

## Primjena metode odzivnih površina u optimizaciji parametara procesa biološke obrade otpadnih voda u bioreaktoru s mikrobnim biofilmom

Filip Bujan, dr. sc. Damir Oros, izv. prof. dr. sc. Tonči Rezić

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Pierottijeva 6, Zagreb 10000.  
e-mail: trezic(at)pbf.hr

### Sažetak:

Cilj ovog rada je bio optimizirati parametre procesa biološke obrade otpadnih voda te odrediti njihov utjecaj na odvijanje procesa pomoću metode odzivnih površina. Bioproces simultane nitrifikacije i denitrifikacije je proveden u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB) s biofilmom mikroorganizma *Paracoccus denitrificans*. Podaci dobiveni eksperimentom su obrađivani statističkim metodama linearne regresije i višesmjernje analize varijance. Utvrđene su kritične vrijednosti za brzinu protoka hranjive podloge (0,6 L/h) te brzinu rotacije bioreaktora (16,9 min<sup>-1</sup>). Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da statistički najznačajniji utjecaj na proces simultane nitrifikacije i denitrifikacije ima brzina protoka hranjive podloge.

**Ključne riječi:** simultana nitrifikacija i denitrifikacija, HRCB, *Paracoccus denitrificans*, metoda odzivnih površina, biofilm

### 1. UVOD

Uklanjanje dušikovih spojeva iz otpadnih voda je sve važnije u svijetu zbog svojeg velikog ekonomskog i ekološkog značaja. Otpadne vode opterećene visokim količinama organskih spojeva s dušikom se pročišćavaju bioprocima aerobne nitrifikacije, te anaerobne denitrifikacije (Huilinir i sur. 2010). Za uspješno provođenje pročišćavanja, tj. procesa obrade otpadne vode potrebno je bioprocise fizički razdvojiti ili promijeniti aerobne uvjete okoline u anaerobne, nakon provedbe aerobne faze procesa. Bakterija *Paracoccus denitrificans* može istodobno provoditi nitrifikaciju i denitrifikaciju, što omogućava provedbu bioprocisa u samo jednom stupnju.

U procesu obrade otpadnih voda se u praksi se koriste vrlo različito konstruirani bioreaktori, ali veću efikasnost često imaju bioreaktori u kojima dolazi do formiranja mikrobnog biofilma nego bioreaktori sa suspendiranom mikrobnom biomasom. Između ostalog, formiranje mikrobnog biofilma na stijenkama reaktora najčešće pozitivno utječe na stabilnost i fiziološku aktivnost mikrobnog biomase. Od bioreaktora s mikrobnim biofilmom za obradu otpadnih voda se najčešće primjenjuju biodisk reaktori, prokapni filteri, submerzni biofilteri, te cijevni bioreaktori.

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) je bioreaktor s karakteristikama rotirajućeg biodisk reaktora i bioreaktora s tankim slojem. HRCB je ispunjen pregradama u obliku prstena koje povećavaju raspoloživu površinu za formiranje mikrobnog biofilma, a osim toga pregrade utječu i na strujanje hranjive podloge u bioreaktoru.

U ovom istraživanju proučava se utjecaj procesnih parametara bioreaktora [brzina protoka (F, L/h) i brzina rotacije bioreaktora (n, min<sup>-1</sup>)] na uklanjanje dušikovih spojeva u HRCB-u. Uspješnost procesa uklanjanja dušikovih spojeva se procjenjuje na osnovu volumetrijske potrošnje dušika (N<sub>snd</sub>, mgN<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Kako bi se odredio utjecaj procesnih parametara na volumetrijsku potrošnju dušika korištena je metoda odzivnih površina (response surface methodology, RSM). Cilj istraživanja je određivanje međuzavisnosti procesnih parametara, te njihov utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika i pronalaženje optimalnih vrijednosti procesnih parametara, kako bi se omogućilo povećanje efikasnosti procesa..

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Simultana nitrifikacija i denitrifikacija

Proces simultane nitrifikacije i denitrifikacije je bioproces u kojemu se nitrifikacija i denitrifikacija provode istovremeno i pod istim uvjetima u istom bioreaktoru. Iz otpadne vode se uklanja amonijak, pri čemu je krajnji produkt bioprocasa elementarni dušik ( $N_2$ ).

Proces simultane nitrifikacije i denitrifikacije se još naziva i heterotrofna nitrifikacija i aerobna denitrifikacija. Za provođenje tog bioprocasa se najčešće koriste mikroorganizmi *Nitrosomonas europaea* (za nitrifikaciju), te *Thiosphaera pantotropha* i *Pseudomonas denitrificans* (za denitrifikaciju).

Za provođenje bioprocasa simultane nitrifikacije i denitrifikacije se koriste bioreaktori različitih izvedba i različiti načini vođenja procesa, a zajednička karakteristika tih sustava je visoka efikasnost (90-100%) uklanjanja organskih spojeva s dušikom. Jedan tip sustava koristi kružni ciklus aktivnog mulja, pri čemu se izmjenjuju aerobna i anaerobna faza ili se stimulira formiranje aerobne i anaerobne mikrozone unutar flokula aktivnog mulja ili biofilma.

Kako bi se bioproces simultane nitrifikacije i denitrifikacije efikasno odvijao, neophodna je kontrola uvjeta okoline bioprocasa, što uključuje kontrolu: koncentracije otopljenog kisika, pH vrijednosti, koncentracije amonijaka i slobodnog hidroksilamina, temperature, te trajanja aeracije. Utvrđeno je da optimalna koncentracija otopljenog kisika iznosi  $1,3 \text{ mgL}^{-1}$ , pri čemu je koncentracija otopljenog kisika od  $1 \text{ mgL}^{-1}$  minimum za odvijanje procesa denitrifikacije. Koncentracija otopljenog kisika mora biti dovoljno visoka za održavanje aktivnosti nitrificirajućih i denitrificirajućih bakterija, ali ne smije biti previsoka jer visoke koncentracije otopljenog kisika inhibiraju enzimski sustav koji provodi denitrifikaciju. Optimalni raspon pH za provođenje procesa simultane nitrifikacije i denitrifikacije je između 7,5 i 8,6. Tijekom procesa nitrifikacije pH vrijednost pada, a tijekom denitrifikacije raste (Matsumoto i sur. 2007).

### 2.3. Bioreaktori s mikrobnim biofilmom u procesima obrade otpadnih voda

Formiranje mikrobnog biofilma u bioreaktoru pozitivno djeluje na karakteristike bioprocasa, jer se dobiva visoka koncentracija aktivnih mikrobnih stanica, a budući da je tako onemogućeno ispiranje stanica bioproces se može provoditi pri brzinama razrjeđenja većim od maksimalne brzine rasta mikroorganizma. Zbog toga se primjenom bioreaktora s mikrobnim biofilmom ostvaruju veće produktivnosti procesa u odnosu na bioreaktore sa suspendiranom mikrobnom biomasom. Formiranjem mikrobnog biofilma otežava se dobava kisika do stanica u unutrašnjosti biofilma, što aktivira njihov anaerobni metabolizam, odnosno stvaraju se uvjeti za istovremeno provođenje anaerobnih i aerobnih procesa unutar istog bioreaktora (Kumar i Anand 1998.). Budući da je omogućeno istodobno provođenje anaerobnih i aerobnih bioprocasa, za uspješnu obradu otpadne vode je u tom slučaju potreban puno manji reaktorski volumen postrojenja za obradu otpadne vode, što smanjuje i troškove obrade (Moser F. 1991; Wolfbauer i sur. 1978). Još jedno pozitivno svojstvo mikrobnog biofilma je manja izloženost mikrobnih stanica prema štetnim tvarima koje su prisutne u otpadnoj vodi. Primjeri takvih bioprocasa su uklanjanje amonijevih iona, nitrata, nitrita i cijanata iz otpadnih voda.

Glavno svojstvo po kojemu se mogu podijeliti bioreaktori s mikrobnim biofilmom je nosač na kojemu se formira biofilm, a on može bit stacionarna inertna površina ili čvrste fluidizirane čestice. Bioreaktori s mikrobnim biofilmom na fluidiziranim čvrstim česticama se dijele na: „air-lift“ bioreaktore bioreaktore s fluidiziranim ili lebdećim slojem, toranjske bioreaktore te bioreaktore s unutrašnjom cirkulacijom podloge pomoću pumpe. Bioreaktori s mikrobnim biofilmom na čvrstoj stacionarnoj inertoj površini su: prokapni filteri, submerzni filteri, aktivni biofilteri i rotirajući biološki kontaktori, koji su poznatiji pod nazivom biodisk reaktori. Pri visokim hidrodinamičkim opterećenjima u primjeni imaju prednost bioreaktori s biofilmom formiranim na čvrstoj stacionarnoj površini. Glavne mane bioreaktora s mikrobnim biofilmom su relativno dug vremenski period potreban za formiranje biofilma i rast biomase, otežana dobava kisika (mali aeracijski kapacitet) te otežana kontrola procesnih parametara sustava (pH, temperatura i debljina biofilma) (Moya i sur. 2012).

Kod bioreaktora s rotirajućim elementima su neki od nedostataka bioreaktora s mikrobnim biofilmom uklonjeni. Glavna karakteristika biodisk reaktora su rotirajući diskovi koji su uronjeni u otpadnu vodu do 40% svojeg promjera, a biofilm se formira na tim diskovima i između njih. Takva konstrukcija bioreaktora omogućava bolju kontrolu procesnih parametara i debljine biofilma. Procesi u biodisk reaktorima su izrazito stabilni, zbog čega se primjenom biodiskreaktora postiže visok stupanj pročišćavanja, a na njega nema značajan utjecaj čak ni nagli porast koncentracije supstrata u ulaznom toku. Još jedna prednost biodisk reaktora je jednostavna konstrukcija i relativno mali potreban radni prostor. Rotacijom diskova se postiže naizmjenični kontakt mikrobnog biofilma sa zrakom i otpadnom vodom, čime se osigurava opskrba mikrobnih stanica kisikom, a brzinom rotacije diskova se može kontrolirati debljina mikrobnog biofilma (Huulinir i sur. 2010).

Kod obrade voda s velikim organskim opterećenjem često je potrebno duže vrijeme zadržavanja, a to se može postići ugradnjom pregrada u prihvatnu posudu bioreaktora. Zbog svojih karakteristika, biodisk reaktori se koriste u obradi otpadnih

voda s toksičnim i teško razgradivim spojevima, npr. u obradi fenolnih spojeva iz rafinerija, u obradi otpadnih voda s fenol-formaldehidnim smolama te otpadnih voda s toksičnim organskim spojevima (npr. klorfenol, toluen) (Kargi i Eker 2001).

Prokapni filteri sadrže čestice nosača velike specifične površine na kojima se formira mikrobnog biofilm. Preko čestica nosača se jednolično propušta otpadna voda koja se obrađuje, a pročišćena voda se skuplja na dnu bioreaktora. Struktura nosača osigurava strujanje zraka i tekućine, tj. osigurava dobavu kisika i hranjivih tvari do stanica mikroorganizma. Prednosti prokapskih filtera su jednostavan način vođenja procesa, lako održavanje procesa te tolerancija na promjene temperature i toksičnih tvari. Glavne mane prokapskih filtera su velika radna površina, osjetljivost na niske temperature, a zbog činjenice da se uglavnom koriste otvoreni prokapni filteri tijekom rada se oslobađa neugodan miris te može doći i do kontaminacija larvama insekata ili crvima. Aktivni biofilteri se sastoje od nekoliko posuda, od kojih su dvije bioreakcijske posude. Kod ovog tipa bioreaktora biomasa raste u obliku biofilma (1. reaktor) te u obliku suspendiranih flokula (2. reaktor). U prvom bioreaktoru se provodi primarna obrada i to tako da se otpadna voda raspršuje preko pregrada na kojima je formiran biofilm, a zatim se u drugom koraku djelomično obrađena otpadna voda dodatno obrađuje u aeracijskom bazenu, u kojemu je biomasa suspendirana u obliku flokula. Posljednja faza uključuje izdvajanje aktivnog mulja (biomasa u obliku flokula) iz pročišćene vode te povratak aktivnog mulja u proces. Aktivni biofilteri imaju relativno visoku učinkovitost pročišćavanja, a njihova primjena je jednostavna i pouzdana. Submerzni filteri su nalik prokapskim filterima, a glavna im je razlika to što je kod submerznih filtera nosač potpuno uronjen u otpadnu vodu. Miješanje suspenzije te kontrola debljine mikrobnog biofilma se postiže aeracijom. Nosač je potrebno regenerirati da bi se uklonio višak biomase te tako spriječio začepljene submerznog filtera.

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) sjedinjuje karakteristike cijevnih bioreaktora s tankim slojem i biodisk reaktora. Unutrašnjost HRCB-a je ispunjena pregradnim prstenovima koji su položeni okomito na aksijalnu os bioreaktora. Razmak između pojedinih diskova je moguće mijenjati, kao i razinu tekućine unutar bioreaktora. Pregradni prstenovi povećavaju površinu za formiranje mikrobnog biofilma. Formiranje mikrobnog biofilma na stijenkama bioreaktora omogućuje vođenje procesa pri većim brzinama razrjeđenja. Jedna od značajnih karakteristika horizontalnih cijevnih bioreaktora je čepoliko strujanje, zbog čega su dobar izbor za biološku obradu otpadnih voda (Wolfbauer i sur. 1978) te za procese biokonverzije (Nipkow i sur. 1986; Moser 1991). Diskovi (prstenovi) koji su postavljeni uzduž osi HRCB-a dodatno pospješuju čepoliko strujanje ujednačavanjem aksijalnih brzina strujanja tekućine. Miješanje tekućine se postiže rotacijom bioreaktora pri čemu dolazi do trenja između tekućine i unutarnje površine bioreaktora. Glavne prednosti horizontalnih cijevnih bioreaktora su: lakši „scale-up“ (konstrukcija većeg bioreaktora na temelju sličnosti), jer je potrebno poznavati manje parametara u odnosu na bioreaktore sa suspenzijom biomase; po duljini bioreaktora se formira gradijent koncentracije otopljenih tvari, što sprečava represijsku kinetiku (npr. inhibicija enzima produktom); miješanje unutar horizontalnih rotirajućih bioreaktora ne ovisi o vremenu, već o duljini bioreaktora. Glavna mana horizontalnih cijevnih bioreaktora je otežani prijenos kisika, zbog čega nisu pogodni za izrazito aerobne procese (npr. uzgoj biomase kvasca).

#### 2.4. Statistička analiza podataka

Metoda odzivne površine (response surface methodology, RSM) je skup statističkih tehnika koje nalaze primjenu u modeliranju i analizi procesa u kojima se prati odziv koji ovisi o nekoliko varijabli, a cilj je optimizacija odziva (Montgomery, 1997).

Glavna statistička metoda za testiranje međuovisnosti procesnih parametara jest analiza varijance (ANOVA). Ova metoda se najčešće koristi pri analizi nezavisnih parametara između kojih se razlike ne mogu iskazati kvantitativno. Kod nezavisnih parametara čija se vrijednost izražava kvantitativno (npr. procesni parametri bioprocesa), potrebno je promatranje cijelog raspona vrijednosti koje parametar može poprimiti, te onih vrijednosti koje nisu bile predviđene planom eksperimenta. Analiza varijance je disperzijski statistički test kojim se ispituje da li rezultati, odnosno statistički uzorci, dolaze iz populacije s jednakim varijancama. Nul-hipoteza kod ANOVA-e podrazumijeva da su srednje vrijednosti unutar tretmana (npr. ista vrijednost jednog parametra, a drugi se mijenja) jednake ida pripadaju istoj populaciji, te da je varijacija između srednjih vrijednosti rezultat pogreške. Ukupna varijacija podataka je izražena preko zbroja kvadratnih odstupanja pojedinih odziva ( $y_i$ ) od srednje vrijednosti odziva ( $\bar{y}$ ) za  $n$  slučaja (opažaja):

$$SS_{tot} = (x + \alpha)^n = \sum_{k=0}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (1)$$

Analizom varijance se ukupna varijacija podataka ( $SS_{tot}$ ) razdjeljuje na doprinos parametara ( $SS_x$ ) i doprinos slučajne greške ( $SS_e$ ):

$$SS_{tot} = SS_x + SS_e \quad (2)$$

$SS_x$  je u biti zbroj kvadratnih odstupanja od srednje vrijednosti između tretmana (različite vrijednosti parametara), a  $SS_e$  je zbroj kvadratnih odstupanja od srednje vrijednosti unutar tretmana. Varijance se računaju pomoću izraza:

$$s_x^2 = \frac{SS_x}{v_x} \quad (3)$$

$$s_e^2 = \frac{SS_e}{v_e} \quad (4)$$

pri čemu su  $v_e$  i  $v_x$  pripadajući stupnjevi slobode. Kako bi se testirala nul-hipoteza koristi se Fisherov statistik, koji je definiran omjerom varijanci (između i unutar tretmana):

$$F_0(v_e, v_x) = \frac{s_x^2}{s_e^2} \quad (5)$$

Budući da je pretpostavka da je proces opisan statističkim linearnim modelom i da je pogreška normalno i nezavisno distribuirana, u slučaju ispravnosti nul-hipoteze opažajni statistik ( $F_0$ ) je raspodijeljen po Fisherovoj raspodjeli. Devijacija  $F$ -vrijednosti od Fisherove raspodjele ukazuje da su srednje vrijednosti populacija različite, odnosno da ispitivani čimbenik utječe na populaciju. U tom slučaju, valjanost  $F$ -vrijednosti se testira pridruženjem  $p$ -vrijednosti, koja pokazuje vjerojatnost značajnosti  $F$ -vrijednosti.

Kada se analiziraju eksperimenti u kojima se ispituje utjecaj dva ili više čimbenika koristi se višesmjerna analiza varijance. Kod višesmerne analize varijance ukupni zbroj kvadratnih odstupanja se rastavlja na doprinose pojedinih čimbenika i doprinos slučajne pogreške:

$$SS_{tot} = \sum_{i=1}^k SS_{mi} + SS_e \quad (6)$$

pri čemu je  $k$  ukupni broj čimbenika.

Granična razina statističke značajnosti ( $\alpha$ ) je mjerilo za osjetljivost statističkog testa. Iznos razine značajnosti označava postotak u kojemu je dozvoljena greška odbacivanja nul-hipoteze. Npr. ukoliko  $\alpha$  iznosi 0,05 to označava da tvrdimo da je nul-hipoteza ispravna s vjerojatnošću od 95%, odnosno vjerojatnost da nul-hipoteza nije ispravna iznosi samo 5%. Odabir vrijednosti razine značajnosti uvelike ovisi o kontekstu istraživanja. U istraživanjima s veoma ozbiljnim posljedicama (npr. medicina, farmacija) potrebna je veća razina sigurnosti pri odbacivanju nul-hipoteze, odnosno, primjenjuju se vrijednosti razine značajnosti manje od 0,01. Razina značajnosti je važan statistički podatak, međutim potrebno je uzeti u obzir i praktičnu značajnost rezultata, budući da mogućnost statističkog testa da odbaci nul-hipotezu ovisi o broju uzoraka.

Kod velikog broja uzoraka može doći do odbacivanja nul-hipoteze na temelju statističkog testa, makar su razlike između srednjih vrijednosti prihvatljive u praksi i ne predstavljaju opasnost za sigurnost i zdravlje ljudi. S druge strane, kod malog broja uzoraka statistički test ne mora odbaciti nul-hipotezu, iako su razlike s inženjerskog aspekta velike. Uzevši u obzir razlike između statističkog i inženjerskog gledišta, evidentno je da je potrebna i inženjerska procjena statističke analize. Zbog toga je preporučljivo da se navodi iznos  $p$ -vrijednosti, a ne samo odnos s razinom značajnosti ( $p < \alpha$ ,  $p > \alpha$ ), jer se na taj način kvantificira mjera značajnosti. (Ukrainczyk, 2010.)

Linearna regresijska analiza je skup statističkih metoda pomoću kojih se mogu definirati relacije između odziva i nezavisnih varijabli. Jedan od modela koji se koriste je višestruki regresijski model. Višestruki regresijski model je algebarski model pomoću kojega se može analitički odrediti statistička povezanost jedne zavisne varijable s dvije ili više nezavisnih varijabli.

Općenita jednadžba višestrukog regresijskog modela je:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon \quad (7)$$

gdje je  $\varepsilon$  slučajna varijabla koja modelu daje stohastični karakter i predstavlja odstupanja od funkcionalnog odnosa koja su nepoznata.

Model višestruke regresije se s obzirom na parametre dijeli na linearne i nelinearne modele, a može poprimiti različite oblike. Model se izabire na temelju zahtjeva konkretne primjene. Linearni modeli su najjednostavniji i najčešće korišteni, pogotovo zato jer je moguće velik broj nelinearnih modela svesti na linearan model primjenom transformacija. Najčešće primjenjivan linearni model je polinomna jednadžba, pogotovo kvadratni polinom:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (8)$$

pri čemu je  $k$  broj varijabli, a  $\beta$ -e su regresijski koeficijenti.

Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) označava udio protumačenog dijela zbroja kvadrata odstupanja od zbroja kvadrata ukupnih odstupanja zavisne varijable od srednje vrijednosti, te je stoga relativni pokazatelj reprezentativnosti regresije:

$$\begin{aligned}
 (SS_{tot} = SS_{reg} + SS_e) \\
 R^2 = \frac{SS_{reg}}{SS_{tot}} \quad (9)
 \end{aligned}$$

Što je koeficijent determinacije bliži jedan, promatrani model je reprezentativniji. Nedostatak koeficijenta determinacije kao mjerila reprezentativnosti je činjenica da nije nepristran, jer je veći što je veći broj regresorskih varijabli u modelu.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Karakteristike bioreaktora

Karakteristične dimenzije bioreaktora su: duljina 2,00 m; unutarnji promjer 0,25 m. Unutrašnjost bioreaktora je ispunjena pregradnim prstenovima unutarnjeg promjera 0,19 m, a međusobna udaljenost između pojedinih prstenova je 0,02 m. Volumen tekućine u bioreaktoru je održavan na 15 L. Miješanje se ostvaruje rotacijom cijelog bioreaktora, što se omogućuje s elektromotorom povezanim preko remenice i remena s bioreaktorom, a pri tome je bioreaktor položen na koloture s kugličnim ležajevima. Aeracija se provodila kroz centralnu cijev koja čini os bioreaktora. Kroz cijelo trajanje eksperimenta je održavan stalan protok zraka u iznosu 152 L/h. Sustavi za uzorkovanje su postavljeni uzduž bioreaktora, a međusobno udaljeni 0,40 m.

#### 3.2. Postavke eksperimenta

Inokulum radne kulture mikroorganizma *Paracoccus denitrificans* uzgojen je pri temperaturi  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  na složenoj hranjivoj podlozi sljedećeg sastava (izraženo u g/L): 10 Na-acetat, 0,8  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,3  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7  $\text{MgSO}_4$ , 0,4  $\text{H}_2\text{O}$ , te uz dodatak elemenata u tragovima (Robertson i Kuenen, 1992). Hranjiva podloga je bila podvrgnuta sterilizaciji pri  $121^\circ\text{C}$  u trajanju od 20 min. Inokulacija HRCB-a je izvršena sa 7,5 L suspenzije biomase radnog mikroorganizma koja je dobivena šaržnim uzgojem u bioreaktoru s mješalom. Prihranjivanje je započelo 24 h nakon inokulacije pri brzini protoka 1 L/h i brzini rotacije bioreaktora  $10 \text{ min}^{-1}$ . Od inokulacije do pojave stabilnog mikrobnog bioflima je prošlo 15 dana te je započeto ispitivanje utjecaja brzine protoka hranjive podloge i brzine rotacije bioreaktora na dinamiku bioprocesa simultane nitrifikacije i denitrifikacije.

#### 3.3. Analitičke metode

Koncentracija biomase je određivana centrifugiranjem uzorka ( $V = 35 \text{ mL}$ ) pri 4500 rpm u trajanju 20 min, zatim dvostrukim pranjem demineraliziranom vodom te sušenjem pri  $105^\circ\text{C}$  u trajanju 48 h. Supernatant dobiven centrifugiranjem suspenzije biomase je poslužio kao uzorak za određivanje koncentracije amonijevih, nitratnih i nitritnih iona, te kemijske potrebe na kisiku (KPK). Sva mjerenja su provedena u 3 paralele, a eksperimentalne greške su bile u rasponu 4-6%. Masa biofilma je određivana skupljanjem uzoraka sa unutarnje površine bioreaktora. Uzorak je zatim bio suspendiran u demineraliziranoj vodi, centrifugiran, dvaput opran demineraliziranom vodom i zatim sušen 48 h pri  $105^\circ\text{C}$ . Plinoviti produkti bioprocesa ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ) su određivani iz izlaza plina bioreaktora. Uzorci su se 3 h apsorbirali u otopini koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (97%) s 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nakon otapanja plinova u otopini, koncentracije produkata (dušikovih oksida) su određivane spektrofotometrijski uz primjenu kolorimetrijskih kitova (obojeno reagiraju s uzorkom) i to za amonijeve ione (Merck; no. 1.00683.0001), nitratne ione (Merck; no. 1.09713.0001) te nitritne ione (Merck; no. 1.14776.0001). Kao mjera učinkovitosti bioprocesa određivana je volumetrijska potrošnja dušika ( $N_{\text{SND}}$ ) koja se računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$N_{\text{SND}} = \frac{N_{\text{IN}} - N_{\text{OUT}} - N_x}{\tau} \quad (10)$$

gdje su  $N_{\text{IN}}$  i  $N_{\text{OUT}}$  koncentracije dušika na ulazu, odnosno, izlazu iz bioreaktora.  $N_x$  je količina dušika koja se tokom bioprocesa ugradi u mikrobnu biomasu, a kalkulira se pod pretpostavkom da je sastav biomase *P. denitrificans* jednak biomasi *Thiosphaera pantotropa* ( $\text{CH}_{1,9}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,25}$ ) (Geraats i sur. 1998).  $\tau$  je hidrauličko vrijeme zadržavanja, odnosno vrijeme potrebno da određeni element fluida prođe kroz cijeli bioreaktor.

Sadržaj anorganskih tvari, odnosno pepela, u biomasi *P. denitrificans* je određivan spaljivanjem i iznosio je približno 10%. Statistička analiza podataka je provedena pomoću programskog paketa Statistica 7 (Stat-Soft, USA).

### 4. Rezultati i rasprava

U prijašnjim istraživanjima uočeno je da pri brzinama rotacije bioreaktora većim od  $30 \text{ min}^{-1}$  dolazi do intenzivnog odvajanja biofilma, te je zbog toga  $30 \text{ min}^{-1}$  određena kao maksimalna vrijednost brzine rotacije bioreaktora tijekom bioprocasa. Mjerenja su provedena tako da se brzina protoka hranjive podloge održavala konstantnom za cijeli raspon vrijednosti brzine rotacije bioreaktora, a zatim se promijenila brzina protoka. Mjerenja su tako izvedena zbog spoznaja iz prethodnih istraživanja da brzina protoka hranjive podloge ima veći utjecaj na dinamiku bioprocasa i stabilnost mikrobnog biofilma nego brzina rotacije bioreaktora (Slavica i sur. 2004).

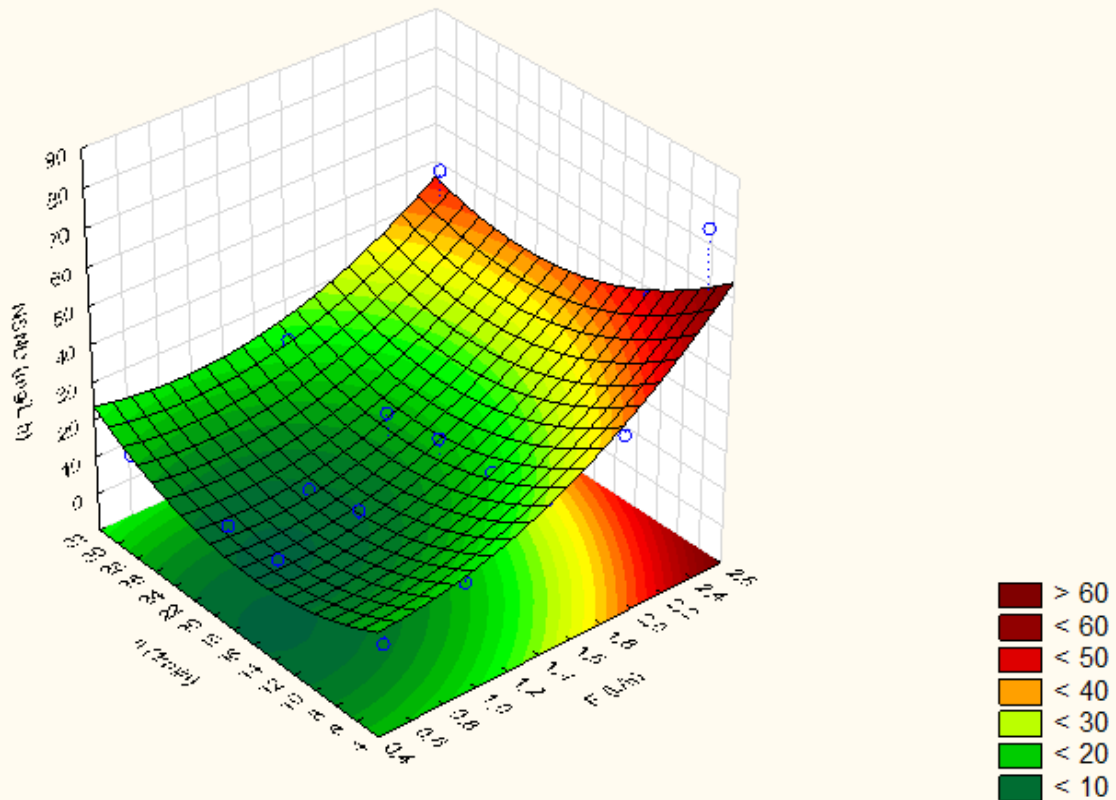
Pri vrijednostima brzine protoka hranjive podloge  $F = 2 \text{ L/h}$  i brzine rotacije bioreaktora  $30 \text{ min}^{-1}$  je došlo do odvajanja biofilma i ispiranja biomase iz bioreaktora, što je rezultiralo i povećanom koncentracijom amonijevih iona u izlazu iz bioreaktora (Tablica 1). Separacija biofilma je kompleksan proces na koji utječu hidrodinamički uvjeti koji vladaju unutar bioreaktora, kao i morfološke i fiziološke karakteristike samog biofilma (Rezić i sur. 2006).

**Tablica 1:** Volumetrijska potrošnja dušika tokom bioprocasa simultane nitrifikacije i denitrifikacije pri različitim kombinacijama procesnih parametara (brzina protoka hranjive podloge i brzina rotacije bioreaktora)

| Br. exp | F[L/h] | n[ $\text{min}^{-1}$ ] | N <sub>snd</sub> [ $\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ] |
|---------|--------|------------------------|---|
| 1       | 0,5    | 5                      | 10,3  |
| 2       | 0,5    | 10                     | 11  |
| 3       | 0,5    | 15                     | 12,5  |
| 4       | 0,5    | 20                     | 11,9  |
| 5       | 0,5    | 30                     | 12,1  |
| 6       | 1      | 5                      | 15,6  |
| 7       | 1      | 10                     | 14,7  |
| 8       | 1      | 15                     | 15,2  |
| 9       | 1      | 20                     | 11,6  |
| 10      | 1      | 30                     | 12,6  |
| 11      | 1,5    | 5                      | 26,9  |
| 12      | 1,5    | 10                     | 24,8  |
| 13      | 1,5    | 15                     | 24,6  |
| 14      | 1,5    | 20                     | 22,1  |
| 15      | 1,5    | 30                     | 24,1  |
| 16      | 2      | 5                      | 34,1  |
| 17      | 2      | 10                     | 19,5  |
| 18      | 2      | 15                     | 20,8  |
| 19      | 2      | 20                     | 20,3  |
| 20      | 2      | 30                     | 25,4  |
| 21      | 2,5    | 5                      | 77,2  |
| 22      | 2,5    | 10                     | 51,8  |
| 23      | 2,5    | 15                     | 23,6  |
| 24      | 2,5    | 20                     | 32,9  |
| 25      | 2,5    | 30                     | 52,1  |

Povećanjem brzine protoka hranjive podloge je došlo i do povećanja volumetrijske potrošnje dušika, što je rezultat veće koncentracije amonijevih iona unutar bioreaktora. Povećanjem brzine rotacije bioreaktora je uočen suprotan učinak, što ukazuje na to da intenzivno miješanje unutar bioreaktora negativno utječe na bioprocas simultane nitrifikacije i denitrifikacije.

Pri maksimalnoj brzini protoka hranjive podloge ( $F = 2,5 \text{ L/h}$ ) je opažena fluktuacija volumetrijske potrošnje dušika, što je posljedica smanjene stabilnosti mikrobnog biofilma pri većim brzinama protoka hranjive podloge. Osim toga, treba uzeti u obzir da je pri manjim brzinama protoka vrijeme zadržavanja značajno veće, što se iskazuje smanjenjem volumetrijske potrošnje dušika.



Slika 1. Graf odzivne površine bioprocasa simultane nitrifikacije i denitrifikacije (graf ovisnosti volumetrijske potrošnje dušika o procesnim parametrima  $n$  i  $F$ )

Odzivna funkcija je aproksimirana regresijskom analizom, a ima oblik kvadratnog polinoma:

$$z = 25,0859 - 4,1202x - 1,9241y - 0,3889xy + 8,9143x^2 + 0,0637y^2 \quad (11)$$

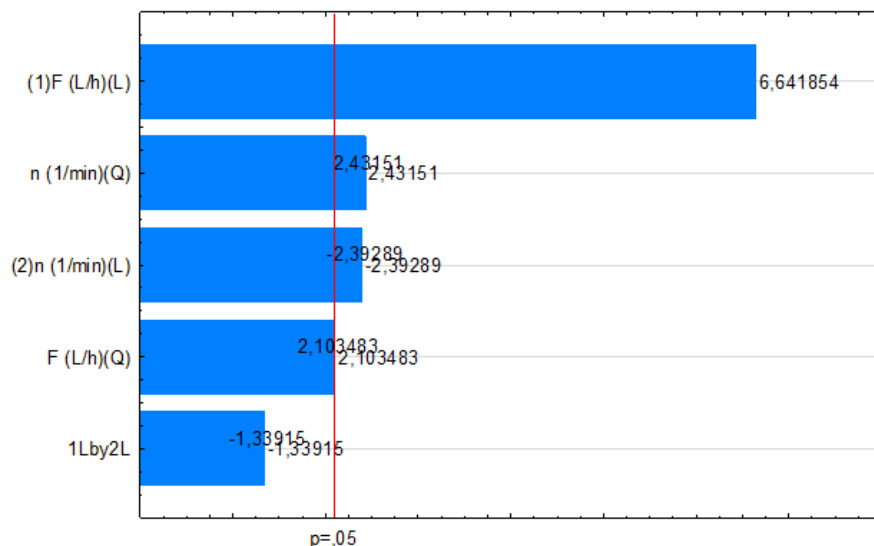
gdje je  $z$  volumetrijska potrošnja dušika,  $x$  je brzina protoka hranjive podloge,  $y$  je brzina rotacije bioreaktora, a brojčane vrijednosti su regresijski koeficijenti.

Tablica 2: Kritične vrijednosti odzivne funkcije (vrijednosti u kojima odzivna funkcija poprima globalni ekstrem)

| N <sub>snd</sub> pri kritičnim vrijednostima: 7,534193 |          |                      |          |
|--|----------|----------------------|----------|
|  | minimum  | kritične vrijednosti | maksimum |
| <b>F (L/h)</b>   | 0,500000 | 0,60231              | 2,50000  |
| <b>n (1/min)</b>                                       | 5,000000 | 16,94687             | 30,00000 |

Kritične vrijednosti odzivne funkcije su izračunate korištenjem prve i druge parcijalne derivacije odzivne funkcije po  $x$  ( $F$ ) i  $y$  ( $n$ ), a iznose  $F = 0,602 \text{ L/h}$  i  $n = 16,95 \text{ min}^{-1}$  (Tablica 2). Pri ovim vrijednostima su određene minimalne vrijednosti volumetrijske potrošnje dušika. Povećanjem brzine protoka hranjive podloge se povećava i volumetrijska potrošnja dušika, dok je utjecaj brzine rotacije bioreaktora promjenjiv, što se vidi iz trenda rasta vrijednosti volumetrijske potrošnje dušika i lijevo i desno od kritične točke (Slika 1) (vrijednost volumetrijske potrošnje dušika raste i pri povećanju i smanjenju brzine rotacije bioreaktora). Isključivo na temelju krivulje odzivne površine, moguće je zaključiti da povećanjem brzine rotacije bioreaktora

dolazi i do povećanja volumetrijske potrošnje dušika, ali eksperimentalno je utvrđeno da pri velikim brzinama rotacije bioreaktora dolazi do smanjenja volumetrijske potrošnje dušika uslijed odvajanja biofilma i ispiranja biomase iz bioreaktora.



Slika 2. Pareto dijagram utjecaja procesnih parametara (brzina protoka hranjive podloge i brzina rotacije bioreaktora) na volumetrijsku potrošnju dušika

Pareto dijagrami (Slika 2) su grafički prikazi statističkog značaja parametara. Takav dijagram je pokazatelj statističke značajnosti utjecaja pojedinih parametara, tj. pokazatelj koliko pojedini parametar zasebno utječe na odziv sustava. Iz grafa je jasno vidljivo kako daleko najveći utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika ima brzina protoka hranjive podloge, tako da je to najvažniji parametar o kojemu treba voditi računa. Isto tako, može se uočiti da je utjecaj brzine rotacije bioreaktora na volumetrijsku potrošnju dušika negativan, što se iskazuje smanjenom stabilnošću mikrobnog biofilma pri velikim brzinama rotacije bioreaktora, uslijed čega može doći i do odvajanja mikrobnog biofilma od stijenke bioreaktora.

Tablica 3: Vrijednosti volumetrijskih potrošnja dušika, dobivene eksperimentalno, te teoretski izračunom iz odzivne funkcije (sve vrijednosti su u  $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

|           | <b>N<sub>SND</sub> (exp.)</b> | <b>N<sub>SND</sub> (teor.)</b> | <b>ΔN<sub>SND</sub></b> |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <b>1</b>  | 10,30000                      | 16,25611                       | -5,9561                 |
| <b>2</b>  | 11,00000                      | 10,42876                       | 0,5712                  |
| <b>3</b>  | 12,50000                      | 7,79164                        | 4,7084                  |
| <b>4</b>  | 11,90000                      | 8,34474                        | 3,5553                  |
| <b>5</b>  | 12,10000                      | 19,02160                       | -6,9216                 |
| <b>6</b>  | 15,60000                      | 19,91338                       | -4,3134                 |
| <b>7</b>  | 14,70000                      | 13,10780                       | 1,5922                  |
| <b>8</b>  | 15,20000                      | 9,49243                        | 5,7076                  |
| <b>9</b>  | 11,60000                      | 9,06729                        | 2,5327                  |
| <b>10</b> | 12,60000                      | 17,78766                       | -5,1877                 |
| <b>11</b> | 26,90000                      | 28,03923                       | -1,1392                 |
| <b>12</b> | 24,80000                      | 20,25541                       | 4,5446                  |
| <b>13</b> | 24,60000                      | 15,66180                       | 8,9382                  |
| <b>14</b> | 22,10000                      | 14,25841                       | 7,8416                  |



|    |          |          |          |
|----|----------|----------|----------|
| 15 | 24,10000 | 21,02230 | 3,0777   |
| 16 | 34,10000 | 40,63366 | -6,5337  |
| 17 | 19,50000 | 31,87158 | -12,3716 |
| 18 | 20,80000 | 26,29973 | -5,4997  |
| 19 | 20,30000 | 23,91810 | -3,6181  |
| 20 | 25,40000 | 28,72550 | -3,3255  |
| 21 | 77,40000 | 57,69665 | 19,7034  |
| 22 | 51,80000 | 47,95633 | 3,8437   |
| 23 | 23,60000 | 41,40624 | -17,8062 |
| 24 | 32,90000 | 38,04636 | -5,1464  |
| 25 | 52,10000 | 40,89728 | 11,2027  |

Temelj statističke analize korištenjem metode odzivnih površina je provedena analiza varijance (ANOVA). Na temelju podataka iz tablica 1 i 3 (Tablica 3), moguće je analizom varijance utvrditi statističku značajnost pojedinih parametara, te na taj način odrediti utjecaj parametara procesa na odziv.

Tablica 4: Rezultati analize varijance

| R <sup>2</sup> =0,74769 |          |    |          |          |
|-------------------------|----------|----|----------|----------|
|                         | SS       | df | F        | p        |
| (1)F (L/h)(L)           | 3483,985 | 1  | 44,11422 | 0,000002 |
| F (L/h)(Q)              | 349,442  | 1  | 4,42464  | 0,048975 |
| (2)n (1/min)(L)         | 452,213  | 1  | 5,72593  | 0,027204 |
| n (1/min)(Q)            | 466,928  | 1  | 5,91224  | 0,025101 |
| 1L by 2L                | 141,630  | 1  | 1,79332  | 0,196324 |

Na temelju provedene analize varijance može se vidjeti da jedino dvostruki član jednadžbe funkcije odziva nema statistički značajan utjecaj na odziv, budući da ima  $p > \alpha$ . Analiza varijance također potvrđuje pretpostavku koju nameće pareto dijagram, a to je da najveći utjecaj na odziv sustava, odnosno najveći utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika, ima brzina protoka hranjivog medija (Tablica 4). To se može zaključiti na račun iznimno niske p-vrijednosti za brzinu protoka, koja označava vjerojatnost veću od 99.9% da brzina protoka hranjivog medija ima utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika koji je statistički značajan, te na temelju F-vrijednosti, koja je signifikantno velika, a označava da su srednje vrijednosti populacija različite, što je pokazatelj da brzina protoka hranjive podloge ima utjecaj na populaciju. Također, iz rezultata analize varijance se jasno vidi da brzina rotacije bioreaktora ima statistički značajan utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika, za zadanu razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$ . Analiza varijance je potvrdila da brzina protoka hranjive podloge ima statistički najznačajniji, te i najveći utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika. Koeficijent determinacije iznosi 0,74769 što ukazuje da je model barem donekle reprezentativan, odnosno da relativno dobro opisuje dinamiku bioprocesa simultane nitrifikacije i denitrifikacije.

## 5. Zaključak

Uz pomoć metode odzivnih površina, statistički je obrađen relativno velik broj zasebnih mjerenja tokom eksperimenta. Linearnom regresijom je aproksimirana odzivna funkcija sustava, a na temelju relativno visokog koeficijenta determinacije ( $R^2 = 0,74769$ ) može se zaključiti da je reprezentativna. Određene su kritične vrijednosti odzivne funkcije, odnosno vrijednosti u kojima odzivna funkcija poprima globalni minimum, a iznose 0,6 L/h za brzinu protoka hranjivog medija te 16,9 min<sup>-1</sup> za brzinu rotacije bioreaktora. Analizom varijance je utvrđeno da statistički najznačajniji utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika ima brzina protoka hranjive podloge. Brzina rotacije bioreaktora također ima utjecaj na volumetrijsku potrošnju dušika, ali je iz krivulje odzivne površine vidljivo da bi se trebalo provesti novo ispitivanje s različitim vrijednostima brzine rotacije

kako bi se odredila optimalna vrijednost tog procesnog parametra. To se može zaključiti na temelju činjenice da je zabilježen porast volumetrijske potrošnje dušika i kod povećanja i kod smanjenja brzine rotacije bioreaktora. Međudjelovanje između brzine protoka i brzine rotacije nije bilo statistički značajno, što ukazuje da između ova 2 parametra ne dolazi do međudjelovanja koje bi utjecalo na volumetrijsku potrošnju dušika. Iako prema krivulji odzivne površine volumetrijska potrošnja dušika raste s porastom brzine protoka hranjive podloge, pri prevelikim vrijednostima brzine protoka, ali i brzine rotacije, može doći do odvajanja mikrobnog biofilma od stijenki bioreaktora, što rezultira ispiranjem biomase iz sustava.

## 6. Popis literature

- Geraats S. G. M., Hooijmans C. M., van Niel E. W. J., Robertson L. A., Heijnen J. J., Luyben K. C. A. M., Kuenen J. G. (1990):** The use of metabolically structured model in the study of growth, nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha*. *Biotechnol. Bioeng.*; **36**; 921-930.
- Huilinir C., Romero R., Munoz C., Bornhardt C., Roeckel M., Antileo C. (2010):** Dynamic modelling of partial nitrification in a rotating disk biofilm reactor: Calibration, validation and simulation; *J Biochem Eng* ; **52**; 7-18
- Huilinir C., Aspe E., Roeckel M. (2011):** Modeling of the denitrification/anaerobic digestion process of salmon fishery wastewater in a biofilm tubular reactor; *J. Env. Man.*; **92**; 1591-1608.
- Kargi F., Eker S. (2001):** Comparison of performance of rotating perforated tubes and rotating biodiscs biofilm reactors for wastewater treatment; *Process Biotechnol.*; **30**; 1201-1206.
- Kumar C.G., Anand S.K. (1998):** Significance of microbial biofilms in food industry: a review; *Int. J. Food Microbiol.*; **42**; 9-27.
- Matsumoto S., Terada A., Tsuneda S. (2007):** Modeling of membrane-aerated biofilm: Effects of C/N ratio, biofilm thickness and surface loading of oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification; *J Biochem Eng*; **37**; 98-107.
- Montgomery D. C. (1997):** Design and analysis of experiments; John Wiley & Sons., New York; **23**; 56-61.
- Moser A. (1991):** Tubular bioreactors: Case study of bioreactor performance for industrial production and scientific research; *Biotechnol. Bioeng.* **37**; 1054-1065.
- Moya J., Huilinir C., Peredo K., Aspe E., Roeckel M. (2012):** Modeling of simultaneous denitrification – Anaerobic digestion – Organic matter aerobic oxidation and nitrification in an anoxic-anaerobic-aerobic compact filter reactor; *J Biotechnol*; **3-4**; 176-188.
- Nipkow A., Sonnleitner B., Fiechter A., (1986):** Performance of a filter loop reactor using *Zymomonas mobilis* and validation of ethanol production model II; *J. Biotechnol.*; **4**; 49-61.
- Rezić T., Šantek B., Novak S., Marić V. (2006):** Heterotrophic cultivation of *Paracoccus denitrificans* in a horizontal rotating tubular bioreactor; *World J Microbiol Biotechnol*; **23**; 987-996.
- Slavica A., Šantek B., Novak S., Marić V. (2004):** Microbial acetate oxidation in a horizontal rotating tubular bioreactor. *J Biosci.*; **29**; 169-177.
- Ukrainczyk M. (2010):** Design of experiments in industry; *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*; **5**; 96-105.
- Wolfbauer O., Klettner H., Moser F., (1978):** Reaction engineering models of biological waste water treatment and kinetics of activated sludge process; *Chem. Eng. Sci.*; **33**; 953-960.