

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Barbara BRAJER HUMAR

**SESTAVA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE
NITRIFIKACIJSKIH BAKTERIJ V IMOBILIZIRANI BIOKULTURI**

MAGISTRSKO DELO

**STRUCTURE AND DIVERSITY OF NITRIFYING MICROBIAL
COMMUNITY IN BIOFILM**

M.SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 14. 12. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Univerzitetni podiplomski študij Varstva okolja ter opravljanje magisterija znanosti. Za mentorja je bila imenovana prof. dr. Ines Mandič-Mulec.

Magistrsko delo je zaključek poddiplomskega študija Varstva okolja. Delo je potekalo v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter v laboratorijih Centralne čistilne naprave Domžale-Kamnik d. o. o.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik komisije	prof. dr. Mihael J. Toman Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član	prof. dr. Romana Marinšek-Logar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	prof. dr. Milenko Roš Visoka šola za varstvo okolja, Velenje
Datum zagovora:	25. 5. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Barbara Brajer Humar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 696.135:631.461.2(043.2)=163.6
KG mikrobnna združba/nitrifikacija/biofilm/reaktor/nitrifikacijske bakterije
KK
AV BRAJER HUMAR, Barbara, univ. dipl. biol.
SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Varstva okolja
LI 2016
IN SESTAVA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDRUŽBE NITRIFIKACIJSKIH BAKTERIJ V IMOBILIZIRANI BIOKULTURI
TD Magistrsko delo
OP IX, 63 str., 13 pregl., 21 sl., 9 pril., 96 vir.
IJ sl
JI sl/en

V procesu čiščenja odpadne vode na čistilnih napravah je proces nitrifikacije ključen za odstranjevanje enega od najpomembnejših hranil-dušika- z nitrifikacijskimi bakterijami. Spremljali smo proces nitrifikacije ter prisotnost, pestrost in stabilnost mikrobnih združb na osnovi zaporedij 16S rRNA in specifičnih funkcionalnih genov (npr. *amoA*) v industrijskih in laboratorijskih reaktorjih z imobilizirano biokulturo. Zanimalo nas je predvsem kako se združba nitrifikacijskih bakterij v imobilizirani biokulturi ali biofilmu na prosto plavajočih plastičnih nosilnih elementih Kaldnes v biofilmu odziva glede na različno kvaliteto odpadne vode ter letni čas. Mikrobeno združbo na CČN Domžale-Kamnik (CČN DK) smo analizirali z metodo TRFLP in s sekvenciranjem genov za 16S rRNA in genov *amoA*. Z analizo TRFLP smo ugotovili, da se je, kljub nihanju strukture združbe v času, vzpostavila določena razlika med vzorci iz pilotnih sistemov z mehansko čiščeno in sintetično odpadno vodo, sama velikost (industrijski vs. mini reaktor) sistema pa ni bila pomembna. Še bolj očitna razlika med združbami, ki so bile izpostavljene različnim odpadnim vodam, se je pokazala z analizo funkcionalnega nitrifikacijskega gena *amoA*. In sicer so se zunanji industrijski reaktor in mini pilotni reaktorji, obremenjeni z mehansko čiščeno odpadno vodo, razlikovali tako po sestavi kot po pestrosti nitrifikacijskih mikroorganizmov. Pestrost splošne 16S rRNA mikrobeno združbe je bila višja v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo, medtem ko so reaktorji z sintetično odpadno vodo imeli večjo pestrost nitrifikacijske (*amoA*) mikrobeno združbe. Na podlagi rezultatov sklepamo, da ima kvaliteta odpadne vode večji vpliv na sestavo združbe kot pa dejavniki okolja kot sta temperatura ali pa velikost reaktorjev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 696.135:631.461.2(043.2)=163.6
CX microbial community/nitrification/biofilm/bioreactor/nitrifying bacteria
CC
AU BRAJER HUMAR, Barbara
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, University Postgraduate Study Programme in Environmental Protection
PY 2016
TI STRUCTURE AND ACTIVITY OF NITRIFYING MICROBIAL COMMUNITY IN BIOFILM
DT M.Sc.Thesis
NO IX, p. 63., 13 tab., 21 fig., 9 ann., 96 ref.
LA sl
AL sl/en
AB

In the process of treating waste water in biological treatment plants, the nitrification process is crucial for the removal of one of the most important nutrients, i.e. nitrogen, using nitrification bacteria. The aim of our work was to produce a study of the process of nitrification itself, including an analysis of the presence, diversity and stability of microbial communities based on the 16S rRNA sequences and specific functional genes (eg. *amoA*) in industrial-scale and laboratory-scale reactors with immobilized bioculture. Industrial-scale reactors treat wastewater of temporary variable composition under different weather conditions, while the microbial population of wastewater treatment plants are often studied in controlled laboratory-scale systems with defined influent at a constant temperature. 16S rRNA and ammonia oxidising *amoA*-gene-defined bacterial community structure was investigated in industrial-scale and laboratory-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) treating municipal wastewater or synthetic ammonium solution. Nitrification activity, 16S rRNA and *amoA* gene TRFLP profiles were comparable between industrial and laboratory-scale reactors with municipal wastewater. Reactors with synthetic ammonium solution exhibited higher nitrification and higher relative abundance of *Nitrosomonadaceae* and *Nitrospiraceae* families but only small changes in general bacterial community structure was detected compared to MBBR reactors treating municipal wastewater. *Nitrosomonas europea* lineage dominated in reactors treating municipal wastewater, while uncultivated *Nitrosomonas*-like sequences prevailed in reactors with synthetic ammonia solution. These results suggest that influent type has a stronger influence on community structure than operational conditions, such as temperature or reactor size.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IMOBILIZIRANA BIOCULTURA ALI BIOFILM	4
2.1.1 Nosilni elementi.....	6
2.2 NITRIFIKACIJA V PROCESU ČIŠČENJA ODPADNE VODE	7
3 MATERIALI IN METODE.....	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Komplet za izolacijo DNK	12
3.1.2 Encimi.....	12
3.1.3 Pufri in raztopine	12
3.1.4 Začetni oligonukleotidi.....	12
3.1.5 TRFLP	12
3.1.6 Bioinformacijska orodja	13
3.2 APARATURE/NAPRAVE	13
3.2.1 Reaktorji	13
3.2.2 Ostala oprema	17
3.3 ANALIZNE METODE	17
3.3.1 Fizikalne in kemijske metode	17
3.3.2 Izračuni	20
3.3.3 Biološke-molekularne metode	22
3.4 OBRATOVANJE REAKTORJEV	26

3.4.1	Mini reaktor	26
3.4.2	Mini reaktor CČN	27
3.4.3	Zunanji B reaktor CČN	27
3.5	VZORČENJE	29
3.5.1	Vzorci vtočne in iztočne odpadne vode.....	29
3.5.2	Vzorci biomase in bakterijskih združb	29
4	REZULTATI.....	31
4.1	UČINEK NITRIFIKACIJE	31
4.2	TRFLP 16S rRNA	34
4.3	TRFLP <i>amoA</i>	37
4.4	KLONSKE KNJIŽNICE	39
4.4.1	Klonska knjižnica 16S rRNA	39
4.4.2	Klonska knjižnica <i>amoA</i>	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	UČINEK NITRIFIKACIJE	45
5.2	TRFLP IN KLONSKA KNJIŽNICA 16S rRNA	46
5.3	TRFLP IN KLONSKA KNJIŽNICA <i>amoA</i>	48
6	SKLEPI	51
7	POVZETEK (SUMMARY).....	52
7.1	POVZETEK	52
7.2	SUMMARY	53
8	VIRI.....	54

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz nastanka biofilma v petih fazah (https://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm)	5
Slika 2: Fotografija poraščenosti polietilenskega nosilca s pritrjno biomaso	6
Slika 3: Uporaba nosilnih elementov Kaldnes K1; (a) aerobni reaktor – zračenje (b) anaerobni reaktor – mešanje.....	7
Slika 4: Dušikov cikel v odpadni vodi (Roš, 2015).....	8
Slika 5: Shema mini pilotnega reaktorja KONTROLA IN REAKTOR 1 s pH regulacijo (Hach-Lange), napolnjenega z nosilci Kaldnes K1	14
Slika 6: Mini reaktor CČN s pH regulacijo (Hach-Lange), napolnjen z nosilci Kaldnes K1	14
Slika 7: Shema mini pilotnega reaktorja CČN	15
Slika 8: Slika mini reaktorja CČN.....	15
Slika 9: Shema zunanjega B reaktorja CČN.....	16
Slika 10: Slika zunanjega B reaktorja CČN	16
Slika 11: Eksperimentalna shema analize TRFLP posameznega vzorca CČN DK	23
Slika 12: Eksperimentalna shema priprave posamezne klonske knjižnice.....	23
Slika 13: Učinek nitrifikacije v reaktorjih	31
Slika 14: Koncentracije NH ₄ -N, NO ₃ -N in NO ₂ -N v Zunanjem B pilotnem reaktorju.....	32
Slika 15: Koncentracije NH ₄ -N, NO ₃ -N in NO ₂ -N v Mini CČN pilotnem reaktorju.....	33
Slika 16: Koncentracije NH ₄ -N, NO ₃ -N in NO ₂ -N v Mini pilotnem reaktorju	33
Slika 17: TRFLP profili odseka gena 16S rRNA po restrikciji s HaeIII vzorcev CČN DK, odvzetih v časovnem obdobju med oktobrom 2007 in januarjem 2008	36
Slika 18: TRFLP profili nitrifikacijske mikrobine združbe na osnovi 491 bp dolgega odseka funkcionalnega nitrifikacijskega gena <i>amoA</i>	38
Slika 19: Relativna pogostost 16S rRNA sekvenc iz vzorcev reaktorjev glede na tip odpadne vode	40
Slika 20: Klonska knjižnica 2191 bp odseka DNK gena <i>amoA</i>	42
Slika 21: Klonska knjižnica 491 bp odseka DNK gena <i>amoA</i> , predstavljena kot NJ drevo (*AS-sintetična odpadna voda, WW-mehansko čiščena odpadna voda)	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Značilnosti nosilcev Kaldnes K1 (Rusten, 1995)	6
Preglednica 2: Opis MBBR reaktorjev	13
Preglednica 3: Vzorčenje obraščenih nosilnih elementov Kalndes K1 iz reaktorjev	30
Preglednica 4: Število in pregled sekvenc DNK iz RDP (spletna Ribosomska baza podatkov), ki so najbolj podobne sekvencam DNK iz reaktorjev CČN DK (*odpadna voda-mehansko čiščena odpadna voda; *raztopina NH ₄ ⁺ -sintetična odpadna voda) .	41
Preglednica 5: Rezultati meritev na vtoku v mini reaktor.	65
Preglednica 6: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja Kontrola.	66
Preglednica 7: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja Reaktor 1.....	66
Preglednica 8: Rezultati meritev na vtoku v zunanji reaktor.....	67
Preglednica 9: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja OXI 1.....	67
Preglednica 10: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja OXI 2.....	68
Preglednica 11: Rezultati meritev na vtoku v mini reaktor CČN.....	68
Preglednica 12: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja 2-NI	69
Preglednica 13: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja 3-NI	69

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CČN DK	Centralna čistilna naprava Domžale-Kamnik
16S rRNA	ribonukleinska kislina male podenote ribosoma (small subunit ribosomal ribonucleic acid)
AOA	amonij oksidirajoče arheje (ammonia oxidizing archaea)
AOB	amonij oksidirajoče bakterije (ammonia oxidizing bacteria)
bp	bazni par
BPK ₅	biološka potreba po kisiku v petih dneh
DNK	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
KPK	kemijska potreba po kisiku
MBBR	reaktor s pritrjeno biomaso na nosilcih (moving bed biofilm reactor)
mRNA	sporočevalna ribonukleinska kislina (messenger ribosomal ribonucleic acid)
NH ₄ -N	amonijev dušik
NO ₂ -N	nitritni dušik
NO ₃ -N	nitratni dušik
NOB	nitrit oksidirajoče bakterije (nitrite oxidizing bacteria)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
TN	celotni dušik
TRF	terminalni restrikcijski fragment (terminal restriction fragment)
TRFLP	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (terminal restriction fragment length polymorphism)

1 UVOD

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE DELA

Evropska in posledično tudi slovenska zakonodaja s področja čiščenja odpadnih voda se zaostruje in predpisuje vse nižje mejne vrednosti hranil v iztokih čiščene odpadne vode iz čistilnih naprav v vodna telesa. Zaostrovanje okoljske zakonodaje temelji na poznavanju negativnih učinkov hranil v vodnem okolju, predvsem kot strupenost za vodne organizme, evtrofikacija in pomanjkanje kisika.

Iz začetka devetdesetih let prejšnjega stoletja iz Norveške izhaja tehnologija z imobilizirano biokulturo ali biofilmom na prosto plavajočih plastičnih nosilnih elementih AnoxKaldnes™. Razvila se je predvsem zaradi zaostritve zakonodaje po letu 1980 ter zaradi močno onesnaženega Severnega morja (Ødegaard s sod., 1994). Postopek čiščenja odpadne vode je znan kot MBBR (Moving bed biofilm reactor) in imobilizirana biokultura ali biofilm označuje mikroorganizme, ujete v matriksu in pritrjene na podlago. Namen biofilma je, da preko povečane površine nosilnih elementov, ki služijo za pritrditev mikroorganizmov, omogočajo večji učinek čiščenja in zadrževanje mikroorganizmov v reaktorju. Nosilci biofilma so stalno prisotni in plavajoči v reaktorju in s tem se izognemo stresnim razmeram (pomanjkanje kisika) pri kroženju mikroorganizmov preko reaktorjev v usedalnike ter preko povratnega blata nazaj v reaktorje.

V zadnjem desetletju najpogosteje opisujemo raznolikost mikrobine združbe na osnovi zaporedij 16S rRNA, kot tudi so raziskave usmerjene na preučevanje specifičnih funkcionalnih genov (npr. *amoA*). Uporaba molekularnih tehnik v mikrobeni ekologiji brez gojenja se v zadnjih desetletjih povečuje, saj danes znamo gojiti v laboratoriju le majhen delež mikroorganizmov iz okolja, največ 1–10 % (Janssen, in sod., 2002, Stres in Tiedje, 2006).

Namen in cilj magistrske naloge je ugotavljanje prisotnosti, pestrosti in stabilnosti mikrobnih združb glede na letni čas in sestavo odpadne vode s pomočjo molekularne biološke metode TRFLP. Naredili smo klonske knjižnice gena za ribosomsko 16S

podenoto (16S rRNA) in funkcionalnega gena nitritacijskih bakterij (*amoA*) za posamezne reaktorje.

Na podlagi rezultatov molekularne biološke metode TRFLP in klonske knjižnice gena za ribosomsko 16S podenoto (16S rRNA) ter funkcionalnega gena nitritacijskih bakterij (*amoA*) za posamezne reaktorje, smo določili prisotnost, pestrost in stabilnost mikrobnih združb glede na letni čas, ki sodelujejo v procesu nitrifikacije in odstranjevanja dušika iz odpadne vode, v imobilizirani biokulturi iz laboratorijske in industrijske pilotne naprave. Rezultate smo primerjali s fizikalnimi in kemijskimi parametri ob različnih razmerah v različnih reaktorjih. Raziskava je obenem aplikativnega značaja in je pripomogla k boljšemu poznovanju procesa nitrifikacije na čistilnih napravah. Poznavanje procesov biološkega čiščenja odpadne vode je pomembno za povečanje zmogljivosti in pa samo kontrolo procesa čiščenja odpadne vode.

1.2 HIPOTEZE

Naše hipoteze so:

1. mikrobne združbe v imobilizirani biokulturi različnih reaktorjev so heterogene in različne,
2. razlike v mikrobeni združbi v laboratorijskih reaktorjih in zunanjih reaktorjih so očitne in posledica dejavnikov zunanjega okolja,
3. pričakujemo večjo pestrost nitrifikacijskih mikrobnih združb v reaktorjih s sintetično odpadno vodo v primerjavi z reaktorji, v katerih bomo čistili mehansko čiščeno odpadno vodo.

2 PREGLED OBJAV

Eden ključnih procesov za odstranjevanje dušika iz odpadne vode sta nitrifikacija in denitrifikacija, kjer se s pomočjo bakterij, dušik odstrani iz odpadne vode. Nitrifikacija je dvostopenjska mikrobnna oksidacija amonijevega iona do nitrita ter naprej do nitrata in je ključen proces v odstranjevanju amonijevega dušika iz odpadne vode. Poznavanje procesov biološkega čiščenja odpadne vode je pomembno za povečanje zmogljivosti in pa samokontrolo procesa čiščenja odpadne vode. Biološko čiščenje odpadne vode na čistilnih napravah običajno poteka z aktivnim blatom kot razpršeno suspendirano biomaso, ki pa se lahko izloči preko presežnega blata in izpere iz sistema v iztočno čiščeno odpadno vodo. Ker imajo nitrifikacijske bakterije daljši čas podvojevanja oz. nizko stopnjo rasti kot tudi visoko občutljivost na vplive okolja (temperatura, pH, alkaliniteta), koncentracijo raztopljenega kisika (Park in Noguera, 2004) in prisotne strupene snovi (Sudarno, 2010), lahko v procesu čiščenja odpadne vode pride do zmanjšanja ali celo do prekinitve procesa nitrifikacije. S tem se zmanjša ali prekine proces odstranjevanja dušika iz odpadne vode ter poviša vnos hraničnih vod na telesa in okolje.

Za ugotavljanje prisotnosti, pestrosti in stabilnosti mikrobnih združb smo izbrali molekularno biološko metodo TRFLP, znane kot polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (terminal restriction fragment length polymorphism). Kombinirali smo jo s klonsko knjižnico gena za ribosomsko 16S podenoto (16S rRNA) in funkcionalnega gena nitritacijskih bakterij (*amoA*) za posamezne reaktorje. Različni raziskovalci so izbrali podobno metodologijo za ugotavljanje vpliva okolja, kot je koncentracija raztopljenega kisika (Park in Noguera, 2004), slanost (Park s sod., 2009), temperatura (Datta s sod., 2011), pretok, koncentracija biomase, nitrit, kadmij, krom (Wells s sod., 2009) in ostanki zdravil (Kraiger s sod., 2008) na mikrobine združbe v čistilnih napravah.

Rezultati analiz mikrobnih združb s TRFLP metodo so pokazali, da sta stabilnost mikrobnih združb in stabilnost procesa čiščenja odpadne vode neodvisna (Falk s sod., 2009). Ker raziskave mikrobine združbe na MBBR nosilcih še niso poznane, bomo v študiji

ugotavljalji vpliv sestave odpadne vode ter procesnih parametrov na strukturo združbe bakterij kot tudi amonij oksidirajočih bakterij v aerobnih MBBR reaktorjih.

2.1 IMOBILIZIRANA BIOKULTURA ALI BIOFILM

Imobilizirana biokultura ali biofilm je pojem, ki označuje mikroorganizme, ujete v matriksu in pritrjene na podlago. Matriks sestavljajo ekstracelularne snovi, polimeri, ki jih proizvajajo bakterije. Iz začetka devetdesetih let prejšnjega stoletja iz Norveške izhaja tehnologija z imobilizirano biokulturo ali biofilmom na prosto plavajočih plastičnih nosilnih elementih Kaldnes K1.

Nosilci biofilma so stalno prisotni in plavajoči v reaktorju in s tem se izognemo stresnim razmeram (pomanjkanje kisika) pri kroženju mikroorganizmov preko reaktorjev v usedalnike ter preko povratnega blata nazaj v reaktorje. Nosilci Kaldnes so bili razviti z namenom povečanja aktivne površine za pritrditev biofilma, kar je še posebej pomembno za počasi rastoče nitrifikacijske bakterije. Nosilci so posebno profilirani krožni obročki, z dvema križnima predelnima stenama iz polietilena HDPE (z visoko gostoto), z visoko specifično težo 0,98 g/ml, kar pomeni, da potujejo s tokovnicami v reaktorju, ker so lažji od vode.

Biofilm nastaja v petih fazah (Aesoy, 1998) (Slika 1):

1. adsorpcija raztopljenih organskih snovi na mokro površino nosilca,
2. transport mikrobnih delcev na površino,
3. prilepljanje mikroorganizmov na površino nosilca,
4. nastanek, produkcija biofilma in razmnoževanje mikroorganizmov,
5. odcepitev biofilma (detachment).



Slika 1: Prikaz nastanka biofilma v petih fazah (<https://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm>)

Nastanek biofilma je opisan s tipično lag fazo, ki ji sledi eksponentna faza rasti. Nato se rast upočasni z večanjem debeline biofilma do končne vrednosti. Tedaj je rast uravnotežena s periodičnim luščenjem biofilma.

Nastanek biofilma je odvisen od procesov, kot so biološki, fizikalni in kemijski (adsorpcija na površino, prilepljanje in odlepljanje mikroorganizmov, transport mikroorganizmov, luščenje biomase). Proses čiščenja odpadne vode je poenostavljen, ker so na nosilcu sočasno lahko različne vrste mikroorganizmov, z različno vlogo pri čiščenju odpadne vode. Na cilindričnih nosilcih Kaldnes se uspešno ustvari biofilm, ki ga sestavljajo različne skupine mikroorganizmov, kot so nitrifikacijske in anaerobne bakterije. V zunanji plasti v aerobnih pogojih (oksičnih razmerah) so našli aerobne nitrifikacijske bakterije in v notranjosti biofilma anaerobne bakterije, za katere je kisik zaviralen (Szatkowska, 2006).

Nosilni elementi z biofilmom se lahko dodajo v obstoječ prezračevalni bazen s suspendiranim blatom na čistilni napravi (MBBR/AS), lahko pa so kot prosto plavajoči nosilci brez suspendiranega blata (MBBR) ali pa kot nasuti sloj v reaktorju.

Postopek ima številne prednosti pred klasičnim postopkom čiščenja s suspendirano biomaso kot na primer manjši vpliv pri nižjih temperaturah na nitrifikacijo (Germain s sod., 2006), koncentracija pritrjene biomase je 10-krat nižja od sistema s suspendirano biomaso, zato je učinek čiščenja manj odvisen od končne separacije (flotacija/filtracija/usedanje) ter pritrjena biomasa je bolj selekcionirana zaradi delovanja v enakih razmerah (brez kroženja med aerobnimi/anaerobnimi razmerami) (Ødegaard s sod., 2006).

2.1.1 Nosilni elementi

V vseh reaktorjih s pritrjenim biofilmom smo kot nosilni element (nosilec) uporabili posebne polietilenske K1 nosilce podjetja AnoxKaldnes™, v nadaljevanje poimenovani Kaldnes K1. Razvilo jih je podjetje Kaldnes K1, proces je patentiran (št. EU patent 0575314, št. USA patenta 5,458,779). Nosilci so posebno profilirani krožni obročki, z dvema križnima predelnima stenama iz polietilena HDPE (z visoko gostoto), z visoko specifično težo 0,98 g/ml, kar pomeni, da potujejo s tokovnicami v reaktorju, ker so lažji od vode. Pri 100 % polnitvi je specifična površina (razmerje površine in volumna) 500 m²/m³. Aktivna specifična površina pri najvišji možni 67 % polnitvi je 335 m²/m³ (Ødegaard s sod., 2006).

Lastnosti nosilcev Kaldnes K1, so prikazane v Preglednici 1. Na sliki (Slika 2) je prikazan nosilec s pritrjeno biomaso in Slika 3 prikazuje gibanje nosilnih elementov po reaktorju.

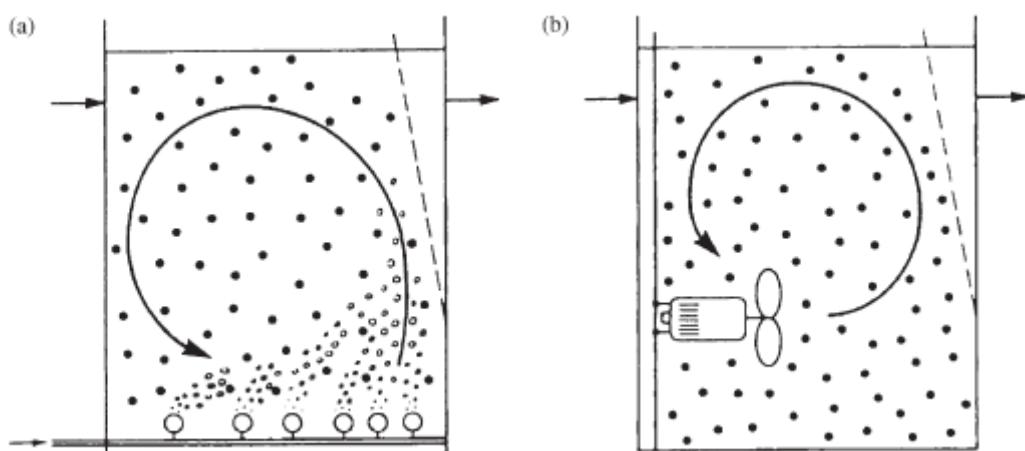
Preglednica 1: Značilnosti nosilcev Kaldnes K1 (Rusten, 1995)

lastnost	enota	vrednost
material		polietilen HDPE
premer	cm	0,9
višina	cm	0,7
gostota	g/ml	0,98
specifična površina	m ² /m ³	500
nasipna gostota	št. nosilcev/100 ml	~100

Pratrjena biomasa, kot biofilm, je večinoma na notranji površini nosilcev v tanki plasti (Slika 2).



Slika 2: Fotografija poraščenosti polietilenskega nosilca s pritrjeno biomaso



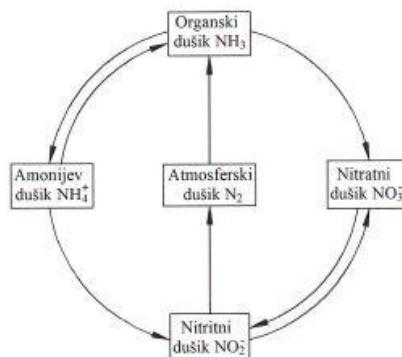
Slika 3: Uporaba nosilnih elementov Kaldnes K1; (a) aerobni reaktor – zračenje (b) anaerobni reaktor – mešanje

2.2 NITRIFIKACIJA V PROCESU ČIŠČENJA ODPADNE VODE

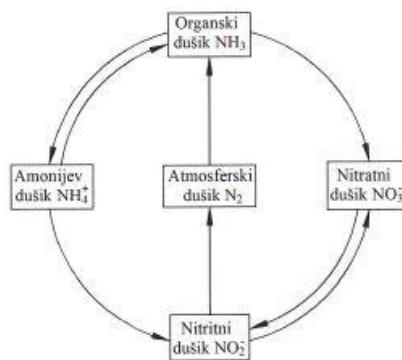
Zgodovina preučevanja procesa nitrifikacije sega v 19. stoletje, ko je avtor Winogradski kot prvi objavil izsledke študije aerobnega procesa oksidacije amonijevega dušika z nitrifikacijskimi bakterijami ali nitrifikatorji (Ann. Inst. Pasteur, 1980). Sledile so študije biokemičnih procesov, objavljene leta 1926 v reviji Chem. Zelle u. Gewebev članku Die Einheit in der Biochemie, avtorjev Kluyver in Donker (Jetten, 2002).

Dušik igra pomembno vlogo v ciklu kroženja vode kot nutrient, ki povzroča evtrofikacijo. Nitrifikacija je dvostopenjska mikrobnna oksidacija amonijevega dušika do nitrata in je ključen proces v odstranjevanju amonijevega dušika iz odpadne vode. V prvi stopnji kemolitoautotrofne amonij oksidirajoče bakterije (AOB) oksidira amonij do nitrita, ki ga nato nitrit oksidirajoče bakterije (NOB) oksidira do nitrata. AOB in NOB skupaj imenujemo nitrifikacijske bakterije ali nitrifikatorji, lahko poimenujemo tudi nitritacijske (AOB) in nitratacijske (NOB) bakterije (Siripong in Rittmann, 2007). Nitrat se z denitrifikacijskimi bakterijami v procesu denitrifikacije reducira do zračnega dušika.

Večina bioloških čistilnih naprav za odstranjevanje dušika uporablja kombinacijo nitrifikacije in denitrifikacije (Xia, 2008).



Slika 4), ki priomoreta k manjšemu vnosu dušika v vodna telesa ter evtrofikacijo (Xia, 2008).



Slika 4: Dušikov cikel v odpadni vodi (Roš, 2015)

Oksidacija amonijevega dušika do nitrita ali nitritacija je dvostopenjski proces (Enačba 1, Enačba 2 in Skupna enačba – Enačba 3).

Enačba 1:



Enačba 2:



Skupna enačba – Enačba 3:



Proces nitrifikacije poteka stabilno pri nizki organski obremenitvi in oksičnih pogojih.

Nitrifikatorji so avtotrofni organizmi, ki za celično rast reducirajo ogljikove spojine v odpadni vodi (npr. ogljikov dioksid). Energijo dobijo z oksidacijo amonijevega dušika in nitratnega dušika, pri čemer nastane malo energije (Roš, 2015). Tako nitrifikatorji, v primerjavi z ostalimi mikroorganizmi, rastejo počasneje, saj imajo celo najhitreje rastoči nitrifikatorji, kot je *Nitrosomonas europaea*, podvojitveni čas, dolg kar 8 ur.

Posebnost nitrifikatorjev je tudi njihova povečana občutljivost na okoljske dejavnike. Nanje inhibitorno delujejo številni dejavniki kot temperatura pod 12 °C, nizek ali visok pH, nizke koncentracije raztopljenega kisika ter tudi številni kemični inhibitorji (Siripong in Rittmann, 2007 po Prosser s sod., 1989).

Pri nitrifikaciji se ob pretvorbi amonijevega dušika preko nitrita v nitrat porablja hidrogenkarbonat (HCO_3^-), kar posledično pomeni zmanjšanje alkalinitete in znižanje pH v kislo, če ni prisotnega hidrogenkarbonata. V odpadni vodi je alkaliniteta rezultat prisotnosti hidroksidov (OH^-), karbonatov (CO_3^{2-}) in hidrogenkarbonatov (HCO_3^-) ter kationov, kot so kalcijev, magnezijev, natrijev, kalijev in amonijev ion (Roš, 2015).

Učinkovitost prve stopnje nitrifikacije, nitritacije je večinoma avtotrofen proces z minimalno prisotnostjo heterotrofnih AOB (Juretscho s sod., 1998). V skupino AOB spadajo predstavniki razreda *Betaproteobacteria*, kot so rodovi *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* in *Nitrosospira*, kot tudi *Gamaproteobacteria* s predstavnikom *Nitrosococcus oceanus*. Koops in Pommerening-Röser (2001), so razdelili AOB znotraj *Nitrosomonas* v 5 evolucijskih linij: *N. europaea/eutropha*, *N. communis*, *N. oligotropha*, *N. marina* in *N. cryotolerans*. V rod *Nitrosococcus* spadajo le morske AOB.

NOB so filogenetsko bolj raznolike kot AOB; vse znane vrste se uvrščajo v enega izmed štirih razredov; rod *Nitrobacter* v *Alfaproteobacteria*, rod *Nitrococcus* v *Deltaproteobacteria*, rod *Nitrospina* v *Betaproteobacteria* in rod *Nitrospira* v svoje deblo *Nitrospira* (Teske s sod., 1994; Ehrich s sod., 1995, Daims s sod., 2001).

Za najpomembnejša predstavnika nitrifikatorjev sta, do nedavnega, veljala rodova *Nitrosomonas* ter *Nitrobacter*, ki oksidirata amonij do nitrita in nitrata. Vendar pa študije kažejo, da imajo pomembno vlogo tudi druge bakterije, ki jih najdemo v rodu *Nitrosospira* (Aoi s sod., 2000; Coskuner in Curtis, 2002) in rodu *Nitrospira*, saj lahko predstavljajo dominanten delež nitratacijskih in nitritacijskih bakterij v sistemih z aktivnim blatom (Juretschko s sod., 1998; Burrell s sod., 1998).

V zadnjih letih je več objav različnih avtorjev, ki potrjujejo vključenost amonij oksidirajočih arhej AOA pri nitrifikaciji (Proser in Nicol, 2008). Znani so pojavi v različnih okoljih, kot so v zemlji (Leininger s sod., 2006), sedimentih (Beman in Francis, 2008), podzemnih vodah (de Vet, 2009) ali oceanih (Beman s sod., 2008).

Poleg bakterijskih pa so poznani tudi arhejski nitrifikatorji (Nicola in Schleper, 2005). Z uporabo molekularnih metod so Park s sod. (2006) dokazali prisotnost amonij-oksidirajočih arhej (AOA) v aktivnem blatu reaktorjev. Z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov za gene arhejske amonijeve monooksigenaze (*amoA*), so zaznali prisotnost arhej v aktivnem blatu čistilnih naprav.

N. europaea je poglaviti mikroorganizem sistemov odstranjevanja dušika, saj je obligatna kemolitotrofna amonij-oksidirajoča bakterija, ki je odgovorna za oksidacijo amonijevega dušika v nitritni dušik, kar ji omogoča pridobivanje energije za rast (Shi s sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

A. SINTETIČNA ODPADNA VODA

Pripravili smo 10 L koncentrirane raztopine tako, da smo v 10 L vodovodne vode dodali 280 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 1 g KH_2PO_4 . Po 2,6 L smo odmerili z merilnim valjem v PVC posode, jih hermetično zaprli in shranili v hladilniku do uporabe. Ob pripravi končne dotočne odpadne vode, smo 2,6 L koncentrirane raztopine razredčili z vodovodno vodo do 200 L. Pričakovana koncentracija v razredčeni sintetični odpadni vodi, je bila okoli 90 mg/L amonijevega dušika in 0,3 mg/L fosforja, odvisno od natančnega doziranja vodovodne vode pri pripravi.

B. MEHANSKO ČIŠČENA ODPADNA VODA

Mehansko čiščena odpadna voda predstavlja odpadno vodo po mehanskem čiščenju na CČN DK, ki je razbremenjena mehanskih delcev.

C. NEVTRALIZACIJSKA RAZTOPINA

Pripravili smo 211 g Na_2CO_3 /10 L demineralizirane vode.

D. RASTNI PUDEZ

Rastni puder (LAR, Nitritox monitor, Growth powder, Art. 704751) vsebuje mikroelemente, potrebne za rast bakterij. Dodajali smo ga sočasno ob pripravi 200 L laboratorijske sintetične odpadne vode. Razvili so ga z namenom vzdrževanja mikroorganizmov v reaktorju on-line merilnika za določevanje inhibicije nitrifikacije.

3.1.1 Komplet za izolacijo DNK

Ultra clean soil DNK Isolation Kit (MoBIO Solano BeCH, CA, USA) za izolacijo DNK z nosilcev.

3.1.2 Encimi

- GoTaq DNK polimeraza z $10 \times$ pufrom (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA),
- *HaeIII* (GG↓CC) s pripadajočim pufrom (MBI Fermentas, Litva),
- *MspI* (C↓CGG) s pripadajočim pufrom (MBI Fermentas, Litva),
- *TaqI* (T↓CGA) s pripadajočim pufrom (MBI Fermentas, Litva).

3.1.3 Pufri in raztopine

- TAE pufer $50 \times$ ($V = 1 \text{ L}$),
- 242 g Tris Base,
- 37,1 mL ledocetne kisline,
- 100 mL 0,5 M EDTA, pH = 8,
- dH₂O do 1000 mL, skupni pH = 8,5.

3.1.4 Začetni oligonukleotidi

Bakterijski (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija):

- 16S rRNA: 6-FAM 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Tm = 51,6 °C
927R: 5'-CCGTCAATTCTTTRAGTTT-3', Tm = 46,5 °C,
- *amoA*: 6-FAM amo1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3', Tm = 66 °C
amo2F: 5'-CCCCTC(G/T)G(G/C)AAAGCCTTCTTC-3', Tm = 73 °C.

Arhejski (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija):

- 16S rRNA: 6-FAM AR 109F: 5'-ACRGCTCAGAACAGGT-3', Tm = 54 °C,
- AR 915R: 5'-GTGCTCCCCGCCAATTCTT-3', Tm = 63 °C.

3.1.5 TRFLP

Kapilarna elektroforeza ABI PRISM 310 (Applied Biosystems Inc.)

3.1.6 Bioinformacijska orodja

- GenScan (Applied Biosystems),
- Genotyper (Applied Biosystems),
- Bionumerics 3.0 (Applied Maths, Belgija),
- TDistinctiEnz program za *in silico* TRFLP,
- http://www.bioinformatics.org/~docreza/cgi-bin/restriction/t_DistinctiEnz.pl),
- program za izračun temperature tališča začetnih oligonukleotidov, (<http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>).

3.2 APARATURE/NAPRAVE

3.2.1 Reaktorji

Eksperimentalno delo je potekalo v reaktorjih, napolnjenih s Kaldnes K1 nosilci. V Preglednici 2 je naveden opis reaktorjev (Preglednica 2):

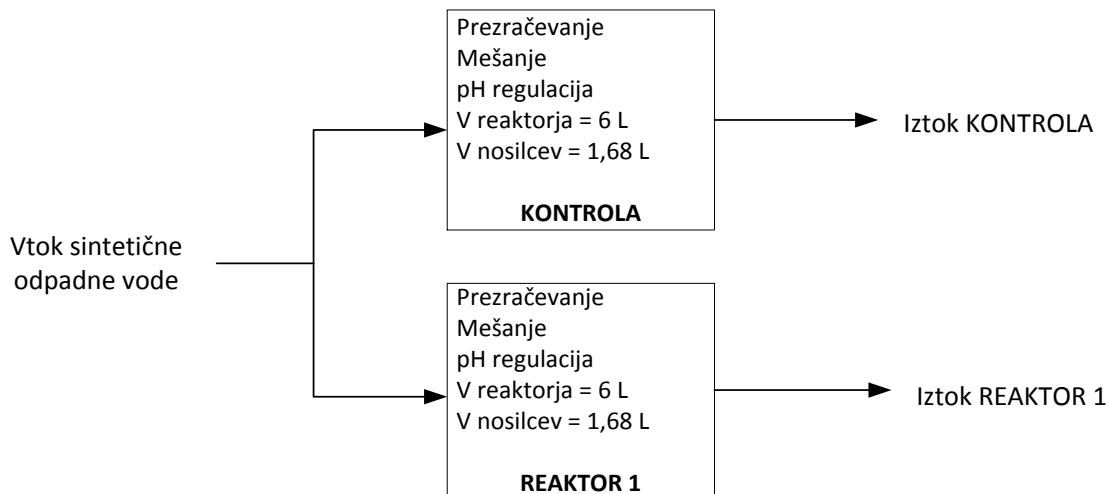
Preglednica 2: Opis MBBR reaktorjev

Ime	Oznaka	Odpadna voda (točka 3.1.1.A-D)	Polnitev (%)	Volumen nosilcev Kaldnes K1 K1	Volumen reaktorja	Temperatura (°C)	Aktivna specifična površina biofilma glede na volumsko polnitev (m ² /m ³)
Mini reaktor	K R1	Sintetična A+C+D	31	1,86 L	6 L	20±1	155
Mini reaktor CČN	2-NI/ 3-NI	Po mehanski stopnji	50 52	5,2 L 3, L	10,4 L 6,7 L	20±1	250 260
Zunanji B reaktor CČN	OXI 1/ OXI 2	Po mehanski stopnji	50	65 m ³ 57,5 m ³	130 m ³ 115 m ³	10–20 (odvisno od okolja)	250

3.2.1.1 Mini reaktor

Mini reaktor sta sestavljala dva paralelna, ločena aerobna reaktorja iz pleksi stekla, delovnega volumna 6 L, poimenovana KONTROLA (K) in REAKTOR 1 (R1). Oba

reaktorja sta bila napolnjena z nosilci Kaldnes K1, in sicer 1,86 L nosilcev/6 L reaktor, kar pomeni 31 % polnitez. Reaktorja sta bila ločena ter vodena kot paralelni preizkus.



Slika 5: Shema mini pilotnega reaktorja KONTROLA IN REAKTOR 1 s pH regulacijo (Hach-Lange), napoljenega z nosilci Kaldnes K1



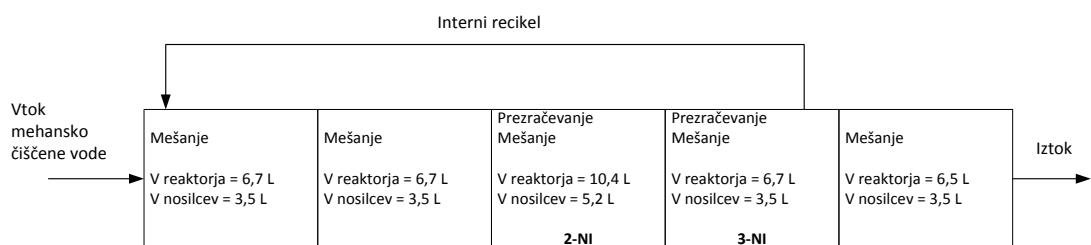
Slika 6: Mini reaktor CČN s pH regulacijo (Hach-Lange), napoljen z nosilci Kaldnes K1

3.2.1.2 Mini reaktor CČN

Mini reaktor CČN sestavlja pet zaporedno povezanih reaktorjev iz pleksi stekla, od tega dva za denitrifikacijo (anoksična reaktorja) in dva za nitrifikacijo (aerobna reaktorja) ter

zadnji za denitrifikacijo, vsi napoljeni z nosilnimi elementi Kaldnes K1 (Slika 8 in Slika 9).

Reaktor 2-NI, ima delovni volumen 10,4 L, polnenje z nosilci je 50 %, kar pomeni, da je volumen nosilcev Kaldnes K1 5,2 L. Reaktor 3-NI, ima delovni volumen 6,7 L, polnenje z nosilci je 52 %, kar pomeni, da je volumen nosilcev Kaldnes K1 3,5 L.



Slika 7: Shema mini pilotnega reaktorja CČN



Slika 8: Slika mini reaktorja CČN

3.2.1.3 Zunanji B reaktor CČN

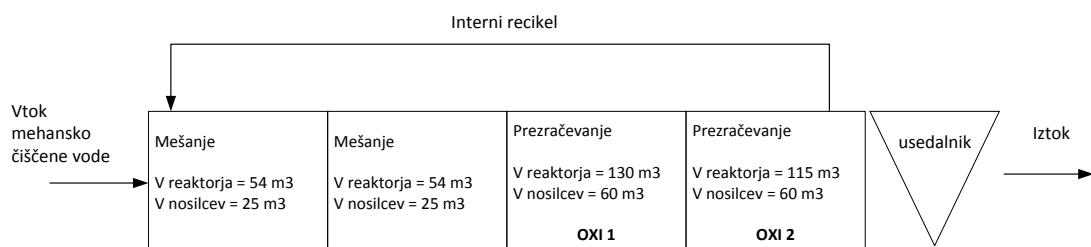
Zunanji B reaktor je industrijska pilotna naprava, locirana v polovico prezračevalnega bazena CČN C. Sestavlja ga štirje zaporedno povezani reaktorji, od tega dva za

denitrifikacijo (anoksična reaktorja) in dva za nitrifikacijo (aerobna reaktorja), napolnjeni s polietilenskimi nosilci tipa Kaldnes K1.

Vse analize so bile opravljene samo v dveh reaktorjih za nitrifikacijo, poimenovanih OXI 1 in OXI 2 (Slika 9). Reaktorji za denitrifikacijo niso bili vključeni v raziskavo.

Vtočna odpadna voda je mehansko čiščena odpadna voda CČN. Pretok odpadne vode je bil konstanten ($53 \text{ m}^3/\text{h}$). V obeh reaktorjih OXI 1 in OXI 2 je bilo zagotovljeno popolno mešanje z vpihanim zrakom, zračenje je bilo zagotovljeno preko vpihavanja zraka skozi perforirane cevi s puhalom na kompresorski postaji CČN, koncentracija kisika je znašala nad 5 mg/L .

Vtočna odpadna voda je iztok po mehanski stopnji CČN, kar pomeni mehansko čiščena odpadna voda. Industrijska pilotna naprava je tako izpostavljena sezonskemu nihanju temperature ter dnevnih bremenitev po vsebini različnih snovi ter vsebnosti inhibitorjih snovi, ki so v odpadni vodi po mehanski stopnji.



Slika 9: Shema zunanjega B reaktorja CČN



Slika 10: Slika zunanjega B reaktorja CČN

3.2.2 Ostala oprema

- centrifuga (Sigma Laboratory centrifuges, Nemčija),
- elektroforeza (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Nemčija),
- aparat za verižno reakcijo s polimerazo (Biometra Tprofessional Standard Gradient Thermocycler, Nemčija).

3.3 ANALIZNE METODE

Za lažje razumevanje mikrobiološke razgradnje organskih snovi je treba meriti in spremljati vrsto različnih parametrov, ki smo jih razdelili v naslednji skupini:

1. fizikalne in kemijske metode: meritev temperature, pH, merjenje koncentracije raztopljenega kisika, merjenje kemijske potrebe po kisiku, biokemijske potrebe po kisiku, nitratnega dušika, nitritnega dušika, amonijevega dušika in celotnega dušika.
2. biološke-molekularne metode za ugotavljanje sestave in spremljanje aktivnosti mikrobnih združb v biofilmu.

3.3.1 Fizikalne in kemijske metode

Odpadno vodo lahko razdelimo na celotni in topni del, pri čemer pomeni topni del, tisti del odpadne vode, ki gre skozi filtrirni papir premera por 0,45 µm in pa 1 µm.

3.3.1.1 Meritev temperature

Meritev temperature je bila izvedena po metodi DIN 38404 (1976) s prenosno sondo Hach-Lange (Nemčija), ki omogoča meritev temperature ob sočasni meritvi koncentracije raztopljenega kisika.

3.3.1.2 Meritev pH

Meritev pH vzorcev je bila izvedena z laboratorijskim pH metrom WTW Inolab ter s stacionarnimi elektrodami za regulacijo pH Hach-Lange v reaktorjih.

3.3.1.3 Določanje koncentracije raztopljenega kisika

Koncentracija raztopljenega kisika v mg/L je masa kisika, raztopljenega na volumsko enoto vode, ali odpadne vode. Meritev se izvaja s pomočjo prenosne kisikove sonde LDO Hach-Lange.

3.3.1.4 Določanje kemijske potrebe po kisiku

Kemijska potreba po kisiku (KPK) v mg/L je masna koncentracija ekvivalenta kisika za količino porabljenega dikromata pri določenih razmerah, ki se uporabi kot kemijski oksidant za popolno oksidacijo organske snovi. S kemijsko oksidacijo določimo porabo kisika za popolno oksidacijo organskih snovi v odpadni vodi. Večja, kot je vrednost KPK, večje je onesnaženje odpadne vode.

Analizo kemijske potrebe po kisiku (KPK) smo izvedli po metodi SIST ISO 6060: 1996 s LCK 114 in LCK 314 kivetnimi testi Hach-Lange. Pri tej analizi pride do kemijske oksidacije testnega vzorca. Oksidacija poteka pri 170 °C, 15 min na razklopni enoti HT Hach-Lange. Po 15 minutah na spektrofotometru Hach Lange DR 2800 odčitamo vrednost.

3.3.1.5 Določanje nitratnega dušika

Koncentracija nitratnega dušika ($\text{NO}_3\text{-N}$) v mg/L predstavlja masno koncentracijo dušika v obliki nitratnega iona. Koncentracija nitrata se določi spektrofotometrično s kivetnim testom Hach-Lange LCK 339. Nitrat reagira v močno kisli raztopini žveplene in fosforne kisline z 2,6 dimetilfenolom, pri čemer nastane obarvana spojina 4-nitro-2,6-dimetilfenol. Po 15 minutah na spektrofotometru Hach Lange DR 2800 odčitamo vrednost.

3.3.1.6 Določanje nitritnega dušika

Koncentracija nitritnega dušika ($\text{NO}_2\text{-N}$) v mg/L predstavlja masno koncentracijo dušika v nitritu. Koncentracija nitrita se določi spektrofotometrično s kivetnim testom Hach-Lange LCK 341. Nitrit reagira s 4-aminobenzensulfonamidom v močno kislem mediju fosforne kisline, pri čemer nastane obarvana diazonijeva sol. Po 15 minutah na spektrofotometru Hach-Lange DR 2800 odčitamo vrednost.

3.3.1.7 Določanje skupnega dušika

Celotni dušik (TN) v mg/L predstavlja vsoto masnih koncentracij organskega, amonijevega, nitritnega in nitratnega dušika. Koncentracijo celotnega dušika smo določevali spektrofotometrično z originalnimi kivetnimi testom Hach-Lange LCK 238. V kiveto za razklop odpipetiramo 0,5 ml vzorca, dodamo 2 ml reagenta A ter 1 tabletko

katalizatorja B. Razklop vzorca v kislem mediju poteka v razklopni enoti Hach-Lange HT pri temperaturi 170 °C, 15 min. Po razklopu in ohladitvi na sobno temperaturo v kiveto za razklop dodamo reagent C, premešamo. Odpipetiramo 0,5 ml v kiveto, v kateri je že kislinski medij, dodamo 0,2 ml reagenta D, zapremo in pretresemo. Po 15 minutah na spektrofotometru Hach Lange DR 2800 odčitamo vrednost.

3.3.1.8 Določanje amonijevega dušika

Amonijev dušik ($\text{NH}_4\text{-N}$) v mg/L predstavlja masno koncentracijo dušika v obliki amonijevega iona. Analiza amonijevega dušika je bila izvedena s kivetnimi testi Hach-Lange LCK 304 in LCK 305. Po 15 minutah na spektrofotometru Hach Lange DR 2800 odčitamo vrednost.

3.3.1.9 Merjenje pretokov odpadne vode

Meritev pretoka v Zunanji B reaktor je potekala z merilnikom pretoka. Vtok odpadne vode na Mini reaktorje, smo dosegli s peristaltičnimi črpalkami Watson Marlow. Črpalke so zagotavljale konstanten pretok skozi celoten sistem. Pretok vode smo merili tako, da smo izmerili čas napolnitve dveh 50 ml steklenih bučk. Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost obeh meritev v istem dnevu.

3.3.2 Izračuni

3.3.2.1 Izračun hidravličnega zadrževalnega časa (HRT)

Hidravlični zadrževalni čas reaktorja je čas, v katerem se zadržuje odpadna voda v posameznem reaktorju. Izračunali smo ga kot količnik med prostornino reaktorja in pretokom odpadne vode.

Izračun hidravličnega časa v nitrifikacijskih reaktorjih:

$$\text{HRT} = \frac{V}{Q}$$

V volumen reaktorja (L)

Q pretok na vtoku v reaktor (L/h)

3.3.2.2 Izračun hitrosti nitrifikacije

Hitrost nitrifikacije predstavlja hitrost pretvorbe amonijevega dušika v nitratni dušik v časovni enoti, izražena kot mgN/L h. Pokaže nam aktivnost nitrifikatorjev. V nalogi smo hitrost nitrifikacije izrazili z obremenitvijo reaktorjev oziroma hitrostjo odstranitve amonijevega dušika.

Enačba 4: Izračun obremenitve.

$$L(\text{N-NH}_4, \text{reaktor}) = C(\text{NH}_4\text{-N, vtok}) / \text{HRT}$$

$L(\text{NH}_4\text{-N, reaktor})$	obremenitev nitrifikacijskih reaktorjev z amonijevim dušikom v časovni enoti (mgN/L h)
$C(\text{NH}_4\text{-N, vtok})$	konzentracija amonijevega dušika v vtoku v nitrifikacijski reaktor
HRT	hidravlični zadrževalni čas v nitrifikacijskih reaktorjih

Enačba 5: Izračun specifične obremenitve nitrifikacijskih reaktorjev

$$L^*(\text{NH}_4\text{-N, reaktor}) = (\text{NH}_4\text{-N, reaktor}) \times 24/\text{As}$$

$L^*(\text{NH}_4\text{-N, reaktor})$	Specifična obremenitev nitrifikacijskih reaktorjev z amonijevim dušikom v časovni enoti ($\text{gN/m}^2\text{.d}$)
As	Aktivna specifična površina nosilnih elementov v reaktorju (npr. $250 \text{ m}^2/\text{m}^3$ pri 50 % polnitvi)

Hitrost nitrifikacije r_{NIT} smo prikazali z razliko med koncentracijami amonijevega dušika v vtoku in iztoku iz reaktorjev in nam pove, koliko miligramov amonijevega dušika se pretvori v eni uri v enim litru.

Enačba 6: Izračun hitrosti nitrifikacije

$$r_{\text{NIT}} = (C(\text{NH}_4\text{-N, vtok}) - C(\text{NH}_4\text{-N, reaktor})) / \text{HRT}$$

r_{NIT}	hitrost nitrifikacije v mgN/L.h
$C(\text{NH}_4\text{-N, vtok})$	koncentracija amonijevega dušika v vtoku v nitrifikacijski reaktor
$C(\text{NH}_4\text{-N, reaktor})$	koncentracija amonijevega dušika v nitrifikacijskem reaktorju
HRT	hidravlični zadrževalni čas v nitrifikacijskih reaktorjih

Enačba 7: Izračun specifične hitrosti nitrifikacije.

$$\text{Specifična hitrost nitrifikacije } r^*_{\text{NIT}} = r_{\text{NIT}} \times 24/\text{As}$$

r^*_{NIT}

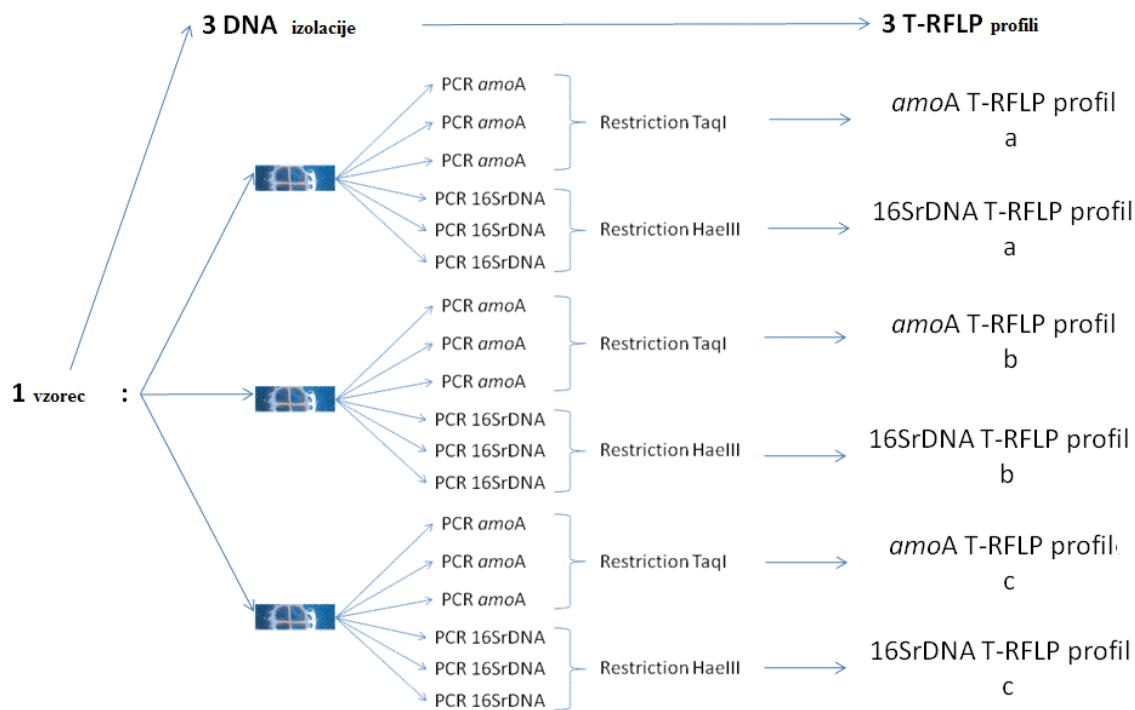
specifična hitrost nitrifikacije v gN/m².dan

3.3.3 Biološke-molekularne metode

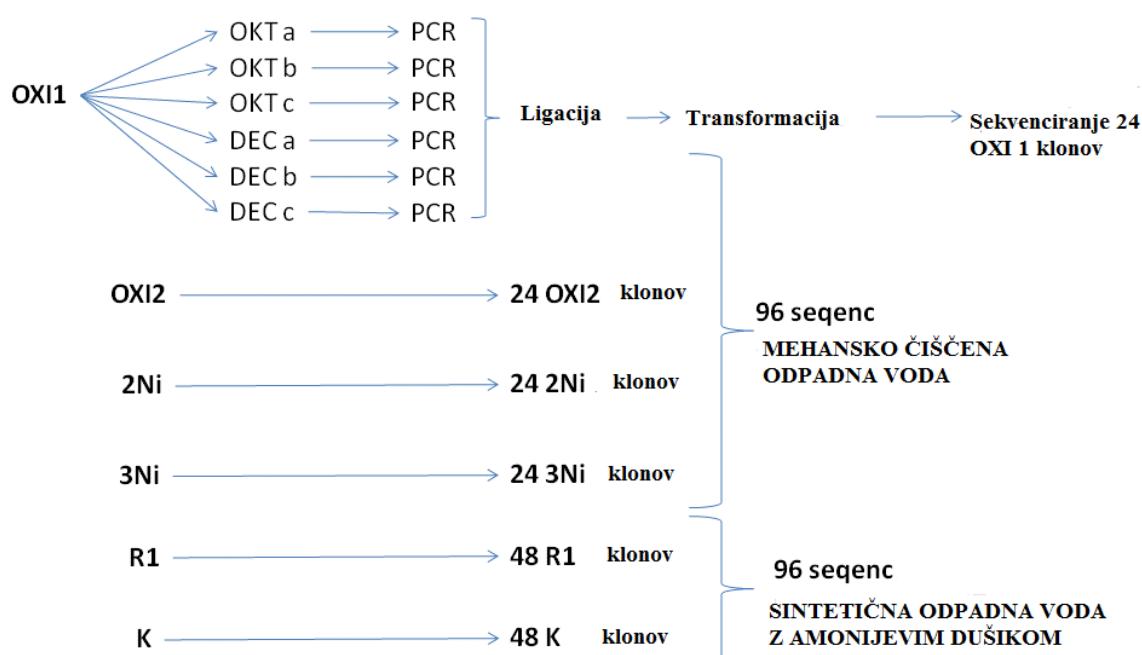
Ob vsakem vzočenju biofilma smo iz reaktorjev odvzeli večje število nosilcev (≥ 10), jih takoj shranili pri temperaturi -20°C do prenosa na -80°C . DNK posameznih vzorcev smo izolirali v treh neodvisnih ponovitvah (trije nosilčki Kaldnes K1 istega vzorca). Nato smo iz vsake izolirane DNK izvedli tri paralelne PCR reakcije, ki smo jih po končani reakciji PCR združili. Produkte PCR smo očistili iz elektroforetskega gela. Slika 11 in Slika 12 prikazujeta shemi reakcij.

Za TRFLP smo pripravili restriktijsko reakcijo PCR produktov, ki je tekla čez noč. Nato smo vzorce pripravili za kapilarno elektroforezo ter jih analizirali.

Za klonske knjižnice smo vse ponovitve, izolirane DNK posameznega vzorca, enkrat pomnožili z reakcijo PCR 16S rRNA in *amoA*, nato pa PCR produkte vseh ponovitev posameznega vzorca, zmešali med seboj ter klonirali.



Slika 11: Eksperimentalna shema analize TRFLP posameznega vzorca CČN DK



Slika 12: Eksperimentalna shema priprave posamezne klonske knjižnice

3.3.3.1 Izolacija DNK iz biofilmov nosilcev Kaldnes K1

Med optimizacijo metod smo ugotovili, da najboljše rezultate daje izolacija DNK iz $\frac{1}{2}$ nosilca Kaldnes K1. Nosilec smo s sterilnim skalpelom razrezali na pol in nato eno polovico dodatno razrezali na pribl. 10 manjših koščkov. Naprej smo delali po navodilih za izolacijo DNK s priborom MOBIO Ultra Clean Soil DNK Isolation Kit. Delali smo v treh paralelkah, pridobili 3 DNK izolacije in 3 TRFLP profile.

3.3.3.2 PCR verižna reakcija s polimerazo

900 bp dolg odsek gena za 16S rRNA smo pomnožili v 17 ciklih reakcije PCR po Kraigher s sod. (2006) z uporabo oligonukleotidnih začetnikov 27f (Weisburg s sod., 1991) in 927r (Heuer in Smalla, 1997).

25 μL PCR reakcija je vsebovala 1x GoTaq Flexi pufer, 2 mM MgCl₂, 0,2 g/l BSA, 1 % formamid, 200 μM dNTP, 200 μM obeh primerjev, GoTaq Flexi polimerazo (0,625 U/). 25 μL PCR reakcijo (Promega Madison, WI, USA) in 1 μL DNK. PCR protokol je vseboval 2 min denaturacijo pri 95 °C, ki ji je sledilo 18 ciklov z denaturacijo (1 min pri 95 °C), annealing, extension in končna extension.

491 dolg odsek funkcionalnega gena *amoA* smo pomnožili z metodo nested PCR, kjer je primarni PCR potekal po protokolu Webster s sod. (2002) z oligonukleotidnimi začetniki *amoA* 2F in *amoA* 5R, sekundarni pa po Avrahami s sod. (2003) z oligonukleotidnima začetnikoma *amoA* 1F in *amoA* 2R (Rotthauwe s sod., 1997), z nekaj modifikacijami: denaturaciji (2 min na 95 °C) je sledilo 30 ciklov z 1 min denaturacijo pri 95 °C, 1 min annealing pri 60 °C, 1 min extension pri 72 °C ter končni 5 min extension pri 72 °C.

PCR reakcija je vsebovala 1x GoTaq Flexi pufer, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 g/l BSA, 1 % formamid, 200 μM dNTP, 300 μM obeh primerjev, GoTaq Flexi polimerazo (0,625 U/). 25 μL PCR reakcijo (Promega Madison, WI, USA) in 1 μL DNK. PCR protokol je bil modificiran po Webster s sod 2002 in je vseboval 2 min denaturacijo pri 95 °C, ki ji je

sledil annaling z nižanjem temperature s 55 °C na 45 °C (1 min in 19 ciklov), dodatnih 14 ciklov s temp. 45 °C, extension 1 min na 72 °C in končna extension 5 min na 72 °C.

Druga nested PCR reakcija je vsebovala 1x GoTaq Flexi pufer, 4 mM MgCl₂, 0,2 g/l BSA, 1 % formamid, 200 µM dNTP, 500 µM obeh primerjev, GoTaq Flexi polimerazo (0,625 U/). 25 µL PCR reakcijo (Promega Madison, WI, USA) in 1 µL primarnega PCR produkta.

Za vse PCR reakcije smo uporabili polimerazo GoTaq proizvajalca Promega.

3.3.3.3 TRFLP

Fluorescentno označene PCR produkte 16S rRNA in *amoA*, smo rezali z restrikcijskim encimom HaeIII, *amoA* pa z restrikcijskim encimom TaqI, proizvajalca MBI Fermentas, Lithuania) po Stres s sod., (2008). Razrezane restrikcijske produkte smo skoncentrirali z etanolno precipitacijo ter analizirali s kapilarno elektroforezo na 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystemm, CA, USA) z uporabo Genscan 500 ROX (Applied Biosystemm, CA, USA) kot v Stres s sod., (2008). Rezultate kapilarne elektroforeze smo analizirali z računalniškim programskim orodjem Bionumerics 3.0 (Applied Maths, Belgija). PEarsonov koeficient korelacji smo uporabili za primerjavo podobnosti posameznih vzorcev in TRFLP profilov. Za izris dreves smo uporabili metodo UPGMA-Upweight Pair Group Method with Arithmetic means, slov. neuravnotežena metoda parnih skupin z aritmetično sredino.

3.3.3.4 Klonske knjižnice

PCR produkte 16S rRNA in *amoA* smo s kitom pGEM-T (Promega) ligirali v vektor pGEM-T ter vektor transformirali v kompetentne celice JM109 (Promega). Kolonije transformiranih JM109 klonov smo poslali na sekvenciranje podjetju Macrogen Inc. Nato smo klonske knjižnice analizirali s spletnimi orodji RDP (Ribosomal Database Project), BLAST in programsko opremo oblikovali filogenetsko drevo (MEGA4).

3.4 OBRATOVANJE REAKTORJEV

3.4.1 Mini reaktor

Vtok v oba ločena reaktorja je bila sintetična odpadna voda (točka A iz 3.1.1.), dovajana preko peristaltične črpalke Watson-Marlow, ki je zagotavljala stalen in enakomeren vtok odpadne vode in posledično s tem tudi iztok. Vtočna odpadna voda je imela stalno sestavo. Pričakovana koncentracija v vtočni odpadni vodi, je okoli 90 mg/L amonijevega dušika in 0,3 mg/L fosforja, odvisno od natančnega doziranja vodovodne vode pri pripravi. V vtočni odpadni vodi ni prisotnega organskega dušika, zato je skupni dušik vsota amonijevega, nitratnega in nitritnega dušika.

Nosilci so bili preneseni iz OXI 1 reaktorja. V času šestih mesecev pred začetkom vzorčenja, kolikor je trajala adaptacija reaktorja, smo redno spremljali stopnjo nitrifikacije ter povečevali obremenitev, da je bila koncentracija amonijevega dušika v iztoku vedno okoli 1 mg/L NH₄-N, z namenom vzdrževanja visoke aktivnosti. Pretok se je reguliral preko obratov na WM črpalki (v %) ali z različnimi debelinami cevk.

Zračenje je bilo zagotovljeno z vpihavanjem zraka s puhalom preko akvarijskih kamenčkov. Koncentracija kisika je znašala nad 7 mg/L (zahtevana meja za biofilm na Kaldnes K1 nosilcih je 5 mg/L). Poleg tega je bilo zagotovljeno, v obeh reaktorjih, popolno mešanje z mešalom RS9000 (Digital Overhead Stirrer, Bochem, Germany) pri hitrosti 400–600 obratov.

Regulacija pH na vrednost 7,5 je potekala s sistemom Hach-Lange, sestavljenim iz pH elektrod, kontrolerja ter črpalk za dovanjanje nevtralizacijske raztopine natrijevega karbonata (Na₂CO₃). Nevtralizacijska raztopina se uporablja kot sredstvo za vzdrževanje želenega pH ter kot vir anorganskega ogljika.

3.4.2 Mini reaktor CČN

Vtočna odpadna voda je mehansko čiščena odpadna voda, dovajana preko peristaltične črpalke Watson-Marlow v prvi reaktor za denitrifikacijo, ki je zagotavljala stalen in enakomeren vtok odpadne vode in posledično s tem tudi iztok. Sledi še en reaktor za denitrifikacijo in nato dva zaporedno vezana reaktorja za nitrifikacijo imenovana 2NI in 3NI, v katerih smo izvajali vzorčenje. Iz 3NI reaktorja, je izveden povratek v prvi denitrifikacijski reaktor. Zadnjemu reaktorju za nitrifikacijo je sledil še en reaktor za denitrifikacijo.

Pretok se je reguliral preko obratov na črpalki (v %) ali z različnimi debelinami cevk.

Zračenje je bilo zagotovljeno preko vpihanja zraka s puhalom preko akvarijskih kamenčkov in zračnih črpalk. Zahtevana meja raztopljenega kisika v MBBR sistemih je nad 5 mg/L. Reaktorji za denitrifikacijo niso imeli prezračevanja, samo mešanje. V obeh reaktorjih 2-NI in 3-NI, smo zagotovljali dodatno mešanje z mešali RS9000 (Digital Overhead Stirrer, Bochem, Germany) pri hitrosti 400–600 obratov

Regulacija pH v procesu nitrifikacije ni bila potrebna zaradi vključenega procesa denitrifikacije v reaktorjih.

Vse analize so bile opravljene samo v dveh reaktorjih za nitrifikacijo, poimenovanih 2-NI in 3-NI. Reaktorji za denitrifikacijo niso bili vključeni v raziskavo.

3.4.3 Zunanji B reaktor CČN

Zunanji B reaktor je industrijska pilotna naprava, locirana v polovici enega aerobnega prezračevalnega bazena CČN C3. Sestavlja ga štirje zaporedno povezani reaktorji, od tega prva dva za denitrifikacijo, sledita dva za nitrifikacijo, vsi napolnjeni s polietilenskimi nosilci Kaldnes K1. Iz zadnjega reaktorja za nitrifikacijo je bil izveden notranji recikel v prvi denitrifikacijski reaktor.

Vse analize so bile opravljene samo v dveh reaktorjih za nitrifikacijo, poimenovanih OXI 1 in OXI 2. Reaktorji za denitrifikacijo niso bili vključeni v raziskavo.

Vtočna odpadna voda je iztok po mehanski stopnji CČN, dovajana preko črpalke v prvi reaktor za denitrifikacijo, ki je zagotavljala stalen in enakomeren vtok odpadne vode in posledično s tem tudi iztok. Pretok odpadne vode je bil konstanten ($53 \text{ m}^3/\text{h}$).

V obeh reaktorjih OXI 1 in OXI 2 je bilo zagotovljeno zračenje z vpihanim zrakom, ki je zagotovljalo tudi intenzivno mešanje. Zračenje je bilo zagotovljeno preko vpihavanja zraka skozi perforirane cevi, nameščene na dnu reaktorja, s puhalom na kompresorski postaji CČN. Koncentracija raztopljenega kisika je znašala nad 5 mg/L .

3.5 VZORČENJE

3.5.1 Vzorci vtočne in iztočne odpadne vode

3.5.1.1 Mini pilotni reaktor

Vtok v oba ločena reaktorja Kontrola in Reaktor 1, je bila sintetična vtočna odpadna voda. Vsako jutro smo pripravili svežo, v količini 200 L za oba reaktorja. Ob tem smo vzorčili trenutni vzorec iz 200 L posode in ga takoj analizirali. Iztok iz reaktorjev smo zbirali v plastično posodo 1 L, vsako jutro približno 30 min, zato je bil trenutni vzorec, ki smo ga takoj analizirali.

3.5.1.2 Mini reaktor CČN in Zunanji B reaktor CČN

Vtočna odpadna voda je mehansko čiščena odpadna voda. V industrijski reaktor Zunanji B pilot je dotekala konstantno, zato smo vzorčili 24-urne povprečne vzorce. Vsako jutro smo v 200 L posodo nalili 200 L odpadne vode, ki je zadoščala za 24 ur. Ob tem smo vzorčili trenutni vzorec iz 200 L posode in ga takoj analizirali.

Vzorec iz reaktorja 2-NI, smo vzeli iz reaktorja kot trenutni vzorec, iztok iz reaktorja 3-NI, smo zbirali v plastično posodo 1 L, vsako jutro približno 30 min, zato je bil trenutni vzorec, ki smo ga takoj analizirali.

Trenutni vzorec iz Oxi 1 in Oxi 2 smo vzorčili iz reaktorja in takoj analizirali.

3.5.2 Vzorci biomase in bakterijskih združb

Iz posameznih reaktorjev OXI 1, OXI 2, 2-NI, 3-NI, K in R1, smo ob različnih časih vzorčili po več (pribl. 20) nosilcev Kaldnes K1 naenkrat ter jih shranili na – 80 °C. Vzorci OXI1, OXI2, 2NI, 3NI, R1 in K so bili vzorčeni vsaj dvakrat v obdobju od oktobra 2007 do januarja 2008 (Preglednica 3).

Preglednica 3: Vzorčenje obraščenih nosilnih elementov Kaldnes K1 iz reaktorjev

DATUM VZORČENJA	ZUNANJI B REAKTOR		MINI REAKTOR CČN		MINI REAKTOR	
	OXI 1	OXI 2	2-NI	3-NI	K	R1
19. 10. 2007	DA	DA	DA	DA	DA	DA
7. 11. 2007	X	X	X	X	DA	DA
20. 11. 2007	X	X	X	X	DA	DA
20. 12. 2007	DA	DA	X	X	DA	DA
18. 1. 2008	X	X	DA	DA	DA	DA

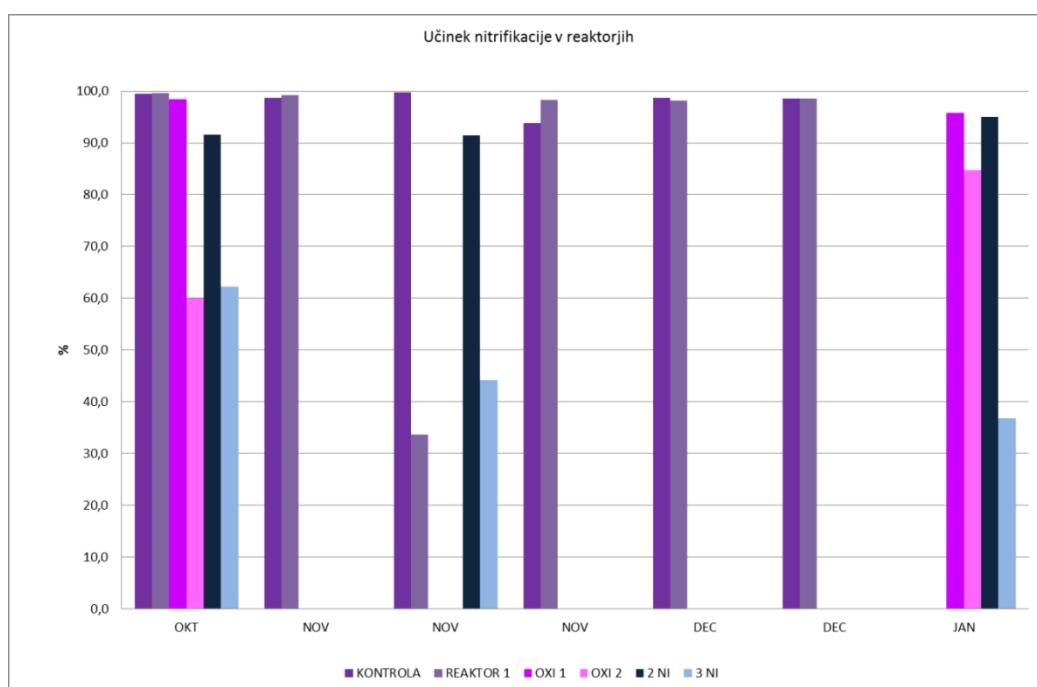
Za analiziranje smo izbrali vse vzorce OXI1, OXI2, 2NI, 3NI ter oktobrske, decembriske in januarske R1 in K vzorce. Vzorce za analize TRFLP smo označili po imenu, mesecu vzorčenja (OKT, DEC, JAN) ter ponovitvi (a, b, c) izolirane DNK (npr. OXI1 DEC a).

4 REZULTATI

V raziskavah smo v prvem delu primerjali učinek nitrifikacije v reaktorjih, v drugem delu prisotnost, pestrost in stabilnost mikrobnih združb na osnovi zaporedij 16S rRNA, kot tudi specifičnih funkcionalnih genov (npr. *amoA*), in sicer glede na različno vrsto odpadne vode ter letni čas.

4.1 UČINEK NITRIFIKACIJE

V reaktorjih smo spremljali učinek nitrifikacije z zmanjšanjem amonijevega dušika in porasta nitritnega ter nitratnega dušika, glede na primerjavo med vtočno in sintetično odpadno vodo in iztočno čiščeno odpadno vodo (Slika 13, Slika 14, Slika 15 in Slika 16).



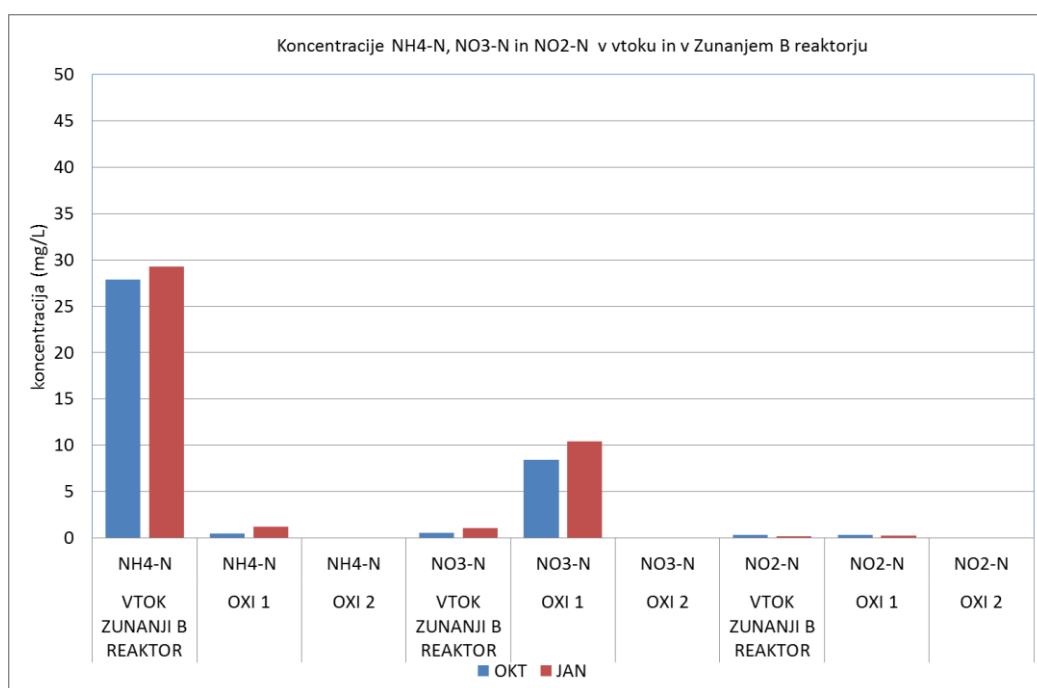
Slika 13: Učinek nitrifikacije v reaktorjih

V zunanjem B reaktorju CČN, kjer je vtok mehansko čiščena odpadna voda, je bil na dan vzorčenja v prvem aerobnem reaktorju OXI 1, kjer se pretvori večina amonijevega dušika, učinek nitrifikacije nad 96 %.

V mini reaktorju CČN, kjer je, enako, vtok mehansko čiščena odpadna voda, je bil na dan vzorčenja v prvem aerobnem reaktorju 2-NI, kjer se pretvori večina amonijevega dušika, učinek nitrifikacije nad 92 % (Slika 13).

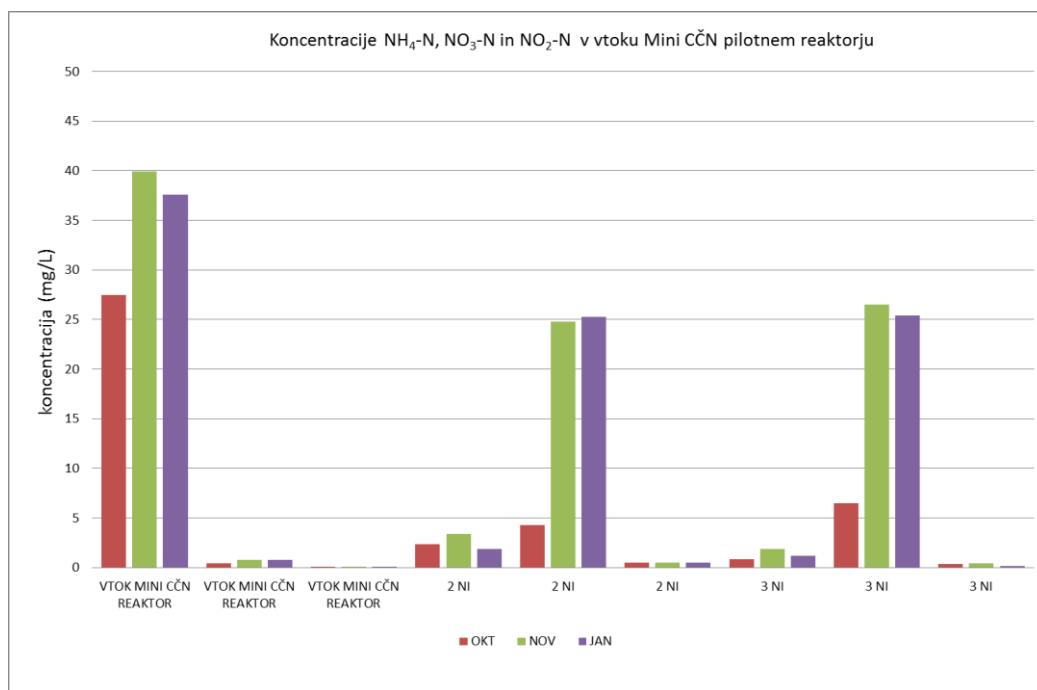
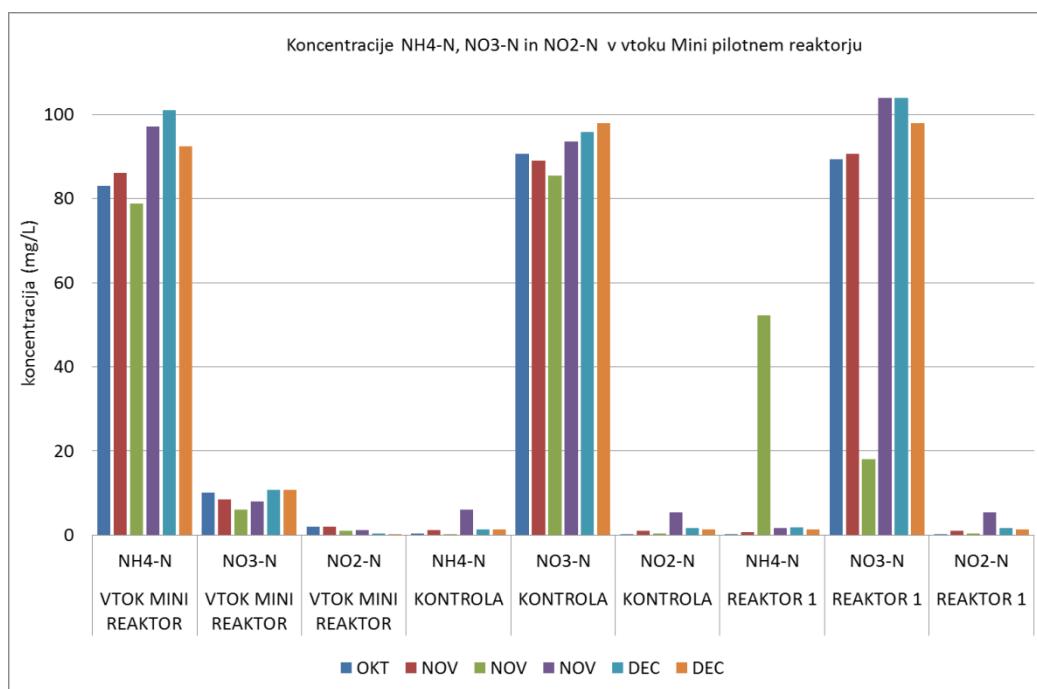
Koncentracija nitritnega dušika je bila v vseh reaktorjih pod 0,8 mg/L.

V obeh reaktorjih, OXI 1 in 2-NI, ki sta prva stopnja nitrifikacije, se je pretvorilo več kot 90 % amonijevega dušika (Slika 13).



Slika 14: Koncentracije NH₄-N, NO₃-N in NO₂-N v Zunanjem B pilotnem reaktorju

V drugi stopnji nitrifikacije v OXI 2 in 3-NI pa je vtok odpadne vode enak iztoku iz OXI 1 in 2-NI, zato je vstopna koncentracija amonijevega dušika pod 3,4 mg/L in s tem tudi nižji učinek čiščenja in nižja stopnja nitrifikacije (Slika 14, Slika 15).

Slika 15: Koncentracije NH₄-N, NO₃-N in NO₂-N v Mini CČN pilotnem reaktorjuSlika 16: Koncentracije NH₄-N, NO₃-N in NO₂-N v Mini pilotnem reaktorju

Stopnja nitrifikacije v reaktorjih, kjer je vtok mehansko čiščena odpadna voda, je nižja od navedene najvišje hitrost nitrifikacije iz literature ($2,6 \text{ g/m}^2 \text{ d N}$, Ødegaard, 2006), in sicer $1,3 \text{ g/m}^2 \text{ d N}$ pri OXI 1 reaktorju in $0,4 \text{ g/m}^2 \text{ d N}$ pri 2-NI reaktorju.

Stopnja nitrifikacije v reaktorjih, kjer je vtok sintetična odpadna voda, bogata z amonijevim dušikom, je višja kot nitrifikacije iz literature ($2,6 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$, Ødegaard, 2006), in sicer najvišja $6,8 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$. Tudi učinek čiščenja po amonijevem dušiku je bil višji (med 94 % in 99 %).

Vzrok povišanje stopnje nitrifikacije je najverjetneje v ugodni stalni temperaturi 20°C , nevtralnemu pH (7,5), visoki koncentraciji raztopljenega kisika (nad 5 mg/L) in anorganskemu viru dušika v vtočni odpadni vodi in z odsotnostjo heterotrofne aktivnosti (Qiao, 2010 in Sudarno, 2010).

Koncentracije nitratnega dušika v iztokih iz reaktorjev so bile podobne vstopnim koncentracijam amonijevega dušika, razen v oktobru 2007 v 2-NI reaktorju. Glede na visoko koncentracijo raztopljenega kisika, ni bila možna pretvorba nitrata z anamoks procesom (Strous, 1997). V klonskih knjižnicah vzorcev iz Zunanjega B reaktorja, smo našli predstavnike denitrifikacijskih bakterij *Comamonadaceae* (**Napaka! Vira sklicevanja ni bilo mogoče najti.**), ki lahko denitrificirajo tudi v dobro prezračenih reaktorjih (Patureau, 1997) in niso prisotni v Mini reaktorjih, zaradi pomanjkanja organskega vira ogljika za heterotrofno denitrifikacijo.

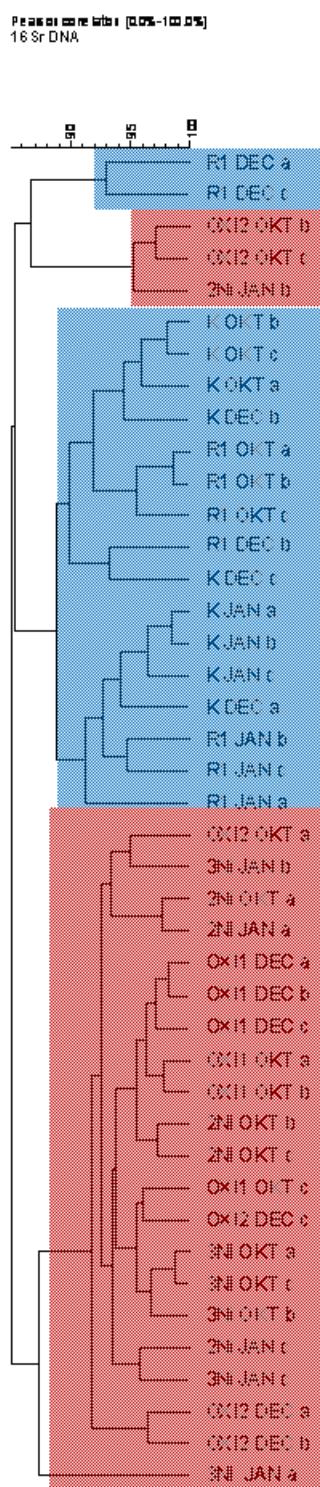
4.2 TRFLP 16S rRNA

Z metodo TRFLP smo analizirali splošno bakterijsko združbo, in sicer bakterijske gene za 16S rRNA kot tudi *amoA* gene nitrifikacijskih bakterij. V filogenetskih drevesih smo izrisali rezultate.

Na podlagi terminalnega restriktijskega (razrezanega z encimom HaeIII) profila 900 bp dolgega PCR produkta odseka gena za 16S rRNA smo ugotovili, da so se vzorci iz

reaktorjev CČN DK razlikovali predvsem po načinu obremenitve z odpadno vodo. Vzorci iz reaktorjev so se po strukturi TRFLP pikov razvrstili v dve večji skupini. Le posamezne ponovitve reaktorjev R1, obremenjene s sintetično odpadno vodo v mesecu decembru, so se po strukturi TRFLP razvrstile podobno kot OXI 2 in 2-NI, obremenjenima z mehansko čiščeno odpadno vodo.

Bakterijska mikrobnna združba reaktorjev R1 in K, ki imata enako funkcijo in obremenitev, je bila podobna. Med oktobrskimi in januarskimi R1 in K vzorci je prišlo do razlike v TRFLP profilih, medtem ko so se decembrski TRFLP profili R1 in K razvrstili nekje vmes, med oktobrske in januarske, zato sklepamo, da je prišlo v tem časovnem obdobju do rahlega premika v strukturi bakterijske združbe R1 in K reaktorjev. Po funkciji je bazen OXI 1, podoben reaktorju 2-NI, in bazen OXI 2 podoben reaktorju 3-NI, vendar neke korelacije med strukturo združbe in funkcijo, ob obremenjevanju z mehansko čiščeno odpadno vodo, nismo zaznali. Ugotovili smo, da se TRFLP profili bakterijske 16S rRNA proučevanih reaktorjev niso bistveno razlikovali med seboj.



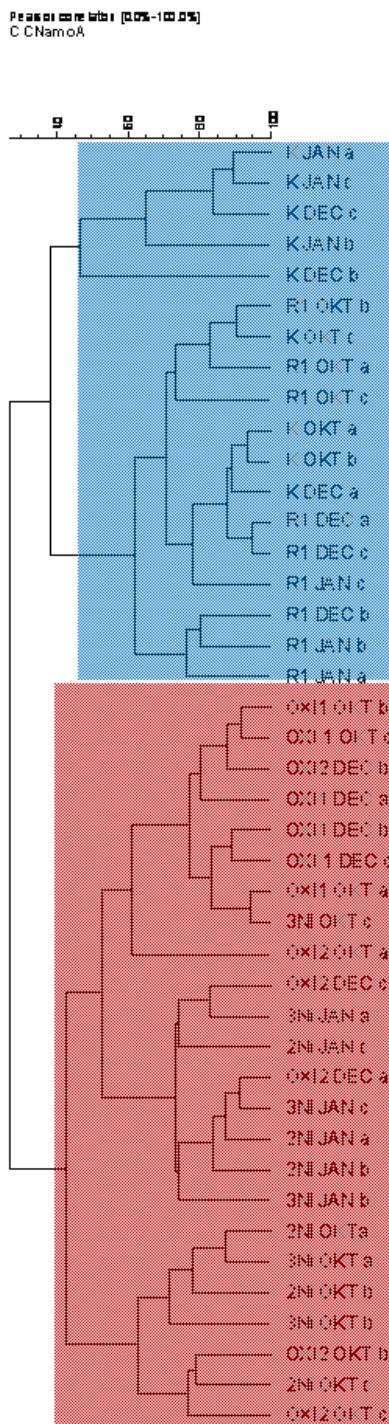
Slika 17: TRFLP profili odseka gena 16S rRNA po restrikciji s HaeIII vzorcev CČN DK, odvzetih v časovnem obdobju med oktobrom 2007 in januarjem 2008

4.3 TRFLP *amoA*

S primerjavo terminalnih restriktijskih (TaqI) 491 bp dolgega odseka funkcionalnega nitrifikacijskega gena *amoA* na vzorcih reaktorjev CČN DK, smo ugotovili razliko v TRFLP profilih glede na vrsto obremenitve reaktorjev. V vzorcih, ki so bili obremenjeni s sintetično odpadno vodo, je bila opazna višja diverziteta *amoA*, kot v vzorcih, obremenjenih z mehansko čiščeno odpadno vodo.

Poleg različne pestrosti funkcionalne skupine nitrifikacijskih bakterij smo zaznali prisotnost nekaterih TRFLP pikov, ki niso bili skupni obema načinoma obremenitve. Najvišji piki pri vzorcih R1 in K so bili dolžine 219 bp, medtem ko se pri vzorcih OXI 1, OXI 2, 2-NI in 3-NI, nekatere sekvene niso razrezale z izbranim encimom (TaqI), zato smo zaznali močni pik dolžine 491 bp. Pri vzorcih R1 in K, je prišlo do podobnega premika v strukturi nitrifikacijske združbe kot pri že omenjenem premiku v splošni mikrobi združbi 16S rRNA, za ta dva reaktorja.

Funkcionalna mikrobi združba nitrifikacijskih bakterij je, kljub nihanju v strukturi v času, bila značilno različna v odvisnosti od načina bremenitve. Zunanji B reaktor CČN in Mini reaktor CČN, vsi obremenjeni z mehansko čiščeno odpadno vodo, so imeli podobno nitrifikacijsko mikrobi združbo.



Slika 18: TRFLP profili nitrifikacijske mikrobne združbe na osnovi 491 bp dolgega odseka funkcionalnega nitrifikacijskega gena *amoA*

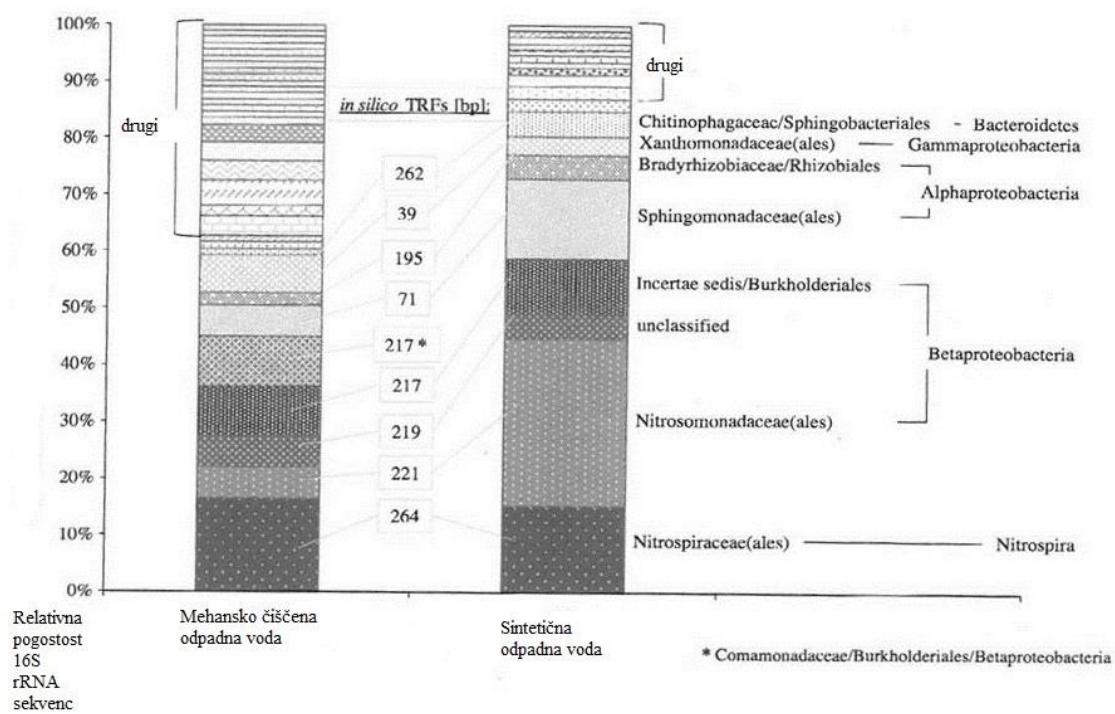
4.4 KLONSKE KNJIŽNICE

4.4.1 Klonska knjižnica 16S rRNA

V klonski knjižnici 16S rRNA smo ugotovili prisotnost mnogih različnih bakterijskih vrst, ki spadajo v debla *Alfaproteobakterije*, *Betaproteobakterije*, *Gamaproteobakterije*, *Deltaproteobakterije*, *Bekteroidete*, *Gemmatimonade*. Od pomembnejših nitrifikacijskih mikroorganizmov, smo zaznali rodova *Nitrospira* in *Nitrosomonas*. Rod *Nitrospira* je bil zastopan v približno enakem deležu (15–17 %) tako v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo kot tudi v reaktorjih s sintetično odpadno vodo.

Rod *Nitrosomonas* pa se je v večjem deležu (23 %) pojavil v reaktorjih s sintetično odpadno vodo, pri bremenitvi z mehansko čiščeno odpadno vodo pa je le 5 % klonov vsebovalo sekvene roda *Nitrosomonas*. Sekvence *Nitrosomonas*, kot *Nitrospira* se pojavijo v višjem deležu v reaktorjih OXI 2 in 3-NI, ki čistijo sekundarno odpadno vodo iz OXI 1 oz. 2-NI. V reaktorju R1 smo zaznali enega predstavnika roda *Nitrobacter*.

Poleg nitrifikacijskih bakterij, so v reaktorjih pomembneje zastopani pripadniki družin *Incertae sedis* 5, iz razreda *Betaproteobakterij* reda *Burkholderiales* ter *Sphingomonadaceae*, ki spadajo med *Alfaproteobakterije*.



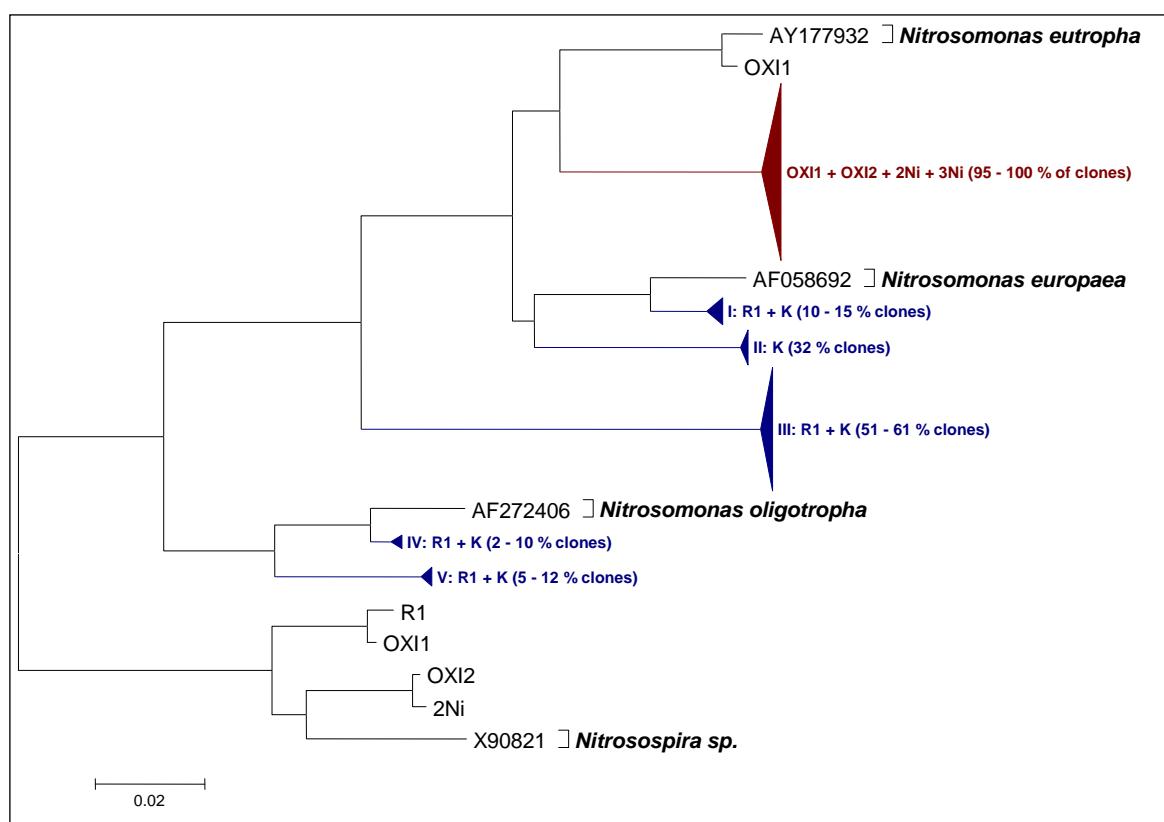
Slika 19: Relativna pogostost 16S rRNA sekvenc iz vzorcev reaktorjev glede na tip odpadne vode

Preglednica 4: Število in pregled sekvenč DNK iz RDP (spletna Ribosomska baza podatkov), ki so najbolj podobne sekvencam DNK iz reaktorjev CČN DK (*odpadna voda-mehansko čiščena odpadna voda; *raztopina NH₄⁺-sintetična odpadna voda)

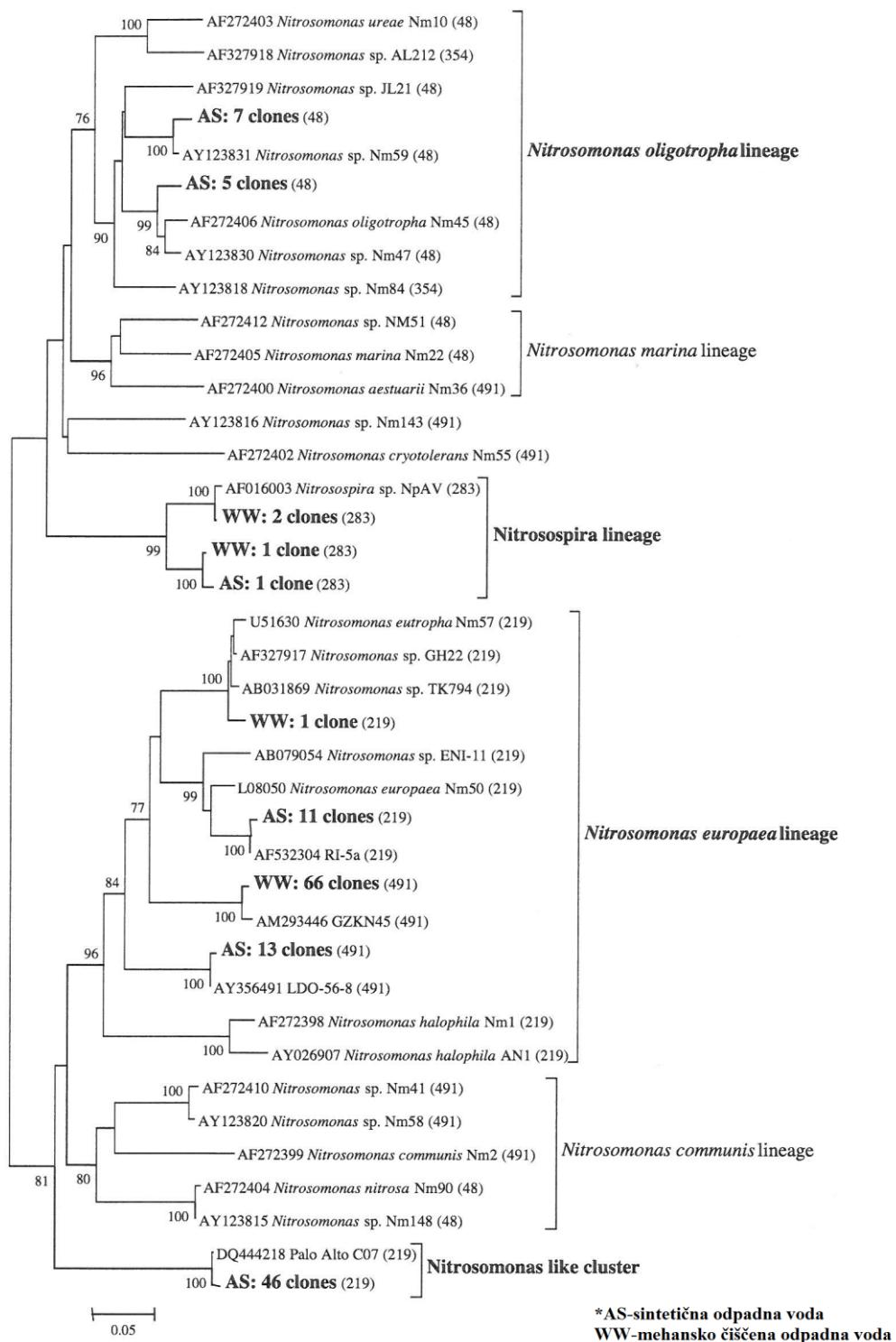
Zaporedjem DNA klonske knjižnice najbolj podobna zaporedja iz RDP (deblo; razred; red; družina; rod; vrsta)	PILOTNI REAKTOR						ODPADNA VODA	RAZTOPINA NH ₄ ⁺
	OXI1	OXI2	2Ni	3Ni	R1	K		
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Nitrosomonadaceae; Nitrosomonas	1	2	0	2	14	11	5	25
Nitrospira; Nitrospira; Nitrospirales; Nitrospiraceae; Nitrospira	1	6	1	6	5	8	14	13
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5; unclassified_Incertae sedis 5	0	1	2	3	5	3	6	8
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; unclassified_Sphingomonadace	0	0	0	1	4	6	1	10
Proteobacteria; Betaproteobacteria; unclassified_Betaproteobacteria	0	1	2	1	3	3	4	6
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; unclassified_Comamonadaceae	3	0	3	0	0	0	6	0
Bacteroidetes; unclassified_Bacteroidetes	0	2	0	0	1	2	2	3
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; unclassified_Gammaproteobacteria	2	0	1	1	1	0	4	1
Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Flexibacteraceae; unclassified_Flexibacteraceae	0	2	2	0	0	0	4	0
Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; unclassified_Sphingobacteriales	0	0	0	0	2	2	0	4
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium	0	1	0	0	2	0	1	2
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingopyxis	0	1	0	0	1	1	1	2
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Incertae sedis 5; Methylibium	1	0	1	0	0	1	2	1
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Dokdonella	1	0	1	1	0	0	3	0
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; unclassified_Xanthomonadaceae	0	0	0	0	2	1	0	3
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetidae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae;	2	0	0	0	0	0	2	0
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; unclassified_Bradyrhizobiaceae	0	1	0	0	1	0	1	1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; unclassified_Rhizobiales	0	0	0	0	0	2	0	2
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Novosphingobium	1	1	0	0	0	0	2	0
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; unclassified_Alphaproteobacteria	1	0	0	1	0	0	2	0
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; unclassified_Rhodocyclaceae	0	0	1	1	0	0	2	0
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Sorangineae; Polyangiaceae; Byssovorax	0	1	1	0	0	0	2	0
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Thermomonas	1	0	1	0	0	0	2	0
unclassified_Bacteria	0	0	0	0	0	2	0	2
Acidobacteria; Acidobacteria; Acidobacteriales; Acidobacteriaceae; Gp6	0	1	0	0	0	0	1	0
Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Flavobacterium	1	0	0	0	0	0	1	0
Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Crenotrichaceae; unclassified_Crenotrichaceae	1	0	0	0	0	0	1	0
Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Flexibacteraceae; Runella	0	0	0	1	0	0	1	0
Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Saprospiraceae; unclassified_Saprospiraceae	0	0	1	0	0	0	1	0
Gemmatumonadetes; Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Gemmatimonadaceae; Gemmatimonas	1	0	0	0	0	0	1	0
Planctomyces; Planctomycetacia; Planctomycetales; Planctomycetaceae; Isosphaera	1	0	0	0	0	0	1	0
Planctomyces; Planctomycetacia; Planctomycetales; Planctomycetaceae; Pirellula	0	0	0	0	0	1	0	1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter	0	0	0	0	1	0	0	1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; Hyphomicrobium	0	0	1	0	0	0	1	0
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; unclassified_Aacetobacteraceae	1	0	0	0	0	0	1	0
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; Sphingomonas	0	0	1	0	0	0	1	0
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Derxia	1	0	0	0	0	0	1	0
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Hydrogenophaga	1	0	0	0	0	0	1	0
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; unclassified_Burkholderiales	0	0	1	0	0	0	1	0
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Shinella	0	0	0	1	0	0	1	0
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; unclassified_Myxococcales	0	0	0	0	0	1	0	1
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Stenotrophomonas	1	0	0	0	0	0	1	0
Spirochaetes; Spirochaetes; Spirochaetales; Leptospiraceae; Leptonema	0	0	0	0	0	1	0	1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae; Phenyllobacterium	0	0	0	0	1	0	0	1
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Myxococcales; Sorangineae; Polyangiaceae; unclassified_Polyangiace	0	0	0	0	0	0	0	0
SKUPAJ KLONOV:	22	20	20	19	42	46	81	88

4.4.2 Klonska knjižnica *amoA*

Večina zaporedij DNK (95 %) 491bp odseka gena *amoA* iz vseh reaktorjev CČN DK, je bila podobna rodu *Nitrosomonas*, le okoli 5 % se jih je razvrstilo bližje vrstam *Nitrosospira*. Znotraj roda *Nitrosomonas* so se, na podlagi zaporedij DNK gena *amoA*, kloni iz reaktorjev OXI1, OXI2, 2NI in 3NI, obremenjeni z mehansko čiščeno odpadno vodo, značilno razvrstili blizu vrste *Nitrosomonas eutropha* (87 % identičnost za večino in 97 % identičnost za enega predstavnika OXI 1). Zaporedja DNK iz reaktorjev R1 in K, obremenjena s sintetično odpadno vodo, so bila podobna zaporedjem DNK *Nitrosomonas europaea* in *Nitrosomonas oligotropha*. Na podlagi identičnosti z zaporedji DNK *N. europaea* so se R1 in K zaporedja, razdelila v tri skupine (I: 95 % identičnost, II: 94 % identičnost in III: 88 % identičnost). 10–20 % zaporedij DNK R1 in K, ki so bila podobna zaporedjem *N. oligotropha*, so se razdelila v skupini IV (96 % identičnost) in V (89 % identičnost).



Slika 20: Klonska knjižnica 2191 bp odseka DNK gena *amoA*



Slika 21: Klonska knjižnica 491 bp odseka DNK gena *amoA*, predstavljena kot NJ drevo
 (*AS-sintetična odpadna voda, WW-mehansko čiščena odpadna voda)

Zaporedja DNK z visoko medsebojno identičnostjo so, zaradi večje preglednosti, združena v skupine, ob katerih je zapisano ime izvornih reaktorjev ter delež, ki ga predstavljajo v celotni klonski knjižnici. Združene skupine so sorodne referenčnim 491 bp odsekom DNK zaporedij *amoA* organizmov iz baze podatkov Gen Bank (*Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas oligotropha* ali vrstam *Nitrosospira sp.*). Poleg imena referenčnih mikroorganizmov je zapisana koda za dostop (Accession number) do javno dostopnih podatkov in zaporedij DNK izbranega mikroorganizma.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Raziskovali smo aktivnost in strukturo mikrobne združbe nitrifikacijskih bakterij v zunanjih industrijskih reaktorjih in laboratorijskih reaktorjih, ki so se razlikovali v vrsti odpadne vode in temperturnih pogojih.

5.1 UČINEK NITRIFIKACIJE

V reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo, kjer se v prvem od dveh zaporednih reaktorjev pretvori večina amonijevega dušika, je bil učinek nitrifikacije med 92 % in 96 %. V reaktorjih, kjer je vstopna koncentracija amonijevega dušika pod 3,4 mg/l, je nižji učinek čiščenja in nižja stopnja nitrifikacije. Stopnja nitrifikacije v reaktorjih, kjer je vtok mehansko čiščena odpadna voda, je nižja od največje hitrosti nitrifikacije, kot jo navaja Ødegaard s sod. (2006) in znaša $2,6 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$, za razliko od naših izračunov stopnje nitrifikacije $1,3 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$ pri OXI 1 reaktorju in $0,4 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$ pri 2-NI reaktorju.

Stopnja nitrifikacije v reaktorjih s sintetično odpadno vodo, bogato z amonijevim dušikom, je bila višja kot v primerljivih preizkusih ($2,6 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$, Ødegaard, 2006), in sicer do $6,8 \text{ gN/m}^2 \text{ d}$. Tudi učinek čiščenja, glede na amonijev dušik, je bil višji (med 94 % in 99 %). Vzrok za visoko stopnjo nitrifikacije je bil verjetno v stalni temperaturi 20°C , nevtralnem pH (7,5), visoki koncentraciji raztopljenega kisika (nad 5 mg/l) in anorganskemu viru dušika v vtočni odpadni vodi z odsotnostjo heterotrofne aktivnosti (Qiao, 2010; Sudarno, 2010).

V klonskih knjižnicah vzorcev iz Zunanjega B reaktorja smo našli predstavnike denitrifikacijskih bakterij Comamonadaceae, ki lahko denitrificirajo tudi v dobro prezračenih reaktorjih (Patureau, 1997) in niso prisotni v Mini reaktorjih, zaradi pomanjkanja organskega vira ogljika za heterotrofno denitrifikacijo.

5.2 TRFLP IN KLONSKA KNJIŽNICA 16S rRNA

Z metodo TRFLP smo analizirali splošno bakterijsko združbo, in sicer bakterijske gene za 16S rRNA in nato še *amoA*.

Z analizo TRFLP profilov 16S rRNA smo ugotovili, da se je, kljub sprememjanju mikrobine združbe, vzpostavila določena razlika med vzorci iz realno obremenjenih in umetno obremenjenih pilotnih sistemov, sama velikost (130 m^3 vs. 10 L) sistema pa ni bila pomembna. Še bolj očitna razlika v TRFLP profilih med načinom obremenitve, se je pokazala z analizo funkcionalnega nitrifikacijskega gena *amoA*.

Kot smo pričakovali, je prisotnost sekvenč skupine *Nitrosomonadaceae* narasla iz 5 %, pri mehansko čiščeni odpadni vodi, na 29 %, pri odpadni vodi, bogati z amonijskih dušikom. Prisotnost rodu *Nitrospira* je bila pri obeh tipih odpadne vode podobna (15–16 %).

Prisotnost dominantnih (prevladujočih) skupin, razen skupine *Comamonadaceae*, ki smo jo potrdili samo v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo, je bila neodvisna od velikosti (L ali m^3), stopnje (1. ali 2. zaporedni reaktor) ali tipa odpadne vode (mehansko čiščena ali sintetična, bogata z amonijevim dušikom).

Sekvence 16S rRNA proteobakterij so bile prisotne v 66–71 % vseh sekvenč v reaktorjih z mehansko in sintetično odpadno vodo. Podobno je bilo pri posameznih skupinah, in sicer pri skupini *Alphaproteobacteria* (15 % in 16 %), *Betaproteobacteria* (35 % in 43 %), *Gamaproteobacteria* (11 % in 3 %) in pri razredu *Deltaproteobacteria* (2 %) in sekvenče *Nitrospira* (16 % in 15 %), kjer se v 99 % ujemajo z *Nitrospira defluvii* 16S rRNA sekvenco (DQ059545).

Predstavniki skupine *Alphaproteobacteria* so bili pogosti v vseh reaktorjih, ne glede na tip odpadne vode, in sicer *Bradyrhizobiaceae* (3–4 %) s predstavniki *Bradyrhizobium* in *Nitrobacter* ter *Sphingomonadaceae* (5–13 %) s predstavniki *Novosphingobium*, *Sphingomonas* in *Sphingopyxis*.

Večja diverziteta v skupini *Betaproteobacteria* je bila opažena v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo. V obeh tipih reaktorjev so bili najpogostejsi predstavniki skupin *Methilicium* (*Burkholderiales Incertae sedis*) in *Nitromonadacea*.

Iz skupine *Gamaproteobacteria* je družina *Xanthomonadaceae* predstavljala 3–6 % klonov.

Itoi s sod. (2007) ugotavljajo prisotnost heterotrofnih predstavnikov v reaktorjih s sintetično odpadno vodo, bogato z amonijevim dušikom. Le-ti so vključeni v nastanek biofilma in zagotavljajo razmere za rast nitrifikatorjev. Reboleiro-Rivas s sod. (2016) navajajo prisotnost predstavnikov skupin *Chitinofagacea* in *Xanthomonadacea*, ki izločajo EPS in so zelo pomembni za razvoj biofilma v komunalni odpadni vodi. Predstavniki skupine *Sphingomonadacea* so pogosti v oligotrofnih in evtrofnih okoljih, ki so podobna našim vrstam MBBR reaktorjev, kjer razgrajujejo kompleksne organske spojine ter izločajo EPS snovi za tvorbo biofilma. Kot navaja Beretscho s sod. (2010) je *Sphingomonas* pogosto na dnu biofilma in je zato manj občutljiv na spremembe okolja.

Dworkin s sod. (2006) navaja, da rod *Bradyrhizobium* tudi sodeluje pri tvorbi biofilma izven gostitelja, če vezava dušika ni prioritetna. Bae s sod (2015) je ugotovil v nitrificirajočih MBBR reaktorjih sicer drugo vrsto bakterij, ki vežejo dušik, in sicer *Mesorhizobium chacoense*. Pri tvorbi biofilma v čistilnih napravah sodelujejo drugi heterotrofi, kot so predstavniki skupine *Xanthomonadacea*, ki izločajo ksantan (EPS) ter druge polisaharide, kot je skupina *Chitinophagacea* (Dworkin s sod., 2006) in pa iz skupine *Burkhoidales*, ki razgrajujejo organsko snov v biofilmu (Niemo s sod., 2009).

Predstavniki skupin *Nitrosomonadacea* in *Nitrospiracea*, so predstavljali 4–5 % in 7–8 % v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo, medtem ko so v reaktorjih s sintetično, z amonijskim dušikom bogato odpadno vodo, narasli na 8–10 % in 11–14 %.

Najpogosteje prisotne skupine bakterijskih družin so v klonski knjižnici predstavljale 50 % v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo in 70 % v reaktorjih s sintetično odpadno vodo, kar je 30–40 % vseh bakterij, zajetih s TRFLP profili. Kljub temu se ponavljajo določeni vzorci v obeh pristopih. Število taksonomskih skupin se zmanjšuje iz reaktorjev z mehansko čiščeno vodo k reaktorjem z amonijskim dušikom bogato odpadno vodo. Vzrok je v visoki heterogenosti hranil v mehansko čiščeni odpadni vodi in pa pomanjkanju organskega ogljika v sintetični odpadni vodi, kot tudi navaja Calderone s sod. (2011) ter Xia s sod. (2010).

Število TRFLP pikov je podobno pri vseh reaktorjih, ne glede na vir odpadne vode, kar kaže na interakcije med nitrifikatorji kot primarnimi producenti ter sekundarnimi producenti – heterotrofi, kar lahko ima za posledico višjo diverziteto v reaktorjih z amonijskim dušikom, bogato odpadno vodo.

Namesto pričakovanih velikih sprememb v biofilmu med reaktorji zaradi razlike med, z amonijskim dušikom bogato odpadno vodo in pa kompleksno sestavljenou mehansko čiščeno odpadno vodo, pa je prišlo le do manjših sprememb v mikrobnii združbi.

Itoi s sod. (2007), Racz s sod. (2010) in Reboleiro-Rivas s sod. (2016) navajajo, da je večina prisotnih skupin mikroorganizmov v obeh vrstah reaktorjev heterotrofov, ki pridobijo ogljik iz CO₂, z vezavo velikega števila prisotnih nitrifikatorjev.

Ni pa izključeno, da so heterotrofovi v dormantni fazi v reaktorjih s sintetično odpadno vodo, ker uporabljene metode ne ločijo med aktivnimi in neaktivnimi celicami.

5.3 TRFLP IN KLONSKA KNJIŽNICA *amoA*

Delež zaporedij nitrifikacijskih mikroorganizmov, rodov *Nitrosomonas* in *Nitrospira*, v klonski knjižnici 16S rRNA, je naraščal v smeri od mehansko čiščene odpadne vode (OXI 1, 2-NI), delno prečiščene (OXI 2, 3-NI) do sintetične odpadne vode (R1 in K) obremenitve, kjer je rod *Nitrosomonas* postal dominanten.

Nitrospira, ki sodeluje v drugem koraku nitrifikacije, se v približno enakem številu pojavi v klonskih knjižnicah reaktorjev z mehansko čiščeno odpadno vodo in sintetično odpadno vodo, bogato z amonijevim dušikom.

V nasprotju pa se je združba amonij oksidirajočih bakterij (*amoA*) spreminja, glede na višje koncentracije amonijskega dušika z višanjem prisotnosti predstavnikov rodu *Nitrosomonas*.

Pestrost splošne 16S rRNA mikrobne združbe je bila višja v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo, medtem ko je bila višja pestrost nitrifikacijske (*amoA*) mikrobne združbe v reaktorjih s sintetično odpadno vodo.

Natančnejša analiza funkcionalne nitrifikacijske združbe s klonsko knjižnico odseka gena *amoA* je pokazala, da se reaktorji, obremenjeni z mehansko čiščeno odpadno vodo, razlikujejo tako po sestavi kot po pestrosti nitrifikacijskih mikroorganizmov. Tako so se v reaktorjih OXI 1, OXI 2, 2-NI in 3-NI kot dominantne izkazale nitritacijske bakterije, po zaporedjih DNK podobne *Nitrosomonas eutropha*, v reaktorjih R1 in K pa *Nitrosomonas europaea*. V R1 in K reaktorjih so se poleg *N. europaea*, pojavili tudi mikroorganizmi podobni *N. oligotropha*, v vseh reaktorjih pa smo zaznali nekaj zaporedij DNK iz rodu *Nitrosospira*.

Enake ugotovitve, za prisotnost *Nitrosomonas* in *Nitrosospira* v reaktorjih z amonijem bogato odpadno vodo, navaja Leyla-Diaz s sod. (2015). Gonzalez-Martinez s sod. (2014) pa so ugotovili, da je *Nitrosomonas oligotropha* prisoten v odpadni vodi, ki je z amonijevim dušikom nizko obremenjena. Gao s sod. (2013) je ugotovil, pri raziskavah mikrobne združbe osmih čistilnih naprav, da je dominanten podobno, kot v naših reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo *Nitrosomonas europea*. V nitrificirajočih MBBR reaktorjih je Bae s sod. (2015) detektiral, da predstavlja *Nitrosomonas eutropha* 61 % skupne 16S rRNA.

S primerjavo terminalnih restriktičskih (TaqI) 491 bp dolgega odseka funkcionalnega nitrifikacijskega gena *amoA* na vzorcih reaktorjev CČN DK, smo ugotovili signifikantno razliko v TRFLP profilih glede na vrsto obremenitve reaktorjev. V vzorcih, ki so bili

obremenjeni s sintetično odpadno vodo, je bila opazna višja diverziteta *amoA*, kot v vzorcih, obremenjenih z mehansko čiščeno odpadno vodo.

Funkcionalna mikrobna združba nitrifikacijskih bakterij je, kljub nihanju v sestavi, verjetno značilno različna v odvisnosti od načina obremenitve. Zunanji B reaktor CČN in Mini reaktor CČN, vsi obremenjeni z mehansko čiščeno odpadno vodo, so imeli podobno nitrifikacijsko mikrobno združbo, ne glede na temperaturne razmere.

6 SKLEPI

- Znotraj posameznih ponovitev nosilcev Kaldnes K1 iz posameznega vzorca smo zaznali določeno variabilnost v TRFLP profilu, vendar so se vse tri ponovitve TRFLP posameznih vzorcev razvrščale funkcijam reaktorjev primerno.
- Temperatura ni posebno vplivala na strukturo mikrobne združbe, saj je do manjših sprememb v profilu TRFLP prihajalo tako v mini pilotni reaktor, mini reaktor CČN kot tudi v zunanjem B reaktorju CČN.
- Pestrost splošne mikrobne združbe (16S rRNA), na podlagi TRFLP in klonske knjižnice, je bila višja v vzorcih, obremenjenih z mehansko čiščeno odpadno vodo, medtem ko je bila pestrost nitrifikacijske mikrobne združbe (*amoA*) višja v mini pilotnih reaktorjih s sintetično odpadno vodo in višjo koncentracijo amonijevega dušika.
- 16S rRNA knjižnica kaže, da sta, si, po deležih dominantnih predstavnikov mikrobnih združb, podobna bolj obremenjena prva zaporedna reaktorja OXI 1 in reaktor 2-NI ter druga zaporedna, z amonijevim dušikom, manj obremenjena OXI2, in 3-NI. V reaktorjih OXI 2 in 3-NI je prisotnost rodov *Nitrospira* in *Nitrosomonas* višja.
- Dominantni predstavniki nitrifikacijskih mikroorganizmov v reaktorjih so se, glede na način obremenitve z odpadno vodo, razlikovali. Tako so ob obremenitvi z mehansko čiščeno odpadno vodo prisotni *Nitrosomonas eutropha*, ob sintetični odpadni vodi pa *Nitrosomonas europaea* in *Nitrosomonas oligotropha*.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

V procesu čiščenja odpadne vode na čistilnih napravah je proces nitrifikacije ključen za odstranjevanje enega od najpomembnejših hranil, kot je dušik, z nitrifikacijskimi bakterijami. Spremljali smo proces nitrifikacije ter prisotnost, pestrost in stabilnost mikrobnih združb na osnovi zaporedij 16S rRNA in specifičnih funkcionalnih genov (npr. *amoA*) v industrijskih in laboratorijskih reaktorjih z imobilizirano biokulturo.

Zanimalo nas je predvsem kako se združba nitrifikacijskih bakterij v imobilizirani biokulturi ali biofilmu na prosto plavajočih plastičnih nosilnih elementih Kaldnes v biofilmu odziva glede na različno kvaliteto odpadne vode ter letni čas.

Mikrobeno združbo na CČN Domžale-Kamnik (CČN DK) smo analizirali z metodo TRFLP in s sekvenciranjem genov za 16S rRNA in genov *amoA*. Z analizo TRFLP smo ugotovili, da se je, kljub nihanju strukture združbe v času, vzpostavila določena razlika med vzorci iz pilotnih sistemov z mehansko čiščeno in sintetično odpadno vodo, sama velikost (industrijski vs. mini reaktor) sistema pa ni bila pomembna. Še bolj očitna razlika med združbami, ki so bile izpostavljene različnim odpadnim vodam, se je pokazala z analizo funkcionalnega nitrifikacijskega gena *amoA*. In sicer so se zunanji industrijski reaktor in mini pilotni reaktorji, obremenjeni z mehansko čiščeno odpadno vodo, razlikovali tako po sestavi kot po pestrosti nitrifikacijskih mikroorganizmov. Pestrost splošne 16S rRNA mikrobine združbe je bila višja v reaktorjih z mehansko čiščeno odpadno vodo, medtem ko so reaktorji z sintetično odpadno vodo imeli večjo pestrost nitrifikacijske (*amoA*) mikrobine združbe.

Na podlagi rezultatov sklepamo, da ima kvaliteta odpadne vode večji vpliv na sestavo združbe kot pa dejavniki okolja kot sta temperatura ali pa velikost reaktorjev.

7.2 SUMMARY

In the process of treating waste water in biological treatment plants, the nitrification process is crucial for the removal of one of the most important nutrients, i.e. nitrogen, using nitrification bacteria. The aim of our work was to produce a study of the process of nitrification itself, including an analysis of the presence, diversity and stability of microbial communities based on the 16S rRNA sequences and specific functional genes (eg. *amoA*) in industrial-scale and laboratory-scale reactors with immobilized bioculture.

Industrial-scale reactors treat wastewater of temporary variable composition under different weather conditions, while the microbial population of wastewater treatment plants are often studied in controlled laboratory-scale systems with defined influent at a constant temperature.

16S rRNA and ammonia oxidising *amoA* - gene-defined bacterial community structure was investigated in industrial-scale and laboratory-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) treating municipal wastewater or synthetic ammonium solution.

Nitrification activity, 16S rRNA and *amoA* gene TRFLP profiles were comparable between industrial and laboratory-scale reactors with municipal wastewater. Reactors with synthetic ammonium solution exhibited higher nitrification and higher relative abundance of *Nitrosomonadaceae* and *Nitrospiraceae* families but only small changes in general bacterial community structure was detected compared to MBBR reactors treating municipal wastewater.

Nitrosomonas europea lineage dominated in reactors treating municipal wastewater, while uncultivated *Nitrosomonas*-like sequences prevailed in reactors with synthetic ammonia solution.

These results suggest that influent type has a stronger influence on community structure than operational conditions, such as temperature or reactor size.

8 VIRI

Aesoy A., Ødegaard H., Haeg M., Risla F., Bentzen G. 1998. Upgrading wastewater treatment plants by using of biofilm carriers, oxygen addition and pre-treatment in the sewage network. *Water Science and Technology*, 37, 9: 159–166.

Altschul S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402.

Aoi Y., Miyoshi T., Okamoto T., Tsuneda S., Hirata A., Kitayama A., Nagamune, T. 2000. Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 3: 234–240.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. 1999. Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons: 202 str.

Avrahami S., Conrad R., Braker G. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5685–5692.

Avrahami S., Conrad R., Braker G. 2003. Effect of ammonia concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidisers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5684–5692.

Avrahami S., Conrad R., Braker G., 2002. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5685–92.

Bae H., Chung Y. C., Yang H., Lee C., Aryapratama R., Yoo J. J., Lee Y. S. 2015. Assessment of bacterial community structure in nitrifying biofilm under carbon-sufficient and limited conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50:201–212.

- Beman J. M., Francis C. A. 2006. Diversity of ammonia oxidising archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Baia del Tobari, Mexico. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 7767–7777.
- Beman J. M., Popp B. N., Francis C. A. 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME Journal*, 2: 429–441.
- Bereschenko L. A., Stams A. J. M., Euverink G. J. W., van Loosdrecht M.C.M. 2010. Biofilm Formation on Reverse Osmosis Membranes Is Initiated and Dominated by *Sphingomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2623–2632.
- Blackwood C. B., Hudleston D., Zak D. R., Buyer J. S. 2007. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment lenght polymorphism data: Insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5276–5283.
- Burrell P. C., Keller J., Blackall L. L., 1998. Microbiology of a Nitrite-Oxidizing Bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1878–1883.
- Calderón K., Rodelas B., Cabriol N., González-López J., Noyola, A. 2011. Analysis of microbial communities developed on the fouling layers of a membrane-coupled anaerobic bioreactor applied to wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 102: 4618–4627.
- Cole J. R., Wang, Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nuclear Acids Research*, 37, D:141–145.
- Coskuner G., Curtis T. P. 2002. In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 3: 431–437.
- Culman S. W., Bukowski R., Gauch H. G., Cadillo-Quiroz H., Buckley D. H. 2009. T-REX: software for the processing and analysis of TRFLP data. *Bmc Bioinformatics*: 10 str.
- Daims H., Nielsen J. L., Nielsen P. H., Schleifer K.-H., Wagner M. 2001. In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5273–5284.

- Daims H., Taylor M. W., Wagner M. 2006. Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends in biotechnology*, 24, 11:483–489.
- Davey M. E., O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 4: 847–867.
- De Vet W., Dinkla I., Muyzer G., Rietveld L., van Loosdrecht M. 2009. Molecular characterisation of microbial populations in groundwater sources and sand filters for drinking water production. *Water Research*, 43: 182–194
- Ebie Y., Noda N., Miura H., Matsumura M., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y. 2004. Comparative analysis of genetic diversity and expression of *amoA* in wastewater treatment processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 740–744.
- Egert M., Marhan S., Wagner B., Scheu S., Friederich M. W. 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS microbiology Ecology*, 48: 187–197.
- Falk M. W., Song K. G., Matiasek M. G., Wuertz S. 2009. Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors-Natural reproducible fluctuations. *Water research*, 3: 842–852.
- Germain E., Bancroft L., Dawson A., Hinricht C., Fricker L., Pearce P. 2006. Evaluation of hybride processes for nitrification by comparing MBBR/S and IFAS configurations. V: Congres »Biofilm Systems 2006«, Amsterdam RAI, 24–27 sept. 2006.
- Gilbride K. A., Lee D. Y., Beaudette L. A. 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 1–20.
- Haseborg E., Zamora TM, Fröhlich J., Frimmel F. H. 2010. Nitrifying microorganisms in fixed-bed biofilm reactors fed with different nitrite and ammonia concentrations. *Bioresource Technology*, 101: 1701–1706.
- Heuer H., Smalla K. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil

microbial communities. V: Van Elsas J. D., Trevors J. T., Wellington E. M. H. (ur.). Modern soil microbiology. New York, Marcel Dekker: 353–373.

Höfferle Š., Nicol G. W., Pal L., Hacin J., Prosser J. I., Mandić-Mulec I. 2010. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. Blackwell Publishing: 302–315.

Itoi S., Ebihara N., Washio S., Sugita H., 2007. Nitrite-oxidizing bacteria, Nitrospira, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 264: 297–308.

Janssen P., Yates P. S., Grinton B. E., Taylor P. M., Sait M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of division Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2391–2396.

Jansson P., Kenne L., Lindberg B., 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45: 275–282.

Jetten M. S. M. 2002. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Re/Views in Environmental Science&BioTechnology*, 1: 51–63.

Jonoud S., Vosoughi M., Khalili Daylami N. 2003. Study on nitrification and denitrification of high nitrogen and COD load wastewater in moving bed biofilm reactor. Tehran, Iran, Chemical and Petroleum Engineering Department, Sharif University of Technology.

Juretscho S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K. H., Pommerening-Roser A., Koops H. P., Wagner M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 3042–3051.

Koops H. P., Pommerening-Röser A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37: 1.

Kowalchuk G. A., Stienstra A. W., Heilig G.H.J., Stephen J. R., Woldendorp J. W. 2000. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 99–110.

Kraigher B., Kosjek T., Ester H., Kompare B., Mandić-Mulec I. 2008. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water research*, 42, 17: 4578–4588.

Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., D van Elsas J., Mandić-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2762–2771.

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299–306.

Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol GW., Prosser J. I., Schuster SC., Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia oxidising prokaryotes in soils. *Nature*, 442: 806–809.

Lekang O. I., Kleppe H. 2000. Efficiency of nitrification in trickling filters using different filter media. *Aquacultural Engineering*, 21: 181–199.

Loy A., Daims H., Wagner M. 2002. Activated sludge-molecular techniques for determining community composition. V: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Bitton G. (ur.). New York, John Wiley&Sons: 26–43.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New Jersey, Prentice Hall: 600 str.

Matsumoto, S., Ishikawa, D., Saeki, G., Aoi, Y., Tsuneda, S., 2010. Microbial Population Dynamics and Community Structure during the Formation of Nitrifying Granules to Treat Ammonia-Rich Inorganic Wastewater. *Microbes and Environments*, 25: 164–170.

Mengoni A., Giuntini E., Bazzicalupo M. 2007. Application of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism for Molecular Analysis of Soil Bacterial Communities. *Soil Biology*, 11: 295–305.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2009. GenBank – podatkovna baza nukleotidnih sekvenc. U. S. National Library of Medicine
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> (14. oktober 2009).

Ni B. J., Yu H. Q., Sun Y. J. 2008. Modeling simultaneous autotrophic and heterotrophic growth in aerobic granules. *Water Research*, 42: 1583–1594.

Nicola G. W., Schleper C. 2005. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle. *Trends in Microbiology*, 14, 5: 207–212.

Niemi R. M., Heiskanen I., Heine R., Rapala J. 2009. Previously uncultured [beta]-Proteobacteria dominate in biologically active granular activated carbon (BAC) filters. *Water Research*, 43: 5075–5086.

Ødegaard H., 2006. Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 53, 9:17–33.

Ødegaard H., Rusten B., Wesman F. 2007. Optimisation of nitrogen removal by the use of combined pre and post-denitrification. V: The »10th Nordic/Nordiwa Wastewater conference. Hamar, Norway.

Ødegaard H., Rusten B., Westrum T. 1994. A new moving bed biofilm reactor-application and results. *Water Science and Technology*, 29, 10-11: 157–165.

Odegaard H., 1999. The moving bed biofilm bioreactor. V: Water environmental engineering and reuse of water. Igarashi T., Watanabe Y., Asano T., Tambo N. (ur.). Hokkaido, Hokkkaido Press: 250–305.

Pal L., Brajer Humar B., Kraigher B., Levstek M., Mandič Mulec I. 2008. Community structure and diversity of nitrifying bacteria in wastewater treatment plant biofilm. V: *Microbiology for today*. Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 93.

Pal L., Kraiger B., Brajer Humar B., Levstek M., Mandič-Mulec I. 2012. Total bacterial and ammonia-oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. *Bioresource Technology*, 110:135–143.

Pankratov T. A., Kulichevskaya I. S., Liesack W., Dedysh S. N. 2006. Isolation of aerobic, gliding, xylanolytic and laminarinolytic bacteria from acidic Sphagnum peatlands and emended description of *Chitinophaga arvensicola* Kampfer et al. 2006. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2761–2764.

Park H. D., Wells G. F., Bae H., Criddle C. S., Francis C. A. 2006. Occurrence of ammonia – oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applies and Environmental Microbiology*, 72: 5643–5647.

Park H.D., LeeS.Y., Hwang S. 2009. Redundancy Analysis Demonstration of the Relevance of Temperature to Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Compositions in a Full-Scale Nitrifying Bioreactor Treating Saline Wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 346–350.

Patureau D., Bernet N., Moletta R. 1997. Combined nitrification and denitrification in a single aerated reactor using the aerobic denitrifier *Commonas* sp. strain SGLY2. *Water Research*, 31: 1363–1370.

Powell R., Gannon F. 2002. Purification by phenol extraction and ethanol precipitation. (zbirka Oxford Practical Approach Series) Oxford, Oxford University Press.

Proser J. I., Nicol G. W. 2008. Relative contribution of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in environment. *Environmental Microbiology*, 10: 2931–2941.

Prosser J. I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advanced Microbiology Physiology*, 30: 125–81.

Purkhold U., Pommerening-Roser A., S. Juretschko, M. C. Schmid, H.-P. Koops, and Wagner M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 5368–5382.

Purkhold U., Wagner M., Timmermann G., Pommerening-Roser A., Koops H.-P. 2003. 16S rRNA and *amoA* -based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1485–1494.

Reboleiro-Rivas P., Martin-Pascual J., Morillo J. A., Juarez-Jimenez B., Poyatos J. M., Rodelas B., Gonzales-Lopez J. 2016. Interlinkage between bacterial populations dynamics and the operational parameters in a moving bed membrane bioreactor treating urban sewage. *Water research*, 88:796–807.

Roš M. 2015. Sodobni postopki čiščenja odpadnih vod, zbirka Zelena Slovenija, Celje, 208 str.

Qiao S., Matsumoto N., Shinohara T., Nishiyama T., Fujii T., Bhatti Z., Furukawa K. 2010. High-rate partial nitrification performance of high ammonium containing wastewater under low temperatures. *Bioresource Technology*, 101: 111–117.

Racz L., Datta T., Goel R. 2010. Effect of organic carbon on ammonia oxidizing bacteria in a mixed culture. *Bioresource Technology*, 101: 6454–6460.

Rasche M. E., Hyman M. R., Arp D. J. 1991. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 10: 2986–2994.

Rostron, W. M., Stuckey, D. C., Young, A. A. 2001. Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media. *Water Research*, 35: 1169–1178.

Rotthauwe J. H., Witzel K. P., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 12: 4704–4712.

Rusten B., Hem J. L., Ødegaard H. 1995. Nitrification of municipal wastewater in moving-bed biofilm reactors. *Water Environmental Research*, 67: 4704–4712.

Siripong S, Rittman, B. 2007. Diversity of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water research*, 4: 1110–1120.

Srinivasan S., Harrington G. W., Xagoraraki I., Goel R. 2008. Factors affecting bulk to total bacteria ratio in drinking water distribution systems. *Water Research*, 42: 3393–3404.

Steinberger R. E., Holden P.A. 2005. Extracellular DNK in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 9: 5404–5410.

Stres B., Danevcic T., Pal L., Luka M. M., Resman L., Leskovec S., Hacin J., Stopar D., Mahne I., Mandic-Mulec I., 2008. Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiology and Ecology*, 66: 110–22.

Stres B., Tiedje J. M., 2006. New frontiers in soil microbiology: How to link structure and function of microbial communities? *Soil Biology*, 8: 1–22.

Strous M., Van Gerven E., Kuenen J. G., Jetten M. 1997. Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2446–2448.

Sudarno U., Winter J., Gallert C. 2010. Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresource Technology*, 102: 5665–5673.

Szatkowska B., Cema G., Plaza J., Hultman B. 2006. One stage system with partial nitritation and Anammox processes in moving-bed biofilm reactor. Kongres »Biofilm Systems 2006«. Amsterdam RAI, sept. 2006.

Tamura K, Dudley J, Nei M. Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596–1599.

Teske A., Alm E., Regan J. M., Toze S., Rittmann B. E., Stahl D. A. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176: 6623–6630.

Van Kessel M.A.H.J., Harhangi H. R., van de Pas-Schoonen K., van de Vossenberg J., Flik G., Jetten M. S. M., Klaren P. H. M., Op den Camp H. J. M., 2010. Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 306: 177–184.

Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H. P., Schleifer K. H. 1995. In situ identification of ammonia-oxidising bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 251–264.

Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R.. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261–5267.

Webster G., Embley M. T., Prosser J. I. 2002. Grassland management regimes reduce small scale heterogeneity and species diversity of beta – proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 20–30.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.

Wells, G. F., Park, H. D., Yeung, C. H., Eggleston, B., Francis, C. A., Criddle, C. S. 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environmental Microbiology*, 11: 2310–28.

Wen Q., Chen Z., Shi H. 2008. TRFLP detection of nitrifying bacteria in a fluidized bed reactor of achieving simultaneous nitrification – denitrification. *Chemosphere*, 71: 1683–1692.

Wuertz S., Bishop P. L., Wilder P. A. 2003. Biofilms in wastewater treatment. IWA Publishing: 401 str.

Xia S., Li J., He S., Xie K., Wang X., Zhang Y., Duan L., Zhang Z. 2010. The effect of organic loading on bacterial community composition of membrane biofilms in a submerged polyvinyl chloride membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 101: 6601–6609.

Xia S., Li J., Wang R. 2008. Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon:nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecology and Engineering*, 32: 256–262.

Yu C. P., Ahuja R., Sayler G., Chu K. H. 2004. Quantitative Molecular Assay for Fingerprinting Microbial Communities of Wastewater and Estrogen-Degrading Consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3: 1433–1444.

Yu T., Qi R., Li D., Zhang Y., Yang M. 2010. Nitrifier characteristics in submerged membrane bioreactors under different sludge retention times. *Water Research*, 44: 2823–2830.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem vsem in vsakomur posebej za spodbudo, podporo in pomoč pri izvedbi magistrske naloge.

Lepo se zahvaljujem direktoricama CČN DK dr. Olgi Burici in dr. Marjetki Stražar za spodbujanje raziskovalnega duha ter omogočeno izvedbo praktičnega dela. Sodelavki dr. Meti Levstek lepa hvala za skupno preživete ure praktičnega dela z reaktorji in komentarje k nalogi. Hvala kolektivu Centralne čistilne naprave Domžale-Kamnik d. o. o. za pomoč pri izvedbi praktičnega dela in sodelavkam za spodbudo.

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Ines Mandič-Mulec za mentorstvo in strokovne pripombe.

Velika zahvala gre prof. dr. Romani Marinšek Logar, prof. dr. Mihaelu J. Tomanu ter prof. dr. Milenku Rošu za strokoven pregled magistrske naloge kot tudi za vse strokovne pripombe in spodbudo v ciljni ravnini.

Hvala Levinu Palu za pomoč pri molekularnih analizah in obdelavi podatkov.

Mirti, Mini in Metodu, svojim trem raziskovalcem koristnega in nekoristnega sveta želim, da ohranijo radovednost ter vztrajajo pri problemih in izzivih dlje od drugih.

»Če si želite doseči nekaj,
česar še nikoli niste dosegli,
morate storiti nekaj,
česar še nikoli niste storili.«

A. N.

PRILOGE

PRILOGA: Rezultati meritev na pilotnih reaktorjih za vrednotenje procesa nitrifikacije.

Preglednica 5: Rezultati meritev na vtoku v mini reaktor.

		vtok	mini	reaktor		
datum	pretok	HRT	NH ₄ -N	NO ₃ -N	NO ₂ -N	TN
	L/h	h	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
19. 10. 2007	0,4	15,1	83,0	10,1	2,1	98,5
2. 11. 2007	0,5	13,2	86,1	8,6	2,0	100,5
7. 11. 2007	1,6	3,8	78,8	6,1	1,1	98,0
20. 11. 2007	2,9	2,1	97,2	8,0	1,3	113,5
20. 12. 2007	1,8	3,3	101,0	10,8	0,4	116,0
18. 1. 2008	1,8	3,3	92,4	10,7	0,1	101,5

Preglednica 6: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja Kontrola.

	Mini	pilotni	reaktor	KONTROLA													
datum	pH	kisik	temp	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	TN	TN (1 um)	razlika NH4-N vtok-iztok	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (deltaNH4-N/HRT)	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (obremenitev N _{x24/A}), A=155 m ² /m ³	učinek čiščenja po amonijevem dušiku	
enota		mg/l	oC	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg NH4-N/l h	mg NH4-N/l h	gN/m ² d	gN/m ² d	%	
19.10.2007	7,7	8,4	20,0	0,4	15,1	0,4	90,7	0,0	98,3	89,9	82,6	5,5	5,5	0,9	0,8	99,5	
2.11.2007	7,5	8,7	19,7	0,5	13,2	1,2	89,1	1,0	95,5	91,5	85,0	6,5	6,4	1,0	1,0	98,7	
7.11.2007	7,5	7,7	19,3	1,6	3,8	0,2	85,5	0,5	86,0	84,5	78,6	21,0	21,0	3,3	3,2	99,8	
20.11.2007	7,8	7,4	19,9	2,9	2,1	6,0	93,5	5,4	111,0	108,0	91,2	47,0	44,1	7,3	6,8	93,8	
20.12.2007	7,5	7,0	17,8	1,8	3,3	1,3	95,8	1,7	121,5	106,5	99,7	30,6	30,2	4,7	4,7	98,7	
18.1.2008	7,5	7,3	19,0	1,8	3,3	1,4	97,9	1,3	108,0	100,5	91,0	27,7	27,3	4,3	4,2	98,5	

Preglednica 7: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja Reaktor 1.

	Mini	pilotni	reaktor	REAKTOR 1													
datum	pH	kisik	temp	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	TN	TN (1 um)	razlika NH4-N vtok-iztok	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (deltaNH4-N/HRT)	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (obremenitev N _{x24/A}), A=155 m ² /m ³	učinek čiščenja po amonijevem dušiku	
enota		mg/l	oC	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg NH4-N/l h	mg NH4-N/l h	gN/m ² d	gN/m ² d	%	
19.10.2007	7,7	8,4	20,0	0,4	14,0	0,3	89,3	0,0	98,7	96,1	82,7	5,9	5,9	0,92	0,91	99,6	
2.11.2007	7,4	8,7	19,7	0,4	14,7	0,7	90,7	1,0	100,0	94,5	85,4	5,9	5,8	0,91	0,90	99,2	
7.11.2007	9,6	7,7	19,3	1,5	4,0	52,3	18,0	0,5	86,0	84,5	26,5	19,7	6,6	3,05	1,03	33,6	
20.11.2007	7,5	8,2	19,9	0,8	7,1	1,6	104,0	5,4	124,5	120,1	95,6	13,7	13,4	2,11	2,08	98,3	
20.12.2007	7,5	7,3	17,8	1,9	3,1	1,9	104,0	1,7	135,0	110,0	99,1	32,7	32,0	5,1	5,0	98,1	
18.1.2008	7,5	7,6	19,0	2,0	3,1	1,4	97,9	1,3	108,0	100,5	91,0	30,0	29,6	4,6	4,6	98,5	

Preglednica 8: Rezultati meritev na vtoku v zunanji reaktor.

				dotok Zunanji		pilotni reaktor					
datum	pretok	HRT	RVI	temp	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	KPK	TN
	m ³ /h	h	%	oC	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
18.10.2007	54	2	200	17,3	54	2	27,9	0,53	0,29	309,6	67
21.1.2008	54	2	200	9,6	54	2	29,3	1,09	0,141	301	125

Preglednica 9: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja OXI 1.

	Zunaji	pilotni	reaktor	OXI 1												
datum	pH	kisik	temp	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	TN	KPK	razlika NH4-N vtok-iztok	obremenitev (konc. vtok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (deltaNH4-N/HRT)	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (obremenitev Nx24/A), A=250 m ² /m ³	učinek čiščenja po amonijevem dušiku
	mg/l	oC	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg NH4-N/1h	mg NH4-N/1h	gN/m ² d	gN/m ² d	%	
18.10.2007	7,6	5,9	17,3	54,0	2,0	0,45	8,4	0,33	26,1	454	27,5	14,0	13,7	1,34	1,32	98,4
21.1.2008	7,8	8,5	9,6	54,0	2,0	1,24	10,4	0,28	24,3	432	28,1	14,7	14,0	1,41	1,35	95,8

Preglednica 10: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja OXI 2.

	Zunaji	pilotni	reaktor	OXI 2													
datum	pH	kisik	temp	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	KPK	TN	razlika NH4-N vtok-iztok	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (deltaNH4-N/HRT)	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (obremenitev N ₂ /A), A=250m ² /m ³	učinek čiščenja po amonijevem dušiku	
		mg/l	oC	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg NH4-N/l h	mg NH4-N/l h	gN/m ² d	gN/m ² d	%	
18.10.2007	7,94	2	17,3	53	2,0	0,18	8,7	0,054	20,5	11,1	0,27	0,23	0,14	0,02	0,01	60,0	
21.1.2008	7,8	2	9,6	53	2,0	0,19	11,3	0,095	33,8	14,4	1,05	0,62	0,53	0,06	0,05	84,7	

Preglednica 11: Rezultati meritev na vtoku v mini reaktor CČN.

			dotok Mini	pilotni reaktor	CČN												
datum	pretok	HRT	RVI	NH4-N	NO3-N	NO2-N	KPK	KPK (1 um)	TN								
	l/h	h	%	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l								
23.10.2007	6,2	5,4	300	27,5	0,42	0,039	254,00	135,00	38,8								
7.11.2007	4,2	8,0	300	39,90	0,79	0,01	291,00	168,00	55,4								
18.1.2008	3,3	9,1	200	37,6	0,78	0,06	237	166	45,4								

Preglednica 12: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja 2-NI.

	Mini	pilotni	reaktor	CČN 2-NI											
datum	pH	kisik	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	TN	KPK	razlika NH4-N vtok-iztok	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (deltaNH4-N/HRT)	obremenitev (konc. vtok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (obremenitev Nx24/A), A=155 m ² /m ³	učinek čiščenja po amonijevem dušiku
		mg/l	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg NH4-N/h	mg NH4-N/h	gN/m ² d	gN/m ² d	%
23.10.2007	7,6	4,4	6,2	5,4	2,3	4,3	0,48	20,6	198	25,2	5,1	4,7	2,4	0,45	91,5
7.11.2007	7,4	5,2	4,2	8,0	3,4	24,8	0,52	9,2	204	36,5	5,0	4,6	3,5	0,44	91,5
18.1.2008	7,0	5,4	3,3	9,1	1,9	25,3	0,53	12,6	201	35,7	4,1	3,9	3,4	0,38	94,9

Preglednica 13: Rezultati meritev na iztoku iz reaktorja 3-NI.

	Mini	pilotni	reaktor	CČN 3-NI											
datum	pH	kisik	pretok	HRT	NH4-N	NO3-N	NO2-N	TN	KPK	razlika NH4-N vtok-iztok	obremenitev (konc. dotok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (deltaNH4-N/HRT)	obremenitev (konc. vtok NH4-N/HRT)	stopnja nitrifikacije (obremenitev Nx24/A), A=155 m ² /m ³	učinek čiščenja po amonijevem dušiku
		mg/l	l/h	h	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg NH4-N/h	mg NH4-N/h	gN/m ² d	gN/m ² d	%
23.10.2007			6,2	5,4	0,88	6,48	0,355	18,4	239	1,5	0,43	0,27	0,14	0,03	62,2
7.11.2007			4,2	8,0	1,9	26,5	0,446	9,6	215	1,5	0,43	0,19	0,14	0,02	44,1
18.1.2008			3,3	9,1	1,2	25,4	0,157	10,1	224	0,7	0,21	0,08	0,07	0,01	36,8

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Barbara BRAJER HUMAR

**SESTAVA IN AKTIVNOST MIKROBNE ZDРUŽBE
NITRIFIKACIJSKIH BAKTERIJ V
IMOBLIZIRANI BIOKULTURI**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016