šoka zalijepe za stakalce.

Za bojanje se prvo koristi boja kristalviolet koju se ostavi da djeluje 3 do 5 minuta, a nakon toga se fiksira lugolom (zasićena otopina joda u KI) koji se ostavi 1 do 2 minute. Uzorak se zatim ispere 96% etanolom kako bi se uklonio višak kristalvioleta i lugola sa bakterija koje nisu reagirale sa tim bojama (Gram-negativne bakterije) i iz međustaničnih prostora. Kako bi se dugotrajnim ispiranjem s etanolom boja isprala i iz onih bakterija koje su reagirale s bojom, dakle Gram-pozitivnih, djelovanje etanola prekida se ispiranjem uzorka vodom. Nakon toga se na uzorak nanosi karbol-fuksin, za dokazivanje Gram-negativnih bakterija, koji se ostavi da djeluje 30 sekundi i zatim ispire vodom kako bi se uklonio višak boje. Uzorak se potom osuši filter papirom i mikroskopira pod imerzionim objektivom

(povećanje 1000x). Sve stanice su se obojile crveno jer je *A. junii* Gram-negativna bakterija, osim toga vide se i štapićasti i okruglasti oblici stanica koji pokazuju različite faze u rastu bakterije.

3.6.5. Bojanje po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen 1983)

Ovo se bojanje koristi za utvrđivanje prisutnosti polifosfata pohranjenih u stanici, odnosno za utvrđivanje bakterija zaslužnih za biološko uklanjanje fosfata. Postupak pripreme preparata je isti kao i kod bojanja po Gramu, a za bojanje su korištene dvije boje, Neisser I i Neisser II. Boja Neisser I priprema se svježe za uporabu i sastoji se od dva dijela koja se miješaju u omjeru volumena 2A:1B.

A : metilen plavo	0.1 g
octena kiselina	5 mL
96% etanol	5 mL
destilirana voda	15 mL

B : kristalviolet (10% u 96% etanolu)	3.3 mL
96% etanol	6.7 mL
destilirana voda	100 mL

Boja Neisser II sastoji se od : bismark smeđeg (1% u vodenoj otopini)	33.3 mL
destilirana voda	66.7 mL

Boja Neisser I ostavi se da djeluje 30 sekundi na pripremljenom preparatu i zatim ispere vodom kako bi se uklonio višak boje. Nakon toga se na uzorak nanese boja Neisser II, ostavi 1 do 2 minute i ponovno ispere vodom. Stakalce se osuši filter papirom i mikroskopira pod imerzionim objektivom. Ovom metodom se bakterije oboje žuto, a polifosfatne granule u bakterijskim stanicama tamno plavo. Jasna vidljivost plavih granula u stanicama dokaz je biološkog uklanjanja fosfata.

3.7. FORMULE KORIŠTENE ZA IZRAČUNAVANJE REZULTATA

Za izračunavanje konačnog broja bakterija (CFU 24h) koji je potreban radi utvrđivanja stope umnožavanja bakterija odnosno da bi se vidjelo kakav je bio njihov rast, korištene su dvije formule. Prva je korištena za izračun CFU u bocama 1A, 1B i 1C, a druga za izračun CFU u bocama s biočesticama 2A, 2B i 2C.

Za planktonske bakterije:

$$\text{CFU (CFU/mL)} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen inokuluma}} * \text{recipročna vrijednost razrijeđenja}$$

Za imobilizirane bakterije:

$$\text{CFU (CFU/g)} = \frac{\text{CFU}_{\text{imobilizirane}}}{\text{masa zeolita}}$$

Ukupan broj za biočestice:

$$\text{CFU (CFU/mL)} = \frac{\text{CFU}_{\text{imobilizirane}}}{\text{masa zeolita} * 100} + \text{CFU}_{\text{planktonske}}$$

$$\text{Stopa umnožavanja bakterija} = \frac{\text{konačan broj bakterija CFU}_{24\text{h}}}{\text{početni broj bakterija CFU}_{\text{start}}}$$

Za izračunavanje stope uzimanja fosfata i postotka uklonjenog fosfata korištene su formule:

$$\text{Stopa uzimanja P (mg/CFU)} = \frac{\text{početna koncentracija P} - \text{konačna koncentracija P}}{\text{CFU}_{\text{ukupni}}}$$

$$\% \text{ uklanjanja P} = \frac{\text{početna koncentracija P} - \text{konačna koncentracija P}}{\text{početna koncentracija P}} * 100$$

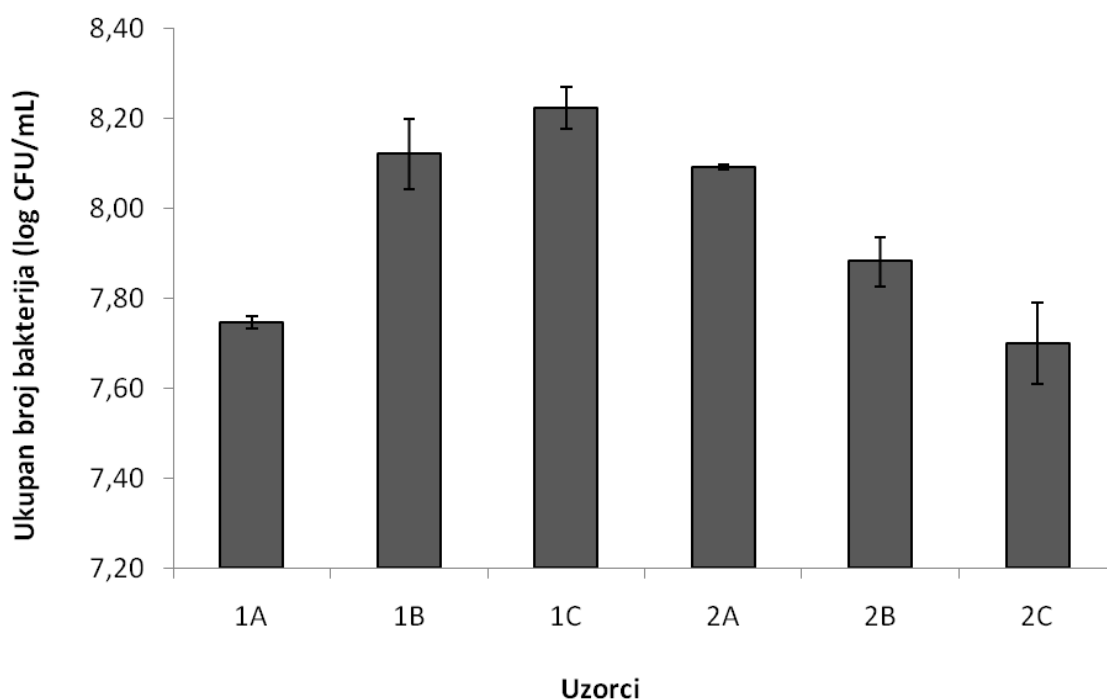
4. REZULTATI

U ovom radu mjerena su 3 parametra: broj vijabilnih bakterija (CFU/mL), koncentracija fosfata i pH, svi parametri mjereni su prije i poslije inkubacije uzoraka. Osim toga, nakon 24 h inkubacije za sve uzorke napravljeni su preparati koji su obojeni po Gramu (dokazivanje kokoidnih i štapićastih oblika *A. junii*) i po Neisseru (dokazivanje biološkog uklanjanja fosfata) te mikroskopirani. Rezultati dobiveni za CFU prikazani su u obliku: srednja vrijednost 3 mjerenja \pm standardna devijacija. Iz tih rezultat izračunata je stopa umnožavanja bakterija. Koncentracije fosfata izmjerene u ovom radu pretvorene su u stopu uzimanja fosfata i količinu uklonjenog fosfata izraženu u postocima pomoću ranije navedenih formula. Na početku pokusa pH je u uzorcima 1A i 2A namješten na 5.0 ± 0.02 , u uzorcima 1B i 2B na 7.0 ± 0.02 , i u uzorcima 1C i 2C na 10.0 ± 0.02 . Nakon 24 h inkubacije pH svih uzoraka bio je u rasponu vrijednosti 6-8 (Tablica 1.).

Tablica 1. Promjena pH nakon 24 h inkubacije u svim uzorcima.

Uzorci	pH start	pH 24 h
1A	5	6,14
1B	7	7,06
1C	10	7,52
2A	5	7,51
2B	7	7,49
2C	10	7,81

Nakon 24 sata inkubacije izračunat je konačan broj bakterijskih stanica izražen kao log CFU za uzorke s planktonskom kulturom i za uzorke s biočesticama (Slika 7.). Iako su dobivene vrijednosti za planktonsku kulturu i biočestice vrlo slične, najveći log CFU dobiven je neočekivano za uzorak 1C koji je sadržavao planktonsku bakterijsku kulturu i čiji je pH početno bio podešen na 10. Dobiveni su vrlo slični rezultati za uzorke 1A (planktonska bakterijska kultura, pH 5) i 2C (biočestice, pH 10) te uzorke 1B (planktonska bakterijska kultura, pH 7) i 2A (biočestice, pH 5).



Slika 7. Srednje vrijednosti ukupnog broja bakterijskih stanica u svim uzorcima nakon 24 h inkubacije.

A – sintetska otpadna voda pH 5

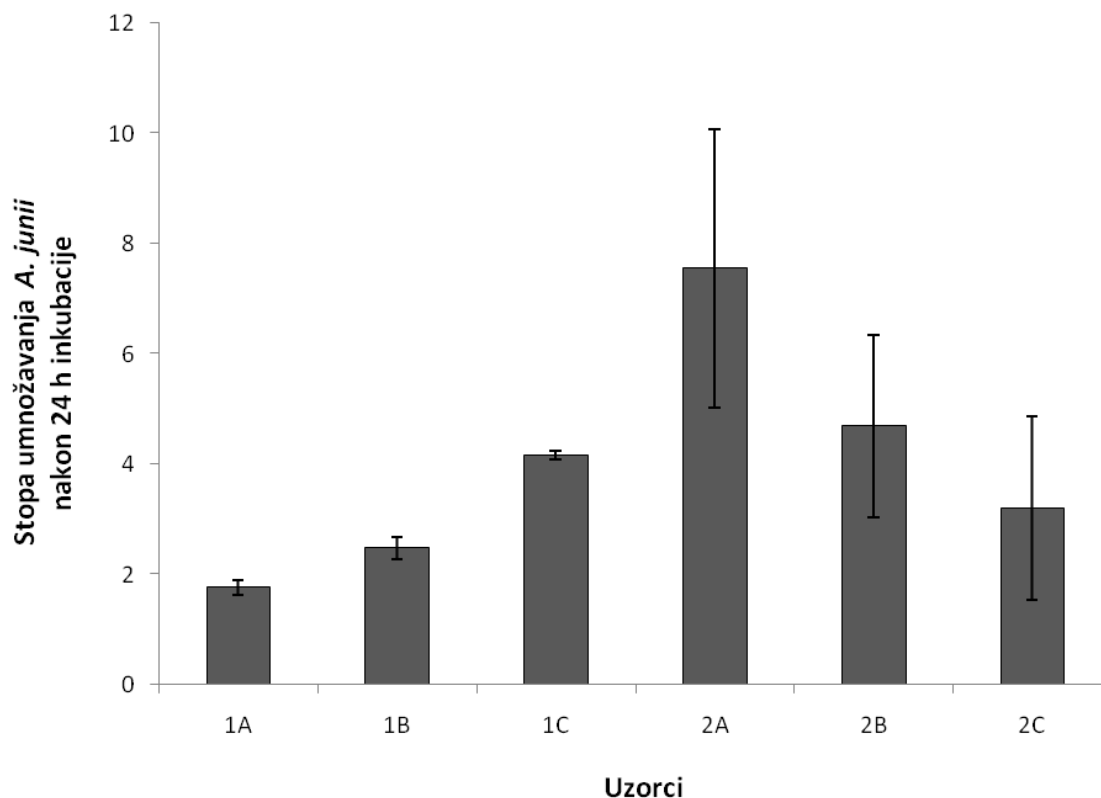
B – sintetska otpadna voda pH 7

C – sintetska otpadna voda pH 10

1 – planktonska kultura *A. junii*

2 – biočestice *A. junii*

Stopa umnožavanja bakterija nakon 24 h inkubacije prikazana je na Slici 8. i pokazuje da postoje značajne razlike između uzoraka, ta stopa je bitno veća u bocama sa biočesticama, posebno kod uzoraka 2A i 2B, nego u bocama sa planktonskom kulturom. Najveća vrijednost izmjerena je za uzorak 2A (biočestice, pH 5) dok su uzorci 1C (planktonska bakterijska kultura, pH 10) i 2B (biočestice, pH 7) imali vrlo slične vrijednosti.



Slika 8. Srednje vrijednosti stope umnožavanja bakterija u svim uzorcima nakon 24 h inkubacije.

A – sintetska otpadna voda pH 5

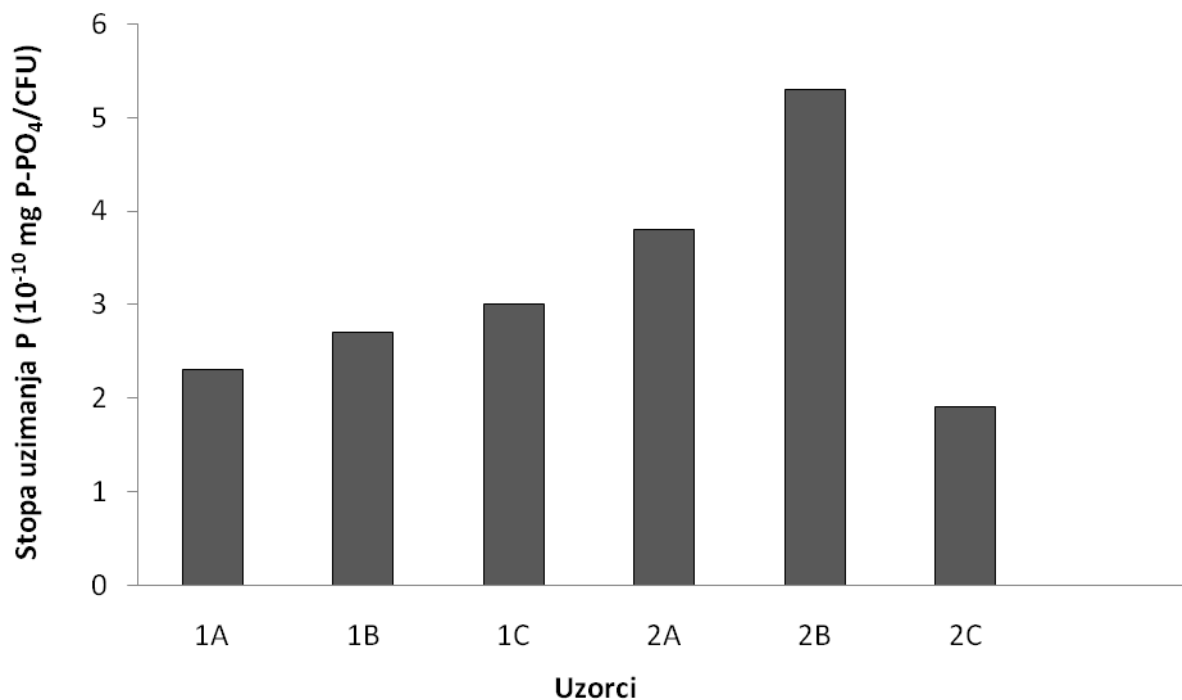
B – sintetska otpadna voda pH 7

C – sintetska otpadna voda pH 10

1 – planktonska kultura *A. junii*

2 – biočestice *A. junii*

Izračunata je i stopa uzimanja fosfata, izražena u mg P-PO₄ po bakterijskoj stanici, prikazana na Slici 9. Dobivene vrijednosti se nalaze u rasponu od 1,90 do 5,30 × 10⁻¹⁰ mg P-PO₄/bakterijskoj stanici. Najveće vrijednosti dobivene su za uzorke sa biočesticama 2A (pH 5) i 2B (pH 7), dok je najmanja vrijednost dobivena za uzorak 2C (pH 10), također s biočesticama.



Slika 9. Stopa uzimanja fosfata za sve uzorke nakon 24 h inkubacije.

A – sintetska otpadna voda pH 5

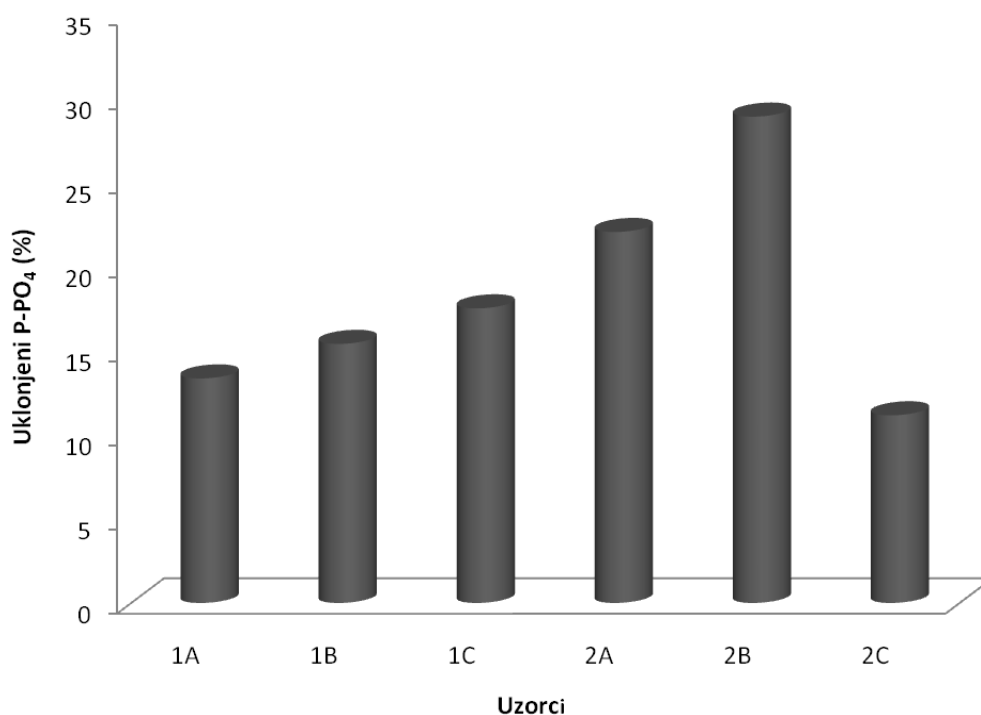
B – sintetska otpadna voda pH 7

C – sintetska otpadna voda pH 10

1 – planktonska kultura *A. junii*

2 – biočestice *A. junii*

Osim stope uzimanja fosfata, izračunat je i postotak uklonjenog fosfata (Slika 10.). Kao i kod prethodnog grafa, i ovaj pokazuje da su veće količine fosfata uklonjene u uzorcima s biočesticama (2A i 2B) nego u uzorcima s planktonskom kulturom. Uzorak 2B je imao najveći postotak od 29% uklonjenog fosfata, dok je najmanji postotak imao uzorak 2C i on je iznosio 11%. Zašto je taj postotak tako malen za uzorak 2C nema dobrog objašnjenja, posebno ako se pogleda ukupan broj bakterija za taj uzorak, koji je sličan kao i kod uzorka 1A (čista bakterijska kultura, pH 5) koji je imao postotak uklonjenog fosfata 13,4%.



Slika 10. Postotak uklonjenog fosfata iz vode u svim uzorcima nakon 24 h inkubacije

A – sintetska otpadna voda pH 5

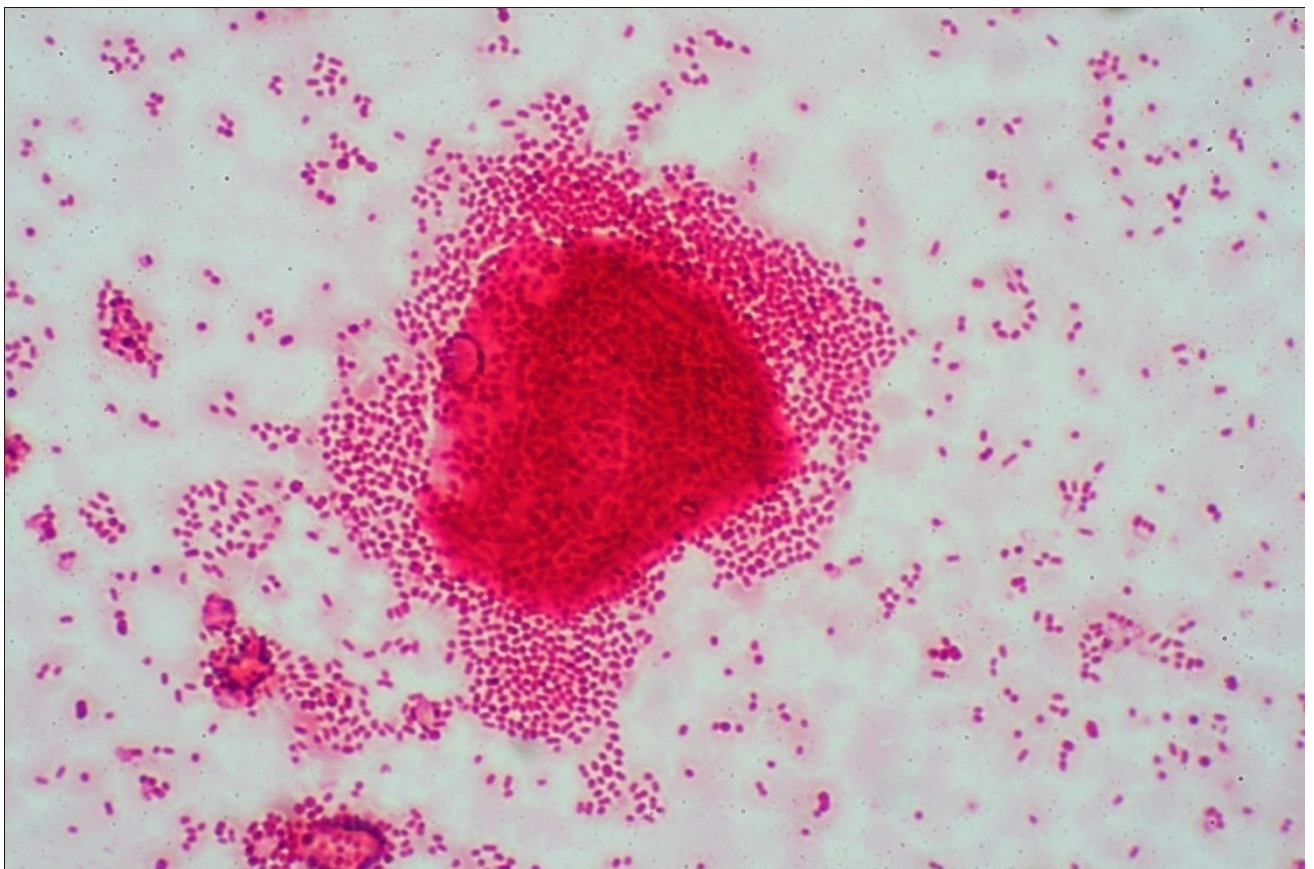
B – sintetska otpadna voda pH 7

C – sintetska otpadna voda pH 10

1 – planktonska kultura *A. junii*

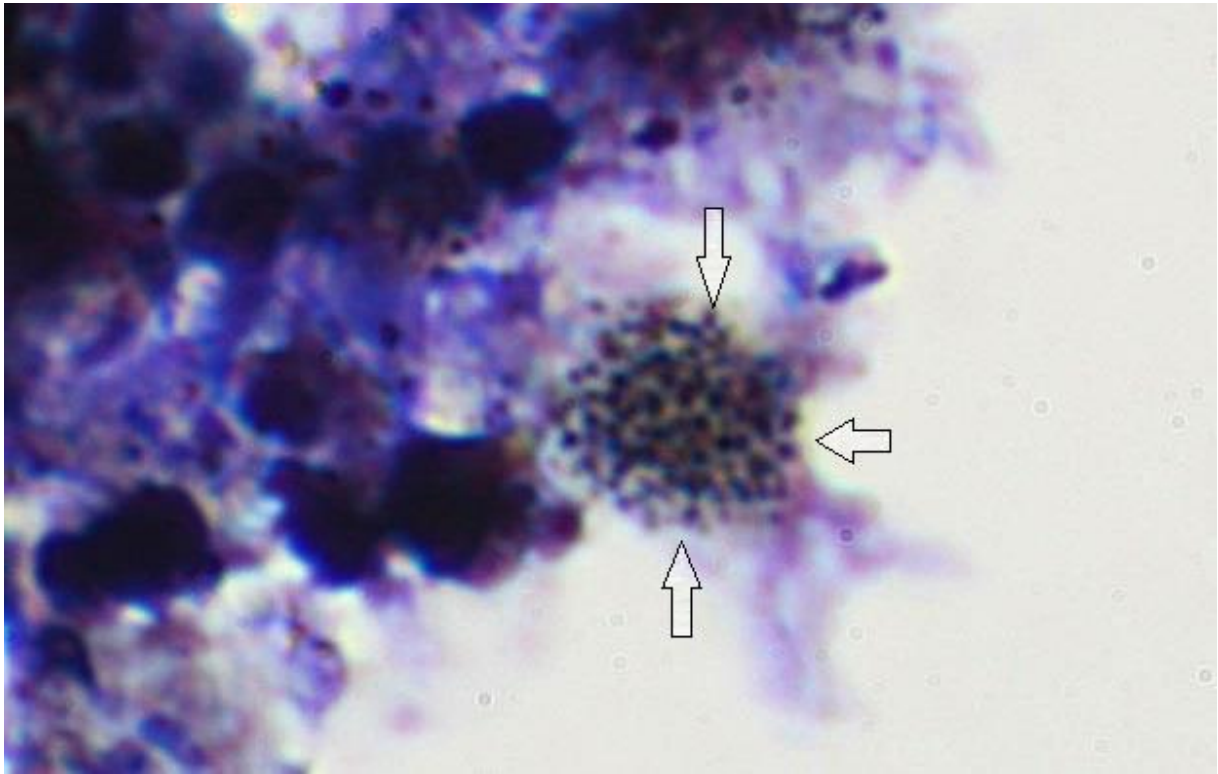
2 – biočestice *A. junii*

Svi uzorci su bojani metodom po Gramu i zatim gledani pod svjetlosnim mikroskopom s imerzijom. Rezultati su bili slični za sve uzorke, stanice *A. junii* su se obojile crveno budući da je riječ o Gram-negativnim bakterijama, s tom razlikom da su kod uzoraka s biočesticama bile vidljive i čestice minerala na kojima je došlo do imobilizacije (Slika 11.). Vidjele su se stanice kokoidnog oblika, bakterije koje se nalaze u stacionarnoj fazi rasta u kojoj dolazi do akumulacije polifosfata, i štapićasti bacili koji su u logaritamskoj fazi rasta u kojoj nema ili ima vrlo malo akumulacije polifosfata.



Slika 11. Biočestica – čestica nosača s biofilmom *A. junii*, obojano po Gramu.

Uzorci su bili također bojani i metodom po Neisseru i mikroskopirani. Prisutnost plavo obojanih granula polifosfata u stanicama *A. junii* dokazuje da zaista dolazi do biološkog uklanjanja fosfata iz sintetske otpadne vode (Slika 12.).



Slika 12. Stanice *A. junii* obojane po Neisseru, vide se tamno-plave granule polifosfata u stanicama.

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio utvrditi kako bakterija *A. junii* preživljava nepovoljne pH vrijednosti kada je planktonska i kada se nalazi imobilizirana na nosač zeolit (biočestice). Brojni radovi su već ranije dokazali da je prirodni zeolitni tuf povoljan mineralni nosač kod kojeg imobilizacijom bakterija dolazi do povećanja ukupne biomase bakterija, a time i do povećanja postotka uklonjenog fosfata. Hrenović i sur. (2009) usporedili su različite mineralne nosače, prirodni zeolitni tuf dobiven sa različitih nalazišta u svijetu (imaju različiti udio klinoptilolita) i bentonit (glina), i potvrdili da je za prirodni zeolit zabilježen veći broj imobiliziranih bakterija u odnosu na bentonit, odnosno da broj imobiliziranih bakterija prvenstveno ovisi o tipu i veličini čestica. Mineraloški sastav nije bitno svojstvo za imobilizaciju bakterija jer je uzorak sa najvećim udjelom klinoptilolita imao najmanji broj imobiliziranih bakterija. Također su utvrdili da je nastanak biofilma rezultat diobe bakterijskih stanica koje su se u početku imobilizirale na nosač, jer rast broja planktonskih stanica ne prati rast broja imobiliziranih stanica u istom uzorku. Ivanković i sur. (2013) su utvrdili da pri niskim vrijednostima pH (pH 3), kada se *A. junii* nalazi u planktonskom obliku, dodavanje čestica prirodnog zeolitnog tufa ne pomaže preživljavanju bakterija, samo su u obliku biočestica zaštićene od niskog pH zbog biofilma koji se stvorio, a ne zbog čestica prirodnog zeolitnog tufa.

Pretpostavka ovog rada je zato bila da će se biočestice pokazati uspješnije u preživljavanju nepovoljnih vrijednosti pH. Kako bi provjerili ovu pretpostavku nakon 24 sata inkubacije izračunat je ukupan broj bakterija, izražen kao log CFU, kao i stopa umnožavanja bakterija. Rezultati pokazuju da je stopa umnožavanja bakterija bila veća kod uzoraka s biočesticama. Osim uspješnog preživljavanja, zanimalo nas je i kako će nepovoljni uvjeti utjecati na sposobnost uklanjanja fosfata iz vode. Ponovno je pretpostavka bila da će uzorci sa biočesticama imati bolje rezultate jer će i bakterije u većem broju preživjeti pa samim time i ukloniti više fosfata. Najbolje rezultate očekivali smo za uzorak 2B sa biočesticama gdje je početni pH bio namješten na 7, što se pokazalo kao vrijednost kod koje *A. junii* uspješno uklanja fosfate, dakle uvjeti u tom uzorku za *A. junii* nisu bili nepovoljni.

Izračunata je stopa uzimanja fosfata koja je izražena u mg po bakterijskoj stanici, a dobiveni rezultati su za sve uzorke bili viši od 10^{-12} mg fosfata/ bakterijskoj stanici čime je još jednom dokazano da *A. junii* zaista spada u PAO (Sidat i sur. 1999). Kao što je i bilo

očekivano, najveća stopa uzimanja fosfata izmjerena je za uzorak 2B, uzorak 2A (biočestice, pH 5) je također imao veću stopu uzimanja od uzoraka sa planktonskom kulturom, ali ono što je bilo neočekivano je vrlo niska, odnosno najniža stopa uzimanja fosfata od svih uzoraka, izmjerena za uzorak 2C (biočestice, pH 10).

Izračunat je i postotak uklonjenog fosfata, gdje su također najveće vrijednosti dobivene za uzorke s biočesticama (2A 22% i 2B 29% uklonjenog fosfata od početne koncentracije) u usporedbi s planktonskim bakterijama (1C 18%). Izmjerene vrijednosti postotka uklonjenog fosfata su znatno niže od vrijednosti iz literature, Hrenović i sur. (2007) su utvrdili čak 59,89% uklonjenog fosfata iz sintetske otpadne vode kada je *A. junii* u planktonskoj kulturi i 88,89% kada je imobilizirana na nosač.

Uzorci su obojani po Gramu i mikroskopirani pri čemu je bilo vidljivo da je u svim uzorcima većina bakterija u logaritamskoj fazi rasta (kratki štapići) jer je pokus rađen kroz 24 h. U toj fazi rasta akumulacije polifosfata ima ili vrlo malo ili nema uopće, zbog čega su izmjerene vrijednosti postotka uklonjenog fosfata niske. Bojanje po Neisseru i mikroskopiranje potvrdilo je postojanje polifosfatnih granula i u uzorcima s planktonskom bakterijskom kulturom i s biočesticama, čime je potvrđeno da u procesu uklanjanja fosfata sudjeluju i slobodne bakterije i bakterije imobilizirane na nosač.

Nakon 24 h inkubacije vrijednosti pH su se jako promijenile (Tablica 1.), posebno u uzorcima 1A, 1C i 2A, 2C gdje su težile prema neutralnom (uzorci 1B i 2B su imali u početku pokusa pH 7 i nakon 24 h inkubacije pH je ostao neutralan). Do tih je promjena došlo zbog puferskih sposobnosti otopine i zbog metabolizma bakterije *A. junii* kojim se se pH regulira i mijenja prema neutralnim vrijednostima koje su optimalne za rast (Ivanković 2012). Takva promjena objašnjava zašto su osim biočestica, za koje se već iz prethodnih istraživanja zna da uspješno preživljavaju nepovoljne pH vrijednosti zahvaljujući nastalom biofilmu, dobro preživljavanje početnih nepovoljnih pH vrijednosti imale i bakterije u planktonskoj kulturi.

6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih ovim radom mogu se donijeti zaključci o sposobnosti *A. junii* da preživi i zadrži svoju specifičnu metaboličku aktivnost pri nepovoljnim pH vrijednostima, kao i zaključci o učinkovitosti biočestica.

Prirodni zeolitni tuf se dokazao kao materijal pogodan za imobilizaciju fosfat-akumulirajuće bakterije kao što je *A. junii*. Biočestice pokazuju veliki potencijal da podnesu nepovoljne pH vrijednosti okoliša koje često dovode do propadanja bioaugmentiranog aktivnog mulja, a u praktičnoj primjeni se mogu unaprijed pripremljene biočestice dodavati u aktivni mulj za proces tercijarne obrade otpadnih voda. Postotak uklonjenog fosfata uz pomoć biočestica je veći u odnosu na planktonsku kulturu (29% je bio najveći postotak za biočestice i 18% za planktonsku kulturu). S obzirom da do uklanjanja fosfata dolazi u lag i stacionarnoj fazi rasta, dok u log fazi rasta ne dolazi do uklanjanja fosfata, ili se uklanja u vrlo malim količinama, potrebno je izbjeći log fazu rasta u aerobnoj zoni kako bi se poboljšalo biološko uklanjanje fosfata.

7. POPIS LITERATURE

- Alarcon, G. O. (1961): Removal of phosphorus from sewage. Neobjavljeni magistarski rad, John Hopkins University, Baltimore.
- Barnard, J. L. (1975): Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Res.* **9**, str. 485 – 490.
- Bond, P. L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L. L. (1999): Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, str. 4077 – 4084.
- Bouvet, P. J. M., Grimont, P. A. D. (1986): Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, str. 228-240.
- Brdjanovic, D., Hooijmans, C. M., van Loosdrecht, M. C. M., Alaerts, G. J., Heijnen, J. J. (1996): The dynamic effect of potassium limitation on biological phosphorus removal. *Water Res.* **30**, str. 2323 – 2328.
- Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M. C. M., Hooijmans, C. M., Alaerts, G. J., Heijnen, J. J. (1998): Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Res.* **32**, str. 200 – 208.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. (2002): *Ecosystems U: Campbell, N. A., Reece, J. B. Biology.* (6th edn.) Benjamin Cummings, San Francisco, str. 1204 – 1205.
- Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B. K. C., Gürtler, V., Seviour, R. J. (2003): Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* **52**, str. 953 – 963.
- Cech, J. S., Hartman, P. (1990): Glucose induced break down of enhanced biological phosphate removal. *Environ. Technol.* **11**, str. 651 – 656.
- Chen, Y., Randall, A. A., McCue, T. (2004): The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. *Water Res.* **38**, str. 27 – 36.
- Cloete, T. E., Bosch, M. (1994): *Acinetobacter* cell biomass, growth stage and phosphorus uptake from activated sludge mixed liquor. *Water Sci. Technol.* **30**, str. 219 – 230.

- Eikelboom, D. H., van Buijsen, H. J. J. (1983): *Microscopic sludge investigation manual*. (2nd edn.) TNO Research Institute of Environmental Hygiene, Delft.
- Fuhs, G. W., Chen, M. (1975): Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb. Ecol.* **2**, str. 119 – 138.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001a): Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* **73**, str. 213 – 222.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001b): pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphate-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* **73**, str. 223 – 232.
- Hrenović, J., Orhan, Y., Büyükgüngör, H., Tibljaš, D. (2001): Phosphorus removal from wastewater in upgraded activated sludge system with natural zeolite addition. *Studies in Surface Science and Catalysis* **135**, str. 5232 – 5236.
- Hrenović, J., Büyükgüngör, H., Orhan, Y. (2003): Use of natural zeolite to upgrade activated sludge process. *Food Technol. Biotechnol.* **41**, str. 157 – 165.
- Hrenović, J., Tibljaš, D., Orhan, Y., Büyükgüngör, H. (2005): Immobilisation of *Acinetobacter calcoaceticus* using natural carriers. *Water SA* **31**, str. 261 – 266.
- Hrenović, J., Tibljaš, D., Sekovanić, L. (2007): Aluminosilicates as carriers of phosphate-accumulating bacteria. *Acta Chim. Slov.* **54**, str. 661 – 666.
- Hrenović, J., Ivanković, T., Tibljaš, D. (2009): The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization. *J. Haz. Mat.* **166**, str. 1377 – 1382.
- Hrenović, J., Ivanković, T., Rožić, M. (2010): Requirement of *Acinetobacter junii* for magnesium, calcium and potassium ions. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, str. 180 – 186.
- Ivanković, T., Hrenović, J., Matonićkin-Kepčija, R. (2013): Resistance of bioparticles formed of phosphate-accumulating bacteria and zeolite to harsh environmental conditions. *Biofiling* **29**, str. 641 – 649.
- Ivanković, T. (2012): Alumosilikatni materijali kao nosači fosfat-uklanjajućih bakterija u obradi otpadnih voda. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, str. 47 – 48.
- Jeon, C. O., Lee, D. S., Lee, M. W., Park, J. M. (2001): Enhanced biological phosphorus removal in anaerobic-aerobic sequencing batch reactor: effect of pH. *Water Environ. Res.* **73**, str. 301 – 306.

- Kuba, T., Wachtmeister, A., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994): Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems. *Water Sci. Technol.* **30**, str. 263 – 269.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1997): Biological dephosphation by activated sludge under denitrifying conditions: pH influence and occurrence of denitrifying dephosphatation in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Sci. Technol.* **36**, str. 75 – 82.
- Levin, G. V., Shapiro, J. (1965): Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organism. *J. Water Pollut. Cont. Fed.* **37**, str. 800 – 821.
- Liu, W. T., Mino, T., Matsuo, T., Nakamura, K. (1996): Biological phosphorus removal process – effect of pH on anaerobic substrate metabolism. *Water Sci. Technol.* **34**, str. 25 – 32.
- Lu, H., Oehmen, A., Viridis, B., Keller, J., Yuan, Z. G. (2006): Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources. *Water Res.* **40**, str. 3838 – 3848.
- Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1998): Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* **32**, str. 3193 – 3207.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L., Keller, J. (2004): Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate-accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Sci. Technol.* **50**, str. 139 – 144.
- Oehmen, A., Lemos, P. C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L. L., Reis, M. A. M. (2007): Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Res.* **41**, str. 2271 – 2300.
- Panswad, T., Doungchai, A., Anotai, J. (2003): Temperature effects on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Res.* **37**, str. 409 – 415.
- Pattarkine, V. M., Randall, C. W. (1999): The requirement of metal cations for enhanced biological phosphorus removal by activated sludge. *Water Sci. Technol.* **40**, str. 159 – 165.
- Pijuan, M., Saunders, A. M., Guisasola, A., Baeza, J. A., Casas, C., Blackall, L. L. (2004): Enhanced biological phosphorus removal in sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, str. 56 – 67.
- Rhodes, C. J. (2010): Properties and applications of zeolites. *Sci. Progress* **93**, str. 1 – 63.

- Schuler, A. J., Jenkins, D. (2002): Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms. *Water Sci. Technol.* **46**, str. 171 – 178.
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Reis, M. A. M. (2002): Effect of pH control on EBPR stability and efficiency. *Water Sci. Technol.* **46**, str. 179 – 184.
- Serralta, J., Borrás, L., Blanco, C., Barat, R., Seco, A. (2004): Monitoring pH and electric conductivity in an EBPR sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **50**, str. 145 – 152.
- Seviour, R. J., Mino, T., Onuki, M. (2003): The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, str. 99 – 127.
- Sidat, M., Bux, F., Kasan, H. V. (1999): Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. *Water SA* **25**, str. 175 – 179.
- Smolders, G. J. F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994a): Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, str. 837 – 848.
- Smolders, G. J. F., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994b): pH: Keyfactor in the biological phosphorus removal process. *Water Sci. Technol.* **29**, str. 71 – 74.
- Srinath, E. G., Sastry, C. A., Pillai, S. C. (1959): Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge. *Experientia* **15**, str. 339 – 340.
- Thomas, M., Wright, P., Blackall, L. L., Urbain, V., Keller, J. (2003): Optimisation of Noosa BNR plant to improve performance and reduce operating costs. *Water Sci. Technol.* **47**, str. 141 – 148.
- Towner, K. (2006): The genus *Acinetobacter*, U: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (ur.) *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer, New York, str. 746 – 758.

