Učinkovitost denitrifikacije u morskom recirkulacijskom akvakulturnom sustavu

Brailo Šćepanović, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:465103

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

SVEUČILIŠTE U SPLITU, SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
INSTITUT ZA OCEANOGRAFIJU I RIBARSTVO, SPLIT

Poslijediplomski sveučilišni studij Primijenjene znanosti o moru

Marina Brailo

UČINKOVITOST DENITRIFIKACIJE U MORSKOM RECIRKULACIJSKOM AKVAKULTURNOM SUSTAVU

Doktorska disertacija

Split, lipanj 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU, SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
INSTITUT ZA OCEANOGRAFIJU I RIBARSTVO, SPLIT

Poslijediplomski sveučilišni studij Primijenjene znanosti o moru

Marina Brailo

UČINKOVITOST DENITRIFIKACIJE U MORSKOM RECIRKULACIJSKOM AKVAKULTURNOM SUSTAVU

Doktorska disertacija

Split, lipanj 2016.

Ova je disertacija izrađena je u Tehnološkom i poslovno-inovacijskom centru za marikulturu Sveučilišta u Dubrovniku, Laboratoriju za akvakulturu Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu te u Institute of Marine and Environmental Technology u Baltimoreu pod vodstvom izvanrednog profesora dr. sc. Jurice Jug-Dujakovića u sklopu Međusveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija „Primijenjene znanosti o moru“ pri Sveučilištu u Splitu i Sveučilištu u Dubrovniku.

Veliko hvala mom mentoru izv. prof. dr. sc. Jurici Jug-Dujakoviću na brojnim savjetima, pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se članovima povjerenstva za ocjenu ovog doktorskog rada red. prof. dr.sc. Ivanu Katavići, izv. prof. dr. sc. Tibeli Landeki Dragičević i dr. sc. Bošku Skaramuci, profesoru emeritusu koji su svojim savjetima pridonjeli njegovu završnom obliku.

Hvala doc. dr. sc. Ani Gavrilović na brojnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem kolegi Božu Konstanjčaru na sladovini i svim zaposlenicima firmi MARIBIC d.o.o. i NONOS DYO d.o.o. jer bez njihove pomoći ovaj rad ne bi bio izvediv.

Hvala dr. sc. Jasni Maršić Lučić na susretljivosti i pomoći pri izolaciji DNK.

Thanks to Harold J. Schreier, PhD and MSc Ryan McDonald for their much appreciated help with analysis of the bacterial DNA, and to Alexis J. Conides, PhD for his help with statistical analysis.

Hvala kolegicama iz Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije na susretljivosti i savjetima i kolegama s Odjela za akvakulturu na konstantnoj podršci.

Hvala lektoru dr. sc. Antunu Česku na ispravcima i korisnim savjetima za pisanje ovog rada.

I na kraju, veliko hvala mojoj obitelji što je bila uz mene na ovom putu.

mojoj Noni

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja 3
1.1.1. Oksidacija amonijaka 3
1.1.2. Redukcija nitrata 4
1.1.3. Biološka filtracija u RAS-ima 6
1.2. Svrha i ciljevi istraživanja 11
2. MATERIJAL I METODE 13
2.1. Karakteristike recirkulacijskog akvakulturnog sustava 13
2.2. Određivanje kvalitete vode 14
2.3. Istraživanje učinkovitosti biološke filtracije 15
2.3.1. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije u stacionarnim uvjetima 16
2.3.2. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije pri različitim protocima 18
2.3.3. Istraživanje učinkovitosti nitrifikacije u stacionarnim uvjetima 18
2.4. Analiza podataka o kvaliteti vode 20
2.4.1. Učinkovitost u protočnim uvjetima 20
2.4.2. Učinkovitost u stacionarnim uvjetima 21
2.4.3. Statistička obrada dobivenih podataka o kvaliteti vode 22
2.5. Filogenetička analiza mikrobnih zajednica u RAS-u 22
2.5.1. Izolacija i pročišćavanje DNK 22
2.5.2. Sekvenciranje sljedeće generacije 23
2.5.3. Analiza sekvenci 24
3. REZULTATI 25
3.1. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije u stacionarnim uvjetima 25
3.1.1. Indukcija denitrifikacijskih bioreaktora 25
3.1.2. Cjelodnevno istraživanje denitrifikacije u stacionarnim uvjetima 38
3.2. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije pri različitim protocima 49
3.3. Istraživanje učinkovitosti nitrifikacije u stacionarnim uvjetima 61
3.4. Rezultati filogenetičke analize mikrobnih zajednica u RAS-u 71
4. RASPRAVA 87

4.1. Učinkovitost denitrifikacije u morskom RAS-u 87
4.2. Učinkovitost nitrifikacije u stacionarnim uvjetima u morskom RAS-u 95
4.3. Analiza mikrobnih zajednica u morskom RAS-u 98
5. ZAKLJUČCI 106
6. LITERATURA 108
7. PRILOZI VIII
7.1. Mikroorganizmi pronađeni u RAS-u VIII
7.2. Faze oporavka denitrifikacijskih bakterija XVII
8. ŽIVOTOPIS VIII

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu, Sveučilišni Odjel za studije mora
Sveučilište u Dubrovniku **Doktorski rad**
Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split
Poslijediplomski sveučilišni studij: Primijenjene znanosti o moru

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Interdisciplinarne prirodne znanosti

UČINKOVITOST DENITRIFIKACIJE U MORSKOM RECIRKULACIJSKOM AKVAKULTURNOM SUSTAVU

Marina Brailo

Rad je izrađen u Tehnološkom i poslovno-inovacijskom centru za marikulturu Sveučilišta u Dubrovniku

Sažetak

U ovoj disertaciji istraživana je učinkovitost denitrifikacije u morskom recirkulacijskom akvakulturnom sustavu. Denitrifikacija je proučavana u dva bioreaktora ispunjena pergolarom (cijevnom polietilenskom mrežom) kao nosačem denitrifikacijskih bakterija, kao izvor ugljika korištena je sladovina, a praćene su promjene relevantnih pokazatelja kvalitete vode; saliniteta, temperature, pH i koncentracija otopljenog kisika, nitratnog, nitritnog i amonijakalnog dušika. Pergolar se pokazao dobrom podlogom za naseljavanje bakterija, a sladovina dobrim izvorom ugljika za denitrifikaciju. Faza indukcije denitrifikacijskih biofiltara trajala je 287 dana. Denitrifikacija je bila najučinkovitija u stacionarnim uvjetima kad je brzina uklanjanja nitratnog dušika iznosila 40 mg/Ld, ili izraženo prema površini pergolara 121 mg/m^{2}d, a prema njegovu volumenu 485 mg/Ld. Faza indukcije rotacijskog biološkog kontaktora kao nitrifikacijskog biofiltra trajala je 160 dana, a postignuta je brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika od 40 mg/Ld. Filogenetička analiza mikrobnih populacija u recirkulacijskom akvakulturnom sustavu sekvenciranjem sljedeće generacije pokazala je da je u nitrifikacijskom biofiltru bio znatan broj bakterija što provode oksidaciju amonijaka i nitrita, dok je u denitrifikacijskim bioreaktorima bio velik udio bakterija što provode heterotrofnu i autotrofnu denitrifikaciju, a bilo je i onih što sudjeluju u kruženju sumpora. Razvijena je stabilna nitrifikacijska populacija sposobna ukloniti amonijak koji bi nastao uzgojem ribe u realnim proizvodnim uvjetima, kao i stabilna denitrifikacijska populacija sposobna ukloniti nitrat koji bi nastao nakon nitrifikacije.

(123 stranice, 74 slike, 17 tablica, 174 literaturna navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Sveučilišnoj knjižnici u Dubrovniku

Ključne riječi: denitrifikacija, filogenetička analiza, nitrifikacija, morski recirkulacijski akvakulturni sustav, pergolar, sekvenciranje sljedeće generacije, sladovina

Mentor: Dr.sc. Jurica Jug-Dujaković, izvanredni profesor

Ocjenjivači: 1. Dr.sc. Ivan Katavić, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. Dr.sc. Tibela Landeka Dragičević, izvanredni profesor
3. Dr.sc. Boško Skaramuca, professor emeritus

Rad prihvaćen: 6. lipnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split, University Department of Marine Studies
University of Dubrovnik **Ph.D. thesis**
Institute of Oceanography and Fisheries, Split

Ph. D. in Natural sciences, research field Interdisciplinary Natural Sciences

DENITRIFICATION EFFICIENCY IN A MARINE RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM

Marina Brailo

Thesis performed at Business and Innovation Centre for Mariculture of the University of Dubrovnik

Abstract

This dissertation studies the efficiency of denitrification in marine recirculating aquaculture system. Denitrification was studied in two bioreactors filled with pergolar (polyethylene pipe net) as the carrier for denitrification bacteria, wort was used as a carbon source, and relevant indicators of water quality were monitored; salinity, temperature, pH as well as concentrations of dissolved oxygen, nitrate, nitrite and ammonia. Pergolar proved to be a good carrier for settling of bacteria and wort proved to be a good carbon source for denitrification. Start-up phase of denitrification biofilters lasted 287 days. Denitrification was most effective in stationary conditions when the removal rate of nitrate nitrogen was 40 mg/Ld, or expressed by the surface of pergolar 121 mg/m^{2}d, and by its volume 485 mg/Ld. Start-up phase of rotating biological contactor that served as nitrification biofilter lasted 160 days and ammonia removal rate of 40 mg/Ld was achieved. Phylogenetic analysis of microbial populations in recirculating aquaculture system by next generation sequencing showed that there was a significant number of bacteria that oxidize ammonia and nitrite in the nitrification biofilter, while in denitrification bioreactors there was a large proportion of bacteria that carry out heterotrophic and autotrophic denitrification, as well as those that participate in sulfur cycling. A stable nitrification population able to remove ammonia that would arise form fish farming in real production conditions was developed, as well as the stable denitrification population able to remove nitrate that would result after nitrification.

(123 pages, 74 figures, 17 tables, 174 references, 2 appendices, original in: Croatian)

Thesis deposited in National and University Library in Zagreb, Split University Library and Dubrovnik University Library

Keywords: denitrification, marine aquaculture recirculation system, next generation sequencing, nitrification, pergolar, phylogenetic analysis, wort

Supervisor: Jurica Jug-Dujaković, PhD, Associate Professor

Reviewers: 1. Ivan Katavić, PhD, Professor
2. Tibela Landeka Dragičević, PhD, Associate Professor
3. Boško Skaramuca, PhD, Professor emeritus

Thesis accepted: 6th June 2016

1. UVOD

Akvakulturna proizvodnja u svijetu u novom tisućljeću nastavila je rasti nešto sporije nego 1980-ih i 1990-ih, ali je i dalje vrijedan i važan sektor proizvodnje hrane bogate proteinima (FAO, 2010; FAO, 2012). U zadnjih pedesetak godina akvakultura se razvijala zajedno s tehnološkim inovacijama i prilagođavala ispunjenju promjenjivih potreba društva (FAO, 2012). S globalnim krahom morskog ribarstva i ekološkim problemima povezanima s kaveznim uzgojem i uzgojem u zemljanim bazenima, potreba za razvitkom u potpunosti zatvorene i ekološki održive proizvodnje morske hrane sve je izraženija. Kako bi se smanjio pritisak na divlje stokove i zadovoljila rastuća globalna potrošnja morske hrane, te će se vrste morati proizvoditi u kontroliranim akvakulturnim sustavima. Moguće rješenje problema je modernizacija postojećih sustava ili razvoj novih uzgojnih tehnologija koje nisu vezane za uže obalno područje (Zohar i sur. 2005).

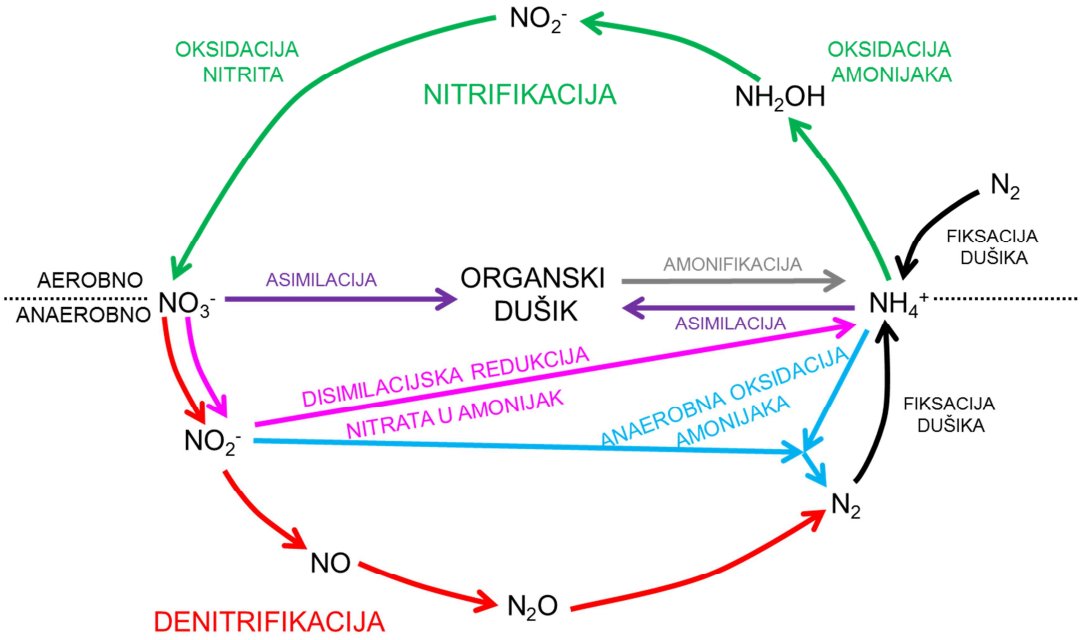
Recirkulacijski akvakulturni sustav (RAS) u kojem voda recirkulira od uzgojne sastavnice do jedinice za obradu vode, može ponuditi rješenje za neke od spomenutih problema jer omogućuju proizvodnju ribe u relativnoj izolaciji od okoline (van Rijn 2013). Među brojne prednosti RAS-a ubrajamo mogućnost uzgoja različitih vrsta, smanjenu potrebu za zemljištem i vodom, visok stupanj kontrole procesa i uniformnost proizvodnje neovisno o situaciji na tržištu nasadnog materijala. Uz to, visoki stupanj kontrole proizvodnog procesa omogućava optimizaciju ekoloških i zootehničkih uvjeta, što uz smanjene rizike drugih uzročnika smrtnosti povezanih s infektivnim bolestima, predatorima, topljivim ili netopljivim otpadom rezultira optimalnim rastom i visokim prinosima (Michaud, 2007). Međutim, to ima i svoje nedostatke jer je proizvodnja ribe u ovakvim sustavima suočena s brojnim izazovima među kojima su najkritičnije kontrola kvalitete vode i gospodarenje otpadom (van Rijn, 2013). Kvaliteta vode narušava se nakupljanjem nusprodukata metabolizma uzgajanih organizama i bakterija koje se nalaze u sustavu. Nusprodukti poput suspendiranih i otopljenih organskih tvari, te dušikovih i fosforovih spojeva, mogu negativno djelovati na uzgajane organizme, a u okolišu mogu i sami biti toksični ili smanjivati količine otopljenog kisika, te uzrokovati eutrofikaciju (Mc Caig i sur., 1999; Cripps & Bergheim, 2000; Kloep i sur., 2000; Thoman i sur., 2001; Li i sur., 2003; Piedrahita, 2003). Odgovarajuća kvaliteta vode u sustavu održava se uz pomoć nekoliko

osnovnih komponenti koje omogućuju pročišćavanje uzgojne vode i njezinu ponovnu uporabu. To su jedinica za mehaničku filtraciju, to jest otklanjanje netopljivog otpada poput fekalija i nepojedene hrane, jedinica za biološku filtraciju, tj. uklanjanje otopljenih nusprodukata metabolizma, jedinica za sterilizaciju ili inaktivaciju patogenih mikroorganizama te jedinica za oksigenaciju, tj. za održavanje optimalne količine otopljenog kisika (Timmons & Losordo, 1994; Timmons i sur., 2001). Dok se mehanički i kemijski procesi (oksigenacija, ozonizacija, UV sterilizacija, regulacija pH i temperature) mogu kontrolirati, biološka se filtracija oslanja na interakciju mikrobnih populacija između njih samih i njihova okoliša, kao posljedica unosa hrane i produkcije topljivog i netopljivog otpada, i kao takva ne može se lako kontrolirati (Schreier i sur., 2010).

Biološki procesi za odstranjivanje otopljenih nusprodukata metabolizma uglavnom se odnose na uklanjanje amonijaka, koji je izrazito toksičan za uzgajane organizme. Amonijak u ribljem organizmu nastaje kao jedan od krajnjih produkata metabolizma proteina, a u sustav se izlučuje škrgama. U vodi se pojavljuje u neioniziranom (NH_3) i ioniziranom obliku (NH_4^+); njihova pojedinačna koncentracija ovisi o pH, temperaturi i slanosti (Anthonisen i sur., 1976), a zbroj ta dva oblika zovemo ukupan amonijakalni dušik (UAN). Uklanjanje amonijaka iz vode kritični je proces u recirkulacijskom sustavu (Avnimelech i sur., 1995; Avnimelech, 1999; Kim i sur., 2000), a najučinkovitiji je način njegova biološka konverzija u nitrat, to jest nitrifikacija (Gilmore i sur., 1999). Taj proces odvija se u dva stupnja i provodi uz pomoć skupine autotrofnih aerobnih mikroorganizama koje nazivamo nitrifikacijskim bakterijama. Prvi korak je oksidacija amonijaka u nitrit, a drugi oksidacija nitrita u nitrat, pa taj proces dovodi do akumulacije iona nitrata koji u većim koncentracijama mogu biti toksični (Timmons i sur., 2001). U zatvorenim recirkulacijskim sustavima nitratni dušik (NO_3-N) se procesom denitrifikacije prevodi u plinoviti dušik (N_2) uz pomoć denitrifikacijskih bakterija. I jednoj i drugoj skupini bakterija potrebno je osigurati odgovarajuće stabilne uvjete i nosač velike specifične površine koju će naseliti (Cohen, 2001). Denitrifikacijske bakterije upotrebljavaju nitrat kao oksidans, pa se denitrifikacija odvija u anaerobnim ili anoksičnim uvjetima. Kao donor elektrona u ovom procesu koristi se nekim lakorazgradljivim sastojkom bogatim ugljikom (C), što se osigurava dodavanjem: octene kiseline, etanola, metanola, acetona, glukoze, glicerola, melase ili šećernih sirupa, ili različitom izvedbom nitrifikacijskih i denitrifikacijskih bioreaktora (Michaud, 2007). U uporabi su i biorazgradljivi polimeri kao donori elektrona u procesu denitrifikacije koji ujedno služe i kao nosači za naseljavanje bakterija.

1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja

Dušik u prirodi kruži uz pomoć nekoliko procesa: algalna asimilacija, bakterijska razgradnja alga, amonifikacija, nitrifikacija i denitrifikacija (Schramm, 2003), prikazanih na slici 1.2.1. Ovi se procesi odvijaju i u akvakulturnim sustavima poput zemljanih bazena (Shilo & Rimon, 1982; Hargreaves, 1998) dok se iz recirkulacijskih sustava amonijakalni dušik uklanja nitrifikacijom, a nitratni dušik denitrifikacijom ili izmjenom vode (Hamlin i sur., 2008).



Slika 1.2.1. Ciklus dušika (prema Schrammu, 2003.).

1.1.1. Oksidacija amonijaka

Proces oksidacije amonijaka, ili nitrifikacije, zajednički provode dvije skupine bakterija koje zovemo nitrificirajućim bakterijama. U prvom stupnju nitritne ili amonij-oksidirajuće bakterije oksidiraju amonijak u nitrit (NO_2^-) u procesu nazvanom nitricija, a u drugom stupnju, nitraciji, nitrit-oksidirajuće ili nitratne bakterije oksidiraju nitrit u finalni proizvod nitrifikacije, nitrat (NO_3^-) (Suzuki i sur., 1974; Hagopian & Riley, 1998), kako je prikazano u tablici 1.2.1.1.

Najznačajnije amonij-oksidirajuće bakterije (AOB) su bakterije rodova *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* i *Nitrosospira*, dok u najznačajnije nitrit-oksidirajuće bakterije (NOB) ubrajamo bakterije rodova *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* (Watson, 1971; Watson i sur., 1986; Meincke i sur., 1989; Hagopian & Riley, 1998; Mc Caig i sur., 1999; Tal i sur., 2003; Schreier i sur., 2010). Ti su mikroorganizmi gram-negativni kemoautotrofi, odnosno litotrofi, što znači da se mogu koristiti anorganskim kemijskim supstratom (NH_3, H_2, Fe^{2+}) kao izvorom elektrona za ugradnju anorganskog ugljika (CO_2, HCO_3^-) u biomasu. Zatim, to su aerobni organizmi kojima obično plinoviti kisik (O_2) služi kao terminalni akceptor elektrona (Hagopian & Riley, 1998).

Tablica 1.2.1.1. Faze nitrifikacije i bakterije koje ih provode (prema Hagopian & Riley, 1998).

Faze nitrifikacije		**bakterije**
nitricija	$NH_3 + 1{,}5\ O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + H^+$	amonij-oksidirajuće (nitritne) bakterije
nitracija	$NO_2^- + 0{,}5\ O_2 \rightarrow NO_3^-$	nitrit-oksidirajuće (nitratne) bakterije

Upravo zbog reakcija ugradnje anorganskog ugljika koje zahtijevaju puno energije, nitrificirajuće bakterije jako sporo rastu (Hagopian & Riley, 1998); vrijeme potrebno za udvostručavanje njihova broja je sedam do osam sati u idealnim uvjetima (Watson, 1971), dok su *in situ* zabilježene vrijednosti od više od 26 sati za AOB i 60 sati za NOB (Shilo & Rimon, 1982; Belser, 1984). Optimalan rast i aktivnost nitrificirajućih bakterija zabilježeni su pri vrijednosti pH od 7,8 (Painter, 1970; Jones & Paskins, 1982; Kumar & Nicholas, 1983) i temperaturi od 25 °C (Hagopian & Riley, 1998). Osim toga, u literaturi se mogu naći podaci i o inhibiciji nitrificirajućih bakterija svjetlom (Johnstone & Jones, 1988) te, u određenim uvjetima, neioniziranim amonijakom (Anthonisen i sur., 1976.; Kim i sur. 2008), nitritom i nitratom (Butt & Lees, 1960).

1.1.2. Redukcija nitrata

Redukcija nitrata u prirodi odvija se uz pomoć različitih mikroorganizama koji provode nekoliko kemijskih procesa. Većina tih organizama ima heterotrofni oblik metabolizma, zbog čega im je potreban organski izvor ugljika za rast (van Rijn & Barak, 1998). Ovisno o svojim

potrebama, mikroorganizam može provoditi procese u kojima se oslobođena energija utroši na obavljanje osnovnih životnih funkcija, to jest disimilacijske procese, ili one u kojima oslobođena energija služi za sintezu složenijih spojeva i izgradnju vlastitog organizma, odnosno za asimilacijske procese. Uz osnovne energetske potrebe mikroorganizma, odvijanje ovih procesa ovisi i o uvjetima u kojima on raste, to jest o količini amonijaka, kisika i/ili organskog izvora ugljika u njegovoj okolini (Zumft, 1997). Procesi redukcije nitrata asimilacijskim i disimilacijskim postupcima prikazani su u tablici 1.2.2.1.

Tablica 1.2.2.1. Disimilacijska i asimilacijska grana redukcije nitrata u prokariotskom ciklusu dušika (prema Zumft, 1997).

<table>
<tr><th colspan="2">Disimilacijska grana</th><th>Asimilacijska grana</th></tr>
<tr><td>Denitrifikacija</td><td>Amonifikacija</td><td>Asimilacija</td></tr>
<tr><td colspan="2">Respiracijska redukcija nitrata
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$</td><td>Asimilacijska redukcija nitrata
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Denitrifikacija u užem smislu respiracija nitrita i dušikovog(II) oksida
$NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$
respiracija dušikovog(I) oksida
$N_2O \rightarrow N_2$</td><td>Amonifikacijska redukcija nitrita
$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$</td><td>Asimilacijska redukcija nitrita
$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$</td></tr>
<tr><td colspan="2">Denitrifikacija u širem smislu povezana s obje grane
$NO_3^-/NO_2^- \rightarrow N_2O$</td></tr>
</table>

Asimilacijska redukcija nitrata je proces gdje se nitrat reducira u amonijak, koji se zatim ugrađuje u biomasu, a događa se u nedostatku reduciranih anorganskih spojeva dušika (van Rijn & Barak, 1998). I sinteza i djelovanje sustava asimilacijske redukcije nitrata su potisnuti ili potpuno suzbijeni prisutnošću amonijaka ili reduciranih organskih metabolita dušika u okolišu ili uzgojnom mediju. Međutim, normalni atmosferski pritisak kisika ili ne utječe ozbiljno na asimilacijske enzime ili je manje toksičan za asimilacijski nego disimilacijski sustav (Payne, 1973).

Disimilacijska redukcija nitrata je proces u kojem se oslobođena energija koristi za aktivnost mikroorganizma, a primarno se događa u odsutnosti kisika. Ovaj proces provode dvije specifične skupine bakterija od kojih jedna skupina reducira nitrat u amonijak, a druga u plinoviti dušik. Osnovni čimbenik koji određuje koji od ova dva procesa će se dogoditi je omjer količine

raspoloživog organskog ugljika prema količini nitrata u okolini; pri visokim omjerima dogodit će se redukcija u amonijak, a pri niskim u plinoviti dušik (van Rijn & Barak, 1998.).

Disimilacijska redukcija nitrata u amonijak je proces što se odvija u dva koraka; prvi je respiracijska redukcija nitrata u nitrit, a drugi amonifikacijska redukcija nitrita. Mikroorganizmi koji provode disimilacijsku redukciju nitrata uglavnom su aerobne bakterije (Payne, 1973).

Denitrifikacija je disimilacijski proces redukcije nitrata u dušik koji bakterijama omogućava respiracijski oblik anaerobnog života, pri čemu oksidi dušika (umjesto kisika) služe kao akceptori elektrona (Zumft, 1997). Denitrifikacija se također odvija u nekoliko koraka; prvi je respiracijska redukcija nitrata u nitrit, nakon čega slijedi redukcija nitrita i dušikova(II) oksida te respiracija dušikova(I) oksida (Knowles, 1982). Unatoč prihvaćenoj činjenici da je disimilacijska redukcija nitrata anaerobna alternativa respiraciji povezanoj s kisikom, godinama nije bilo suglasja o fiziološkom lokusu osjetljivosti na kisik ni o stupnju osjetljivosti na lokusu; nekim bakterijama je potreba anoksija kako bi započele denitrifikaciju, dok su druge tolerantnije na male količine kisika (Payne, 1973). Prema podacima dostupnim u literaturi (Hernandez & Rowe, 1988) može se zaključiti da se inhibicija respiracije nitrata kisikom događa na tri razine: 1) – potiskivanje sinteze enzima koji kataliziraju redukciju oksida dušika (Chang & Morris, 1962; Justin & Kelly, 1978; Betlach & Tiedje, 1981), 2) – ometanje enzima već prisutnih u stanicama bakterija (Chang & Morris, 1962; Betlach & Tiedje, 1981) i 3) – skretanje toka elektrona s jednog (nitratni) na drugi (kisikov) respiratorni sustav (Simoni & Shallenberger, 1972.; John, 1977; Hernandez & Rowe, 1987).

1.1.3. Biološka filtracija u RAS-ima

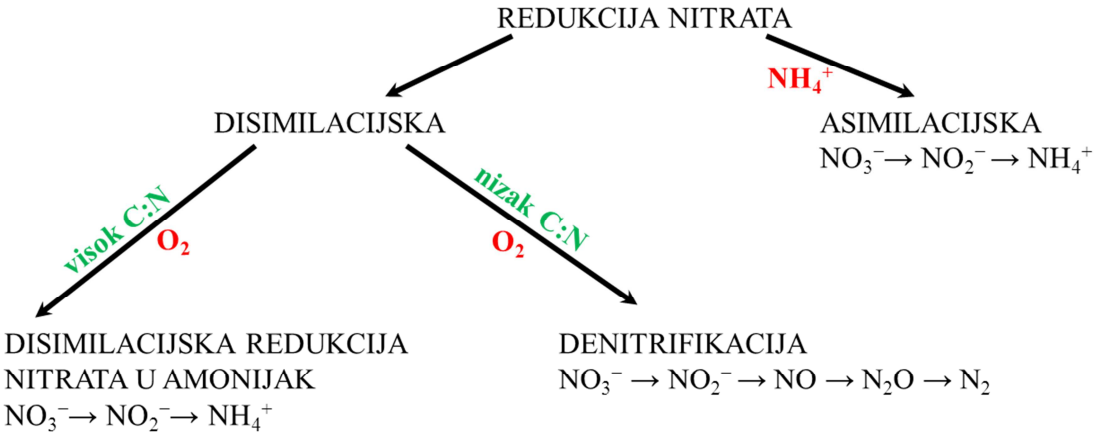
Aerobna nitrifikacija amonijaka i nitrita u recirkulacijskim se akvakulturnim sustavima odvija najvećim dijelom na biofiltrima u kojima bakterijska biomasa raste pričvršćena za podlogu u obliku filma, to jest na biofilmskim biofiltrima. Pregled literaturnih podataka o tim vrlo različitim biofiltrima dali su Malone & Pfeiffer (2006.), a prema dostupnosti kisika podijelili su ih na uronjene i potopljene. Kod uronjenih biofiltara je podloga za rast bakterija izložena i zraku i vodi, to jest bakterijama je dostupan kisik iz zraka, kao i onaj otopljen u vodi. Kod tih biofiltara održavanja optimalne količine biofilma osigurano je naseljavanjem novih bakterija na podlogu nakon što bakterije u najdonjem sloju biofilma odumru zbog nedostatka hrane i kisika. U te filtre ubrajamo različite prokapavajuće filtre i rotirajuće biološke kontaktore, brzina

nitrifikacije koja se može postići kod prokapavajućih biofiltara s PVC podlogom iznosi od 0,1 do 0,9 g/m^{2}dan (Timmons i sur., 2001), dok je izmjerena brzina nitrifikacije rotacijskog biološkog kontaktora od 312 g/m^{3}dan ili 1,21 g/m^{2}dan (Van Gorder i Jug-Dujaković, 2005). Uz to, prednosti rotacijskog biološkog kontaktora su što se pri radu ovih filtara ploče s naseljenim bakterijama okreću uranjajući i izranjajući iz vode, pri čemu se O_2 iz zraka u njoj otapa. Ujedno se i CO_2 oslobađa iz vode, pa oni djeluju kao izmjenjivači plinova, a ne zahtijevaju dodatnu aeraciju. Osim toga, kod ovih biofiltara održavanje optimalne količine biofilma osigurano je kompetencijom među bakterijama. Biofilm raste sve dok bakterije u njegovu najdonjem sloju ne odumru zbog nedostatka kisika i hrane, nakon čega se on oljušti, a na podlogu se nasele nove bakterije (Šarić i sur., 2010). Zatim, modeli koji se okreću uz pomoć protoka vode i/ili zraka imaju male energetske zahtjeve što ih čini znatno neovisnijima o električnoj energiji.

Većina dostupne literature o učinkovitosti nitrifikacije bazirana je na podacima dobivenima za vrijeme uzgoja neke određene vrste, dok se vrlo malo istraživanja bavi fazom indukcije nitrifikacijskih bakterija, to jest pripremom filtara za uzgoj. Ta je priprema u proizvodnji ribe gubitak vremena, a budući da je taj gubitak neizbježan, potrebno je znati koliko će proces pripreme trajati, to jest kad će biti moguće naseliti ribu u sustav i početi s uzgojem. I drugi su autori (Summerfelt, 1998) prepoznali ovaj problem; faza indukcije mora se uzeti u obzir pri projektiranju i radu recirkulacijskoga akvakulturnog sustava. Formiranje i održavanje pouzdane populacije nitrificirajućih bakterija koja je sposobna ukloniti planirano opterećenje amonijakom kritična je za uspjeh. Oni koji se bave uzgojem ribe u RAS-ima moraju aklimatizirati nitrifikacijske bakterije na jedinstvene uvjete i razviti populaciju koja će biti dostatna da se ukloni amonijak koji nastaje kad se riba uvede u sustav. Iako se indukcija nitrifikacijskih reaktora proučava od 80ih godina prošlog stoljeća, do danas nema pouzdanih uputa za primjenu za sve uzgojne sustave; najčešće se počinje postupnim dodavanjem uzgojnih organizma i/ili amonijaka i nitrita. Problemi s aklimatizacijom bakterija u biofiltrima u morskim sustavima opravdavaju razvoj novih postupaka indukcije, što će zahtijevati dodatna istraživanja, posebno u području identifikacije bakterijskih populacija i njihove dinamike (Gutierrez-Wing & Malone, 2006).

Dok je aerobna nitrifikacija amonijaka i nitrita postala opći standard u RAS-u, akumulacija dobivenog nitrata još uvijek nije dobila potrebnu pozornost (Singer i sur., 2008). Univerzalno prihvaćen i dostupan koncept oblikovanja i funkcioniranja denitrifikacijske jedinice na komercijalnoj razini nije razvijen, niti primijenjen u akvakulturi (Grguric i sur., 2000;

Menasveta i sur., 2001; Klas i sur., 2006; van Rijn i sur., 2006). Većina tehnoloških rješenja za uklanjanje nitrata su istraživačkog tipa i još nisu primijenjena u komercijalnim akvakulturnim sustavima zbog visoke cijene sofisticirane opreme, visokih troškova rada i potrebe za složenim upravljačkim sposobnostima (Pungrasmi i sur., 2013). Proces denitrifikacije u RAS-ima podrazumijeva biološku redukciju nitrata u plinoviti dušik, pa je potrebno osigurati odgovarajuće uvjete koji će omogućiti rast i razvoj denitrifikacijskih bakterija. Pri tome je potrebno uzeti u obzir nekoliko čimbenika: količina kisika mora biti minimalna, reducirani anorganski spojevi dušika trebaju biti prisutni, a odnos količine ugljika prema dušiku treba biti dostatno nizak kako bi isključio rast organizama koji reduciraju nitrat u amonijak, kao što je prikazano slikom 1.2.3.1. (Tiedje, 1990).



Slika 1.2.3.1. Procesi disimilacijske i asimilacijske redukcije nitrata i uvjeti u kojima se odvijaju. Crvenom bojom označeni su čimbenici što potiskuju određeni proces, a zelenom oni što ga potiču (prema Tiedje, 1990).

Dva glavna problema karakteriziraju denitrifikacijske reaktore: prvo, zbog fluktuacija u količini i kvaliteti vode teško je kontrolirati točne količine topljivih ugljikovih spojeva koji se dodaju kako bi održavali rast bakterija i drugo, visoke koncentracije kisika u ulaznoj vodi (blizu zasićenja zbog intenzivne aeracije u uzgojnim bazenima) inhibiraju denitrifikaciju i izazivaju prekomjernu potrošnju organskog ugljika aerobnim reakcijama (Singer i sur., 2008). Uz to, limitiranje procesa denitrifikacije ugljikom dovodi do nepotpune denitrifikacije i istodobne akumulacije nitrita, a suprotno tome, suvišak organskih donora elektrona može rezultirati proizvodnjom sumporvodika, koji također može biti toksična prijetnja uzgajanim organizmima

(Cytryn i sur., 2005a). Dakle, reguliranje količine ugljika je najvažnije za ispravno uklanjanje nitrata iz vodenih sustava biološkom denitrifikacijom bez štetnih učinaka (Hamlin i sur., 2008). Anaerobni uvjeti u denitrifikacijskim reaktorima su osigurani ili propuhivanjem reaktora plinovitim dušikom ili osiguravanjem dovoljno dugog vremena zadržavanja koje će jamčiti potpunu biološku potrošnja kisika (van Rijn & Barak, 1998).

Iz naznačenog proizlazi kako je za odvijanje denitrifikacije u RAS-ima potrebno osigurati prostor bez kisika te s odgovarajućim omjerom količina ugljika i dušika. Zato se u ovakvim sustavima denitrifikacijski bioreaktor obično ugrađuje u sustav nakon nitrifikacijske jedinice, što osigurava potrošnju kisika i proizvodnju nitratnog dušika uz pomoć aerobnih bakterija, dok se odgovarajuća količina ugljika osigurava dodavanjem nekog organskog spoja. Na odabir vrste i količine organskog spoja treba obratiti posebnu pažnju; Phillips i Love (1998) preporučuju limitirati količinu ugljika kako bi se spriječila redukcija sulfata u vodikov sulfid, ali i pri tome treba biti oprezan jer je limitacija ugljikom najvjerojatniji uzrok niske brzine denitrifikacije (Arbiv i van Rijn, 1995). Kao izvori ugljika upotrebljavaju se jednostavni organski spojevi poput metanola (Lee i sur., 2000), glukoze (Honda i sur. 1993, Park i sur. 2001) i melase (Gomez i sur., 2000; Pungrasmi i sur. 2013). Hamlin i sur. (2008) su koristili metanol, octenu kiselin, melasu te granulirani kukuruzni škrob, dok su sa škrobom kukuruza, pšenice i riže istraživali i Morrison i sur. (2008). Neki su autori upotrebljavali izvor ugljika podrijetlom iz samog sustava (van Rijn & Rivera, 1990; Arbiv & van Rijn, 1995; Phillips & Love, 1998; Shnel i sur., 2002; Gelfand i sur., 2003; Tal i sur., 2009; Suhr i sur. 2013), dok drugi ističu upotrebu biorazgradljivih polimera (Mergaert i sur., 1993, 1995, 1996; Boley i sur., 2000, 2001, 2005; Ebeling i sur., 2010).

Široka lepeza dosad primijenjenih organskih spojeva i potreba za daljnjim smanjenjem dodane količine ugljika (Lee i sur., 2000, Hamlin i sur., 2008) daje prostora za dodatna istraživanja u ovom području. Zato je u ovoj disertaciji kao izvor ugljika odabrana sladovina, sirovina za proizvodnju piva, s kojom dosad nisu zabilježena slična istraživanja. Najzastupljeniji kemijski spojevi u sladovini su ugljikohidrati koje kvasci mogu fermentirati: glukoza, fruktoza, maltoza i maltotrioza. Uz naznačene, sladovina sadržava još razgradljivih spojeva, poput dekstrina, koje kvasci ne mogu fermentirati (Hodžić i sur., 2008), ali kako je riječ o jednostavnim ugljikohidratima, pretpostavlja se da ih denitrifikacijske bakterije mogu iskorititi.

Iako su istraživanja primjene denitrifikacije u recirkulacijskim sustavima započela još prije dvadesetak godina, do danas nema dostatno informacija o provedbi procesa uklanjanja

nitrata iz uzgojne sredine. Često se ove studije provode u laboratorijski simuliranim uvjetima u malim eksperimentalnim objektima. Takvi sustavi mogu tek djelomično simulirati uvjete komercijalnih recirkulacijskih akvakulturnih sustava pa su potrebne informacije o denitrifikaciji u cjelokupnom sustavu. Upravo nedostatak sveobuhvatnih istraživanja ograničava primjenu denitrifikacije u recirkulacijskim sustavima (van Rijn i sur., 2006). Nadalje, Suhr i sur. (2013) smatraju da će omjer raspoloživog ugljika prema dušiku i vrijeme zadržavanja vode biti važni parametri za buduće dimenzioniranje i rad pojedinih denitrifikacijskih reaktora.

Schreier i sur. (2010) dali su pregled literaturnih podataka o mikrobnoj raznolikosti bioloških filtara u recirkulacijskim akvakulturnim sustavima i uočili kako su nedavne studije uz pomoć molekularnih alata ne samo omogućile uvid u sastav i srukturu različitosti mikrobnih zajednica, nego također pružile uvid u njihove aktivnosti, što bi trebalo pomoći razumijevanju interakcija u mikrobiološkim zajednicama. U istraživanjima su pronađene skupine bakterija koje sudjeluju u procesima kruženja ugljika, dušika i sumpora; one koje provode oksidaciju amonijaka i one koje provode oksidacija nitrita (Tal i sur. 2003), zatim one koje sudjeluju u autortofnoj (Cytryn i sur. 2005b) i heterotrofnoj denitrifikaciji (Cytryn i sur., 2003., Michaud 2007), one koje provode disimilacijsku redukciju nitrata u amonijak i one koje amonijak oksidiraju anaerobno (Tal i sur. 2003), a tu su i bakterije koje reduciraju sulfat (Cytryn i sur., 2003) i one koje oksidiraju sulfid (Cytryn i sur. 2005b). Uzimajući u obzir te različite odjeljke unutar mikrobnih zajednica, Schreier i sur. (2010) ističu kako će uspjeh daljnjeg razvoja tehnologije RAS-a biti uvjetovan, ne samo nastavkom prepoznavanja bitnih mikroorganizama povezanih sa specifičnim procesima nego i u razumijevanju njihova doprinosa svojoj zajednici u postizanju učinkovite i stabilne aktivnosti. U tom smislu, buduće studije koje uključuju primjenu molekularnih analiza sljedova gena za 16S podjedinicu ribosoma pružit će širu sliku zastupljenosti zajednica u različitim odjeljcima biofiltara, te dati podatke o prostornim i vremenskim odnosima unutar, i između tih odjeljaka. To će biti potrebno za određivanje prisutnosti (ili odsutnosti) nositelja određenih procesa ili za procjenu razvoja zajednica biofiltra u fazi indukcije. Uz to, genetska analiza zajednica može dovesti do razvoja molekularnih metoda za procjenu uvjeta u biofiltru i predviđanja kolapsa sustava (Schreier i sur. 2010).

1.2. Svrha i ciljevi istraživanja

Svrha ovog istraživanja je odrediti učinkovitost biološke filtracije u morskom recirkulacijskom akvakulturnom sustavu s naglaskom na denitrifikaciju u stacionarnim i protočnim uvjetima. Osnova za to je razvitak stabilnih populacija nitrifikacijskih i denitrifikacijskih bakterija sposobnih da uklanjaju UAN, odnosno NO_3-N do neškodljivih razina. S obzirom na funkcionalne performanse upotrijebljenog RAS-a, rezultati ovog istraživanja bit će primjenjivi u komercijalnoj proizvodnji ribe u morskim recirkulacijskim sustavima.

U ovom radu će se istražiti parametri koji utječu na učinkovitost nitrifikacije i denitrifikacije, zatim mogućnost primjene dosad neistraženog izvora ugljika za provedbu denitrifikacije, kao i mogućnost primjene dosad neistraženog nosača za naseljavanje bakterija. Uz to, istražit će se učinkovitost vlastitog dizajna jedinice za denitrifikaciju, proučit će se učinkovitost denitrifikacije u stacionarnim i protočnim uvjetima, i dobit će se podaci o funkcionalnom integriranju denitrifikacijske tehnologije u recirkulacijski akvakulturni sustav.

Analizirat će se mikrobne zajednice u sustavu kako bi se doznalo koje su bakterijske vrste odgovorne za provođenje biološke filtracije. Kako su bakterijama za provođenje tih procesa potrebni odgovarajući uvjeti, u ovom će se istraživanju objasniti koji to parametri utječu na učinkovitost nitrifikacije i denitrifikacije. S obzirom na naznačeno, u ovom je istraživanju cilj dati pregled mikrobnih zajednica iz nitrifikacijskog i denitrifikacijskog bioreaktora i usporediti ga sa sastavom komercijalne kulture bakterija za pročišćavanje dodane u sustav.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- odrediti podobnost pergolara kao nosača za denitrifikacijske bakterije
- odrediti podobnost sladovine kao izvora ugljika za provedbu denitrifikacije
- odrediti vrijeme indukcije denitrifikacijskog reaktora
- odrediti učinkovitost denitrifikacije u stacionarnim uvjetima
- odrediti učinkovitost denitrifikacije pri različitim protocima
- odrediti vrijeme indukcije rotirajućeg biodiska
- odrediti učinkovitost nitrifikacije u stacionarnim uvjetima
- analizirati mikrobne zajednice u sustavu.

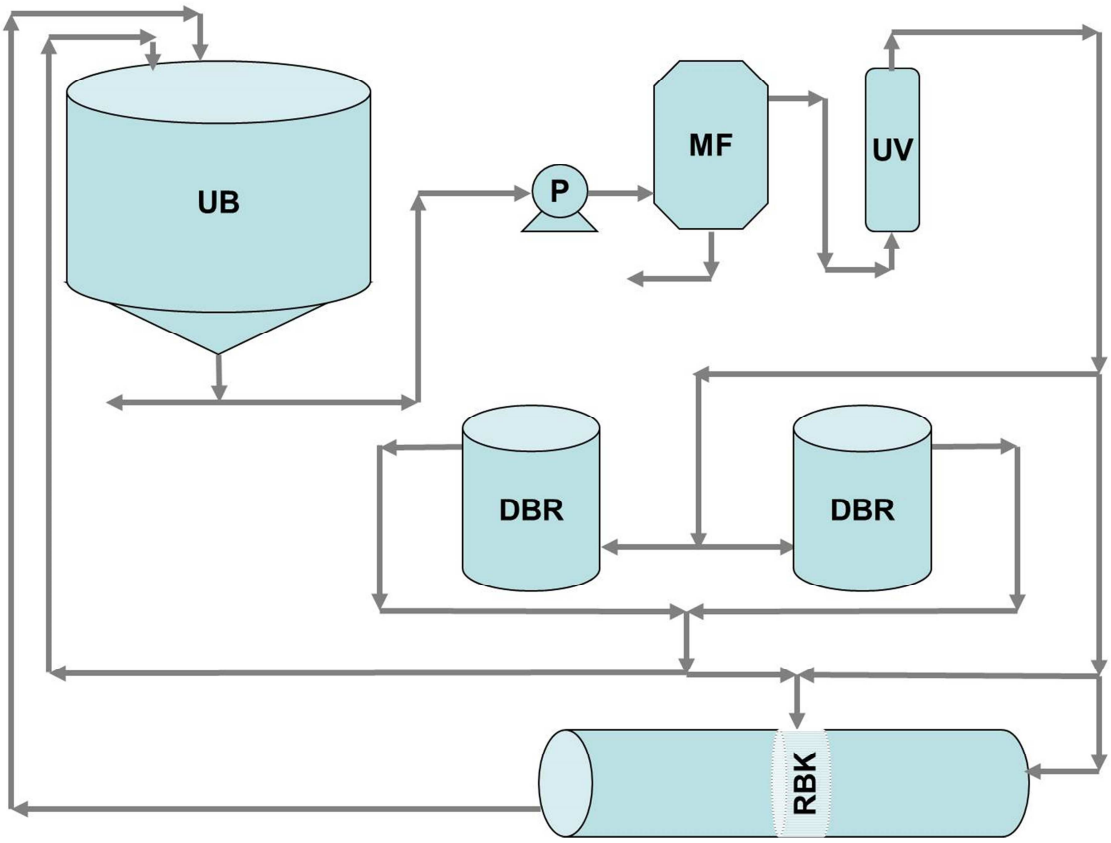
Slijedom navedenoga, rezultati ovih istraživanja će biti temelj funkcionalnom integriranju denitrifikacijske tehnologije u RAS i eventualnih razvojnih pilot-projekata zatvorenoga proizvodnog morskog recirkulacijskog akvakulturnog sustava.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Karakteristike recirkulacijskog akvakulturnog sustava

Ovo istraživanje provedeno je u recirkulacijskom akvakulturnom sustavu (slika 2.1.1.) Tehnološkog i poslovno-inovacijskog centra za marikulturu Sveučilišta u Dubrovniku. Sustav se sastojao od osnovnih komponenti koje održavaju odgovarajuću kvalitetu vode u uzgojnom prostoru, pri stalnoj recirkulaciji s minimalnom izmjenom vode: (1) uzgojnog bazena, (2) mehaničkog filtra, (3) komponente za biofiltraciju, (4) uređaja za sterilizaciju i (5) pumpe koja je omogućavala protok morske vode (Sweetwater SHE 2.4; Aquatic Eco-Systems, Inc. Apopka, FL, SAD).

U sustavu se koristilo okruglim bazenom s konusnim dnom, izrađenim od polietilena visoke gustoće (engl. *high density polyethylene*, HDPE) prema vlastitom dizajnu. Promjer bazena bio je 1,90 m, srednja visina 1,02 m, a nagib konusnog dna 18^{o}. Ukupni volumen bio mu je 2,89 m^3, a tijekom eksperimenta koristilo se volumenom (V_B) od 1 m^3. Netopljivi otpad iz sustava se uklanjao granularnim mehaničkim filtrom (PolyGeyser Bead Filter DF3; Aquaculture Systems Technologies LLC, Jefferson, Louisiana, SAD). Nakon mehaničkog pročišćavanja voda je sterilizirana uz pomoć UV lampe (SMART High-Output UV Sterilizer; Emperor Aquatics, Inc., Pottstown, Pennsylvania, SAD) kako bi, oslobođena svih neželjenih mikroorganizama dotjecala do komponente za biofiltraciju. Ona se sastojala od aerobnog, nitrifikacijskog i anaerobnog, denitrifikacijskog dijela. Za nitrifikaciju je odabran rotirajući biološki kontaktor (RBK) (RBC 1400; Fresh Culture Systems, Breiningsville, Pennsylvania, SAD). Anaerobni dio biološke filtracije odvijao se u dva cilindrična spremnika vlastitog dizajna ispunjena odgovarajućim nosačem za naseljavanje i rast denitrifikacijskih bakterija. Temperatura je u sustavu održavana klimatizacijskim uređajem Toshiba RAS-18SKH (Toshiba Corporation, Japan) smještenim u prostoriji.



Slika 2.1.1. Shematski prikaz recirkulacijskog akvakulturnog sustava: UB – uzgojni bazen, P – pumpa, MF – mehanički filtar, UV – UV sterilizator, DBR – denitrifikacijski bioreaktor, RBK – rotacijski biološki kontaktor

2.2. Određivanje kvalitete vode

Prije početka istraživanja, sustav je napunjen morskom vodom koja se crpila iz bušotine i sterilizirana je 4%-tnom otopinom natrijevog hipoklorita (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u koncentraciji od 0,5 mL/L. Nakon kloriranja uslijedilo je dekloriranje, to jest uklanjanje viška klora uz pomoć natrijeva tiosulfata (Kemika) u koncentraciji od 0,05 g/L.

Tijekom eksperimenta, ovisno o očekivanoj bakterijskoj aktivnosti, provjeravala se kvaliteta morske vode: pratile su se promjene saliniteta (YSI Model 30 Handheld Salinity, Conductivity and Temperature System, YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, SAD), pH vrijednosti (YSI Environmental EcoSense pH10 pH/Temperature Pen, YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, SAD), temperature i količine otopljenog kisika (Oxyguard Handy Polaris, OxyGuard

International A/S Birkeroed, Danska). Količina amonijaka, nitrata i nitrita u uzorcima morske vode određivana je standardnim spektrofotometrijskim metodama. Kako bi se otklonile nečistoće koje bi mogle utjecati na analitički postupak, uzorci su prethodno filtrirani na staklenim MGC filtrima (Munktell, Njemačka) veličine pora od 0,45 mm. Potom je uz pomoć spektrofotometra SECOMAM Uvi Light PC 2 (Nova Analytics company, Ales, Francuska) metodom redukcije hidrazinom (Bower & Holm-Hansen, 1980a) određena koncentracija nitratnog dušika, NO_3-N, diazotacijskom reakcijom koncentracija nitritnog dušika, NO_2-N (Strickland & Parsons, 1968) te salicilat-hipokloritnom metodom (Bower & Holm-Hansen, 1980b) koncentracija ukupna amonijakalnog dušika, UAN. Koncentracija neioniziranog amonijaka (NH_3) zatim je izračunata prema jednadžbi (Johansson & Wedborg, 1980):

$$\% \, NH_3 = 100 / [1 + 10^{(\log K_1 \, - \, pH)}]$$

gdje je:

$$\log K_1 = - 0{,}467 + 0{,}00113 \cdot S + 2887{,}9 \cdot T^{-1}$$

pri čemu je K_1 konstanta disocijacije, S salinitet (g/L) i T temperatura (°K).

2.3. Istraživanje učinkovitosti biološke filtracije

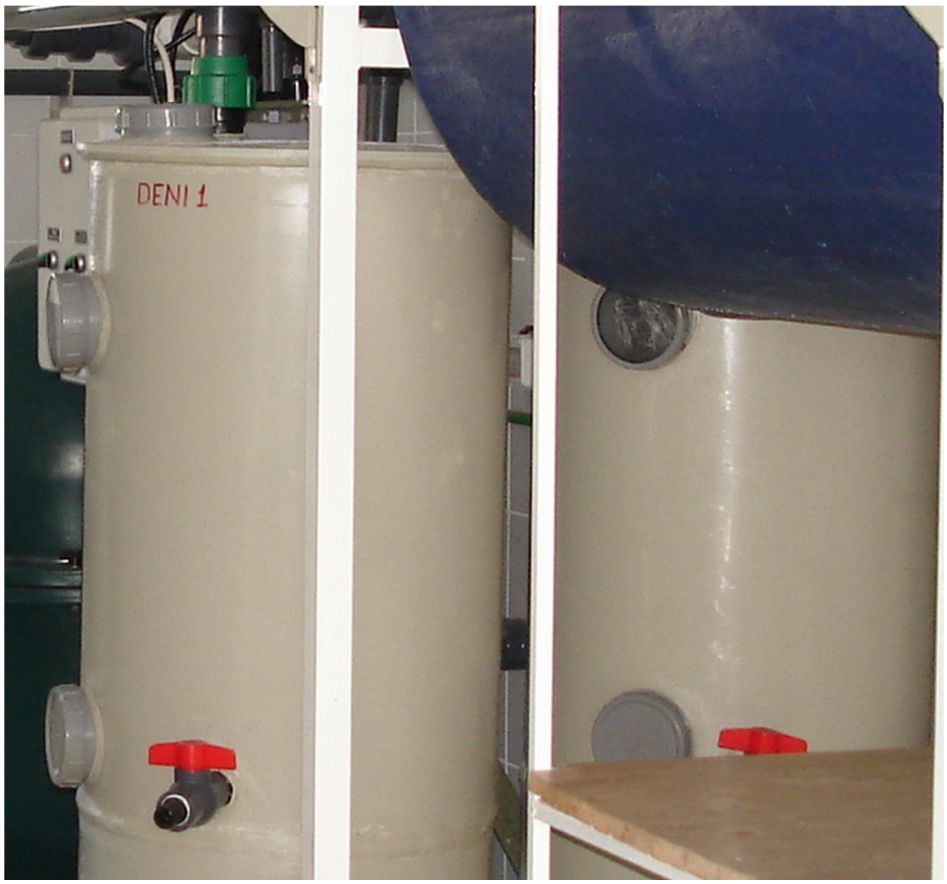
Za istraživanja učinkovitost biološke filtracije u morskom recirkulacijskom akvakulturnom sustavu s naglaskom na denitrifikaciju u stacionarnim i protočnim uvjetima odabran je recirkulacijski akvakulturni sustav u kojem se može uzgajati lubin *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) u nasadnoj gustoći od 40 kg/m^3 s dnevnom stopom hranjenja od 3% od mase ribe. Uzimajući u obzir teoretske vrijednosti produkcije ukupnoga amonijakalnog dušika hranom u iznosu od 0,03 kg(UAN)/kg(hrana) (Wheaton i sur., 1994), u takvom bi uzgojnom modelu dnevno nastalo 0,036 kg/m^3, to jest 36 mg/L UAN koji bi se procesom nitrifikacije oksidirao u 36 mg/L NO_3-N. Kako bi se ostavila mogućnost daljnjeg povećanja uzgojnog kapaciteta RAS-a u ovom istraživanju su odabrane ciljane brzine uklanjanja UAN i NO_3-N od 40 mg/Ld.

2.3.1. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije u stacionarnim uvjetima

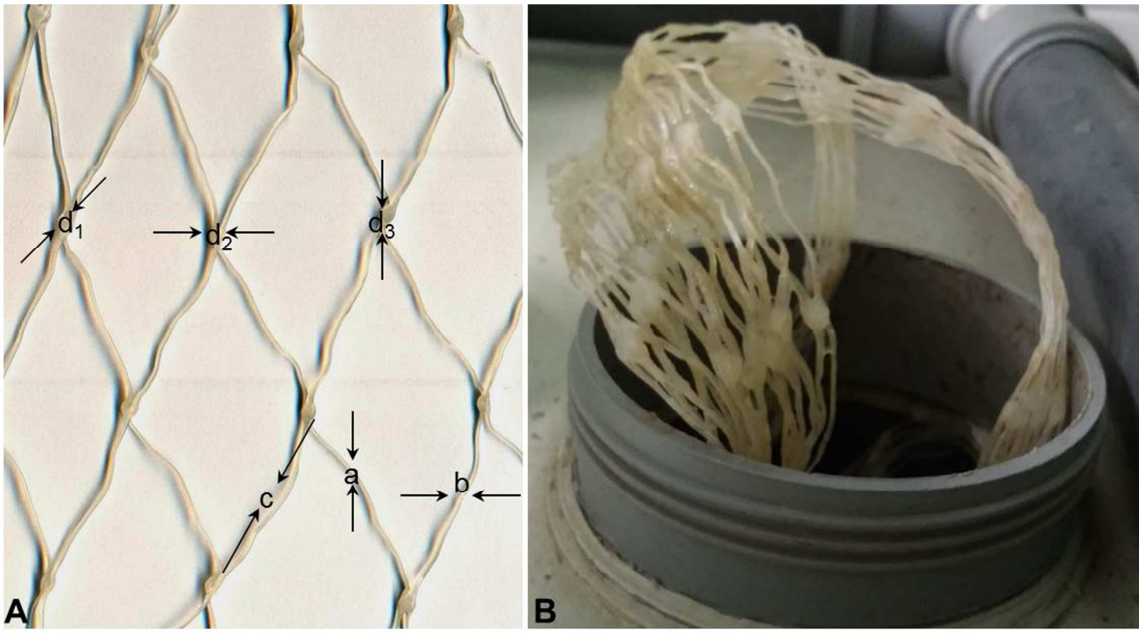
U ovom eksperimentu denitrifikacija se proučavala u dva cilindrična spremnika, denitrifikacijska bioreaktora (slika 2.3.1.), ispunjena nosačima na kojima su u anaerobnim uvjetima rasle denitrifikacijske bakterije. Volumen svakoga denitrifikacijskog reaktora iznosio je 0,12 m^3, ali je u stacionarnim uvjetima, radi lakše manipulacije korišten volumen od 0,1 m^3. Za naseljavanje bakterija upotrijebljena je cijevna polietilenska mreža za uzgoj dagnji – pergolar, prikazan na slici 2.3.2. Nakon mjerenja dimenzija pergolara i izračunavanja njegove površine i volumena u svaki je denitrifikacijski reaktor stavljeno 400 m pergolara kojega je ukupna površina iznosila 33,2 m^2, a volumen 0,0083 m^3.

Na početku istraživanja je uz morsku vodu i nosač, u denitrifikacijske reaktore u ovom sustavu dodana komercijalno dostupna kultura bakterija za biološko pročišćavanje vode u akvakulturi, kalijev nitrat (Kemika) u količini koja je osiguravala koncentraciju od 15 mg/L nitratnog dušika (NO_3-N) i kao izvor ugljika sladovina. Njezina je količina određena uz pomoć vrijednosti kemijske potrošnje kisika (KPK) i to u omjeru KPK/NO_3-N = 2,5/1 (van Rijn & Barak, 1998). Uz to, kako bi se spriječila asimilacijska redukcija nitrata u amonijak (van Rijn & Barak, 1998), dodan je i amonijev klorid (Kemika).

U denitrifikacijskim bioreaktorima pratile su se promjene relevantnih pokazatelja kvalitete vode kako je prethodno opisano. Na temelju izmjerene koncentracije nitratnog dušika koji su potrošile bakterije od prethodnog uzorkovanja, određivala se količina nitrata i odgovarajuća količina sladovine dodavanih u denitrifikacijske reaktore. Ta je koncentracija postupno povećavana sve do vrijednosti od 40 mg/L. Kad se nakon jednog dana količina NO_3-N nije mogla izmjeriti, to jest kad je sav NO_3-N bio potrošen, zaključeno je da se razvila stabilna bakterijska populacija sposobna za provođenje procesa denitrifikacije u morskoj vodi ovako opterećenog sustava i da su denitrifikacijski reaktori inducirani. Tad je provedeno i cjelodnevno praćenje učinkovitosti denitrifikacije, pri čemu su u oba denitrifikacijska reaktora uzorci uzimani svaka tri sata.



Slika 2.3.1. Denitrifikacijski bioreaktori



Slika 2.3.2. Pergolar: A – dimenzije za određivanje površine; a, b, c – duljine stranica kvadra, d_1, d_2, d_3 – osi elipsoida, B – pergolar nakon upotrebe

2.3.2. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije pri različitim protocima

Za potrebe ovog dijela istraživanja u sustavu je uključena pumpa koja je omogućavala protok morske vode iz bazena kroz mehanički filtar, UV reaktor i denitrifikacijske reaktore natrag u bazen. Tako je simulirano kretanje vode u operativnome recirkulacijskom akvakulturnom sustavu. U bazen je dodano 40 mg/L nitratnog dušika i sladovina potrebna za denitrifikaciju, u omjeru KPK/NO_3-N = 2,5/1. Za potrebe određivanja pokazatelja kvalitete morske vode na prije opisan način, svakodnevno su se uzimali uzorci na ulazima i izlazima denitrifikacijskih reaktora. Protok kroz denitrifikacijske reaktore postavljen je tako da je vrijeme zadržavanja morske vode u svakome od njih bilo jedan sat, a učinkovitost se pratila deset dana. Nakon toga je eksperiment ponovljen s vremenom zadržavanja morske vode u denitrifikacijskim reaktorima u trajanju od dva sata, a zatim još jednom s vremenom zadržavanja u trajanju od tri sata.

Kako bi svaki eksperiment započeo s jednako kvalitetnom denitrifikacijskom populacijom, između ponavljanja eksperimenta s različitim vremenima zadržavanja bilo je potrebno osigurati oporavak mikrobne zajednice u reaktorima. To je omogućeno provođenjem eksperimenta u stacionarnim uvjetima onoliko dugo koliko je denitrifikacijskim bakterijama bilo potrebno da opet uklone 40 mg(NO_3-N)/L u jednom danu. Tijekom istraživanja provedene su dvije faze oporavka denitrifikacijskih bakterija, prva između eksperimenata s vremenom zadržavanja morske vode u denitrifikacijskim reaktorima u trajanju od jednoga i dva sata, te druga faza oporavka između eksperimenata s vremenom zadržavanja morske vode u trajanju od dva i tri sata.

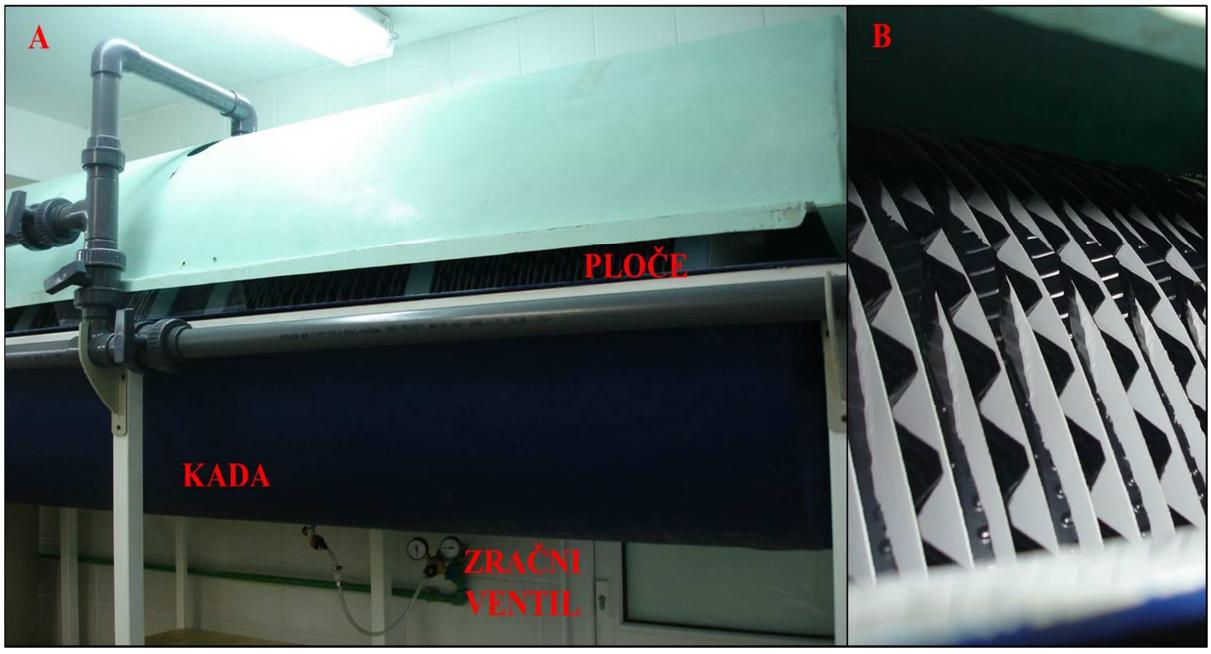
2.3.3. Istraživanje učinkovitosti nitrifikacije u stacionarnim uvjetima

Rotirajući biološki kontaktor (RBK) sastojao se od velikog broja okruglih ploča, diskova, nanizanih na osovinu (slika 2.5.1.). Na sredini osovine među diskovima nalazio se prsten s lopaticama koje služe za okretanje. Ta konstrukcija bila je postavljena u polucilindričnu kadu s vodom tako da je 40 – 50% površine diskova bilo uronjeno. Diskovi čine podlogu za naseljavanje bakterija zbog čega su izrađeni od naborane plastike kako bi se osigurala dodatna funkcionalna površina. Usmjeravanjem struje vode i/ili zraka prema lopaticama na sredini osovine, ona se okreće, i to omogućava ravnomjerno naseljavanje bakterija na cjelokupnu

površinu diskova i njihov kontakt s kisikom i u zraku i u vodi. Volumen kade rotirajućeg biološkog kontaktora je 0,33 m^3, a površina diskova je 145 m^2.

U kadu rotacijskog biološkog kontaktora napunjenog morskom vodom dodana je komercijalna kultura bakterija za biološko pročišćavanje vode u akvakulturi i supstrati za njihov rast; amonijev klorid (Kemika) u količini koja je osiguravala koncentraciju od 14 mg/L ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) i natrijev nitrit (Kemika) u koncentraciji nitritnog dušika od 5 mg/L (Scott, 2002).

Biološki kontaktor se rotirao zračnom strujom, a uzorak se vode uzimao za potrebe određivanja pokazatelja kvalitete vode, na prethodno opisan način. Na temelju izmjerene koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika koji su potrošile bakterije od prethodnog uzorkovanja, određivala se količina amonijeva klorida se dodavala u RBK. Ta je koncentracija postupno povećavana sve do vrijednosti od 40 mg/L. Kad se nakon jednog dana količina UAN nije mogla izmjeriti, to jest kad je sav UAN bio potrošen, zaključeno je da se razvila stabilna bakterijska populacija sposobna za provođenje procesa nitrifikacije u morskoj vodi ovako opterećenog sustava i da je rotirajući biološki kontaktor induciran.



Slika 2.3.3.1. Rotacijski biološki kontaktor (RBK): A – djelovi RBK-a, B – ploče

2.4. Analiza podataka o kvaliteti vode

Određene koncentracije ukupnoga amonijakalnog i nitratnog dušika dovedene su u matematičke odnose s dimenzijama reaktora u kojima se odvijala biološka filtracija i upotrijebljene za dobivanje podataka o učinkovitosti procesa denitrifikacije i nitrifikacije u ovom sustavu. Pritom je učinkovitost denitrifikacije određena pomoću brzina i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N, a učinkovitost nitrifikacije pomoću brzina i učinkovitosti uklanjanja UAN.

2.4.1. Učinkovitost u protočnim uvjetima

U protočnim uvjetima učinkovitost denitrifikacije u dva denitrifikacijska bioreaktora očituje se u promjenama koncentracija nitratnog dušika pri prolasku kroz te reaktore.

Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima u protočnim uvjetima određena je iz omjera izmjerenih količina NO_3-N na izlazima i ulazima reaktora prema formuli:

$$UU(NO_3\text{-}N) = \{[c_u(NO_3\text{-}N) - c_i(NO_3\text{-}N)] / c_u(NO_3\text{-}N)\} \cdot 100\%$$

gdje su:

$UU(NO_3\text{-}N)$ – učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (%), $c(NO_3\text{-}N)$ – koncentracija NO_3-N (mg/L), u – ulaz bioreaktora, i – izlaz bioreaktora.

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima u protočnim uvjetima izračunata je iz kvantitativnog odnosa razlike izmjerenih koncentracija NO_3-N na ulazima i izlazima reaktora, protoka i površine pergolara prema formuli:

$$PU(NO_3\text{-}N) = \{[c_u(NO_3\text{-}N) - c_i(NO_3\text{-}N)] \cdot Q\} / A_P$$

gdje su:

$PU(NO_3\text{-}N)$ – površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (mg/m^2h), $c(NO_3\text{-}N)$ – koncentracija NO_3-N (mg/L), u – ulaz bioreaktora, i – izlaz bioreaktora, Q – protok (L/h), A_P – površina pergolara (m^2).

Volumna brzina uklanjanja nitratnog u denitrifikacijskim bioreaktorima u protočnim uvjetima izračunata je iz kvantitativnog odnosa razlike izmjerenih koncentracija NO_3-N na ulazima i izlazima reaktora, protoka i volumena pergolara prema formuli:

$$VU(NO_3\text{-}N) = \{[c_u(NO_3\text{-}N) - c_i(NO_3\text{-}N)] \cdot Q\} / V_P$$

gdje su:

VU(NO_3-N) – volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (mg/m^3h), *c*(NO_3-N) – koncentracija NO_3-N (mg/L), *u* – ulaz bioreaktora, *i* – izlaz bioreaktora, *Q* – protok (L/h), V_P – volumen pergolara (m^3).

2.4.2. Učinkovitost u stacionarnim uvjetima

U stacionarnim uvjetima učinkovitost denitrifikacije u denitrifikacijskim bioreaktorima očituje se u promjenama koncentracija nitratnog dušika u tim reaktorima ovisno o vremenu proteklome od prethodnog mjerenja.

Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima u stacionarnim uvjetima određena je iz omjera koncentracija NO_3-N izmjerenih u tim reaktorima u određenom vremenu prema formuli:

$$UU(NO_3\text{-N}) = \{[c_n(NO_3\text{-N}) - c_{n+x}(NO_3\text{-N})] / c_n(NO_3\text{-N})\} \cdot 100\%$$

gdje su:

UU(NO_3-N) – učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (%), *c*(NO_3-N) – koncentracija NO_3-N (mg/L), *n* – dan trajanja eksperimenta, *x* – vrijeme proteklo od prethodnog uzorkovanja.

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima u stacionarnim uvjetima izračunata je iz kvantitativnog odnosa razlike izmjerenih koncentracija NO_3-N, volumena reaktora, vremena protekloga od prethodnog mjerenja i površine pergolara prema formuli:

$$PU(NO_3\text{-N}) = \{[c_n(NO_3\text{-N}) - c_{n+x}(NO_3\text{-N})] \cdot (V_R / x)\} / A_P$$

gdje su:

PU(NO_3-N) – površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (mg/m^2d), *c*(NO_3-N) – koncentracija NO_3-N (mg/L), *n* – dan trajanja eksperimenta, x – vrijeme proteklo od prethodnog uzorkovanja (d), V_R – volumen reaktora (L) i A_P – površina pergolara (m^2).

Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima u stacionarnim uvjetima izračunata je iz kvantitativnog odnosa razlike izmjerenih koncentracija NO_3-N, volumena reaktora, vremena protekloga od prethodnog mjerenja i volumena pergolara prema formuli:

$$VU(NO_3\text{-N}) = \{[c_n(NO_3\text{-N}) - c_{n+x}(NO_3\text{-N})] \cdot (V_R / x)\} / V_P$$

gdje su:

$VU(NO_3\text{-}N)$ – volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (mg/m^3d), $c(NO_3\text{-}N)$ – koncentracija NO_3-N (mg/L), n – dan trajanja eksperimenta, x – vrijeme proteklo od prethodnog uzorkovanja (d), V_R – volumen reaktora (L) i V_P – volumen pergolara (m^3).

Matematičke formule kojima je određena učinkovitost denitrifikacije u stacionarnim uvjetima upotrebljavane su i za istraživanje učinkovitosti nitrifikacije, pri čemu je volumen reaktora zamijenjen volumenom kade RBK-a gdje se provodio proces nitrifikacije, a volumen i površina pergolara zamijenjeni su volumenom i površinom ploča RBK-a.

2.4.3. Statistička obrada dobivenih podataka o kvaliteti vode

Podaci dobiveni istraživanjem učinkovitosti denitrifikacije su obrađeni analizom unakrsne korelacije ovisnih i neovisnih varijabli u vremenskim nizovima. Analizirana je ovisnost učinkovitosti i brzine uklanjanja nitratnog dušika o hidrografskim parametrima kvalitete vode, koncentracijama nutrijenata i dodane sladovine (KPK vrijednost). Razlike između reaktora A i B ispitivane su χ^2 testom (Box & Jenkins, 1976). Sve analize provedene su s intervalom pouzdanosti od 5% uz pomoć paketa programa IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp.).

2.5. Filogenetička analiza mikrobnih zajednica u RAS-u

Za potrebe filogenetičke analize mikrobnih zajednica u ovom sustavu bilo je potrebno izolirati DNK iz populacije bakterija koja je dodana u sustav na početku istraživanja te iz stabilnih bakterijskih populacija što su provodile procese denitrifikacije i nitrifikacije. Uzorkovanje je obavljeno mjesec dana nakon postignute indukcije i to s različitih mjesta u denitrifikacijskim bioreaktorima i s različitih mjesta na rotacijskom biološkom kontaktoru gdje se odvijala nitrifikacija. Također su uzeti i uzorci komercijalne kulture bakterija za biološko pročišćavanje vode u akvakulturi.

2.5.1. Izolacija i pročišćavanje DNK

Uzorci su tijekom noći pohranjeni na +4 °C, a ekstrakcija DNK provedena je prema uputama kompleta za izolaciju DNK Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega

Corporation, Madison, Wisconsin, SAD). Uzorak s bakterijama centrifugiran je dvije minute na 16 000 · g, a talog je resuspendiran u 50 mM otopini etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Dodan je lizozim nakon čega je suspenzija inkubirana 30 min na 37 °C te centrifugirana dvije minute na 16 000 · g. Talog je resuspendiran u otopini za lizu jezgre stanice i inkubiran pet minuta na 80 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu suspenziji je dodana ribonukleaza i inkubirna je 30 min na 37 °C pa je nakon inkubacije ohlađena na sobnu temperaturu. Dodana je otopina za taloženje proteina, provedena inkubacija na ledu pet minuta i centrifugiranje tri minute na 16 000 · g. Supernatantu je dodan izopropanol, nakon čega je centrifugiran dvije minute na 16 000 · g. Dobiveni je talog osušen na zraku, dodan mu je 70%-tni etanol pa je centrifugiran dvije minute na 16 000 · g. Nakon sušenja na zraku dobivena je DNK resuspendirana u TE (10 mM Tris-HCl (pH = 8) i 0,1 mM EDTA). Koncentracija (μg/mL) i čistoća dobivene DNK ($A_{260/280}$) očitana je aparatom Biophotometer (Eppendorf, Germany). Izolirana bakterijska DNK pohranjena je na −20 °C do daljnje analize.

Izolirana DNK pročišćena je da bi se uklonili zaostali proteini kompletom Wizard® DNA Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, SAD). Uzorci su zatim pripremljeni za analizu uz pomoć sekvencera sljedeće generacije (engl. *next generation*) MiSeq System (Illumina, Inc. San Diego, California, SAD).

2.5.2. Sekvenciranje sljedeće generacije

MiSeq System je uređaj za automatsko sekvenciranje DNK, koji u posebno dizajniranim protočnim komorama može istovremeno pripremiti, umnožiti i sekvencirati velik broj klasterskih fragmenata DNK. Uzorci, to jest molekule DNK su prethodno označene tako da su im na odgovarajućim mjestima (fragment gena za 16S rRNA) umetnuti takozvani adapteri s mjestima za vezanje početnica i oligonukleotidima za vezanje na protočnu komoru. Tako pripremljeni fragmenti stavljeni su u spremnik s reagensima potrebnim za amplifikaciju i sekvenciranje, a ta je smjesa na početku rada automatski dodana u protočne komore. Pojedinačne su se molekule DNK uz pomoć umetnutih oligonukleotida vezale za komplementarne u svakoj komori, polimeraza ih je umnožila i tako su nastali klasteri fragmenata DNK. Zatim je uslijedilo sekvenciranje s pomoću odgovarajućih početnica i prisutnih dušičnih baza od kojih je svaka specifično fluorescentno obilježena. Osvjetljavanjem svake protočne komore i uz pomoć posebnih filtara označene baze su postale vidljive u trenutku komplementarnog vezivanja na

molekulu DNK, pa se ova tehnologija naziva sekvenciranje sintezom (engl. *sequencing by synthesis*, SBS). Svaka je sekvenca umnožena dva puta (po jednom iz svakog smjera) i definirana je s dva očitanja. Ishod ovakvog sekvenciranja bio je komplet digitalnih slika koje je zatim integrirano računalo automatski korigiralo kompenzirajući optičke efekte i kemijsku neučinkovitost. Kompenzirana očitanja zatim su prolazila kroz seriju filtara za ugađanje kvalitete s pomoću kojih su identificirana i izdvojena očitanja niske kvalitete. Na kraju su očitanja visoke kvalitete podvrgnuta algoritmu programa CLC Main Workbench (CLC bio©Copyright 2012) koji je konvertirao intenzitet signala u individualne odzive baza, dajući odgovarajuće operativne taksonomske jedinice, OTJ (engl. *operational takonomic unit*, OTU), u ovom slučaju skevence fragmenata gena za 16S rRNA. Usporedbom slijeda para baza svake OTJ s bazom podataka sekvenci fragmenata gena za 16S rRNA poznatih organizama (Greengenes 13_8) uz određen je njezin najbliži srodnik u bazi, a zatim su ti podaci grupirani u odgovarajuće taksonomske kategorije uz pomoć programa QIIME (Caporaso i sur., 2010).

2.5.3. Analiza sekvenci

Procjena zastupljenosti i bogatstva vrsta u uzorcima komercijalne kulture, nitrifikacijskih i denitrifikacijskih bakterija obavljena je uz pomoć Chao indeksa izračunatog na sljedeći način:

$$S_p = S_o + (a^2/2b)$$

gdje su:

S_p – procijenjeni broj vrsta, S_o – opaženi broj vrsta, a – broj vrsta u uzorku zastupljen samo jednom jedinkom, b – broj vrsta u uzorku zastupljen s dvije jedinke (Chao, 1984).

Abundacija vrsta u uzorcima određena je pomoću Simpsonova indeksa ujednačenosti (E) prema formuli:

$$E = \frac{1}{\sum(n/N)^2 \cdot S}$$

gdje su:

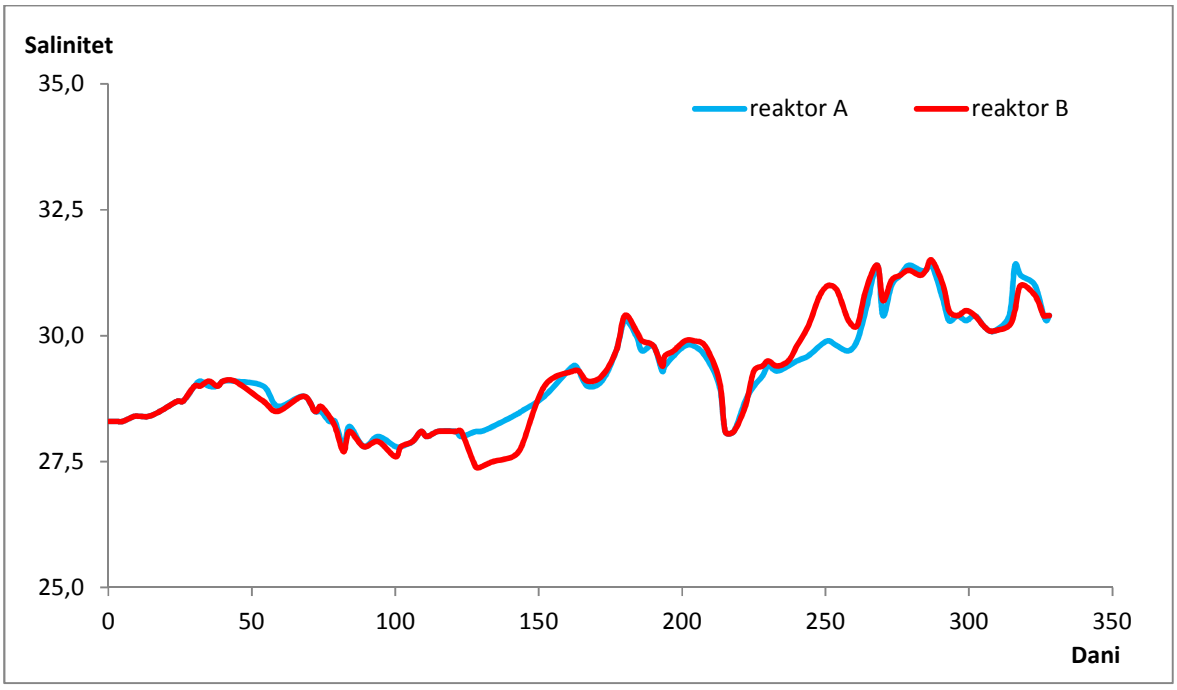
E – Simpsonov indeks ujednačenosti, n – ukupni broj organizama određene vrste, N – ukupni broj organizama svih vrsta i S – broj vrsta (Šolić, 2015).

3. REZULTATI

3.1. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije u stacionarnim uvjetima

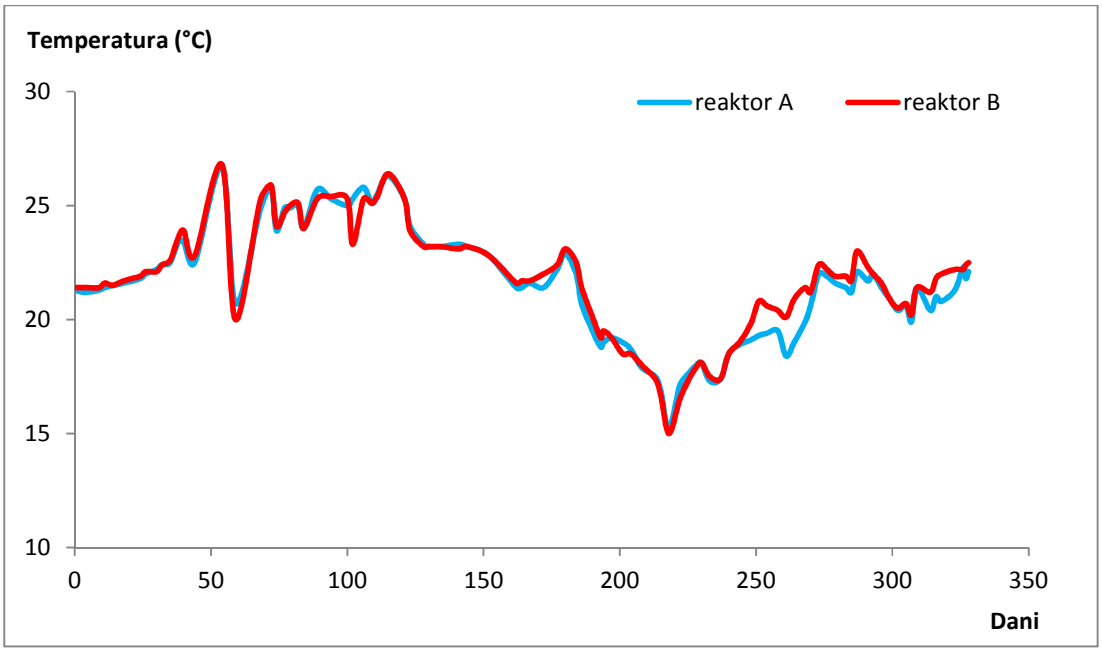
3.1.1. Indukcija denitrifikacijskih bioreaktora

Tijekom stacionarnog dijela istraživanja u denitrifikacijskom bioreaktoru A vrijednosti saliniteta kretale su se od 27,8 do 31,4 a u bioreaktoru B od 27,4 do 31,5 (slika 3.1.1.1.). Srednja vrijednost saliniteta nakon indukcije u bioreaktoru A bila je 30,6 ± 0,4, a u reaktoru B 30,5 ± 0,4. Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između reaktora A i B ($p<0,05$).



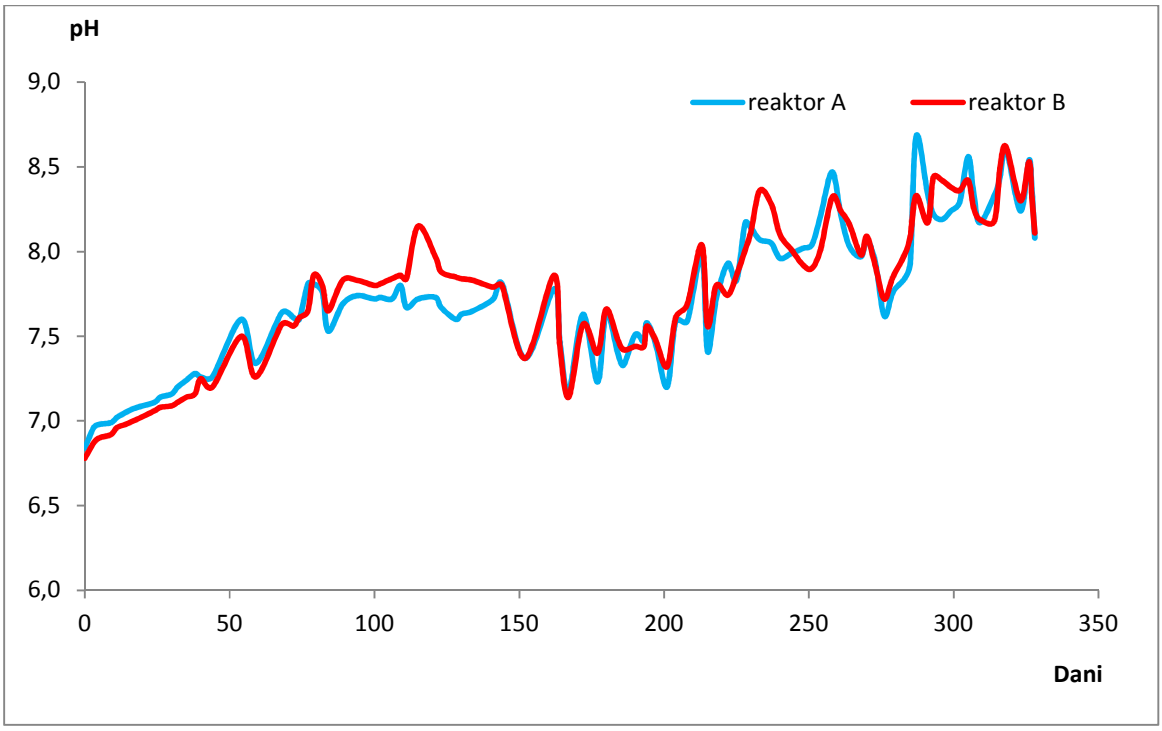
Slika 3.1.1.1. Vrijednosti saliniteta u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Tijekom istraživanja u stacionarnim uvjetima u denitrifikacijskom bioreaktoru A temperatura je varirala od 15,2 do 26,7 °C, a u reaktoru B od 15,0 do 26,8 °C (slika 3.1.1.2.). Srednja vrijednost temperature nakon indukcije iznosila je 21,3 ± 0,7 °C u bioreaktoru A i 21,7 ± 0,8 °C u reaktoru B, a rezultati χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).



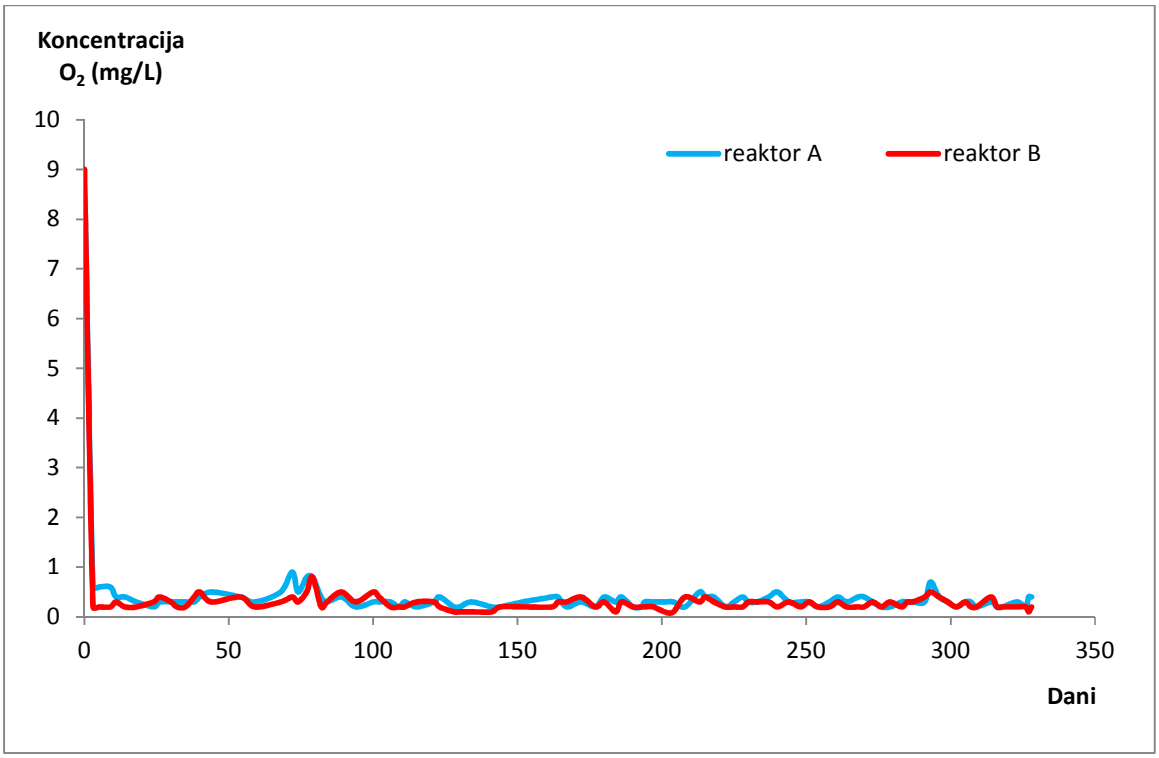
Slika 3.1.1.2. Vrijednosti temperature u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Tijekom istraživanja u stacionarnim uvjetima u denitrifikacijskom bioreaktoru A zabilježene su pH vrijednosti u rasponu od 6,84 do 8,68, a u reaktoru B u rasponu od 6,78 do 8,62 (slika 3.1.1.3.). Srednja pH vrijednost nakon indukcije bila je 8,4 ± 0,2 u bioreaktoru A i 8,3 ± 0,0 u reaktoru B, a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između reaktora ($p<0,05$).



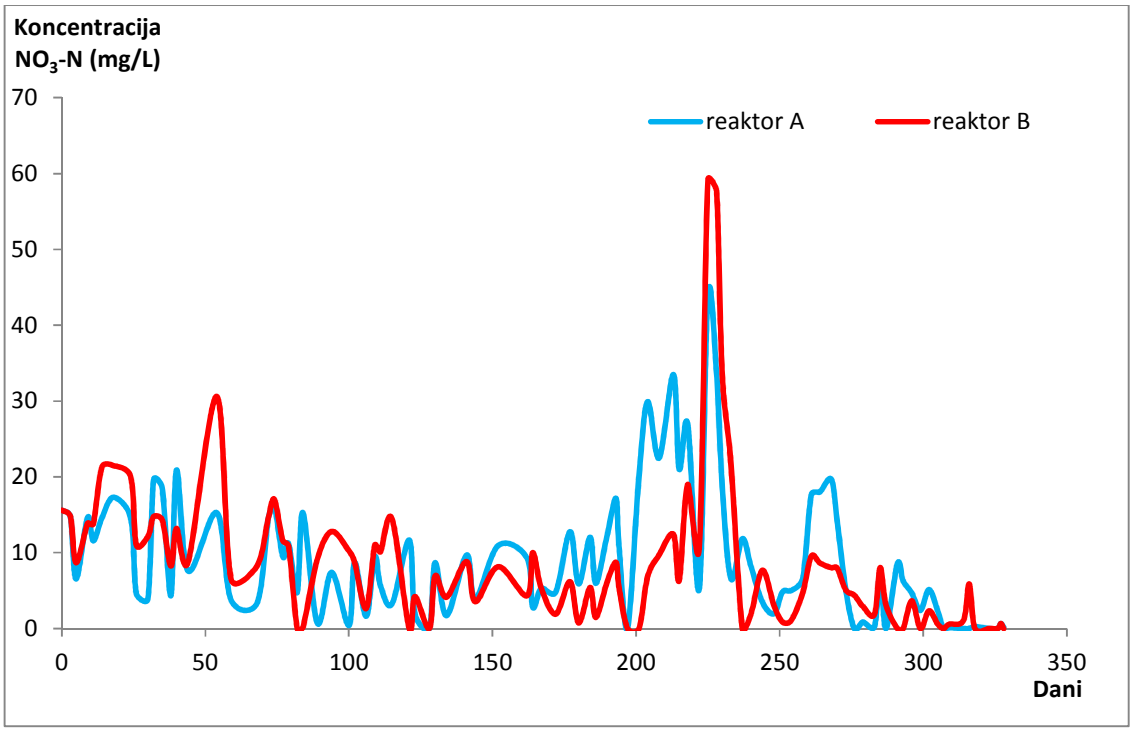
Slika 3.1.1.3. pH vrijednost u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Najveća vrijednost koncentracije kisika od 9,0 mg/L zabilježena je na samom početku istraživanja u oba denitrifikacijska bioreaktora, dok je najniža vrijednost u bioreaktoru A bila 0,2 mg/L, a u bioreaktoru B 0,1 mg/L (slika 3.1.1.4.). Srednja vrijednost koncentracije kisika nakon indukcije iznosila je 0,3 ± 0,1 mg/L u oba bioreaktora, a rezultati χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).



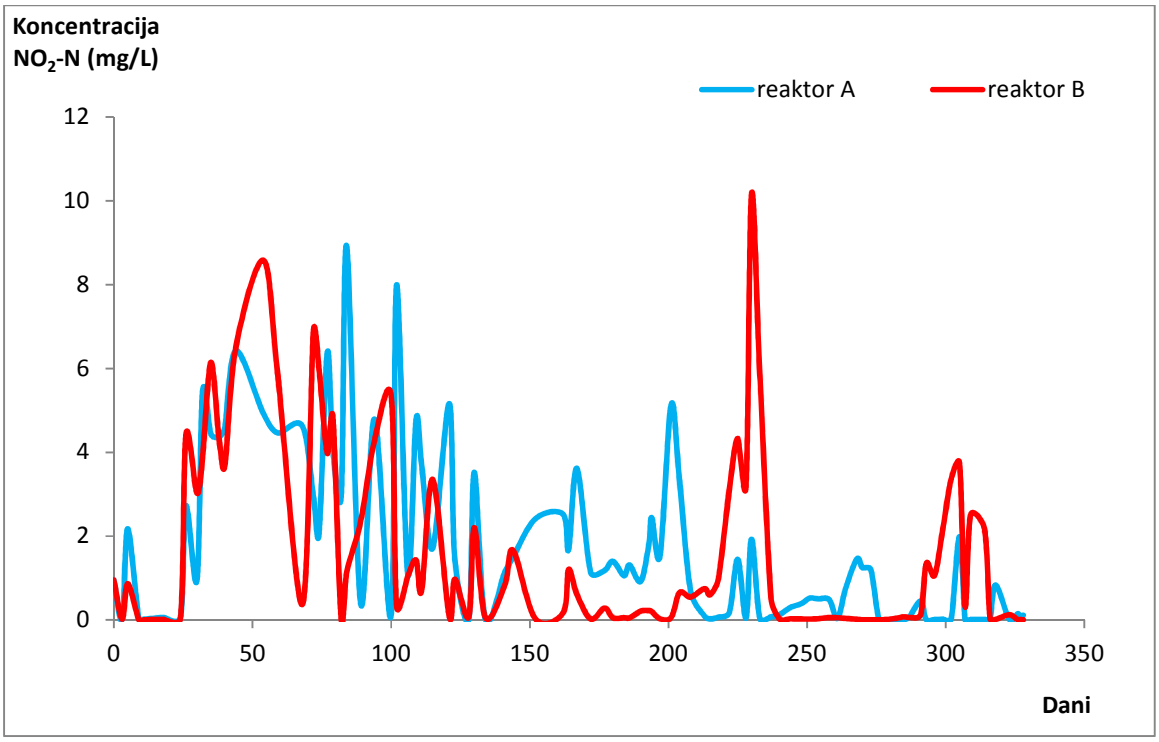
Slika 3.1.1.4. Koncentracija kisika (O_2) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Najveća izmjerena vrijednost koncentracije nitratnog dušika u denitrifikacijskom bioreaktoru A u stacionarnom dijelu istraživanja iznosila je 43,88 mg/L, a u bioreaktoru B 59,19 mg/L, dok je najniža vrijednost od 0 mg/L zabilježena u oba reaktora (slika 3.1.1.5.). Srednja vrijednost koncentracije NO_3-N nakon indukcije iznosila je 1,9 ± 2,7 mg/L u bioreaktoru A i 1,1 ± 1,7 mg/L u bioreaktoru B, a među njima χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p<0,05$).



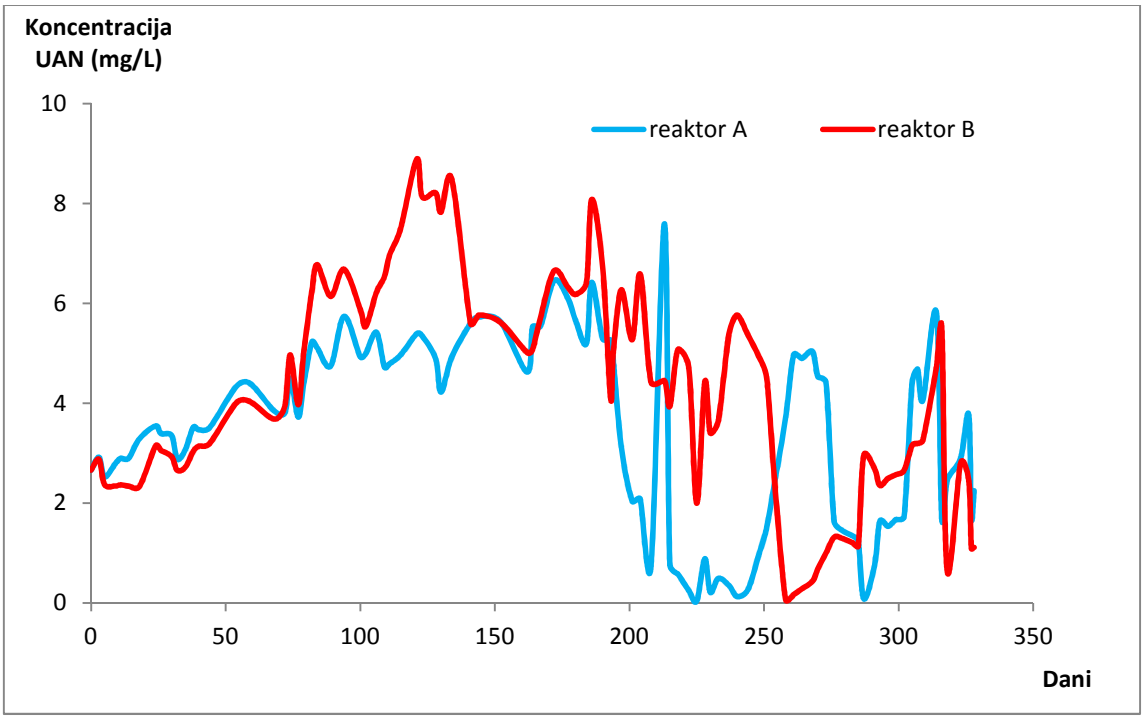
Slika 3.1.1.5. Koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Koncentracija nitritnog dušika u denitrifikacijskom bioreaktoru A u stacionarnom dijelu istraživanja kretala se od 0,001 do 8,916 mg/L, a bioreaktoru B od 0,002 do 10,170 mg/L (slika 3.1.1.6.) Srednja vrijednost koncentracije NO_2-N nakon indukcije bila je 0,2 ± 0,5 mg/L u bioreaktoru A i 1,1 ± 1,3 mg/L u bioreaktoru B, a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između reaktora ($p<0,05$).



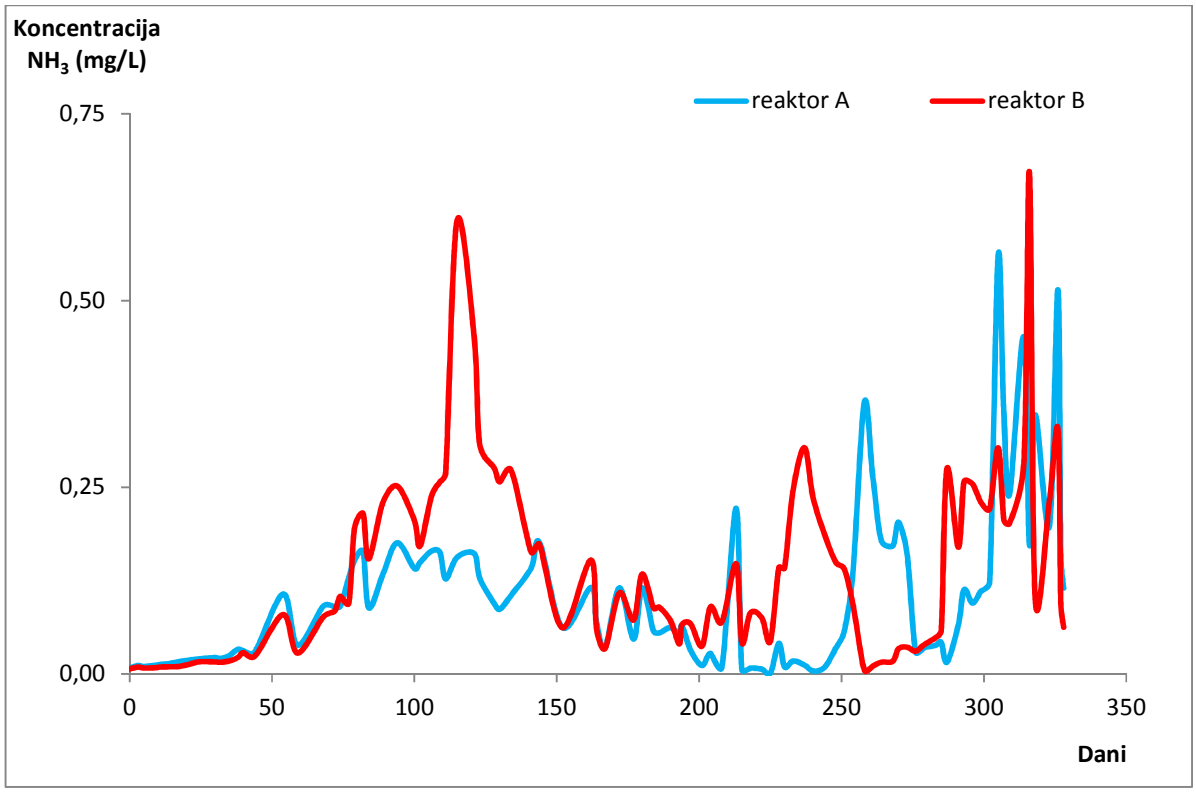
Slika 3.1.1.6. Koncentracije nitritnog dušika (NO_2-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Najmanja izmjerena vrijednost koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika u stacionarnom dijelu istraživanja u bioreaktoru A iznosila je 0,048 mg/L, a u reaktoru B 0,045 mg/L, dok je najveća vrijednost od 7,595 mg/L zabilježena u oba bioreaktora (slika 3.1.1.7.). Srednja vrijednost koncentracije UAN nakon indukcije bila je 2,6 ±1,5 mg/L u reaktoru A i 2,7 ± 1,2 mg/L u reaktoru B, a među njima χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p<0,05$).



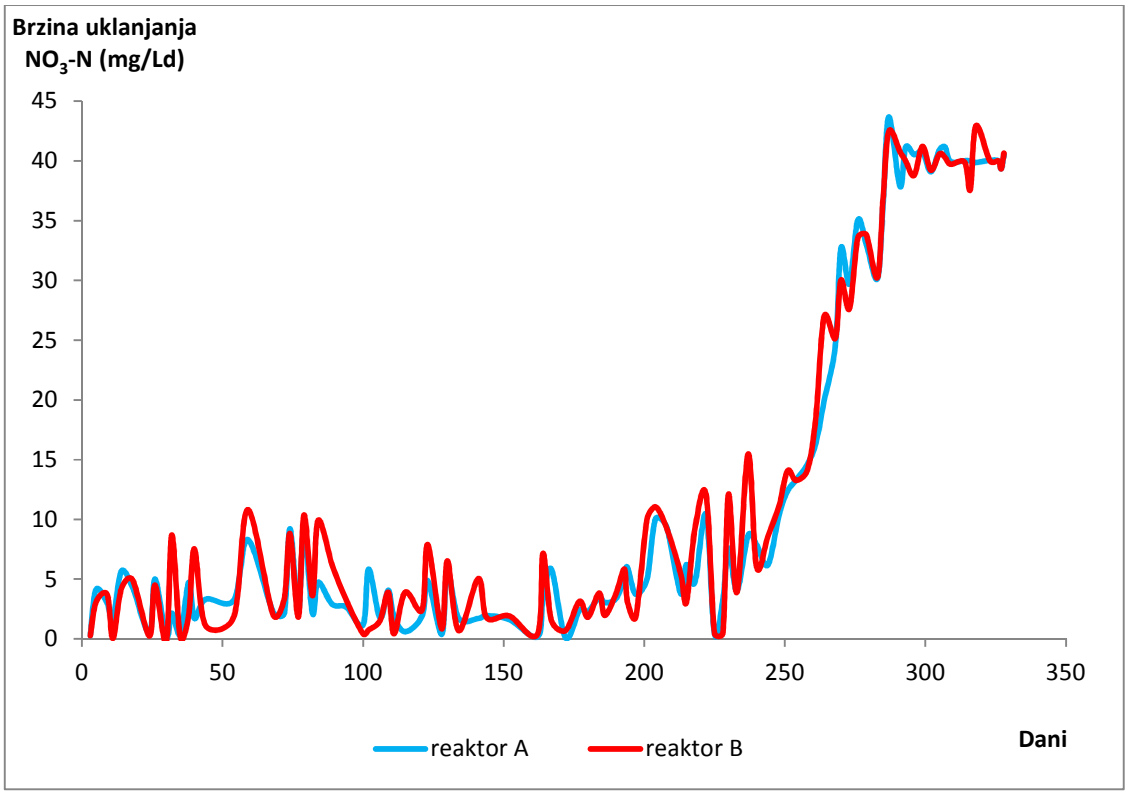
Slika 3.1.1.7. Koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Koncenrtacija amonijaka u stacionarnom dijelu istraživanja u denitrifikacijskim bioreaktorima A i B kretala se od najmanje izmjerene u oba reaktora od 0,001 mg/L do najviše 0,560 mg/L u bioreaktoru A te 0,501 mg/L u reaktoru B (slika 3.1.1.8.). Srednja vrijednost koncentracije NH_3 nakon indukcije bila je 0,2 ± 0,2 mg/L u bioreaktoru A i 0,2 ± 0,1 mg/L u reaktoru B, a među njima χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p<0,05$).



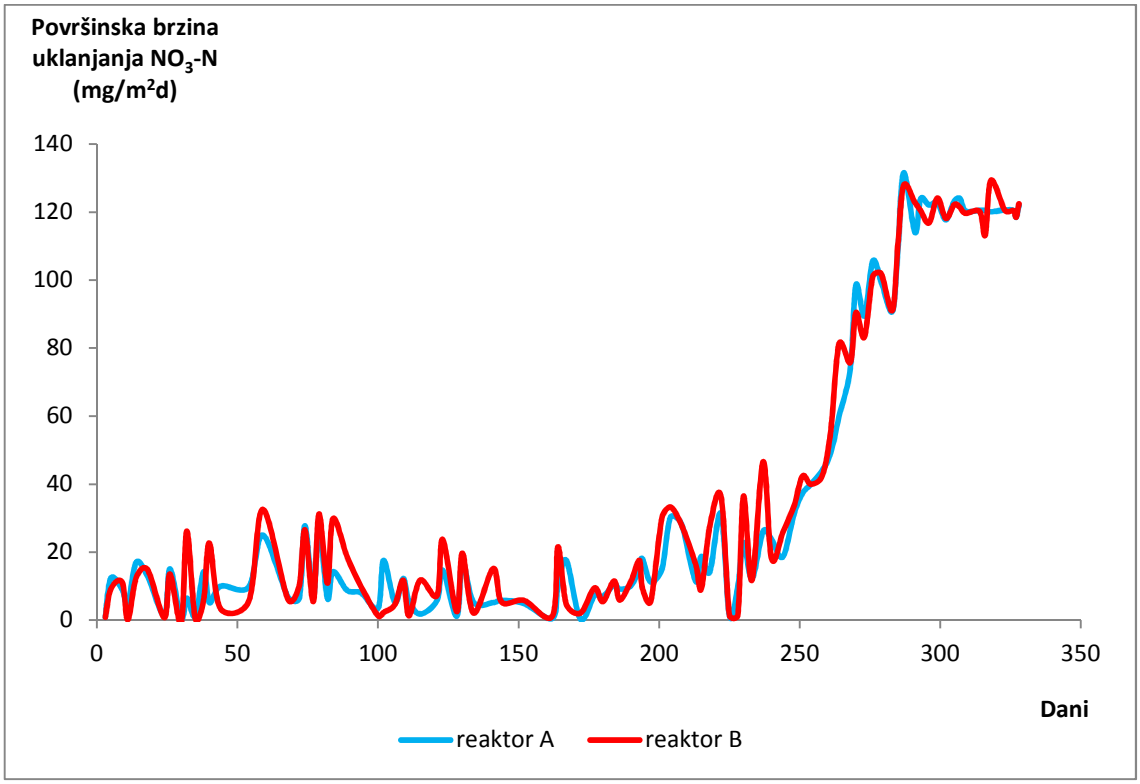
Slika 3.1.1.8. Koncentracije amonijaka (NH_3) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Brzina uklanjanja nitratnog dušika u stacionarnim uvjetima u denitrifikacijskim reaktorima A i B od 287. dana bilo je konstantno oko 40 mg/Ld, a najveće vrijednosti od 43,68 mg/Ld, odnosno 42,94 mg/Ld zabilježene su u bioreaktoru A 287., a u reaktoru B 318. dan (slika 3.1.1.9.). Srednja vrijednost brzine uklanjanja NO_3-N nakon indukcije bila je 40,3 ± 1,2 mg/Ld u bioreaktoru A i 40,2 ±1,3 mg/Ld u reaktoru B, dok χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih dvaju reaktora ($p<0,05$).



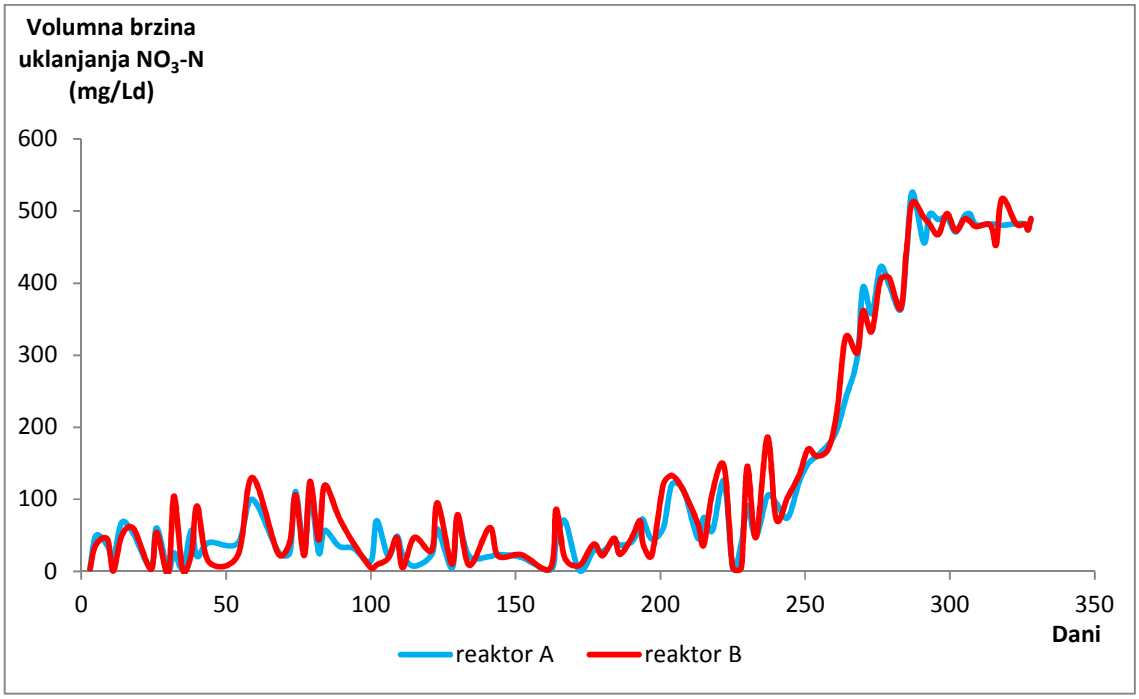
Slika 3.1.1.9. Brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika u stacionarnim uvjetima u oba denitrifikacijska reaktora je od 287. dana bila konstantna na oko 121 mg/m^{2}d, dok su najveće vrijednosti zabilježene u bioreaktoru A 287., a u reaktoru B 318. dan te su iznosile 131,57 mg/m^{2}d, odnosno 129,33 mg/m^{2}d (slika 3.1.1.10.). Srednja vrijednost površinske brzine uklanjanja NO_3-N nakon indukcije bila je 121,4 ± 3,6 mg/m^{2}d u bioreaktoru A i 121,1 ± 3,8 mg/m^{2}d u reaktoru B, dok χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike među tim reaktorima ($p<0,05$).



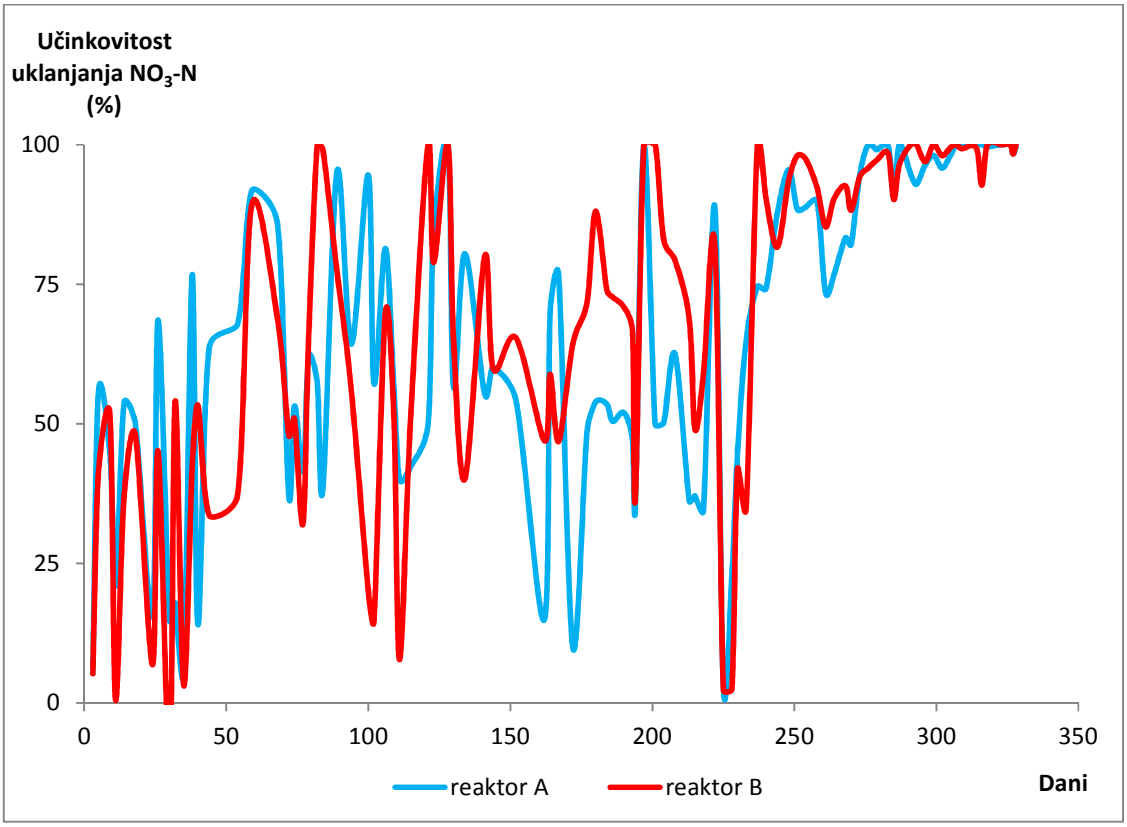
Slika 3.1.1.10. Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika u stacionarnim uvjetima u oba denitrifikacijska reaktora pratila je kretanje dnevnog denitrifikacije te je i njena vrijednost od 287. dana bila konstantna na oko 485 mg/Ld, a najveće vrijednosti od 526,29 mg/Ld, odnosno 517,31 mg/Ld, zabilježene su u bioreaktoru A 287., a u reaktoru B 318. dan (slika 3.1.1.11.). Srednja vrijednost volumne brzine uklanjanja NO_3-N nakon indukcije iznosila je 485,6 ±14,3 mg/Ld u bioreaktoru A i 484,6 ±15,1 mg/Ld u reaktoru B, a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih dvaju reaktora ($p<0,05$).



Slika 3.1.1.11. Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika u stacionarnim uvjetima u oba denitrifikacijska bioreaktora dostigla je konstantnu vrijednost od oko 100% nakon 287. dana istraživanja (slika 3.1.1.12.). Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).



Slika 3.1.1.12. Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom stacionarnog dijela istraživanja.

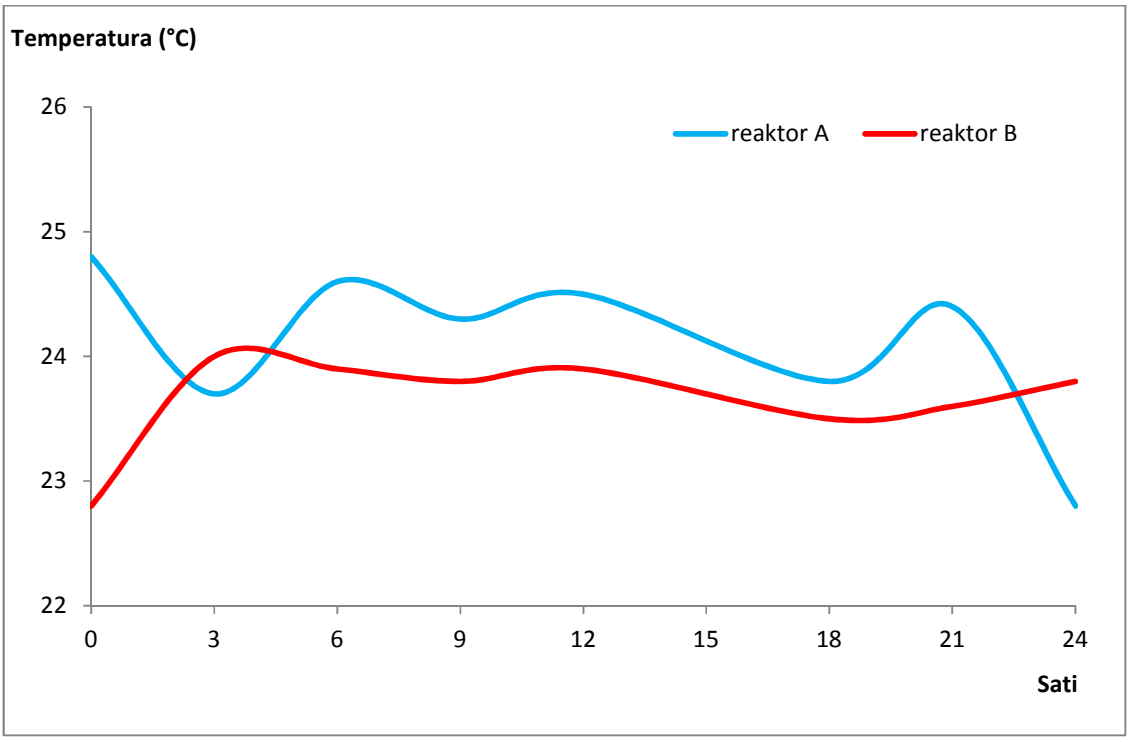
Tablica 3.1.1.1. Rezultati unakrsne korelacije brzine i učinkovitosti uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) i vrijednosti saliniteta (S) temperature (T) i pH te koncentracija kisika (O_2), NO_3-N, nitritnog dušika (NO_2-N), ukupnog amonijakalnog dušika (UAN), ukupnog NO_3-N i dodane sladovine izražene pomoću vrijednosti kemijske potrošnje kisika (KPK) tijekom stacionarnog istraživanja denitrifikacije; BU – brzina uklanjanja NO_3-N, UU – učinkovitost uklanjanja NO_3-N; c – koncentracija; kk – koeficijent korelacije.

	Denitrifikacijski reaktor A				Denitrifikacijski reaktor B			
	BU		UU		BU		UU	
	odziv	kk	odziv	kk	odziv	kk	odziv	kk
S	1	0,814	1	0,513	2	0,776	1	0,570
T	21	-0,762	23	-0,546	23	0,735	26	-0,338
c(O_2)			9	-0,219			7	-0,266
pH	0	0,691	2	0,589	0	0,665	1	0,570
UAN	12	-0,509	10	-0,424	2	-0,556	44	0,320
c(NO_3-N)	0	-0,330	0	-0,286	0	-0,317	0	-0,361
c(NO_2-N)	14	-0,436	18	-0,302	66	0,403	0	-0,117
c(NO_3-N) ukupni	1	0,868	1	0,536	1	0,840	2	0,453
KPK dodana	0	0,858	0	0,549	1	0,847	0	0,460

Statističkom analizom unakrsne korelacije varijabli u vremenskim nizovima s intervalom pouzdanosti od 5% ispitivana je ovisnost brzine i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N o vrijednostima S, T, pH, koncentracija O_2, UAN, NO_3-N, NO_2-N, ukupnog NO_3-N i dodane sladovine izražene pomoću KPK vrijednosti. U stacionarnim uvjetima je u oba denitrifikacijska reaktora dokazana ovisnost brzine uklanjanja NO_3-N o svim ispitivanim parametrima osim o koncentraciji O_2, dok učinkovitost uklanjanja NO_3-N ovisi i o koncentraciji O_2 (tablica 3.1.1.1.).

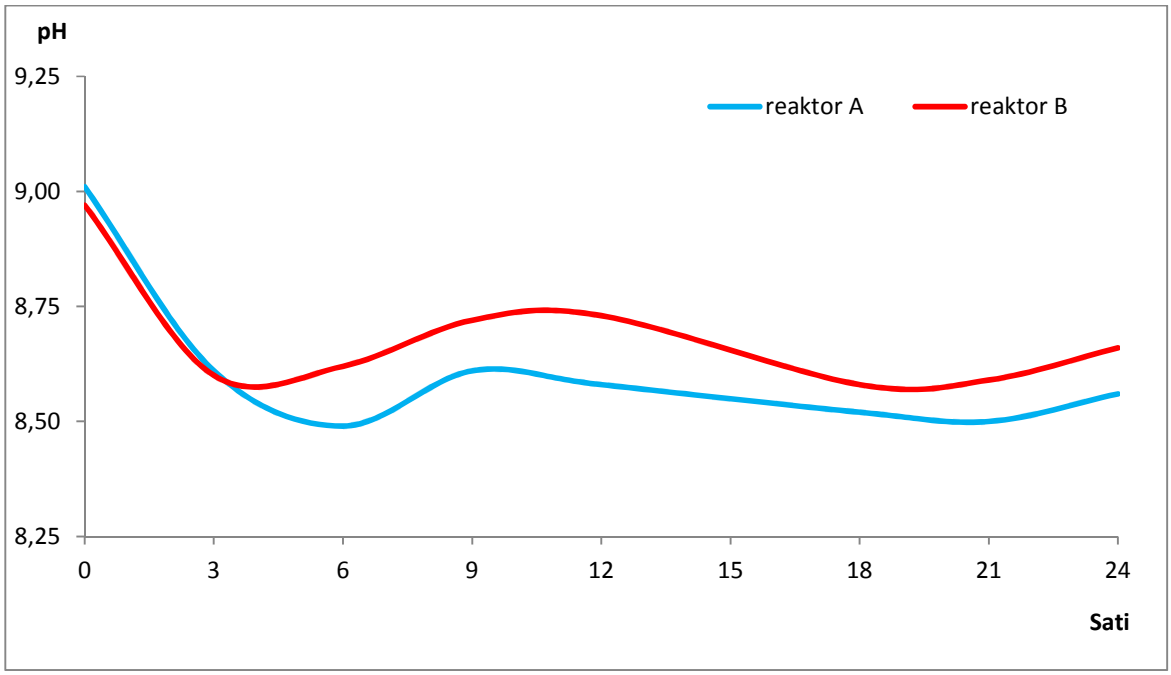
3.1.2. Cjelodnevno istraživanje denitrifikacije u stacionarnim uvjetima

Tijekom 24 sata istraživanja denitrifikacije u stacionarnim uvjetima salinitet je bio 32 u oba reaktora, dok se temperatura kretala od 22,8 do 24,8 °C u denitrifikacijskom bioreaktoru A te od 22,8 do 24,0 °C u reaktoru B (slika 3.1.2.2.). Srednja vrijednost temperature bila je 24,1 ± 0,6 °C u bioreaktoru A i 23,7 ± 0,4 °C u reaktoru B, ali među reaktorima χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p<0,05$).



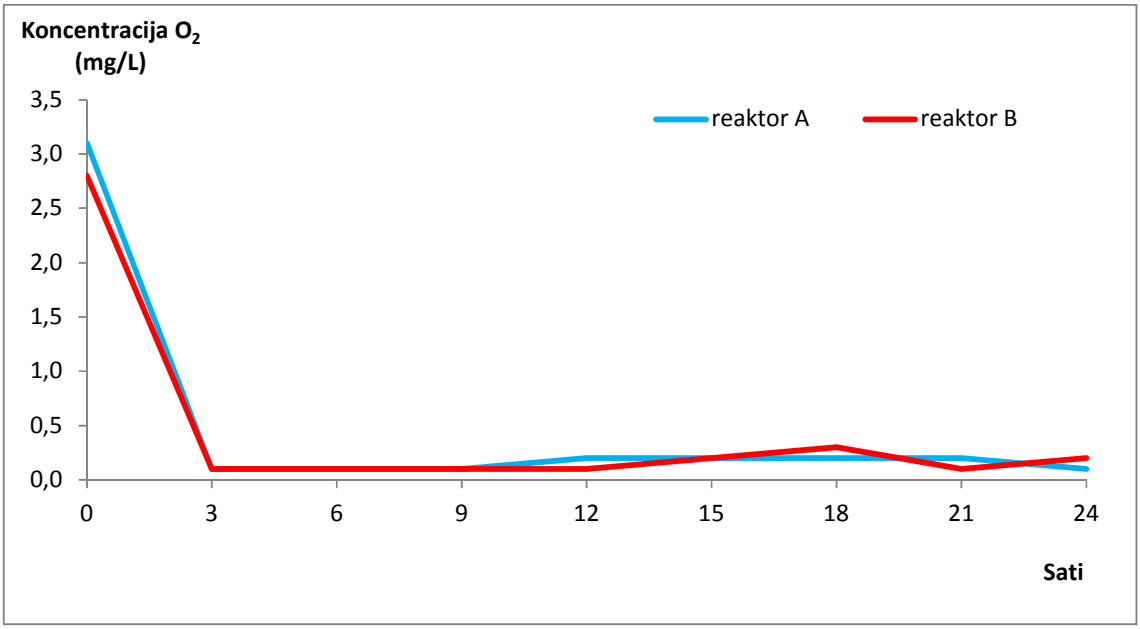
Slika 3.1.2.1. Vrijednosti temperature u denitrifikacijskim reaktorima A i B u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Tijekom cjelodnevnog istraživanja denitrifikacije u stacionarnim uvjetima izmjerene su pH vrijednosti u rasponu od 8,49 od 9,01 u denitrifikacijskom reaktoru A, a u reaktoru B u rasponu od 8,58 do 8,97 (slika 3.1.2.2.). Srednja pH vrijednost iznosila je 8,6 ± 0,2 u bioreaktoru A i 8,7 ± 0,1u reaktoru B, a među njima χ^2 test nije utvrdio statistički značajne razlike ($p<0,05$).



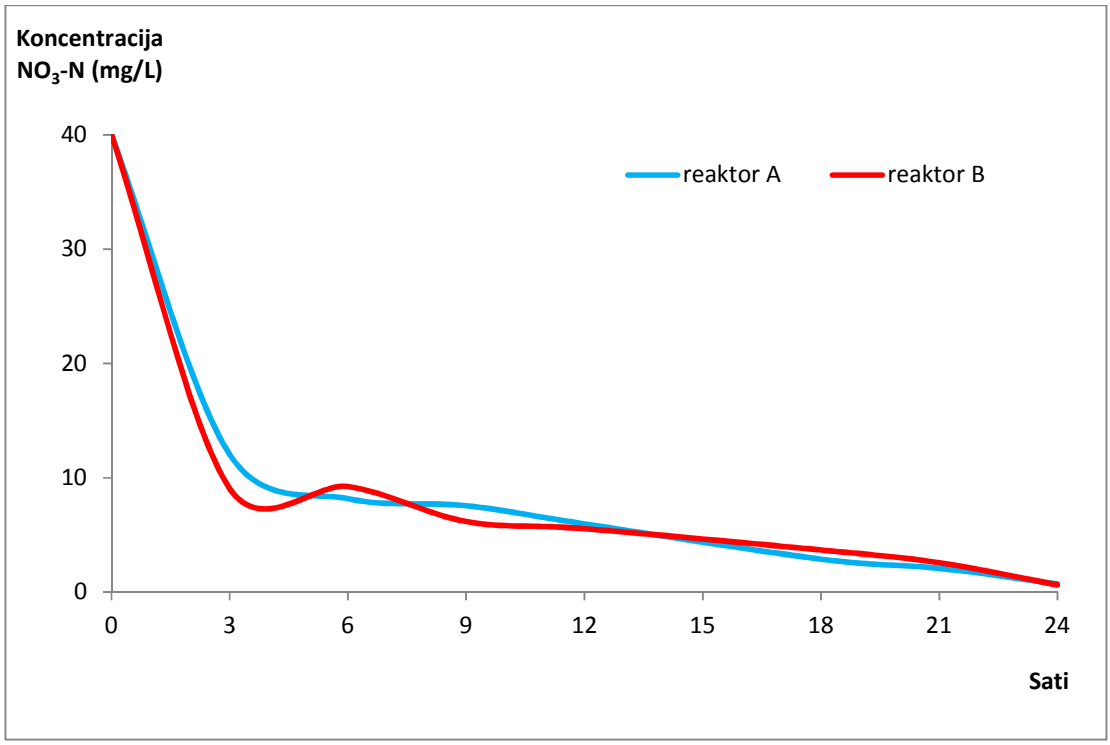
Slika 3.1.2.2. pH vrijednost u denitrifikacijskim reaktorima A i B u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Tijekom cjelodnevnog istraživanja denitrifikacije u stacionarnim uvjetima u oba reaktora je zabilježena najniža vrijednost koncentracije kisika od 0,1 mg/L, a najveća vrijednost od 3,1 mg/L u denitrifikacijskom reaktoru A i 2,8 mg/l u reaktoru B (slika 3.1.2.3.). Srednja vrijednost koncentracije kisika bila je 0,5 ± 1,0 mg/L u bioreaktoru A i 0,5 ± 0,9 mg/L u reaktoru B. Nakon potrošnje početne količine kisika tijekom prva tri sata srednja vrijednost koncentracije kisika bila je 0,1 ± 0,0 mg/L u reaktoru A i 0,1 ± 0,1 mg/L u reaktoru B. Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između tih dvaju reaktora ($p<0,05$).



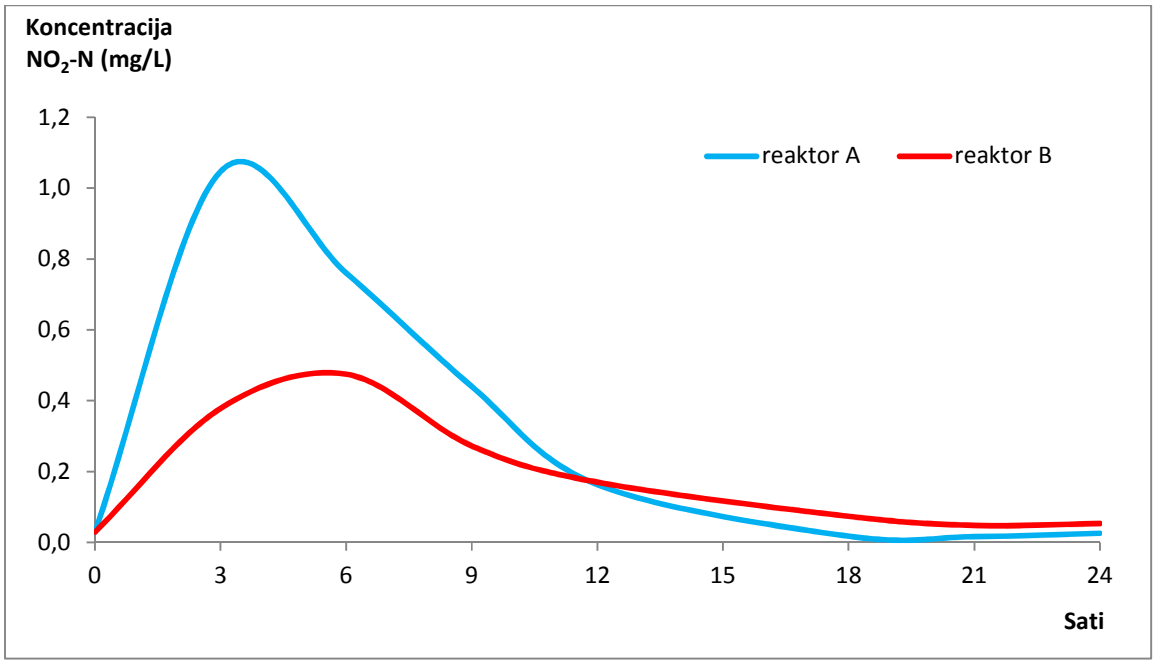
Slika 3.1.2.3. Koncentracija kisika (O_2) u denitrifikacijskim reaktorima A i B u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Koncentracija nitratnog dušika u cjelodnevnom istraživanju denitrifikacije u stacionarnim uvjetima spustila se s početne vrijednosti od 40 mg/L u oba reaktora na 0,711 mg/L u denitrifikacijskom reaktoru A i na 0,627 mg/L u reaktoru B (slika 3.1.2.4.) Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između tih dvaju reaktora ($p<0,05$).



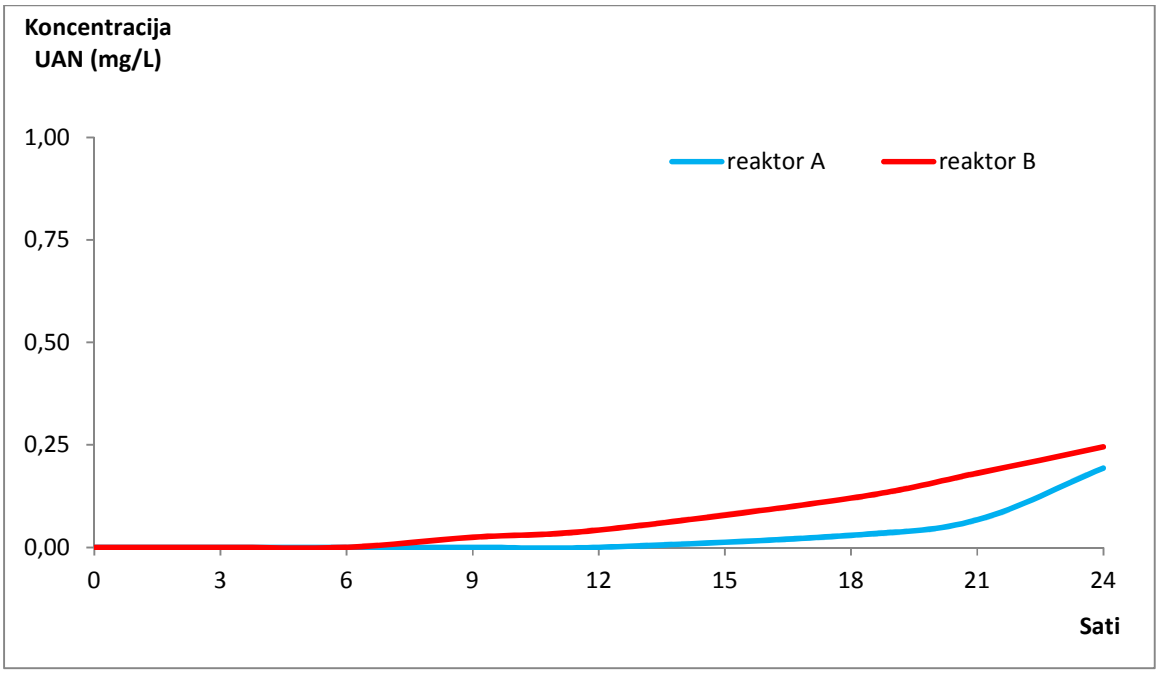
Slika 3.1.2.4. Koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Tijekom cjelodnevnog istraživanja denitrifikacije u stacionarnim uvjetima izmjerena koncentracije nitritnog dušika od početne vrijednosti od 0 mg/L u oba reaktora porasla je u reaktoru A do 1,047 mg/L i u reaktoru B do 0,457 mg/L, nakon čega su se vrijednosti spustile (slika 3.1.2.5.). Uz to, među tim reaktorima χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p<0,05$).



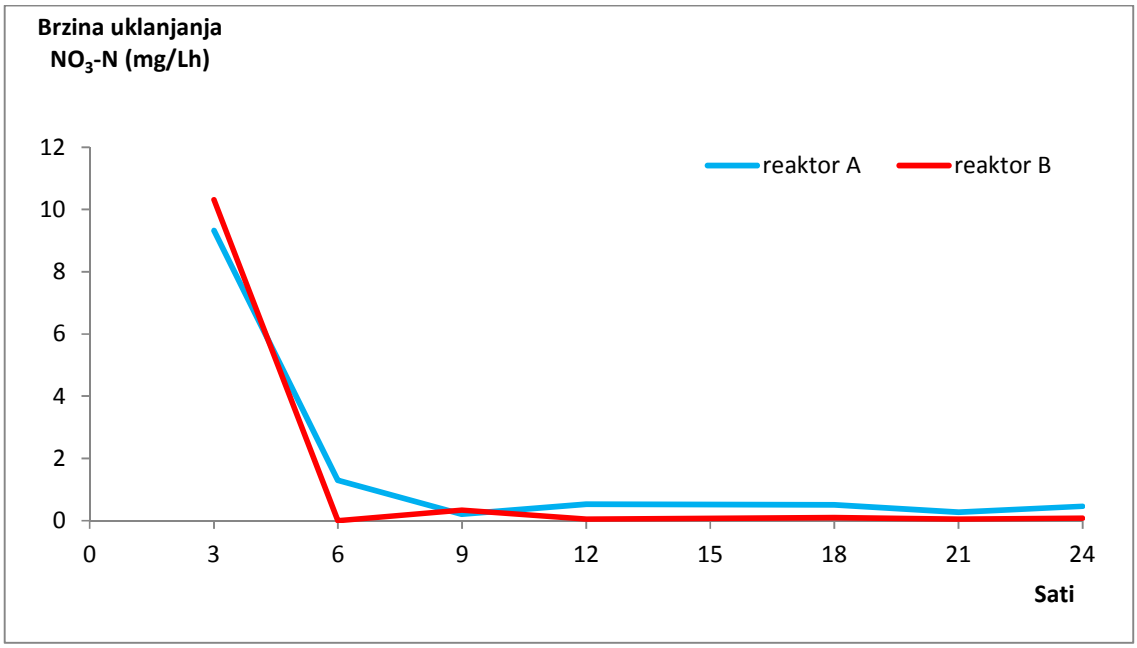
Slika 3.1.2.5. Koncentracije nitritnog dušika (NO_2-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Tijekom cjelodnevnog istraživanja denitrifikacije u stacionarnim uvjetima izmjerena koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika s početne 0 mg/l u oba reaktora povećala na 0,193 mg/L u reaktoru A te na 0,245 mg/L u reaktoru B (slika 3.1.2.6.). Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između denitrifikacijskih reaktora A i B ($p<0,05$).



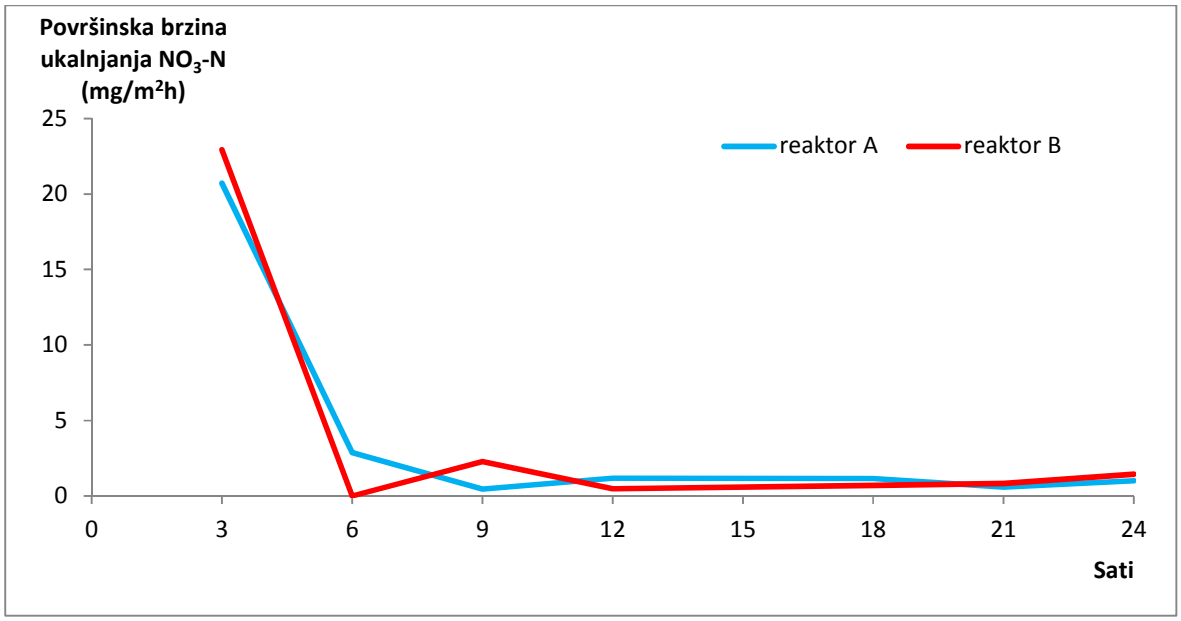
Slika 3.1.2.6. Koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u denitrifikacijskim reaktorima A i B u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Brzina uklanjanja nitratnog dušika u istraživanju denitrifikacije u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata smanjila se sa 9,32 mg/Lh u reaktoru A i 10,32 mg/Lh u reaktoru B na 0 mg/Lh u oba reaktora (slika 3.1.2.7.). Uz to, χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih dvaju reaktora ($p<0,05$).



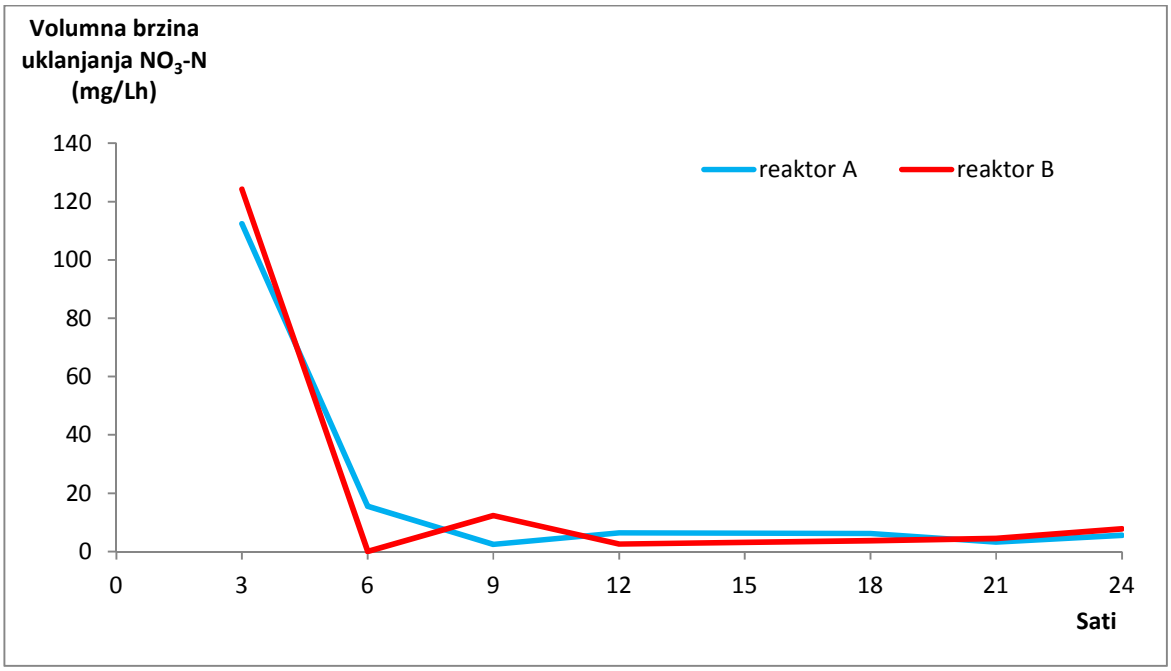
Slika 3.1.2.7. Brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata smanjila se sa 20,72 mg/m^{2}h u reaktoru A i 22,92 mg/m^{2}h u reaktoru B na 0 mg/m^{2}h u oba reaktora (slika 3.1.2.8.). Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između denitrifikacijskih reaktora A i B ($p<0,05$).



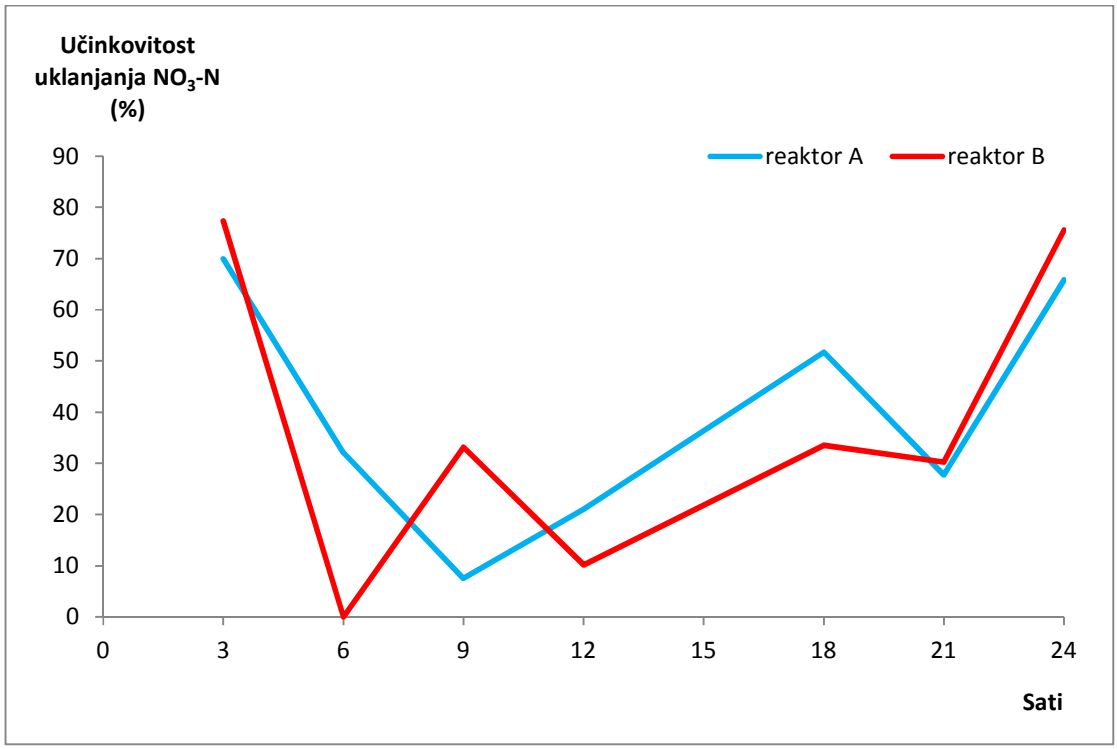
Slika 3.1.2.8. Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim reaktorima u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata smanjila se sa 112,33 mg/Lh u reaktoru A i 124,29 mg/Lh u reaktoru B na 0 mg/Lh u oba reaktora (slika 3.1.2.9.). Nadalje, χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih dvaju reaktora ($p<0,05$).



Slika 3.1.2.9. Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim reaktorima u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata u reaktoru B je varirala od 0 do 77,38%, a u reaktoru A od 7,52 do 69,92% (slika 3.1.2.10.). Rezultati provedenog χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika između denitrifikacijskih reaktora A i B ($p<0,05$).



Slika 3.1.2.10. Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima u stacionarnim uvjetima tijekom 24 sata.

Tablica 3.1.2.1. Rezultati unakrsne korelacije brzine i učinkovitosti uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) i vrijednosti temperature (T) i pH te koncentracija kisika (O_2), NO_3-N, nitritnog dušika (NO_2-N), ukupnog amonijakalnog dušika (UAN), ukupnog NO_3-N i dodane sladovine izražene pomoću vrijednosti kemijske potrošnje kisika (KPK) tijekom cjelodnevnog istraživanja denitrifikacije; BU – brzina uklanjanja NO_3-N, UU – učinkovitost uklanjanja NO_3-N; c – koncentracija; kk – koeficijent korelacije.

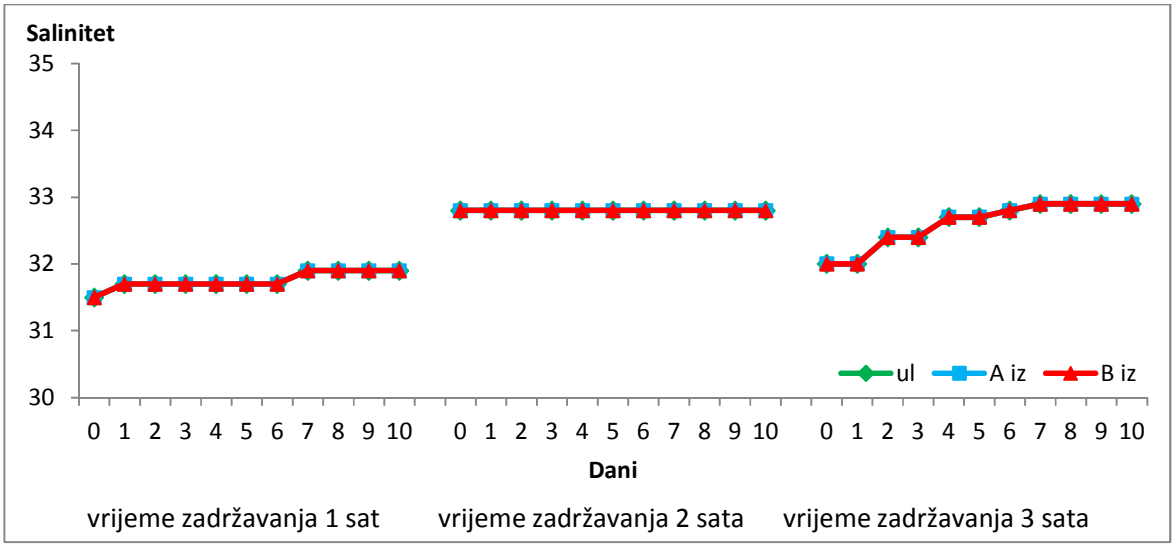
	Denitrifikacijski reaktor A				Denitrifikacijski reaktor B			
	BU		UU		BU		UU	
	odziv	kk	odziv	kk	odziv	kk	odziv	kk
T			0	-0,833	0	-0,884		
c(O_2)	0	0,963			0	0,980		
pH	0	0,952			0	0,886		
UAN								
c(NO_3-N)	0	0,925			0	0,936		
c(NO_2-N)	0	0,795						
c(NO_3-N) ukupni	0	0,925			0	0,936		
KPK dodana	0	0,968			0	0,980		

Statističkom analizom unakrsne korelacije varijabli u vremenskim nizovima s intervalom pouzdanosti od 5% ispitivana je ovisnost brzine i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N o vrijednostima T, pH, koncentracije O_2, UAN, NO_3-N, NO_2-N, ukupnog NO_3-N i dodane sladovine izražene pomoću KPK vrijednosti. Tijekom cjelodnevnog istraživanja denitrifikacije u oba denitrifikacijska reaktora pokazana je ovisnost brzine uklanjanja NO_3-N o vrijednostima pH, koncentracije O_2, NO_3-N, ukupnog NO_3-N i dodane sladovine, dok u reaktoru A ona još ovisi i o koncentraciji NO_2-N, a u reaktoru B o temperaturi. Učinkovitost uklanjanja NO_3-N reaktoru A ovisila je o temperaturi, dok u reaktoru B nije dokazana ovisnost ni o jednom parametru (tablica 3.1.2.1.).

3.2. Istraživanje učinkovitosti denitrifikacije pri različitim protocima

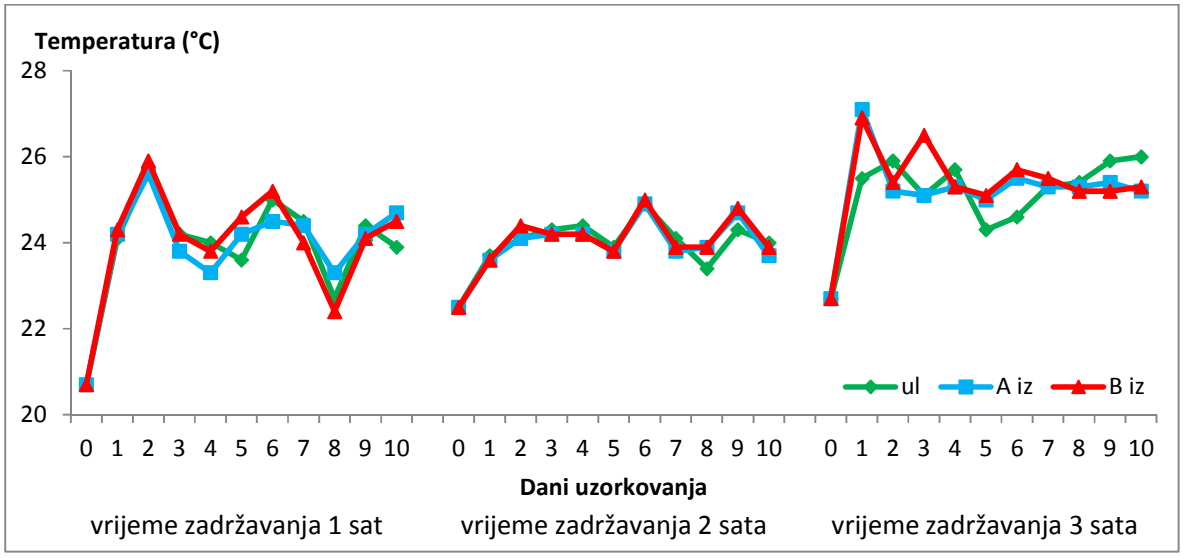
Istraživanja učinkovitosti denitrifikacije su uključila različite protoke vode kroz bioreaktore s njenim zadržavanjem u trajanju od jednoga, dva i tri sata. Parametri kvalitete vode mjereni su na ulazima i izlazima denitrifikacijskih bioreaktora uz napomenu da je postojalo jedno mjesto uzorkovanja ulazne vode u oba reaktora pa su time i ulazne vrijednosti za oba reaktora jednake.

Tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima vrijednosti saliniteta su se kretale jednako u oba reaktora i bez razlika među ulazima i izlazima iz jedinica pa tako χ^2 testom nisu utvrđene niti statistički značajne razlike između reaktora A i B ($p<0,05$). Pri istraživanju denitrifikacije sa zadržavanjem vode u denitrifikacijskim bioreaktorima u trajanju od jednoga sata, vrijednosti saliniteta kretale su se od 31,5 do 31,9, za vrijeme istraživanja uz zadržavanje morske vode u reaktorima u trajanju od dva sata, salinitet je imao konstantu vrijednost od 32,8, dok su vrijednosti saliniteta tijekom istraživanja sa zadržavanjem vode od tri sata bile od 32,0 do 32,9 u (slika 3.2.1.). Srednja vrijednost saliniteta tijekom istraživanja denitrifikacije s vremenom zadržavanja vode u trajanju od jednog sata bila je 31,8 ± 0,1, s vremenom zadržavanja vode od dva sata 32,8 ± 0,0, a s vremenom zadržavanja vode od tri sata 32,6 ± 0,3.



Slika 3.2.1. Vrijednosti saliniteta u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Vrijednosti temperature u denitrifikacijskim bioreaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jednoga sata, varirale su od 20,7 do 25,9 °C. Za vrijeme istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od dva sata kretale su se od 22,5 do 25,0 °C. Vrijednosti temperature u denitrifikacijskim bioreaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od tri sata iznosile su od 22,7 do 26,9 °C (slika 3.2.2.). Srednje vrijednosti temperature u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.1., a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih reaktora ($p<0,05$).

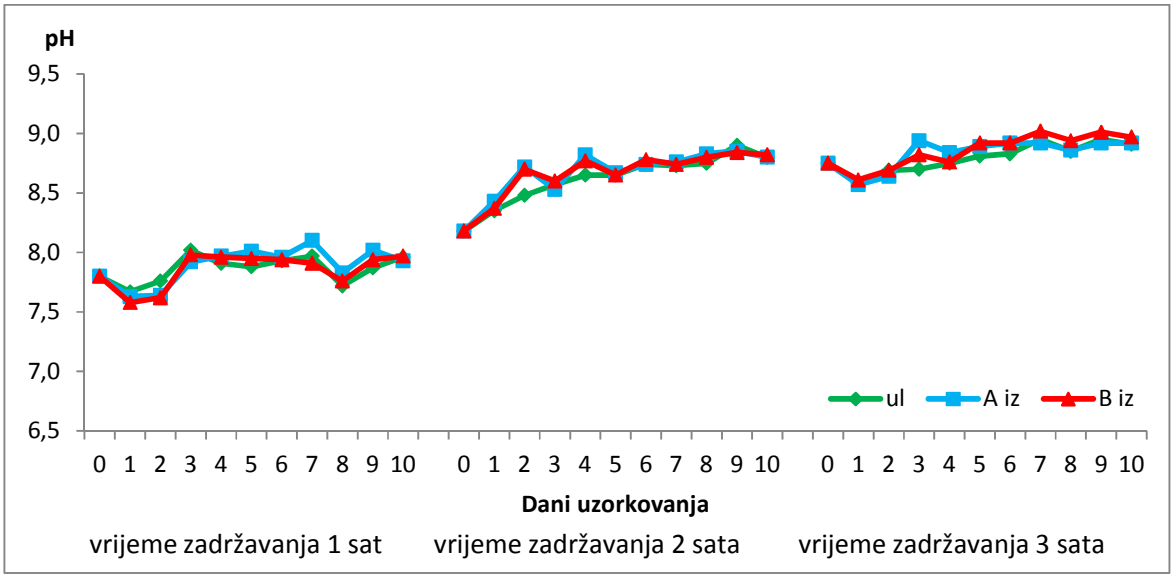


Slika 3.2.2. Temperatura u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.1. Srednje vrijednost temperature tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Temperatura (°C)			
Vrijeme zadržavanja	Ulazna vrijednost	Izlazna vrijednost	
		Reaktor A	Reaktor B
1 sat	23,9 ± 1,2	23,9 ± 1,2	24,0 ± 1,3
2 sata	24,0 ± 0,6	23,9 ± 0,6	24,0 ± 0,6
3 sata	25,1 ± 0,9	25,2 ± 1,0	25,3 ± 1,0

Tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem morske vode u trajanju od jednoga sata, u denitrifikacijskim su bioreaktorima zabilježene vrijednosti pH od 7,58 do 8,10. Za vrijeme istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od dva sata varirale su od 8,18 do 8,90, dok su uz zadržavanje vode u trajanju od tri sata kretale od 8,57 do 8,94 (slika 3.2.3.). Srednje pH vrijednosti u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.2., a rezultati χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).

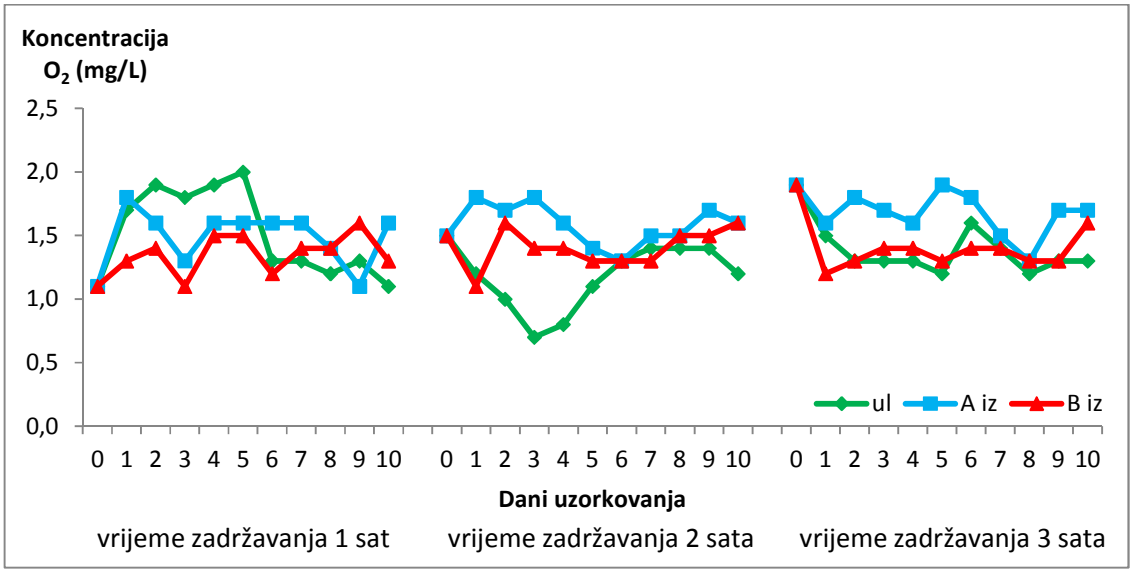


Slika 3.2.3. Vrijednosti pH zabilježene u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.2. Srednje pH vrijednosti tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

pH			
Vrijeme zadržavanja	Ulazna vrijednost	Izlazna vrijednost	
		Reaktor A	Reaktor B
1 sat	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
2 sata	8,6 ± 0,2	8,7 ± 0,2	8,7 ± 0,2
3 sata	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,9 ± 0,1

Koncentracije kisika u denitrifikacijskim bioreaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jednoga sata kretale su se od 1,1 do 2,0 mg/L što je izmjereno u ulaznoj vodi. Koncentracije kisika u bioreaktorima za vrijeme istraživanja sa zadržavanjem vode od 2 sata kretale su se od 0,7 do 1,8 mg/L, a tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od 3 sata od 1,2 do 1,9 mg/L (slika 3.2.4.). Srednje koncentracije kisika u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.3., a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih reaktora ($p<0,05$).

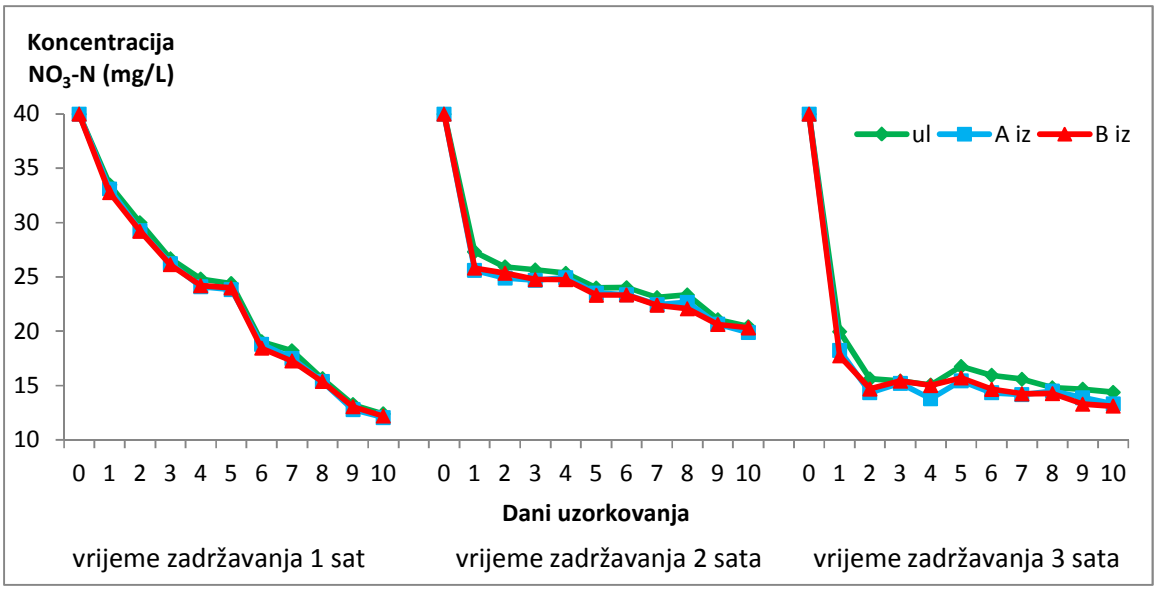


Slika 3.2.4. Koncentracija kisika (O_2) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.3. Srednje koncentracije kisika(O_2) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Koncentracija O_2 (mg/L)			
Vrijeme zadržavanja	Ulazna vrijednost	Izlazna vrijednost	
		Reaktor A	Reaktor B
1 sat	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2
2 sata	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1
3 sata	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2

Koncentracija nitratnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima pri istraživanju denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jednoga sata, spustila se s početne vrijednosti od 40 na 12,063 mg/L u denitrifikacijskom bioreaktoru A i 12,190 mg/L u reaktoru B. Za vrijeme istraživanja sa zadržavanjem vode u trajanju od dva sata, koncentracija se spustila s početne vrijednosti na 19,873 mg/L u denitrifikacijskom bioreaktoru A, i 20,324 mg/L u reaktoru B, a sa zadržavanjem vode od tri sata spustila se na 13,308 mg/L u denitrifikacijskom bioreaktoru A i 13,111 mg/L u reaktoru B (slika 3.2.5.). Srednje vrijednosti promjena koncentracija NO_3-N na ulazima i izlazima reaktora tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.4., a rezultati χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).

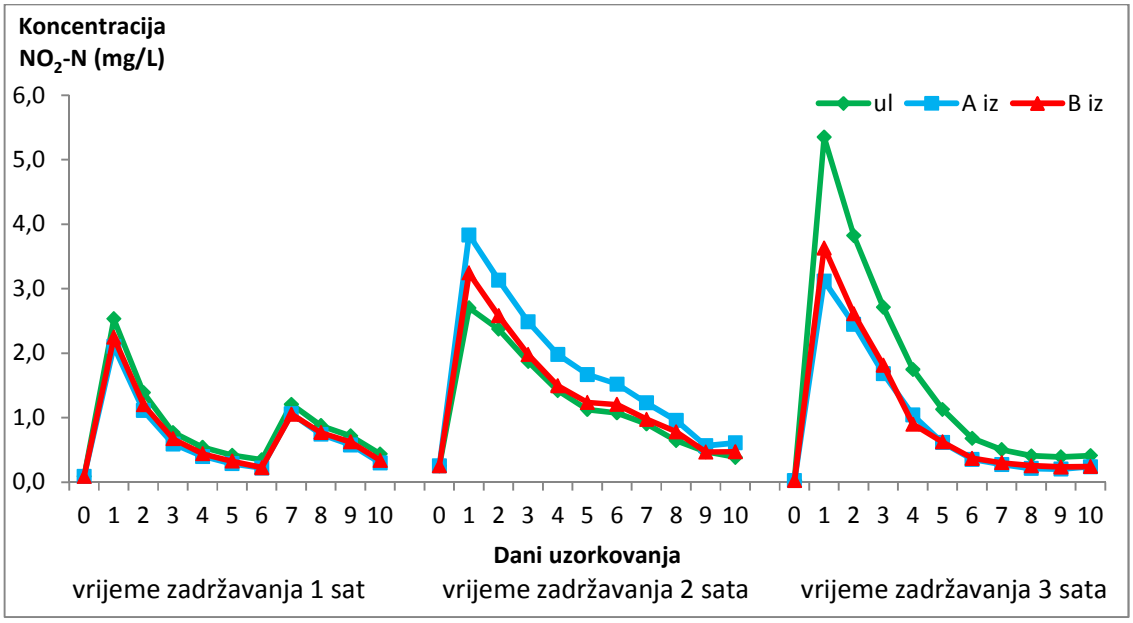


Slika 3.2.5. Koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.4. Srednje vrijednosti promjena koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Srednje vrijednosti promjena koncentracija NO_3-N		
Vrijeme zadržavanja	Reaktor A	Reaktor B
1 sat	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2
2 sata	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,4
3 sata	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,6

Koncentracija nitritnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jedan sat mijenjala se od početne vrijednosti od 0 do 2,535 mg/l u ulaznoj vodi obaju reaktora. Za vrijeme istraživanja sa zadržavanjem vode od dva sata kretala se od početne vrijednosti od 0 do 3,836 mg/l u izlaznoj vodi reaktora A. Koncentracija NO_2^--N se pri istraživanju denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od tri sata kretala od početne vrijednosti od 0 do 5,349 mg/l u ulaznoj vodi obaju reaktora (slika 3.2.6.). Srednje vrijednosti promjena koncentracija NO_2-N u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.5., a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih reaktora ($p<0,05$).

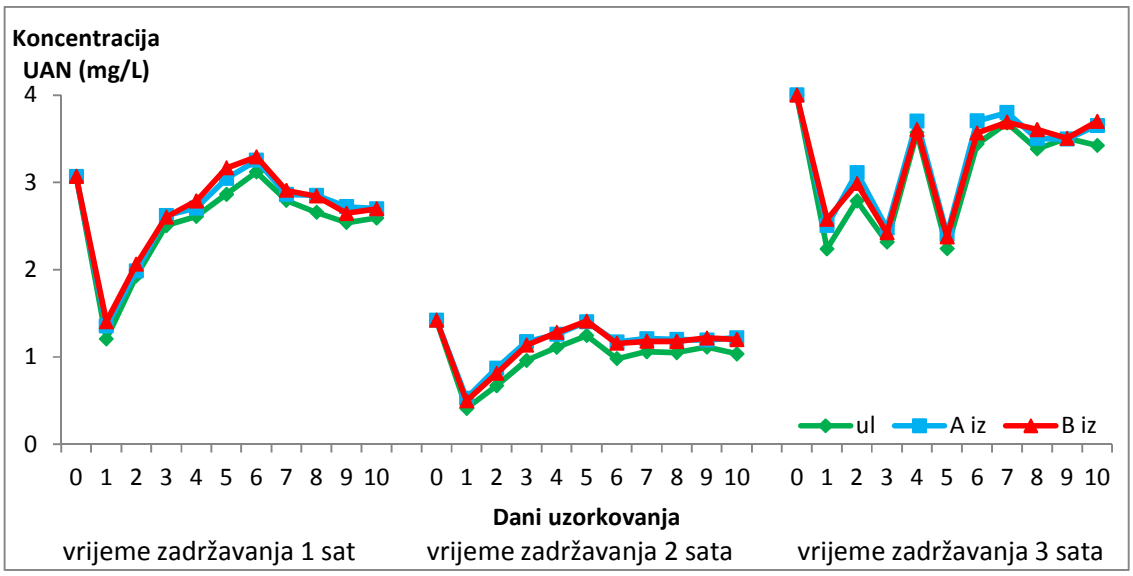


Slika 3.2.6. Koncentracija nitritnog dušika (NO_2-N) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.5. Srednje vrijednosti promjena koncentracija nitritnog dušika (NO_2-N) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Srednje vrijednosti promjena koncentracija NO_2-N (mg/L)		
Vrijeme zadržavanja	Reaktor A	Reaktor B
1 sat	− 0,2 ± 0,1	− 0,1 ± 0,1
2 sata	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,1
3 sata	− 0,7 ± 0,6	− 0,6 ± 0,5

Koncentracija ukupnoga amonijakalnog dušika u denitrifikacijskim bioreaktorima u istraživanju denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jednoga sata, varirala je od 1,21 mg/l u ulaznoj vodi do 3,29 mg/l u izlaznoj vodi reaktora B. Za vrijeme istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode od dva sata kretala se od početne vrijednosti od 1,42 mg/l preko najniže zabilježene od 0,41 mg/L u ulaznoj vodi do 1,41 mg/l u izlaznoj vodi reaktora B. Za vrijeme istraživanja sa zadržavanjem vode od tri sata koncentracija UAN se mijenjala od početne vrijednosti od 4,00 mg/l preko najniže zabilježene od 2,24 mg/L u ulaznoj vodi do 3,70 mg/l u izlaznoj vodi reaktora B (slika 3.2.7.). Srednje vrijednosti promjena koncentracija UAN u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.6., a rezultati χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).

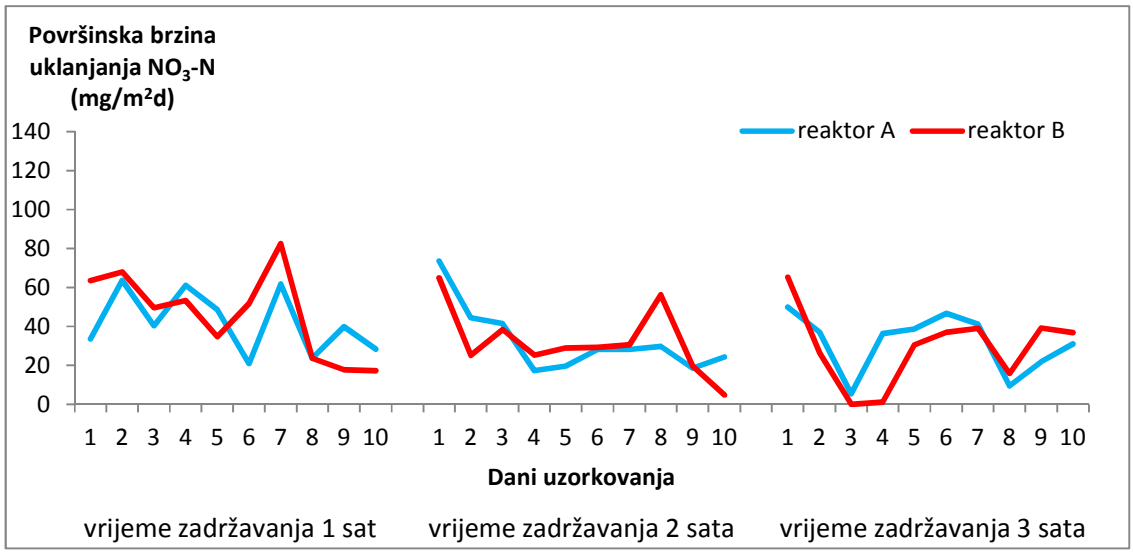


Slika 3.2.7. Koncentracija ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.6. Srednje vrijednosti promjena koncentracija ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Srednje vrijednosti promjena koncentracija UAN (mg/L)		
Vrijeme zadržavanja	Reaktor A	Reaktor B
1 sat	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
2 sata	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
3 sata	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim reaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode od jednoga sata kretala se od 21,02 do 61,74 mg/m^{2}d u denitrifikacijskom reaktoru A te od 17,27 do 82,50 mg/m^{2}d u reaktoru B. Ako je zadržavanje vode bilo dva sata, ona je bila od 17,21 do 73,60 mg/m^{2}d u reaktoru A te od 4,76 do 64,92 mg/m^{2}d u reaktoru B. Površinska brzina uklanjanja NO_3-N tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode od tri sata iznosila je od 5,50 do 49,87 mg/m^{2}d u denitrifikacijskom reaktoru A te od 0 do 65,21 mg/m^{2}d u reaktoru B (slika 3.2.8.). Srednje vrijednosti površinske brzine uklanjanja NO_3-N tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.7., a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih reaktora ($p<0,05$).

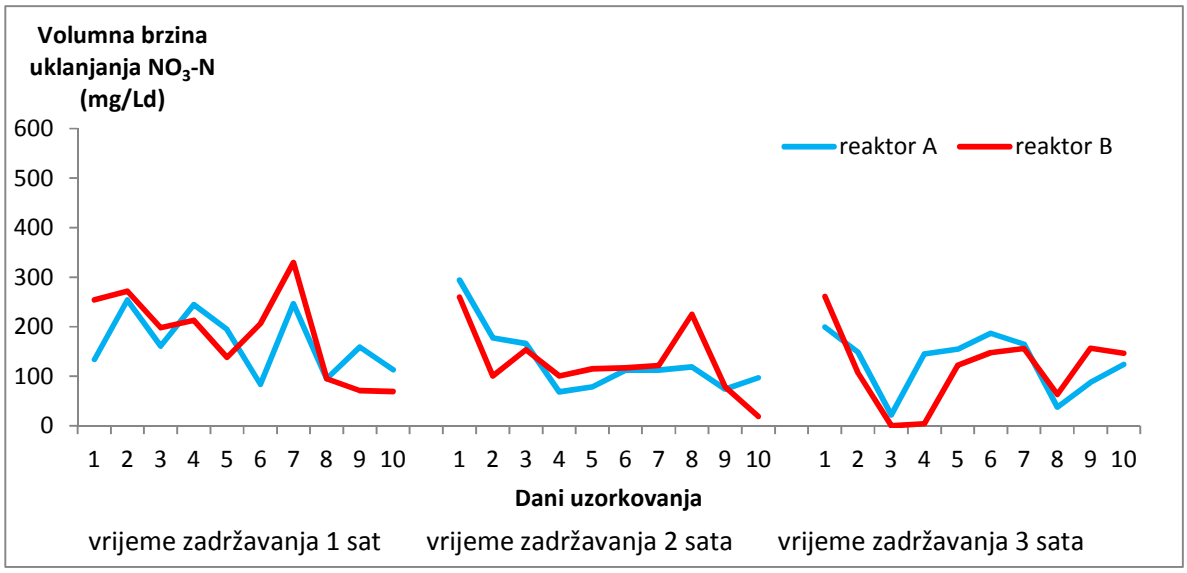


Slika 3.2.8. Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.7. Srednje vrijednosti površinske brzine uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima

Površinska brzina uklanjanja NO_3-N (mg/m^{2}d)		
Vrijeme zadržavanja	Reaktor A	Reaktor B
1 sat	42,17 ± 15,19	46,18 ± 21,13
2 sata	32,54 ± 16,18	32,31 ± 16,50
3 sata	31,79 ± 14,22	29,15 ± 18,53

Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika u denitrifikacijskim reaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jednoga sata, kretala se od 84,07 do 246,95 mg/Ld u reaktoru A i od 69,08 do 330,01 mg/Ld u reaktoru B. Za vrijeme istraživanja sa zadržavanjem vode od dva sata, ona je varirala od 68,83 do 294,56 mg/Ld u denitrifikacijskom reaktoru A i od 19,03 do 259,68 mg/Ld u reaktoru B. Volumna brzina denitrifikacije u denitrifikacijskim reaktorima u istraživanju denitrifikacije sa zadržavanjem vode od tri sata kretala se od 22,01 do 199,50 mg/Ld u denitrifikacijskom reaktoru A te od 0 do 260,85 mg/Ld u reaktoru B (slika 3.2.9.). Srednje vrijednosti volumne brzine uklanjanja NO_3-N tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima prikazane su u tablici 3.2.8., a χ^2 testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih reaktora ($p<0,05$).

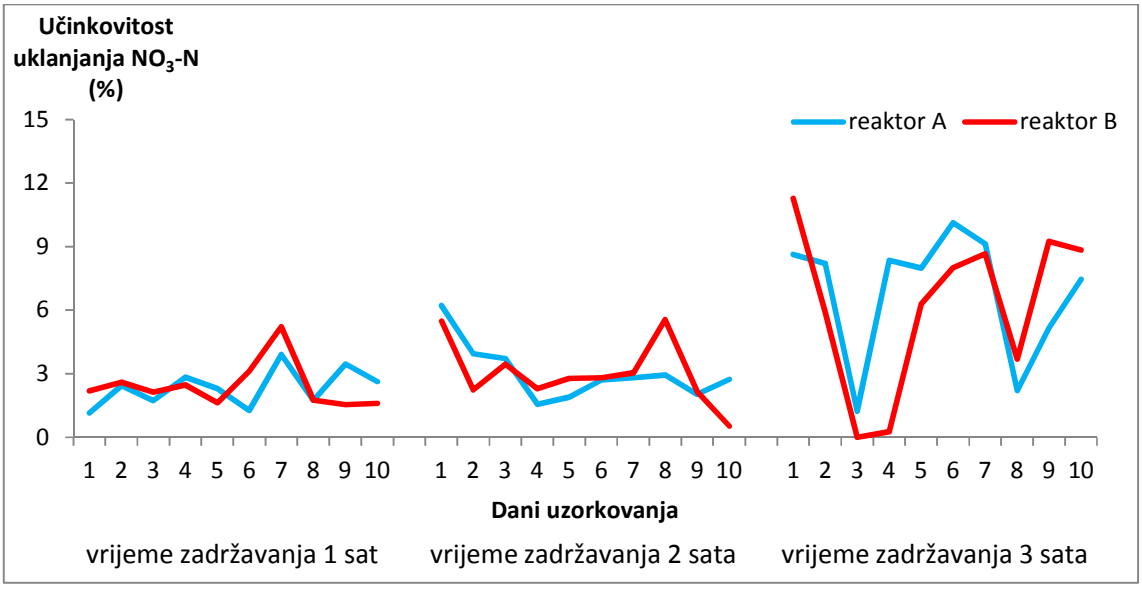


Slika 3.2.9. Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.8. Srednje vrijednosti volumne brzine uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Volumna brzina uklanjanja NO_3-N (mg/Ld)		
Vrijeme zadržavanja	Reaktor A	Reaktor B
1 sat	168,66 ± 60,74	184,73 ± 84,54
2 sata	130,17 ± 64,73	129,23 ± 65,98
3 sata	127,15 ± 56,90	116,59 ± 74,14

Učinkovitost uklanjanja NO_3-N tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u trajanju od jednoga sata kretala se od 1,16 do 3,91% u denitrifikacijskom reaktoru A i od 1,61 do 5,22% u reaktoru B. Za vrijeme istraživanja sa zadržavanjem vode od dva sata iznosila je od 1,57 do 6,22% u denitrifikacijskom reaktoru A te od 0,54 do 5,55% u reaktoru B. Učinkovitost denitrifikacije tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode od tri sata kretala se od 1,24 do 10,13% u denitrifikacijskom reaktoru A te od 0 do 11,29% u reaktoru B (slika 3.2.10.). Srednje vrijednosti učinkovitosti uklanjanja NO_3-N pri istraživanju denitrifikacije uz različite protoke prikazane su u tablici 3.2.9., a rezultati χ^2 testa nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika među tim reaktorima ($p<0,05$).



Slika 3.2.10. Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata.

Tablica 3.2.9. Srednje vrijednosti učinkovitosti uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) tijekom istraživanja denitrifikacije pri različitim protocima.

Učinkovitost uklanjanja NO_3-N (%)		
Vrijeme zadržavanja	Reaktor A	Reaktor B
1 sat	2,35 ± 0,86	2,43 ± 1,05
2 sata	3,06 ± 1,27	3,03 ± 1,44
3 sata	6,85 ± 2,84	6,22 ± 3,63

Tablica 3.2.10. Rezultati unakrsne korelacije brzina i učinkovitosti uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) i ulaznih i izlaznih vrijednosti temperature (T) i pH te koncentracija NO_3-N, nitritnog dušika (NO_2-N), ukupnog amonijakalnog dušika (UAN) i kisika (O_2) u istraživanju denitrifikacije u protočnim uvjetima: PBU – površinska brzina uklanjanja NO_3-N, VBU – volumna brzina uklanjanja NO_3-N, UU – učinkovitost uklanjanja NO_3-N, c – koncentracija, ul – ulazna vrijednost; iz – izlazna vrijednost, kk – koeficijent korelacije.

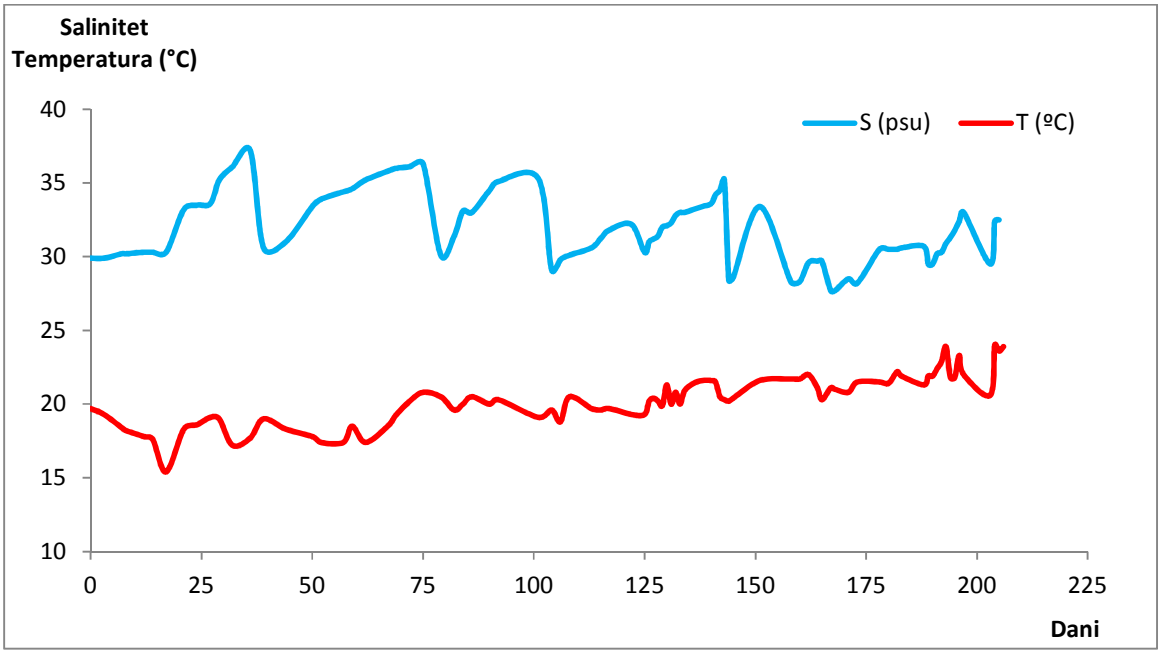
	Denitrifikacijski reaktor A				Denitrifikacijski reaktor B			
	PBU / VBU		UU		PBU / VBU		UU	
	odziv	kk	odziv	kk	odziv	kk	odziv	kk
Vrijeme zadržavanja jedan sat								
T_{ul}	0	0,699			0	0,715	0	0,660
$c(O_2)_{ul}$	0	0,665						
T_{iz}	0	0,635			0	0,613		
Vrijeme zadržavanja dva sata								
T_{ul}	1	-0,696						
$c(O_2)_{ul}$	1	-0,650						
T_{iz}	1	-0,688						
$c(O_2)_{iz}$	1	0,729	1	0,655				
pH_{iz}	0	-0,961	0	-0,955				
$c(NO_3\text{-}N)_{ul}$	0	0,861	0	0,806				
$c(UAN)_{ul}$	1	0,722	1	0,651	0	-0,648		
$c(NO_2\text{-}N)_{ul}$	0	-0,929	0	-0,908	0	0,629		
$c(NO_3\text{-}N)_{iz}$	0	0,846	0	0,789	0	0,623		
$c(UAN)_{iz}$					0	0,635		
Vrijeme zadržavanja tri sata								
T_{iz}	0	0,677			0	-0,630		

Statističkom analizom unakrsne korelacije varijabla u vremenskim nizovima s intervalom pouzdanosti od 5% u denitrifikacijskim je reaktorima u protočnim uvjetima ispitivana ovisnost brzina i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N o ulaznim i izlaznim vrijednostima T i pH i koncentracijama O_2, NO_3-N, UAN i NO_2-N. U sva tri eksperimenta u oba reaktora pokazana je ovisnost o nekim parametrima (tablica 3.2.10.). U istraživanju denitrifikacije s vremenom zadržavanja vode u reaktorima od jednoga sata u oba je reaktora pokazan brzi odziv površinske i volumne brzine uklanjanja NO_3-N na promjene u ulaznoj i izlaznoj temperaturi. Površinska i volumna brzina uklanjanja NO_3-N u reaktoru A ovise i o ulaznoj koncentraciji O_2, dok učinkovitost uklanjanja NO_3-N u denitrifikacijskom reaktoru B ovisi samo o ulaznoj temperaturi. U istraživanju denitrifikacije s vremenom zadržavanja vode od dva sata u oba reaktora pokazana je brzi odziv površinske i volumne brzine uklanjanja NO_3-N na promjene ulazne koncentracije UAN i NO_2-N, te izlazne koncentracije NO_3-N. Površinska i volumna brzina uklanjanja NO_3-N u

reaktoru A ovise i o ulaznoj i izlaznoj temperaturi i koncentraciji O_2 te o ulaznoj koncentraciji NO_3-N i izlaznoj pH vrijednosti. Površinska i volumna brzina uklanjanja NO_3-N u reaktoru B ovise i o izlaznoj koncentraciji UAN. Učinkovitost uklanjanja NO_3-N u denitrifikacijskom reaktoru A brzo se mijenjaju ovisno o ulaznoj i izlaznoj koncentraciji NO_3-N, ulaznoj UAN i NO_2-N te o izlaznoj koncentraciji O_2 i pH vrijednosti. U istraživanju denitrifikacije s vremenom zadržavanja vode od tri sata u oba reaktora pokazana je ovisnost površinske i volumne brzine uklanjanja NO_3-N samo o izlaznoj temperaturi.

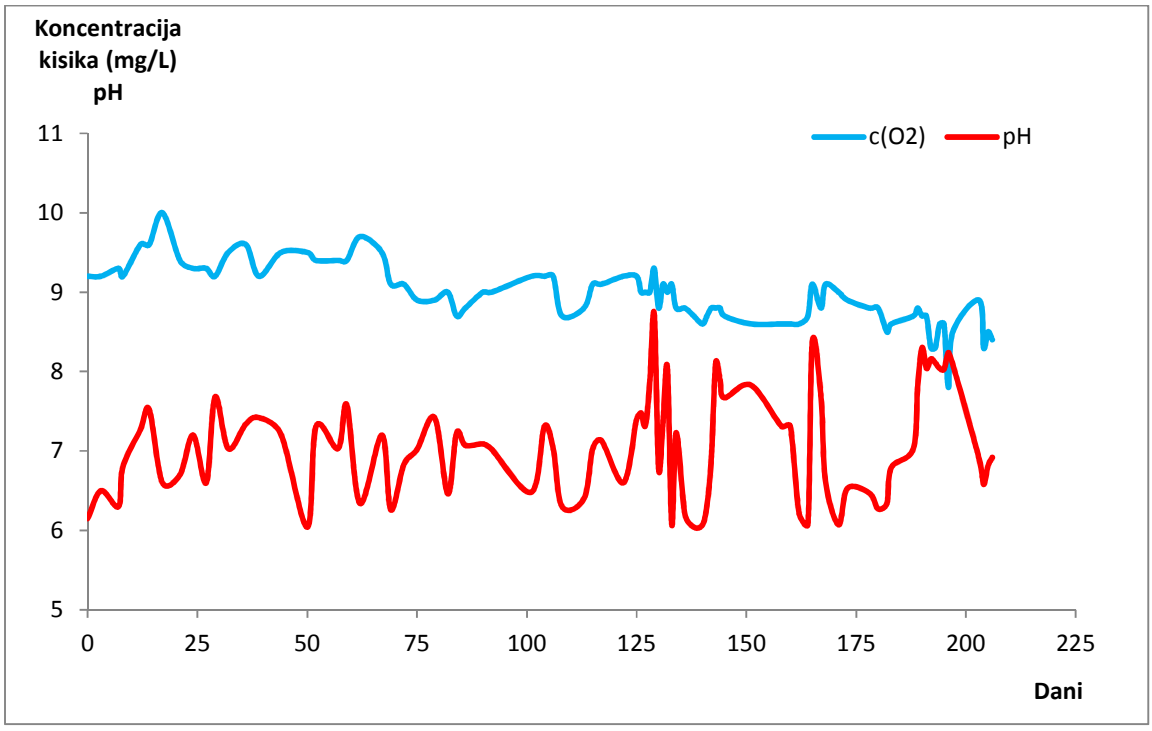
3.3. Istraživanje učinkovitosti nitrifikacije u stacionarnim uvjetima

Tijekom istraživanja nitrifikacije u stacionarnim uvjetima vrijednosti saliniteta su se kretale od 27,7 do 37,2, a temperature od 15,4 do 24,0 °C (slika 3.3.1.). Srednja vrijednost saliniteta nakon indukcije bila je 30,4 ± 1,7, a temperature 22,0 ± 1,0 °C.



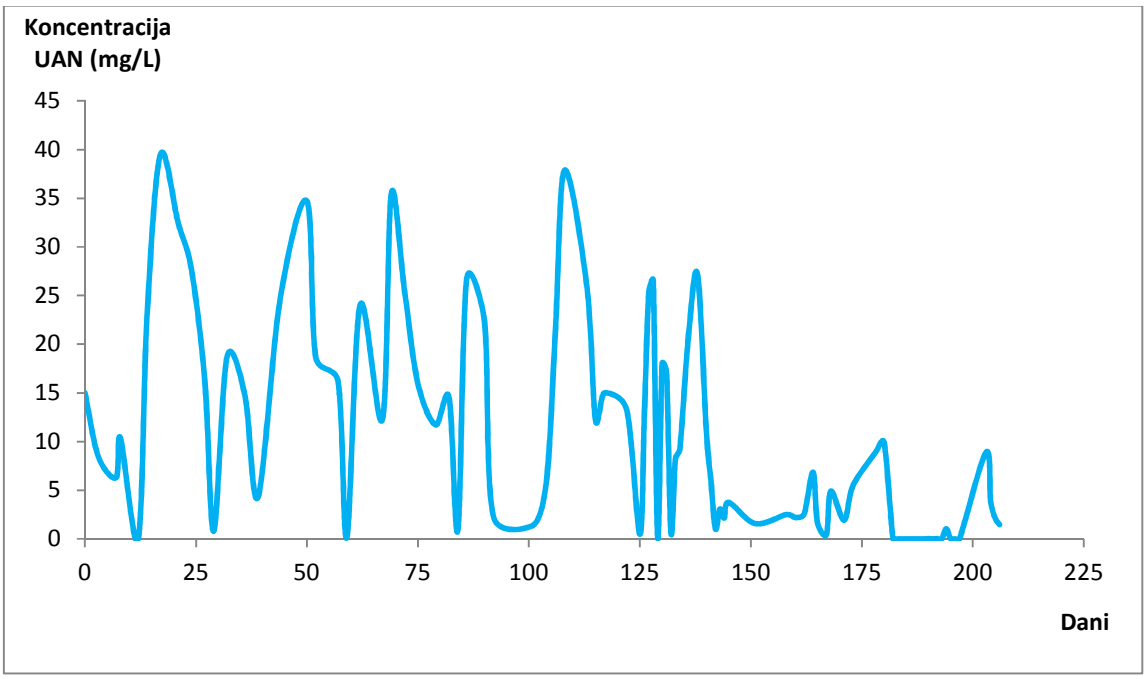
Slika 3.3.1. Vrijednosti saliniteta i temperature u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Tijekom istraživanja nitrifikacije u stacionarnim uvjetima koncentracija kisika se kretala od 7,8 mg/L do 10,0 mg/L, a pH vrijednost od 6,04 do 8,73 (slika 3.3.2.). Srednja vrijednost koncentracije kisika nakon indukcije bila je 8,6 ± 0,3 mg/L, a srednja pH vrijednost 7,2 ± 0,8.



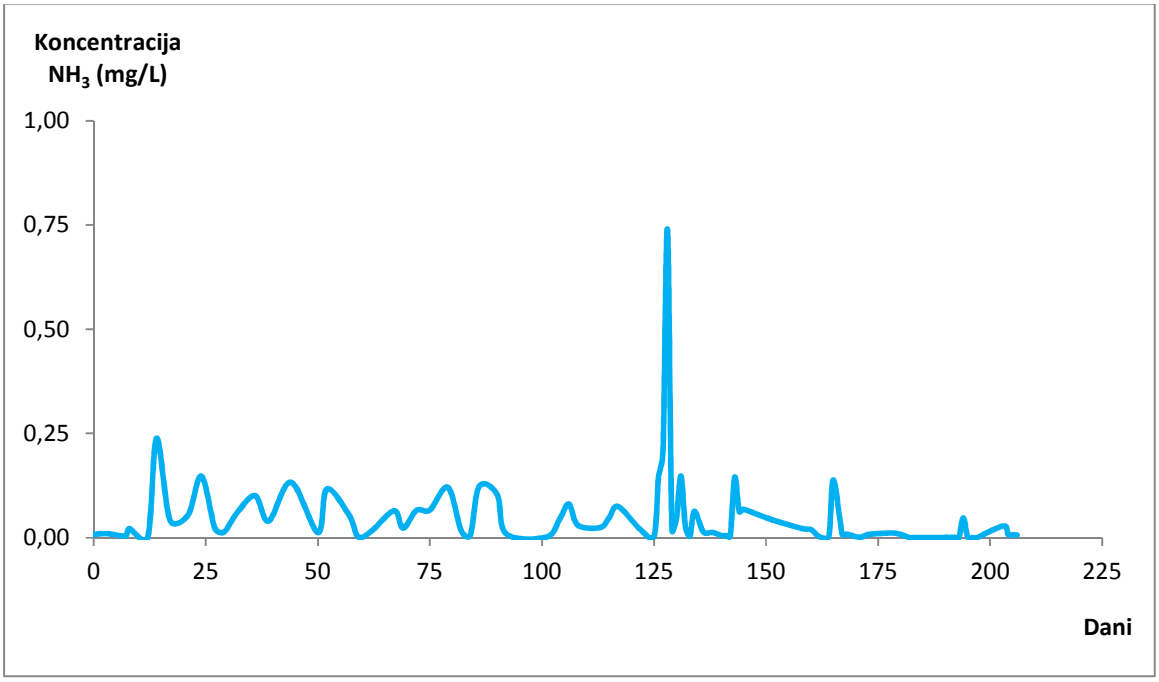
Slika 3.3.2. Koncentracija kisika (O_2) i pH vrijednost u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Tijekom istraživanja nitrifikacije u stacionarnim uvjetima izmjerena koncentracija ukupnoga amonijakalnog dušika kretala se od 0 do 39,493 mg/L (slika 3.3.3.). Srednja vrijednost koncentracije UAN nakon indukcije bila je 2,39 ± 3,15 mg/L.



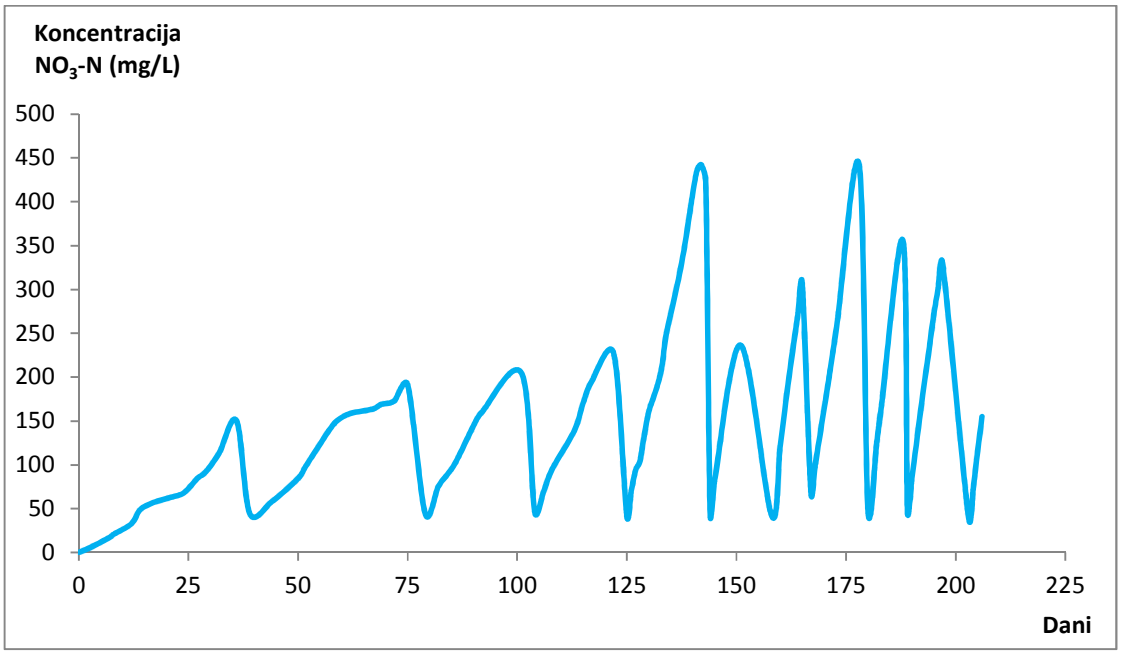
Slika 3.3.3. Koncentracija ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Koncentracija neioniziranog amonijaka u istraživanja nitrifikacije u stacionarnim uvjetima kretala se od 0 mg/L do najviše 0,74 mg/L (slika 3.3.4.). Srednja vrijednost koncentracije NH_3 nakon indukcije bila je 0,01 ± 0,03 mg/L.



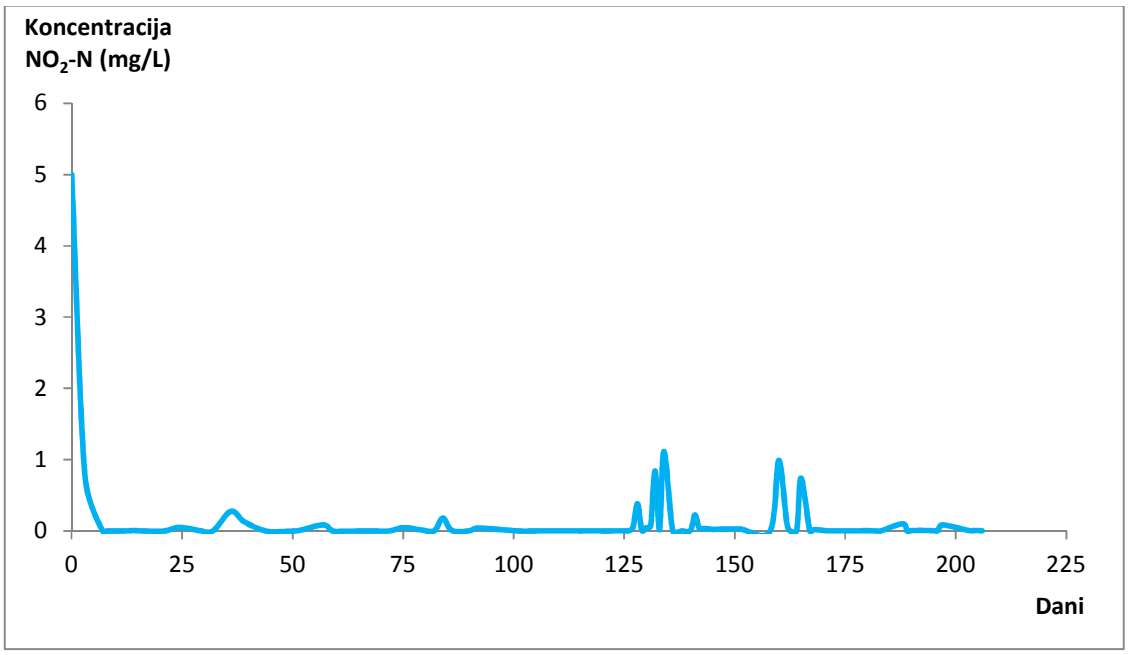
Slika 3.3.4. Koncentracija amonijaka (NH_3) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Koncentracija nitratnog dušika u istraživanju nitrifikacije u stacionarnim uvjetima varirala je od 0 do 441,36 mg/L (slika 3.3.5.). Srednja vrijednost koncentracije NO_3-N nakon indukcije bila je 184,47 ± 107,56 mg/L.



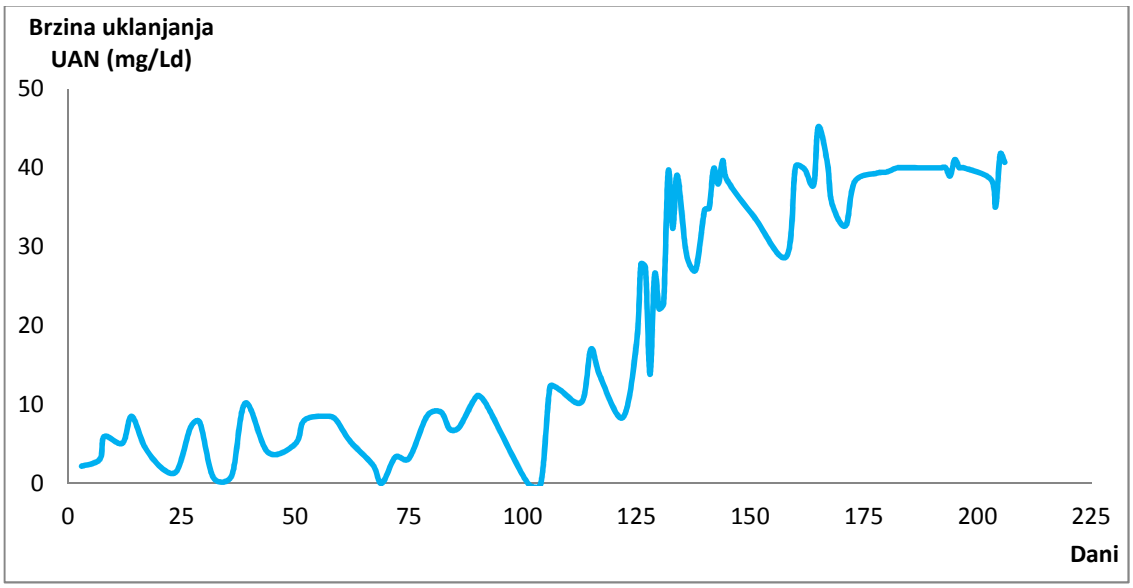
Slika 3.3.5. Koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Koncentracija nitritnog dušika u istraživanju nitrifikacije u stacionarnim uvjetima kretala se od početne vrijednosti od 5,00, preko 0 do 1,12 mg/L (slika. 3.3.6.). Srednja vrijednost koncentracije NO_2-N nakon indukcije bila je 0,08 ± 0,24 mg/L.



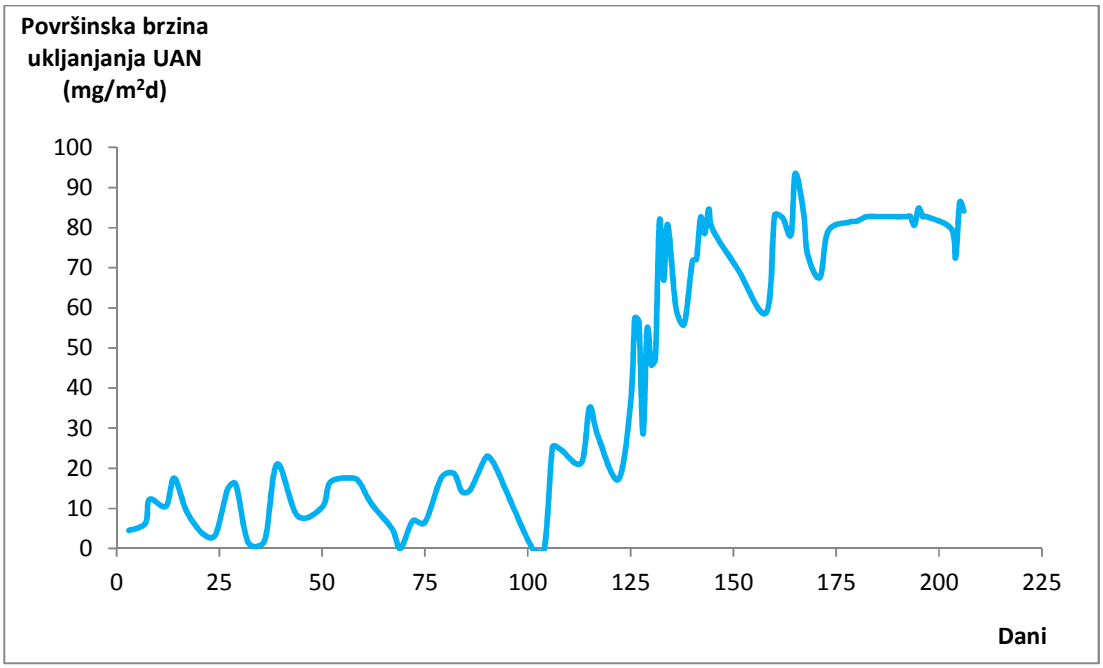
Slika 3.3.6. Koncentracija nitritnog dušika (NO_2-N) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika u istraživanju nitrifikacije u stacionarnim uvjetima varirala je od 0 do 45,19 mg/L (slika 3.3.7.). Srednja vrijednost brzine uklanjanja UAN nakon indukcije, postignute 160. dan bila je 39,41 ± 2,31 mg/L.



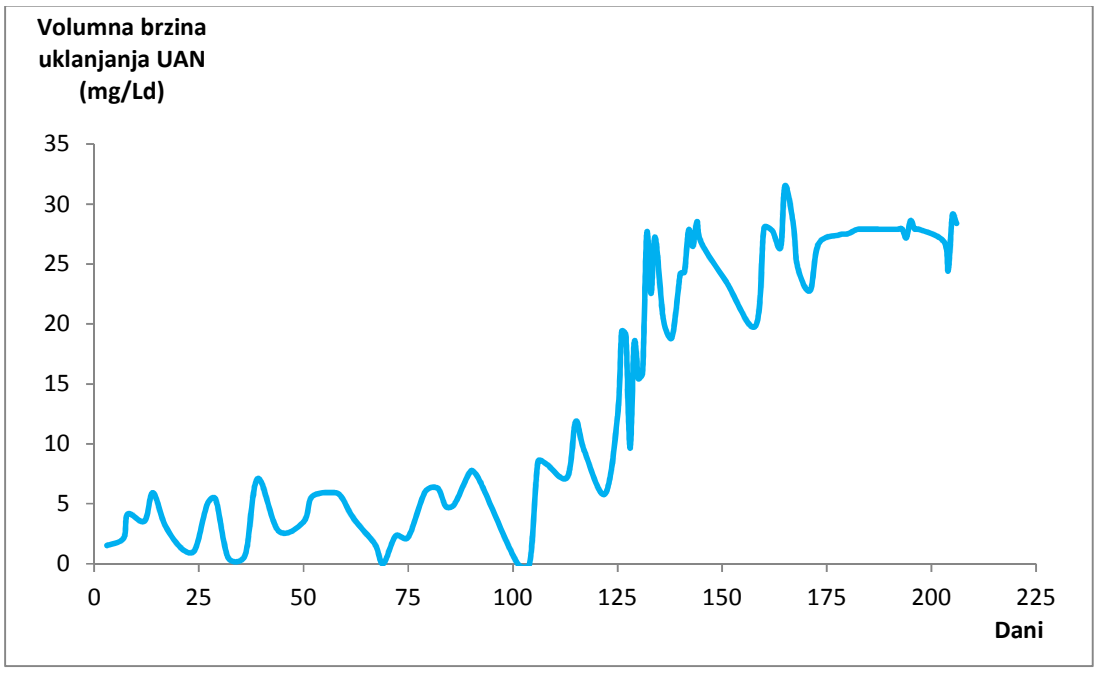
Slika 3.3.7. Brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Površinska brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika u istraživanju nitrifikacije u stacionarnim uvjetima kretala se od 0 do 93,50 mg/m^{2}d (slika 3.3.8.). Srednja vrijednost površinske brzine uklanjanja UAN nakon indukcije, postignute 160. dan bila je 81,55 ± 4,77 mg/L.



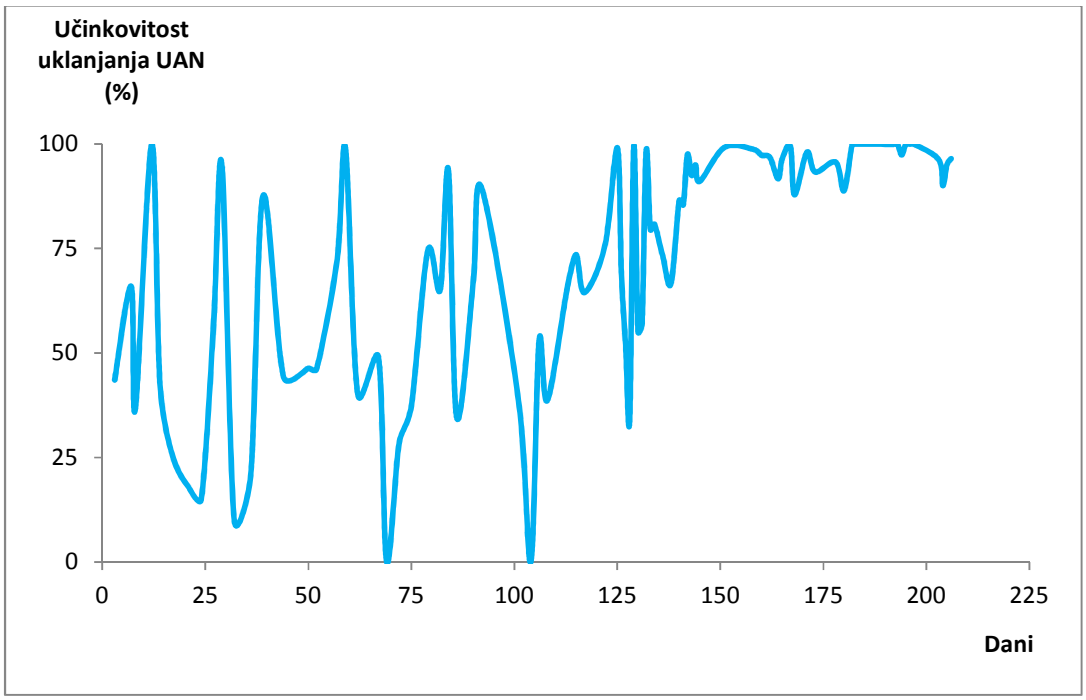
Slika 3.3.8. Površinska brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Volumna brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika u istraživanju nitrifikacije u stacionarnim uvjetima varirala je od 0 do 31,53 mg/mLd (slika 3.3.9.). Srednja vrijednost volumne brzine uklanjanja UAN nakon indukcije, postignute 160. dan bila je 27,50 ± 1,61 mg/L.



Slika 3.3.9. Volumna brzina uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

Učinkovitost uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika u istraživanju nitrifikacije u stacionarnim uvjetima varirala je od 0 do 100% (slika 3.3.10.). Srednja vrijednost volumne brzine uklanjanja UAN nakon indukcije, postignute 160. dan bila je 96,96 ± 3,75%.



Slika 3.3.10. Učinkovitost uklanjanja ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u nitrifikacijskom reaktoru u stacionarnim uvjetima.

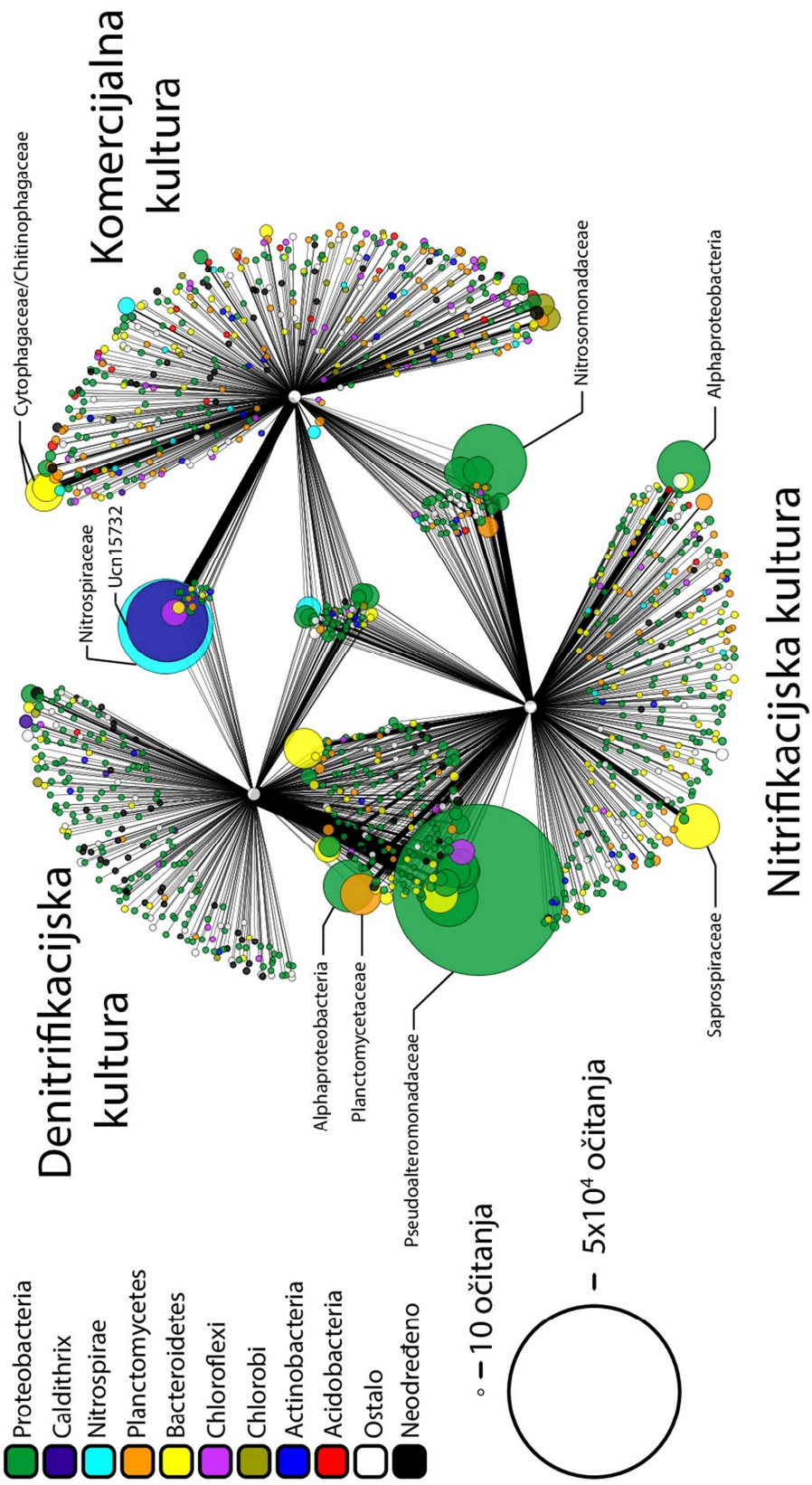
3.4. Rezultati filogenetičke analize mikrobnih zajednica u RAS-u

Rezultati dobiveni obradom sekvenci fragmenata gena za 16S rRNA iz uzoraka komercijalne, nitrifikacijske i denitrifikacijske kulture uz pomoć uređaja MiSeq System prikazani su u tablici 3.4.1. Vrstama je najbogatija populacija nitrifikacijskih bakterija iz rotirajućega biološkog kontaktora, a najsiromašnija populacija komercijalne kulture. Vrijednosti Chao indeksa u svim uzorcima jednake su broju pronađenih operativnih taksonomskih jedinica. Simpsonov indeks ujednačenosti najveći je u uzorku komercijalne kulture, a najmanji u uzorku iz denitrifikacijskih bioreaktora.

Tablica 3.4.1. Broj pronađenih operativnih taksonomskih jedinica (OTJ), Chao indeks i Simpsonov indeks ujednačenosti populacija bakterija

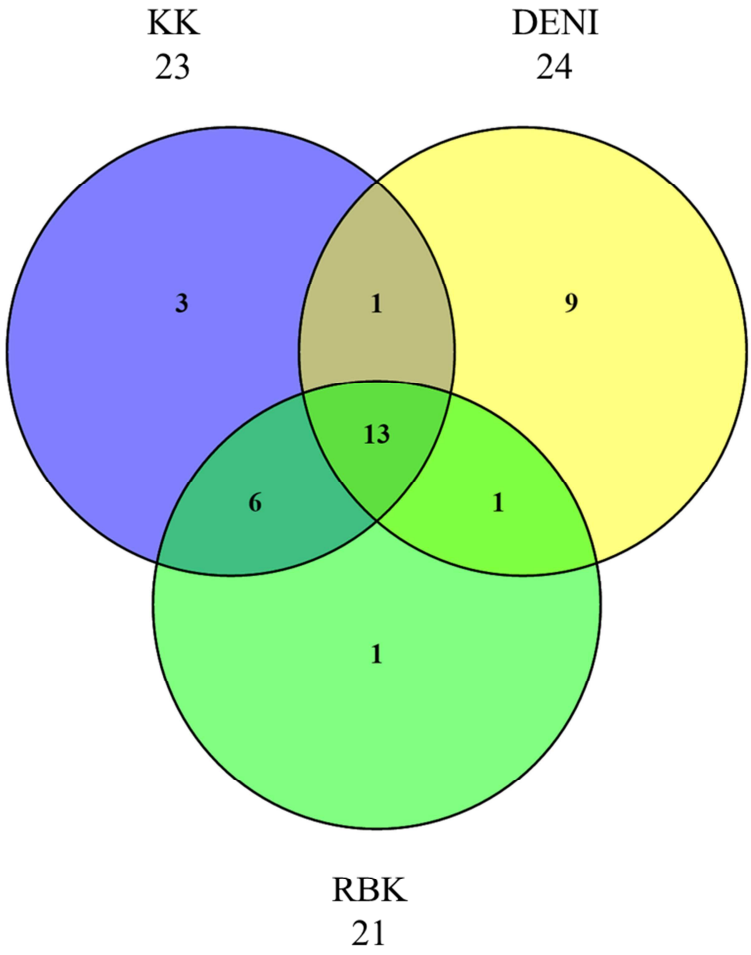
Uzorak	**broj OTJ**	**Chao indeks**	**Simpsonov indeks ujednačenosti**
Komercijalna kultura	467	467	0,048
Nitrifikacijska kultura	688	688	0,036
Denitrifikacijska kultura	533	533	0,021

Na slici 3.4.1. prikazane su sve pronađene operativne taksonomske jedinice – u komercijalnoj kulturi 467, u nitrifikacijskoj 688, a u denitrifikacijskoj 533. Zastupljenost tih jedinica bila je raznolika, od onih s vrlo malim brojem očitanja (10) do onih s vrlo velikim ($5 \cdot 10^4$). Uz to, neke su jedinice bile samo u jednome, neke u dva, a neke u sva tri uzorka. Usporedbom slijeda para baza svake OTJ s bazom podataka sekvenci fragmenata gena za 16S rRNA poznatih organizama (Greengenes 13_8) određen je njezin najbliži srodnik u bazi, a zatim su ti podaci grupirani u odgovarajuće taksonomske kategorije.



Slika 3.4.1. Operativne taksonomske jedinice u uzorcima komercijalne, nitrifikacijske i denitrifikacijske populacije bakterija

Mikroorganizmi pronađeni u obrađenim uzorcima podijeljeni su u ukupno 34 koljena; od toga u uzorku komercijalne kulture 23, u uzorku nitrifikacijskih bakterija 21, a u uzorku denitrifikacijskih 24 (slika 3.4.2.). 13 koljena pojavljuje se u svim uzorcima, dok je po jedan zajednički komercijalnoj i denitrifikacijskoj kulturi, te denitrifikacijskom i nitrifikacijskom uzorku. Komercijalne i nitrifikacijske bakterije dijele šest istih koljena. Komercijalnoj su kulturi jedinstvena tri koljena, nitrifikacijskoj jedan, a denitrifikacijskoj devet.



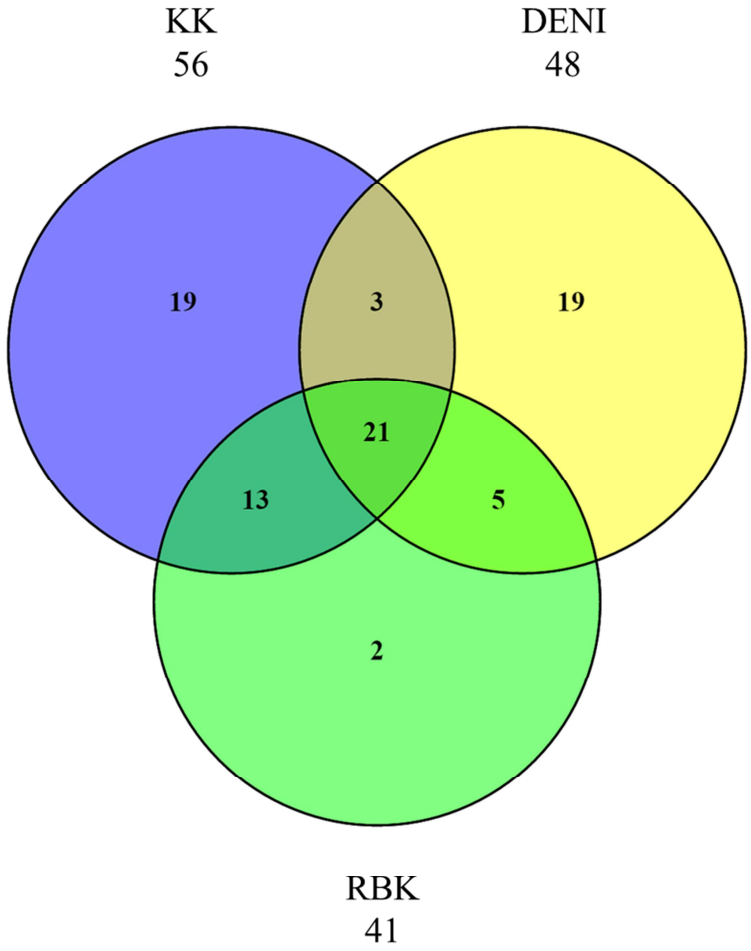
Slika 3.4.2. Vennov dijagram broja operativnih taksonomskih jedinica određenih do taksonomske kategorije koljena: KK – uzorak komercijalne kulture, DENI – uzorak iz denitrifikacijskih bioreaktora, RBK – uzorak iz rotacijskog biološkog kontaktora.

Udjeli pojedinih koljena bakterija pronađenih u uzorcima iz komercijalne kulture, rotacijskoga biološkog kontaktora, to jest nitrifikacijskih bakterija i denitrifikacijskih bioreaktora, prikazani su u tablici 3.4.2. Na razini koljena u uzorku komercijalne kulture bakterija s 20,81% najzastupljenije su bakterije iz koljena Proteobacteria, dok taj postotak raste u uzorku iz rotacijskoga biološkog kontaktora s 57,57%, do čak 78,09% u uzorku iz denitrifikacijskih reaktora. Druga najzastupljenija skupina u komercijalnoj kulturi je koljeno Nitrospirae, sa 17,94%; ono se u denitrfikacijskom uzorku uopće ne pojavljuje, dok je među nitrifikacijskim bakterijama zastupljeno s 3,10%. Predstavnika koljena Bacteroidetes ima u znatnim udjelima u svim uzorcima: u komercijalnoj kulturi 13,84%, u nitrifikacijskoj 21,17%, a u denitrifikacijskom uzorku 9,06%. Bakterije iz koljena Planctomycetes s udjelima od 10,07% i 11,78% bitne su skupine u uzorcima komercijalnih bakterija i onih iz rotacijskoga biološkog kontaktora, dok su među denitrifikacijskim bakterijama zastupljene sa samo 0,60%. Predstavnika koljena Chlorobi i Chloroflexi u ima u komercijalnoj kulturi 8,30 i 6,31%, dok se njihov udio smanjuje na 1,26 i 3,38% u denitrifikacijskome te na 0,13 i 0,37% u nitrifikacijskome uzorku. Bakterije iz koljena Acidobacteria su u komercijalnoj kulturi prisutne sa 2,93%, dok su u uzorcima iz RAS-a gotovo zanemarive, u nitrifikacijskom reaktoru ih je 0,19%, a u denitrifikacijskim 0,02%. Bakterije iz koljena [Caldithrix] su u uzorku komercijalne kulture zastupljene s 11,78%, dok se u drugim uzorcima uopće ne pojavljuju. Koljena [Thermi] ima samo u uzorku iz rotacijskoga biološkog kontaktora (0,18%). U svim uzorcima je i dio neodređenih sekvenci, i to među komercijalnim bakterijama 3,47%, među denitrifikacijskima 3,93% i među nitrifikacijskim 0,52%. U denitrifikacijskom uzorku pojavljuje se i koljeno Parvarchaeota iz kraljevstva Archaea s 0,01%.

Tablica 3.4.2. Udio pojedinih koljena mikroorganizama pronađenih u uzorcima iz komercijalne kulture (KK), rotacijskoga biološkog kontaktora (RBK) i denitrifikacijskih bioreaktora (DENI)

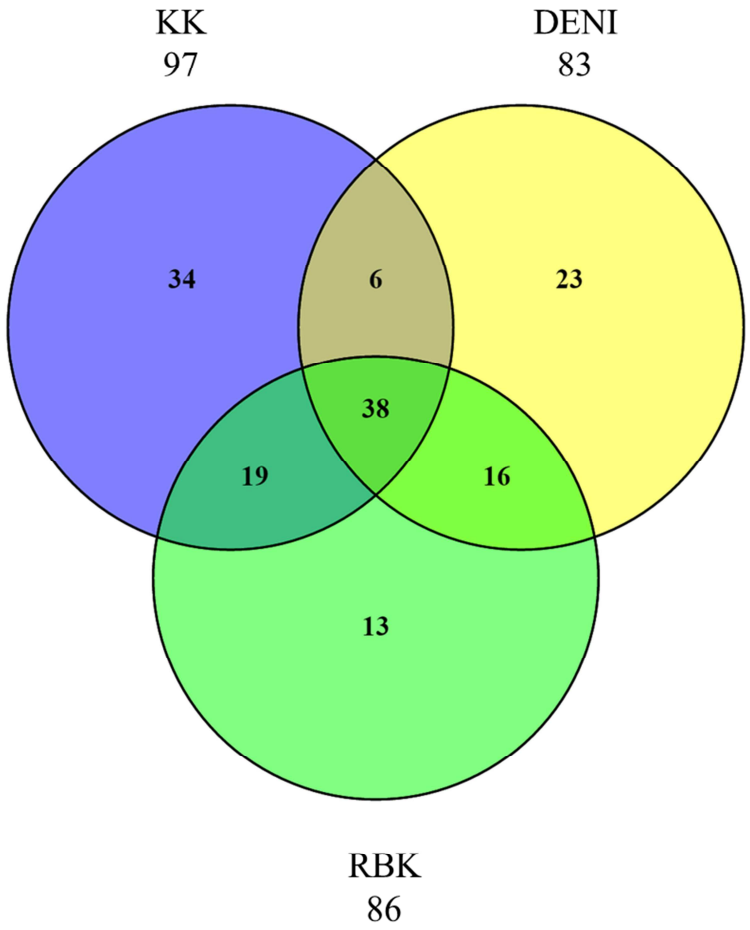
Koljeno	**Udio u uzorku (%)**		
	KK	**RBK**	**DENI**
Proteobacteria	20,81	57,57	78,09
Nitrospirae	17,94	3,10	
Bacteroidetes	13,84	21,17	9,06
[Caldithrix]	11,78		
Planctomycetes	10,07	11,78	0,60
Chlorobi	8,30	0,13	1,26
Chloroflexi	6,31	0,37	3,38
Neodređeno	3,47	0,52	3,93
Acidobacteria	2,93	0,19	0,02
Chlamydiae	1,17	1,83	
Verrucomicrobia	0,55	0,39	0,13
OP3	0,46		0,04
Actinobacteria	0,43	0,48	0,10
OD1	0,36	0,08	1,01
Gemmatimonadetes	0,31	1,52	0,03
SBR1093	0,31	0,46	
TM6	0,28	0,07	
TM7	0,23	0,10	
GN02	0,17	0,03	0,42
Cyanobacteria	0,16	0,03	
WS3	0,08		
Firmicutes	0,03	0,01	0,16
Armatimonadetes	0,01		
BRC1			0,10
[Thermi]		0,18	
Caldithrix			1,12
Lentisphaerae			0,26
Spirochaetes			0,21
OP11			0,03
NKB19			0,03
WPS-2			0,03
FBP			0,01
[Parvarchaeota] Archaea			0,01

Na taksonomskoj kategoriji razreda u uzorcima ih je određeno ukupno 82; od toga u uzorku komercijalne kulture 56, u uzorku iz rotacijskoga biološkog kontaktora, to jest nitrifikacijske kulture 41, a u uzorku iz denitrifikacijskih reaktora 48 (slika 3.4.3.). Od toga se 21 razred pojavljuje u svim uzorcima, dok su tri zajednička komercijalnoj i denitrifikacijskoj kulturi, pet denitrifikacijskom i nitrifikacijskom uzorku, a 13 komercijalnoj i nitrifikacijskoj kulturi. U uzorcima komercijalne i denitrifikacijske kulture je po 19 jedinstvenih razreda, a u nitrifikacijskoj kulturi svega dva.



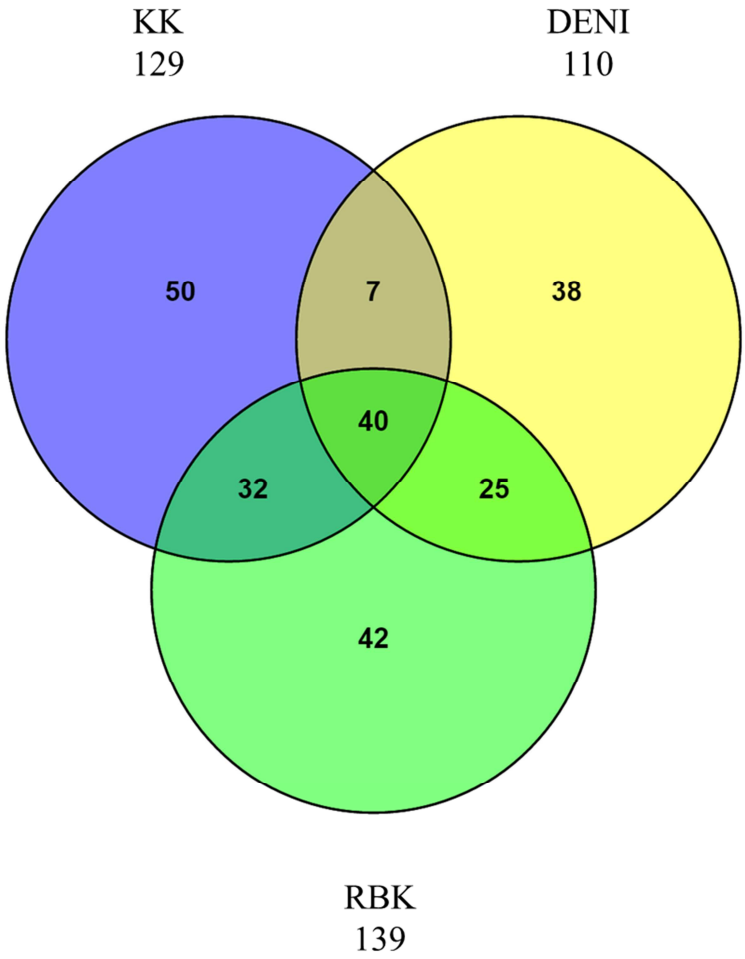
Slika 3.4.3. Vennov dijagram broja operativnih taksonomskih jedinica određenih do taksonomske kategorije razreda: KK – uzorak komercijalne kulture, DENI – uzorak iz denitrifikacijskih bioreaktora, RBK – uzorak iz rotacijskoga biološkog kontaktora.

U uzorcima je određeno ukupno 149 taksonomskih redova; i to u uzorku komercijalne kulture 97, u uzorku nitrifikacijskih bakterija iz rotacijskoga biološkog kontaktora 86, a u uzorku denitrifikacijske kulture 83 (slika 3.4.4.). Od toga se 38 redova pojavljuje u svim uzorcima, dok je šest zajedničkih komercijalnoj i denitrifikacijskoj kulturi te 16 denitrifikacijskom i nitrifikacijskom uzorku. Komercijalna i nitrifikacijska kultura dijele 19 istih redova. Komercijalnoj kulturi jedinstvena su 34 reda, nitrifikacijskoj 13, a denitrifikacijskoj njih 23.



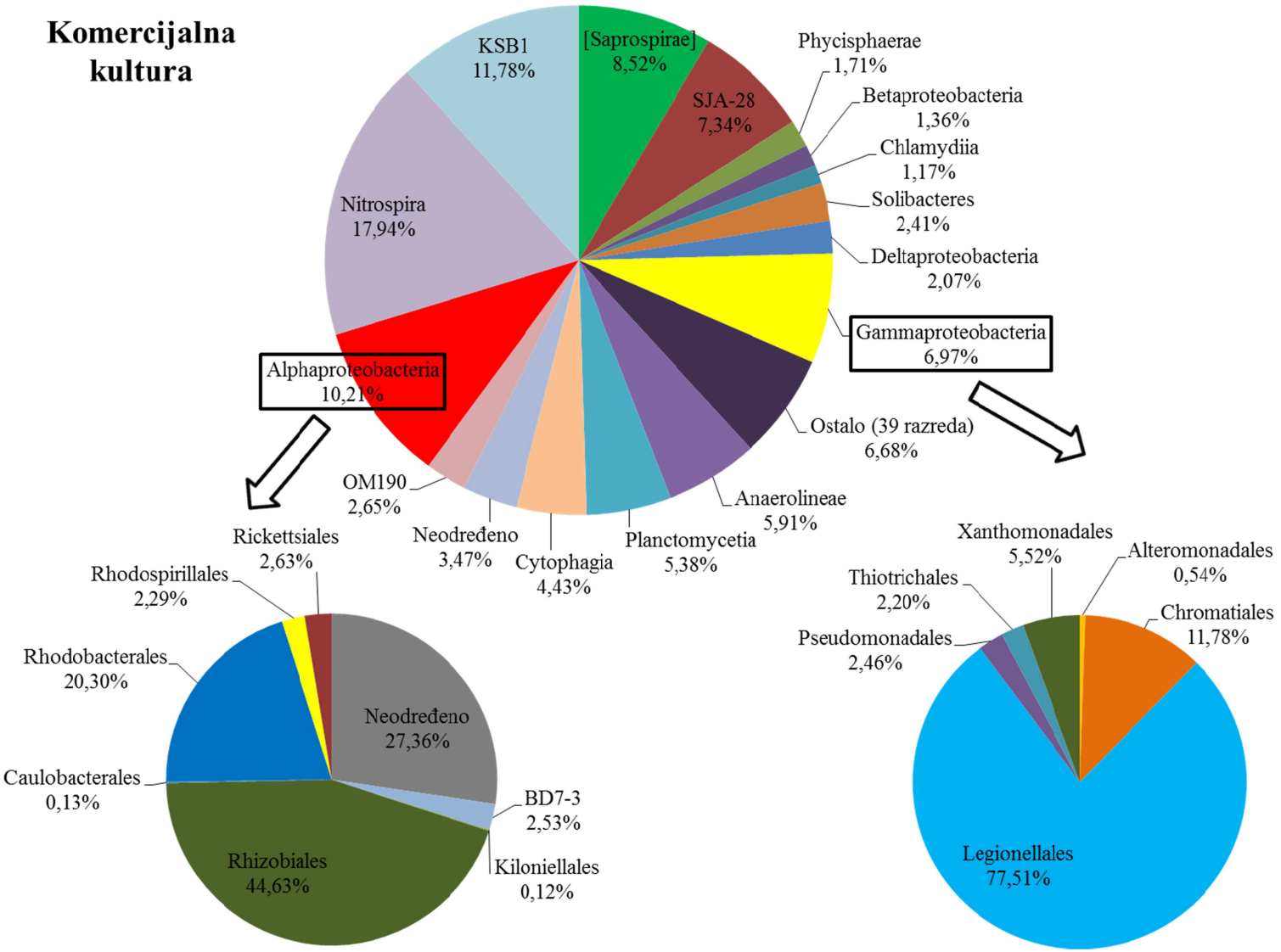
Slika 3.4.4. Vennov dijagram broja operativnih taksonomskih jedinica određenih do taksonomske kategorije reda: KK – uzorak komercijalne kulture, DENI – uzorak iz denitrifikacijskih bioreaktora, RBK – uzorak iz rotacijskoga biološkog kontaktora.

Na taksonomskoj kategoriji porodica u uzorcima je određeno ukupno 234; od toga u uzorku komercijalne populacije 129, u uzorku nitrifikacijskih bakterija 139, a u uzorku denitrifikacijske populacije 110 (slika 3.4.5.). Od toga se 40 porodica pojavljuje u svim uzorcima, dok je sedam zajedničkih komercijalnoj i denitrifikacijskoj kulturi, 25 denitrifikacijskom i nitrifikacijskom uzorku, a 32 komercijalnoj kulturi i nitrifikacijskom uzorku. Komercijalnoj kulturi jedinstveno je 50 porodica, nitrifikacijskoj 42, a denitrifikacijskoj 38.



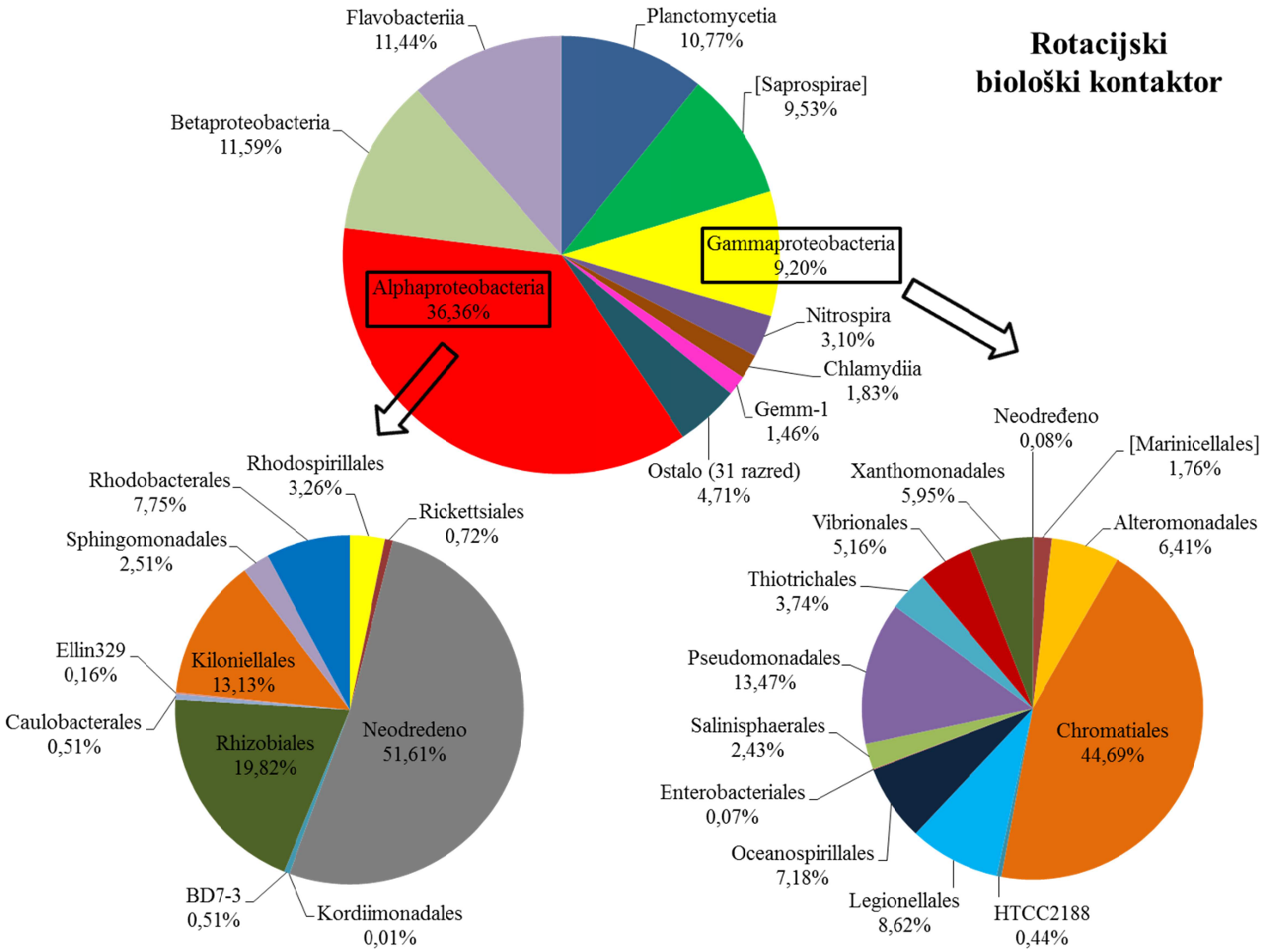
Slika 3.4.5. Vennov dijagram broja operativnih taksonomskih jedinica određenih do taksonomske kategorije porodice: KK – uzorak komercijalne kulture, DENI – uzorak iz denitrifikacijskih bioreaktora, RBK – uzorak iz rotacijskog biološkog kontaktora.

U uzorku komercijalne populacije najzastupljeniji su razredi: Nitrospira (17,94%), KSB1 (11,78%), Alphaproteobacteria (10,21%), [Saprospirae] (8,52%), SJA-28 (7,34%), Gammaproteobacteria (6,97%), Anaerolineae (5,91%), Planctomycetia (5,38%), Cytophagia (4,43%), OM190 (2,65%), Solibacteres (2,41%), Deltaproteobacteria (2,07%), Phycisphaerae (1,71%), Betaproteobacteria (1,36%) i Chlamydiia (1,17 %). Neodređeno je 3,47% populacije komercijalne kulture, a na ostalih 39 razreda koji su pojedinačno zastupljeni s < 1% otpada 6,68% populacije. Tih 39 razreda su: 4C0d-2, Acidimicrobiia, Acidobacteria-6, Actinobacteria, Bacilli, Bacteroidia, BD7-11, [Chloracidobacteria], Chloroplast, Clostridia, Epsilonproteobacteria, [Fimbriimonadia], Flavobacteriia, Gemm-1, Gemm-2, Gemmatimonadetes, GKS2-174, MJK10, OPB56, Opitutae, PBS-25, [Pedosphaerae], PRR-12, RB25, SAR202, SC3, SJA-4, Sphingobacteriia, Sva0725, TA18, Thermoleophilia, Thermomicrobia, TK10, TK17, TM7-1, TM7-3, Verrucomicrobiae, VHS-B5-50 te dva neodređena. U razredu Alphaproteobacteria najbrojnije su bakterije iz redova: Rhizobiales (44,63%), Rhodobacterales (20,30%), Rickettsiales (2,63%), BD7-3 (2,53%), Rhodospirillales (2,29%). Slijede predstavnici rodova Caulobacterales (0,13%) i Kiloniellales (0,12%), dok je neodređeno 27,36% Alphaproteobacteria. U uzorku komercijalne populacije u razredu Gammaproteobacteria najbrojnije su bakterije iz redova: Legionellales (77,51%), Chromatiales (11,78%), Xanthomonadales (5,52%), Pseudomonadales (2,46%), Thiotrichales (2,20%) i Alteromonadales (0,54%) (slika 3.4.6.).



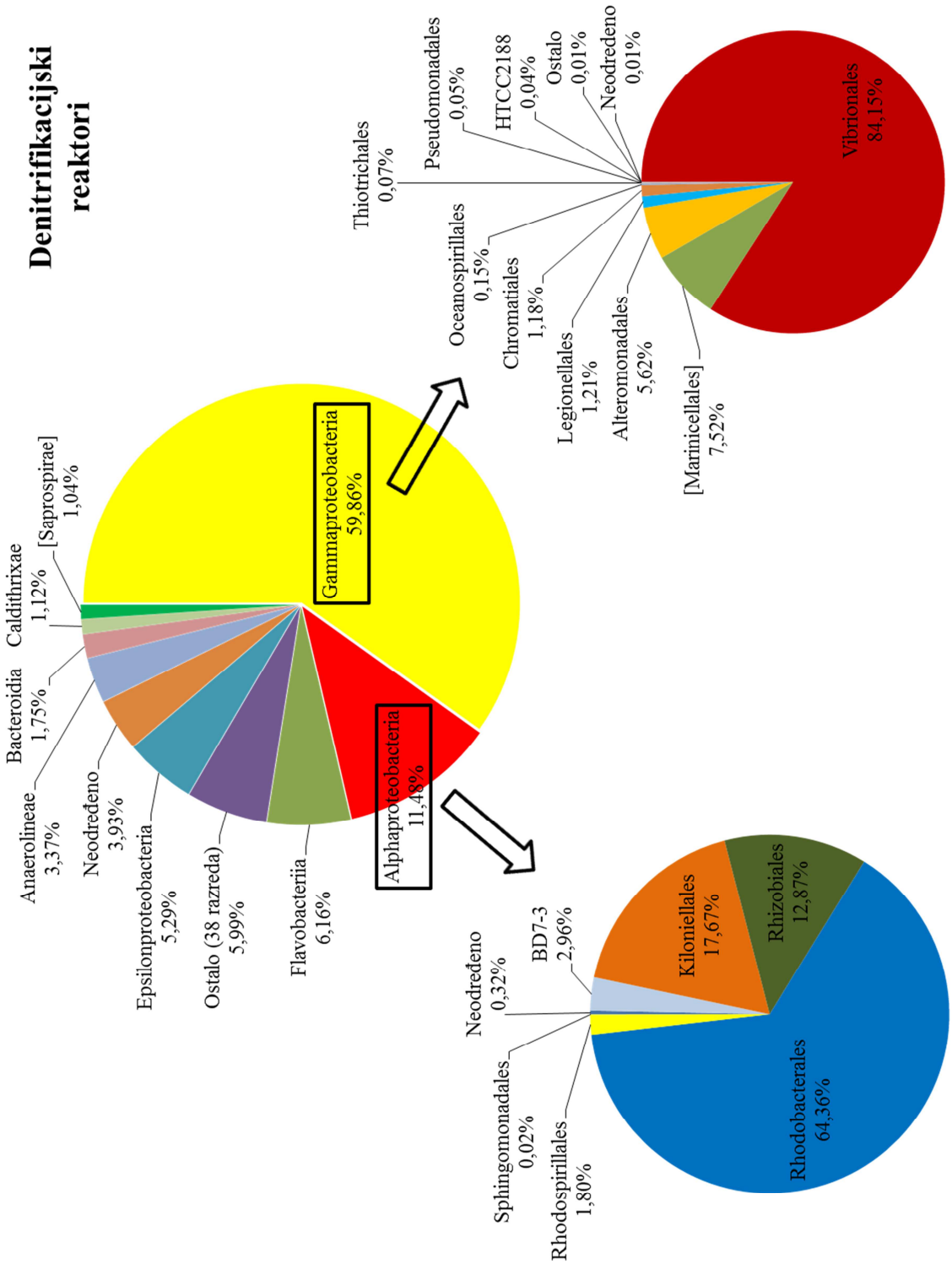
Slika 3.4.6. Najvažniji predstavnici populacije komercijalnih bakterija.

U uzorku nitrifikacijske populacije iz rotacijskoga biološkog kontaktora najbrojnije su bakterije iz razreda: Alphaproteobacteria (36,36%), Betaproteobacteria (11,59%), Flavobacteriia (11,44%), Planctomycetia (10,77%), [Saprospirae] (9,53%), Gammaproteobacteria (9,20%), Nitrospira (3,10%), Chlamydiia (1,83%) i Gemm-1 (1,46%). Na ostali 31 razred, koji je pojedinačno zastupljen s < 1% otpada 4,71% nitrifikacijske populacije. Ti razredi su: 3BR-5F, 4C0d-2, Acidimicrobiia, Actinobacteria, Anaerolineae, Bacilli, Chloroplast, Cytophagia, Dehalococcoidetes, Deinococci, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Gemm-2, Ignavibacteria, NPL-UPA2, OM190, OPB56, Opitutae, Phycisphaerae, [Rhodothermi], SAR202, SJA-4, Solibacteres, Sphingobacteriia, Thermoleophilia, TK17, TM7-3, Verrucomicrobiae, VHS-B5-50, ZB2 te jedan neodređeni, a ima i onih koji ubrajamo u grupu ostalih. U razredu Alphaproteobacteria najbrojnije su one neodređene (51,61%), zatim bakterije iz redova Rhizobiales: (19,82%), Kiloniellales (13,13%), Rhodobacterales (7,75%), Rhodospirillales (3,26%) i Sphingomonadales (2,51%). Predstavnici rodova zastupljeni s manje od 1% su: Rickettsiales (0,72%), BD7-3 (0,51%), Caulobacterales (0,51%), Ellin329 (0,51%) i Kordiimonadales (0,01%). U uzorku nitrifikacijske populacije u razredu Gammaproteobacteria najbrojnije su bakterije iz redova: Chromatiales (44,69%), Pseudomonadales (13,47%), Legionellales (8,62%), Oceanospirillales (7,18%), Alteromonadales (6,41%). Xanthomonadales (5,95%), Vibrionales (5,16%). Zatim slijede rodovi Thiotrichales (3,74%), Salinisphaerales (2,43%), [Marinicellales] (1,76%), HTCC2188 (0,44%) i Enterobacteriales (0,07%), a neodređeno je 0,08% Gammaproteobacteria (slika 3.4.7.).



Slika 3.4.7. Najvažniji predstavnici populacije nitrifikacijskih bakterija.

U uzorku denitrifikacijske populacije najzastupljeniji su razredi: Gammaproteobacteria (59,86%), Alphaproteobacteria (11,48%), Flavobacteriia (6,16%), Epsilonproteobacteria (5,29%), Anaerolineae (3,37%), Bacteroidia (1,75%), Caldithrixae (1,12%), [Saprospirae] (1,04%). Neodređeno je 3,93%. bakterija iz denitrifikacijskih bioreaktora, a na ostalih 38 razreda koji su pojedinačno zastupljeni s < 1% otpada 5,99% populacije. Tih 38 razreda su: 3BR-5F, ABY1, Acidimicrobiia, Actinobacteria, BB34, BD1-5, Betaproteobacteria, Clostridia, Cytophagia, Deltaproteobacteria, Gemm-2, Holophagae, Ignavibacteria, koll11, [Lentisphaeria], [Leptospirae], NPL-UPA2, OM190, OP11-2, OP11-3, OPB56, Opitutae, Phycisphaerae, Planctomycetia, [Rhodothermi], PRR-11, Solibacteres, Sphingobacteriia, Spirochaetes, TA18, TK17, TSBW08, Verruco-5, WCHB1-64, ZB2 te tri neodređena razreda. U razredu Alphaproteobacteria najzastupljeniji su redovi Rhodobacterales (64,38%), Kiloniellales (17,68%), Rhizobiales (12,87%), BD7-3 (2,96%), Rhodospirillales (1,80%) i Sphingomonadales (0,02%) dok je neodređeno 0,32% Alphaproteobacteria. U razredu Gammaproteobacteria najbrojniji su redovi Vibrionales: (84,15%), [Marinicellales] (7,52%), Alteromonadales (5,62%), Legionellales (1,21%), Chromatiales (1,18%), Oceanospirillales (0,15%), Thiotrichales (0,07%), Pseudomonadales (0,05%) te HTCC2188 (0,04%). Neodređeno je 0,01%, jednako kao i ostalih Gammaproteobacteria (slika 3.4.8.).



Slika 3.4.8. Najvažniji predstavnici populacije denitrifikacijskih bakterija.

Udjeli najvažnijih bakterijskih vrsta pronađenih u uzorcima komercijalne kulture, nitrifikacijskog i denitrifikacijskih reaktora prikazani su tablicom 3.4.3.

Tablica 3.4.3. Udjeli najvažnijih bakterijskih vrsta pronađenih u uzorcima komercijalne kulture (KK), nitrifikacijskog reaktora (RBK) i denitrifikacijskih reaktora (DENI).

KOLJENO RAZRED RED	**PORODICA**	**ROD**	**Udio u uzorku (%)**		
			KK	**RBK**	**DENI**
Acidobacteria					
Solibacteres Solibacterales	Solibacteraceae	*Candidatus Solibacter*	1,52		
Bacteroidetes					
Bacteroidia					
Bacteroidales			0,29		1,05
Cytophagia					
Cytophagales	Cytophagaceae		4,43	0,01	
Flavobacteriia					
Flavobacteriales				0,22	4,76
	Flavobacteriaceae			10,34	0,63
[Saprospirae]					
[Saprospirales]	Chitinophagaceae		5,52	0,33	
	Saprospiraceae		3,00	9,12	0,91
Chlamydiae					
Chlamydiia					
Chlamydiales			1,04	0,01	
Caldithrix					
Caldithrixae					
Caldithrixales	BA059				1,11
Chlorobi					
SJA-28			7,34		
Chloroflexi					
Anaerolineae					
Caldilineales	Caldilineaceae		4,66	0,04	3,08
Gemmatimonadetes					
Gemm-1			0,20	1,46	
Nitrospirae					
Nitrospira					
Nitrospirales	Nitrospiraceae		0,29	3,10	
	Nitrospiraceae	*Nitrospira*	17,66		
Planctomycetes					
OM190					
CL500-15			2,64	0,02	
Planctomycetia					
B97			1,35	0,04	
Pirellulales	Pirellulaceae		2,04	2,29	0,03
Planctomycetales	Planctomycetaceae	*Planctomyces*	1,70	8,25	0,03

Tablica 3.4.3. Nastavak

Proteobacteria					
Alphaproteobacteria			2,79	18,77	0,04
Kiloniellales			0,01	4,71	
	Kiloniellaceae	*Thalassospira*			2,03
Rhizobiales			2,82	0,54	0,02
	Hyphomicrobiaceae		0,20	0,24	1,23
	Phyllobacteriaceae	ostalo	0,02	2,75	
	Phyllobacteriaceae		0,04	1,98	0,02
Rhodobacterales					
	Hyphomonadaceae		2,03	0,06	
	Hyphomonadaceae	*Hyphomonas*		1,60	
	Rhodobacteraceae		0,05	0,65	7,15
Betaproteobacteria					
Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae		0,51	11,37	
Epsilonproteobacteria					
Campylobacterales	Campylobacteraceae	*Arcobacter*		0,02	5,28
Gammaproteobacteria					
Alteromonadales	Colwelliaceae				3,12
Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	*Halorhodospira*	0,22	3,80	
Legionellales			4,30	0,64	0,72
Pseudomonadales	Moraxellaceae	*Acinetobacter*	0,16	1,24	0,03
Vibrionales	Pseudoalteromonadaceae	ostalo		0,30	26,35
Vibrionales	Pseudoalteromonadaceae			0,05	7,16
Vibrionales	Vibrionaceae	*Vibrio*		0,13	16,83
[Marinicellales]	[Marinicellaceae]	*Marinicella*		0,14	4,50
[Caldithrix]					
KSB1					
Ucn15732			11,78		

4. RASPRAVA

4.1. Učinkovitost denitrifikacije u morskom RAS-u

Denitrifikacija se u morskom recirkulacijskom akvakulturnom sustavu odvijala u dva reaktora čiji je zajednički volumen zauzimao ≈ 6% od volumena cijelog RAS-a. Nakon dodavanja komercijalne kulture bakterija u reaktore, nosača za naseljavanje tih bakterija te supstrata za njihov rast – natrijeva nitrata i sladovine, započelo je istraživanje denitrifikacije u stacionarnim uvjetima. Koncentracija kisika je odmah počela opadati, jednako kao i koncentracija NO_3-N, dok je pH vrijednost počela rasti. Potrošnja kisika upućuje na aktivnost aerobnih bakterija u komercijalnoj mješavini bakterija za pročišćavanje vode u akvakulturi, dok potrošnja nitrata i povećanje pH vrijednosti ukazuju na aktivnost denitrifikacijskih bakterija (Rust i sur., 2002). S razvojem populacije denitrifikacijskih bakterija i povećanjem denitrifikacijske aktivnosti postupno je rasla brzina uklanjanja NO_3-N, a ciljana brzina uklanjanja od 40 mg(NO_3-N)/Ld postignuta je u oba reaktora 287. dan. Idućih 40-ak dana brzina uklanjanja bila je stabilna na postignutoj vrijednosti; površinska brzina uklanjanja NO_3-N tada je iznosila 121 mg/m^2d, a volumna brzina uklanjanja 485 mg/Ld. Ovdje je bitno napomenuti kako su površinska i volumna brzina uklanjanja NO_3-N izražene prema površini, i volumenu pergolara u reaktorima, dok se za izračun brzine uklanjanja upotrebljava volumen denitrifikacijskog reaktora. Iako je učinkovitost uklanjanja NO_3-N tijekom eksperimenta u oba reaktora više puta iznosila 100%, tek je nakon 287 dana ona bila konstantna na toj vrijednosti. Prethodno dosegnuta 100%-tna učinkovitost ostvarena je pri dodatku manje količine NO_3-N u denitrifikacijske reaktore, to jest u vezi je s nižom vrijednošću brzine uklanjanja NO_3-N. Indukcija denitrifikacijskih bioreaktora, to jest razvoj stabilne bakterijske populacije sposobne za provođenje denitrifikacije u morskoj vodi ovako opterećenog sustava trajala je više od devet mjeseci. Dugo vrijeme indukcije koje je bilo potrebno za razvoj stabilne denitrifikacijske populacije nije neočekivano uzmu li se u obzir udjeli najvažnijih bakterijskih vrsta pronađenih u uzorcima komercijalne kulture i denitrifikacijskih reaktora. Oko 40% mikrobne populacije u tim reaktorima zauzimaju bakterije sposobne provoditi heterotrofnu denitrifikaciju, kao što su pripadnici porodica Pseudoalteromonadaceae i Vibrionaceae, kojih nije bilo u komercijalnoj kulturi.

Nakon faze indukcije u oba su denitrifikacijska bioreaktora koncentracije NO_3-N bile najviše oko 5 mg/L, a iako je u reaktorima izmjerena koncentracija UAN od oko 6 mg/L, koncentracija NH_3 nikad nije bila veća od 0,75 mg/L. Uz to, nakon indukcijske faze, u reaktoru A je 305. dan izmjerena koncentracija NO_2-N od 2 mg/L, dok su u reaktoru B tri tjedna mjerene povećane koncentracije NO_2-N s maksimalnom vrijednošću nešto većom od 3 mg/L. Nakupljanje nitrita uočeno je i u drugim istraživanjima denitrifikacije, kako u laboratorijskim (Park i sur., 2001, Morrison i sur., 2008) tako i u komercijalnim uzgojnim sustavima (Grguric i sur., 2000). Prema Grguricu i sur. (2000) nakupljanje nitrata je pokazatelj da je od dvije redukcijske reakcije redukcija nitrita u plinoviti dušik ona koja je sporija i tako je korak koji ograničava denitrifikaciju, a Park i sur. (2001) su uočeno nakupljanje nitrita pripisali nepotpunoj redukciji nitrata uzrokovanoj promjenama saliniteta. Morrison i sur. (2008) su granule s biofilmom iz biofiltara dvaju morskih RAS-a inkubirali u epruvetama u anaerobnim uvjetima sa 150 mg NO_3-N/L i osam puta većom količinom izvora ugljika, i to škrobom kukuruza, pšenice i riže, te topljivim škrobom, glukozom i kalijevim acetatom. Postigli su brzinu uklanjanja NO_3-N od 1,7 mg/Lh i zaključili su da su glukoza i netopljivi škrob idealni oblici izvora ugljika za stabilnu denitrifikaciju. Ta brzina uklanjanja NO_3-N gotovo je jednaka brzini postignutoj u ovom istraživanju, ali zbog znatno veće potrošnje izvora ugljika i nakupljanja NO_2-N u koncentracijama čak 20 puta većima od vrijednosti preporučenih za uzgoj lubina (Blancheton, 2000), nameće se zaključak kako je učinkovitost denitrifikacije u stacionarnim uvjetima u ovom istraživanju znatno uspješnija.

Brzine uklanjanja NO_3-N ostvarene pri istraživanju denitrifikacije u stacionarnim uvjetima upućuju na to da je stabilna denitrifikacijska populacija uspješno rasla u reaktorima na pergolaru kao nosaču bakterija te da je bila u stanju provoditi denitrifikaciju s pomoću sladovine kao izvora ugljika. Iako se za uzgoj dagnja upotrebljava na gotovo cijelom Mediteranu (Župan, 2012), dosad nije zabilježena upotreba pergolara kao nosača bakterija za biološku filtraciju u akvakulturnim sustavima. Procesi s fiksnim bakterijskim filmom imaju brojne prednosti u usporedbi sa suspendiranim procesima: omogućuju upotrebu malih reaktora, jednostavan rad i visoka pouzdanost čine ih isplativima, a akumulacija biomase i zadržavanje tvari u njoj povećane su zbog pričvršćivanja za fiksni nosač. Idealna podloga za takve sustave treba biti jeftina, izdržljiva, imati veliku površinu uz dostatnu poroznost (Manoj & Vasudevan 2012). U stacionarnom dijelu ovog istraživanja u oba je denitrifikacijska reaktora postignuta brzina uklanjanja od 485 mg(NO_3-N)/L(pergolara)d, što je oko četiri puta više nego u istraživanju denitrifikacije na supstratu na dnu tanka pri čemu je kao supstrat

korišten prirodno tlo (kontrola), pijesak, kamen plavac i vermikulit, a kao izvor ugljika metanol i melasa (KPK/N = 5/1) (Pungrasmi i sur. 2013), pa je denitrifikacija ne pergolaru znatno učinkovitiji proces. S obzirom na brzine uklanjanja NO_3-N postignute u ovom istraživanju, dostupnost pergolara i njegovu visoku specifičnu površinu od 4 000 m^2/m^3, nameće se zaključak da je pergolar povoljan za primjenu u biološkim filtrima, ne samo za denitrifikaciju, nego i za nitrifikaciju. Uz to, visoke brzine uklanjanja NO_3-N potvrđuju i podobnost sladovine kao izvora ugljika, što dosad nije zabilježeno. KPK vrijednost sladovine bila je 237 g(O_2)/L, a za postizanje ciljane brzine uklanjanja NO_3-N od 40 mg/Ld uz omjer KPK/NO3-N od 2,5/1 u svaki je denitrifikacijski bioreaktor trebalo dodati svega oko 40 mL sladovine. Važno je istaknuti tu gotovo neznatnu količinu dodane sladovine u usporedbi s volumenom denitrifikacijskog reaktora jer je u literaturi naglašena potreba za redukcijom i finim doziranjem izvora ugljika za denitrifikaciju (Lee i sur., 2000, Morrison i sur., 2008, Hamlin i sur., 2008).

Statističkom analizom ispitivana je ovisnost brzine i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N o vrijednostima S, T, pH, koncentracija O_2, NO_3-N, NO_2-N, UAN, dodanih NO_3-N i KPK vrijednosti u stacionarnim uvjetima. Uočen je trenutni odziv brzina i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N na promjene S, pH, koncentracija NO_3-N, dodanih NO_3-N i KPK vrijednosti u oba reaktora. Brzine i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N u oba reaktora rastu s porastom naznačenih parametara uz relativno visoke koeficijente korelacije, osim s koncentracijom NO_3-N, kada se smanjuju s nešto nižim koeficijentima korelacije. Pritom je potrebno naglasiti da se koncentracija NO_3-N odnosi na onu koja se mjeri u reaktorima pri svakom uzorkovanju, pa njezina povećana vrijednost upućuje na slabije provođenje denitrifikacije, što je potkrijepljeno statističkom analizom. Koncentracija dodanih NO_3-N i KPK povećavana je s opadanjem mjerene koncentracije NO_3-N, to jest s povećanjem efikasnosti denitrifikacije, što je također statistički dokazano. Optimalna pH vrijednost za provođene denitrifikacije je između 7 i 8 (Knowles, 1982) pa ne čudi porast njezine efikasnosti s porastom pH, posebno uzme li se u obzir konstantan porast pH vrijednosti za vrijeme faze indukcije denitrifikacijskih reaktora. Slično tome, utvrđena je pozitivna korelacija između vrijednosti saliniteta i pokazatelja uspješnosti denitrifikacije, što se također može objasniti konstantnim povećanjem saliniteta tijekom cijeloga stacionarnog dijela istraživanja. Brzine uklanjanja NO_3-N u denitrifikacijskim reaktorima nisu bile u korelaciji s koncentracijom otopljenog O_2, dok učinkovitosti uklanjanja jesu. Takav rezultat može iznenaditi; međutim, uzmu li se u obzir vrijednosti koncentracije kisika, koje su bile niske i gotovo konstantne tijekom cijelog

istraživanja, može se zaključiti da je nedostatak korelacije između brzina uklanjanja NO_3-N i koncentracija kisika uvjetovan vrlo malim varijacijama u vrijednostima koncentracija O_2. Uz to, u oba je reaktora pokazana negativna korelacija između koncentracija kisika i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N, što se može objasniti većim promjenama vrijednosti učinkovitosti uklanjanja u usporedbi s variranjima vrijednosti brzina uklanjanja. Statistički značajna razlika među reaktorima A i B pokazana je u vrijednostima mjerenoga i dodanog NO_3-N te dodane KPK vrijednosti, kao i koncentracija NO_2-N i UAN, ali te promjene nisu bile dostatno velike da bi uzrokovale statistički značajnu razliku u brzini i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N među reaktorima.

U stacionarnim uvjetima provedeno je i cjelodnevno istraživanje denitrifikacije u reaktorima A i B pri čemu se nije pokazala statistički značajna razlika među vrijednostima mjerenih parametara, dok su najveće promjene tih vrijednosti zapažene u prva tri sata eksperimenta. Koncentracija kisika i NO_3-N naglo je opala, nakon čega je uslijedio puno sporiji, ali stalan pad koncentracije. Koncentracija NO_2-N je porasla, i to značajnije u reaktoru A, a zatim je opadala sporije od koncentracije nitrata. Nadalje, mjerljiva koncentracija UAN je uočena tek pri kraju eksperimenta; takvu pojavu su Grguric i sur. (2000) protumačili kao dokaz da se u reaktorima u određenoj mjeri odvijao i proces disimilacijske redukcije nitrata u amonijak. U prilog tome ide činjenica da su i u ovom istraživanju u denitrifikacijskim reaktorima pronađeni predstavnici bakterija koje mogu reducirati nitrat u amonijak. Statistička analiza korelacije brzina uklanjanja NO_3-N i mjerenih parametara pokazala je trenutni odziv u odnosu na prema promjenama vrijednosti pH, koncentracije O_2, NO_3-N, ukupnog NO_3-N i dodane sladovine u oba reaktora, dok se u reaktoru A pokazala korelacija i s koncentracijom NO_2-N. Brzine uklanjanja NO_3-N u oba reaktora povećavale su se s porastom naznačenih parametara uz relativno visoke koeficijente korelacije. Porast učinkovitosti denitrifikacije s rastom koncentracije NO_3-N i O_2 može iznenaditi, ali je potrebno uzeti u obzir i činjenicu da su na početku istraživanja izmjerene i najveće brzine i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N u oba reaktora, pa je ta korelacija prije povezana s promjenama u vrijednostima nego sa samim vrijednostima. Uz to, u reaktorima A i B nije pokazana statistički značajna razlika među izračunatim vrijednostima brzina i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N.

Tijekom istraživanja učinkovitosti denitrifikacije u protočnim uvjetima zamijećeno je opadanje koncentracije NO_3-N u sustavu, s najvećim promjenom u prvom danu istraživanja, dok je daljnji pad koncentracije bio najbrži tijekom eksperimenta sa

zadržavanjem vode u denitrifikacijskim bioreaktorima u trajanju od jednoga, a najsporiji tijekom eksperimenta sa zadržavanjem vode u trajanju od tri sata. Smanjenje koncentracije u reaktorima je najmanje pri najkraćem zadržavanju vode, a najveće pri najdužem vremenu zadržavanja. Koncentracija NO_2-N u sustavu prvi dan raste, a zatim opada, a u reaktorima je pri vremenima zadržavanja od jednoga i tri sata uočena potrošnja nitrata, a pri vremenu zadržavanja od dva sata njegova produkcija. Koncentracija UAN u sustavu prvi dan opada, a zatim raste pa ponovno opada, dok je u reaktorima pri svim vremenima zadržavanja primijećena produkcija amonijaka. Na početku eksperimenta koncentracija NO_3-N je brzo opala nakon čega bi uslijedilo usporenje, dok je koncentracija NO_2-N prvo rasla, a zatim opadala. Takva dinamika kretanja slična je zabilježenoj pri cjelodnevnom istraživanju denitrifikacije, a primijećena je i u drugim istraživanjima (Grguric i sur., 2000, Hamlin i sur., 2008). Iako su zamijećene sličnosti s istraživanjima što su proveli Grguric i sur. (2000) te Hamlin i sur. (2008), zabilježene povećane učinkovitosti denitrifikacije u odnosu na rezultate ovog istraživanja mogu se pripisati razlikama u karakteristikama istraživanih sustava; volumeni uzgojnih bazena i denitrifikacijskih reaktora višestruko su veći, a i kvaliteta vode znatno je drukčija. Grguric i sur. (2000) proučavali su učinkovitost denitrifikacije u morskom akvariju volumena od 2 900 000 L na prethodno induciranome denitrifikacijskom filtru s poroznim medijem uz dodatak metanola kao izvora ugljika. Vrijeme zadržavanja morske vode u denitrifikacijskoj jedinici koja je uključivala i bazen za deaeraciju bilo je oko tri sata, a u 24 sata uklonjeno je oko 120 mg(NO_3-N)/L. Hamlin i sur. (2008) su istraživali denitrifikaciju u slatkovodnom sustavu za uzgoj sibirske jesetre uz 100 minuta zadržavanja vode u reaktorima volumena od 1,89 m^3 i volumena nosača od 1 m^3. U svoje denitrifikacijske reaktore dodavali su: metanol, octenu kiselinu, melasu i granulirani kukuruzni škrob, i sa svakim korištenim izvorom ugljika postigli brzine uklanjanja NO_3-N od oko 0,68 kg/m^3d. Usporedbe učinkovitosti biološke filtracije među različitim sustavima vrlo su nezahvalne zbog specifičnih uvjeta koji u njima vladaju. U ovom istraživanju u denitrifikacijskim je reaktorima pri protočnim uvjetima postignuta brzina uklanjanja NO_3-N od 140 mg/Ld, pa je proces denitrifikacije na pergolaru sa sladovinom kao izvorom ugljika (KPK/NO_3-N = 2,5/1) višestruko učinkovitiji od onoga koji su proučavali Park i sur. (2001). Oni su imobilizirali slatkovodne denitrifikacijske bakterije (prethodno uzgajane 120 dana u denitrifikacijskom reaktoru kontinuiranog toka) u polivinil alkoholu i aklimatizirali ih na salinitet od 7,5, 15 i 30 u laboratorijskom reaktoru volumena jedne litre. Ulazna je voda imala 3,5 mg/L NO_3-N, izvor ugljika bio je glukoza, a omjer KPK/N = 6,5/1. Nakon četiri mjeseca istraživanja u reaktoru sa

salinitetom od 30 pri vremenu zadržavanja od tri sata najveća brzina uklanjanja NO_3-N iznosila je 10 g/m^{3}d.

Vrijednosti površinske i volumne brzine uklanjanja nitratnog dušika u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije sa zadržavanjem vode u bioreaktorima u trajanju od jednoga, dva i tri sata, najveće su pri najkraćem vremenu zadržavanja, a najmanje pri najdužem, dok učinkovitost uklanjanja NO_3-N raste s većim vremenom zadržavanja. Pritom je potrebno uzeti u obzir način izračuna tih parametara, i brzine i učinkovitost uklanjanja ovise o koncentracijama NO_3-N na ulazu i izlazu denitrifikacijskih reaktora. Razlika između ulazne i izlazne koncentracije NO_3-N dovodi se u odnos s protokom i površinom ili volumenom pergolara za izračun površinske ili volumne brzine uklanjanja NO_3-N, dok se za izračun učinkovitosti uklanjanja ta razlika dovodi u odnos s njegovom ulaznom koncentracijom. Iz toga je vidljivo da, upotrebljavaju li se samo koncentracije NO_3-N, dobiva se rezultat kakav se očekuje – pri dužem vremena zadržavanja učinkovitost uklanjanja NO_3-N je najveća. Kad se uz koncentraciju upotrijebi i protok, rezultat je suprotan. To znači da vrijednost protoka ima puno veći utjecaj na rezultat nego razlika koncentracija. To ne čudi s obzirom na to da su srednje vrijednosti promjena koncentracija NO_3-N u reaktorima A i B tijekom istraživanja denitrifikacije pri vremenu zadržavanja od jednoga i dva sata, bile manje od 1 mg/L, a tijekom istraživanja denitrifikacije pri vremenu zadržavanja od tri sata nešto veće od 1 mg/L. Dakle, pri izračunu površinske i volumne brzine uklanjanja NO_3-N protok je veličina koja određuje rezultat, a i male promjene vrijednosti koncentracija pri izračunu učinkovitosti uklanjanja NO_3-N potvrđuju očekivani rezultat – povećanu učinkovitost pri dužem vremenu zadržavanja. Opadanje učinkovitosti uklanjanja organskog i dušikom bogatog otpada sa smanjenjem vremena zadržavanja uočili su i Thanh i sur. (2013) pri istraživanju membranskog bioreaktora u kombinaciji sa spužvom kao nosačem aktivnog mulja, pri vremenima zadržavanja od osam, četiri i dva sata. Statističkom analizom nije pokazana značajna razlika u vrijednostima mjerenih parametara kvalitete vode između reaktora A i B, niti značajna razlika u brzinama i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N među reaktorima tijekom istraživanja denitrifikacije pri protočnim uvjetima. Nadalje, ispitivana je ovisnost brzina i učinkovitosti uklanjanja NO_3-N o ulaznim i izlaznim vrijednostima mjerenih parametara. Za očekivati je da se pokazatelji učinkovitosti denitrifikacije mijenjaju ovisno o istim parametrima barem pri svakom vremenu zadržavanja vode u reaktorima, međutim u sva tri eksperimenta u oba je reaktora dokazana ovisnost o nekim varijablama, ali se rezultati razlikuju u svakom eksperimentu i pojedinom reaktoru. Ta nedosljednost može se objasniti činjenicom da je statistička analiza bila dovoljno

precizna da identificira pojedine parametre u svakom eksperimentu i reaktoru, iako varijacije u njihovim vrijednostima nisu značajne. Za one parametre za koje je pokazana statistički značajna ovisnost, promjene pokazatelja učinkovitosti denitrifikacije su brze, što se može objasniti najvećim promjenama u vrijednostima mjerenih parametara koje su se dogodile tijekom prvog dana istraživanja.

Iako je u stacionarnom dijelu istraživanja ostvarena vrlo visoka učinkovitost denitrifikacije, ona nije bila tako uspješna u protočnim uvjetima; površinske i volumne brzine uklanjanja NO_3-N su oko tri puta manje u protočnim uvjetima. To je pokazatelj kako oblikovanje svakog RAS-a s pripadajućim denitrifikacijskim reaktorom utječe na aktivnost denitrifikacijskih bakterija s promjenom specifičnih uvjeta u kojima one žive, što su uočili i u drugi autori (Tal i sur., 2009, Krom i sur., 2014). Tal i sur. (2009) istraživali su zatvoreni morski RAS za uzgoj komarče s odvojenim aerobnim i anaerobnim jedinicama. U anaerobnom filtru provodila se denitrifikacija i anaerobna oksidacija amonijaka, voda se u njemu zadržavala 6,8 sati, a prije njega provela je u prosjeku 2,5 sata u tanku za taloženje mulja i tanku za njegovu razgradnju. Autori su dokazali izmjenu dominacije procesa između heterotrofne i autotrofne denitrifikacije; za vrijeme reduciranog hranjenja ribe dominirala je autotrofna, a za uobičajenog hranjenja heterotrofna denitrifikacija, i postignuta je brzina uklanjanja od 0,7g(NO_3-N)/m^2d. U usporedbi s rezultatima što su ih dobili Tal i sur. (2009), brzina uklanjanja NO_3-N od 121 mg/m^2d ostvarena u stacionarnom dijelu ovog istraživanja je oko šest puta manja, baš kao što su i komponente sustava. Također je potrebno napomenuti kako su u denitrifikacijskim reaktorima ovog sustava pronađene bakterije koje provode autotrofnu denitrifikaciju. Izmjenu procesa autotrofne i heterotrofne denitrifikacije uočili su i Krom i sur. (2014) u istraživanju bakterijskih procesa uklanjanja fosfora i kruženja nitrata i sulfata u morskom RAS-u s nultom izmjenom. Zanimljivo je istaknuti da su se ti autori koristili sustavom s muljem bogatim bakterijama iz prethodnog uzgojnog ciklusa koji je trajao sedam godina kako bi izbjegli dugotrajnu fazu indukcije.

Odabrano oblikovanje denitrifikacijskih bioreaktora u ovom RAS-u omogućuje daljnje povećanje površine za naseljavanje bakterija dodavanjem velike količine pergolara u reaktore, jer on sada zauzima samo oko 8% volumena reaktora. S povećanjem površine dostupne za naseljavanje denitrifikacijskih bakterija, očekuje se i veća učinkovitost denitrifikacije. Uz to, ovo je istraživanje provedeno u potpunosti bez uzgojnih organizama pa je opravdano očekivati povećanje učinkovitosti i nakon njihova dodavanja u sustav. Očekivan rast učinkovitosti može se iskoristiti u daljnjim istraživanjima kako bi se smanjilo vrijeme

potrebno za denitrifikaciju u stacionarnim uvjetima, ili pronašlo ogovarajuće vrijeme zadržavanja vode u protočnim uvjetima.

4.2. Učinkovitost nitrifikacije u stacionarnim uvjetima u morskom RAS-u

Ovo istraživanje započelo je u dezinficiranom rotacijskom biološkom kontaktoru i u dezinficiranoj morskoj vodi u koju su dodane komercijalne bakterije za pročišćavanje vode u akvakulturi i supstrati za njihov rast; 14 mg/L UAN i 5 mg/L NO_2-N. Koncentracije UAN i NO_2-N ubrzo su počele opadati, a koncentracija NO_3-N rasti, što svjedoči o trenutnoj aktivnosti bakterija koje oksidiraju amonijak i nitrit. S povećanjem aktivnosti nitrifikacijskih bakterija, povećavala se i koncentracija nitrata u RBK-u, a voda se mijenjala kad je izmjerena koncentracija NO_3-N dostigla 150, 200, 250, 300 i/ili 400 mg/L. U većini akvakulturnih sustava koncentracija nitrata niža je od 50 ppm, ali u intenzivnim uzgojnim sustavima, posebice u recirkulacijskima, ona često prelazi 100, a ponekad i 500 ppm (Vectesi i sur., 2012) pa su dopuštanjem nakupljanja veće količine nitratnog dušika u ovom istraživanju simulirani proizvodni uvjeti u komercijalnim RAS-ima. S daljnjim razvojem populacije nitrifikacijskih bakterija postupno je rasla brzina uklanjanja UAN, a nakon 160 dana konstantno je iznosila oko 40 mg/Ld. U to je vrijeme površinska brzina uklanjanja UAN iznosila 83 mg/m^2d, a volumna 28 mg/Ld. Ovdje je bitno napomenuti kako su površinska i volumna brzina uklanjanja UAN izražena prema površini, odnosno volumenu ploča rotacijskog biološkog kontaktora, dok se za izračun brzine uklanjanja upotrebljava volumen kade RBK-a. Iako je učinkovitost uklanjanja UAN tijekom eksperimenta više puta bila 100%-tna, tek je nakon 160 dana ona bila konstantna na toj vrijednosti. Prethodno dosegnuta 100%-tna učinkovitost ostvarena je pri dodatku manje količine UAN u RBK, to jest u vezi je s nižom vrijednošću brzine uklanjanja UAN.

U ovom RAS-u stabilna populacija nitrifikacijskih bakterija razvila se nakon više od pet mjeseci pripreme za uzgoj lubina u nasadnoj gustoći od 40 kg/m^3 s dnevnom stopom hranjenja od 3%; indukcija rotacijskog biološkog kontaktora trajala je 160 dana. Takav rezultat u skladu je s drugim istraživanjima indukcije u morskim RAS-ima; Gross i sur. (2003) su uočili kako je inicijacija nitrifikacijskog filtra u morskim sustavima vrlo mukotrpna i da uzrokuje ekonomske gubitke i povećano ispuštanje vode bogate dušikom u okoliš. Uz to, indukcija potpuno novog medija u morskim sustavima zahtijeva puno više vremena, a brzina nitrifikacije je i do 60% niža nego u slatkovodnim sustavima (Rusten i sur., 2006; Chen i sur., 2006), ali zašto je to tako, ne može se u potpunosti objasniti. Uzrok može biti u inhibiciji bakterija zbog migracije tvari iz novoga plastičnog materijala od kojega je nosač izrađen

(Horowitz i sur., 2001), a može se pripisati znatnim promjenama saliniteta ili temperature. Sesuk i sur. (2009) dugotrajno su razdoblje indukcije biofilmskih filtara povezali s ograničenom stopom rasta nitrifikacijskih bakterija i nepravilnom strategijom naseljavanja mikroorganizama, pa su zaključili kako su neaklimatizirani biofiltri vrlo podložni nepotpunoj nitrifikaciji i da njihovu upotrebu u zatvorenim RAS-ima treba izbjegavati ili provesti s velikim oprezom. Na tijek indukcije svakako utječe odabir nitrifikacijskih bakterija za inokulaciju filtra; uspješne bakterijske starter kulture moraju biti bez patogena, imati kratku lag fazu rasta i biti tolerantne prema različitim uvjetima okoliša, poput dnevnih promjena temperature, radijacije i slanosti (Gross i sur., 2003). Neki autori (Manthe & Malone, 1987) preporučuju inokulaciju filtara s podlogom iz drugih sustava sličnog saliniteta u kojima već postoji stabilna nitrifikacijska populacija, dok drugi (Gross i sur., 2003) ističu da s dodavanjem bakterija iz nekoga biofiltra koji je u tom trenutku u uporabi treba biti oprezan jer postoji i mogućnost da se uz nitrifikacijske bakterije u novi filtar prenesu i nepoželjni mikroorganizmi poput patogenih bakterija, spora ili virusa. U ovom istraživanju ja za inokulaciju biofiltara upotrijebljena komercijalno dostupna kultura bakterija, a njihov omjer bitno se izmijenio tijekom eksperimenta. Iako su u komercijalnoj kulturi bakterije porodice Nitrosomonadaceae, koje provode aerobnu oksidaciju amonijaka u nitrit (Hagopian & Riley, 1998, Schreier i sur., 2010) bile zastupljene samo s 0,51%, nakon završene indukcije u RBK-u obuhvaćaju 11,37% populacije. Nadalje, bakterije porodice Nitrospiraceae koje provode aerobnu oksidaciju nitrita u nitrat (Hagopian & Riley, 1998, Schreier i sur., 2010), također su zastupljene u komercijalnoj kulturi, i to s čak 17,95%. Važno je istaknuti kako su te bakterije zastupljene s dvije skupine; neodređene i one koje ubrajamo u rod *Nitrospira*. Njihovi se udjeli znatno razlikuju: pripadnici roda *Nitrospira* zastupljeni su u komercijalnoj kulturi sa 17,66%, ali se ne pojavljuju u induciranome nitrifikacijskom biofiltru, dok su neodređene bakterije porodice Nitrospiraceae svoj udio povećale s 0,29% na 3,10%. Nameće se zaključak da su pripadnici roda *Nitrospira* bili podrijetlom iz slatkovodnih izvora zbog čega se nisu uspjeli prilagoditi relativno visokom salinitetu (≈ 30) u ovom sustavu.

Dugu fazu indukcije i prilagodbu na salinitet opisali su Gelfand i sur. (2003), koji su u zatvorenom RAS-u uzgajali tilapiju, a zatim i oradu. Iz njihovih rezultata vidljiva su dva razdoblja: faza indukcije od 1. do 210. dana (*start-up phase*) i faza ustaljenog stanja od 210. do 394. dana (*steady-state phase*). Tijekom uzgoja tilapije slanost je postupno povećana od 0 do 20 ppt za potrebe uzgoja orade. Adaptaciju sustava od slatke do slane vode pratilo je prolazno nakupljanje dušičnih spojeva u sustavu, posebno nitrita. Autori su to pripisali

promjenom u populaciji bakterija koje oksidiraju nitrit uzrokovanom povećanim salinitetom, ili prilagodbi postojećih populacija na nove uvjete. Sustav je postao stabilan nakon 210 dana, a površinska brzina uklanjanja UAN u prokapavajućem filtru bila je 0,064 g/m^2d. S obzirom na zapažanja Gelfanda i sur. (2003) rezultati dobiveni ovim istraživanjem znatno su povoljniji, površinska brzina uklanjanja UAN iznosila je 83 $mg(UAN)/m^2d$, a faza indukcije trajala je 50 dana kraće. Uz to, koncentracija NO_2-N u tijekom istraživanja nije bila veća od 1,2 mg/L, a iako su nekad izmjerene visoke koncentracije UAN, koncentracija NH_3 nije nikad bila veća od 0,8 mg/L. Te vrijednosti zadovoljavaju preporučene parametre kvalitete vode za akvakulturni uzgoj lubina (Blancheton, 2000). Nakupljanje NO_2-N zamijećeno je u brojnim istraživanjima (Manthe & Malone, 1987, Gross i sur., 2003, Gelfand i sur., 2003, Marin i sur., 2011, Keuter, 2011). Uzrok nije poznat, a pripisuje se brojnim čimbenicima, poput visokoga organskog opterećenja (van den Akker i sur., 2003), visoke koncentracije UAN (Chung i sur. 2006) ili promjene u koncentraciji soli i uzgojnih uvjeta (Lee i sur., 2002, Svobodova i sur., 2005). Gutierrez-Wing & Malone (2006) sumnjaju da je razlog u nedostatku odgovarajućih bakterija za inokulaciju ili u nepoznatim čimbenicima koji utječu na razvitak morskih nitrifikacijskih populacija. Iz naznačenog se nameće zaključak da se iz početne količine bakterija porodice Nitrospiraceae razvila stabilna populacija bakterija odgovornih za aerobnu oksidaciju nitrita u nitrat koja može osigurati odvijanje nitrifikacije bez uobičajenih poteškoća.

Istraživanjem indukcije biofiltara s fluidiziranim slojem za primjenu u morskim RAS-ima bavila se i Keuter (2011). Formiranje učinkovitih nitrifikacijskih populacija trajalo je veći dio godine, a znatan razvoj aktivnosti dogodio se tek nakon dodavanja ribe u sustave. Međutim i tada je nitrifikacija bila usporena neko vrijeme i nije bilo moguće povećati stopu hranjenja kako je bilo planirano pa je bilo potrebno često mijenjati vodu. U usporedbi s rezultatima što ih je dobila Keuter (2011), rezultati indukcije RBK-a u ovome morskom sustavu su znatno uspješniji jer je ostvaren postavljeni cilj: razvitak stabilne nitrifikacijske populacije koja može ukloniti amonijak nastao pri uzgoju ribe u realnim proizvodnim veličinama (lubin u nasadnoj gustoći od 40 kg/m^3 s dnevnom stopom hranjenja od 3%). Uz to, ovaj rezultat ostavlja prostor za daljnje povećanje kapaciteta RAS-a jer se nakon dodavanja ribe u sustav može očekivati porast aktivnosti nitrifikacijskih bakterija, osobito s obzirom na visoke brzine uklanjanja UAN na RBK-ima ostvarene u nekim RAS-ima (Van Gorder i Jug-Dujaković, 2005, Brazil, 2006).

4.3. Analiza mikrobnih zajednica u morskom RAS-u

Procjena bogatstva vrsta u uzorcima komercijalne kulture, nitrifikacijskih i denitrifikacijskih bakterija obavljena je uz pomoć Chao indeksa koji se koristi podacima o frekvenciji rijetkih vrsta u uzorku da bi preko toga procijenio minimalni broj vrsta koji nije obuhvaćen uzorkom (Chao, 1984). Vrstama je najbogatija populacija nitrifikacijskih bakterija iz rotirajućeg biološkog kontaktora, a najsiromašnija populacija komercijalne kulture, dok su vrijednosti Chao indeksa jednake broju zabilježenih operativnih taksonomskih jedinica u svim uzorcima. To znači da u uzorcima nema rijetkih vrsta i da su oni kvalitetni pokazatelji populacija u kojima nema neotkrivenih vrsta. Raznolikost populacije sastoji se od dvije komponente: bogatstva vrsta i ujednačenosti njihovih abundancija (Šolić, 2015). Indeks ujednačenosti govori o tome kolika je raznolikost neke zajednice s obzirom na njezinu maksimalnu raznolikost. Njegova maksimalna vrijednost je jedan, a postiže se kad su sve vrste u uzorku jednako brojne (Šolić, 2015). Simpsonov indeks ujednačenosti u uzorku komercijalne kulture iznosi 0,048, što je i najveća vrijednost, dok je najmanja od 0,021 izračunata za uzorak iz denitrifikacijskih bioreaktora. To znači da je ujednačenost abundancija vrsta u ovim populacijama relativno niska, to jest da su populacije pod jakim utjecajem nekoliko dominantnijih vrsta. Indeks ujednačenosti populacije denitrifikacijskih bakterija je najmanji i njezine su vrste najraznolikije zastupljene u uzorku. Populacija nitrifikacijskih bakterija najbogatija je brojem vrsta, a indeks njene ujednačenosti je srednji, dok je populacija komercijalne kulture bakterija najmanje je bogata vrstama, a indeks njezine ujednačenosti najveći. Iz tog se zaključuje kako je populacija komercijalnih bakterija najmanje raznolika među analiziranim populacijama, i da su nitrifikacijska i denitrifikacijska raznolikije od komercijalne populacije i po broju vrsta i po njihovoj abundaciji. Može se pretpostaviti kako je pri popravku jednoga komada opreme došlo do miješanja vode u cjevovodu kojim je napajan ovaj sustav s vodom iz okoliša gdje se u neposrednoj blizini uzgaja lubin u kaveznom sustavu i da su se neke bakterijske vrste zadržale i razvile u za njih povoljnim uvjetima. Michaud (2007) je također uočio da su se unatoč tomu što su sve kolonizirajuće bakterije iz istog izvora vode, tijekom aktivnosti biofiltra bakterijske zajednice izmijenile i specijalizirale u skladu s ekološkom nišom koju zauzimaju i čimbenicima okoliša.

U uzorcima komercijalne kulture, nitrifikacijskog i denitrifikacijskih reaktora pronađeno je 11 bakterijskih koljena s 18 razreda i 25 redova zastupljenih s udjelom > 1%. Neke skupine bakterija bile su u uzorku komercijalne kulture zastupljene znatnim udjelom, ali

se u biološkim filtrima ovog morskog RAS-a nisu zadržale. Takve su bakterije razreda KSB1 reda Ucn15732 iz razreda [Caldithrix] koje u komercijalnoj kulturi imaju vrlo znatan udio (11,78%). Pripadnici ovog razreda imaju raznovrsne gene za razgradnju proteina, celuloze, hemiceluloze i polisaharida, pa se može pretpostaviti da imaju ulogu u početnoj razgradnji i hidrolizi kompleksnih organskih spojeva ugljika, a izolirani su iz metanom bogatog sloja sedimenta estuarija (Baker i sur., 2015). Obligatne intracelularne bakterije koljena Chlorobi (Everett i sur., 1999) razreda SJA-28 treća su skupina po brojnosti u komercijalnoj kulturi (7,34%), ali se u biološkim filtrima ovog morskog RAS-a nisu zadržale. Te bakterije provode deklorinaciju triklorbenzena u anaerobnim uvjetima (von Wintzingerode i sur., 1999). U koljenu Acidobacteria u komercijalnoj kulturi najbrojnije su bakterije reda Solibacteres razreda Solibacterales porodice Solibacteraceae i roda Candidatus *Solibacter*, koje sudjeluju u kruženju ugljika i dušika (Ward i sur., 2009), a ne pojavljuju se u ovom morskom RAS-u. Bakterija reda Chlamydiales razreda Chlamydiae i koljena Chlamydiia u uzorcima komercijalne kulture ima znatan udio (1,04%), ali se one u RBK-u pojavljuju u neznatnom broju, dok ih u denitrifikacijskim bioreaktorima uopće nema. Predstavnici koljena Caldithrix razreda Caldithrixae reda Caldithrixales porodice BA059 pronađeni su samo u denitrifikacijskim bioreaktorima. Bliski srodnici tih bakterija morski su organizmi koji provode redukciju nitrata u amonijak (Miroshnichenko i sur., 2003).

Bakterije koljena Chloroflexi razreda Anaerolineae reda Caldilineales porodice Caldilineaceae u uzorcima komercijalne kulture i denitrifikacijskih bioreaktora zastupljene su znatnim udjelom (tablica 3.4.3.), a u RBK-u se pojavljuju u neznatnom broju. One mogu rasti i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima, termofilne su i sposobne iskoristiti različite ugljikovodike (Yamada i sur., 2006). Izolirane su iz izvora vruće vode u Japanu (Sekiguchi, 2003) a pronađene su i u mulju sustava za obradu otpadne vode (Shu i sur., 2015).

Bakterije koljena Gemmatimonadetes razreda Gemm-1 u komercijalnoj kulturi bile su vrlo slabo zastupljene, u a nitrifikacijskom reaktoru povećale su svoj udio (1,455%), dok ih u denitrifikacijskim reaktorima uopće nema. To su heterotrofne aerobne bakterije koje nakupljaju polifosfate izolirane iz sustava za obradu otpadnih voda (Zhang i sur., 2003), a pronađene su i u različitim vrstama tla (Brooker, 2013, Tsitko i sur., 2014).

U komercijalnoj su kulturi bakterije koljena Nitrospirae razreda Nitrospira reda Nitrospirales jedne od najznačajnijih, i pojavljuju se s neodređenim bakterijama porodice Nitrospiraceae (0,29%) i s rodom Nitrospira (17,66%). Od toga se one roda Nitrospira nisu zadržale u biološkim filtrima ovog morskog RAS-a, dok su neodređene bakterije

Nitrospiraceae porodice znatno povećale svoj udio (3,10%). Te bakterije imaju važnu ulogu u nitrifikaciji, i često se nalaze i u slatkovodnim i u morskim akvakulturnim filtrima, gdje provode aerobnu oksidaciju nitrita u nitrat (Hagopian & Riley, 1998, Schreier i sur., 2010).

Bakterije reda Bacteroidales razreda Bacteroidia koljena Bacteroidetes bile su slabo zastupljene u komercijalnoj kulturi, ali su u denitrifikacijskim uvjetima znatno povećale svoj udio (1,05%). One su jedna od brojnijih skupina u moru gdje imaju važnu ulogu u razgradnji organskih tvari, osobito proteina (Fernandez-Gomez i sur., 2013). Pronađene su u morskim nitrifikacijskim akvakulturnim filtrima (Michaud, 2007, Interdonato, 2012), morskim denitrifikacijskim akvakulturnim filtrima (Cytryn, 2005a), te morskim akvakulturnim bazenima za razgradnju mulja u kojima se događa redukcija sulfata (Cytryn i sur., 2003).

Bakterije razreda Cytophagia reda Cytophagales porodice Cytophagaceae bile su znatno zastupljene u komercijalnoj kulturi (4,43%); pojavljuju se u nitrifikacijskom reaktoru, dok ih u denitrifikacijskima uopće nema. Ti aerobni kemoorganotrofni organizmi mogu razgraditi neke organske makromolekule, poput proteina, lipida, škrob, pektina, agara, hitina, karboksimetilceluloze ili celuloze (Nakagawa, 2005). Nedostatak složenih organskih makromolekula u nitrifikacijskom biofiltru i kisika u denitrifikacijskima objašnjava njihovo odumiranje u ovom sustavu.

Razred Flavobacteriia iz koljena Bacteroidetes pojavljuje se u svim uzorcima, i to u vrlo različitim udjelima; u komercijalnoj kulturi je zastupljen s manje od 1%, dok ga u nitrifikacijskom uzorku ima 11,44%, a u denitrifikacijskom 6,16%. Ovaj je razred vrlo bogat i raznolik, neke su bakterije strogo aerobni a neke anaerobni fakultativni kemoorganotrofi, od kojih mnogi zahtijevaju NaCl ili morsku vodu za rast, a većina raste na podlogama s organskim sastojcima kao izvorom ugljika i dušika, dok neki mogu iskoristiti i anorganski dušik. (Bernardet, 2011). Sve bakterije ovog razreda pripadale su redu Flavobacteriales zastupljenim s dvije porodice, od kojih je brojnija bila Flavobacteriaceae. Iako je u toj prodici otkriveno osam rodova, njihov je ukupni broj neznatan, a najveći dio ostao je neodređen (10,35%) u uzorku nitrifikacijskih bakterija. I uz prisutnost još jedne porodice reda Flavobacteriales veliki dio ove skupine (4,77%) neodređen je u denitrifikacijskom uzroku. Može se zaključiti da su u RBK-u prevladavale aerobne bakterije koje mogu koristiti anorganski dušik, dok su u denitrifikacijskim reaktorima prevladavale anaerobne bakterije jer se mogu poslužiti organskim spojevima koji se nalaze u sladovini. Pojedini predstavnici ovih skupina pronađeni su u aeracijskom bazenu pogona za obradu komunalnih otpadnih voda (Preut, 2014), u mulju sustava za obradu otpadne vode (Shu i sur., 2015), u pješčanim filtrima

za obradu vode za piće (Haig, 2014) i u različitim dijelovima morskih recirkulacijskih akvakulturnih sustava (Michaud, 2007, Interdonato, 2012, Martins i sur., 2013).

Razred [Saprospirae] iz koljena Bacteroidetes pojavljuje se u svim uzorcima i to u vrlo različitim udjelima. Zastupljen je s porodicama Chitinophagaceae i Saprospiraceae koje su u uzorku komercijalne kulture prisutne sa 5,52%, i 3,00%, dok u uzorku iz nitrifikacijskog reaktora porodice Saprospiraceae ima 9,12%, a ostalih predstavnika manje od 1%. U uzorku iz denitrifikacijskih reaktora Chitinophagaceae se uopće ne pojavljuju, a neodređenih bakterija porodice Saprospiraceae ima manje od 1%. Kako su bakterije porodice Saprospiraceae strogi aerobi (Krieg i sur., 2011), nije iznenađujuće njihovo gotovo izumiranje u anaerobnim uvjetima koji vladaju u denitrifikacijskim bioreaktorima. Sve one trebaju aminokiseline za rast, a nekim rodovima izvor su dušika amonijeve soli i/ili nitrat (Krieg i sur., 2011) pa je razumljiv i porast udjela u RBK-u u usporedbi s onim kojim su te bakterije zastupljene u komercijalnoj kulturi. Bakterije iz porodice Chitinophagaceae hidroliziraju hitin ili celulozu, a rast im je inhibiran dodatkom >3% NaCl (Krieg i sur., 2011), što objašnjava njihovo gotovo izumiranje u nitrifikacijskom i potpuno u denitrifikacijskim reaktorima ovog morskog RAS-a.

Bakterije koljena Planctomycetes u uzorcima komercijalne kulture i nitrifikacijskog reaktora zauzimaju oko desetine populacije, dok su u denitrifikacijskim bioreaktorima zastupljene s manje od 1%. Bakterije razreda OM190 reda CL500-15 izolirane su iz ultraoligotrofnog jezera Crater u Oregonu, Amerika (Urbach i sur., 2001); njihov je udio značajan u komercijalnoj kulturi, pojavljuju se u nitrifikacijskom reaktoru, a u denitrifikacijskim ih reaktorima uopće nema. Razred Planctomycetia zastupljen je s tri reda: B97, Planctomycetales i Pirellulales. Red B97 ima značajan udio u komercijalnoj kulturi, pojavljuje se u nitrifikacijskom reaktoru, a u denitrifikacijskim reaktorima uopće nije zastupljen. U komercijalnoj kulturi vrste roda *Planctomyces* porodice Planctomycetaceae zastupljene su s 1,70%. Njihov udio raste u nitrifikacijskom reaktoru na 8,25%, dok su u denitrifikacijskim reaktorima slabo zastupljene. Ti organizmi pronađeni su u različitim vodenim biofiltracijskim sustavima, na slatkovodnim (Sugita i sur., 2005) i morskim (Tal i sur., 2003) nitrifikacijskim filtrima, u mulju sustava za obradu otpadne vode (Shu i sur., 2015), i u mulju morskih RAS-a (Cytryn i sur., 2003). Porodica Pirellulaceae je u komercijalnoj kulturi zastupljena s 2,04%, u nitrifikacijskom reaktoru njen udio raste na 2,29%, a u denitrifikacijskim reaktorima je slabo zastupljena. Predstavnici te porodice obligatni su aerobni kemoorganotrofni organizmi pronađeni u pješčanim filtrima za obradu

vode za piće (Haig, 2014), slatkovodnim (Sugita i sur., 2005) i morskim nitrifikacijskim akvakulturnim filtrima (Michaud, 2007, Interdonato, 2012).

Broj predstavnika koljena Proteobacteria u uzorcima komercijalne kulture i ovoga morskog recirkulacijskog sustava veći je od svih drugih skupina bakterija, a njihovi udjeli kreću se od 1/5 u uzorku komercijalne kulture, pa više od 1/2 u nitrifikacijskom reaktoru do 4/5 u denitrifikacijskim reaktorima.

Predstavnici razreda Alphaproteobacteria su u uzorcima komercijalne kulture i ovoga morskog recirkulacijskog sustava vrlo raznoliko zastupljeni: 7 redova u komercijalnoj kulturi obuhvaća oko 10% ukupne populacije, 10 redova u nitrifikacijskoj kulturi obuhvaća 37% populacije, a 6 redova u denitrifikacijskom uzorku obuhvaća 11% populacije. Predstavnici ove skupine najbrojniji su u nitrifikacijskome rotacijskom biološkom kontaktoru, što se podudara s istraživanjem Michauda (2007), koji je također otkrio najviše Alphaproteobacteria u uzorcima iz nitrifikacijskog filtra iz RAS-a za uzgoj lubina. U uzorku komercijalne kulture i u nitrifikacijskom uzorku u razredu Alphaproteobacteria najbrojnije su bile bakterije reda Rhizobiales. U komercijalnoj kulturi bilo je najviše neodređenih bakterija ovog roda (2,82%), a predstavnika porodica Phyllobacteriaceae i Hyphomicrobiaceae bilo je < 1%. Bakterijske su se populacije isprofilirale u ovom sustavu pa je tako udio neodređenih bakterije reda Rhizobiales u nitrifikacijskom i denitrifikacijskim reaktorima zanemariv, predstavnici porodica Phyllobacteriaceae u RBK zauzimaju oko 5%, dok ih gotovo uopće nema u denitrifikacijskim reaktorima. Predstavnici porodica Hyphomicrobiaceae zadržavaju svoj neznatan udio u nitrifikacijskom reaktoru, a u denitrifikacijskim reaktorima zauzimaju 1,23%. Predstavnici porodice Phyllobacteriaceae su aerobne bakterije koje se mogu koristiti različitim oblicima dušika za rast (Mergaert & Swings, 2005), a već su pronađeni na biološkom filtru morskog RAS-a (Michaud, 2007). Neki predstavnici porodice Hyphomicrobiaceae reduciraju nitrat u anaerobnim uvjetima (Garrity i sur., 2005b) pa ne čudi njihov značajan udio u denitrifikacijskim reaktorima ovog morskog RAS-a. Ove su bakterije pronađene i u morskom denitrifikacijskom reaktoru s metanolom kao izvorom ugljika (Labbe i sur., 2003). U denitrifikacijskom uzorku u koljenu Alphaproteobacteria najznačajnije su bile bakterije reda Rhodobacterales, i to predstavnici porodice Rhodobacteraceae, sa 7,15%. Ove su se bakterije u tim uvjetima razvile od svega 0,05%, koliko ih ima u komercijalnoj kulturi, dok su u nitrifikacijskom reaktoru nešto brojnije (0,65%). Predstavnici ove porodice imaju vrlo raznoliku metaboličku aktivnost, neki su strogo aerobni ili fakultativno anaerobni, imaju respiratorni ili fakultativno fermentativni metabolizam (Garrity i sur., 2005a). Široko su

rasprostranjeni u različitim morskim sredinama i brojčano su dominantne pri početku kolonizacije potopljenih površina u moru (Dang i sur., 2000, 2002). Sposobnost učinkovitog koloniziranja površine može dati ovim bakterijama konkurentsku prednost u filtrima s jakim protokom, niskim vremenom zadržavanja i jakom silom naprezanja što može ograničiti kolonizaciju (Cytryn i sur., 2005b). Bakterije porodice Rhodobacteraceae već su pronađene u morskim recirkulacijskim sustavima (Cytryn i sur.; 2005a, 2005b, Michaud, 2007., Schreier i sur., 2010) gdje provode oksidaciju sulfida uz pomoć nitrata, ili o sulfidu ovisnu denitrifikaciju. Red Rhodobacterales zastupljen je s još jednom porodicom; u komercijalnoj kulturi bile su neodređene bakterije porodice Hyphomonadaceae (2,03%) i one su se u RBK-u zadržale s 0,07%, a u denitrifikacijskim reaktorima se uopće ne pojavljuju, dok su predstavnici roda *Hyphomonas* pronađeni samo u nitrifikacijskom reaktoru (1,61%). Bakterije ovog roda morski su aerobni kemoorganotrofi (Lee i sur., 2005) i zapaženi su u morskim recirkulacijskim akvakulturnim sustavima (Michaud, 2007). Od predstavnika koljena Alphaproteobacteria potrebno je još istaknuti red Kiloniellales, čijih je predstavnika u komercijalnoj kulturi bilo jako malo (0,01%), ali su u nitrifikacijskom reaktoru povećali svoj udio na 4,71%. U denitrifikacijskim bioreaktorima bakterije roda *Thalassospira* porodice Kiloniellaceae obuhvaćaju 2,03% populacije iako nisu postojale u komercijalnoj kulturi, niti su pronađene u RBK-u. To su morske bakterije, s aerobnim ili fakultativno anaerobnim metabolizmom koje se koriste nitratom kao akceptorom elektrona (Wiese i sur., 2009). One su pronađene u istraživanju denitrifikacije u slanoj otpadnoj vodi s poli(butilen sukcinatom) kao izvorom ugljika (Luo i sur., 2013).

U razredu Betaproteobacteria najznačajnije su bakterije reda Nitrosomonadales, porodice Nitrosomonadaceae. Iako su u komercijalnoj kulturi bile zastupljene s 0,51%, u RBK-u obuhvaćaju 11,37% populacije, dok ih u denitrifikacijskim reaktorima gotovo i nema. To su litoautotrofne bakterije koje oksidiraju amonijak (Garrity i sur., 2005c) pa ne iznenađuje njihov znatan udio u nitrifikacijskom reaktoru. Redovito ih nalazimo i u slatkovodnim i u morskim akvakulturnim filtrima, gdje provode aerobnu oksidaciju amonijaka u nitrit (Hagopian & Riley, 1998, Schreier i sur., 2010)

Predstavnici razreda Gammaproteobacteria vrlo su raznoliko zastupljeni u uzorcima komercijalne kulture i ovoga morskog recirkulacijskog sustava: 6 redova u komercijalnoj kulturi obuhvaća oko 7% ukupne populacije, 12 redova u nitrifikacijskoj kulturi obuhvaća 9% populacije, dok 9 redova u denitrifikacijskom uzorku obuhvaća 60% populacije. U uzorku komercijalne kulture prevladavale su neodređene bakterije reda Legionellales s 4,30%, dok su

se u nitrifikacijskom i denitrifikacijskim bioreaktorima ovoga morskog recirkulacijskog akvakulturnog sustava zadržale s manje od 1%. Drugi najvažniji red ove skupine u komercijalnoj kulturi bio je Chromatiales, osobito s porodicom Ectothiorhodospiraceae i bakterijama roda *Halorhodospira*, koje su u komercijalnoj kulturi bile zastupljene s 0,22%, a u rotacijskom biodisku 3,80%. To su halofilne bakterije što provode oksidaciju sulfida (Imhoff & Süling, 1996); pronađene su u sustavima za obradu otpadnih voda (Shu i sur., 2015) i u morskim RAS-ima (Interdonato, 2012). Predstavnici reda Pseudomonadales porodice Moraxellaceae roda *Acinetobacter* u komercijalnoj i denitrifikacijskoj kulturi slabo su zastupljene, ali ih u nitrifikacijskom reaktoru ima 1,24%. To je očekivano jer te bakterije imaju striktni aerobni respiratorni metabolizam i kao izvor dušika koriste se amonijakom, nitratom ili aminokiselinama (Juni, 2005). Uz to, zapažena je njihova sposobnost djelomične razgradnje niskomolekularnog polietilena (Tsuchii i sur., 1980) i zastupljenost u slatkovodnim (Itoi, 2007, Schneider, 2007, Schreier, 2010) i morskim akvakulturnim sustavima (Michaud, 2007). U denitrifikacijskim bioreaktorima predstavnici reda Vibrionales najbrojnije su bakterije razreda Gammaproteobacteria. Važno je istaknuti kako te skupine bakterija nije bilo u komercijalnoj kulturi; već je podrijetlom iz okoliša, pojavljuje se na rotacijskom biološkom kontaktoru, a u denitrifikacijskim bioreaktorima ima znatan udio. Najvažnija porodica ovog reda je Pseudoalteromonadaceae, koje su neodređeni i ostali predstavnici najbrojnija skupina u bakterijskoj populaciji denitrifikacijskih reaktora (26,35 i 7,16%). Ti aerobni i fakultativni anaerobni kemoorganotrofni organizmi zahtijevaju natrijeve ione za rast, a neki od njih provode denitrifikaciju (Enger i sur., 1987, Ivanova i sur., 2004). Pronađeni su u morskom nitrifikacijskom filtru (Michaud i sur., 2009). Redu Vibrionales pripadaju i bakterije roda *Vibrio* porodice Vibrionaceae obuhvaćajući 16,83% ukupne populacije denitrifikacijskih bakterija. Ove bakterije vrlo su česte u morima i estuarijima, na stijenci i u samim crijevima morskih životinja; neke vrste su patogene za određene kralježnjake i beskralježnjake, a neke provode denitrifikaciju (Farmer i sur., 2005). Prisutnost prisutnost patogenih vrsta roda *Vibrio* u recirkulacijskim sustavima predstavlja problem zbog mogućnosti da uzrokuju bolesti (Colt, 2006, Martins i sur., 2013), dok su ostale vrste dobrodošle zbog njihove sposobnosti da provode denitrifikaciju (Leonard i sur., 2000, Yoshie i sur.; 2004, 2006, Michaud, 2007, Interodnato, 2012) koja je iskorištena i u ovom sustavu jer su podrijetlom iz okoliša. Predstavnika porodice Colwelliaceae reda Alteromonadales nije bilo u komercijalnoj kulturi; pojavljuju se na rotacijskom biološkom kontaktoru, a u denitrifikacijskim bioreaktorima imaju znatan udio (3,12%). One su aerobni i fakultativno anaerobni morski organizmi koji

zahtijevaju natrijeve ione za rast, a reduciraju nitrat u nitrit (Ivanova i sur., 2004). Imaju važnu ulogu u denitrifikaciji u sustavu za pročišćavanje slane industrijske otpadne vode (Yoshie i sur., 2004, 2006), a pronađene su i u morskim recirkulirajućim akvakulturnim sustavima (Interdonato, 2012, Martins i sur., 2013). Bakterije reda [Marinicellales] porodice [Marinicellaceae] roda *Marinicella* zastupljene su u denitrifikacijskim reaktorima s 4,50%; pojavile su se na rotacijskom biološkom kontaktoru, a nije ih bilo u komercijalnoj kulturi. Izolirane su iz morske sredine, imaju aerobni kemoorganoheterotrofni metabolizam i zahtijevaju natrijeve ione za rast (Romanenko i sur., 2010)., a uočene su u aeracijskom bazenu pogona za obradu komunalnih otpadnih voda (Preut, 2014) i biofiltru morskog RAS-a (Ruan i sur., 2014).

Najvažniji bakterijski predstavnici razreda Epsilonproteobacteria su reda Campylobacterales porodice Campylobacteraceae roda *Arcobacter* sa znatnim udjelom u nitrifikacijskom reaktoru (5,28%), iako ih nije bilo u komercijalnoj kulturi, a pojavile su se na rotacijskom biološkom kontaktoru. Ti kemoorganotrofi sudjeluju u kruženju sumpora oksidirajući sulfid u sumpor (Vandamme i sur., 2005). Pronađene su u slatkovodnim (Schneider i sur., 2007) i morskim RAS-ima (Welsh i sur., 2011).

U populaciji denitrifikacijskih bioreaktora velik udio zauzimaju bakterije sposobne provoditi heterotrofnu denitrifikaciju, poput predstavnika porodica: Pseudoalteromonadaceae, Vibrionaceae (*Vibrio*), Colwelliaceae, Hyphomicrobiaceae i Kiloniellaceae (*Thalassospira*) i one koje obavljaju autotrofnu (o sulfidu ovisnu) denitrifikaciju poput bakterija porodice Rhodobacteraceae. Važnu ulogu u kruženju sumpora reducirajući sulfat imaju predstavnici reda Bacteroidales; njih u denitrifikacijskim bioreaktorima ima u znatnom broju dok su bakterije rodova Desulfobacterales i Desulfovibrionales zastupljene manjim udjelom (0,23%). Ciklus sumpora u denitrifikacijskim reaktorima upotpunjuju bakterije porodica Campylobacteraceae (*Arcobacter*) i Ectothiorhodospiraceae (*Halorhodospira*) oksidirajući sulfid. U nitrifikacijskom biofiltru prisutan je značajan broj bakterija koje provode oksidaciju amonijaka, poput predstavnika porodice Nitrosomonadaceae te onih koje oksidiraju nitrit, kao što su predstavnici porodice Nitrospiraceae (*Nitrospira*). Ovi rezultati u skladu su s literaturnim podacima o mikrobnoj raznolikosti bioloških filtara u recirkulirajućim akvakulturnim sustavima (Schreier i sur., 2010).

5. ZAKLJUČCI

Za potrebe ovih istraživanja dizajaniran je morski recirkulacijski akvakulturni sustav s komponentama u kojima se uspješno provodila biološka filtracija, to jest nitrifikacija i denitrifkacija, i koji je primjenjiv u eksperimentalnim i komercijalnim uvjetima. Na temelju obavljenog istraživanja i dobivenih podataka proizlaze sljedeći zaključci:

- U stacionarnim uvjetima postignuta je brizina uklanjanja od 40 mg(NO_3-N)/Ld, što izraženo prema površini pregolara iznosi 121 mg(NO_3-N)/m^2d, a prema njegovu volumenu 485 mg(NO_3-N)/Ld.
- Faza indukcije denitrifkacijskih biofiltara u ovom istraživanju trajala je 287 dana. Razvijena je stabilna denitrifikacijska populacija sposobna ukloniti nitrat koji bi nastao nakon nitrifikacije i eventualnog uzgoja ribe u realnim proizvodnim uvjetima. U populaciji denitrifikacijskih bioreaktora veliki udio zauzimaju bakterije koje provode heterotrofnu denitrifikaciju, te one koje obavljaju autotrofnu denitrifikaciju. Osim njih, prisutne su i bakterije koje sudjeluju u kruženju sumpora reducirajući sulfat ili oksidirajući sulfid.
- Ovakav dizajn denitrifikacijskih reaktora omogućuje daljnje povećanje površine za naseljavanje bakterija, jer je za sada zauzeto samo oko 8 % njhovog volumena, a s povećanjem površine dostupne za naseljavanje denitrifikacijskih bakterija, očekuje se i veća učinkovitost denitrifikacije.
- Pergolar se pokazao dobrom podlogom za naseljavanje bakterija, specifična površina od 4 000 m^2/m^3 čini ga povoljnim za primjenu u biološkim filtrima, kako za denitrifikaciju, tako i za nitrifikaciju.
- Dokazano je da sladovima može služiti kao izvor ugljika za denitrifkaciju u recirkulacijskim akvakulturnim sustavima i to u omjeru KPK/ NO_3-N = 2,5/1.
- Postignuta je brzina nitrifikacije od 40 mg(UAN)/Ld, što izraženo prema površini ploča rotacijskog biološkog kontaktora iznosi 83 mg(UAN)/m^2d, a prema njihovu volumenu 28 mg(UAN)/Ld.
- Faza indukcije rotacijskog biološkog kontaktora kao nitrifikacijskog biofiltra u ovom istraživanju trajala je 160 dana. Razvijena je stabilna nitrifikacijska populacija sposobna

ukloniti amonijak koji bi nastao prilikom uzgoja ribe u realnim proizvodnim uvjetima. U nitrifikacijskom biofiltru dokazana je značajna prisutnost bakterija koje provode oksidaciju amonijaka te onih koje oksidiraju nitrit.

6. LITERATURA

Anthonisen, A.C., R.C. Loehr, T.B.S. Prakasam & E.G. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. J. Wat. Pollut. Control Fed., 48: 835-852.

Arbiv, R., & J. van Rijn, 1995. Performance of a treatment system for inorganic nitrogen removal from intensive aquaculture systems. Aquacult. Eng., 14: 189-203.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176: 227-235.

Avnimelech, Y., N. Mozes, S. Diab & M. Kochba. 1995. Rates of organic carbon and nitrogen degradation in intensive fish ponds. Aquaculture, 134: 211-216.

Baker, B.J., C.S. Lazar, A.P. Teske, & G.J. Dick. 2015. Genomic resolution of linkages in carbon, nitrogen, and sulfur cycling among widespread estuary sediment bacteria. Microbiome, 3: 14.

Belser, L.W., 1984. Bicarbonate uptake by nitrifiers: effects of growth rate, pH, substrate concentration and metabolic inhibitors. Appl. Environ. Microbiol., 48(6): 1100-1104.

Bernardet J.F. Class II. Flavobacteriia class. nov. In N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig and W.B. Whitman (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 4. Springer, New York, 2011, p. 105.

Betlach, R. M. & J. M. Tiedje. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. Appl. Environ. Microbiol., 42(6): 1074-1084.

Blancheton, J.P. 2000. Development in recirculation systems for Mediterranean fish species. Aquacult. Eng., 22: 17-31.

Boley, A., W.-R. Müller, & G. Haider. 2000. Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. Aquacult. Eng., 22: 75-85.

Boley, A. & W.-R. Müller, 2001. Evaluation of different biodegradable polymers for nitrate removal in aquaria. Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco, no. spécial 20, fascicule 1.

Boley A. & W.-R. Müller. 2005. Denitrification with polycaprolactone as solid substrate in a laboratory-scale recirculated aquaculture system. Water. Sci. Technol., 52(10-11) 495-502.

Bower, C.E. & T. Holm-Hansen. 1980a. A simplified hydrazine-reduction method for determining high concentrations of nitrate in recirculated seawater. Aquaculture, 21(3): 281-286.

Bower, C.E. & T. Holm-Hansen. 1980b. Salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37(5): 794-798.

Box, G.E.P., & G.M. Jenkins. 1976. Time series analysis: Forecasting and control, Rev. ed. Holden-Day, San Francisco. 575 pp.

Boyd, C.E. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. Aquaculture, 226: 101-112.

Brazil, B.L. 2006. Performance and operation of a rotating biological contactor in a tilapia recirculating aquaculture system. Aquacult. Eng., 34: 261-274.

Brooker, M.R. 2013. The wetland dilemma: nitrogen removal at the expense of methane generation. M.S. Thesis The Ohio State University.159 pp.

Butt, W.D. & H. Lees. 1960. The effect of oxygen concentration on nitrite oxidation in the presence of different inorganic ions. Biochem. J., 76: 425-427.

Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N. Fierer, A.G. Peña, J.K. Goodrich, J.I. Gordon, G.A. Huttley, S.T Kelley, D. Knights, J.E. Koenig, R.E. Ley, C.A. Lozupone, D. McDonald, B.D. Muegge, M. Pirrung, , J. Reeder, J.R. Sevinsky, P.J. Turnbaugh, W.A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld & R. Knight. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing dana. Nature Methods. 7(5): 335-336.

Chang, J.P., & J.G. Morris. 1962. Studies on the utilization of nitrate by *Micrococcus denitrificans*. J. Gen. Microbiol., 29: 301-310

Chao, A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. Scan. J. Stat., 11: 265-270.

Chen, K.C., S.C. Lee, S.C. Chin & J.Y. Houng. 1998. Simultaneous carbon-nitrogen removal in wastewater using phosphorylated PVA-immobilized microorganisms. Enzyme. Microb. Tech., 23: 311-320.

Chen, S., J. Ling, & J.-P. Blancheton. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. Aquacult. Eng., 34: 179-197.

Chung, J., H. Shim, S. Park, S.J. Kim & W. Bae. 2006. Optimization of free ammonia concentration for nitrite accumulation in shortcut biological nitrogen removal process. Bioproc. Biosystems. Eng., 28(4): 275-82.

Cohen, Y. 2001. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresour. Technol., 77: 257-274.

Colt, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. Aquacult. Eng., 34: 143-156.

Cripps, S.J. & A. Bergheim. 2000. Solids management and removal for intensive land-based aquaculture production systems. Aquacult. Eng., 22: 33-56.

Cytryn E., I. Gelfand, Y. Barak, J. van Rijn & D. Minz. 2003. Diversity of microbial communities correlated to physiochemical parameters in a digestion basin of a zero-discharge mariculture system. Environ. Microbiol., 5: 55-63.

Cytryn, E., D. Minz, I. Gelfand, A. Neori, A. Gieseke, D. De Beer & J. van Rijn. 2005a. Sulfide-oxidizing activity and bacterial community structure in a fluidized bed reactor from a zero-discharge mariculture system. Environ. Sci. Technol., 39(6): 1802-1810.

Cytryn, E., J. van Rijn, A. Schramm, A. Gieseke, D. De Beer, & D. Minz. 2005b. Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system. Appl. Environ. Microb., 71(10): 6134-6141.

Dang, H. & C.R. Lovell. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNAgene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol., 66(2): 467- 475.

Dang, H. & C.R. Lovell. 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 68 (2): 496-504

Davidson, J. & S.T. Summerfelt. 2005. Solids removal from a coldwater recirculating system – comparison of a swirl separator and a radial-flow settler. Aquacult. Eng., 33: 47-61.

Ebeling, J.M., P.G. Hightower, D.G. II Drennan, & R.F. Malone. 2010. Passive denitrification research/technology using biodegradable biopolymer (PHA's). Abstract Book of European Aquaculture Society conference Aquaculture Europe 2010. Porto, October 5-8, 2010. 407-409.

Egli, K., F. Bosshard, C. Werlen, P. Lais, H. Siegrist, A.J.B. Zehnder & J.R. van der Meer. 2003. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. Microb. Ecol., 45: 419-432.

Enger, Ø., H. Nygaard, M. Solberg, G. Schei, J. Nielsen & I. Dundas. 1987. Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 37: 416-421.

Everett, K.D., R.M. Bush, & A.A. Andersen. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 415-440.

FAO 2010. The state of world fisheries and aquaculture 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO 2012. The state of world fisheries and aquaculture 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Farmer, J.J. III, J.M. Janda, F.W. Brenner, D.N. Cameron & K.M. Birkhead. 2011. Genus I. Vibrio Pacini 1854, 411. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Staley (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2(B) Springer, New York. p. 494-546.

Fernández-Gómez B., M. Richter, M. Schüler, J. Pinhassi, S.G. Acinas, J.M. González & C, Pedrós-Alió. 2013. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. ISME J. 7(5): 1026-37.

Garrity G. M., Bell, J.A & Lilburn, T. 2005a. Family I. Rhodobacteraceae fam. nov. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley & G. M. Garrity (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (C) Springer, New York, 2005, p. 161.

Garrity G. M., Bell, J.A & Lilburn, T. 2005b. Family VIII. Hyphomicrobiaceae Babudieri 1950, In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley & G. M. Garrity (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (C) Springer, New York, 2005, p. 476.

Garrity G. M., Bell, J.A & Lilburn, T. 2005c. Family I. Nitrosomonadaceae fam. nov. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley & G. M. Garrity (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (C) Springer, New York, 2005, p. 864.

Gelfand, I., Y. Barak, Z. Even-Chen, E. Cytryn, M. Krom, A. Neori & J. van Rijn. 2003. A novel zero-discharge intensive seawater recirculating system for culture of marine fish. J. World. Aquacult. Soc., 34: 344-358.

Gilmore K.R., K.J. Husovitz, T. Holst & N.G. Love. 1999. Influence of organic and ammonia loading on nitrifier activity and nitrification performance for a two-stage biological aerated filter system. Water. Sci. Technol., 39: 227-234.

Golz, W.J., K.A. Rusch & R.F. Malone. 1999. Modeling the major limitations on nitrification in floating-bead filters. Aquacult. Eng., 20: 43-61.

Gómez, M.A., González-López, J., Hontoria-García, E., 2000. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. J. Hazard. Mater., 80: 69-80.

Grguric, G., S.S. Wetmore & R.W. Fournier. 2000. Biological denitrification in a closed seawater system. Chemosphere, 40: 549-555.

Gross, A., A. Nemirovsky, D. Zilberg, A. Khaimov, A. Brenner, E. Snir, Z. Ronena & A. Nejidat. 2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. Aquaculture, 223(1-4): 51-62.

Guerdat, T.C., T.M. Losordo, J.J. Classen, J.A. Osborne & D.P. DeLong. 2010. An evaluation of commercially available biological filters for recirculating aquaculture systems. Aquacult. Eng., 42: 38-49.

Gutierrez-Wing, M.T. & R.F. Malone. 2006. Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. Aquacult. Eng., 34: 163-171.

Hagopian, D.S. & J.G. Riley. 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. Aquacult. Eng., 18(4): 223-244

Haig, S.-J. 2014. Characterising the functional ecology of slow sand filters through environmental genomics. PhD Thesis, University of Glasgow, 296 pp.

Hamlin, H.J., J.T. Michaels, C.M. Beaulaton, W.F. Graham, W. Dutt, P. Steinbach, T.M. Losordo, K.K. Schrader & K.L. Main. 2008. Comparing denitrification rates and carbon sources in commercial scale upflow denitrification biological filters in aquaculture. Aquacult. Eng., 38: 79-92.

Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture, 166: 181-212.

Hernandez, D. & J.J. Rowe. 1987. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 53(4): 745-750.

Hernandez, D., & J.J. Rowe. 1988. Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. J. Biol. Chem., 263: 7937-7939.

Hiraishi, A. & S.T. Khan. 2003. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. Appl. Microbiol. Biotechnol., 61: 103-109.

Hodžić, Z., B. Banjanin & J. Sadadinović. 2008. Fermentable carbohydrates determination in different worts by HPLC-RI. Annals of the Faculty of Engineering Hunedoara – Journal of engineering, TOME VI (Fascicule 1): 105-110.

Honda, H., Y. Watanaba, K. Kikuchi, N. Iwata, S. Takeda, H. Uemoto, T. Furata & M. Kiyono. 1993. High density rearing of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* with a closed seawater recirculation system equipped with a denitrification unit. Suisanzoshoku, 41: 19-26.

Horowitz, A., T.M. Samocha, R.L. Gandy & S. Horowitz. 2001. Toxicity tests to assess the effect of a synthetic tank liner on shrimp survival and nitrification in a recirculating superintensive production system. Aquacult. Eng., 24: 91-105.

Imhoff, J.F., & J. Süling. 1996. The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: A reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. Arch. Microbiol., 165: 106-113.

Interdonato, F. 2012. Recirculating aquaculture system (RAS) biofilters: focusing on bacterial communities complexity and activity. PhD Thesis, Università degli studi di Messina, 124 pp.

Itoi S, N. Ebihara, S. Washio & H. Sugita. 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.

Ivanova, E.P., S. Flavier & R. Christen. 2004. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: Emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferri. Int. J. Syst. Evol. Micr., 54(5): 1773-1788.

Johansson, O. & M. Wedborg. 1980. The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25°C. J. Solut. Chem., 9. 37-44.

John P. 1977. Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes. J. Gen. Microbiol., 98(1): 231-238.

Johnstone, B.H. & R.D. Jones. 1988. Effects of light and CO on the survival of a marine ammonium-oxidizing bacterium during energy source deprivation. Appl. Environ. Microbiol., 54: 2890-2893.

Jones, G.L. & A.R. Paskins. 1982. Influence of high partial pressure of carbon dioxide and/or oxygen on nitrification. J. Chem. Technol. Biotechnol., 32(1): 213-223.

Juni E. Genus II. Acinetobacter Brisou and Prévot 1954, 727AL In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G. M. Garrity (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (B) Springer, New York, 2005, p. 425.

Justin, P. & D.P. Kelly. 1978. Metabolic changes in *Thiobacillus denitrificans* accompanying transition from aerobic to anaerobic growth in continuous chemostat culture. J. Gen. Microbiol., 107: 131-137.

Kamstra, A., J.W. van der Heul & M. Nijhof. 1998. Performance and optimisation of trickling filters on eel farms. Aquacult. Eng., 17: 175-192.

Keuter, S. 2011. Characterization of nitrifying bacteria in marine recirculation aquaculture systems with regard to process optimization. PhD Thesis, Universität Hamburg, 114 pp.

Kim S., I. Kong, B. Lee, L. Kang, M. Lee & K. Suh. 2000. Removal of ammonium-N from a recirculation aquacultural system using an immobilized nitrifiers. Aquacult. Eng., 21: 139-150.

Klas, S., N. Mozes & O. Lahav. 2006. Development of a single-sludge denitrification method for nitrate removal from RAS effluents: lab-scale results vs. model prediction. Aquaculture, 259: 342-353.

Kloep, F., I. Röske & T.R. Neu. 2000. Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. Water Res., 34: 311-319.

Knowles, R. 1982. Denitrification. Microbiol. Rev., 46(1): 43-70.

Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W. & Whitman, W.B. 2011. Family III. Saprospiraceae fam. nov. In: N. R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig & W.B. Whitman (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 4. New York, Springer. 358.

Krom, M.D., A. Ben David, E.D. Ingall, L.G. Benning, S. Clerici, S. Bottrell, C. Davies, N.J. Potts, R.J.G. Mortimer & J. van Rijn. 2014. Bacterially mediated removal of phosphorus and cycling of nitrate and sulfate in the waste stream of a 'zero-discharge' recirculating mariculture system. Water Res., 56: 109-21.

Kumar, S. & D.J.D. Nicholas. 1983. Proton electrochemical gradients in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. J. Bacteriol. 154(1): 65-71.

Labbe, N., P. Juteau, S. Parent & R. Villemur. 2003. Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal biodome, Canada. Microb. Ecol. 46: 12-21.

Lee, E.Y., K.S. Cho, H.D. Han & H.W. Ryu. 2002. Hydrogen sulfide effects on ammonia removal by a biofilter seeded with earthworm casts. J. Environ. Qual., 31: 1782-1788.

Lee, K.-B. C.-T. Liu, Y. Anzai, H. Kim, T. Aono, H. Oyaizu. 2005. The hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of Hyphomonadaceae fam. nov., Xanthobacteraceae fam. nov. and Erythrobacteraceae fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 1907-1919.

Lee, P.G., R.N. Lea, E. Dohmann, W. Prebilsky, P.E. Turk, H. Ying, & J.L. Whitson. 2000. Denitrification in aquaculture systems: an example of a fuzzy logic control problem. Aquacult. Eng., 23: 37-59.

Lemarié, G., A. Dosdat, D. Covès, G. Dutto, E. Gasset, & J. Person-Le Ruyet. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture, 229(1-4): 479-491.

Lemarié, G., J.-L.M. Martin, G. Dutto & C. Garidou. 1998. Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquat. Living Resour. 11(4), 247-254.

Leonard, N., J. Blancheton & J. Guiraud. 2000. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. Aquacult. Eng., 22(1-2): 109-120.

Li, J. X.H. Xing & B.Z. Wang. 2003. Characteristics of phosphorous removal from waste water by biofilm sequencing batch reactor (SBR). Biochem. Eng. J., 16: 279-285.

Losordo, T.M., M.P. Masser & J. Rakocy. 1998. Recirculating aquaculture tank production systems: An overview of critical considerations. Southern Regional Aquaculture Center Pub. SRAC-451.

Luo, G, M. Dong, Q. Liu, P. Deng & H. Tan. 2013. Denitrification of saline water with poly butylene succinate as carbon source and biofilm carriers. Environmental Pollution & Control 03.

Malone, R.F. & T.J. Pfeiffer. 2006. Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. Aquacult. Eng., 34(3): 389-402.

Manoj, V.R. & N. Vasudevan. 2012. Removal of nutrients in denitrification system using coconut coir fibre for the biological treatment of aquaculture wastewater. J. Environ. Biol., 33: 271-76.

Manthe, D.P. & R.F. Malone. 1987. Chemical addition for accelerated biological filter acclimation in closed blue crab shedding systems. Aquacult. Eng., 6: 227-236.

Marin, P., A. Donoso-Bravo, J.L. Campos, G. Ruiz-Filippi & R. Chamy. 2011. Performance of an in-situ rotating biological contactor in a recirculating aquaculture system. Water Sci. Technol., 64(11): 2217-2222.

Martins, P., D.F.R. Cleary, A.C.C. Pires, A.M. Rodrigues, V. Quintino, R. Calado, & N.C.M. Gomes. 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. PloS One, 8(11): e80847.

Mc Caig, A.E., C.J. Phillips, J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, M. Harvey, R.A. Herbert, T.M. Embley & J.I. Prosser. 1999. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial b-Subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. Appl. Environ. Microbiol., 65(1): 213-220.

Meincke, M., Krieg, E., Bock, E., 1989. *Nitrosovibrio* sp., the dominant ammonia-oxidizing bacteria in building sandstone. Appl. Environ. Microbiol., 55(8): 2108-2110.

Menasveta, P., T. Panritdam, P. Sihanonth, S. Powtongsook, B. Chuntapa & P. Lee. 2001. Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. Aquacult. Eng., 25: 35-49.

Mergaert ,J., A. Webb, C. Anderson, A. Wouters & S. Jeans. 1993. Microbial degradation of poly(3-hydoxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. Appl. Environ. Microbiol., 59: 3233-3238.

Mergaert, J., A. Wouters, C. Anderson & S. Jeans. 1995. In situ biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. Can. J. Microbiol., 41(Suppl 1):154-159.

Mergaert, J, G. Glorieux, L. Hauben, V. Storms, M. Mau & S. Jeans. 1996. Biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoates) in anaerobic sludge and characterization of a poly(3-hydroxyalkanoates) degrading anaerobic bacterium. Syst. Appl. Microbiol., 19: 407-413.

Mergaert, J. & J. Swings 2005. Family IV. Phyllobacteriaceae fam. nov. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G.M. Garrity (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (C) Springer, New York p. 393.

Michaud, L. 2007. Microbial communities of recirculating aquaculture facilities: interaction between heterotrophic and autotrophic bacteria and the system itself. PhD Thesis, Université Montpellier II, 125 pp.

Michaud, L., A. Lo Giudice, M. Troussellier, F. Smedile, V. Bruni & J.-P. Blancheton. 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. J. Appl. Microbiol., 107: 1935-1946.

Miroshnichenko, M.L., N.A. Kostrikina, N.A. Chernyh, N.V. Pimenov, T.P. Tourova, A.N. Antipov, S. Spring, E. Stackebrandt & E.A. Bonch-Osmolovskaya. 2003. *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. Int. J. Syst. Evol. Micr., 53: 323-329.

Mladineo, I., I. Bočina, C. Przybyla, J. Fievet & J.-P. Blancheton. 2010. Fish growth and health aspects of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in standard vs. high rate algal pond recirculation systems Aquat. Living Resour., 23: 217-224.

Morrison, M.M., Y. Tal & H. J. Schreier. 2008. Stimulating denitrification in a marine recirculating aquaculture system biofilter using granular starch as a carbon source. IJRA, 9: 23-41.

Nakagawa, Y. 2005. Family I. Cytophagaceae Stanier 1940. In: N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig and W.B. Whitman (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 4. Springer, New York, 2011, p. 371.

Painter, H.A. 1970. A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. Water Res., 4: 393-450.

Park, E.J., J.K. Seo, M.R. Kim, I.H. Jung, J.Y. Kim & S.K. Kim. 2001. Salinity acclimation of immobilized freshwater denitrifiers. Aquacult. Eng., 24: 169-180.

Payne, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Rev., 37: 409-452.

Phillips, J.B. & N.G. Love. 1998. Biological denitrification using upflow biofiltration in recircualting aquaculture systems:pilotscale experience and implications for full-scale. In: The Second International Conference on Recirculating Aquaculture. Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, pp. 171-178.

Piedrahita, R.H. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture, 26: 35-44.

Preut, M. 2014. Community analysis of a unique full-scale wastewater treatment plant as revealed by 454-pyrosequencing. PhD thesis. The University of New Mexico Albuquerque, 166 pp.

Pungrasmi, W., C. Playchoom & S. Powtongsook. 2013. Optimization and evaluation of a bottom substrate denitrification tank for nitrate removal from a recirculating aquaculture system. J. Environ. Sci., 25: 1557-1564.

Romanenko L.A., N. Tanaka, G.M. Frolova & V.V. Mikhailov. 2010. *Marinicella litoralis* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from coastal seawater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60: 1613-1619.

Ruan, Y-J.,. X-S. Guo, Z.-Y. Ye, Y. Liu, F.-S. Yang & S.-M. Zhu. 2014. Bacterial community analysis of biofilter in full-scale marine recirculating aquaculture system based on 454 pyrosequencing. Proceedings of the 10th International Conference on Recirculating Aquaculture August 22 - 24, 2014. Roanoke, Virginia, USA.

Rust, C.M., C.M. Aelion and J.R.V. Flora. 2002. Laboratory sand column study of encapsulated buffer release for potential in situ pH control. J. Contam. Hydrol. 54:81-98.

Rusten, B., B. Eikebrokk, Y. Ulgenes & E. Lygren. 2006. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. Aquacult. Eng., 34: 322-331.

Schneider, O., M. Chabrillon-Popelka, H. Smidt, O. Haenen, V. Sereti, E.H. Eding & J.A. Verreth. 2007. HRT and nutrients affect bacterial communities grown on recirculation aquaculture system effluents. FEMS Microbiol. Ecol., 60(2): 207-219.

Schramm, A. 2003. In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. Geomicrobiol. J., 20: 313-333.

Schreier, H.J., N. Mirzoyan & K. Saito. 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. Curr. Opin. Biotechnol., 21: 318-325.

Scott, J.T. 2002. Ntrification rates in a reversed-flow, spouted-bed bioreactor applied to recirculating aquaculture systems. M.S. Thesis, Louisiana State University. 159 pp.

Sekiguchi, Y. 2003. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. Int. J. Syst. Evol. Micr., 53(6): 1843-1851.

Sesuk, T., S., Powtongsook & K. Nootong. 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. Bioresource Technol., 100: 2088-2094.

Shilo, M. & A. Rimon. 1982. Factors which affect the intensification of fish breeding in Israel. 2. Ammonia transformation in intensive fishponds. Bamidgeh 34, 101-114.

Shnel, N., Y. Barak, T. Ezer, Z. Dafni & J. van Rijn. 2002. Design and performance of a zero-discharge tilapia recirculating system. Aquacult. Eng., 26: 191-203.

Shu, D., Y. He, H. Yue & Q. Wang. 2015. Microbial structures and community functions of anaerobic sludge in six full-scale wastewater treatment plants as revealed by 454 high-throughput pyrosequencing. Bioresource Technol., 186: 163-172.

Simoni, R.D. & M.K. Shallenberger. 1972. Coupling of energy to active transport of amino acids in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 69: 2663-2667.

Singer, A., S. Parnes, A. Gross, A. Sagi & A. Brenner. 2008. A novel approach to denitrification processes in a zero-discharge recirculating system for small-scale urban aquaculture. Aquacult. Eng., 39: 72-77.

Strickland, J.D.H. & T.R. Parsons. 1968. A practical handbook of sea-water analysis. J. Fish. Res. Bd. Canada. 167: 311 pp.

Sugita, H., H. Nakamura & T. Shimada. 2005. Microbial communities associated with filter material in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. Aquaculture, 243: 403-409.

Suhr, K.I. & P.B. Pedersen. 2010. Nitrification in moving bed and fixed bed biofilters treating effluent water from a large commercial outdoor rainbow trout RAS. Aquacult. Eng., 42: 31-37.

Suhr, K.I., P.B. Pedersen & E. Arvin. 2013. End-of-pipe denitrification using RAS effluent waste streams: effect of C/N ratio and hydraulic retention time. Aquacult. Eng., 53: 57-64.

Summerfelt, S.T. 1998. An integrated approach to aquaculture waste management in flowing water systems. In: Libey, G.S. & M.B. Timmons (Eds.) Proceedings of the Second International Conference on Recirculating Aquaculture, 87-97.

Suzuki, I., U. Dular & S.C. Kwok. 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. J. Bacteriol., 120(1): 556-558.

Svobodova, Z., J. Machova, G. Poleszczuk, G. Huda, J. Hamackova & H. Kroupova. 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. Acta Vet. Brno., 74: 129-137.

Šarić, I., M. Brailo, A. Gavrilović & J. Jug-Dujaković. 2010. Biološki filtri u akvakulturi. Ribarstvo, 68(3): 117-132.

Šolić, M. 2015. Kvantitativne metode u ekologiji zajednica. Split: Institut za oceanografiju i ribarstvo. 134 pp.

Tal, Y, J.E.M. Watts, S.B. Schreier, K.R. Sowers & H.J. Schreier. 2003. Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in closed recirculated mariculture systems. Aquaculture, 215: 187-202.

Tal Y., H.J. Schreier, K.R. Sowers, J.D. Stubblefield, A.R. Place & Y. Zohar. 2009. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. Aquaculture, 286: 28-35.

Thoman, E.S., E.D. Ingall, D.A. Davis & C.R. Arnold. 2001. A nitrogen budget for a closed, recirculating mariculture system. Aquacult. Eng., 24: 195-211.

Tiedje, J.M., 1990. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonia. U: Zehnder, A.J.B. (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms. Wiley, N.Y., pp. 179-244.

Timmons, M.B. & T.M. Losordo. 1994. Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering, Design and Management. Elsevier, Amsterdam, 333 pp.

Timmons, M.B., J.M. Ebeling, F.W. Wheaton, S.T. Summerfelt & B.J. Vinci. 2001. Recirculating Aquaculture Systems. Cayuga Aqua Ventures. Ithaca, New York, N.Y., 647 pp.

Tsitko, I., M. Lusa, J. Lehto, L. Parviainen, A.T.K., Ikonen, A.-M., Lahdenpera, & M. Bomberg. 2014. The variation of microbial communities in a depth profile of an acidic, nutrient-poor boreal bog in southwestern finland. Open J. Ecol., 4: 832-859.

Tsuchii, A., T. Suzuki & S. Fukuoka. 1980. Microbial degradation of polyethylene oligomers. Rep. Ferment. Res. Inst., 55: 35-40.

Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G.L. Larson & S.J. Giovannoni. 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. Limnol. Oceanogr., 46(3): 557-572.

van den Akker, B., M.P. Holmes, P. Pearce & H.J. Fallowfield. 2003. A pilot study to investigate ammonia removal from drinking water using a nitrifying trickling filter. In:

Proceedings of the NZWWA 45th Annual Conference and Expo. Auckland, New Zealand, September 17-19, 2003. New Zealand Water and Wastes Association, Auckland, New Zealand.

Van Gorder, S.D. & J. Jug-Dujaković. 2005. Performance characteristics of rotating biological contactors within two commercial recirculating aquaculture systems. IJRA, 6: 23-38.

van Rijn J. & Y. Barak. 1998. Denitrification in recirculating aquaculture systems: from biochemistry to biofilters. In: The second international conference on recirculating aquaculture, Roanooke, Virginia, pp. 179-187.

van Rijn, J. & G. Rivera. 1990. Aerobic and anaerobic biofiltration in an aquaculture unit: nitrite accumulation as a result of nitrification and denitrification. Aquacult. Eng., 9: 1-18.

van Rijn, J., Y. Tal & H.J. Schreier. 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. Aquacult. Eng., 34: 364-376.

van Rijn, J. 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. Aquacult. Eng., 53: 49-56.

Vandamme, P., F.E. Dewhirst, B.J. Paster & S.L.W. On. 2005. Genus II. Arcobacter In: Brenner, D.J., N.R. Krieg, J.T. Staley & G.M. Garrity (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (C) Springer, New York, 2005, p. 1161.

Vectesi, D., I. Kotzamanis, M.A. Henry & I.N. Vatsos. 2012. Haematological and immunological responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to a short-term exposure to increased water levels of nitrate, Iran J. Fish. Sci., 11(2): 430-439.

von Wintzingerode, F., B. Selent, W. Hegemann, & U.B. Goebel. 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic trichlorobenzene-transforming microbial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 65(1): 283-286.

Ward, N.L., J.F. Challacombe, P.H. Janssen, B. Henrissat, P.M. Coutinho, M. Wu, G. Xie, D.H. Haft, M. Sait, J. Badger, R.D. Barabote, B. Bradley, T.S. Brettin, L.M. Brinkac, D. Bruce, T. Creasy, S.C. Daugherty, T.M. Davidsen, R.T. Deboy, J.C. Detter, R.J. Dodson, A.S. Durkin, A. Ganapathy, M. Gwinn-Giglio, C.S. Han, H. Khouri, H. Kiss, S.P. Kothari, R. Madupu, K.E. Nelson, W.C. Nelson, I. Paulsen, K. Penn, Q.H. Ren, M.J. Rosovitz, J.D. Selengut, S. Shrivastava, S.A. Sullivan, R. Tapia, L.S. Thompson, K.L. Watkins, Q. Yang, C.H. Yu, N. Zafar, L.W. Zhou & C.R. Kuske. 2009. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. Appl. Environ. Microbiol., 75(7): 2046-2056.

Watson S.W, E. Bock, F.W Valois, J.B. Waterbury & U. Schlosser. 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov. a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. Arch. Microbiol. 144: 1-7.

Watson S.W. & J.B. Waterbury. 1971. Characteristics of two marine nitrite-oxidizing bacteria *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp.. Arch Microbiol 77: 203-230.

Welsh, J.E., P.A. King & E. MacCarthy. 2011. Characterization of a biofilm bacterium from a recirculation system for European lobster (*Homarus gammarus*). Aquaculture, 318(3-4): 458-463.

Wheaton, F.W., J.N. Hochheimer, G.E. Kaiser, R.F. Malone, M.J. Krones, G.S. Libey & C.C. Easter. 1994. Nitrification filter design methods. pp. 127-171. In: Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management. Timmons, M.B. & T.M. Losordo, (Eds.) Volume 27, Development in Aquaculture and Fisheries Sciences. Elsevier. New York.

Wiese, J., V. Thiel, A. Gärtner, R. Schmaljohann & J.F. Imhoff. 2009. *Kiloniella laminariae* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*. Int. J. Syst. Evol. Micr., 59: 350-356.

Yamada T., Y. Sekiguchi, S. Hanada, H. Imachi, A. Ohashi, H. Harada & Y. Kamagata. 2006. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 1331-1340.

Yoshie, S., N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata, & Y. Inamori. 2004. Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system. FEMS Microbiology Letters, 235: 183-189.

Yoshie, S., T. Ogawa, H. Makino, H. Hirosawa, S. Tsuneda & A. Hirata. 2006. Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater. Lett. Appl. Microbiol., 42: 277-283.

Zhang, H, Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata & K. Nakamura. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53(4): 1155-1163.

Zohar, Y., Y. Tal, H. Schreier, C. Steven, J. Stubblefield & A. Place. 2005. Commercially feasible urban recirculating aquaculture: Addressing the marine sector. In: Urban Aquaculture Chap. 10. (Eds) Barry Costa-Pierce, Alan Desbonnet, Peter Edwards & Dale Baker. CAB International. 159-173.

Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. R., 61(4): 533-616.

Župan, I. 2012. Integralni uzgoj dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) i kunjke (*Arca noae* Linnaeus, 1758) na uzgajalištima riba. Doktorska disertacija, Sveučilčište u Splitu i Sveučilište u Dubrovniku. 120 pp.

7. PRILOZI

7.1. Mikroorganizmi pronađeni u RAS-u

Tablica 7.1. Popis mikroorganizama pronađenih u uzorcima komercijalne kulture (KK), nitrifikacijskog reaktora (RBK) i denitrifikacijskih reaktora (DENI) s pripadajućim udjelima.

CARSTVO **KOLJENO** **RAZRED** **RED**	**PORODICA**	**ROD**	**Udio u uzorku (%)**		
			KK	**RBK**	**DENI**
Neodređeno					
Ostalo					
Ostalo					
Ostalo	Ostalo	Ostalo	3,468	0,519	3,926
Archaea					
[Parvarchaeota]					
[Parvarchaea]					
WCHD3-30					0,007
Bacteria					0,004
Bacteria					
Acidobacteria					
Acidobacteria-6					
iii1-15	RB40		0,020		
iii1-15	mb2424		0,089		
Holophagae					
Holophagales					0,012
RB25			0,010		
Solibacteres					
Solibacterales	Ostalo	Ostalo	0,142		
Solibacterales			0,598		
Solibacterales	PAUC26		0,142	0,192	
Solibacterales	PK34				0,004
Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus *Solibacter*	1,525		
Sva0725					
Sva0725			0,100		
[Chloracidobacteria]			0,070		
RB40			0,087		
RB40	Ellin6075		0,143		
Actinobacteria					
Acidimicrobiia					
Acidimicrobiales			0,144	0,031	
Acidimicrobiales	C111		0,115	0,044	
Acidimicrobiales	EB1017		0,007		

Tablica 7.1. Nastavak

Acidimicrobiales	JdFBGBact			0,013	
Acidimicrobiales	koll13				0,018
Acidimicrobiales	Iamiaceae	*Iamia*	0,009		
Actinobacteria					
Actinomycetales	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium*		0,005	
Actinomycetales	Microbacteriaceae			0,094	
Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Cryocola*		0,006	
Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Microbacterium*		0,033	
Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Yonghaparkia*		0,004	
Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Mycobacterium*	0,024	0,015	
Actinomycetales	Nocardioidaceae	*Aeromicrobium*		0,029	
Actinomycetales	Propionibacteriaceae				0,078
	Propionibacteriaceae	*Propionibacterium*		0,059	
	Pseudonocardiaceae	*Pseudonocardia*		0,146	
Thermoleophilia					
Gaiellales				0,004	
Gaiellales	AK1AB1_02E		0,023		
Gaiellales	Gaiellaceae		0,016		
Solirubrobacterales			0,095		
Armatimonadetes					
[Fimbriimonadia]					
[Fimbriimonadales]			0,013		
BRC1					
NPL-UPA2				0,003	0,085
PRR-11					0,012
Bacteroidetes					
Bacteroidia					
Bacteroidales			0,291		1,054
Bacteroidales	Marinilabiaceae				0,072
Bacteroidales	SB-1				0,628
Cytophagales	Cyclobacteriaceae			0,014	
Cytophagales	Cytophagaceae		4,433	0,007	
Cytophagales	Flammeovirgaceae			0,072	0,004
Flavobacteriales				0,223	4,764
Flavobacteriales	Cryomorphaceae		0,304	0,028	
Flavobacteriales	Cryomorphaceae	*Crocinitomix*		0,111	
Flavobacteriales	Cryomorphaceae	*Fluviicola*	0,030	0,025	
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Ostalo			0,062
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae			10,345	0,628
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Aequorivita*			0,009
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Arenibacter*		0,027	0,271
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium*	0,018		
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Maribacter*		0,005	0,418
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Muricauda*		0,601	0,006
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Polaribacter*		0,005	
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Sediminicola*		0,014	0,006
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Tenacibaculum*		0,056	

Tablica 7.1. Nastavak

Sphingobacteriia					
Sphingobacteriales			0,239	0,037	0,050
	NS11-12				0,009
[Rhodostalomi]					
[Rhodostalomales]	Rhodostalomaceae			0,032	
	[Balneolaceae]	*Balneola*		0,030	0,043
[Saprospirae]					
[Saprospirales]	Chitinophagaceae		5,520	0,333	
[Saprospirales]	Saprospiraceae		3,002	9,121	0,911
[Saprospirales]	Saprospiraceae	*Lewinella*		0,079	0,129
Chlamydiae					
Chlamydiia					
Chlamydiales	Ostalo	Ostalo		0,233	
Chlamydiales			1,042	0,008	
Chlamydiales	Criblamydiaceae			0,004	
Chlamydiales	Parachlamydiaceae	Ostalo	0,007	1,046	
Chlamydiales	Parachlamydiaceae			0,452	
Chlamydiales	Parachlamydiaceae	Candidatus *Protochlamydia*		0,005	
Chlamydiales	Rhabdochlamydiaceae	Candidatus *Rhabdochlamydia*		0,038	
Chlamydiales	Simkaniaceae	Ostalo	0,093	0,019	
Chlamydiales	Waddliaceae	*Waddlia*	0,031	0,026	
Caldithrix					
Caldithrixae	BA059				1,110
Caldithrixae	Caldithrixaceae				0,006
Chlorobi					
Ignavibacteria	Ostalo	Ostalo			0,003
Ignavibacteria	Ignavibacteriaceae			0,111	
Ignavibacteria	heB3-7				0,458
OPB56			0,966	0,015	0,796
SJA-28			7,339		
Chloroflexi					
Anaerolineae			0,213		
Anaerolineae					
Anaerolineales	Anaerolinaceae	*SHD-231*			0,097
Caldilineales	Caldilineaceae		4,660	0,040	3,081
DRC31			0,294		
GCA004			0,058	0,019	0,185
H39			0,008		
S0208			0,006		0,003
SBR1031	A4b		0,644	0,179	0,007
SBR1031	oc28g		0,024		
Dehalococcoidetes					
Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae			0,044	
Dehalococcoidales	Dehalococcoidaceae	*Dehalogenimonas*		0,033	
GIF9				0,015	
SAR202			0,009	0,036	

Tablica 7.1. Nastavak

TK10					
AKYG885	Dolo_23		0,017		
TK17				0,004	
mle1-48			0,327		0,009
Thermomicrobia					
AKYG1722			0,053		
Cyanobacteria					
4C0d-2					
MLE1-12			0,157	0,005	
SM2F09				0,005	
Chloroplast					
Stramenopiles			0,007		
Streptophyta				0,020	
FBP					0,012
Firmicutes					
Bacilli					
Bacillales	Staphylococcaceae	*Staphylococcus*		0,008	
Bacillales	Thermoactinomycetaceae		0,019		
Clostridia					
Clostridiales	Christensenellaceae				0,003
Clostridiales	Clostridiaceae				0,004
Clostridiales	Clostridiaceae	*Clostridium*	0,006		
Clostridiales	Lachnospiraceae				0,122
Clostridiales	Peptococcaceae	*Niigata-25*			0,021
Clostridiales	Peptostreptococcaceae				0,003
Clostridiales	[Acidaminobacteraceae]	*Fusibacter*			0,003
Clostridiales	Christensenellaceae				0,003
Clostridiales	Clostridiaceae				0,004
Clostridiales	Clostridiaceae	*Clostridium*	0,006		
Clostridiales	Lachnospiraceae				0,122
Clostridiales	Peptococcaceae	*Niigata-25*			0,021
Clostridiales	Peptostreptococcaceae				0,003
Clostridiales	[Acidaminobacteraceae]	*Fusibacter*			0,003
GN02					
3BR-5F				0,034	0,352
BB34					0,003
BD1-5					0,062
GKS2-174			0,172		
Gemmatimonadetes					
Gemm-1			0,205	1,455	
Gemm-2			0,013	0,062	0,027
Gemmatimonadetes					
KD8-87			0,092		
Lentisphaerae					
[Lentisphaeria]					
Victivallales	Victivallaceae				0,257

Tablica 7.1. Nastavak

Nitrospirae					
Nitrospira					
Nitrospirales	Nitrospiraceae		0,285	3,103	
Nitrospirales	Nitrospiraceae	*Nitrospira*	17,656		
NKB19					
TSBW08					0,030
OD1			0,355	0,004	
ABY1					0,177
ZB2				0,072	0,829
OP11					
OP11-2					0,013
OP11-3					0,006
WCHB1-64					0,005
d153					0,010
OP3					
koll11					
GIF10	kpj58rc				0,041
PBS-25			0,457		
Planctomycetes					
BD7-11			0,326		
OM190					
CL500-15			2,647	0,024	0,004
agg27				0,003	0,004
Phycisphaerae					
CCM11a			0,936	0,013	0,012
Phycisphaerales			0,522	0,956	0,500
Phycisphaerales	Phycisphaeraceae			0,007	0,005
Pla1			0,063	0,009	0,014
S-70			0,144		
WD2101			0,044		
mle1-8			0,006		
Planctomycetia					
B97			1,351	0,037	
Gemmatales	Gemmataceae		0,253	0,050	
Gemmatales	Gemmataceae	*Gemmata*	0,016	0,027	
Gemmatales	Isosphaeraceae		0,028	0,104	
Pirellulales	Pirellulaceae		2,040	2,291	0,034
Pirellulales	Pirellulaceae	*A17*		0,006	
Planctomycetales	Planctomycetaceae	*Planctomyces*	1,697	8,254	0,025
Proteobacteria					
Alphaproteobacteria			2,793	18,768	0,036
BD7-3			0,259	0,186	
Caulobacterales	Caulobacteraceae			0,019	0,340
Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Brevundimonas*	0,014	0,167	
Ellin329				0,059	
Kiloniellales			0,013	4,714	
Kiloniellales	Kiloniellaceae			0,060	
Kiloniellales	Kiloniellaceae	*Thalassospira*			2,029

Tablica 7.1. Nastavak

Kordiimonadales	Kordiimonadaceae			0,003	
Rhizobiales	ostalo	ostalo	0,850	0,102	0,097
Rhizobiales			2,819	0,537	0,027
Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae		0,376		
Rhizobiales	Cohaesibacteraceae	*Cohaesibacter*			0,055
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ostalo		0,359	0,023
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		0,202	0,241	1,230
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Devosia*		0,083	0,014
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Hyphomicrobium*	0,163	0,554	
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Parvibaculum*	0,006	0,101	
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	*Rhodoplanes*	0,024		
Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	ostalo	0,021	2,747	
Rhizobiales	Phyllobacteriaceae		0,040	1,980	0,024
Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Aminobacter*		0,010	
Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Mesorhizobium*	0,050	0,352	
Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Nitratireductor*		0,095	0,005
Rhizobiales	Rhizobiaceae	ostalo	0,006		
Rhizobiales	Rhizobiaceae			0,004	0,003
Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Agrobacterium*		0,045	
Rhodobacterales	Hyphomonadaceae		2,025	0,065	
Rhodobacterales	Hyphomonadaceae	*Hyphomonas*		1,605	
Rhodobacterales	Hyphomonadaceae	*Maricaulis*		0,006	0,025
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*ostalo*		0,013	0,120
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		0,048	0,653	7,154
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Anaerospora*			0,091
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Paracoccus*		0,218	
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Phaeobacter*		0,236	
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Ruegeria*		0,023	
Rhodospirillales			0,006	0,356	0,099
Rhodospirillales	Acetobacteraceae		0,018	0,003	
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae		0,198	0,826	0,107
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	*Inquilinus*	0,012		
Rickettsiales			0,251	0,191	
Rickettsiales	Pelagibacteraceae		0,005		
Rickettsiales	Rickettsiaceae		0,013	0,063	
Rickettsiales	mitochondria	*ostalo*		0,008	
Sphingomonadales				0,021	
Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	*ostalo*		0,056	
Sphingomonadales	Erythrobacteraceae			0,136	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*ostalo*		0,097	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae			0,251	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Blastomonas*		0,004	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Novosphingobium*		0,188	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Sphingobium*		0,057	
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Sphingomonas*		0,024	0,003
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Sphingopyxis*		0,080	

Tablica 7.1. Nastavak

Betaproteobacteria			0,242		
Burkholderiales	Comamonadaceae		0,114	0,122	
Burkholderiales	Comamonadaceae	*Delftia*		0,035	
Burkholderiales	Oxalobacteraceae	*Ralstonia*	0,017		0,011
MND1			0,458		
Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae		0,506	11,368	0,003
Rhodocyclales	Rhodocyclaceae		0,024	0,061	0,463
Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	*Dechloromonas*		0,005	
Deltaproteobacteria			0,073	0,007	0,092
Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae		0,013	0,037	0,046
Bdellovibrionales	Bacteriovoracaceae	*Bacteriovorax*		0,028	0,280
Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	*Bdellovibrio*	0,395		0,032
Desulfobacterales	Desulfobulbaceae			0,013	0,193
Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae			0,031	0,010
Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	*Desulfovibrio*			0,032
FAC87			0,594		
GMD14H09				0,046	0,108
MIZ46			0,031		
Myxococcales			0,111	0,005	0,169
Myxococcales	Haliangiaceae		0,088	0,006	
Myxococcales	Nannocystaceaeg	*Plesiocystis*		0,087	
Myxococcales	OM27			0,049	0,005
NB1-j	MND4		0,045	0,008	
Spirobacillales			0,700	0,017	
Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae		0,016		0,007
Epsilonproteobacteria					
Campylobacterales	Campylobacteraceae	*Arcobacter*		0,024	5,281
Campylobacterales	Helicobacteraceae				0,003
Campylobacterales	Helicobacteraceae	*Sulfurimonas*	0,041	0,049	0,009
Gammaproteobacteria				0,007	0,004
Alteromonadales	Ostalo	Oostalo		0,009	
Alteromonadales				0,004	
Alteromonadales	Alteromonadaceae	Ostalo		0,015	
Alteromonadales	Alteromonadaceae	*HB2-32-21*	0,013	0,103	
Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Marinobacter*		0,030	
Alteromonadales	Alteromonadaceae	*nsmpVI18*	0,025	0,006	0,182
Alteromonadales	Colwelliaceae			0,003	3,121
Alteromonadales	Colwelliaceae	*Thalassomonas*			0,052
Alteromonadales	HTCC2188;g	*HTCC*		0,368	
Alteromonadales	J115			0,041	
Alteromonadales	OM60			0,011	0,008
Chromatiales			0,529	0,266	0,699
Chromatiales	Chromatiaceae	*Nitrosococcus*		0,045	
Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae		0,074	0,007	0,005
Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	*Halorhodospira*	0,217	3,795	
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae			0,006	
HTCC2188	HTCC2089			0,040	0,025

Tablica 7.1. Nastavak

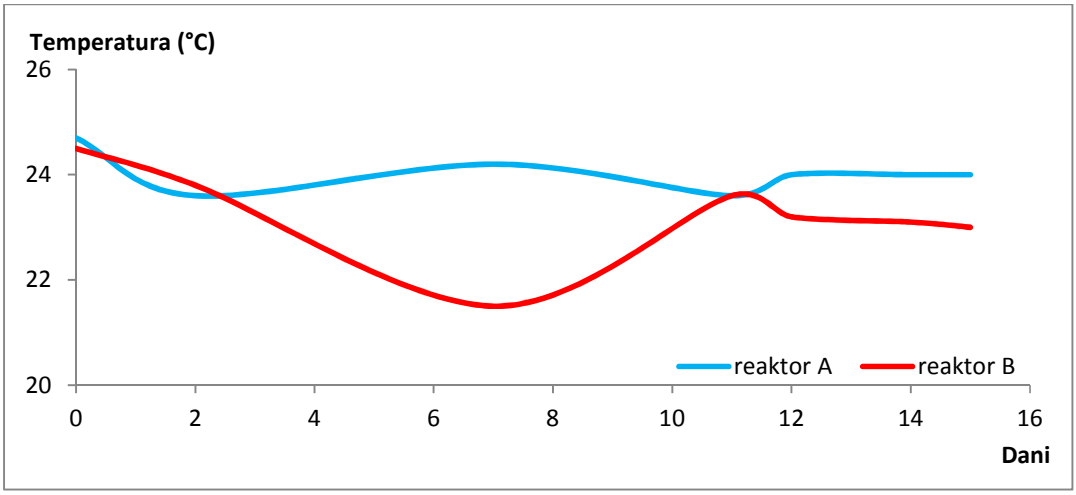
Legionellales			4,297	0,643	0,721
Legionellales	Coxiellaceae		0,393	0,096	
Legionellales	Legionellaceae		0,246	0,053	0,003
Legionellales	Legionellaceae	*Legionella*	0,467		
Oceanospirillales				0,022	
Oceanospirillales	Alcanivoracaceae	*Alcanivorax*		0,619	
Oceanospirillales	Halomonadaceae	Candidatus *Portiera*		0,004	
Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	*Oleibacter*		0,009	
Oceanospirillales	Oleiphilaceae			0,007	0,089
Pseudomonadales	Moraxellaceae		0,009		
Pseudomonadales	Moraxellaceae	*Acinetobacter*	0,163	1,240	0,028
Salinisphaerales				0,147	
Salinisphaerales	Salinisphaeraceae	Ostalo		0,072	
Salinisphaerales	Salinisphaeraceae	*Salinisphaera*		0,006	
Thiotrichales	Piscirickettsiaceae		0,153	0,345	0,043
Vibrionales	Pseudoalteromonadaceae	Ostalo		0,301	26,347
Vibrionales	Pseudoalteromonadaceae			0,047	7,158
Vibrionales	Pseudoalteromonadaceae	*Vibrio*			0,003
Vibrionales	Vibrionaceae	Ostalo			0,035
Vibrionales	Vibrionaceae	*Vibrio*		0,126	16,828
Xanthomonadales	Xanthomonadaceae			0,189	
Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Luteibacter*		0,054	
Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Luteimonas*		0,304	
Xanthomonadales	Sinobacteraceae		0,385		
[Marinicellales]	[Marinicellaceae]			0,022	
[Marinicellales]	[Marinicellaceae]	*Marinicella*		0,140	4,502
TA18					
PHOS-HD29			0,160		0,004
SBR1093					
VHS-B5-50			0,309	0,459	
Spirochaetes					
Spirochaetes					
Spirochaetales	Spirochaetaceae				0,014
[Leptospirae]					
[Leptospirales]	Leptospiraceae	*Leptonema*			0,197
TM6			0,005	0,067	
SJA-4					
S1198			0,275		
TM7					
MJK10			0,007		
SC3			0,029		
TM7-1			0,075	0,003	
TM7-3			0,020	0,084	
W055			0,100	0,009	

Tablica 7.1. Nastavak

Verrucomicrobia					
Opitutae				0,004	0,068
Opitutales	Opitutaceae		0,060		
Opitutales	Opitutaceae	*Opitutus*	0,079	0,229	0,012
Puniceicoccales	Puniceicoccaceae	Ostalo		0,048	
[Pelagicoccales]	[Pelagicoccaceae]	*Pelagicoccus*			0,050
Verrucomicrobiae					
Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae		0,110		
Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	*Verrucomicrobium*		0,107	
Verruco-5					
R76-B128					0,003
[Pedosphaerae]			0,183		
[Pedosphaerales]			0,117		
WPS-2					0,026
WS3					
PRR-12					
Sediment-1	CV106		0,083		
[Caldithrix]					
KSB1					
Ucn15732			11,781		
[Thermi]					
Deinococci					
Deinococcales	Trueperaceae	B-42		0,179	

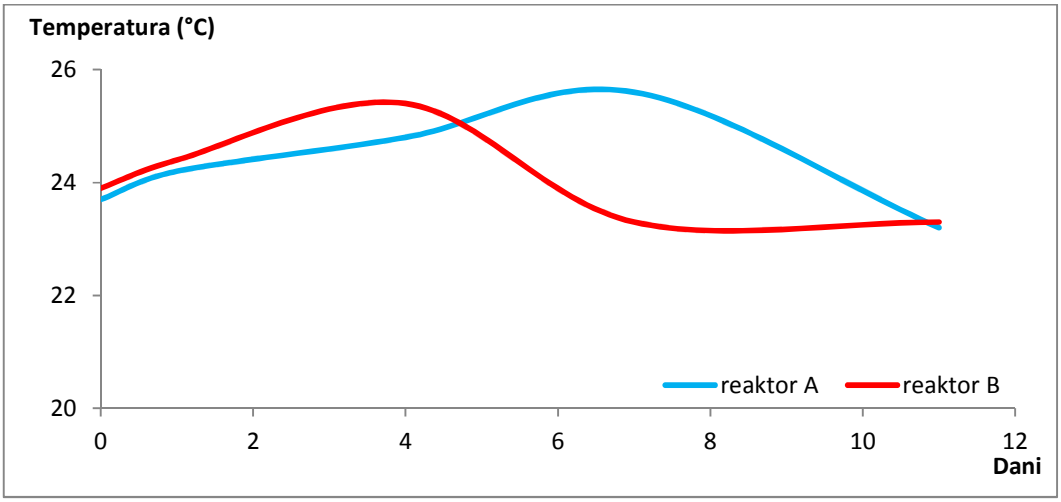
7.2. Faze oporavka denitrifikacijskih bakterija

Za vrijeme prve faze oporavka denitrifikacijskih bakterija vrijednost saliniteta je konstantno iznosila 32,0 u oba reaktora, a temperatura je varirala od 23,8 do 24,2 °C u denitrifikacijskom bioreaktoru A te od 21,5 do 23,8 °C u reaktoru B (slika 7.2.1.).



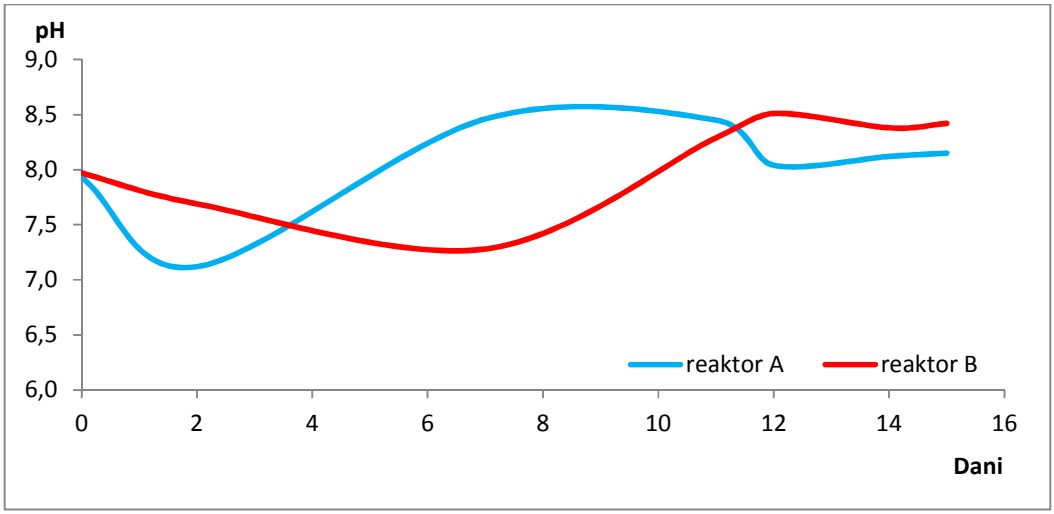
Slika 7.2.1. Vrijednosti saliniteta u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Za vrijeme druge faze oporavka denitrifikacijskih bakterija u oba reaktora je zabilježena konstantna vrijednost saliniteta od 32,8, dok se temperatura kretala od 23,9 do 25,6 °C u bioreaktoru A te od 23,3 do 25,4 °C u reaktoru B (slika 7.2.2.).



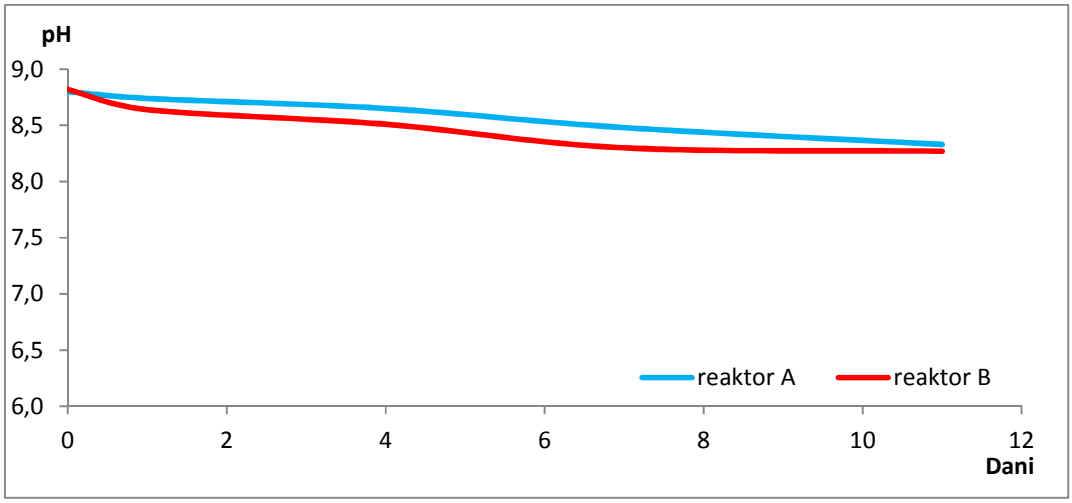
Slika 7.2.2. Vrijednosti saliniteta u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Tijekom prve faze oporavka denitrifikacijskih bakterija u bioreaktoru A zabilježene su pH vrijednosti u rasponu od 7,12 do 8,45, a u reaktoru B u rasponu od 7,28 do 8,51 (slika 7.2.3.).



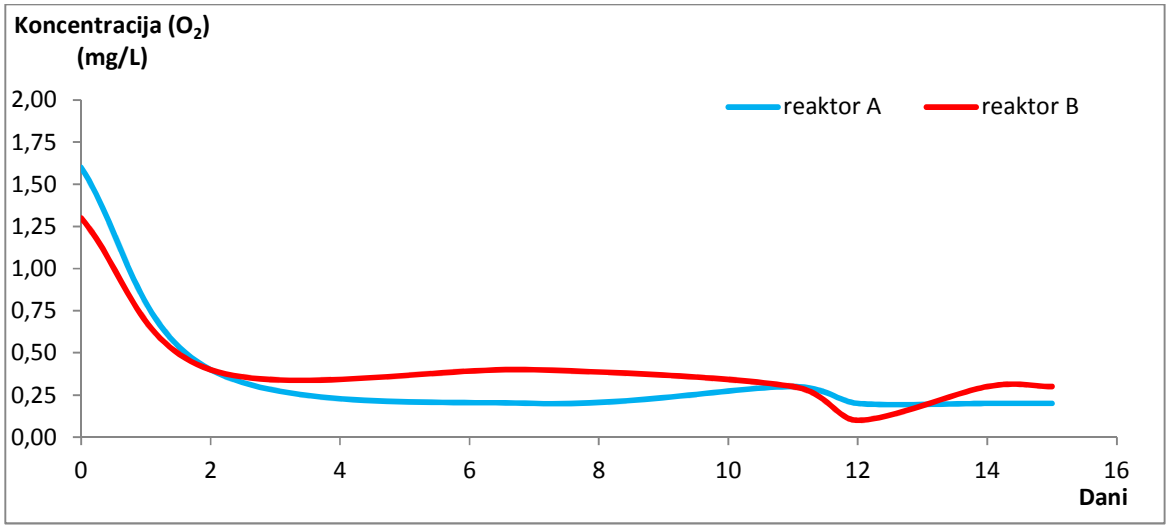
Slika 7.2.3. pH vrijednost u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Tijekom druge faze oporavka denitrifikacijskih bakterija pH vrijednosti su se smanjivale od početne od 8,64 u oba bioreaktora do 8,33 u bioreaktoru A i 8,27 u reaktoru B (slika 7.2.4.).



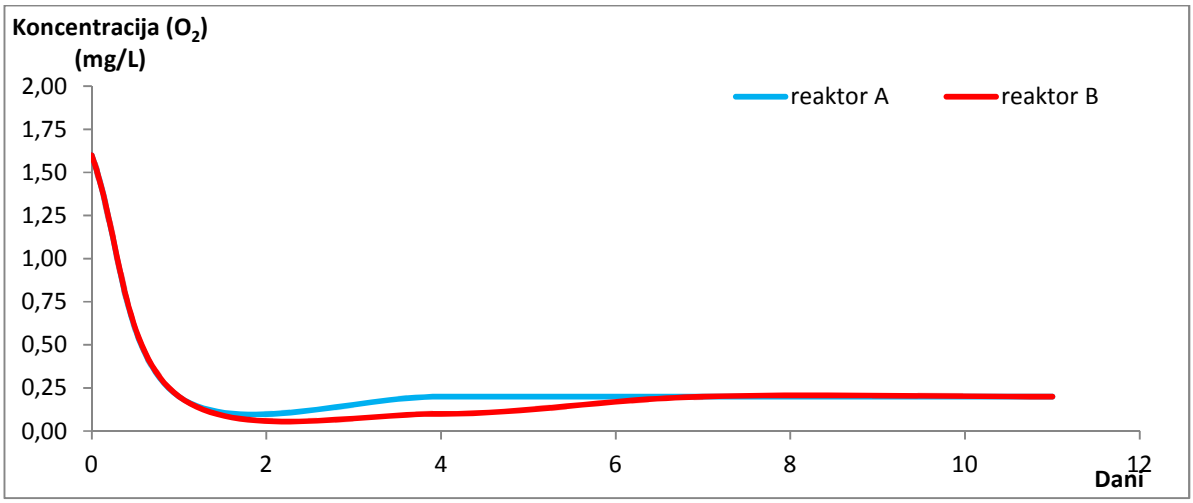
Slika 7.2.3. pH vrijednost u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Najveće vrijednosti koncentracije kisika zabilježene su na početku prve faze oporavka: 1,6 mg/L u denitrifikacijskom bioreaktoru A te 1,3 mg/L u bioreaktoru B, dok je najniža vrijednost u reaktoru A bila 0,2 mg/L, a u reaktoru B 0,1 mg/L (slika 7.2.5.).



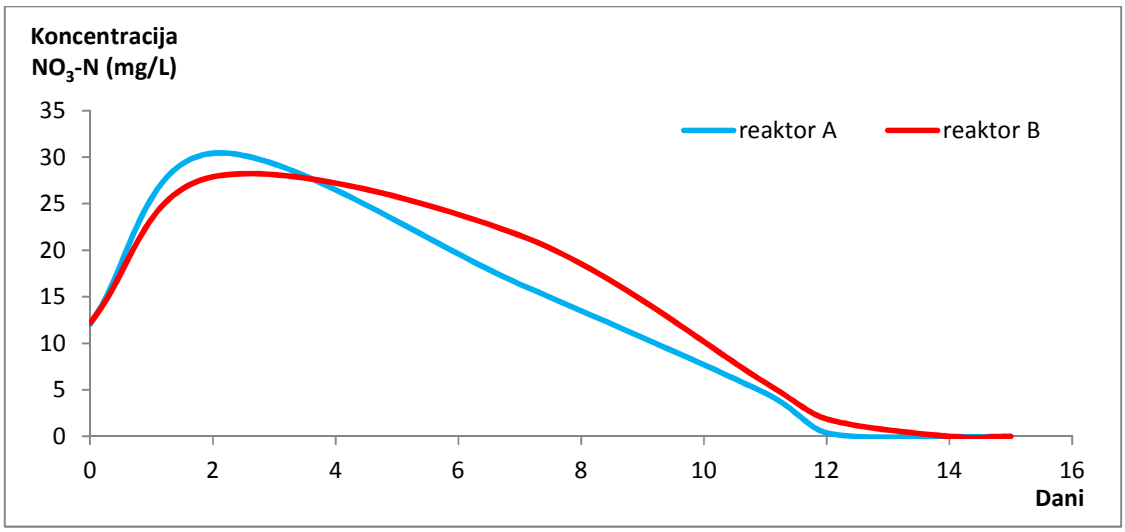
Slika 7.2.5. Koncentracija kisika (O_2) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Najveća vrijednost koncentracije kisika od 1,6 mg/L zabilježena je na samom početku druge faze oporavka u oba denitrifikacijska bioreaktora, dok je najniža vrijednost u bioreaktoru A iznosila 0,2 mg/L, a u bioreaktoru B 0,1 mg/L (slika 7.2.6.).



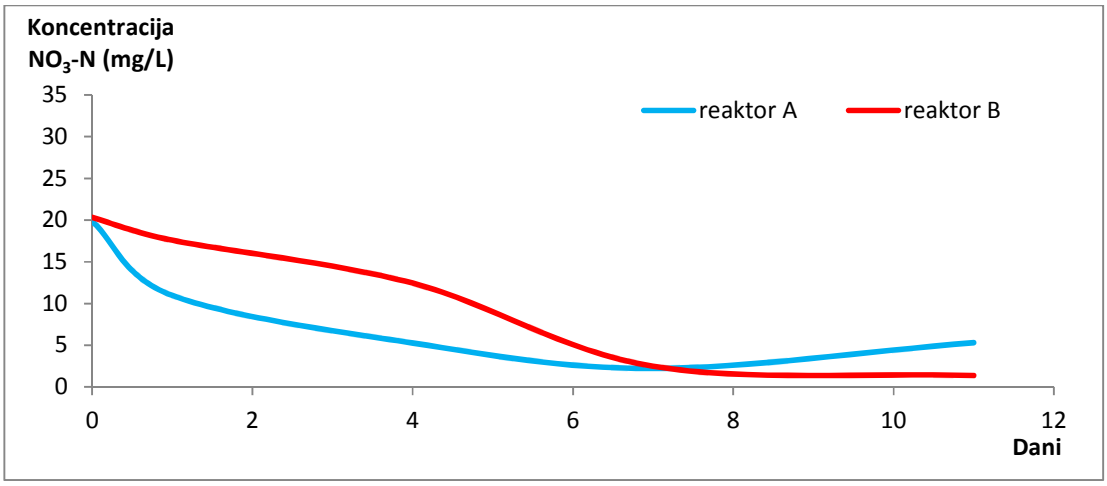
Slika 7.2.6. Koncentracija kisika (O_2) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Najveća izmjerena vrijednost koncentracije nitratnog dušika u denitrifikacijskom bioreaktoru A tijekom prve faze oporavka iznosila je 30,43 mg/L, a u bioreaktoru B 21,60 mg/L, dok je najniža vrijednost od 0 mg/L zabilježena u oba reaktora (slika 7.2.5.).



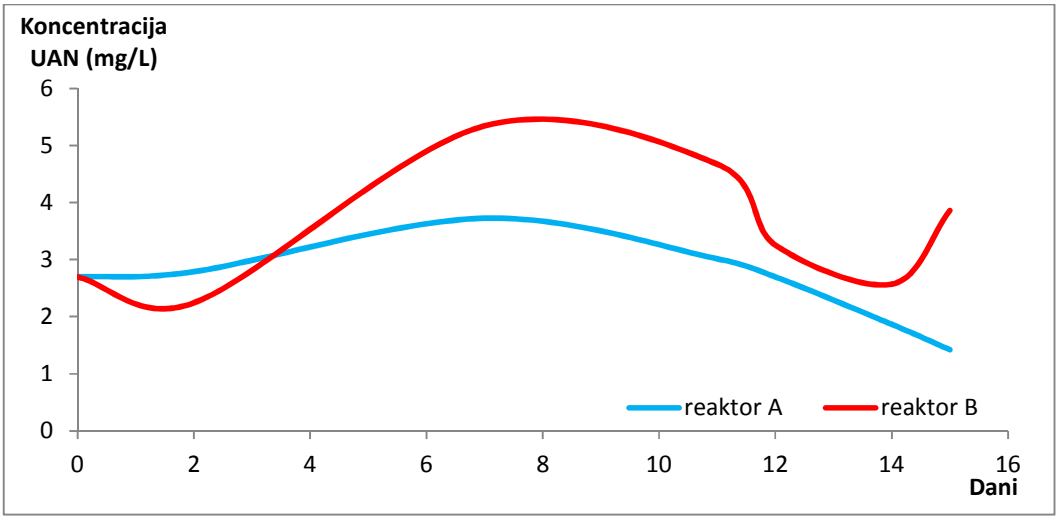
Slika 7.2.5. Koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Vrijednost koncentracije nitratnog dušika tijekom druge faze oporavka u denitrifikacijskom bioreaktoru A su se kretale od 5,31 do 19,87 mg/L, a u reaktoru B od 1,37 do 20,32 mg/L (slika 7.2.6.).



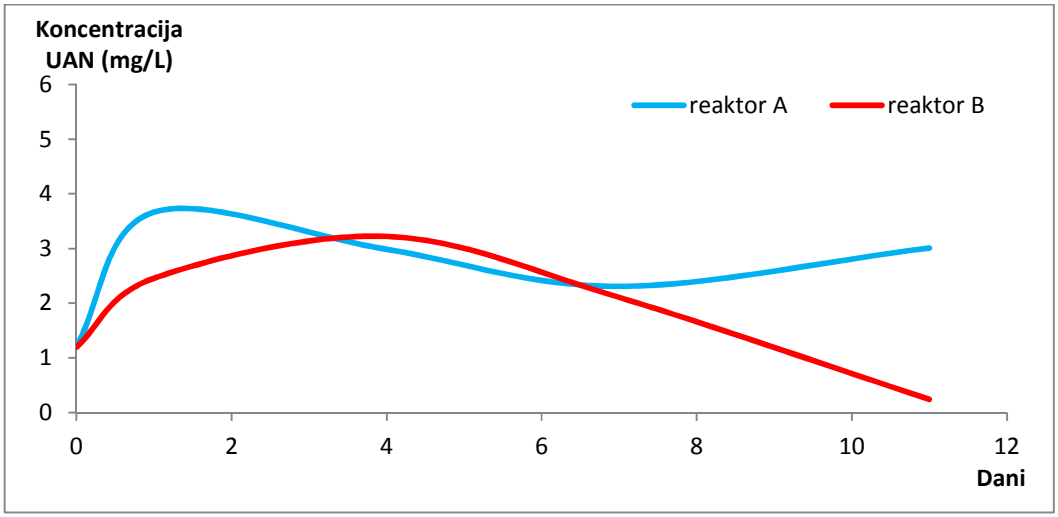
Slika 7.2.6. Koncentracija nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Vrijednosti koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika tijekom prve faze oporavka u bioreaktoru A su varirale od 1,42 do 3,73 mg/L, a u reaktoru B u 2,24 do 4,67 mg/L (slika 7.2.7.).



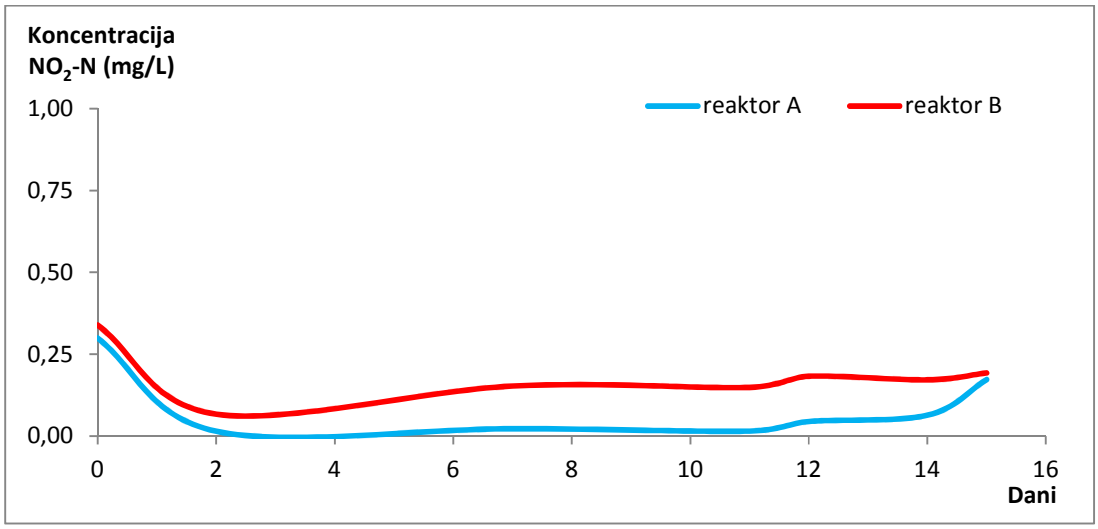
Slika 7.2.7. Koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Za vrijeme druge faze oporavka u oba denitrifikacijska bioreaktora zabilježena je najniža vrijednost koncentracije UAN 1,20 mg/l, dok je najveća vrijednost zabilježena u reaktoru A iznosila 2,99 mg/L, a u reaktoru B 2,11 mg/L (slika 7.2.8.).



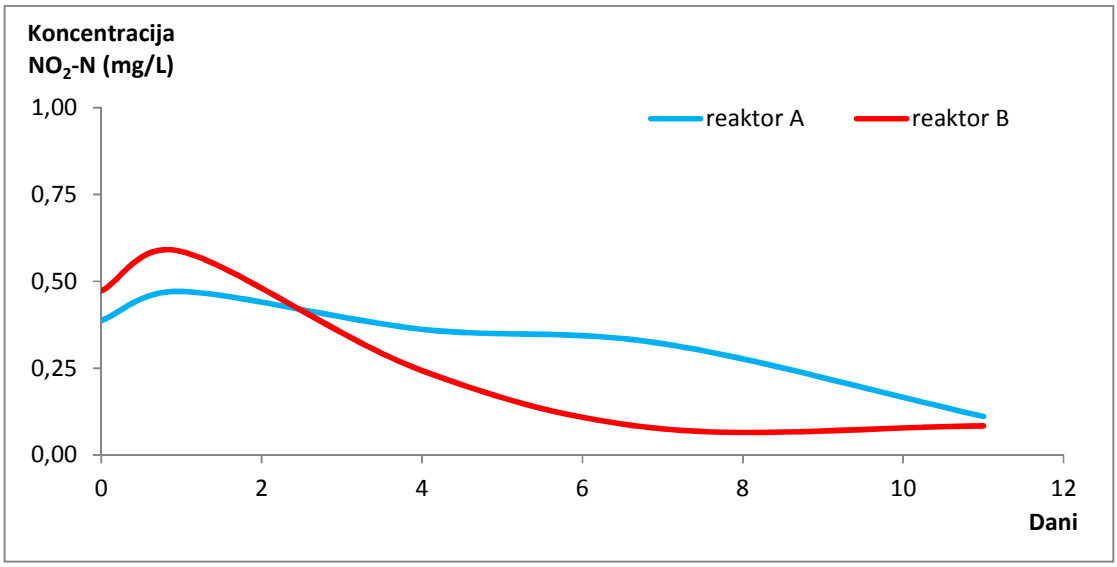
Slika 7.2.8. Koncentracije ukupnoga amonijakalnog dušika (UAN) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Koncentracija nitritnog dušika tijekom prve faze oporavka denitrifikacijskih bakterija u reaktoru A kretala se od 0,02 do 0,30 mg/L, a u reaktoru B od 0,07 do 0,34 mg/L, (slika 7.2.9.).



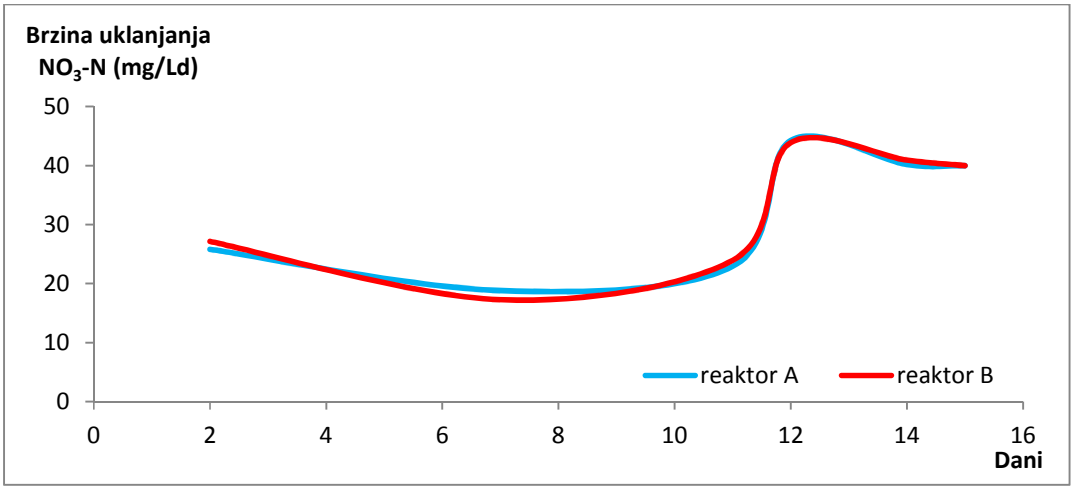
Slika 7.2.9. Koncentracije nitritnog dušika (NO_2-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Koncentracija nitritnog dušika tijekom prve faze oporavka denitrifikacijskih bakterija u reaktoru A kretala se od 0,11 do 0,47 mg/L, a u reaktoru B od 0,08 do 0,59 mg/L (slika 7.2.10.).



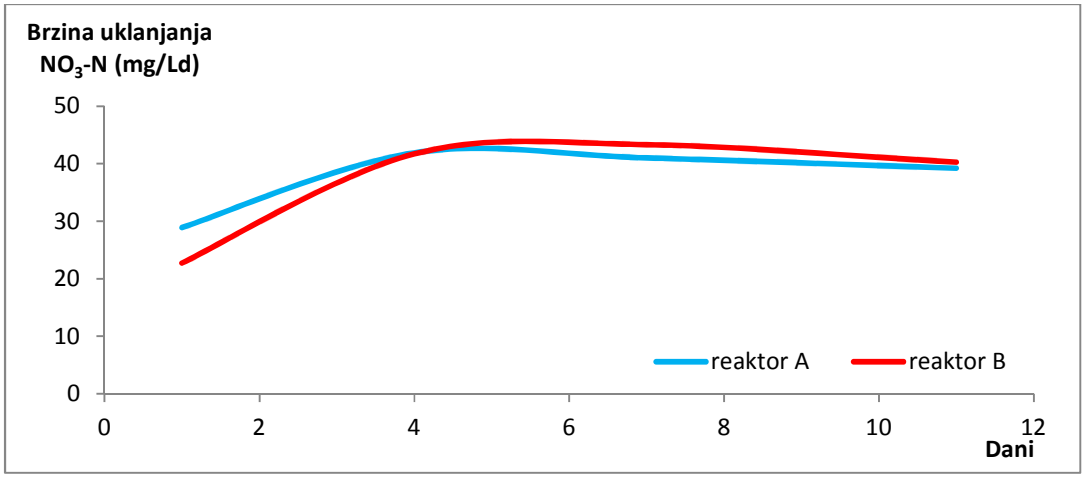
Slika 7.2.10. Koncentracije nitritnog dušika (NO_2-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Brzina uklanjanja nitratnog dušika tijekom prve faze oporavka denitrifikacijskih bakterija bioreaktorima A i B od 12. dana bila je konstantna oko 40 mg/Ld kada su zabilježene i najveće vrijednosti od 44,27 mg/Ld u reaktoru A i 43,91 mg/Ld u reaktoru B (slika 7.2.11.).



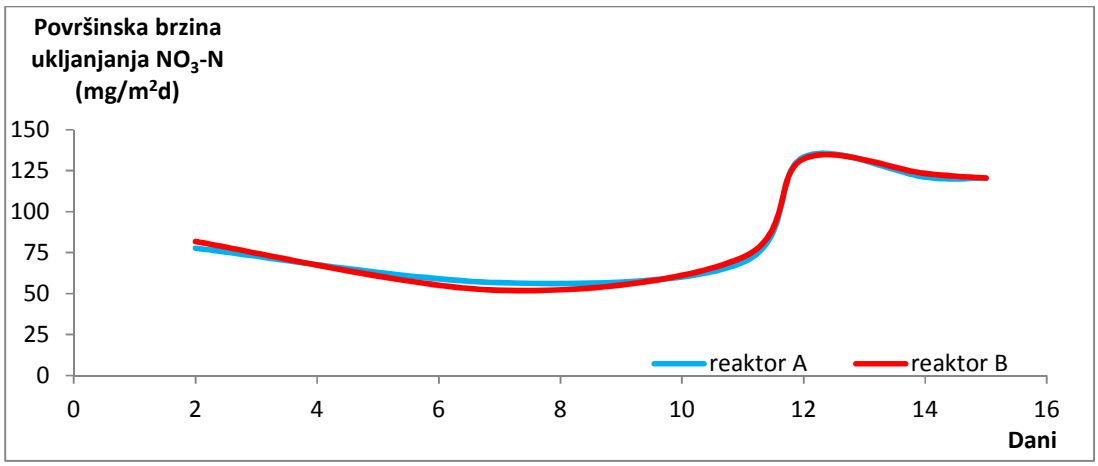
Slika 7.2.11. Brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Brzina uklanjanja nitratnog dušika tijekom druge faze oporavka denitrifikacijskih bakterija bioreaktorima A i B bila je konstantna oko 40 mg/Ld od 4. dana kada je zabilježena najveća vrijednosti od 41,90 mg/Ld u reaktoru A, dok je najveća vrijednost od 43,32 mg/Ld u reaktoru B zabilježena 7. dan (slika 7.2.12.).



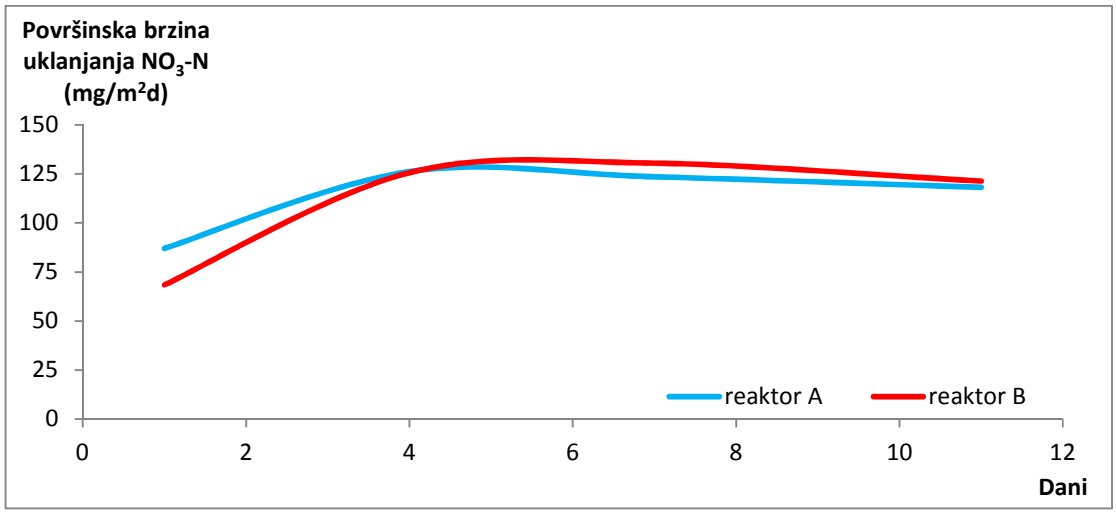
Slika 7.2.12. Brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N) u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika tijekom prve faze oporavka u oba denitrifikacijska reaktora je od 12. dana bila konstantna na oko 121 mg/m^{2}d kada su zabilježene najveće vrijednosti od 133,33 mg/m^{2}d u reaktoru A i 132,25 mg/m^{2}d u reaktoru B (slika 7.2.13.).



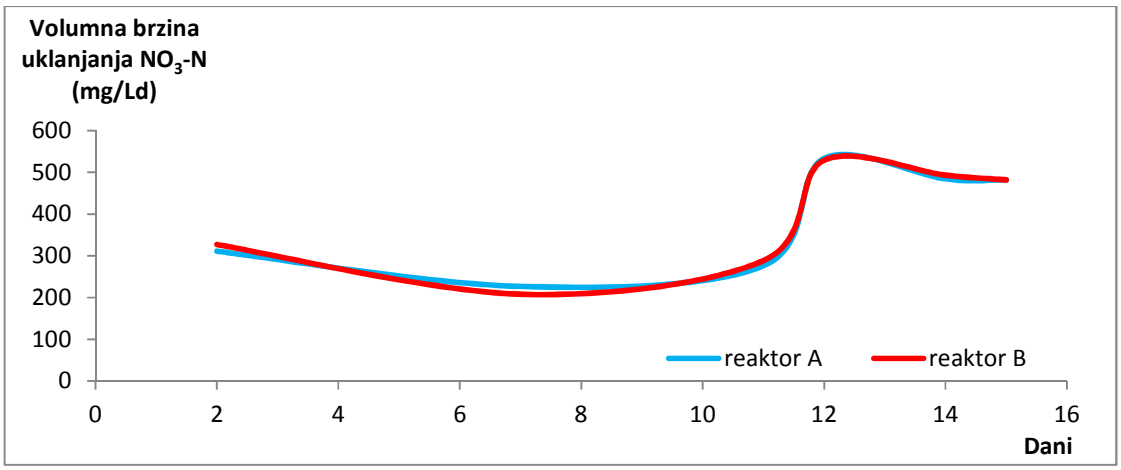
Slika 7.2.13. Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N)u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika tijekom druge faze oporavka u oba denitrifikacijska reaktora je od 7. dana bila konstantna na oko 121 mg/m^{2}d kada su zabilježene najveće vrijednosti od 123,54 mg/m^{2}d u reaktoru A i 130,48 mg/m^{2}d u reaktoru B (slika 7.2.14.).



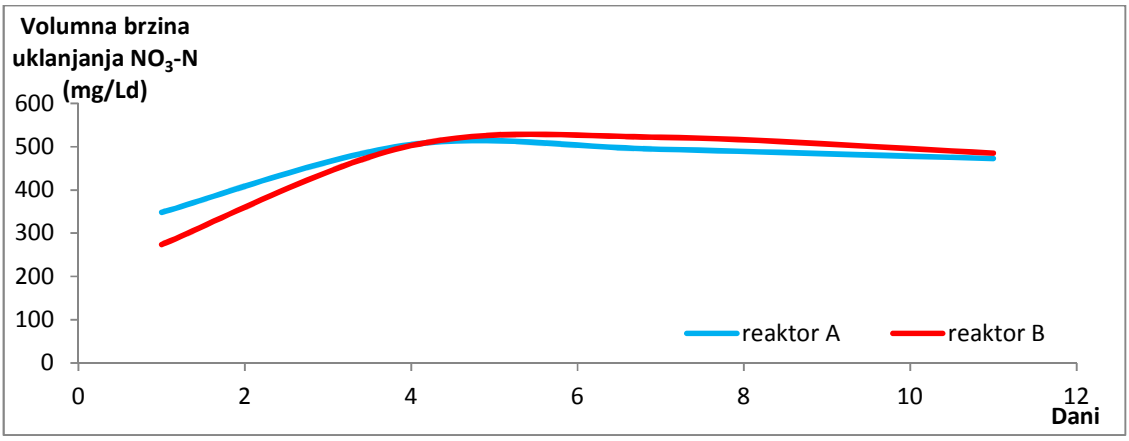
Slika 7.2.14. Površinska brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N)u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika tijekom prve faze oporavka u oba denitrifikacijska reaktora je od 12. dana bila konstantna na oko 485 mg/Ldan kada su zabilježene najveće vrijednosti od 533,33 mg/Ldan u reaktoru A i 528,99 mg/Ldan u reaktoru B (slika 7.2.15.).



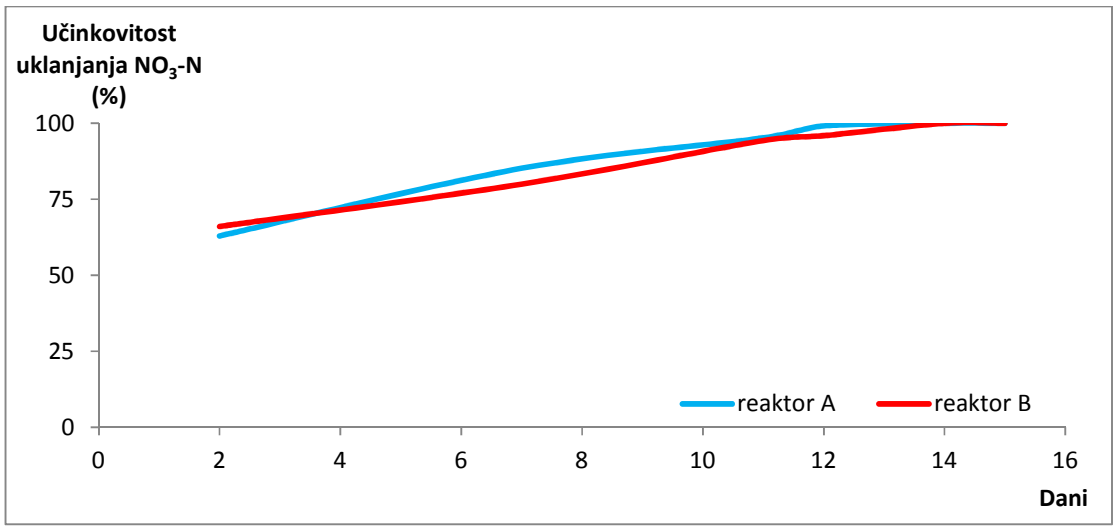
Slika 7.2.15. Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N)u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika tijekom druge faze oporavka u oba denitrifikacijska reaktora je od 7. dana bila konstantna na oko 485 mg/Ldan kada su zabilježene najveće vrijednosti od 494,18 mg/Ldan u reaktoru A i 521,92 mg/Ldan u reaktoru B (slika 7.2.16.).



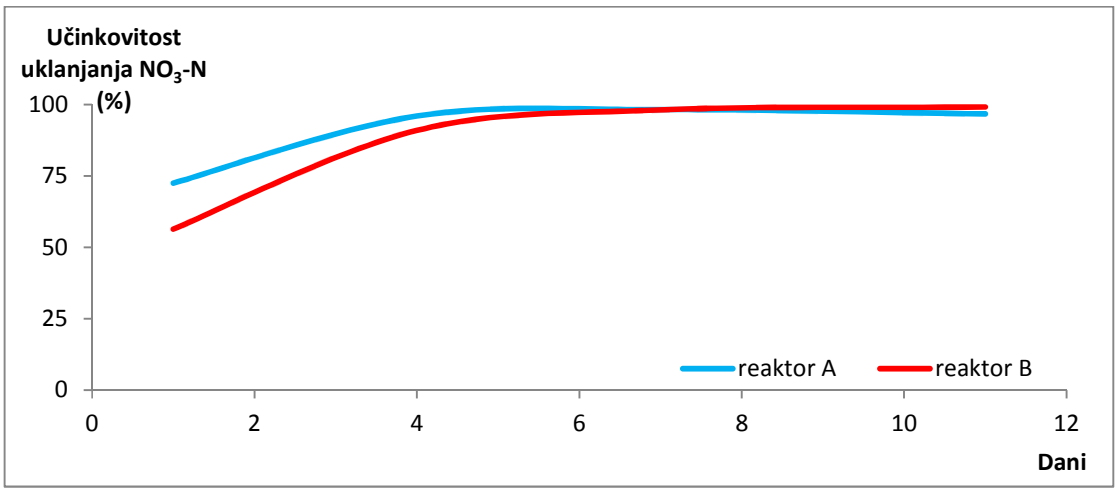
Slika 7.2.16. Volumna brzina uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N)u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika za vrijeme prve faze oporavka denitrifikacijskih bakterija 100% -tna vrijednost dostignuta je 14. dan u oba reaktora (slika 7.2.17.).



Slika 7.2.17. Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N)u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom prve faze oporavka.

Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika za vrijeme druge faze oporavka denitrifikacijskih bakterija maksimalne vrijednosti od 98,2% u reaktoru A i 99,16% u reaktoru B, zabilježene su 7. odnosno 11. dan (slika 7.2.18.).



Slika 7.2.18. Učinkovitost uklanjanja nitratnog dušika (NO_3-N)u denitrifikacijskim reaktorima A i B tijekom druge faze oporavka.

ŽIVOTOPIS

Marina Brailo rođena je 6. ožujka 1981. godine u Dubrovniku gdje završava osnovnu i srednju školu. Akademske godine 1999./2000. upisuje dodiplomski studij Biotehnologije na Prehrambeno-bitehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biokemijsko inženjerstvo i diplomira 21. prosinca 2006. godine s temom „Mikroorganizmi aktivnog mulja u razgradnji sastojaka u otpadnoj vodi grada Velika Gorica“ uz mentorstvo dr. sc. Tibele Landeka Dragičević, doc. Međusveučilišni poslijediplomski doktorski studij „Primijenjene znanosti o moru“ pri Sveučilištu u Splitu i Sveučilištu u Dubrovniku upisuje u akademskoj godini 2006./2007. Od listopada 2007. godine zaposlena je kao asistent na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku gdje sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskom studiju „Akvakultura“ i diplomskom studiju „Marikultura“.

Od listopada 2009. do siječnja 2010. godine kao dobitnica stipendije za doktorande Hrvatske zaklade za znanost, boravi na stručnom usavršavanju u Centru za biotehnologiju mora Biotehnološkog Instituta Sveučilišta Maryland u Baltimoreu, SAD. Sudjelovala je na nekoliko znanstvenih projekata: „Reproduktivne genetičke i uzgojne značajke organizama zanimljivih za marikulturu“, „Istraživanje na području značajnog krajobraza „Konavoski dvori““, „Gornji Majkovi – lokve: značajke staništa riječne kornjače *Mauremys rivulata*“, „Ušće Neretve – je li ugrožena bioraznolikost?“, „Praćenje stanja vode u jami u Predolcu“, „Primjena bioloških metoda konzerviranja proizvoda akvakulture – ekološki način povećanja sigurnosti i održivosti“ te „Ballast Water Management System for Adriatic Sea Protection“. Koautor je nekoliko znanstvenih i stručnih radova, a sudjelovala je na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova i radionica.

Popis radova:

Schreier, H.; Dejtisakdi, W.; Escalante, J.; Brailo, M. (2012) Transposon mutagenesis of *Planctomyces limnophilus* and analysis of a pckA mutant. Applied and Environmental Microbiology. 78 (19); 7120-7123.

Pećarević, M., Mikuš, J., Bratoš Cetinić, A., Marčelja, E. Bonačić, K., Brailo, M., Lovrić, J. (2012) Učinak sustava za tretiranje vodenog balasta na preživljavanje prirodnih populacija zooplanktona u plovidbenim uvjetima na brodu "Naše more". Naše more : znanstveni časopis za more i pomorstvo. 59 (5-6); 243-253.

Šarić, I., Brailo, M., Gavrilović, A.; Jug–Dujaković, J. (2010) Biološki filtri u akvakulturi. Ribarstvo 68 (3): 117-132.

Bratoš Cetinić, A., Mikuš, J., Glamuzina, B., Prusina, I., Brailo, M., Pećarević, M. (2015.). Populacije školjkaša donjeg toka rijeke Neretve. U: Knjiga sažetaka Zaštita voda u kršu. 2 znanstveno-stručna konferencija s međunarodnim sudjelovanjem (Pilić, Z., Škobić, D. (ur.)). Fakultet prirodoslovno matematičkih i odgojnih zanosti Sveučilišta u Mostaru, Mostar. 77.

Mikuš, J., Pećarević, M., Gavrilović, A., Brailo, M., Bratoš-Cetinić, A., Crnčević, M. 2015. Gornji Majkovi – lokve: značajke staništa riječne kornjače *Mauremys rivulata* (Valenciennes,1833). U: Knjiga sažetaka Zaštita voda u kršu. 2 znanstveno-stručna konferencija s međunarodnim sudjelovanjem (Pilić, Z., Škobić, D. (ur.)).Fakultet prirodoslovno matematičkih i odgojnih zanosti Sveučilišta u Mostaru, Mostar. 78-80.

Cîntă Pînzaru, S.; Herman, C.; Venter M.; Brailo, M.; Glamuzina, B. (2012) Seawater Anions, Salinity And Organic Content Simultaneously Assessed By Surface Enhanced Raman Scattering. U: Book of abstracts from 31st European Congress On Molecular Spectroscopy. (Nagy-Póra, K., Chiş, V., Aştilean, S., Cozar, O. (ur.)). Cluj-Napoca: Napoca Star, 87.

Brailo, M.; Gavrilović, A.; Jug-Dujaković, J.; Ljubičić, A.; Van Gorder, S. (2011) Influence of the water quality parameters on the condition index of the European flat oyster *Ostrea edulis*. U: Book of abstract from 46th European Marine Biology Symposium (Travizi, A.; Iveša, Lj.; Fafanđel, M. (ur.)). Institute Ruđer Bošković, Rovinj. 71.