Potencijal funkcionalnih skupina praživotinja u aktivnom mulju kao indikatora učinkovitosti pročišćavanja otpadnih voda

Kepec, Mirjana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:228441

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Mirjana Kepec

Potencijal funkcionalnih skupina praživotinja u aktivnom mulju kao indikatora učinkovitosti pročišćavanja otpadnih voda

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE

DIVISION OF BIOLOGY

Mirjana Kepec

Potential of protozoan functional groups in activated sludge as an indicator of wastewater treatment efficiency

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.

Ovaj je doktorski rad izrađen pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Renate Matoničkin Kepčija, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvale

Najsrdačnije se zahvaljujem svoj mentorici izv. prof. dr. sc. Renati Matoničkin Kepčija koja mi je toliko pomagala i vjerovala u mene.

Također se zahvaljujem i prof. dr. sc. Biserki Primc na svesrdnoj pomoći. Izražavam zahvalnost i prof. dr. sc. Tibeli Landeka Dragičević koja mi je bez imalo oklijevanja također dala podršku.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji koji su također bili uz mene, a posebno suprugu koji mi je puno pomagao.

Svojim sinovima posvećujem ovaj rad sa porukom da nikad ne odustaju od svojih snova.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

POTENCIJAL FUNKCIONALNIH SKUPINA PRAŽIVOTINJA U AKTIVNOM MULJU KAO INDIKATORA UČINKOVITOSTI PROČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA

MIRJANA KEPEC

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

Sastav zajednica protozoa i mikro-metazoa motren je u aktivnom mulju uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u korelaciji s učinkom pročišćavanja. Istražena su dva režima rada uređaja kroz više mjeseci: pročišćavanje komunalne otpadne vode (K) i miješane komunalne i industrijske otpadne vode (K+I). Određen je biotički indeks aktivnog mulja (SBI) od 6 do 10, koji je indicirao dobro stanje aktivnog mulja i dobru učinkovitost pročišćavanja. Fizikalno-kemijski (električna vodljivost, suspendirane tvari, KPK, BPK_5) i mikrobiološki parametri (ukupan broj bakterija, koliformne bakterije, *Escherichia coli*, sulfit-reducirajuće bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* i kvasci) ukazali su na visoku učinkovitost pročišćavanja, uglavnom >95 %, uz iznimku pojedinih bakterija (enterokoki) i hranjivih soli. Sastav mikrobnih zajednica razlikovao se između dva režima rada, a stanje aktivnog mulja bilo je povoljnije tijekom K+I režima. U aktivnom mulju određeno je 38 svojti praživotinja i sitnih beskralježnjaka, uz dominaciju trepetljikaša (27 svojti), posebice svojti Peritrichia. Potvrđena je korelacija ključnih indikatorskih skupina s parametrima influenta i efluenta te s učinkovitosti pročišćavanja. Pristup baziran na pojedinim svojtama ukazao je na visoki indikatorski potencijal vrsta *Vorticella convalaria, Vorticella microstoma, Opercularia coarctata* i *Aspidisca cicada.*

(84 stranice, 24 slike, 16 tablica, 81 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: protozoa, trepetljikaši, biotički indeks aktivnog mulja, indikatorske vrste

Mentor: izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

Ocjenjivači:

1. doc. dr. sc. Tomislav Ivanković
2. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević
3. izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

POTENTIAL OF PROTOZOAN FUNCTIONAL GROUPS IN ACTIVATED SLUDGE AS AN INDICATOR OF WASTEWATER TREATMENT EFFICIENCY

MIRJANA KEPEC

Faculty of Science, Division of Biology

Protozoan and micro-metazoan assemblages were investigated in activated sludge of wastewater treatment facility in correlation with wastewater purification efficiency. Two different campaigns were analysed through several months: purification of municipal wastewater (K) and combined municipal and industrial wastewater (K+I). Sludge biotic index (SBI) was between 6 and 10, indicating good status of activated sludge and good purification efficiency. Physico-chemical (elektrical conductivity, suspended solids, COD, BOD_5) and microbiological parameters (total bacteria, coliforms, *Escherichia coli*, sulfit-reducing bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and yeasts) also indicated high purification efficiency, mostly > 95 %, with the exception of certain bacteria (enterococci) and nutrients. Microbial assemblage composition differed between the two campaigns, and the activated sludge status was better during K+I campaign. There were 38 taxa of protozoa and micro-metazoa in activated sludge, with the domination of ciliates (27 taxa), especially Peritrichia. Key indicator groups correlated well with purification efficiency and with influent and effluent parameters. Species-specific approach indicated high indicator potential of several taxa: *Vorticella convalaria*, *Vorticella microstoma*, *Opercularia coarctata* and *Aspidisca cicada*.

(84 pages, 24 figures, 16 tables, 81 references, original in Croatian)

Keywords: protozoa, ciliates, Sludge Biotic Index, indicator species

Supervisor: PhD Renata Matoničkin Kepčija, Associated Professor

Reviewers:
1. PhD Tomislav Ivanković, Assistant Professor
2. PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor
3. PhD Jasna Lajtner, Associated Professor

SADRŽAJ

1.UVOD 1

1.1. Cilj i hipoteze istraživanja 5

2. LITERATURNI PREGLED 7

2.1. Sastav otpadnih voda i izvori onečišćenja 7

2.1.1. Nova zagađivala 8

2.1.2. Sastav komunalnih otpadnih voda i industrijskih otpadnih voda tvornica šećera ... 8

2.2. Aktivni mulj 9

2.2.1. Sastav aktivnog mulja 11

Trepetljikaši 14

Ključne grupe trepetljikaša 17

Ostale ključne grupe 21

3. MATERIJALI I METODE 25

3.1. Uređaj za biološko pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici 25

3.2. Uzorkovanje 28

3.2.1. Otpadna voda (influent i efluent) 29

3.2.2. Aktivni mulj 30

3.3. Fizikalno-kemijske analize 30

3.4. Mikrobiološke analize 31

3.5. Biotički indeks aktivnog mulja 32

3.5.1. Analiza mikrofaune 35

3.5.2. Mikrobiološke analize aktivnog mulja 36

3.6. Lizosomski biomarkeri 37

3.7. Statističke metode 38

4. REZULTATI 39

4.1. Parametri otpadne vode: ulaz (influent) i izlaz (efluent) 39

4.1.1. Fizikalno-kemijski parametri 39
4.1.2. Mikrobiološke analize otpadne vode (influent i efluent) 48
4.2. Aktivni mulj 58
4.2.1. Biotički indeks aktivnog mulja 58
4.2.2. Mikrobiološke analize aktivnog mulja 66
5. RASPRAVA 68
6. ZAKLJUČAK 77
7. LITERATURA 79
ŽIVOTOPIS

1. UVOD

Biološki proces pročišćavanja otpadnih voda baziran na aktivnom mulju temelji se na prirodnoj sposobnosti mikrobnih zajednica da razgrađuju organsko i anorgansko onečišćenje (Foissner, 2016). Aktivni mulj je umjetni ekosustav, koji se razlikuje od prirodnog vodenog ekosustava po visokim vrijednostima ulaznog organskog onečišćenja, ubrzanom procesu razgradnje, kratkom vremenu zadržavanja te dominaciji heterotrofnih organizama. Ovaj sustav može se promatrati i kao kontinuirana kultura (Leal i sur., 2013). Dominantni organizmi u aktivnom mulju su bakterije, i u brojnosti i u biomasi (Madoni, 2011) te čine oko 90 % ukupne mase aktivnog mulja (Pike, 1975). Bakterije imaju veliku važnost u uklanjanju organskih i anorganskih tvari iz otpadne vode. Zbog svojstava aktivnog mulja, među eukariotima su jedino protozoa (praživotinje) i neki sitni beskralježnjaci, sa životnim ciklusom kraćim od vremena retencije mulja, sposobni preživjeti i biti kompetitivni u ovom umjetnom ekosustavu (Antonietti i sur., 1981). Protozoa su uobičajena biota aktivnog mulja u postrojenjima za obradu otpadnih voda (Foissner, 2016), a kako se dio vrsta hrani bakterijama, održavaju njihove populacije u ravnoteži i osiguravaju re-mineralizaciju hranjivih soli. Svojte protozoa koje se hrane skupljajući hranu filtriranjem iz struje vode dodatno aeriraju i miješaju čestice mulja i uklanjaju suspendirane čestice. Praživotinje predstavljaju tako drugu najvažniju skupinu u ovom umjetnom ekosustavu (Pauli i sur., 2001). Karakteristike flokule mulja i prisutnost određenih vrsta mikroorganizama je dobar pokazatelj rada postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda.

Brojni biološki indeksi su razvijeni za procjenu onečišćenja vodenih ekosustava. U Europi se za slatkovodne ekosustave koristi proširenI biotički indeks (engl. *extended biotic indeks*, EBI) (Woodiwiss, 1980) koji je baziran na makrobeskralježnjacima. Ova metoda se oslanja na promjenu sastava zajednica kako raste onečišćenje te na smanjenje broja taksonomskih grupa s porastom onečišćenja. Saprobni indeks (indeks saprobnosti) (Sladecek, 1973) uz razne modifikacije ostaje također jedan od standardno korištenih indeksa. Uz navedene indekse, u procjeni ekološkog stanja voda u zemljama Europske Unije koriste se različite metrike razvijene za pojedine biološke elemente kakvoće (makrobeskralješnjake, fitobentos, makrofita i ribe) prema Okvirnoj direktivi o vodama (engl. *Water framework directive*).

Protozoa su osjetljiviji na promjene uvjeta okoliša nego bakterije, primjerice na prisutnost toksičnih tvari ili nedostatak kisika. Neke grupe protozoa, posebno trepetljikaši, mogu se brzo adaptirati na prevladavajuće uvjete u aktivnom mulju. Dominacija pojedinih skupina ukazuje na organsko opterećenje i, s njim povezanu, koncentraciju kisika (Drzewicki i Kulikowska, 2011). Korelacija između sastava protozoa i učinkovitosti pročišćavanja otpadnih voda (Junkins i sur., 1983; Madoni, 2011) čini protozoa vrijednim indikatorima u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda. Nekoliko indeksa je razvijeno zahvaljujući bioindikatorskim svojstvima praživotinja (Foissner, 2016), kao što je biotički indeks aktivnog mulja (engl. *Sludge Biotic Index*, SBI), kojeg je predložio Madoni (1994). Ovaj indeks se bazira na ključnim grupama protozoa, s naglaskom na trepetljikaše i kombinira sastav, raznolikost i brojnost mikrofaune. SBI omogućava određivanje biološke kvalitete mulja, koja se izražava numeričkim vrijednostima (od 0 do 10), te je u korelaciji s ekološkim uvjetima na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda. Biotički indeks aktivnog mulja se pokazao brzim, pouzdanim i objektivnim indikatorom za različite sustave pročišćavanja otpadnih voda s aktivnim muljem, uključujući industrijske otpadne vode (Arévalo i sur., 2009; Leal i sur., 2013; Pedrazzani i sur., 2016).

Međutim, biotički indeks aktivnog mulja je također kritiziran zbog manjka osjetljivosti, jer, primjerice, ponekad ukazuje na prvu klasu mulja, unatoč lošijoj kvaliteti otpadnih voda (Drzewicki i Kulikowska, 2011). Drzewicki i sur. (2017b) su tako pokazali da statičko magnetsko polje, kada se koristi u tretmanu otpadnih voda, ima različit učinak na SBI ključne grupe, a koje nisu u korelaciji s učinkovitosti pročišćavanja. Ove spoznaje ukazuju na ograničenu uporabljivost biotičkog indeksa mulja u nekonvencionalnom tretmanu otpadnih voda, što je također dokazano u istraživanju mikrofaune u aerobnim reaktorima zrnatog mulja (Drzewicki i sur., 2017a). Autori su pratili učinkovitost pročišćavanja i mikrofaunu tijekom obrade procjednih voda bogatih dušikom. Mikrofauna je imala malu raznolikost, a neke svojte poput *Vorticella infusionum* pokazale su gotovo suprotna svojstva bioindikacije u usporedbi s konvencionalnim aktivnim muljem.

Zajedničko pročišćavanje komunalnih i industrijskih otpadnih voda može imati štetan utjecaj na protozoa i sitne beskralježnjake. Pokazalo se da određeni toksični spojevi, koji mogu biti prisutni u industrijskim otpadnim vodama, ograničavaju primjenljivost biotičkog indeksa mulja u procjeni kvalitete aktivnog mulja (Papadimitriou i sur., 2007). Također, iznenadna vršna opterećenja organske tvari mogu destabilizirati mikrofaunu i tako utjecati na učinkovitost u pročišćavanju (Drzewicki i Kulikowska, 2011). Mikrofauna male raznolikosti, posebno na relativno visokim temperaturama, onemogućila je upotrebu SBI za procjenu učinkovitosti

pročišćavanja otpadnih voda iz proizvodnje celuloze i papira u UNOX sustavu (Bernat i sur., 2017).

Testovi akutne toksičnosti onečišćivača na trepetljikašima pokazali su da su ovi organizmi korisni bioindikatori za evaluaciju toksičnosti voda s prisutnim različitim koncentracijama metala (Madoni, 2011). Jedan od ekotoksikoloških testova je i praćenje stabilnosti lizosomske membrane. Okolišni stresori kao i toksične kemikalije uzrokuju promjene na membrani lizosoma, kao i degradaciju staničnih komponenti, a rezultiraju mnogim degradacijskim procesima, kao i smrću stanica. Ti procesi su vrlo slični kod svih eukariotskih organizama od kvasaca do čovjeka (Klionsky i Emr, 2000; Cuervo, 2004). Odgovori lizosomskog sustava mogu biti prognostički biomarkeri budući da oštećenja lizosoma prethode oštećenjima stanica i tkiva. Lizosomska oštećenja se koriste kao rani indikatori izloženosti onečišćivačima (Moore, 2002). Neki trepetljikaši su se također pokazali kao dobri indikatori izloženosti ksenobioticima, upravo pomoću testova stabilnosti lizosoma (Trielli i sur., 2007). Prednost praživotinja u testovima toksičnosti je njihova osjetljivost, budući da kao jednostanični organizmi brzo reagiraju na promjene u okolišu. Biološko pročišćavanje otpadnih voda bazirano na aktivnom mulju je uglavnom dizajnirano da održava veliku gustoću i aktivnost onih mikroorganizama koji učestvuju u različitim procesima pročišćavanja. Uporaba protozoa kao bioindikatora u ovom sustavu je stoga logična, a velika brojnost osigurava lagano dobivanje reprezentativnog uzorka.

Liste vrsta protozoa pronađenih u aktivnom mulju, s više od 200 identificiranih vrsta, objavili su brojni autori (Agersborg i Hatfield, 1929; Barker, 1943; Curds i Cockburn, 1970a). Potpunu listu objavio je Curds (1975). Navodi 228 vrsta protozoa, a najviše vrsta pripada skupini Ciliophora (trepetljikaši), oko 160 vrsta.

Ciliophora često u aktivnom mulju imaju najveću brojnost među eukariotima. Određene vrste su prisutne u velikom broju i karakteristične, primjerice: *Vorticella convallara*, *Opercularia microdiscum* i *Carchesium polypidnum*. Istraživanje o strukturi zajednica protozoa (Mistri i sur., 1994) pokazuje varijaciju gustoće pojedinih trepetljikaša. Trepetljikaši u aktivnom mulju se većinom hrane disperziranim populacijama bakterija. Bakterivorni trepetljikaši se mogu podijeliti u grupe s obzirom na način života: slobodno plivajuće, puzajuće i sesilne oblike, koji se čvrsto drže za flokulu mulja. Od puzajućih oblika, veliku gustoću imaju predstavnici podrazreda Hypotricha npr. *Aspidisca cicada,* a među pričvršćenim oblicima, kao što je navedeno, dominiraju predstavnici podrazreda Peritricha. Slobodno plivajući trepetljikaši

kao što su *Cyclidium glaucoma* i *Colpidium colpoda* su dominantni kad je organsko onečišćenje veće, dok su okućeni i pričvršćeni trepetljikaši kao *Epistylis plicatilis* i *Zoothamnium proceris* dominantni u kasnijim završnim fazama kad je BPK_5 nizak (Madoni, 2011).

U postrojenju s aktivnim muljem koje dobro funkcionira, unutar skupine protozoa dominantni su rodovi: *Vorticella, Carchesium, Zoothamnium, Euplotes* i *Aspidisca*. Komparativno istraživanje trepetljikaša u zajednici protozoa u postrojenjima sa aktivnim muljem (Martin-Cereceda i sur., 1996) pokazuje vezu najčešćih vrsta s operativnim parametrima postrojenja, sugerirajući indikatorske vrste.

U ovom istraživanju analizirani su aktivni mulj i otpadna voda s Uređaja za biološko pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Na uređaju se zajednički pročišćavaju komunalne vode grada i otpadne vode Tvornice šećera Viro. To je dvostupanjski anaerobno-aerobni proces. Otpadne vode šećerane, koje su puno većeg organskog opterećenja od komunalne otpadne vode, najprije prolaze anaerobnu fazu (anaerobni fermentor), a zatim se miješaju s gradskom otpadnom vodom u aeracijskim bazenima, gdje se završava razgradnja organske tvari pomoću mikroorganizama aktivnog mulja. Nakon aeracijskih bazena otpadna voda odlazi u sekundarne taložnice u kojima se taloži mulj, a pročišćena otpadna voda (efluent) se prelijeva u recipijent kanal Manteč, pa Županijski kanal i dalje u rijeku Dravu. Jedan dio aktivnog mulja (povratni mulj) se vraća iz sekundarnih taložnica u bioaeracijske bazene, a višak mulja se odlaže u lagune otpadnih voda šećerane.

Tijekom ovog istraživanja praćen je sastav zajednica protozoa i mikro-metazoa u aktivnom mulju u korelaciji s učinkom pročišćavanja. Po prvi put se na nekom uređaju u Hrvatskoj računao i biotički indeks aktivnog mulja, koji se računa na osnovu sastava ključnih funkcionalnih skupina trepetljikaša. Dobiveni rezultati SBI-a korelirali su se s analitičkim indeksima aktivnog mulja te fizikalno-kemijskim pokazateljima ulazne i izlazne vode. Paralelno se provelo laboratorijsko istraživanje u kojem je testirana mogućnost uporabe trepetljikaša aktivnog mulja u testovima stabilnosti lizosoma.

1.1. Cilj i hipoteze istraživanja

Struktura vrsta praživotinja u aktivnom mulju je indikator učinkovitosti postrojenja za pročišćavanje. Biotički indeks aktivnog mulja (SBI) razvijen je 90-ih godina prošlog stoljeća (Madoni, 1994) te je sintetizirao indikatorska svojstva ključnih svojti protozoa. SBI se koristi u postrojenjima za pročišćavanje te je njegova vrijednost kao brzog, pouzdanog i objektivnog indikatora potvrđena (npr. Arévalo i sur. 2009). U Hrvatskoj se rutinski provodi analiza prisustva/odsustva praživotinja, ali se ne koristi biotički indeks mulja (SBI) (osobna komunikacija).

Ciljevi ovog rada su:

1. utvrditi sastav zajednica protozoa u različitim ekološkim uvjetima na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda,

2. izračunati biotički indeks mulja i usporediti ga s analitičkim i mikrobiološkim parametrima na uređaju,

3. utvrditi utječe li miješanje industrijske otpadne vode s komunalnom otpadnom vodom na funkcionalne skupine praživotinja aktivnog mulja,

4. lizosomskim biomarkerima provjeriti prisustvo toksičnih supstanci tj. uzročnika okolišnog stresa,

5. utvrditi potencijal dominantnih svojti aktivnog mulja kao indikatora,

6. utvrditi koji je optimalni sastav zajednice protozoa za najbolji učinak pročišćavanja.

Na osnovu predloženih ciljeva istraživanja postavljene su radne hipoteze:

a) u zajednicama praživotinja dominiraju trepetljikaši, a udio pojedinih funkcionalnih skupina ukazuje na stanje aktivnog mulja,

b) biotički indeks aktivnog mulja je objektivan i primjenjiv pokazatelj rada uređaja te je njegova vrijednost značajno korelirana s analitičkim pokazateljima učinkovitosti pročišćavanja,

c) promjena ulaznog opterećenja i režima rada uređaja utječe na funkcionalne skupine praživotinja aktivnog mulja,

d) lizosomski biomarkeri dokazuju prisustvo/odsustvo okolišnih stresora,

e) dominantne svojte aktivnog mulja mogu se koristiti kao zasebni indikatori pojedinih uvjeta na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda.

Značaj ovog istraživanja su nove spoznaje o dinamici i indikatorskoj vrijednosti svojti praživotinja aktivnog mulja povezano sa kakvoćom ulazne i izlazne vode i učinkovitosti procesa obrade.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sastav otpadnih voda i izvori onečišćenja

Onečišćenje voda posljedica je tehnološkog razvoja i porasta broja stanovništva, a preko hranidbenih lanaca utječe i na ljude i općenito, narušava vodene ekosustave. Ispuštanjem otpadnih voda i bacanjem otpada u vodu, ljudi su prepuštali pročišćavanje prirodnim procesima, prije svega mikroorganizmima razlagačima. Količina komunalnih i industrijskih voda sve više raste, a time i onečišćenje voda.

Onečišćenja voda su različita, a svako ima drugačiji utjecaj na okoliš i ljude:

- organske tvari i hranjive soli (spojevi dušika i fosfora); uzrokuju pojačan rast primarnih proizvođača i troše kisik iz vode,
- mineralne soli (kloridi, sulfati) i metali; mogu biti otrovni za živa bića u vodi, npr. ribe, školjkaše, a preko kojih ulaze u hranidbene lance,
- organska (mikro) zagađivala, otrovni spojevi koji su štetni za organizme u vodi; utječu na razmnožavanje i remete strukturu zajednice u vodenom ekosustavu,
- mikroorganizmi koji dospijevaju iz otpada (komunalnog); često su patogeni mikroorganizmi uzročnici bolesti i vodenih i kopnenih organizama,
- radioaktivne tvari; prolaskom kroz hranidbene lance koncentriraju se u pojedinim tkivima i organima; potencijalno uzrokuju karcinome i genotoksični su,
- suspendirane čestice u vodi; mogu smanjiti prodiranje sunčeve svjetlosti u vodu, a na taj način remete rast primarnih proizvođača,
- fizikalno-kemijske promjene, npr. toplinsko onečišćenje (ispuštanje vode visokih temperatura), promjene kiselosti ili boje vode (Petrović i sur., 2013).

Do početka 1990-tih godina najveću pozornost zbog onečišćenja voda imala su organska zagađivala i teški metali koji su iz različitih industrijskih postrojenja dospijevali u vodotoke (kemijska, prehrambena, tekstilna, industrija papira). Danas je zbog primjene odgovarajućih mjera i uklanjanja izvora onečišćenja, smanjeno ispuštanje organskih zagađivala.

2.1.1. Nova zagađivala

Pojavila su se i nova zagađivala čije ispuštanje u okoliš još nije dovoljno zakonski regulirano. Naziv „nova zagađivala“ ne znači nove spojeve ili produkte njihove razgradnje, nego su to zagađivala koja nisu uključena u redoviti nadzor. U nova zgađivala se svrstavaju slijedeće skupine spojeva:

- toksini cijanobakterija,
- bromirani spojevi (usporivači gorenja),
- nuzproizvodi dezinfekcije,
- aditivi gorivu,
- hormoni i endokrini modulatori,
- organometalni spojevi,
- organofosfatni spojevi (usporivači gorenja) i omekšivači (plastifikatori),
- perfluorirani spojevi,
- farmaceutici i sredstva za osobnu higijenu,
- polarni pesticidi i njhovi produkti razgradnje ili transformacije,
- nanomaterijali (ili nanočestice),
- siloksani,
- površinski aktivne tvari i njihovi metaboliti.

Za većinu navedenih novih zagađivala još nema procjene opasnosti za zdravlje ljudi i drugih organizama jer nema dovoljno ekotoksikoloških podataka (Petrović i sur., 2013). Većina današnjih analitičkih metoda usmjerena je na određivanje izvornih spojeva, a rijetko njihovih metabolita i transformacijskih produkata.

2.1.2. Sastav komunalnih otpadnih voda i industrijskih otpadnih voda tvornica šećera

Mikrobiološki sastav komunalnih otpadnih voda karaketiriziraju bakterije probavnog trakta kralježnjaka, među kojima su mnoge patogene bakterije. Od ljudskih patogena (kad je podrijetlo voda iz domaćinstava) najčešće su prisutne *Salmonella typhi, Salmonella paratyphi, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae, Campilobacter* spp., *Leptospira* spp. i *Vibrio cholerae*. Od bakterija dolaze još rodovi *Micrococcus, Cytophaga, Pseudomonas, Aeromonas*

i drugi. Među praživotinjama u komunalnoj otpadnoj vodi česte su vrste *Entamoeba histolytica* i *Giardia intestinalis*. Dolaze i virusi: adenovirusi, enterovirusi, hepatitis virus i reovirusi (Pejić, 2014).

Mikrobiološki sastav otpadnih voda šećerane je sličan komunalnim otpadnim vodama. Podrijetlo bakterija u otpadnim vodama šećerane je iz vode za pranje i plavljenje repe i/ili iz zemlje. Mogu dospjeti čak i u proces prerade, ali ne predstavljaju problem u procesu. Dezinfekcijska sredstva koja se koriste u proizvodnji šećera kao i visoka temperatura i pH vrijednost vode onemogućavaju razmnožavanja bakterija. Od bakterija najveću brojnost pokazuje ukupan broj bakterija, a prisutne su i koliformne bakterije, enterokoki, *Escherichia coli*, sulfit-reducirajuće bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* kao i kvasci (Kepec, 2016).

2.2. Aktivni mulj

Aktivni mulj se sastoji od živih mikroorganizma (bakterije, gljivice, protozoa, sitni beskralježnjaci) i organske tvari. Otpadna voda i aktivni mulj se aeriraju da bi se pospješila razgradnja organske tvari.

Osnovni mehanizam djelovanja aktivnog mulja, koji ima sličnost s prirodnim vodenim ekosustavima je:

$$Organska\ tvar + O_2 \xrightarrow{Bakterije(enzimi)} CO_2 + H_2O + energija$$

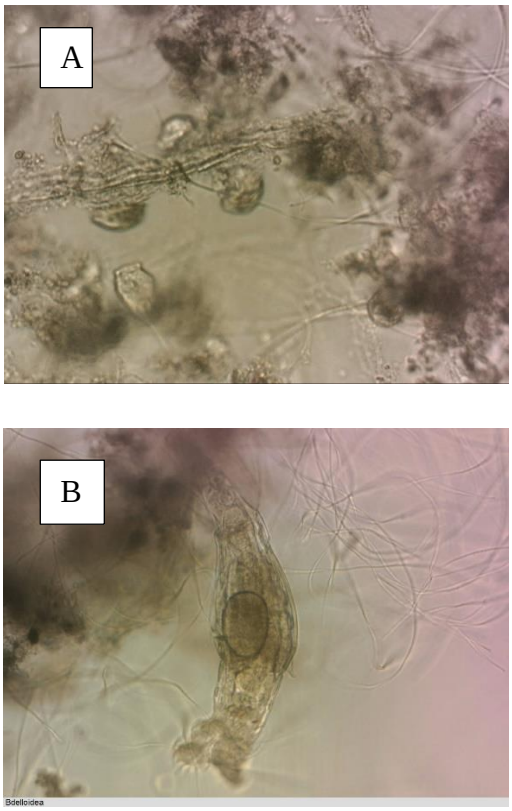
Organsko onečišćenje uklanja se pomoću mikroorganizama pri odgovarajućim procesnim čimbenicima, zatim slijedi sedimentacija – odvajanje mulja od obrađene otpadne vode i uklanjanje viška mulja iz sustava. Organsku tvar mikroorganizmi uparabljuju kao izvor hrane za rast i razmnožavanje odnosno produkciju mikroorganizama. Pri tom nastaje CO_2, plin koji odlazi u atmosferu, voda, koja ulazi u sastav finalnog efluenta i energija koju mikroorganizmi koriste za održavanje svojih životnih funkcija, a dio energije se gubi i u obliku topline.

Otpadna voda bogata organskom tvari miješa se s mikroorganizmima u prisutnosti otopljenog kisika dovoljno vremena da omogući mikroorganizmima da razgrade prisutnu organsku tvar. Princip rada je da jedan tip mikroorganizama probavlja (ili hrani se) s jednom

vrstom organske tvari, a ostali mikroorganizmi probavljaju njihove nusprodukte i druge organske spojeve. Mikroorganizmi asimiliraju organske spojeve i ujedno troše otopljeni kisik iz otpadne vode. Upravo zbog velike potrošnje kisika, aktivni mulj se aerira, da se izbjegne anoksija. Nadalje, osim što mikroorganizmi apsorbiraju organske spojeve, proizvode i nusproizvode tj. određene produkte razgradnje. Drugi mikroorganizmi često koriste te nusprodukte kao izvor hrane. Ovaj akumulativni biodegradacijski proces traje sve dok se kompleksni organski spojevi potpuno razgrade i budu asimilirani od populacije mikroorganizama (Junkins i sur., 1983). Vrijednost pH u bioeracijskim bazenim se treba održavati između 6,5 do 8,5. U tom intervalu aktivnost mikroorganizama je najbolja (Junkins i sur., 1983).

Aktivni mulj se formira u bioaeracijskim bazenima, a nekad produženo i u sekundarnim taložnicama. Dio mulja (povratni mulj) se vraća u bioaeracijske bazene, a preostali dio aktivnog mulja se uklanja kao višak mulja.

Izgled flokule mulja (Slika 1) i prisutnost određenih vrsta mikroorganizama koriste se kao pokazatelji rada postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Općenito, male do srednje flokule mulja koje nisu raspršene ukazuju na aktivni mulj sa dobrom aktivnošću. U flokuli tzv. zdravog aktivnog mulja treba biti prisutan relativno velik broj vrsta protozoa. Prisutnost sitnih bičaša i nitastih bakterija u flokuli ukazuju na mladu flokulu i nedostatak kisika. Male flokule, s neravnim rubovima i uz prisustvo velikog broja kolnjaka ukazuju na stari mulj (Junkins i sur., 1983).



Slika 1. Mikroskopski izgled flokula aktivnog mulja; A. flokule aktivnog mulja svojstva dobre taloživosti (dovoljna aeracija, dobro formirana flokula mulja); B. flokule mulja loše taloživosti (nedovoljna aeracija, nema formiranja pravilne flokule, prisutne nitaste forme i kolnjaci) (vlastita fotografija).

2.2.1. Sastav aktivnog mulja

U aktivnom mulju biološke komponente čine razlagači: bakterije i gljivice, koji koriste organske tvari iz otpadne vode, i potrošači: heterotrofni bičaši, trepetljikaši, amebe i sitni beskralježnjaci, koji se hrane dispergiranim bakterijama. Trepetljikaši su često glavni bakteriovori u aktivnom mulju, dok su kolnjaci predatori raznih praživotinja.

U bioaeracijskim bazenima prisutni su razni rodovi bakterija koje koriste različite sastojke kao izvore ugljika (energije): *Escherichia, Enterobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, Zooglea, Nocardia, Micrococcus, Mycobacterium, Corynebacterium* i *Sphaerotilus*. Bakterije u aktivnom mulju čine oko 90 % ukupne biomase aktivnog mulja. U konvencionalnom aktivnom mulju, suspendirana tvar sadrži oko 10^9 jedinki/mL (Pike, 1975).

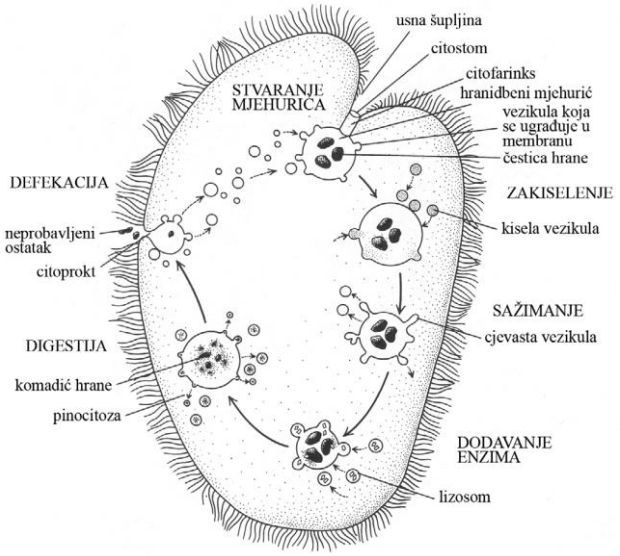
Formiranje aktivnog mulja (Junkins i sur., 1983) zbiva se kroz procese:

1. prijenos mase - prolaz otopljenih organskih tvari kroz staničnu membranu mikroorganizama gdje se razgrađuju,
2. konverzija (pretvorba) - razgradnja organske tvari pomoću enzima mikroorganizama, razmnožavanje mikroorganizama i oksidacijski procesi,
3. flokulacija - formiranje flokula mulja.

Sva tri koraka zbivaju se istovremeno u bioaeracijskim bazenima, a donekle i u sekundarnim taložnicama (Junkins i sur., 1983).

2.2.1.1. Protozoa

Protozoa (praživotinje, fagotrofni protisti) su jednostanični eukariotski organizmi koji pripadaju carstvu Protista (Habdija i sur., 2011). Noviji sustavi klasifikacije eukariota (Adl i sur., 2005) ukinuli su podjele na carstva te praživotinje spadaju u više klastera, odnosno nisu monofiletskog porijekla. Praživotinje mogu biti jednojezgrene i mnogojezgrene, veličine od 2 μm do nekoliko centimetara, s mnoštvom organela i skeletnih struktura. Budući da svaka stanica funkcionira kao potpuni organizam, ima strukturne specijalizacije za sve životne funkcije: kretanje, uzimanje hrane, razmnožavanje i reagiranje na podražaje. Svi protozoa su pokretni ili imaju pokretne stadije. Mnoge praživotinje se pokreću i hrane pomoću bičeva i trepetljika, a neki se kreću ameboidno pomoću pseudopodija ili „lažnih nožica“, dok se neki kreću puzanjem. Primaju i reagiraju na podražaje prije svega preko stanične membrane. Samo neke praživotinje imaju posebne organele za primanje podražaja npr. fotoreceptore. Protok kalcijevih iona je najvjerojatnije kontrolirajući faktor kretanja, a vezan je s promjenama potencijala stanične membrane (Habdija i sur., 2011). U homogenim uvjetima okoliša, bez stimulansa, pokretljivost protozoa je nasumična. Digestija ili probava hrane započinje kad se hranidbeni mjehurić odvoji od citostoma i spoji s kiselim vezikulama i lizosomima te stvori probavni mjehurić (Slika 2).



Slika 2. Intracelularna probava u trepetljikaša (preuzeto iz: Habdija i sur., 2011).

Protozoa igraju važnu ulogu u procesima pročišćavanja otpadnih voda baziranih na aktivnom mulju. Zajedno s bakterijama reduciraju organsko i anorgansko onečišćenje otpadnih voda te učinkovitost bioloških sustava pročišćavanja otpadnih voda baziranih na aktivnom mulju ovisi o sastavu protozoa tj. o prisutnim vrstama u zajednici. Biološko pročišćavanje otpadnih voda bazirano na aktivnom mulju je uglavnom dizajnirano da održava veliku gustoću i aktivnost onih mikroorganizama koji učestvuju u različitim procesima pročišćavanja. Praživotinje prisutne u aktivnom mulju uglavnom su bakteriovori, a istraživanja su pokazala da mogu održavati bakterijske populacije u ravnoteži (Warren i sur., 2010). Zbog svoje važne uloge, praživotinje su važna komponenta aktivnog mulja te se smatraju drugom po važnosti skupinom u ovom sustavu (Pauli i sur., 2001). Općenito se smatra da je primarna uloga protozoa u pročišćavanju otpadnih voda bistrenje efluenta, do kojeg dolazi hranjenjem suspendiranim bakterijama (Curds, 1992). Prehranom nad suspendiranim bakterijama, inducira se brži rast populacija filamentoznih i bakterija koje oblikuju flokule, što direktno utječe na aktivni mulj (Warren i sur., 2010).

Od svih protozoa, trepetljikaši su najbrojniji u svim tipovima aerobnih bioloških sustava pročišćavanja. Prisutnost i odgovarajuća brojnost protozoa ukazuje na dobro izbalansiran proces. Mikroskopska analiza aktivnog mulja je važna u vođenju procesa biološkog pročišćavanja jer ukazuje na probleme u procesu puno ranije nego ih se može detektirati putem ostalih analiza. U današnje vrijeme protozoa se koriste kao bioindikatori promjena u postrojenjima sa aktivnim muljem (Al-Shahwani i Horan 1991; Esteban i sur. 1991).

Iako postoje brojni ključevi za identifikaciju protozoa (npr. Foissner i Berger, 1996; Foissner i sur., 1991, 1992, 1994, 1995; Serrano i sur., 2008) ona ostaje i dalje problem, pa se predlaže veća uporaba molekularnih metoda (Foissner, 2016). Prisutne indikatorske vrste u aktivnom mulju ukazuju na efikasnost rada uređaja. Primjerice, indikatorske vrste *Aspidisca cicada, Chilodonella uncinata, Coleps hirtus, Zoothamnium procerius, Vorticella convallaria* u zajednici s okućenim amebama rodova *Arcella* i *Euglypha* ukazuju na dobar aktivan mulj, dobro vođenje uređaja i efluent sa značajnom redukcijom organske tvari (Foissner, 2016). Sastav zajednica protozoa uglavnom ovisi o sastavu otpadnih voda, a broj vrsta se smanjuje s pogoršanjem uvjeta na uređaju za pročišćavanje.

Trepetljikaši

Trepetljikaši (Ciliophora) ili cilijati su velika skupina praživotinja, s preko 8000 opisanih vrsta rasprostranjenih u slatkim vodama, u moru i u tankom sloju vode u tlu, ali i unutar drugih organizama. Svi trepetljikaši su heterotrofni. Najviše ih je slobodnoplivajućih, a manje sesilnih i zadružnih. Veličina im varira od 10 µm do 4,5 mm. Slobodnoplivajući trepetljikaši su pokretni (trepetljike) i najbrže su praživotinje, a postižu brzinu od 0,4 do 2 mm/s. Slobodno živući trepetljikaši mogu biti detrivori, bakteriovori, herbivori ili predatori. Predatori se hrane drugim praživotinjama, uključujući i trepetljikaše, a i sitnim životinjama kao kolnjacima. Mnogi sitni trepetljikaši se kreću u potrazi za hranom (bakterijama, dijatomeama i dr.), dok drugi, veći, hranu skupljaju filtrirajući je iz struje vode koju stvaraju oralnom aparaturom. Preoralna trepetljikavost filtratorskih vrsta mnogo je složenija od trepetljikavosti vrsta koje direktno hvataju plijen.

Osobitost trepetljikaša je jezgreni dimorfizam tj. imaju jedan ili više mikronuklesa i jedan ili više makronukleusa. Mikronukleusi su diploidni, sitni (promjera od 2 do 5 µm), a odgovorni su za genetičku rekombinaciju. Makronukleusi su poliploidni, veći, a mogu biti i fragmentirani. U njima se odvija sinteza RNA i odgovorni su za normalan stanični metabolizam (Habdija i sur., 2011).

Trepetljikaši su dominantna grupa protozoa u aktivnom mulju (Martin-Cereceda i sur., 1996) te poboljšavaju kvalitetu efluenta. U njihovom nedostatku efluent ima veće vrijednosti BPK_5 i veću mutnoću zbog prisutnih dispergiranih bakterija (Curds 1992) (Slika 3). Zbog mogućnosti razvoja masovnih populacija i efikasnog filtracijskog aparata, peritrihni

trepetljikaši imaju važnu ulogu u biološkom pročišćavanju otpadnih voda (Habdija i sur., 2011). Iako je pronađeno oko 230 vrsta protozoa u različitim aerobnim biološkim sustavima, samo neke su učestale (Curds i Cockburn, 1970a; Madoni i Ghetti, 1981), a to vrijedi i za trepetljikaše.

Trepetljikaši u biološkim sustavima za pročišćavanje otpadnih voda se hrane uglavnom bakterijama i mogu se podijeliti u tri skupne prema načinu pokretanja: slobodnoplivajući, puzajući i pričvršćeni trepetljikaši koji se čvrsto drže za flokulu mulja (Tablica 1). Dok su slobodnoplivajuće i pričvršćene vrste u kompeticiji za hranu tj. dispergirane bakterije u tekućoj fazi, puzajuće vrste se hrane česticama na flokulama mulja.

Tablica 1. Trepetljikaši karakteristični za aktivni mulj prema načinu života i ishrani (preuzeto i prilagođano iz Madoni, 1994).

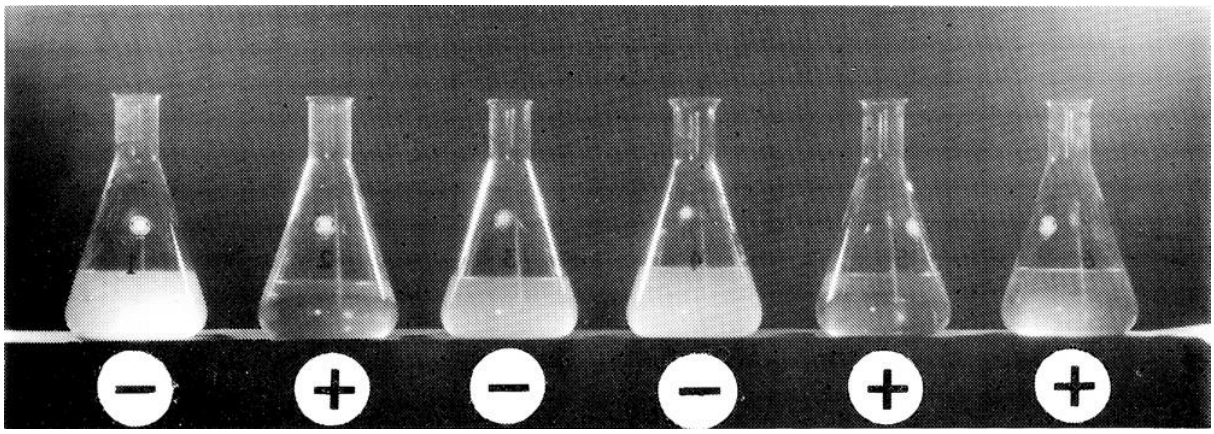
Karnivorni	**Bakteriovorni**		
	slobodno-plivajući	**puzajući**	**pričvršćeni**
Holotrichia	*Colpoda* sp.	*Aspidisca cicada*	*Carchesium* sp.
Acineria incurvata	*Colpidium colpoda*	*Aspidisca lynceus*	*Epstylis* spp.
Amphileptus sp.	*Colpidium campylim*	*Chilodonella uncinata*	*Opercularia coarctata*
*Coleps hirtus**	*Cinetchilum margaritaceum*	*Euplotes affinis*	*Opercularia microdiscus*
Litonotus spp.	*Cyclidium glaucoma*	*Euplotes moebiusi*	*Opercularia minima*
Spathidium spp.	*Dexiotricha* sp.	*Euplotes patella*	*Stentor* spp.
Suctoria	*Glaucoma scitillans*	*Stylonychia* spp.	*Vaginicola crystallina*
Acineta spp.	*Loxocephalus* sp.	*Trithigmostoma cucullulus*	*Vorticella convallaria*
Metacineta sp.	*Paramecium* spp.	*Trochilia minuta*	*Vorticella microstoma*
Podophrya spp.	*Pseudocohnilembus pussilus*		*Vorticella octava*
Tokophrya spp.	*Sathrophilus* sp.		*Zoothamnium* spp.
	Spirostomum teres		

Nastavak Tablice 1.

<table>
<tr><th rowspan="2">Karnivorni</th><th colspan="3">Bakteriovorni</th></tr>
<tr><th>slobodno-plivajući</th><th>puzajući</th><th>pričvršćeni</th></tr>
<tr><td rowspan="3"></td><td>Tetrahymena pyroformis complex</td><td rowspan="2"></td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>Uronema nigricans</td></tr>
<tr><td colspan="2">Acineria uncinata '
Drepanomonas revoluta'
Trachelophyllum pusillum'</td></tr>
</table>

*Omnivori; 'Ove vrste su slobodno-plivajućeg načina života, ali njihova ishrana je vezana za flokule.

Trepetljikaši su prisutni u procesu pročišćavanja otpadnih voda s velikim brojem vrsta i brojnošću, a uglavnom dosežu gustoću od oko 10^7 jedinki/L u aeracijskim bazenima (Madoni i sur. 1993; Pauli i sur. 2001).



Slika 3. Fotografije laboratorijskih uzoraka efluenta s prisutnim trepetljikašima (+) i bez trepetljikaša (-) (preuzeto iz: Curds, 1992).

Odnosi kompeticije i predacije među trepetljikašima osciliraju dok se ne postigne dinamička stabilnost, koja ovisi o načinu vođenja procesa pročišćavanja i zadanim ciljevima za optimalnu učinkovitost (Madoni, 1986). Struktura i karakteristike mikrofaune su važni indikatori učinkovitosti sustava pročišćavanja (Madoni, 1994; Arévalo i sur., 2009; Martin-Cerecedai sur., 1996).

Učinkovito postrojenje s aktivnim muljem treba imati slijedeće karakteristike:

- veliku brojnost mikrofaune ($\geq 10^6$ jedinki/L),
- mikrofaunu sastavljenu od puzajućih i pričvršćenih trepetljikaša, a gotovo bez bičaša,
- vrste trepetljikaša trebaju biti raznolike i niti jedna ne smije dominirati brojčano nad drugom s faktorom većim od 10.

Ako to nije slučaj, nalaz nekih ključnih grupa protozoa (Tablica 2) ukazuje na neko specifično problematično stanje na postrojenju (Madoni, 1994).

Tablica 2. Ključne skupine mikrofaune koje ukazuju na učinkovitost i potencijalne probleme na uređajima za pročišćavanje otpadnih voda (preuzeto i prilagođeno iz Madoni, 1986).

Dominantna skupina	**Učinkovitost pročišćavanja**	**Mogući uzrok**
Sitni bičaši	slaba	slaba aeracija mulja; veliko organsko opterećenje; prisutne fermentirajuće tvari
Sitni plivajući bičaši	osrednja	prekratko vrijeme retencije mulja, mulj siromašan kisikom
Veći plivajući trepetljikaši	osrednja	veliko organsko opterećenje; mulj siromašan kisikom
Puzajući trepetljikaši	dobra	
Pričvršćeni i puzajući trepetljikaši	dobra	
Pričvršćeni trepetljikaši	u opadanju	prolazan fenomen (diskontinuirano opterećenje, „nezreli“ mulj)
Sitne gole amebe	slaba	vrlo visoko organsko opterećenje; prisutni teško razgradivi spojevi
Okućeni	dobra	

Ključne grupe trepetljikaša

Trepetljikaši imaju dobru korelaciju s fizikalno-kemijskim parametrima otpadne vode nakon obrade i operativnim parametrima uređaja. U pročišćavanju s aktivnim muljem, najveću abundanciju pokazuje ključna grupa: pričvršćeni trepetljikaši (Martin-Cereceda i sur., 1996; Madoni, 2011).

Madoni (1994) je proveo opsežno istraživanje o uzajamnoj vezi različitih grupa mikrofaune, koje su kombinacija taksonomskih skupina, životnih oblika trepetljikaša i načina ishrane, i glavnih uvjeta na postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda. Analizirano je 44 postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda na bazi aktivnog mulja, a praćena je korelacija između 9 različitih grupa mikrofaune i šest fizikalno-kemijskih parametara na postrojenjima. Tako se došlo do „pozitivnih" i „negativnih" ključnih grupa. Pozitivne grupe su puzajući i pričvršćeni trepetljikaši i okućeni. Negativne grupe su sitni bičaši, slobodno plivajući bakteriovorni trepetljikaši i peritrihni trepetljikaši *Vorticella microstoma i Opercularia* spp.

Zajednice protozoa u aktivnom mulju su izučavali mnogi znanstvenici (Madoni, 1994; Martin-Cereceda i sur., 1996; Arévalo i sur., 2009; Madoni, 2011). Foissner (2016) kompilira dostupne literaturne podatke te daje tablicu vrsta i u odnosu na učinkovitost pročišćavanja (dobra, srednja i slaba učinkovitost pročišćavanja).

Mnoga istraživanja su pokazala da je broj prisutnih vrsta trepetljikaša na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda koji dobro funkcionira oko 10^6 jedinki/L. Kad taj broj padne ispod 10^4 jedinki/L, to indicira nedovoljno pročišćavanje (Drakides, 1980). U takvim slučajevima dolazi do proliferacije dispergiranih bakterija i povećanja mutnoće efluenta, a posljedično tome i do povećanja BPK_5. Suprotno, povećan broj trepetljikaša ($>10^7$ jedinki/L) gotovo uvijek znači dobru purifikaciju i optimalne uvjete u procesu (Madoni, 1994).

Mikrofauna dobro funkcionirajućeg sustava je raznolika, sastoji se od različitih grupa organizama, a svaka pojedinačna grupa od više različitih vrsta. Nijedna grupa ili vrsta nisu brojčano dominantne. Mikrofauna kod koje dominira jedna grupa ili vrsta je pokazatelj trofičkog disbalansa zbog limitirajućih čimbenika koji onemogućavaju razvoj ostalih vrsta, a favoriziraju rast onih vrsta koje su tolerantne na te čimbenike. Najčešći limitirajući uvjeti su npr. prisutne šok doze toksičnih supstanci, zatim premalo ili preveliko organsko opterećenje, snažnija ekstrakcija mulja i manjak kisika.

Do sličnih rezultata su došli i drugi autori izučavajući protozoa aktivnog mulja (De Marco i sur., 1991). Autori su klasificirali mikrofaunu u tri klase prema abundanciji ($<10^4$ jedinki/L, od 10^4 do10^6 jedinki/L; i $>10^6$ jedinki/L), i prema učinkovitosti rada uređaja za pročišćavanje okarakterizirali ih kao indikatore neučinkovitog, slabo učinkovitog i uređaja dobre učinkovitosti. Dokazali su da su uklanjanje organskih tvari, kao i koncentracija metala, značajno različiti na različitim uređajima sukladno zastupljenosti triju klasa protozoa. Pokazalo

se da se brojnost i raznolikost zajednica trepetljikaša mijenja ovisno o kvaliteti ulaznog opterećenja, kao i o uvjetima rada samog postrojenja (Esteban i sur., 1991).

Pričvršćeni trepetljikaši

U aktivnom mulju postrojenja s dobrom učinkovitošću pročišćavanja dominaniraju upravo pričvršćeni trepetljikaši kao što su rodovi *Vorticella, Carchesium, Zoothamnium* i *Epistylis* (Madoni, 2011). Pojedine vrste koreliraju sa specifičnim parametrima procesa pročišćavanja (Martin-Cereceda i sur., 1996). Primjerice, vrsta *V. striata* je karakteristična za slabiju kvalitetu efluenta, *Aspidisca cicada* za stabilne uvjete na postrojenju i dobar aktivni mulj, a vrsta *Litonotus lamella* za slabo taloženje mulja.

Pričvršćeni trepetljikaši su ko-dominantni s puzajućim trepetljikašima u aktivnom mulju. Izrazito povećan broj pričvršćenih trepetljikaša tj. >80 % mikrofaune aktivnog mulja dovodi do smanjenja učinkovitosti pročišćavanja (Madoni, 1994). Najčešće se to događa u slučaju gubitka aktivnog mulja ili diskontinuiranog pritjecanja organskog opterećeanja s influentom. Prema Curds i Cockburn (1970b), pričvrščćeni trepetljikaši mogu podnositi široki raspon organskog opterećenja. Također je ustanovljeno da je omjer brojnosti puzajućih i pričvršćenih trepetljikaša u uskoj vezi sa učinkovitošću pročišćavanja (Bedogni i sur., 1991). Kad je vrijednost omjera > 0,5 postiže se bolja kvaliteta finalnog efluenta.

Neke pričvršćene svojte trepetljikaša kao što su *Vorticella microstoma* i *Opercularia* spp. mogu opstati i preživjeti u vrlo nepovoljnim uvjetima u aktivnom mulju (npr., nedostatak kisika, prisutnost toksičnih tvari). Ako su prisutne s velikom brojnošću, mogu se smatrati ključnim grupama (Madoni, 1994). Neke svojte roda *Opercularia* karakteristične su za stabilne uvjete u aktivnom mulju. Primjerice Pauli i sur. (2001) navode da *O. coarctata* i *V. convallaria* dominiraju u stabilnoj fazi u postrojenjima s aktivnim muljem.

***Opercularia* spp.**

U aktivnom mulju se obično nalaze *Opercualaria coarctata, O. microdiscus,* i *O. minima*. Najčešće dolaze u malom broju, a dobri su indikatori, jer njihov broj značajno raste

kad je mulj loše kvalitete (Esteban i sur., 1991). Curds i Cockburn (1970b) su ustanovili da *Opercularia* spp. dolaze u većem broju kad je visok BPK_5 finalnog efluenta. Vrste ovog roda mogu podnositi stresne uvjete okoliša bolje od drugih protozoa. Neki autori su ustanovili da se *Opercularia* javlja u većem broju u industrijskim otpadnim vodama koje sadrže toksične tvari (Antonietti i sur., 1982; Cardinaletti i Zitelli, 1991). U industrijskim otpadnim vodama koje sadrže soli metala, *O. coarctata* može biti jedina komponenta mikrofaune. *O. microdiscus* podnosi manjak kisika i često se detektira u taložnicama s niskim omjerom povrata mulja. Ove dvije vrste su povezane s visokim vrijednostima BPK_5 i amonijakalnog N u finalnom efluentu (Poole, 1984; Madoni i sur., 1993). *Opercularia* spp. često dolaze zajedno s vrstom *Vorticella microstoma* (Madoni, 1994).

Vorticella microstoma

Ova vrsta trepetljikaša je najčešće prisutna za vrijeme prve faze kolonizacije flokula mulja, ali obično bude zamijenjena drugim vrstama (npr. *V. convallaria)* koje postaju dominantne dok traju stabilni uvjeti. Ove dvije vrste imaju različitu toleranciju na manjak kisika pa *V. microstoma* ukazuje na manjak otopljenog kisika u aeracijskim bazenima (Madoni i Antonietti, 1984; Madoni, 1994). Dominacija ove vrste ukazuje na slabu učinkovitost pročišćavanja.

Puzajući trepetljikaši

Puzajući trepetljikaši su načinom života vezani uz flokulu mulja i pomoću svojih struktura (ciri ili zasebne trepetljike) kreću se po flokuli. Na primjer, vrsta *Aspidisca cicada* je tipična za stabilnu fazu aktivnog mulja i vrlo često dolazi zajedno s pričvršćenim trepetljikašem *Vorticella convallaria* (Martin-Cereceda i sur., 1996). Obje vrste pokazuje veliku toleranciju na bakar (Nicolau i sur., 2005). Malo veći puzajući trepetljikaš, *Euplotes aediculatus,* hrani se bakterijama i predator je drugih manjih praživotinja. Dobar je indikator za vode onečišćene niklom (Madoni i Romeo, 2006). Vrsta istog roda *E. patella* je indikator niskog organskog onečišćenja (Madoni, 1994).

Puzajući trepetljikaši pokazuju smanjenje brojnosti s povećanjem opterećenja (Curds i Cockburn, 1970b). Pričvršćeni i puzajući trepetljikaši često su ko-dominantni u mikrofauni aktivnog mulja. Zbog različitih načina ishrane nisu međusobno u kompeticiji, ali ipak se omjer među ove dvije grupe mijenja ovisno o opterećenju mulja (Madoni, 1994).

Slobodno plivajući trepetljikaši

Plivajuće bakteriovorne vrste trepetljikaša su brojnije u ranoj fazi rada uređaja kad se tek formiraju flokule mulja pa su stoga sesilni ili pričvršćeni trepetljikaši odsutni ili imaju nisku brojnost. Slobodno plivajuće vrste ubrzo budu zamijenjene s populacijom pričvršćenih trepetljikaša u kompeticiji za dispergirane bakterije (Madoni, 1994).

Sitni slobodno plivajući trepetljikaši kao što su *Colpidium, Cyclidium, Tetrahymena* i *Uronema* ponekad su dominantni u mikrofauni mulja. To se dešava u situaciji kad je mulj nedovoljno zreo ili kad se radi o visokom organskom opterećenju i nedostatku kisika. Ove bakteriovorne svojte postaju dominantne u kompeticiji kod visoke koncentracije dispergiranih bakterija, a i bolje preživljavaju od ostalih kada su prisutne toksične tvari u influentu, kao i manjak kisika. Curds i Cockburn (1970b) su ustanovili da su slobodno plivajući oblici dominantni kod visokih organskih opterećenja.

Ostale ključne grupe

Okućeni

Okućeni su prisutni u aktivnom mulju s tri najčešća roda: *Arcella, Difflugia* i *Euglypha.* Ovi protozoa koloniziraju mulj kada je nisko organsko onečišćenje i uobičajeno dolaze u aeracijskim bazenima gdje se provodi uklanjanje dušika (Poole, 1984). Okućeni su prisutni u većoj brojnosti u mulju malog organskog opterećenja, dužeg vremena retencije i s većom koncentracijom otopljenog kisika u aeracijskim bazenima, što onemogućava kompletnu nitrifikaciju (Madoni i sur., 1993). U ovakvim uvjetima kvalitet efluenta je odličan i postiže se

velika učinkovitost uređaja za pročišćavanje. Prilikom identifikacije okućena, treba voditi računa da se u obzir uzimaju samo žive jedinke (Arregui i sur., 2012), budući da su njihove kućice vrlo otporne te se mogu dugo održati u sustavu i nakon smrti organizma.

Bičaši

Sitni bičaši su brojni u aktivnom mulju i dosežu gustoću 10^7-10^8 jedinki/L (Madoni,1994). Veći bičaši kao *Peranema* se rijetko nalaze u aktivnom mulju s većim brojnostima, a ulaze u skupinu karnivora (Warren i sur., 2010).

Sitni heterotrofni bičaši kao što su *Bodo, Polytoma* i *Tetramitus,* također su karakteristični za početnu fazu rada postrojenja kada se formiraju flokule. Hrane se dispergiranim bakterijama i s vremenom budu zamijenjeni bakteriovornim trepetljikašima. Veliki porast ovih protozoa u zrelom aktivnom mulju je povezan sa slabim učinkom biološkog pročišćavanja zbog više razloga: slabo aeriran mulj, veliko organsko opterećenje ili prisutne fermentirajuće tvari (Madoni, 1986, 1994). Bičaši su jedini prisutni protozoa u mulju sa snažnim organskim opterećenjem (Curds i Cockburn, 1970b). U postrojenju koje radi s uobičajenim opterećenjem dolazi svega nekoliko jedinki bičaša (<10 jedinki u Fuchs-Rosenthal komorici). S pogoršanjem stanja na postrojenju, njihov broj se povećava i ukazuje na pogoršanje učinkovitosti pročišćavanja (Madoni, 1994).

2.2.2. Biotički indeks aktivnog mulja

Biotički indeks aktivnog mulja razvio je Madoni (1994) upravo na osnovu navedenih ključnih skupina praživotinja. SBI omogućava procjenu biološke kvalitete aktivnog mulja i objedinjuje prisutne svojte protozoa i njihovu abundanciju s njihovim indikatorskim svojstvima. Indeks je teoretski primjenljiv za sve tipove pročišćavanja s aktivnim muljem.

Na osnovi mikroskopske analize određuju se dominantne ključne grupe kao i brojnost pojedinih svojti. Biotički indeks mulja ovisi o bogatstvu vrsta (koje se mijenjaju sa opterećenjem mulja) i gustoći mikrofaune (koja opada sa smanjenjem opterećenja mulja).

Biotički indeks aktivnog mulja izražava se kao brojčana vrijednost od 0 do 10. Dobivene vrijednosti biotičkog indeksa aktivnog mulja se grupiraju u 4 klase, koje pokazuju biološku kvalitetu aktivnog mulja, a u korelaciji su s fizikalno-kemijskim parametrima na uređaju te indiciraju učinkovitost pročišćavanja otpadnih voda.

Uporabljivost SBI indeksa potvrđena je nizom istraživanja (Arévalo i sur. 2009; Madoni, 1996; Papadimitriou i sur., 2007).

Prednost ove metode je relativno lagano uzorkovanje i niski troškovi analize te jednoznačna brojčana vrijednost, koja operaterima može pomoći u dnevnom vođenju uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Nedostaci uključuju nespecifičnost metode, odnosno niske vrijednosti mogu biti uzrokovane s više različitih čimbenika. Također, za određivanje ovog indeksa potrebno je poznavanje praživotinja, odnosno stručnjak koji može determinirati karakteristične svojte aktivnog mulja.

2.3. Utjecaj toksičnih tvari na aktivni mulj

Značajan je i utjecaj toksičnih tvari na mikrofaunu aktivnog mulja. Općenito, prisustvo toksičnih tvari u otpadnoj vodi rezultira osiromašenjem aktivnog mulja tj. smanjenim brojem vrsta protozoa (Papadimitriou i sur., 2007). Dodavanjem toksičnih spojeva u influent (ulaznu otpadnu vodu) izučavao se učinak na zajednicu protozoa. Svojte kao što su *Podophrya* sp. i *Tokophrya* sp. su pokazale učinkovitost u uklanjanju fenola i mogu se smatrati indikatorskim vrstama učinkovitog uklanjanja fenola. Svojte *Chilodonella* sp. i *Colpidium* sp. su se pokazale uspješne u uklanjanju cijanida iz otpadne vode (Papadimitriou i sur., 2007).

Toksične tvari dospijevaju u otpadne vode uglavnom iz industrije i značajno smanjuju učinkovitost pročišćavanja. Teški metali su toksični za većinu mikroorganizama prisutnih u sustavima biološkog pročišćavanja otpadnih voda (Barth i sur., 1965). Provedena su i istraživanje učinka izloženosti bakru zajednica protozoa u aktivnom mulju (Nicolau i sur., 2005). Niske koncentracije nisu imale učinak na puzajuće vrste *Acineria uncinata* i *Aspidisca cicada* koje su pokazale značajnu toleranciju, kao i sesilna svojta *Opercularia* sp.

Lizosomski biomarkeri su korisni za utvrđivanje ekotoksikoloških učinaka. Lizosomi su sposobni akumulirati široki spektar zagađivala. Lizosomski biomarkeri se stoga koriste za

utvrđivanje odgovora na okolišni stres (Köhler i sur. 1992). Okolišni stresori kao i toksične kemikalije uzrokuju promjene na membrani lizosoma, kao i degradaciju staničnih komponenti u lizosomima (Cuervo, 2004). U eukariotskim stanicama prva linija obrane od oksidativnog oštećenja su ksenobiotički transporteri, biotransformacijski enzimi i antioksidativni zaštitini enzimi kao što su superoksid dizmutaza i katalaza (Livingstone, 2001). Druga linija obrane je uklanjanje oštećenih proteina i oštećenih organela, a čak i dijelova jezgre i DNA (Bergamini i sur., 2003; Cuervo, 2004). Degradacija staničnih komponenti kroz autofagiju može poslužiti i kao treća linija obrane, a može završiti kao programirana smrt stanice (Lockshin i Zakeri, 2004). Odgovori lizosomskog sustava mogu biti prognostički biomarkeri budući da oštećenja lizosoma prethode oštećenjima stanica i tkiva.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje je provedeno na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u komunalnom poduzeću Virkom u Laboratoriju za analizu vode u Virovitici.

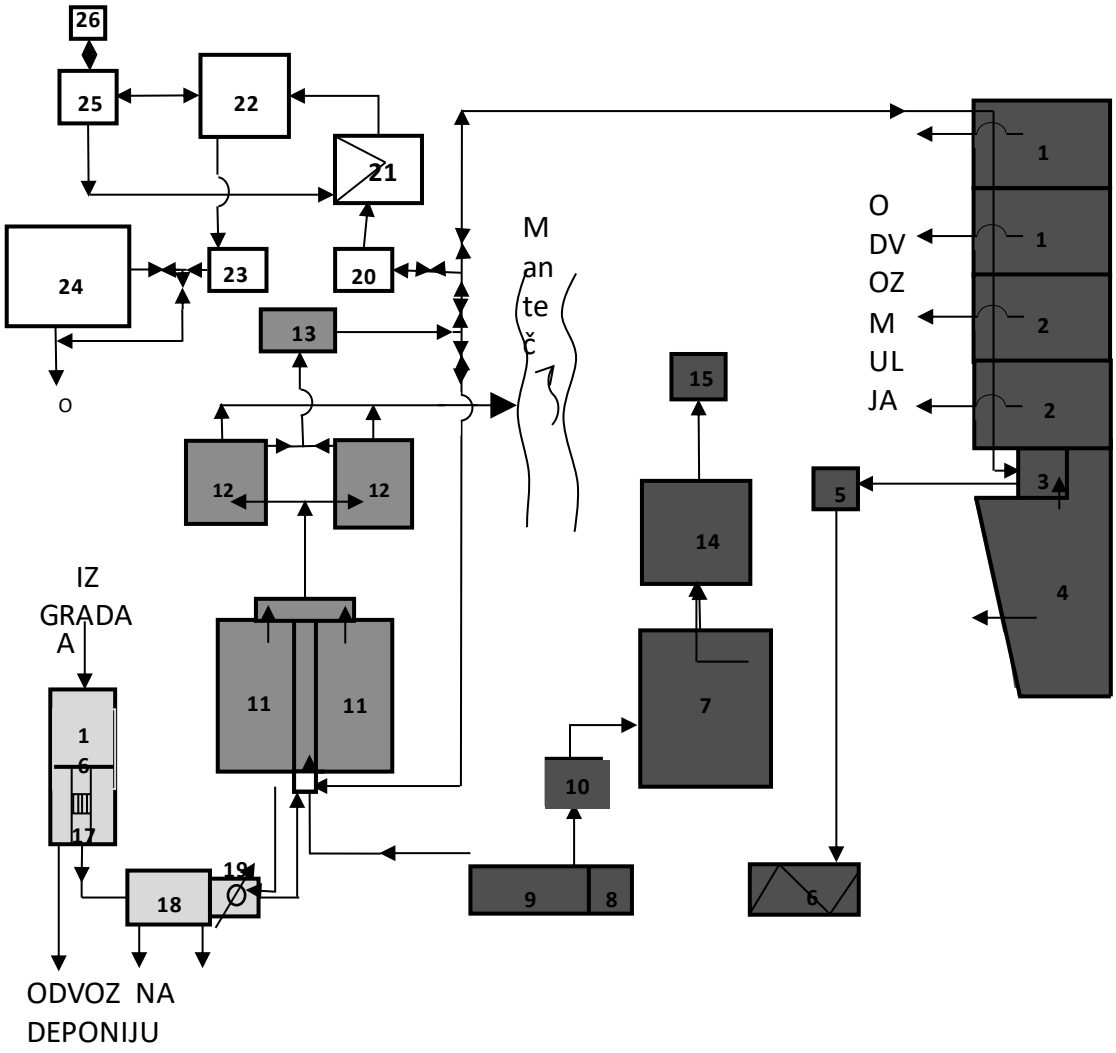
Analize su uključivale i fizikalno-kemijske i mikrobiološke analize otpadne vode i aktivnog mulja sa uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici (Kepec, 1997): influent – prije pročišćavanja, efluent – nakon pročišćavanja i aktivni mulj iz povrata u bioaeracijske bazene.

Istraživanje je uključivalo i određivanje biotičkog indeksa aktivnog mulja, kao i primjenu istog kao indikatora efikasnosti pročišćavanja za vrijeme različitih opterećenja uređaja: samo komunalne vode (K) i zajedničko pročišćavanje industrijske otpadne vode iz Tvornice šećera Viro i komunalne otpadne vode grada Virovitice (K+I).

Istraživanje je trajalo nekoliko mjeseci tijekom 2016. i 2017. godine. Uzorci su uzimani u dva režima rada uređaja: kada se prerađuje samo komunalna otpadna voda i kada se prerađuju zajedno i komunalna i industrijska otpadna voda za vrijeme prerade šećerne repe i sirovog šećera iz šećerne trske.

3.1. Uređaj za biološko pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici

Uređaj za biološko pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici je uređaj na kojem se pročišćavaju i otpadne vode grada i otpadne vode Tvornice šećera Viro, a baziran je na aktivnom mulju (Kepec, 1997). U zajedničkom pročišćavanju komunalnih i otpadnih voda Tvornice šećera Viro dolazi do uzajamnog nadopunjavanja tj. ove različite otpadne vode su kompatibilne. Komunalne vode imaju snažnu hidrauliku i donator su svježeg „cjepiva“ tj. mikroorganizama aktivnog mulja i razrjeđuju otpadne vode šećerane koje su puno većeg organskog opterećenja.



Slika 4. Blok shema Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici (izgrađeni i projektirani dijelovi) Izgrađeno: 1: Taložne lagune za karbonatni mulj, 2: Taložne lagune za zemljani mulj, 3: Kompenzacijska laguna, 4: Rezervna laguna, 5: Crpilište tehnološke otpadne vode TŠ, 6: Izmjenjivač topline, 7: Anaerobni fermentor, 8: Otplinjač, 9: Lamelni separator, 10: Crpilište anaerobnog mulja, 11: Bioaeracijski bazen, 12: Sekundarna taložnica, 13: Crpilište aerobnog mulja, 14: Plinosprem, 15: Baklja za spaljivanje bio-plina, 16: Crpilište komunalne otpadne vode, 17: Automatska fina rešetka, 18: Aerirani pjeskolov-mastolov, 19: Mjerni žlijeb; Nije izgrađeno: 20: Primarni zguščivač mulja, 21: Izmjenjivač topline, 22: Digestor za anaerobnu razgradnju mulja, 23: Sekundarni zguščivač mulja, 24: Strojna dehidracija mulja, 25: Plinosprem, 26: Baklja za spaljivanje bio-plina (preuzeto iz: Kepec, 2016).

Sustav pročišćavanja je sekundarnog tipa pomoću mehaničkih i bioloških metoda pročišćavanja komunalne i industrijske otpadne vode (Slika 4). Radi se o dvostupanjskom aerobno-anaerobnom postupku. Otpadne vode tvornice šećera su daleko većeg organskog opterećenja od komunalnih otpadnih voda, stoga se najprije vrši anaerobna razgradnja otpadnih

voda tvornice šećera u anaerobnom tanku pri temperaturi od oko 37 ºC i uz djelovanje bakterija. Tu se vrši razgradnja 80 – 90 % organske tvari uz pomoć anaerobnih bakterija (mješovite mikrobne zajednice) koje vrše razgradnju hidrolizom, kiselinskom i metanskom fermentacijom. U hidrolizi sudjeluju bakterije: *Clostridium* sp., *Proteus vulgaris, Micrococcus* sp. i *Bacterioides* sp. Kiselinsku fermentaciju provode bakterije: *Lactobacilus* sp., *Pseudomanas* sp., *Bacillus* sp. i *Micrococcus*. Metansku fermentaciju provode bakterije: *Methanotrix* sp., *Methanosarcina* i *Methanobacterium* sp. (Glancer-Šoljan i sur., 2005). Kao konačan produkt anaerobne razgradnje nastaje bioplin.

Sastav bioplina je:

- CH_4 (metan) = 70 %
- CO_2 (ugljik (IV) oksid) = 25 %
- vodena para = 4-5 %
- sumporovodik u tragovima

Proizvodna linija iskorištavanja bioplina nije izvedena, pa bioplin izgara na vrhu anaerobnog tanka (baklja koja gori dok je kampanja tj. prerada šećerne repe). Anaerobna razgradnja u anaerobnom tanku se odvija samo za vrijeme kampanje prerade šećerne repe, jer se koristi otpadna toplina iz procesa proizvodnje šećera za zagrijavanje vode u anaerobnom tanku.

Preostale nerazgrađene spojeve, uglavnom organske kiseline nastavljaju razgradnju u bioaeracijskim bazenima zajedno s komunalnim vodama iz grada. Gradske vode, koje su manjeg organskog opterećenja, dolaze direktno nakon primarnog (mehaničkog) čišćenja: rešetka, pjeskolov, aerobni mastolov, u bioaeracijske bazene gdje se provodi aerobna razgradnja. Aerobnu razgradnju provode mikroorganizmi aktivnog mulja koji se sastoji od mikrobnih zajednica (bakterije, gljivice, protozoa) koje razgrađuju organsko i anorgansko onečišćenje uz prisustvo kisika. Dakle, u bioaeracijskim bazenima daljnju razgradnju provode mikroorganizmi aktivnog mulja, od kojih su najbrojnije aerobne bakterije.

Nakon bioaeracijskih bazena, otpadna voda odlazi u sekundarne taložnice gdje se odvija taloženje mulja i prelijevanje pročišćene otpadne vode u recipijent. Višak aktivnog mulja se uklanja (odlaže se u lagune otpadnih voda šećerane), a dio se vraća u bioaeracijske bazene (povrat mulja) i tako se stalno održava zastupljenost vrsta, kao i brojnost mikroorganizama, a osobito protozoa koji su važni za učinkovitost pročišćavanja otpadnih voda. Konačna

pročišćena otpadna voda ili efluent nakon prelijevanja iz sekundarnih taložnica ulijeva se u recipijent kanal Manteč, a zatim u Županijski kanal i konačno u rijeku Dravu.

Uređaj je projektiran za 41 000 ES (1 ES=60 g BPK_5/dan), a aglomeracija koja pripada uređaju broji oko 21 000 stanovnika. Na uređaju za biološko pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici godišnje se pročisti 1 900 000 m^3 otpadnih voda grada i 250 000 m^3 otpadnih voda Tvornice šećera Viro. Tijekom godina je broj gospodarskih subjekata smanjen pa Opća bolnica Virovitica najviše doprinosi hidrauličkom i organskom opterećenju sustava za pročišćavanje. Od ostalih subjekata koji ispuštaju otpadne vode tu spadaju R.S. Metali –pogon Rapid, Hrvatski duhani, TVIN, Vitrex, Silosi i Virkom koji ispušta otpadne vode od pranja pješčanih filtera. Na uređaj dolazi i 30-50 % drugih voda: procijednih i oborinskih (Kepec, 2016).

3.2. Uzorkovanje

Uzorci otpadne vode prije pročišćavanja (influent) i nakon pročišćavanja (efluent), kao i uzorci aktivnog mulja, uzimani su u sterilne staklene boce i polipropilenske boce, a analize su se radile unutar 3 sata nakon uzorkovanja.

Uzorci su bili:

- otpadna voda (influent) ili ulazna otpadna voda koja dolazi na uređaj za pročišćavanje. U različitim režimima rada uređaja ulazna otpadna voda je bila samo komunalna ili gradska otpadna voda, ili zajednički influent komunalne i otpadne vode Tvornice šećera Viro za vrijeme kampanje prerade šećera, bilo iz šećerne repe ili šećerne trske,
- otpadna voda (efluent) ili izlazna voda koja odlazi s uređaja nakon postupka pročišćavanja u kanal Manteč, zatim Županijski kanal i konačno se ulijeva u rijeku Dravu,
- aktivni mulj iz bioaeracijskih bazena (iz tzv. povrata mulja u aeracijske bazene, jer se višak mulja uklanja, a dio se vraća u bazene).

Uzorci su analizirani tijekom višemjesečnog razdoblja u 2016. i 2017. godini s dinamikom uzorkovanja jednom mjesečno. Uz standardno praćenje vizualnih indikatora aktivnog mulja (boja, miris, pjenjenje, rast algi, prisustvo mjehurića), pratili su se i analitički

indikatori u otpadnim vodama i u aktivnom mulju (otopljeni kisik, BPK_5, KPK, 30-minutni test taloženja, suspendirane tvari, pH, ulja i masti, temperatura, nutrijenti, protok, vrijeme zadržavanja mulja), kao i broj mikroorganizama u aktivnom mulju: aerobni mezofili, enterokoki, koliformi, *Escherichia coli*, kvasci, sulfit-reducirajuće bakterije i *Pseudomonas aeruginosa*. Koristile su se standardne fizikalno-kemijske i mikrobiološke metode opisane u nastavku. Dana 24. 3. 2017. mjerenja ulazne vode grada (influenta) nisu izvršena zbog zastoja u radu crpki otpadnih voda grada.

Mikroskopsko pretraživanje aktivnog mulja za određivanje biotičkog indeksa aktivnog mulja (SBI), kao i određivanje broja hetrotrofnih nanoflagelata se provodilo unutar 3 sata od uzorkovanja.

3.2.1. Otpadna voda (influent i efluent)

Uzorci otpadne vode su uzimani prije pročišćavanja (influent) i poslije pročišćavanja (efluent) s Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

Uzorkovanje je provedeno tijekom 2016. i 2017. godine u različitim režimima rada uređaja tj. kada se pročišćava samo gradska otpadna voda te u vrijeme kampanje prerade šećerne repe i sirovog šećera iz trske kada se zajedno pročišćavaju otpadne vode grada i otpadne vode Tvornice šećera Viro. Zajedničko pročišćavanje komunalnih i otpadnih voda šećerane se odvijalo tijekom jeseni 2016. i 2017. godine (rujan, listopad i studeni i tijekom ljeta 2017. godine (lipanj). Tijekom jeseni 2016. godine se u Tvornici šećera Viro prerađivala šećerna repa, a tijekom ljeta 2017. godine se prerađivao sirovi tršćani šećer za dobivanje bijelog konzumnog šećera.

Uzorci su uzimani u sterilne boce i čuvani na 4°C do analize koja se radila 1 sat poslije uzorkovanja.

3.2.2. Aktivni mulj

Uzorci aktivnog mulja su uzimani iz povrata mulja u bioaeracijske bazene u polikarbonatne boce od 1 000 mL. Mikroskopska analiza radila se u vremenskom razdoblju od oko 3 sata nakon uzorkovanja

3.3. Fizikalno-kemijske analize

Analiza fizikalnih parametara se vršila neposredno nakon uzimanja uzoraka otpadne vode: ulaz komunalne vode na uređaj (influent-grad), ulaz otpadne vode šećerane (influent-šećerana) i zajednički izlaz nakon pročišćavanja (efluent).

Fizikalno-kemijske analize otpadnih voda provedene su prema metodama i pravilnicima koje su usklađene sa Zakonom o vodama u Republici Hrvatskoj (NN 91/08), s Državnim planom za zaštitu voda (NN 8/99) i s Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisije otpadnih tvari (NN 80/13, NN 43/14, NN 27/15, NN 3/16).

Fizikalno-kemijske analize su uključivale mjerenje temperature i otopljenog kisika multiparametarskim mjeračem (HQ40d, Hach Lange) ulazne otpadne vode (influent) i izlazne otpadne vode (efluent). Vrijednost pH istih uzoraka je mjerena pH metrom (MettlerToledo). Elektrovodljivost je mjerena konduktometrom (MC226k, MettlerToledo), koji je umjeren puferskom otopinom od 1 413 µS/cm.

Uzorci otpadnih voda (influent i efluent) su uzimani u staklene boce od 100 mL i čuvane na 4 º C do analiza. Analize su izvršene isti dan kada su i uzeti uzorci.

Suspendirana tvar je određivana gravimetrijski. Uzorak od 100 mL se filtrirao preko filter papira promjera 47 mm, veličine pora 1,1 µm (Glass-Microfibre disc, Watman 11, Sigma-Aldrich, SAD) membranskom filtracijom s vakuum pumpom (MZ 2, Wacuubrand, Njemačka) kroz filter papir prethodno sušen na 105 ºC za vrijeme od 2 sata do konstantne težine u sušioniku (UNE 400, Memmert, Njemačka). Nakon sušenja i hlađenja u eksikatoru, filter papir je izvagan (Ohaus Discovery, Švicarska). Umnožak razlike težine i razrjeđenja daje vrijednost suspendirane tvari u mg/L.

Ukupni dušik je određivan kivetnim testom (Hach Lange LCK 238). Ukupni fosfor određen je kivetnim testom Hach Lange LCK 348 i LCK 349. Određivanje ukupnog dušika i fosfora provedeno je zagrijavanjem na 100 °C (Hach DRB 200). Dušik i fosfor su analizirani u filtriranim uzorcima, da se izbjegnu prisutni N i P u stanicama mikroorganizama, što bi ukazivalo na veću koncentraciju nego što je zapravo raspoloživo ili dostupno za bakterije.

Kemijska potrošnja kisika KPK određivana je spektrofotometrijski uz korištenje $K_2Cr_2O_7$ kao oksidansa spektrofotometrom (UV/VIS Hach DR 5000). Hg_2SO_4 se dodaje za uklanjanje klorida, a za digestiju se dodaje 3 mL otopine koja se dobije miješanjem otopine $K_2Cr_2O_7$ i otopine Ag_2SO_4 u 98 %-tnoj H_2SO_4. Digestija je provedena na 148 °C za vrijeme od 2 h u termoreaktoru (TR 300, Merck, Njemačka). KPK je očitana spektrofotometrijski (Hach DR 5000, Njemačka) s baždarnim pravcem postavljenim u deset koncentracijskih vrijednosti (0 do 1 000 mg O_2/L na 620 nm). Za pripremu standardne otopine KPK korišten je $C_8H_5KO_4$.

Biokemijska potrošnja kisika za vrijeme od 5 dana (BPK_5) određivana na razrijeđenim uzorcima. Razrjeđenje je računato na osnovi izmjerene vrijednosti za kemijsku potrošnju kisika (KPK). Zatim su se uzorci razrijedili s aeriranom otopinom za razrjeđenje (demineralizirana voda u koju je dodana fosfatna pufer otopina). Biokemijska potrošnja kisika BPK_5 je dobivena iz razlike u vrijednostima otopljenog kisika prvog i petog dana, a uzimajući u obzir razrjeđenje uzorka.

3.4. Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize su se radile prema slijedećim normama i pravilnicima: broj bakterija (HRN EN ISO 6222: 2000), kvasci (HR EN ISO 7954: 2000), enterokoki (HRN EN ISO 7899-2:2000), koliformne bakterije i *Escherichia coli* (HRN EN ISO 9308-1:2000/Corr. 1:2008), *Pseudomonas* (HRN EN ISO 16266:2008) i sulfit-reducirajuće bakterije (HRN EN ISO 26461-2: 2008).

Za određivanje ukupnog broja bakterija u otpadnim vodama korišten je *Tryptic Glucose Yeast agar* (Biolife, Italija). Bakterije su inkubirane na 37 °C (Memmert, tip BE 400 i INB 500, Njemačka) i na 22 °C (Memmert, tip IPP 400). Razvijene bakterijske kolonije koje su se inkubirale na 37 °C brojane su nakon 48 sati, a bakterije koje su inkubirane na 22 °C nakon 72 sata.

Kvasci i plijesni dokazivani su brojanjem kolonija na *Sabouraud Dextrose Agar* s dodatkom kloramfenikola (Biolife). Uzorci su inkubirani na 20 °C kroz 72 sata.

Enterokoki su određivani metodom membranske filtracije pomoću selektivne mikrobiološke podloge *Slanetz Bartley Agar* (Biolife) koji sadrži 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid (TTC). Inkubacija je izvršena na 37 °C kroz 48 sati. Za potvrđivanje enterokoka korištene su podloge *Esculin Iron Agar* (Biolife), *Triple Sugar Iron Agar* i katalaza test. Broj koliformnih bakterija određivan je metodom membranske filtracije s mikrobiološkom podlogom *m-Les Endo Agar* (Biolife). Inkubacija je provedena na 37 °C kroz 24 sata, a za potvrdne testove korišteni su *Triple Sugar Iron Agar* (Biolife), *Mac Conkey Broth Purple* (Biolife) i *Bactident Oxydase* trakice (Merck).

Sulfit-reducirajuće klostridije određivane su pomoću SPS Agara (Liofilchem, Italija). Fekalni koliformi i *E. coli* određivani su membranskom filtracijom na selektivnoj mikrobiološkoj podlozi *m-Faecal coliform agar* (Biolife). Inkubacija je izvršena na 44 °C kroz 24 sata, a za potvrdne testove korišteni su *Triple Sugar Iron Agar USP* (Biolife), *Mac Conkey Broth Purple Brothu* (Biolife), *Simmons Citrate Agar* (Biolife), *Bacitident Oxidase* trakice (Merck), *DEV Tryptophan Broth* (Merck), Kovačev reagens (Biolife) i bojenje po Gramu.

Za utvrđivanje *Pseudomonas aeruginosa* korištena je metoda membranske filtracije i mikrobiološka podloga *Pseudomonas Selective Agar* (Biolife), inkubacija je izvršena na 37 °C kroz 24 sata, a za potvrđivanje je korišten *Tryple Sugar Iron Agar*, oksidaza i katalaza test, *DEV Tryptophan Broth* u kojem se utvrđivao nastanak piocijanina dodatkom kloroforma, te *Simmons Citrate Agar*.

Nacjepljivanje se provodilo s različitima razrjeđenjima uzoraka prema očekivanim vrijednostima, a izračun broja bakterija se dobivao umnoškom kolonija na hranjivoj podlozi i razrjeđenja.

3.5. Biotički indeks aktivnog mulja

Biotički indeks aktivnog mulja se određivao na osnovu mikroskopske analize aktivnog mulja (Madoni, 1994) Analizom kvalitativnog i kvantitativnog sastava ključnih svojti trepetljikaša te prisutnosti/odsutnosti heterotrofnih nano-flagelata dolazi se do numeričke vrijednosti (od 0 do 10) i svrstava aktivni mulj u jednu od četiri klase.

Biotički indeks aktivnog mulja izračunavao se pomoću „dvosmjerne“ tablice (Tablica 3). Ključne grupe slijede jedna ispod druge te prema dolje indiciraju lošiju biološku kvalitetu mulja. U kolonama su četiri raspona ukupnog broja taksonomske jedinice mikrofaune. Za određivanje biotičkog indeksa mulja važno je selektirati horizontalni red koji korespondira sa dominantnom grupom na nižoj poziciji, uzimajući u obzir i gustoću (manje ili više od 10^6 jedinki/L). Okomiti red je određen s ukupnim brojem taksonomskih jedinica, kao i gustoćom bičaša.

Za analizu se uzimalo poduzorke od 25 µl aktivnog mulja i pregledavalo se na svjetlosnom mikroskopu (Opton Axiowert) s povećanjem 100x, odnosno 250x i 400x prilikom determinacije i s pokrovnim stakalcem od 18 x 18 mm. Ako je neka vrsta bila prisutna kao kolonija brojale su se sve jedinke. Uzete su minimalno 2 replike uzorka aktivnog mulja. Uz identifikaciju svojti, provedeno je i brojenje te je izračunata abundancija (jed/mL). Za brojenje sitnih bičaša korištena je Fuchs-Rosenhal-ova komorica.

Nakon brojenja i identifikacije vrsta protozoa, pomoću „dvosmjerne“ tablice (Tablica 3) očitavaju se dominantne ključne grupe -vodoravni položaj i ukupna brojnost – okomiti red. Kad se okomiti i vodoravni red „križaju“, na osnovu očitanja iz tablice, izračuna se biotički indeks aktivnog mulja.

Tablica 3. „Dvosmjerna“ tablica za određivanje biotičkog indeksa aktivnog mulja na bazi ključnih grupa, gustoće i broja taksonomskih jedinica mikrofaune (Madoni, 1994).

Dominanta grupa i gustoća mikrofaune koja definira vodoravni red ulaska u tablicu		**Ukupan broj taksonomskih jedinica mikrofaune aktivnog mulja** i broj sitnih bičaša (F) izbrojen duž dijagonale Fuchs-Rosenthalove komirice							
Dominantna grupa	Gustoća jed./L	>10		8-10		5-7		<5	
		F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100
Puzajući+sesilni trepetljikaši i/ili okućeni*	$\geq 10^6$	10	8	9	7	8	6	7	5
	$< 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
Sesilni (pričvršćeni) trepetljikaši > 80 % *	$\geq 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
	$< 10^6$	8	6	7	5	6	4	5	3
Opercularia spp.	$\geq 10^6$	7	5	6	4	5	3	4	2
	$< 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1

Nastavak Tablice 3.

Dominanta grupa i gustoća mikrofaune koja definira vodoravni red ulaska u tablicu		**Ukupan broj taksonomskih jedinica mikrofaune aktivnog mulja** i broj sitnih bičaša (F) izbrojen duž dijagonale Fuchs-Rosenthalove komirice							
Dominantna grupa	Gustoća jed./L	>10		8-10		5-7		<5	
		F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100	F<10	10<F<100
Vorticella microstoma	$\geq 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
	$< 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
Slobodnoplivajući bakteriovorni trepetljikaši	$\geq 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
	$< 10^6$	4	2	3	1	2	0	1	0
Sitni plivajući bičaši (> 100) **	$\geq 10^6$	4		3		2		1	

** Opercularia* spp. i *Vorticella microstoma* nisu brojne
** duž dijagonale Fuchs-Rosenhal-ove komorice

Kada su vodoravni i okomiti red identificirani, biotički indeks aktivnog mulja se može odrediti na osnovu njihovog križanja. Tako „dvosmjerna“ tablica omogućava da se brojčano iskaže biološka kvaliteta mulja od 0 do 10 na osnovu dva indikatora: različite osjetljivosti grupa mikrofaune na uvjete okoliša i učinaka tih uvjeta na abundanciju i raznolikost zajednice protozoa. Vrijednosti biotičkog indeksa mulja se grupiraju u četiri klase (Tablica 4).

Tablica 4. Konverzija biotičkog indeksa mulja u četiri klase za ocjenu kvalitete aktivnog mulja (Madoni, 1994).

Vrijednost biotičkog indeksa mulja	**Klasa**	**Procjena**
8-10	I	Vrlo dobro koloniziran i stabilan mulj, odlične biološke aktivnosti; dobra učinkvitost pročišćavanja
6-7	II	Dobro koloniziran i stabilan mulj, biološka aktivnost u opadanju; dobro pročišćavanje
4-5	III	Nedovoljno biološko pročišćavanje u aeracijskom bazenu; osrednji učinci pročišćavanja
0-3	IV	Slabo biološko pročišćavanje u aeracijskom bazenu; slabi učinci pročišćavanja

3.5.1. Analiza mikrofaune

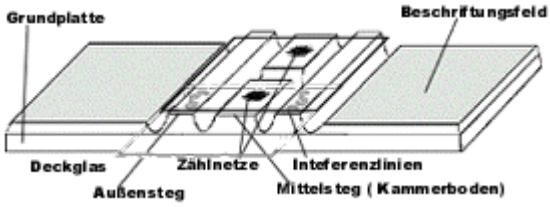
Premda se veliki broj različitih organizama nalazi u aktivnom mulju, neki oblici kao što su gole amebe i alge te ličinke kukaca ne doprinose značajno brojnosti te nisu uključeni u ovoj analizi. Metoda biotičkog indeksa aktivnog mulja uključuje ove organizme: sitne i veće bičaše, trepetljikaše, okućene, kolnjake i obliće. Sve ove grupe uzimaju se u obzir za određivanje raznolikosti mikrofaune (okomiti stupac u tablici biotičkog indeksa mulja, Tablica 3). Budući da je jako teško identificirati vrste bičaša, kolnjaka i oblića, ove grupe doprinose samo s 1 sistematskom jedinicom.

Za određivanje protozoa u aktivnom mulju i otpadnim vodama korišteni su determinacijski ključevi (Foissner i sur., 1991, 1992, 1994, 1995; Foissner i Berger, 1996; Serrano i sur., 2008).

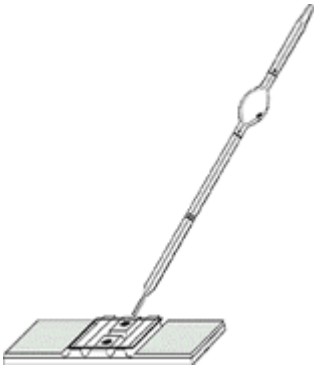
Prilikom analize treba paziti na slijedeće:

- Cjelokupna analiza treba biti izvršena unutar 5 sati. Uzorci za mikroskopsku analizu se moraju održavati na životu za vrijeme prenošenja, posebno dovoljnom aeracijom.
- Uzima sa mali volumen tekućine (25 µL) pomoću mikropipete. Najčešće se rade dva replikatna uzorka (Madoni, 1994).

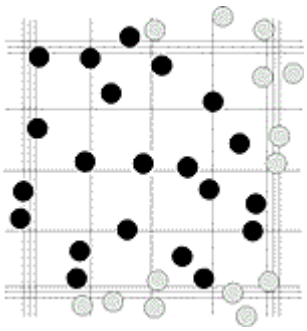
Brojenje sitnih bičaša zahtjeva odgovarajuću tehniku zbog njihove male veličine i velike gustoće, najčešće od 10^7 do 10^8 jedinki/L. Zato je korištena Fuchs-Rosenthalova komorica (Slike 5 - 7). Komorica je dimenzija 4 x 4 x 0,2 mm (dubina) i podijeljena je u 256 kvadratića veličine 250 µm. Broje se samo bičaši u 16 kvadratića duž dijagonale komorice. Kad je broj bičaša duž dijagonale manji od 10, to znači da je njihova gustoća u aktivnom mulju manja od 50 000 jedinki/mL; a ako je broj bičaša iznad 100, to dogovara gustoći od $5x10^8$ jedinki/L. Bičaši su analizirani na povećanju 200x (Opton, Jenaval).



Slika 5. Fuchs-Rosenthal-ova komorica (preuzeto s: www.lo-laboroptik.de).



Slika 6. Nanošenje uzorka u Fuchs-Rosenthal-ovu komoricu (preuzeto s: www.lo-laboroptik.de).



Slika 7. Brojenje bičaša u Fuchs-Rosenthal-ovoj komorici (preuzeto s: www.lo-laboroptik.de).

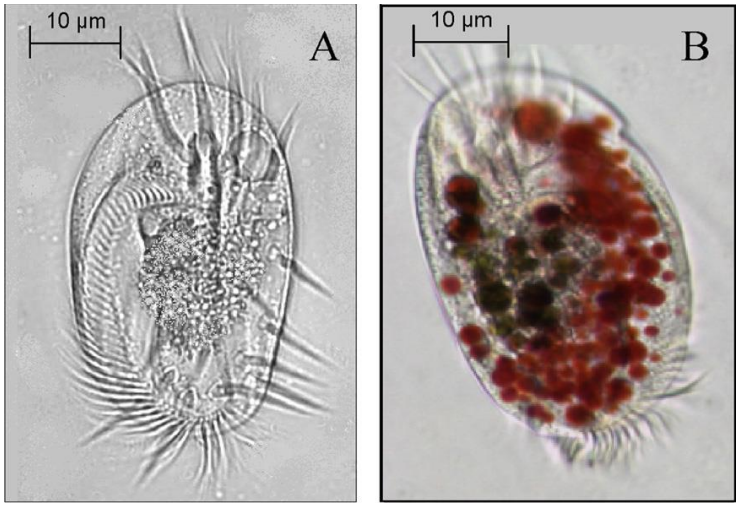
3.5.2. Mikrobiološke analize aktivnog mulja

Mikrobiološke analize aktivnog mulja obuhvaćale su određivanje ukupanog broja bakterija, ukupne koliforme, fekalne koliforme i *Escerichia coli*, sulfit-reducirajuće bakterije, *Pseudomonas aeruginosa* i kvasce. Metode su navedene u poglavlju 3.4., a analize su provedene odmah po uzorkovanju.

3.6. Lizosomski biomarkeri

U ovom istraživanju se planirala koristiti metoda određivanje stabilnosti membrane lizosoma kod trepetljkaša iz aktivnog mulja. Metoda se bazira na zadržavanja neutralnog crvenila.

Histološka boja neutralno crvenilo NC-(3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) je vitalna lipofilna boja. Koristi se za bojanje živih stanica i kao pH indikator. Neutralno crvenilo pasivnom difuzijom prolazi kroz staničnu membranu, pa u lizosome, u kojima se akumulira. U lizosomima je niži pH nego u citoplazmi, zbog čega je neutralno crvenilo (NC) u lizosomima u ionskom obliku i crvene boje. Boja zahvaljujući niskom pH ostaje neko vrijeme „zarobljena“ u lizosomima, ovisno o propusnosti lizosomske membrane. Duljina vremena zadržavanja neutralnog crvenila u lizosomima mjera je oštećenja lizosoma. Zbog oštećenja membrane lizosoma dolazi do slobodnog prolaza boje i hidrolitičkih enzima u okolni citosol koji poprima crveno obojenje (Slika 8). Mjeri se vrijeme zadržavanja neutralnog crvenila u lizosomima. Oštećenje membrane uzrokuje brži prolaz neutralnog crvenila zajedno sa hidrolitičkim enzimima u okolnu citoplazmu koja se oboji crveno, a što se vidi optičkim mikroskopom te može analizirati pomoću programskih paketa za analizu slika.



Slika 8. Trepetljikaš *Euplotes crassus* kao modelni organizam za testove stabilnosti membrane lizosoma; A) neobojena jedinka, B) jedinka tretirana neutralnim crvenilom (preuzeto iz: Gomiero i sur., 2012).

Aktivni mulj korišten u analizama SBI aeriran je u laboratoriju te je mikrofauna trebala biti izložena različitim koncentracijama nanočestica metala. Tijekom tri pokušaja aklimatizacije mikrofaune aktivnog mulja u laboratoriju (korištene su aeracijske pumpe te se pokušalo s razrjeđenjem), nije se uspjelo postići dovoljno preživljavanje mikrofaune te se s ovim dijelom eksperimenta nije nastavilo.

3.7. Statističke metode

Fizikalno-kemijski i mikrobiološki parametri uspoređeni su između različitih režima rada uređaja za pročišćavanje otpadne vode putem t-testa i Mann-Whitney U testom, da bi se utvrdilo postoje li statistički značajne razlike između K i K+I režima. Izbor metode ovisio je o raspodjeli podataka. U slučaju kada podaci nisu slijedili normalnu raspodjelu, koristila se transformacija podataka, međutim ukoliko se ni tad nije postignula normalna raspodjela, rabljen je neparametrijski test.

Kao pokazatelji korelacije koristio se Spearmanov koeficijent korelacije, odnosno neparametrijski koeficijent korelacije. Time se testirala potencijalna korelacija biotičkog indeksa aktivnog mulja i fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara influenta i efluenta na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Isti koeficijant korelacije korišten je za testiranje korelacije gustoće pojedinih svojti i fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara.

Međusobna sličnost zajednica protozoa i mikro-metazoa testirala se Cluster analizom na osnovu Bray-Curtisovog indeksa sličnosti, za izračun kojeg su podaci o brojnosti transfomirani drugim korijenom. Cluster analiza omogućuje grupiranje uzoraka, odnosno zajednica prema sličnosti pri čemu se dobije vizualan prikaz koji je definiran i metodom klasteriranja, kao i korištenim indeksom. Kao mjera za usporedbu klastera korištena je metoda srednje udaljenosti grupa. Statističke analize provedene su u programskim paketima Statistica 13 i PRIMER6.

4. REZULTATI

4.1. Parametri otpadne vode: ulaz (influent) i izlaz (efluent)

4.1.1. Fizikalno-kemijski parametri

Visoka učinkovitost pročišćavanja otpadne vode vidljiva je u smanjenju većine mjerenih parametara (Tablice 5-9). Efluent ili izlazna pročišćena voda koja se ulijeva u kanal Manteč po svim navedenim parametrima je sukladna Pravilniku o graničnim vrijednostima emisije otpadnih tvari (NN 80/13; NN 43/14).

Otpadna voda šećerane razlikovala se u brojnim parametrima od komunalne otpadne vode. Otpadne vode šećerane imale su statistički značajno nižu temperaturu i niži pH te višu električnu vodljivost (Tablice 5 i 7). Koncentracija otopljenog kisika bila je prosječno niža u otpadnim vodama šećerane (Tablica 7), uz izrazito niski minimum od 0,45 mg/L (Tablica 5). Iako je prosječno u komunalnoj otpadnoj vodi koncentracija otopljenog kisika bila dva puta viša, ta razlika nije bila statistički značajna (Tablica 7).

Za usporedbu ulaznih parametara između K i K+I razdoblja uzimana je vrijednost dobivena nakon miješanja dvaju influenata (komunalne otpadne vode i otpadne vode šećerane). Temperatura, količina otopljenog kisika i pH se nisu statistički značajno razlikovali između dva razdoblja rada uređaja (t-test, $p>0,05$), iako je na osnovu srednjih vrijednosti uočljiva određena razlika (Tablica 8). Električna vodljivost bila je statistički značajno veća u razdoblju pročišćavanja zajedničkih influenata (K+I) u odnosu na razdoblje kada se pročišćavala samo komunalna otpadna voda (t-test, $p<0,01$). U efluentu, u odnosu na influent, dolazi do relativno malog smanjenja električne vodljivosti, u odnosu na ostale parametre (Tablica 9).

Tablica 5. Fizikalno–kemijski parametri otpadne vode prije pročišćavanja (influent) i nakon pročišćavanja (efluent) na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

Datumi uzorkovanja	**Temperatura. vode (°C)**			**pH vrijednost**			**Električna vodljivost (µS/cm)**			**Otopljeni kisik (mg O_2/L)**		
	influent -grad	influent-šećerana	efluent	influent-grad	influent-šećerana	efluent	Influent -grad	influent-šećerana	efluent	influent-grad	influent-šećerana	efluent
21.6.2016.	17,5	-	19,6	7,88	-	7,92	1 002	-	760	4,50	-	3,26
4.11.2016.*	16,4	12,4	18,0	8,17	6,96	8,29	1 045	4 900	1 524	5,80	5,5	4,40
18.11.2016.*	14,4	10,4	18,0	8,21	6,64	8,24	1 040	4 870	1 563	4,70	1,4	3,40
2.12.2016.	12,6	-	10,9	8,09	-	7,83	1 149	-	1 105	4,95	-	2,88
24.3.2017.	-	-	14,1	8,02	-	7,78	1 246	-	1 135	-	-	2,22
21.4.2017.	11,5	-	10,4	8,08	-	8,05	910,0	-	941,0	4,30	-	4,10
26.5.2017.	15,0	-	12,2	7,80	-	7,76	1 305	-	1 005	4,59	-	0,35
27.6.2017*.	19,9	-	23,2	8,09	7,44	8,08	1 256	2 260	1 318	0,16	-	3,30
29.9.2017.	19,2	-	18,2	7,93	-	7,79	1 431	-	1 088	3,94	-	3,12
13.10.2017*	18,2	14,4	20,4	8,39	7,46	8,83	1 355	3 270	1 623	4,28	0,45	5,37
3.11.2017*.	18,5	11,0		7,79	6,35	7,59	1 477	4 530	2 740	4,38	0,54	3,26

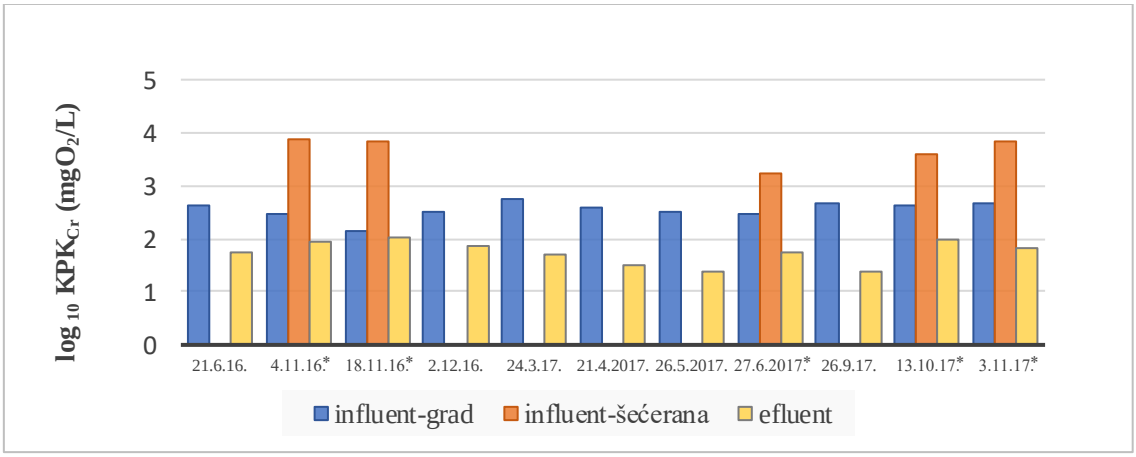
* Razdoblja u kojem su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno.

Tablica 6. Fizikalno–kemijski parametri otpadne vode indikativni za organsko opterećenje prije pročišćavanja (influent) i nakon pročišćavanja (efluent) na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

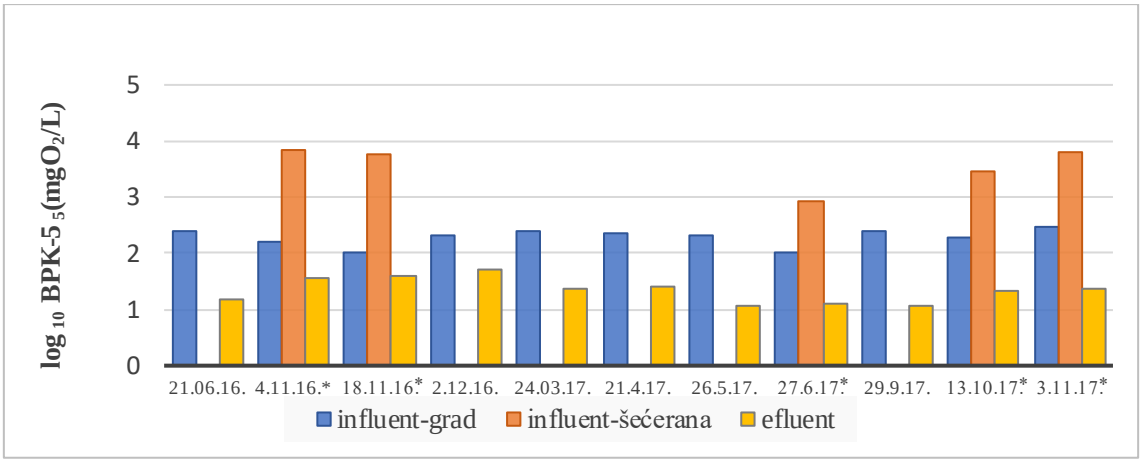
Datumi uzorkovanja	**BPK_5 (mg/L)**			**KPK_{Cr} (mg/L)**			**Suspendirane tvari (mg/L)**			**Ukupni dušik (mg N/L)**			**Ukupni fosfor (mg P/L)**		
	influent -grad	influent-šećerana	efluent	influent -grad	influent-šećerana	Efluent	influent -grad	influent-šećerana	efluent	influent -grad	influent-šećerana	efluent	influent -grad	influent-šećerana	efluent
21.6.16.	244,0	-	14,7	431,6	-	55,0	325,4	-	12,0	40,7	-	16,4	4,80	-	1,55
4.11.16.*	158,0	6 750	37,7	297,8	7 175,1	89,9	112,8	582,0	37,4	34,4	57,2	35,4	4,30	7,50	1,12
18.11.16.*	104,9	5 900	40,2	145,0	7 041,0	104,3	56,7	832,0	57,8	11,2	13,8	9,4	4,46	7,40	2,48
2.12.16.	211,7	-	52,0	309,8	-	71,8	106,3	-	31,3	32,7	-	13,4	4,52	-	2,67
24.3.17.	258,0	-	23,1	542,8	-	50,6	209,1	-	6,8	61,0	-	50,2	6,46	-	2,42
21.4.17.	234,3	-	24,7	404,0	-	32,7	223,9	-	10,7	44,6	-	31,8	6,22	-	3,04
26.5.2017.	208,0	-	11,7	322,5	-	23,6	90,3	-	7,9	94,6	-	25,1	5,55	-	2,61
27.6.2017.*	106,6	840	12,8	304,8	1 741,7	53,4	69,5	533,0	14,8	58,4	37,3	47,8	5,18	6,72	3,65
29.9.2017.	256,4	-	11,5	461,8	-	23,0	167,8	-	2,7	51,9	-	32,4	7,65	-	3,86
13.10.2017*	194,0	2 910	21,9	420,0	4 110,0	101,1	108,6	151,0	14,5	49,2	38,2	31,7	6,92	5,88	2,00
3.11. 2017*.	291,0	6 070	24,3	481,7	6 709,0	69,7	134,2	391,5	18,7	69,5	15,2	33,3	6,36	4,34	1,48

*Razdoblja u kojima su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno.

Kemijska potrošnja kisika i biološka potrošnja kisika bile su puno više u otpadnim vodama šećerane u odnosu na komunalnu otpadnu vodu. Influent iz šećerane imao je KPK i preko 7 000 mg O_2/L, dok su vrijednosti BPK_5 iznosile i preko 6 000 mg O_2/L (Tablica 6). Te vrijednosti su u prosjeku bile više 20 puta od vrijednosti u komunalnoj otpadnoj vodi za KPK, odnosno 30 puta više za BPK_5. Ove razlike bile su statistički značajne (Tablica 7). Nakon miješanja otpadnih voda, zajednički influent je imao niže vrijednosti za oba parametra (Tablica 8). Kemijska potrošnja kisika bila je statistički značajno viša u uzorcima zajedničkog influenta komunalnih i otpadnih voda šećerane u odnosu na komunalne otpadne vode (t-test, $p<0,001$) (Slika 9). Redukcija kemijske potrošnje kisika (KPK) je bila između 76,4 % i 96,8 %, a redukcija biološke potrošnje kisika između 76,1 % i 98,5 % (Tablica 9). Potonji parametar također se statistički značajno razlikovao između dva režima rada (t-test, $p<0,001$), pri čemu su vrijednosti bile više za kombiniranu otpadnu vodu (Slika 10). Omjer KPK i BPK_5 bio je viši u K otpadnoj vodi (u prosjeku 1,9) u odnosu na I otpadnu vodu (u prosjeku 1,4).

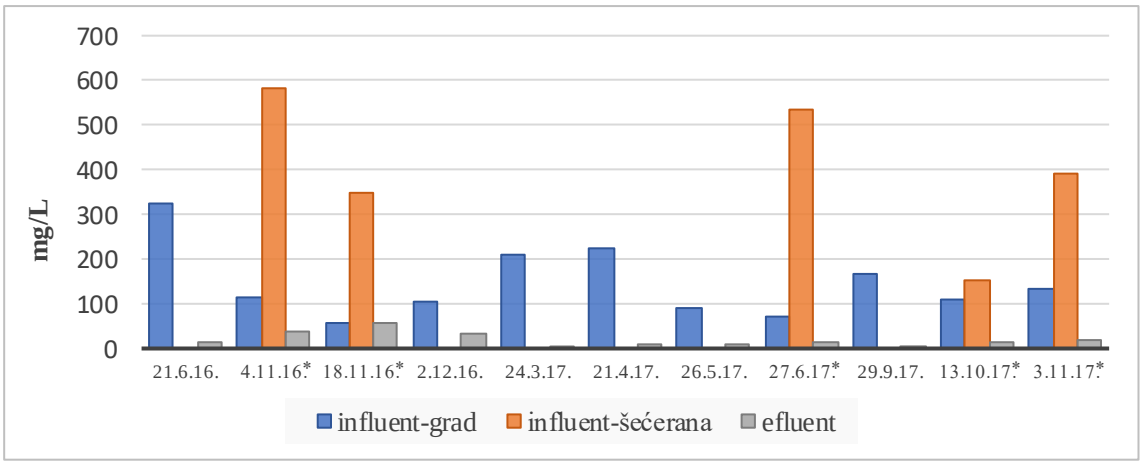


Slika 9. Kemijska potrošnja kisika (KPK) ulazne i izlazne otpadne vode na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).



Slika 10. Biološka potrošnja kisika (BPK_5) ulazne i izlazne otpadne vode na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

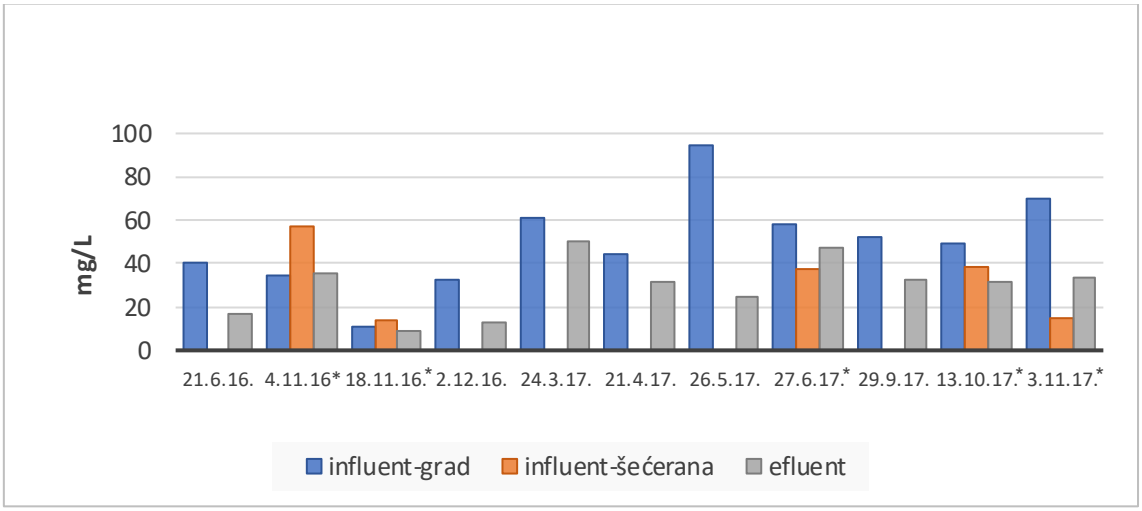
Količina suspendirane tvari influenta nije se statistički značajno razlikovala između dva režima rada (t-test, $p>0,05$), iako su otpadne vode šećerane imale veliku količinu suspendirane tvari te su se međusobno K i I otpadna voda statistički značajno razlikovale (Tablica 7). Redukcija suspendirane tvari je bila od 83,4 % do 93,7 % (Tablica 8).



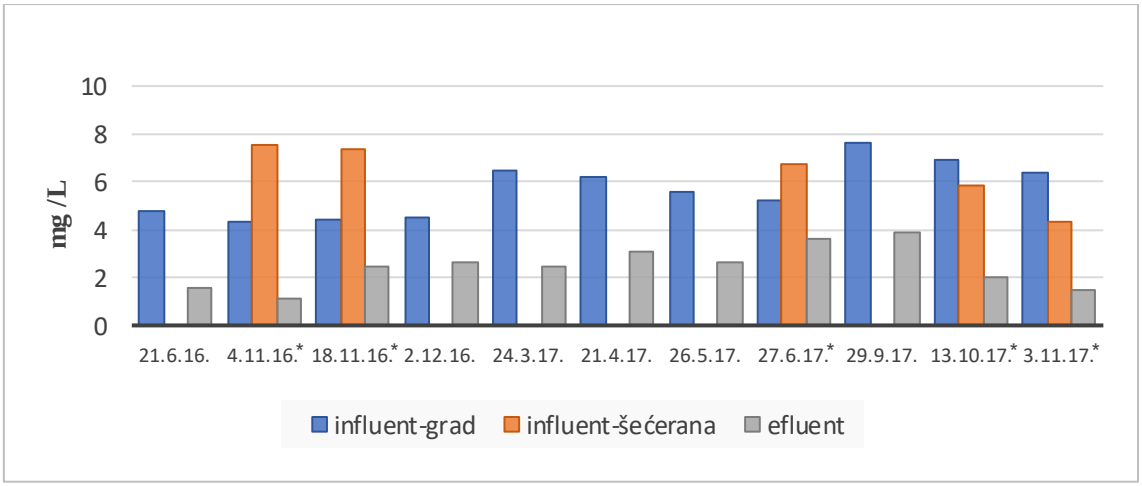
Slika 11. Suspendirana tvar ulazne i izlazne otpadne vode na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Koncentracije ukupnog dušika i ukupnog fosfora nisu se statistički značajno razlikovale između otpadnih voda šećerane i komunalnih otpadnih voda (Tablica 7), niti je zabilježena statistički značajna razlika između influenta komunalne otpadne vode i kombinirane otpadne vode (K+I) (t-test, $p>0,05$). Ukupni dušik i ukupni fosfor pokazuju smanjenje vrijednosti nakon pročišćavanja (Slike 12 i 13). Izlazne vrijednosti su iznad 10 mg/L kako propisuje Pravilnik o

graničnim vrijednostima emisije otpadnih tvari (NN 80/13; NN 43/14). Učinkovitost pročišćavanja je dosta varijabilna i za ukupni dušik i ukupni fosfor, a relativno niska za ukupni dušik (Tablica 9).



Slika 12. Koncentracija ukupnog dušika ulazne i izlazne otpadne vode na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).



Slika 13. Koncentracija ukupnog fosfora ulazne i izlazne otpadne vode na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Tablica 7. Srednje vrijednosti (± SD) fizikalno-kemijskih parametara komunalne i industrijske otpadne vode i rezultat Mann-Whitney U testa (p-vrijednost; statistički značajne razlike su označene podebljano).

Parametar	**Mjerna jedinica**	**Komunalna otpadna voda (K)**	**Industrijska otpadna voda (I)**	**p-vrijednost**
Temperatura	°C	15,2 ± 2,7	12,1 ± 1,8	**0,023**
pH		7,97 ± 0,13	7,0 ± 0,5	**0,002**
Električna vodljivost	µS/cm	1174 ± 165	3966 ± 1162	**0,002**
Otopljeni kisik	mg/L	4,5 ± 0,3	2,0 ± 1,9	0,289
KPK	mg O_2/L	412,1 ± 87,7	5355,4 ± 2376,7	**0,002**
BPK_5	mg O_2/L	235,4 ± 21,6	4494,0 ± 2520,5	**0,002**
Suspendirane tvari	mg/L	187,1 ± 86,3	401,5 ± 170,3	**0,009**
Ukupni N	mg N/L	54,3 ± 24,6	32,3 ± 18,1	0,174
Ukupni P	mg P/L	5,9 ± 1,2	6,4 ± 1,3	0,365

Tablica 8. Srednje vrijednosti (± SD) ulaznih (influent) i izlaznih (efluent) fizikalno-kemijskih parametara tijekom dva razdoblja pročišćavanja otpadnih voda na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

		Komunalna otpadna voda (K)		**Komunalna i industrijska otpadna voda (K+I)**	
Parametar	**Mjerna jedinica**	**influent**	**efluent**	**influent**	**efluent**
Temperatura	°C	15,2 ± 2,7	14,2 ± 3,7	17,2 ± 3,4	19,9 ± 2,1
pH		7,97 ± 0,13	7,86 ± 0,12	7,78 ± 0,17	8,4 ± 0,3
Električna vodljivost	µS/cm	1174 ± 165	1005 ± 150	2100 ± 366	1568 ± 178
Otopljeni kisik	mg/L	4,47 ± 0,27	2,66 ± 1,41	3,03 ± 1,73	4,2 ± 0,9
KPK	mg O_2/L	412,1 ± 87,7	42,8 ± 19,6	1739,6 ± 1051,2	82,7 ± 21,7
BPK_5	mg O_2/L	235,4 ± 21,6	22,9 ± 15,3	1354,7 ± 137,4	27,4 ± 11,4
Suspendirane tvari	mg/L	187,1 ± 86,3	11,9 ± 10,0	224,0 ± 100,9	28,6 ± 18,8
Ukupni N	mg N/L	54,3 ± 24,6	28,2 ± 14,7	41,4 ± 17,1	31,5 ± 13,9
Ukupni P	mg P/L	5,87 ± 1,16	2,69 ± 0,76	5,64 ± 0,60	2,15 ± 0,99

Tablica 9. Učinkovitost pročišćavanja za dio fizikalno-kemijskih parametara tijekom dva razdoblja pročišćavanja otpadnih voda na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

	Komunalna otpadna voda (K)			**Komunalna i industrijska otpadna voda (K+I)**		
Parametar	**Min**	**Maks**	**Sr. vri.**	**Min**	**Maks**	**Sr. vri.**
Električna vodljivost	-3,4 %	24,2 %	13,4 %	2,7 %	37,7 %	23,7 %
KPK	75,4 %	95,5 %	90,0 %	92,9 %	98,5 %	96,9 %
BPK_5	76,8 %	95,0 %	89,1 %	86,5 %	96,8 %	93,5 %
Suspendirane tvari	70,6 %	98,4 %	91,4 %	83,4 %	94,0 %	87,3 %
Ukupni N	17,7 %	73,5 %	46,1 %	5,2 %	41,0 %	23,2 %
Ukupni P	40,9 %	67,7 %	54,1 %	36,7 %	79,6 %	62,1 %

4.1.2. Mikrobiološke analize otpadne vode (influent i efluent)

Rezultati mikrobioloških analiza otpadne vode prije i poslije pročišćavanja pokazuju smanjenje broja bakterija tijekom pročišćavanja, i to ukupnog broja bakterija, koliformnih bakterija, enterokoka, *E. coli*, sulfit-reducirajućih bakterija, *P. aeruginosa* kao i kvasaca. (Tablice 10 i 11). Usprkos visokim vrijednostima pojedinih mikrobioloških parametara (Tablica 12), učinkovitost pročišćavanja bila je vrlo visoka (Tablica 13).

Tablica 10. Brojnost bakterija (ukupan broj bakterija, koliforni, enterokoki i *Escherichia coli)* u influentu komunalne otpadne vode i otpadne vode šećerane te efluentu na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

Datumi uzorkovanja	**Ukupan broj bakterija /37°C/mL**			**Koliformi/100 mL**			**Enterokoki/100 mL**			***E. coli*/100 mL**		
	influent -grad	influent -šećerana	efluent	influent -grad	influent -šećerana	efluent	influent -grad	influent -šećerana	efluent	influent -grad	influent -šećerana	efluent
21.6.´16.	$1{,}17 \times 10^6$	-	1×10^4	$6{,}3 \times 10^6$	-	$4{,}0 \times 10^4$	$1{,}22 \times 10^6$	-	$5{,}0 \times 10^3$	$3{,}87 \times 10^6$	-	-
4.11.´16*	$2{,}82 \times 10^5$	$4{,}12 \times 10^7$	$4{,}6 \times 10^4$	$1{,}85 \times 10^7$	$3{,}79 \times 10^5$	$1{,}05 \times 10^5$	$7{,}6 \times 10^5$	$1{,}17 \times 10^7$	$2{,}28 \times 10^4$	$5{,}20 \times 10^6$	$1{,}08 \times 10^3$	$3{,}26 \times 10^4$
18.11.16.*	$2{,}14 \times 10^5$	$1{,}90 \times 10^7$	$5{,}8 \times 10^4$	$5{,}73 \times 10^6$	$5{,}17 \times 10^5$	$3{,}41 \times 10^5$	$3{,}2 \times 10^5$	$1{,}5 \times 10^7$	$3{,}2 \times 10^4$	$1{,}44 \times 10^6$	$2{,}43 \times 10^4$	$6{,}87 \times 10^4$
2.12.´16.	$4{,}40 \times 10^5$	-	$1{,}1 \times 10^4$	$9{,}8 \times 10^6$	-	$8{,}8 \times 10^4$	$1{,}480^6$	-	$9{,}0 \times 10^3$	$2{,}72 \times 10^6$	-	$1{,}46 \times 10^4$
24.3.´17.	$4{,}32 \times 10^5$	-	$1{,}01 \times 10^4$	$1{,}41 \times 10^7$	-	$2{,}14 \times 10^5$	$1{,}25 \times 10^6$	-	$3{,}2 \times 10^4$	$2{,}19 \times 10^6$	-	$5{,}65 \times 10^4$
21.4.´17.	$1{,}54 \times 10^5$	-	$1{,}65 \times 10^3$	$9{,}8 \times 10^6$	-	$5{,}8 \times 10^5$	$9{,}1 \times 10^5$	-	$1{,}09 \times 10^5$	$4{,}11 \times 10^6$	-	$1{,}22 \times 10^5$
26.5. ´17	$1{,}63 \times 10^5$	-	$2{,}0 \times 10^4$	$1{,}55 \times 10^7$	-	$9{,}8 \times 10^5$	$1{,}27 \times 10^6$	-	$3{,}37 \times 10^4$	$5{,}79 \times 10^6$	-	$2{,}38 \times 10^5$
27.6.´17.*	$3{,}63 \times 10^5$	$3{,}63 \times 10^5$	$4{,}4 \times 10^3$	$1{,}20 \times 10^7$	$3{,}63 \times 10^5$	$1{,}27 \times 10^5$	$7{,}0 \times 10^5$	$3{,}63 \times 10^5$	$6{,}70 \times 10^3$	$\times 10^2$	$3{,}63 \times 10^5$	$3{,}0 \times 10^3$
29.9.´17.	$2{,}80 \times 10^5$	-	$5{,}30 \times 10^3$	$1{,}41 \times 10^7$	-	$1{,}27 \times 10^5$	$2{,}50 \times 10^6$	-	$1{,}20 \times 10^4$	$3{,}13 \times 10^5$	-	$1{,}99 \times 10^4$
13.10.´17*	$3{,}28 \times 10^5$	$4{,}00 \times 10^6$	$3{,}8 \times 10^3$	$1{,}73 \times 10^7$	$3{,}45 \times 10^6$	$4{,}35 \times 10^4$	$1{,}25 \times 10^6$	$5{,}60 \times 10^6$	$2{,}5 \times 10^3$	$4{,}36 \times 10^6$	$1{,}12 \times 10^5$	$4{,}55 \times 10^3$
3.11.´17.*	$4{,}80 \times 10^5$	$1{,}7 \times 10^7$	$2{,}31 \times 10^4$	$1{,}55 \times 10^5$	$1{,}19 \times 10^6$	$1{,}55 \times 10^5$	$7{,}2 \times 10^5$	$1{,}04 \times 10^6$	$1{,}22 \times 10^4$	$6{,}13 \times 10^6$	$1{,}00 \times 10^4$	$2{,}60 \times 10^4$

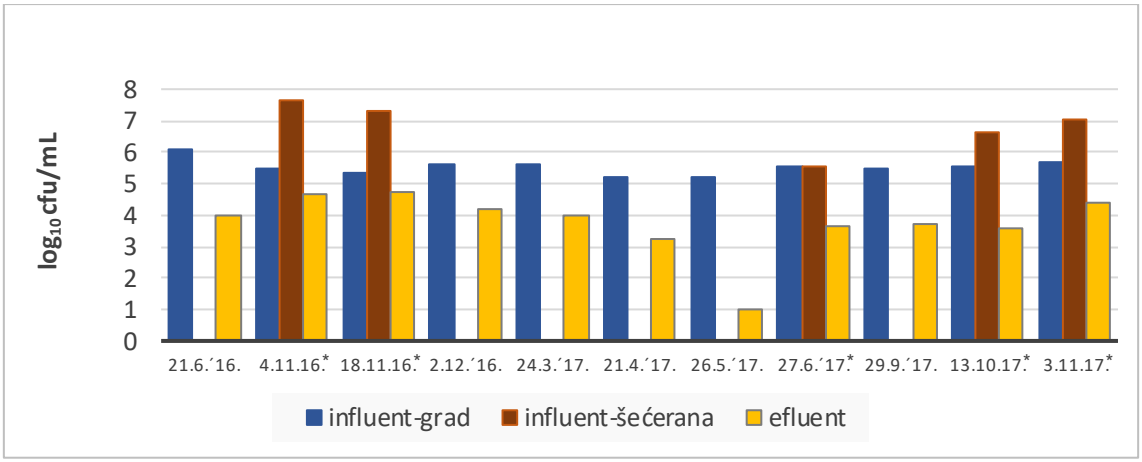
* Razdoblja u kojima su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno.

Tablica 11. Brojnost bakterija (sulfit-reducirajuće bakterije, pseudomonas i kvasci) u influentu komunalne otpadne vode i otpadne vode šećerane te efluentu na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

Datumi uzorkovanja	**Sulfit-reducirajuće bakterije mL**			***Pseudomonas aeruginosa* /100 mL**			**Kvasci/mL**		
	influent-grad	influent-šećerana	efluent	influent-grad	influent-šećerana	efluent	influent-grad	influent-šećerana	efluent
21.6.´16.	$3{,}0 \times 10^2$	-	$1{,}3 \times 10^2$	$2{,}25 \times 10^2$	-	$3{,}1 \times 10^2$	-	-	-
4.11.´16*	$4{,}3 \times 10^2$	-	$2{,}74 \times 10^2$	$1{,}83 \times 10^5$	-	$2{,}43 \times 10^3$	-	-	-
18.11.16.*	$5{,}0 \times 10^1$	$2{,}510^3$	$1{,}3 \times 10^2$	$9{,}59 \times 10^4$	$1{,}75 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^3$	$2{,}2 \times 10^2$	$6{,}04 \times 10^3$	$1{,}4 \times 10^1$
2.12.´16.	$6{,}0 \times 10^2$	-	$4{,}0 \times 10^1$	$2{,}6 \times 10^5$	-	$4{,}35 \times 10^3$	$4{,}28 \times 10^2$	-	$4{,}2 \times 10^1$
24.3.´17.	$6{,}0 \times 10^2$	-	$5{,}5 \times 10^1$	$1{,}21 \times 10^5$	-	$2{,}14 \times 10^3$	$2{,}5 \times 10^2$	-	$1{,}2 \times 10^1$
21.4.1´17.	$1{,}80 \times 10^3$	-	$7{,}0 \times 10^1$	$3{,}32 \times 10^4$	-	$7{,}27 \times 10^3$	$3{,}40 \times 10^2$	-	$8{,}1 \times 10^1$
26.5. ´17.	$1{,}80 \times 10^3$	-	$7{,}5 \times 10^1$	$6{,}91 \times 10^4$	-	$8{,}66 \times 10^3$	$8{,}6 \times 10^2$	-	$7{,}9 \times 10^1$
27.6.´17. *	$2{,}0 \times 10^3$	-	$8{,}00 \times 10^1$	$1{,}01 \times 10^5$	$1{,}16 \times 10^3$	$1{,}21 \times 10^3$	$1{,}86 \times 10^3$	-	$1{,}7 \times 10^1$
26.9.´17.	$1{,}10 \times 10^3$	-	$2{,}00 \times 10^1$	$1{,}4 \times 10^4$	-	$4{,}28 \times 10^2$	$3{,}2 \times 10^2$	-	$1{,}30 \times 10^1$
13.10.´17*	$1{,}00 \times 10^2$	$4{,}00 \times 10^2$	$4{,}00 \times 10^1$	$1{,}41 \times 10^5$	$4{,}37 \times 10^2$	$7{,}70 \times 10^2$	$6{,}90 \times 10^1$	$8{,}4 \times 10^2$	$8{,}00 \times 10^0$
3.11.´17*	$1{,}7 \times 10^2$	$1{,}00 \times 10^2$	$2{,}00 \times 10^1$	$1{,}55 \times 10^6$	$1{,}33 \times 10^3$	$1{,}41 \times 10^3$	$8{,}7 \times 10^2$	$5{,}80 \times 10^3$	$4{,}40 \times 10^1$

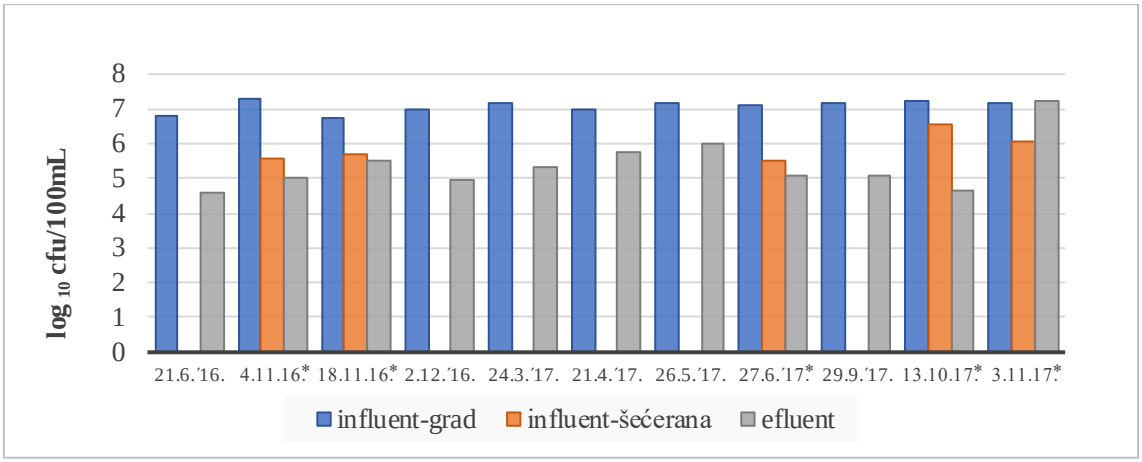
* Razdoblja u kojima su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno.

Otpadna voda šećerane imala je statistički značajno veći ukupan broj bakterija, pri čemu se radi o razlici za gotovo dva reda veličine (Tablica 12). Nakon miješanja otpadnih voda, međutim, ukupan broj bakterija nije se statistički značajno razlikovao između influenta komunalne otpadne vode i kombinirane otpadne vode (t-test, $p>0,05$). Najviše vrijednosti zabilježene u otpadnoj vodi šećerane iznosile su iznad 4×10^7 CFU/mL (Slika 14). Učinkovitost pročišćavanja za ovaj parametar kretala se od 69,7 % do visokih 99,1 % (Tablica 14).



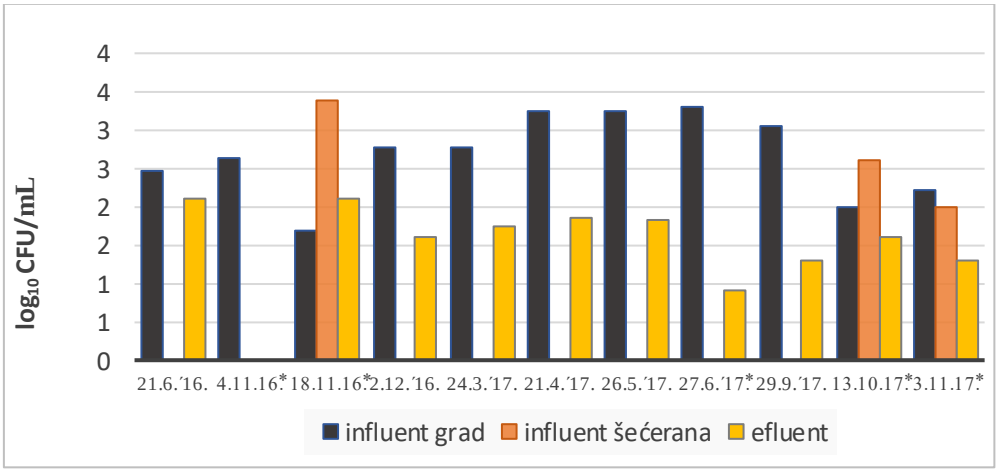
Slika 14. Ukupan broj bakterija u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Koliformne bakterije imale su prosječno 10 puta veću brojnost u komunalnoj otpadnoj vodi u odnosu na otpadnu vodu šećerane, a ta razlika je bila statistički značajna (Tablica 12). Broj kolifomnih bakterija bio je u prosjeku $1,16 \times 10^7$ CFU/mL u komunalnoj otpadnoj vodi, a $7,53 \times 10^6$ CFU/mL u otpadnoj vodi šećerane pomiješanoj s komunalnom otpadnom vodom, ali ta razlika nije bila statistički značajna (t-test, $p>0,05$). Učinkovitost pročišćavanja bila je visoka (Slika 15) te se kretala od 86,3 % do 99,6 %.



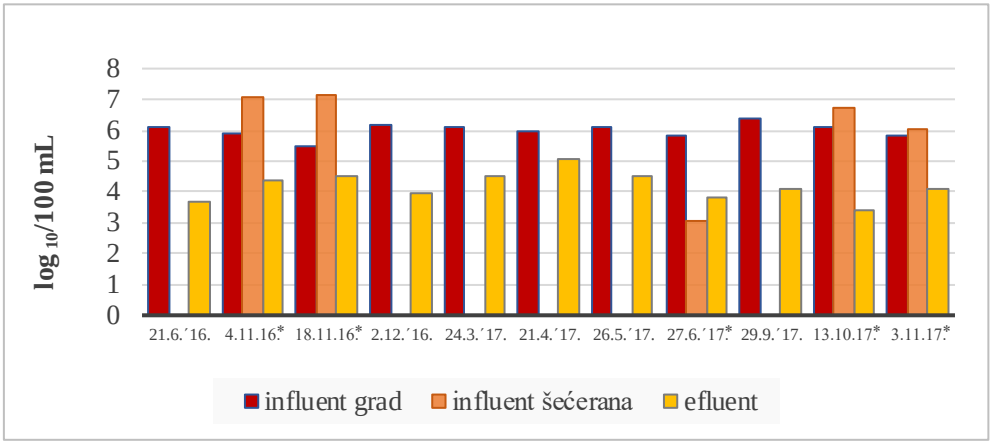
Slika 15. Koliformne bakterije u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Nije zabilježena statistički značajna razlika u brojnosti sulfit-reducirajućih bakterija između komunalne i industrijske otpadne vode (Tablica 12). Također, nije bilo ni statistički značajne razlike između influenata K i K+I razdoblja, što je potvrdio t-test ($p>0,05$). Učinkovitost pročišćavanja sulfit-reducirajućih bakterija je bila vrlo varijabilna te se kretala od 0 do gotovo 100 %.



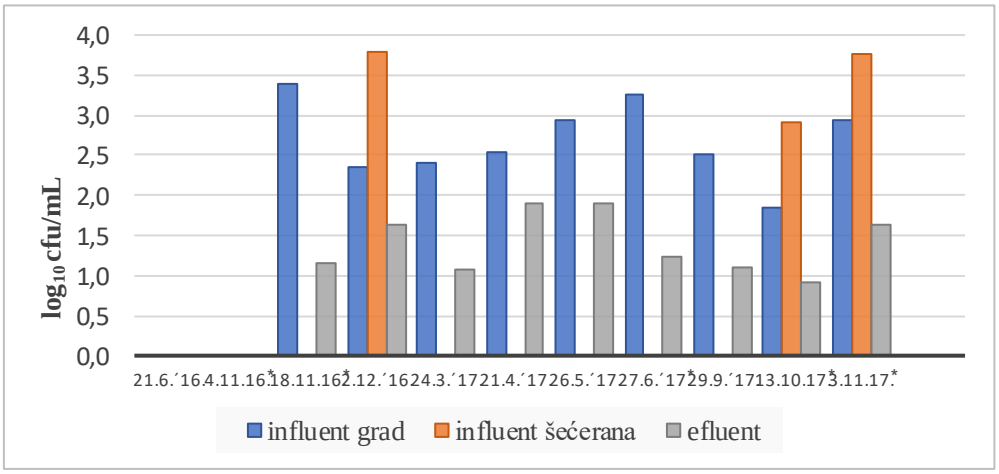
Slika 16. Sulfit-reducirajuće bakterije u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Brojnost enterobakterija bila je nešto viša u otpadnim vodama šećerane (Slika 17), ali ne statistički značajno (Tablica 12). Nije zabilježena ni statistički značajna razlika u brojnosti enterobakterija između efluenta komunalne i kombinirane otpadne vode (t-test, $p>0,05$). Učinkovitost pročišćavanja kretala se između 88 % i 99,9 % (Tablica 14).



Slika 17. Enterokoki u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

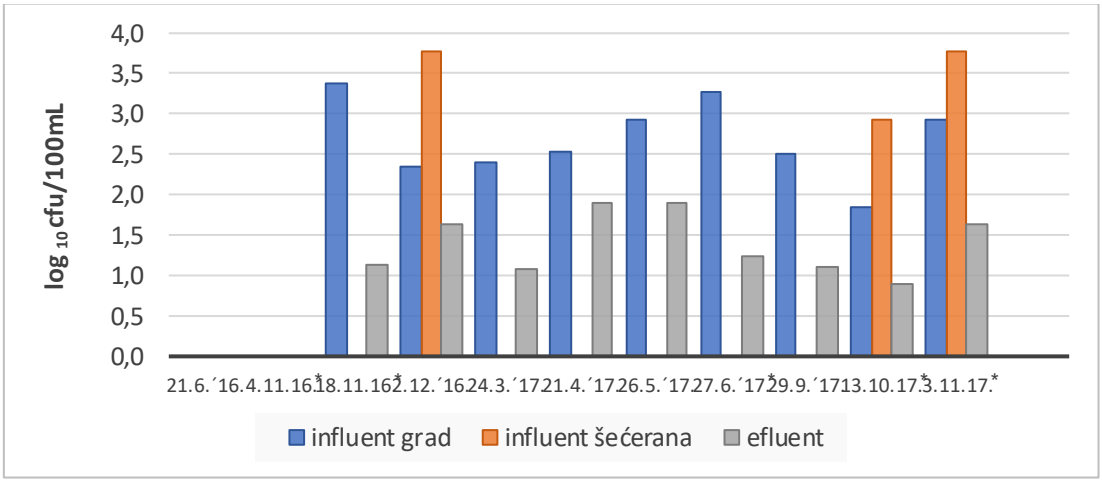
Otpadna voda šećerane imala je statistički značajno veći broj kvasaca u odnosu na komunalne otpadne vode (Slika 18, Tablica 12). Isti odnos ostao je i nakon miješanja te je komunalna otpadna voda imala statistički značajno niži broj kvaščevih gljivica u odnosu na kombinirane otpadne vode (t-test, $p<0,05$). Pročišćavanje je bilo vrlo učinkovito s vrijednostima smanjenja od 76,2 % do 99,4 % (Tablica 14).



Slika 18. Kvasci u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

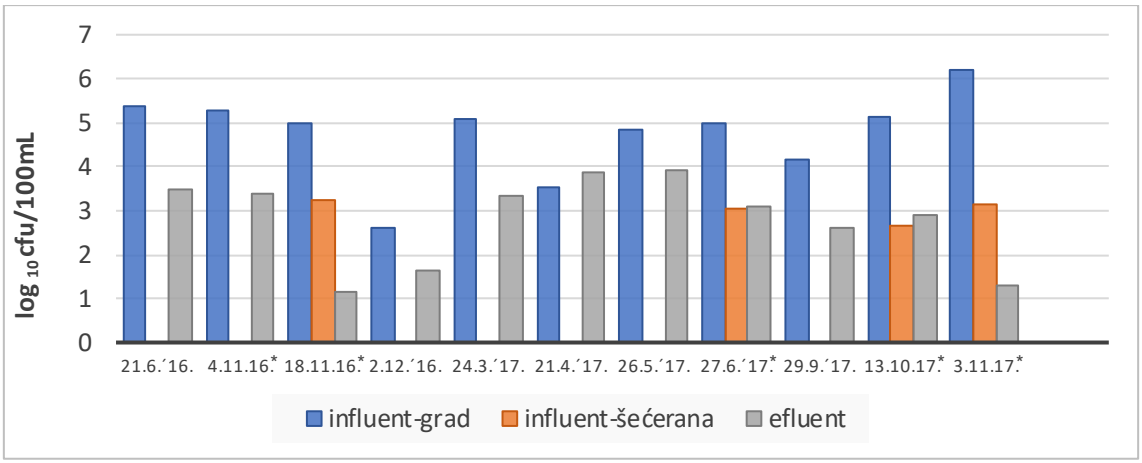
E. coli bila je znatno brojnija u komunalnoj otpadnoj vodi, pri čemu je razlika znala iznositi i tri reda veličine (Slika 19, Tablica 12). Brojnost *E. coli* bila je niža u kombiniranoj

otpadnoj vodi, u odnosu na komunalne otpadne vode (Tablica 13), ali ta razlika nije bila statistički značajna (t-test, p>0,05). Učinkovitost pročišćavanja bila je od 93,6 % do gotovo 100 % (Tablica 14).



Slika 19. *E coli* u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Brojnost *P. aeruginosa* bila je viša u komunalnoj otpadnoj vodi u odnosu na otpadnu vodu šećerane (Slika 20) i ta razlika je bila statistički značajna (Tablica 12). Nakon miješanja, influenti se nisu statistički značajno razlikovali (Tablica 13) (t-test, p>0,05). Učinkovitost pročišćavanja kretala se od 78,1 % do 99,9 % (Tablica 14).



Slika 20. *Pseudomonas aeruginosa* u ulaznoj i izlaznoj otpadnoj vodi na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Datumi uzorkovanja tijekom kojih su se gradska otpadna voda i otpadne voda tvornice šećera pročišćavale zajedno označeni su zvjezdicom (*).

Tablica 12. Srednje vrijednosti (± SD) mikrobioloških parametara komunalne i industrijske otpadne vode i rezultat Mann-Whitney U testa (p-vrijednost; statistički značajne razlike su označene podebljano).

Parametar	**Mjerna jedinica**	**Komunalna otpadna voda (K)**	**Industrijska otpadna voda (I)**	**p-vrijednost**
Ukupne bakterije (37 °C)	CFU/mL	$4{,}40 \times 10^5 \pm 3{,}79 \times 10^4$	$1{,}51 \times 10^7 \pm 1{,}63 \times 10^7$	**0,013**
Koliformi	CFU/100 mL	$1{,}16 \times 10^7 \pm 3{,}53 \times 10^6$	$1{,}17 \times 10^6 \pm 1{,}32 \times 10^5$	**0,002**
Enterokoki	CFU/100 mL	$1{,}44 \times 10^6 \pm 5{,}51 \times 10^5$	$6{,}67 \times 10^6 \pm 6{,}56 \times 10^6$	0,257
Sulfit-reducirajuće bakterije	CFU/mL	913 ± 533	$1{,}00 \times 10^3 \pm 1{,}31 \times 10^3$	0,938
Escherichia coli	CFU/100 mL	$3{,}17 \times 10^6 \pm 1{,}87 \times 10^6$	$2{,}53 \times 10^3 \pm 1{,}15 \times 10^3$	0,096
Pseudomonas aeruginosa	CFU/100 mL	$1{,}20 \times 10^5 \pm 1{,}02 \times 10^5$	$1{,}17 \times 10^3 \pm 5{,}48 \times 10^2$	**0,022**
Kvasci	CFU/mL	440 ± 243	$4{,}23 \times 10^3 \pm 2{,}94 \times 10^3$	**0,013**

Tablica 13. Srednje vrijednosti (± SD) ulaznih (influent) i izlaznih (effluent) mikrobioloških parametara tijekom dva razdoblja pročišćavanja otpadnih voda.

		Komunalna otpadna voda (K)		**Komunalna i industrijska otpadna voda (K+I)**	
Parametar	**Mjerna jedinica**	**influent**	**efluent**	**influent**	**efluent**
Ukupne bakterije (37 °C)	CFU/mL	$4{,}40 \times 10^5 \pm 3{,}79 \times 10^4$	$9{,}68 \times 10^3 \pm 6{,}20 \times 10^3$	$2{,}05 \times 10^6 \pm 3{,}00 \times 10^6$	$2{,}71 \times 10^4 \pm 2{,}44 \times 10^4$
Koliformi	CFU/100 mL	$1{,}16 \times 10^7 \pm 3{,}53 \times 10^6$	$3{,}38 \times 10^5 \pm 3{,}69 \times 10^5$	$7{,}53 \times 10^6 \pm 4{,}93 \times 10^6$	$1{,}54 \times 10^5 \pm 1{,}12 \times 10^5$
Enterokoki	CFU/100 mL	$1{,}44 \times 10^6 \pm 5{,}51 \times 10^5$	$3{,}35 \times 10^4 \pm 3{,}89 \times 10^4$	$2{,}81 \times 10^6 \pm 2{,}53 \times 10^6$	$1{,}52 \times 10^4 \pm 1{,}21 \times 10^4$
Sulfit-reducirajuće bakterije	CFU/mL	913 ± 533	64 ± 37	720 ± 789	90 ± 78
Escherichia coli	CFU/100 mL	$3{,}17 \times 10^6 \pm 1{,}87 \times 10^6$	$7{,}52 \times 10^4 \pm 9{,}10 \times 10^4$	$2{,}50 \times 10^6 \pm 1{,}51 \times 10^6$	$2{,}70 \times 10^4 \pm 2{,}67 \times 10^4$
Pseudomonas aeruginosa	CFU/100 mL	$1{,}20 \times 10^5 \pm 1{,}02 \times 10^5$	$3{,}86 \times 10^3 \pm 3{,}53 \times 10^3$	$2{,}90 \times 10^5 \pm 4{,}65 \times 10^4$	$1{,}36 \times 10^3 \pm 6{,}42 \times 10^2$
Kvasci	CFU/mL	440 ± 243	45 ± 34	2682 ± 3084	37 ± 38

Tablica 14. Učinkovitost pročišćavanja za mikrobiološke parametre tijekom dva razdoblja pročišćavanja otpadnih voda.

	Komunalna otpadna voda (K)			**Komunalna i industrijska otpadna voda (K+I)**		
Parametar	**Min**	**Maks**	**Sr. vri.**	**Min**	**Maks**	**Sr. vri.**
Ukupne bakterije (37 °C)	93,7 %	99,4 %	97,3 %	86,3 %	99,6 %	94,9 %
Koliformi	88,0 %	99,6 %	96,9 %	90,0 %	99,9 %	97,5 %
Enterokoki	56,7 %	98,2 %	88,1 %	-38,9 %	100,0 %	65,0 %
Sulfit-reducirajuće bakterije	93,6 %	100,0 %	97,2 %	92,4 %	99,8 %	98,1 %
Escherichia coli	78,1 %	99,.9 %	93,2 %	97,9 %	99,9 %	98,7 %
Pseudomonas aeruginosa	76,2 %	95,9 %	87,0 %	94,4 %	99,4 %	97,9 %

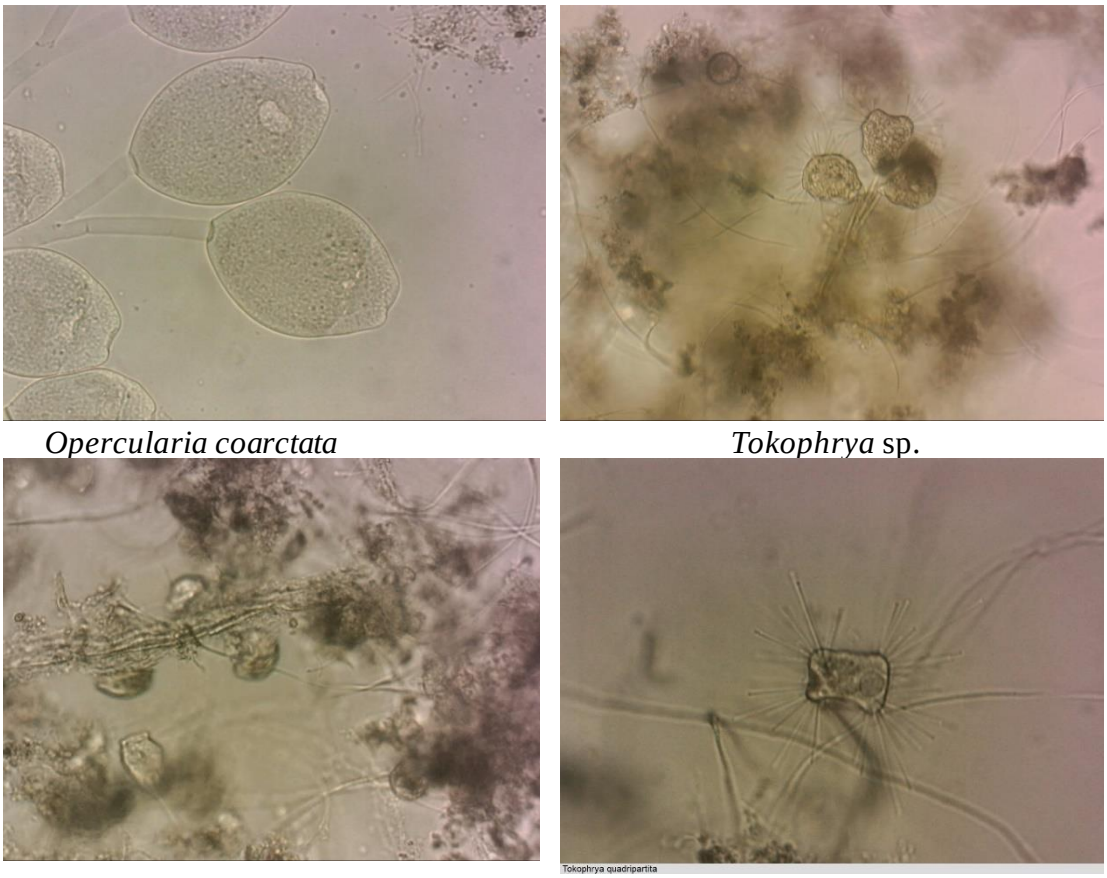
4.2. Aktivni mulj

4.2.1. Biotički indeks aktivnog mulja

Evaluacija učinkovitosti pročišćavanje otpadnih voda na bazi aktivnog mulja se procjenjivala na osnovu prisutnih zajednica protozoa koristeći biotički indeks aktivnog mulja (SBI).

Tijekom ovog istraživanja identificirano je ukupno 38 svojti protozoa i sitnih Metazoa (Tablica 15), Protozoa su bili dominantni i u raznolikosti (30 svojti) i u brojnosti (85 -100 % u ukupnoj brojnosti). Jedini Metazoa u aktivnom mulju su bili kolnjaci i oblići (Tablica 15). Trepetljikaši su bili najraznolikiji među praživotinjama (27 svojti). Najveća brojnost je zabilježena za sesilne (pričvršćene) svojte trepetljikaša, posebno sesilne peritrihne vrste *Vorticella convallaria, V. microstoma, Opercularia coarctata* (Slika 21) i *Epistilys* sp. Vrsta *V. convallaria* je bila najzastupljenija vrsta s prosječno 2,25 x 10^6 jedinki/L. Od pokretnih oblika, puzajuća vrsta trepetljikaša *Aspidisca cicada* (Slika 21) bila je najbrojnija. Sitni bičaši imali su vrlo nisku brojnost i niti u jednom uzorku nisu zabilježeni s više od 10 jedinki, odnosno uglavnom ih nije bilo.

Prosječan broj svojti po jednom uzorku je bio 10 za oba razdoblja (K i K+I). Brojnost mikrofaune je bila iznad 10^6 jedinki/L u oba razdoblja. Međutim, prosječna brojnost mikrofaune je bila skoro tri puta veća u aktivnom mulju za vrijeme pročišćavanja komunalne vode, u usporedbi s razdobljem kad se pročišćavala zajedno komunalna i industrijska otpadna voda (Tablica 15). Ova razlika je bila statistički značajna (Mann-Whitney U test, $p<0,05$). Pojedine svojte pokazale su preferenciju prema K ili K+I uvjetima. Sesilna vrsta trepetljikaša *Epistylis coronata*, okućen *Euglypha* sp. i kolnjaci porodice Bdelloidea imali su veću brojnost tijekom K+I razdoblja. Sesilni trepetljikaši *Vorticella convallaria, V. microstoma* i *Opercularia coarctata* i pokretna vrsta *Aspidisca cicada* imale su veću brojnost u aktivnom mulju tijekom K uvjeta.



Opercularia coarctata *Tokophrya* sp.

Aspidisca cicada *Tokophrya* sp.

Slika 21. Trepetljikaši aktivnog mulja na flokulama u uzorcima s Uređaja za pročišćavanje u Virovitici.

Biotički indeks mulja je bio visok u oba razdoblja te je iznosio od 6 do 10 za K razdoblje i od 8 do 10 za K+I razdoblje, ukazujući na dobru kvalitetu aktivnog mulja u oba razdoblja, odnosno uglavnom na 1. klasu aktivnog mulja (Tablica 4). Ove vrijednosti biotičkog indeksa mulja su u korelaciji s velikom učinkovitošću pročišćavanja. Niže vrijednosti, odnosno SBI od 6 je bio u dva slučaja za vrijeme pročišćavanja komunalne otpadne vode.

Tablica 15. Brojnost (jed/L) protozoa i sitnih metazoa u uzorcima aktivnog mulja i biotički indeks aktivnog mulja (SBI) tijekom dva istraživana razdoblja.

	Komunalna otpadna voda (K)						Komunalna i industrijska otpadna voda (K+I)				
	lip-2016	**pro-2016**	**ožu-2017**	**tra-2017**	**svi-2017**	**ruj-2017**	**stu-2016**	**pro-2016**	**lip-2017**	**lis-2017**	**stu-2017**
Ciliophora											
Acineria sp.	20 000	20 000						60 000			
Acineria uncinata	150 000				200 000						
Aspdisca sp.			140 000	100 000	400 000				40 000		
Aspidisca cicada	2 870 000	320 000	40 000	80 000	200 000	480 000				180 000	720 000
Chilodonella uncinata		20 000			140 000		400 000		120 000		40 000
Cinetochilum margaritaceum						260 000	180 000		40 000		20 000
Epistilys coronata						360 000			660 000	360 000	120 000
Epistylis entzii										60 000	
Epistilys sp.							820 000	560 000	380 000		160 000
Euplotes sp.			20 000	40 000	200 000	20 000				340 000	
Litonotus sp.					40 000		60 000				
Opercularia articulata			60 000								
Opercularia coarctata	2 470 000	3 080 000	160 000	300 000	160 000		320 000				
Opercularia microdiscum					40 000						
Opercularia sp.				100 000							
Podoprya sp.					160 000						
Pseudovorticella chlamydophora						40 000					
Thigmogaster oppositevacuolatus							120 000				
Tokophrya infusionum	50 000		120 000			20 000					
Tokophrya sp.	10 000		60 000								
Trithigmostoma cucullulus						20 000					
Vorticella aquadulcis			320 000								
Vorticella campanula										20 000	
Vorticella convallaria		180 000	18 520 000	1 520 000	300 000	540 000		20 000	40 000	800 000	140 000

Nastavak Tablice 15.

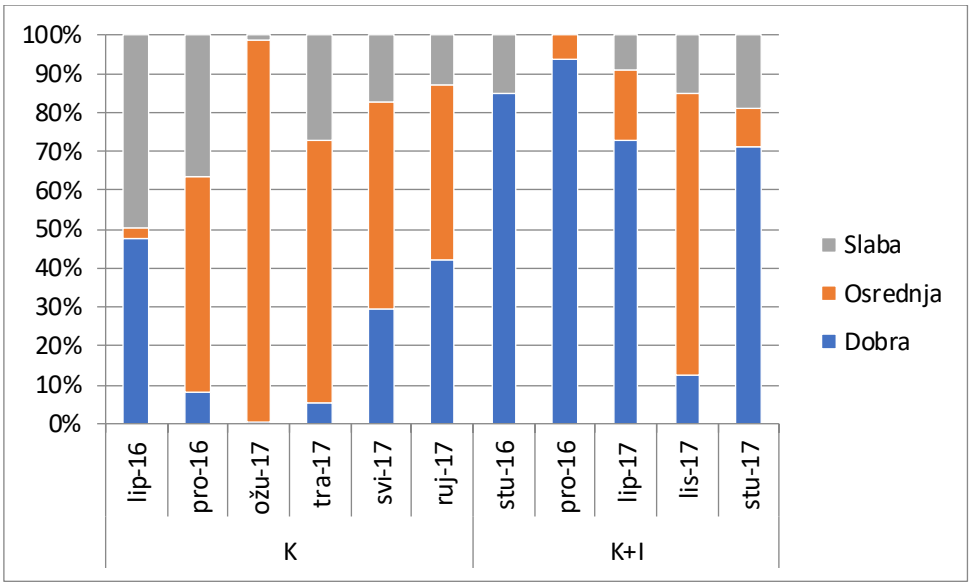
	Komunalna otpadna voda (K)						Komunalna i industrijska otpadna voda (K+I)				
	lip-2016	**pro-2016**	**ožu-2017**	**tra-2017**	**svi-2017**	**ruj-2017**	**stu-2016**	**pro-2016**	**lip-2017**	**lis-2017**	**stu-2017**
Ciliophora											
Vorticella microstoma	510 000	1 860 000	60 000	240 000		160 000			20 000	240 000	260 000
Vorticella octava			180 000	80 000		40 000				180 000	
Vorticella sp.	30 000	120 000		40 000				60 000			
Euglenozoa											
Euglena viridis						300 000			20 000		
Phacus longicauda									40 000		
Testacea											
Euglypha sp.		100 000		40 000		20 000	1 760 000	1 160 000	40 000		220 000
Rotifera											
Bdelloidea		20 000				40 000	60 000		180 000	160 000	20 000
Brachionus sp.							20 000		40 000		
Cephalodella sp.							40 000				
Dicranophorus sp.										40 000	
Euchlanis sp.							80 000				
Lophocaris sp.								100 000			
Rotifera non det.		40 000						20 000			
Nematoda											
Nematoda non det.				20 000				40 000	20 000		
Ukupna brojnost	**6 110 000**	**5 760 000**	**19 680 000**	**2 560 000**	**1 840 000**	**2 300 000**	**3 860 000**	**2 020 000**	**1 640 000**	**2 380 000**	**1 700 000**
Broj svojti	**8**	**10**	**11**	**11**	**10**	**13**	**11**	**8**	**13**	**10**	**9**
Taksonomske jedinice za SBI	**8**	**9**	**11**	**11**	**10**	**13**	**8**	**7**	**12**	**9**	**9**
SBI	**6**	**6**	**9**	**9**	**9**	**10**	**9**	**8**	**10**	**9**	**9**

Biotički indeks aktivnog mulja pokazao je mali broj statistički značajnih korelacija s parametrima ulazne otpadne vode (Tablica 16). U odnosu na učinkovitost pročišćavanja nisu zabilježene statistički značajne korelacije.

Tablica 16. Spearmanov koeficijent korelacije (N=11) između biotičkog indeksa aktivnog mulja i fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara influenta i efluenta na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Statistički značajne korelacije označene su podebljano.

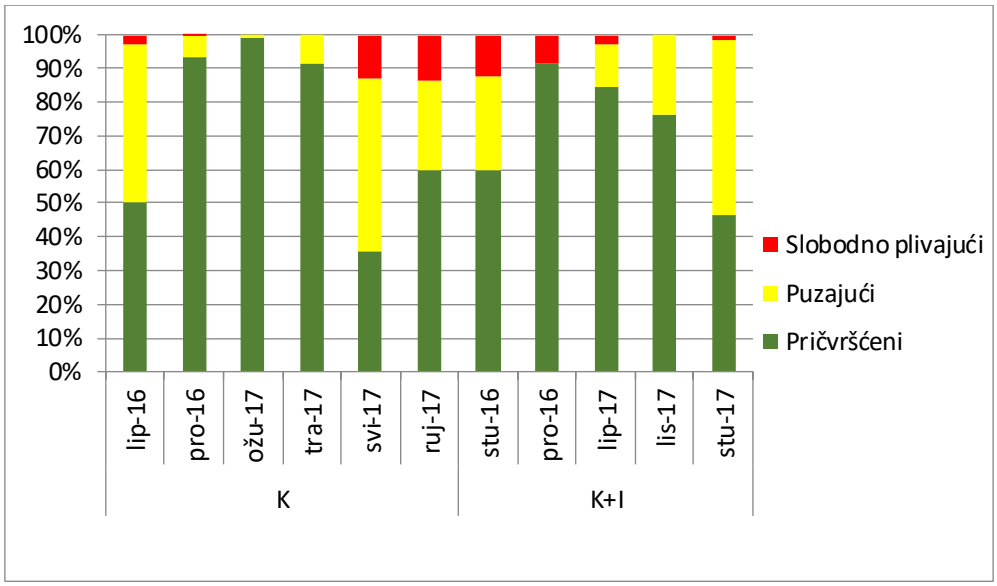
	Influent		Efluent	
Parametar	R_S	p-vrijednost	R_S	p-vrijednost
Temperatura	0,36	0,281	0,49	0,152
pH	0,00	1,000	0,18	0,597
Električna vodljivost	0,15	0,650	0,17	0,608
Otopljeni kisik	0,08	0,804	-0,53	0,117
KPK	-0,51	0,106	-0,09	0,793
BPK_5	**-0,61**	**0,047**	-0,14	0,682
Suspendirane tvari	-0,43	0,183	-0,42	0,194
Ukupni N	**0,72**	**0,012**	**0,68**	**0,021**
Ukupni P	0,41	0,212	0,53	0,091
Ukupne bakterije (37°C)	-0,37	0,257	-0,49	0,123
Koliformi	0,25	0,450	0,55	0,082
Enterokoki	0,05	0,878	-0,20	0,547
Sulfit-reducirajuće bakterije	-0,25	0,452	0,41	0,211
Escherichia coli	0,04	0,896	-0,05	0,895
Pseudomonas aeruginosa	-0,03	0,930	-0,51	0,135
Kvasci	-0,12	0,734	-0,19	0,595

Daljnja analiza indikatorskih svojti preživotinja prema širokim kategorijama (prema Foissner, 2016) ukazala je na veću učinkovitost aktivnog mulja pri pročišćavanju komunalnih i industrijskih otpadnih voda zajedno u odnosu na pročišćavanje samo komunalne otpadne vode (Slika 22). U razdobljima kad se pročišćavala samo komunalna otpadna voda, dominantna skupina (prosječno 54 %) ukazivala je na osrednju učinkovitost pročišćavanja. Za razliku od tog, tijekom K+I razdoblja, 67 % brojnosti su u prosjeku imali indikatori dobre učinkovitosti pročišćavanja. Najviši udio indikatora slabog pročišćavanja poklapa se s uzorcima koji su imali najniži biotički indeks aktivnog mulja.



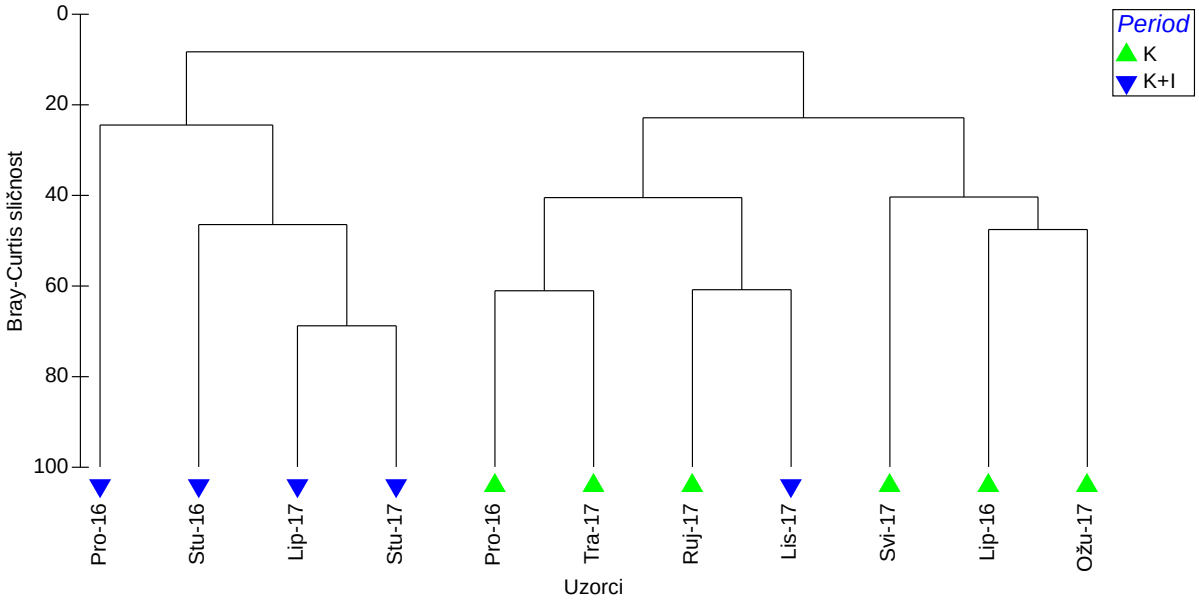
Slika 22. Udio indikatorskih vrsta učinkovitosti pročišćavanja (prema Foissner, 2016) u aktivnom mulju tijekom dva razdoblja pročišćavanja; K-pročišćavanje komunalne otpadne vode, K+I-pročišćavanje komunalne i industrijske otpadne vode.

Zasebno su analizirani životni oblici trepetljikaša, kao dominante komponente mikrofaune. U aktivnom mulju su uglavnom dominirali pričvršćeni oblici (Slika 23), odnosno pripadnici peritrihnih trepetljikaša, kao što su rodovi *Vorticella*, *Epistilys* i *Opercularia*. Srednji udio ovih oblika u brojnosti bio je oko 70 %. Drugi po brojnosti bili su puzajući oblici kao *Aspidisca cicada* s udjelom od prosječno 25 %, a najmanje je zabilježeno slobodno plivajućih oblika. Povremeno su puzajuće svojte imale gotovo jednaku brojnost kao pričvršćene svojte. Omjer između brojnosti puzajućih i pričvršćenih svojti bio je od 0 do 1,12, uz srednju vrijednost od 0,46.



Slika 23. Udio različitih životnih oblika trepetljikaša u aktivnom mulju tijekom dva istraživana razdoblja; K-pročišćavanje komunalne otpadne vode, K+I-pročišćavanje komunalne i industrijske otpadne vode.

Analiza sličnosti zajednice protozoa i sitnih Metazoa pokazala je prilično jasno odvajanje između dva razdoblja; onog kad se pročišćava samo komunalna i onog kad se pročišćava komunalna i industrijska otpadna voda (Slika 24). Jedina iznimka je uzorak iz listopada 2017 iz K+I režima, koji je sličniji uzorcima iz K razdoblja. Nije bilo nekog izraženog grupiranja mikrofaune susjednih mjeseci, za ona uzorkovanja koja su provedena tijekom vremenski bliskih razdoblja. Izuzev klastera proljetnih mjeseci tijekom K razdoblja, nije uočeno ni sezonsko grupiranje uzoraka.



Slika 24. Dendrogram sličnosti mikrofaune tijekom dva razdoblja pročišćavanja otpadnih voda; K-pročišćavanje komunalne otpadne vode, K+I-pročišćavanje komunalne i industrijske otpadne vode.

Zabilježene su pozitivne korelacije između učinkovitosti pročišćavanja i pojedinih svojti: učinkovitost pročišćavanja ukupnog N i brojnost vrste *Aspidisca cicada* (R_S=0,85, p<0,001) te učinkovitost pročišćavanja BPK_5 i brojnost *Epistylis* sp. (R_S=0,64, p<0,05). Također je postojala pozitivna korelacija između učinkovitosti pročišćavanja sulfit-reducirajućih bakterija i broja svojti mikrofaune (R_S=0,79, p<0,01).

Negativne korelacije postojale su između parametara efluenta i pojedinih svojti: električna vodljivost i brojnost vrste *Opercularia coarctata* (R_S=-0.62, p<0,05), ukupnih bakterija i broja svojti (R_S=-0,68, p<0,05), ukupnog N i brojnosti *Vorticella* sp. (R_S=-0,79, p<0,01) te kvasaca i brojnosti *V. convallaria* (R_S=-0,88, p<0,001).

Pojedine svojte pokazale su porast brojnosti u uvjetima manje učinkovitosti pročišćavanja. Ovakav trend bio je statistički značajan za vrstu *Aspidisca cicada* i učinkovitost uklanjanja KPK (R_S=-0,62, p<0,05), *Vorticella microstoma* i učinkovitost pročišćavanja BPK_5 (R_S=-0,66, p<0,05) i KPK (R_S=-0,77, p<0,01) te za *V. convallaria* i učinkovitost pročišćavanja BPK_5 (R_S=-0,66, p<0,05).

4.2.2. Mikrobiološke analize aktivnog mulja

Brojnost bakterija u aktivnom mulju se ne razlikuje u redu veličine od brojnosti bakterija u otpadnoj vodi nakon pročišćavanja tj. u efluentu (usp. Tablice 12 i 16). Međutim, brojnost koliformnih bakterija je veća u uzorcima aktivnog mulja (oko 10^6 do 10^7/mL), od brojnosti u efluentu (oko 10^4 do 10^5/mL). Isto vrijedi za enterokoke koji su imali veću brojnost u aktivnom mulju u odnosu na efluent.

Tablica 16. Broj različitih grupa bakterija u aktivnom mulju Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

Datumi uzorkovanja	**Broj bakterija /37°C/mL**	**Koliformne bakterije /100 mL**	**Enterokoki/100mL**	***Escherichia coli*/100 mL**	**Sulfit-red. Bakterije/mL**	***Pseudomonas aeruginosa*/100 mL**	**Kvasci/mL**
21.6.´16.	$4,3x10^4$	$9,5x\ 10^6$	$3,93x10^6$	-	$3,5x10^4$	$3,1x10^5$	-
4.11.´16.*	$1,67x10^6$	$1,55x10^6$	$9,8x10^5$	$1,33x10^5$	-	$9,3x10^4$	-
18.11.16.*	$6,3x10^5$	$2,42x10^6$	$2,8x10^5$	$3,13x10^5$	$1,5x10^4$	$2,61x10^5$	$8,0x10^2$
2.12.´16.	$7,1x10^5$	$4,35x10^6$	$1,25x10^6$	$4,0x10^5$	$1,x10^4$	$4,57x10^5$	$6,0x10^3$
24.3.´17.	$9,6x10^5$	$1,99x10^7$	$3,1x10^6$	$5,78x10^5$	$1,4x10^4$	$9,81x10^5$	$4,3x10^3$
21.4.´17.	$3,7x10^5$	$1,73x10^7$	$2,82x10^6$	$1,35x10^6$	$5,0x10^3$	$1,3x10^5$	$3,4x10^3$
26.5.´17.	$9,0x10^3$	$7,27x10^6$	$7,3x10^5$	$3,09x10^6$	$3,0x10^3$	$3,64x10^4$	$1,6x10^3$
27.6.´17.	$3,8x10^4$	$6,17x10^5$	$8,66x10^5$	$4,1x10^4$	$5,0x10^2$	$1,32x10^4$	$3,0x10^2$
29.9.´17.	$1,4x10^5$	$8,16x10^6$	$9,40x10^5$	$2,41x10^5$	$1,0x10^3$	$9,8x10^3$	$4,0x10^3$
13.10.17.*	$1,22x10^6$	$3,64x10^7$	$2,80x10^6$	$1,6x10^5$	$1,0x10^5$	$6,91x10^5$	$9,6x10^5$
3.11.17.*	$4,2x10^5$	$3,08x10^6$	$5,90x10^5$	$2,35x10^5$	$4,0x10^3$	$1,4x10^5$	$3,2x10^3$

* Razdoblja u kojima su se komunalne vode grada i otpadne vode tvornice šećera pročišćavale zajedno

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju se pratio sastav zajednica protozoa i sitnih Metazoa u aktivnom mulju s Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici u korelaciji s učinkom pročišćavanja. Uzorci otpadnih voda i aktivnog mulja su analizirani tijekom višemjesečnog razdoblja u različitim režimima rada uređaja (K - razdoblje kada se obrađuje samo komunalna otpadna voda i K+I razdoblje kad se zajedno obrađuju otpadne vode tvornice šećera i komunalne otpadne vode).

Ulazna otpadna voda razlikovala se prema fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim parametrima između dva razdoblja rada uređaja (K i K+I). Vrlo izražene razlike zabilježene su za parametre koji ukazuju na organsku tvar u vodi, odnosno KPK i BPK_5, pri čemu su otpadne vode u K+I režimu imale četiri do pet puta više koncentracije ovih parametara. Prije miješanja je povremeno u otpadnoj vodi šećerane zabilježen BPK_5 preko 6 000 mg O_2/L, odnosno KPK preko 7 000 mg O_2/L. Vrijednosti ovih parametara u skladu su s očekivanim za komunalnu otpadnu vodu (Pauli i sur., 2001), kao i za otpadnu vodu šećerane (Calero i sur., 2000). Za ove parametre se nakon miješanja dvaju efluenata postiže razrjeđenje, što je povoljno za uređaj za pročišćavanje, jer se izbjegava preveliko opterećenje. Viši omjer KPK/BPK_5 u komunalnoj otpadnoj vodi u odnosu na otpadnu vodu šećerane ukazuje na bolju biorazgradivost otpadnih voda šećerane, a time i zajedničkih otpadnih voda. Oba omjera relativno su niska te ukazuju na dobru biorazgradivost testiranih otpadnih voda (Henze i Comeau, 2008). Većina ostalih parametara nije se statistički značajno razlikovala između dva testirana razdoblja (K *vs.* K+I), iako su srednje vrijednosti ukazivale na razlike, što je uzrokovano velikom varijabilnošću. Ovi rezultati ukazuju na pozitivan učinak razrjeđivanja otpadnih voda šećerane s komunalnom otpadnom vodom. Općenito je K otpadna voda imala srednje opterećenje dušikom i nisko opterećenje fosforom te nisku koncentraciju mikroorganizma, prema Henze i Comeau (2008).

Praživotinje i sitni beskralježnjaci koji su zabilježeni u ovom istraživanju u skladu su s ranijim istraživanjima aktivnog mulja, odnosno radi se o svojtama koje su karakteristične za ovaj umjetni ekosustav (Madoni, 1994, 2011; dos Santos i sur., 2014; Foissner, 2016). Smatra se da aktivni mulj ima sličan sastav zajednica u cijelom svijetu (Warren i sur., 2010), što je u skladu s kozmopolitskom rasprostranjenošću slobodno-živućih praživotinja. Među protozoolozima se, međutim, zadnjih desetljeća vodi rasprava koliko su praživotinje uistinu kozmopolitski rasprostranjene (Foissner i sur., 2003) te koliko je točna tzv. hipoteza

„sveprisutnosti“. Ideju da je za praživotinje „Sve svugdje, a okoliš odabire“ podupire dio znanstvenika (npr., Fenchel i Finlay, 2004). U slučaju aktivnog mulja, to bi značilo da slični ekološki uvjeti podržavaju gotovo identični sastav zajednica, bez obzira na biogeografiju određenog područja. Foissner (2016), međutim, zastupa ideju da je dio praživotinja endemski rasprostranjen, a kao dokaz i u aktivnom mulju opisuje nove vrste za znanost. Novija istraživanja praživotinja sugeriraju najvjerojatniju kombinaciju kozmopolitske rasprostranjenosti i određene stope endemizma u praživotinja (Fontaneto i Hortal, 2012).

Najveća raznolikost trepetljikaša među heterotrofnim eukariotima aktivnog mulja također je u skladu s ranijim istraživanjima (Pauli i sur., 2001; Madoni, 2011; Leal i sur., 2013) te potvrđuje postavljenu hipotezu. Sastav protozoa i sitnih beskralježnjaka iz ovog istraživanju ukazuje na dobre uvjete (Madoni, 1994, 2011) na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici. Među praživotinjama aktivnog mulja dominirali su sesilni trepetljikaši, posebno peritrihne vrste *Vorticella convallaria, V. microstoma*, *Opercularia coarctata* i *Epistilys* sp. Najbrojnija vrsta bila je *V. convallaria*, što odgovara rezultatima ranijih istraživanja ovakvih sustava (Madoni i Ghetti, 1981; Martin-Cereceda i sur., 1996; Arregui i sur., 2012). Ova vrsta karakteristična je za stabilnu fazu aktivnog mulja (Madoni, 2011), kada su flokule stabilne i kolonizirane karakterističnom mikrobnom zajednicom. Među pokretnim vrstama, puzajuća vrsta *Aspidisca cicada* imala je najveću brojnost, što potvrđuje njen status jedne od dominantnih vrsta aktivnog mulja (Curds i Cockburn, 1970a; Madoni i Ghetti, 1981). Mnogobrojni znanstveni radovi potvrđuju važnost sastava protozoa u aktivnom mulju za uspješno pročišćavanje otpadnih voda sa aktivnim muljem (Martin-Cereceda i sur., 1996; Papadimitriou i sur., 2010). Mikrofauna aktivnog mulja ukazuje na promjene u postrojenju sa muljem (Al-Shahwani i Horan, 1991; Esteban i sur., 1991) te su metode bazirane na mikroskopskim analizama korisne za ocjenu efluenta (Curds i Cockburn, 1970b) kao i rada postrojenja (Drakides, 1980; Madoni, 1994).

Prosječni broj svojti mikrofaune u ovom istraživanju (10) indicirao je dobro stanje aktivnog mulja na istraživanom postrojenju (Madoni, 1994), a time i dobru učinkovitost pročišćavanja. Ovi rezultati su također potvrđeni i vizualnim indikatorima mulja (osobno opažanje), kao i fizikalno-kemijskim parametrima influenta i efluenta kao što su redukcija KPK, BPK_5 i suspendirane tvari. U skladu s tim je i zabilježena brojnost koja je premašivala 10^6 jed./L tijekom oba istraživana razdoblja (K i K+I). Ovakva brojnost indicira također stabilan aktivni mulj (Madoni, 1994). Variranje brojnosti praživotinja aktivnog mulja, koje je uočeno, uobičajeno je svojstvo ovog umjetnog ekosustava (Arregui i sur., 2012), u kojem se događaju

znatno brže promjene u odnosu na prirodne ekosustave. Znatno brojnija mikrofauna zabilježena tijekom K režima rada, u odnosu na K+I možda je uzrokovana većim organskim opterećenjem koje donosi otpadna voda šećerane, a rezultira višim vrijednostima KPK i BPK_5 influenta. Preveliko organsko opterećenje može negativno djelovati na praživotinje i sitne beskralježnjake aktivnog mulja (Salvadó i Gracia, 1993). S obzirom na učinkovitost pročišćavanja, može se zaključiti da niže vrijednosti brojnosti mikrofaune u K+I režimu rada nisu imale utjecaja na performanse istraživanog postrojenja. Istraživanje je i potvrdilo da se aktivni mulj može koristiti i prilikom pročišćavanja industrijskih otpadnih voda, a što je još uvijek relativno slabo istraženo područje (Warren i sur., 2010).

Prema rezultatima ovog istraživanja, biotički indeks aktivnog mulja primjenljiv je kao indikator učinkovitosti pročišćavanja i u sustavu koji zajednički prerađuje komunalne otpadne vode, kao i kombinirane otpadne vode. Ovi rezultati u skladu su s originalnim radom koji je uveo SBI (Madoni, 1994) te rezultatima Arévalo i sur., (2009) i Leal i sur., (2013). Prema Madoniju (1994), indeks vrijedi za sva postrojenja s aktivnim muljem. Metoda određivanja biotičkog indeksa mulja je testirana na 45 postrojenja sa aktivnim muljem. U svakom pojedinačnom postrojenju se vršila identifikacija i enumeracija mikrofaune i korelirali su se podaci sa fizikalno-kemijskim parametrima. Utvrđena je dobra korelacija biotičkog indeksa mulja s učincima pročišćavanja. U istom radu su identificirane i tzv. negativne i pozitivne ključne grupe protozoa. U ovom istraživanju SBI se pokazao manje osjetljiv na parametre koji indiciraju učinke pročišćavanja, što je u skladu s istraživanjima uporabljivosti SBI u postrojenju koje zajednički pročišćava komunalne otpadne vode i otpadne vode tekstilne industrije (dos Santos i sur. 2014). Autori su uočili povezanost dinamike pojedinih svojti s uvjetima na uređaju. Neka istraživanja ukazuju da SBI nije primjenjiv u nestandardnim uređajima (Drzewicki i sur., 2017a, b). Vjerojatno je da ekstremni uvjeti, koji jako reduciraju mikrofaunu aktivnog mulja, onemogućuju primjenu SBI.

Visoke vrijednosti SBI ukazale su na I. i II. klasu aktivnog mulja koje su u skladu sa zabilježenom visokom učinkovitošću pročišćavanja. Razlika u vrijednostima SBI-a nije bila statistički značajna između dva razdoblja, što ukazuje na dobro izbalansiran proces na istraživanom uređaju. Suprotno sličnim vrijednostima SBI, mikrofauna se razlikovala između dva režima rada (K *vs.* K+I). Ova razlika vjerojatno odražava razlike u karakteristikama influenta, budući da praživotinje aktivnog mulja ovise upravo o stanju otpadne vode i prisutnim praživotinjama u njoj (Pauli i sur., 2001). Neke vrste su preferirale K+I uvjete (peritrihne vrste *Epistylis coronata*, okućen *Euglypha* sp. i kolnjaci porodice Bdelloidea), dok su peritrihne vrste

Vorticella convallaria, *V. microstoma* i *Opercularia coarctata*, uz pokretnu vrstu *Aspidisca cicada* pokazale preferenciju prema K uvjetima. Dvije od navedenih vrsta (*V. microstoma* i *O. coarctata*) su zasebne ključne grupe u izračunu SBI (Madoni, 1994) te indiciraju stresne uvjete za mikrofaunu (Drzewicki i Kulikowska, 2011; Foissner, 2016; Salvadó i sur., 1995). Njihova visoka brojnost tijekom prerade samo komunalne otpadne vode može indicirati prisustvo nekih toksičnih tvari u otpadnoj vodi šećerane. Svakako bi bilo dobro provesti daljnja istraživanja da se prouči postoji li takav uzrok. Standardne analize koje se provode u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda ne detektiraju toksične tvari, a one mogu dovesti do drastične redukcije raznolikosti praživotinja i mikro-metazoa (Sobczyk i sur., 2021). Primjerice, ulazak fenola u otpadne vode rezultira promjenama u dominaciji sesilnih vrsta, favorizirajući dominaciju *Opercularia* sp. više nego *Vorticella* sp. (Papadimitrou i sur. 2007). Fenol povećava brojnost (abundanciju) *Podophrya* sp. *i* slobodno plivajuće *Colpidium* sp., koji je tipičan za ulaz industrijskih otpadnih voda. *Podoprya* sp. je pokazala značajnu negativnu korelaciju sa uklanjanjem fenola iz efluenta, sugerirajući da njeno prisustvo može biti indikator efikasnosti uklanjanja fenola. Ulazak cijanida u otpadne vode povećava abundanciju *Opercularia* sp. i *Colpidium* sp., sugerirajući njihovu toleranciju na uvjete visoke toksičnosti. *Chilodonella* sp. pokazuje negativnu korelaciju na sadržaj cijanida u efluentu (Papadimitrou i sur., 2007). Navedeno potvrđuje potencijal pristupa baziranog na pojedinoj svojti te je u skladu s ovim istraživanjem.

Bičaši, jedna od ključnih skupina aktivnog mulja (Madoni, 1994), imali su iznimno nisku brojnost u ovom istraživanju, što ukazuje na stabilan aktivni mulj. Niska brojnost u skladu je i s efluentom relativno niskog organskog opterećenja, indiciranog KPK i BPK_5 vrijednostima (Ratsak i sur., 1996). Budući da je sitne bičaše, primjerice Bodoinida, koji su česti u aktivnom mulju, teško determinirati, njihova ekologija u ovom sustavu je relativno slabo poznata (Warren i sur., 2010).

Rod *Aspidisca* smatra se veoma otpornim u aktivnom mulju te je sposoban izdržati varijacije u opterećenju (Leal i sur., 2013), što se ne poklapa potpuno s ovim istraživanjem. *A. cicada* nije bila prisutna u dijelu K+I uzoraka te je moguće da joj nisu odgovrali uvjeti. Također, uklanjanje dušika bilo je nešto slabije tijekom K+I režima rada, a recentno je pokazano da *A. cicada* utječe upravo na nitrifikacijske bakterije (Sobczyk i sur., 2020). Na osnovu navedenog, promjene u brojnosti ove vrste, ili njen izostanak iz sustava, mogu indicirati smanjenje učinkovitosti rada postrojenja. Ova vrsta pokazala je pozitivnu korelaciju s učinkovitošću uklanjanja KPK, što je u skladu s rezultatima Martin-Cereceda i sur. (1996), koji ju smatraju

indikatorom stabilnog rada uređaja za pročišćavanje. Slično navode i Sobczyk i sur. (2021), koji su zabilježili negativnu korelaciju brojnosti *A. cicada* s KPK i BPK_5 efluenta.

Predstavnici Suctoria (sisarci) nisu bili brojni u aktivnom mulju, a potpuno su izostali tijekom K+I režima rada. Mogući uzrok je manje dostupnog plijena, budući da su sisarci predatori na drugim trepetljikašima. Predatori ukazuju na to da se u aktivnom mulju oblikovao cijeli hranidbeni lanac, prema tome ukazuju na stabilni aktivni mulj (Papadimitriou i sur., 2007). Učinak predatorskih trepetljikaša ovisi u njihovom životnom obliku te će slobodno plivajuće vrste imati različit učinak u odnosu na pričvršćene vrste, a učinak će prvenstveno biti uočljiv na populacijama trepetljikaša koji su plijen (Curds, 1973).

Istraživanje je obuhvatilo i analizu primjenjivosti ekotoksikološkog testa praćenja stabilnosti lizosomske membrane kod trepetljikaša aktivnog mulja. Zajednica aktivnog mulja, međutim, nije se uspješno aklimatizirala na laboratorijske uvjete te su svojte pokazivale znakove stresa već u kontrolnim uzorcima. Iz navedenog razloga, moralo se odbaciti hipotezu da lizosomski biomarkeri dokazuju prisustvo/odsustvo okolišnih stresora u aktivnom mulju.

Mnogi autori smatraju trepetljikaše važnim bioindikatorima procesa pročišćavanja s aktivnim muljem jer pokazuju dobru korelaciju sa fizikalno-kemijskim parametrima postrojenja (Curds i Cockburn, 1970b; Al-Shahwani i Horan, 1991; Poole, 1984). Nadalje, mnogi autori navode i indikatorske vrste trepetljikaša koje su u korelaciji s efikasnošću pročišćavanja (Martin-Cereceda i sur., 1996.) i tzv. pozitivne i negativne ključne grupe trepetljikaša (Madoni, 1994). Pristup baziran na odgovoru pojedinih vrsta, u ovom se istraživanju pokazao osjetljivijim od korelacija samog SBI s parametrima pročišćavanja. Naime, SBI je pokazao vezu samo s BPK_5 u influentu, dok su brojne svojte imale značajne korelacije s učinkovitosti pročišćavanja. Takve vrste su bile *O. coarctata* i *A. cicada*, što je u suprotnosti s Drzewicki i Kulikowska (2011), koji navode povezanost vrste *O. coarctata* sa slabom učinkovitosti pročišćavanja. Autori navode, što je u skladu s ovim istraživanjem, da pojedine vrste mogu biti osjetljiviji indikatori od SBI. Ekstremno pojednostavljenje u vidu uporabe samo funkcionalnih skupina predlažu Zhou i sur. (2008), smatrajući determinaciju pojedinih svojti previše zahtjevnom. Sobczyk i sur. (2021) smatraju da je kod stabilnih uređaja teško utvrditi vezu između sastava zajednice i učinkovitosti pročišćavanja, tj. parametrima na uređaju. Prema Drzewicki i sur. (2017a, b) pristup baziran na pojedinim svojtama posebno je pogodan za nekonvencionalne uređaje. Pri tome su mogući kontradiktorni rezultati, što se tiče bioindikacije praživotinja, između uređaja koji pročišćavaju samo komunalne otpadne vode u odnosu na one

koji pročišćavaju industrijske otpadne vode (Bernat i sur., 2017). Uređaji koji pročišćavaju industrijske otpadne vode sustavi su u kojima indikacija putem pojedinih vrsta ima velik potencijal, budući da u njima određene vrste praživotinja mogu imati snažan učinak na proces pročišćavanja (Pedrazzani i sur., 2016). SBI se u ovim sustavima vjerojatno ne može koristit kao indikator kvalitete efluenta (dos Santos i sur., 2014). Kako se na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici kombiniraju komunalne i industrijske otpadne vode, ovakav pristup baziran na pojedinim indikatorskim svojtama mogao bi također biti dodatan alat u praćenju rada uređaja.

U ovom istraživanju nije zabilježen utjecaj temperature na mikrofaunu aktivnog mulja, što se očituje u izostanku sličnosti zajednica bliskih mjeseci uzorkovanja. Također, nije zabilježena značajna korelacija između temperature i SBI vrijednosti. Temperatura se inače smatra najznačajnijim čimbenikom u strukturiranju zajednica praživotinja i sitnih beskralježnjaka aktivnog mulja (Sobczyk i sur., 2020). Mogući razlozi za izostanak korelacije u ovom istraživanju su mala variranja temperature influenta, a time i temperature aktivnog mulja. Stabilna temperatura vjerojatno je stoga pružala slične uvjete za mikrofaunu.

Pojedine od indikatorskih svojti je lako prepoznati, zbog karakteristične morfologije, primjerice *A. cicada* u bočnom položaju ima jedinstven oblik s tzv. „rebrima“. Ovo pruža mogućnost relativno lake determinacije za koju nisu nužni specijalisti za praživotinje, što povećava uporabljivost mikroskopske analize aktivnog mulja za praćenje ranih pokazatelja promjena u radu uređaja za pročišćavanje baziranih na ovoj biotehnologiji. Al-Shashwani i Horan (1991) smatraju da je u pojedinom postrojenju, uz konstantan monitoring, dovoljno pratiti do 20 vrsta trepetljikaša da bi se mogli donositi zaključci o stanju aktivnog mulja. Arregui i sur. (2012) su proveli analizu vjerojatnosti točne determinacije pojedinih svojti praživotinja, koje su uobičajene u aktivnom mulju. Čimbenici koji su na to utjecali su: brojnost vrste u uzorku, morfološke karakteristike, učestalost i veličina vrste. Iako su sitnije vrste teže za determinaciju te je vjerojatnost da ih se previdi relativno velika, pokazalo se da i veliki kolonijalni peritrihni trepetljikaši povremeno budu neidentificirani, uslijed eventualnih metodoloških problema. Rasprave se vode i oko broja uzoraka koje je potrebno pregledati za reprezentativno stanje u aktivnom mulju, budući da se u uzorcima većeg volumena često previde sitne svojte, ali je veća vjerojatnost detekcije kolonijalnih oblika (Warren i sur., 2010). Vjerojatno je optimalan broj uzoraka veći od onog koji je korišten u ovom istraživanju, a koje je slijedilo standardnu proceduru za određivanje SBI. Šest pod-uzoraka predlažu Dubber i Gray (2009), budući da se time detektira 90 % do 95 % prisutnih vrsta. Autori smatraju da bi za

detekciju gotovo svih prisutnih vrsta trebalo više od 20 pod-uzoraka, što je vremenski zahtjevno. Svakako je u svim postupcima mikroskopske analize aktivnog mulja potrebna standardizacija postupaka analize i kontrola rada operatera.

Usprkos brojnih ključeva za identifikaciju vrsta protozoa (Foissner i Berger 1996; Serrano, i sur., 2008) još uvijek je problem točna identifikacija. Stoga se predlaže uporaba molekularnih metoda (Foissner, 2016). Autor je na osnovi prisutnih vrsta protozoa u zajednici načinio tablicu sa indikatorskim vrstama koje indiciraju dobro, srednje i loše pročišćavanje na uređajima (Foissner, 2016). Primjena ove široke i relativno grube skale indicirao je bolje uvjete na uređaju tijekom pročišćavanja kombiniranih otpadnih voda (K+I), u odnosu na samo komunalne otpadne vode. Analizom pojedinih indikatorskih svojti praživotinja pokazalo se također da je veća učinkovitost aktivnog mulja pri pročišćavanju komunalne i industrijske vode nego kada se pročišćava samo komunalna voda.

Rezultati mikroskopskog pretraživanja aktivnog mulja tijekom ovog istraživanja pokazuju da su pričvršćeni trepetljikaši kao što su *Vorticella convalaria, Aspidisca* sp. i okućeni kao što je *Euglypha* sp. uvijek prisutni i dominantni kada se radi o visokoj učinkovitosti pročišćavanja (redukcija iznad 90 % KPK u efluentu). Također je važno i odsustvo većeg broja nanoflagelata, kao i Nematoda. Ovime je potvrđena hipoteza da će ključne grupe reagirati na uvjete na uređaju. Same ključne skupine imaju bioindikatorski potencijal (Madoni, 1994; Zhou i sur. 2008)

Uklanjanje dušika bilo je slabije tijekom K+I razdoblja u odnosu na K razdoblje (23,2 % *vs.* 46,1 %), što ukazuje na slabiji proces nitrifikacije. K otpadna voda imala je, očekivano, više koncentracije koliforma, te je u tom slučaju industrijska otpadna voda doprinosila razrjeđenju. Niža učinkovitost uklanjanja sulfit-reducirajućih bakterija opažena je u oba testirana razdoblja, budući da se radi o vrlo rezistentnim mikroorganizmima u procesima pročišćavanja otpadnih voda (Guzmán i sur., 2007). Zanimljivo je da je učinkovitost uklanjanja ovih mikroorganizama pozitivno korelirala s brojem svojti mikrofaune, što ukazuje i na važnost praživotinja i mikro-metazoa u uklanjanju patogena. Naime, brojnost sulfit-reducirajućih bakterija smatra se dobrom surogat varijablom za brojnost patogena kao što su enterovirusi, *Salmonella,* oblići, *Cryptosporidium* i *Giardia*, u efluentu (Guzmán i sur., 2007). Veća raznolikost praživotinja vjerojatno stoga dovodi i do uklanjanja većeg broja patogena, a to ukazuje na važnost mikrofaune u postrojenjima s aktivnim muljem. Uklanjanje patogena u procesu pročišćavanja s aktivnim muljem varira od 28 % do 99 %, ovisno o patogenu, pri čemu

se za inaktivaciju nekih predlažu dodatni postupci kao što je tretman efluenta UV zračenjem i ozonom (Warren i sur., 2010). Važno je provoditi i mikrobiološke analize otpadne vode nakon pročišćavanja. Naime, neke bakterije imaju sposobnost razgradnje teško razgradivih spojeva npr, klorobenzena. Bakterije roda *Pseudomonas* mogu aerobno razgraditi trikloro- i tetraklorobenzen (Glancer-Šoljan i sur., 2005). Također neki mikroorganizmi imaju sposobnost razgradnje polikloriranih bifenila (PCBs) npr. *Acinobacter* i *Alcaligenes* (Glancer-Šoljan i sur., 2005).

Pričvršćeni trepetljikaši pokazali su direktnu vezu s organskim opterećenjem i u obrnutom su odnosu s biološkom potrošnjom kisika u efluentu. Stoga je povećanje brojnosti ove grupe u direktnoj vezi s povećanjem organskog opterećenja i smanjenja BPK_5 u efluentu. Ova grupa pokazala se pozitivnim indikatorom u našem istraživanju i potvrdila rezultate Madoni (1994). Nasuprot tome, slobodno plivajući trepetljikaši su u vezi sa visokim vrijednostima BPK_5 efluenta i sa slabom zrelosti mulja tj. ukazuju na nezreli mulj. Ova skupina bila je najmanje zastupljena među trepetljikašima, potvrđujući stabilnost procesa na Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici.

Odnos između puzajućih i pričvršćenih vrsta trepetljikaša smatra se inidkatorom učinkovitosti pročišćavanja te Madoni (1994) navodi da vrijednost veća od 0,5 ukazuje na dobru kvalitetu efluenta. U našem istraživanju ova vrijednost je u nekoliko navrata bila izmad 0,5, ali je često bila niža, bez uočenih povezanosti s učinkovitošću pročišćavanja ili SBI vrijednosti. Slično navode Pedrazzani i sur. (2016) te zaključuju da je i omjer niži od 0,5 pozitivan pokazatelj s obzirom na kvalitetu efluenta. Obje ove skupine, tj. životni oblici karakteristično ko-dominiraju u aktivnom mulju jer su načinom života prilagođeni na vezivanje uz flokule aktivnog mulja (Martin-Cereceda i sur., 1996).

Dobivene vrijednosti biotičkog indeksa mulja u tijeku ovog istraživanja potvrđuju učinkovitost pročišćavanja otpadne vode na istraživanom uređaju te postojanje stabilnog aktivnog mulja. Korelacije sastava protozoa i mikro-metazoa, kao i SBI indeksa s fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim parametrima ulazne otpadne vode (influenta), kao i izlazne otpadne vode (efluenta) potvrđene su za pojedine parametre te pojedine svojte. Aktivni mulj je dinamična zajednica u kojoj se promjene brzo odvijaju, budući da svojte reagiraju na fizikalno-kemijske uvjete u postrojenju i biotičke interakcije. Iz tog razloga direktne korelacije se ne mogu niti očekivati, jer je zajednica mogla reagirati na prethodne uvjete od, primjerice, prije nekoliko dana (Sobczyk i sur., 2021).

Na uređajima za pročišćavanje otpadnih voda u Hrvatskoj se rade rutinske analize ili mikroskopske pretrage aktivnog mulja, ali se ne radi metoda određivanja biotičkog indeksa aktivnog mulja. Rezultati ovog istraživanja mogu ukazati na potrebu detaljnije mikroskopske analize mikrofaune s obzirom na praživotinje i sitne beskralježnjake. Ove analize mogu ukazati na probleme na uređaju, čak i na specifične probleme u aktivnom mulju, i ranije nego se isti uoče uporabom standardnih metoda. Pri tome je važno definirati metodologiju i standardizirati mikroskopske analize aktivnog mulja, što još uvijek nije provedeno u većini zemalja EU (Arregui i sur., 2012), usprkos široko rasprostranjenoj uporabi aktivnog mulja kao biotehnološkog sustava.

6. ZAKLJUČAK

- U ovom istraživanju je po prvi put određivan biotički indeks aktivnog mulja na uređaju za pročišćavanje u Hrvatskoj te je koreliran s učinkovitošću pročišćavanja. Biotički indeks aktivnog mulja pokazao se pouzdanim pokazateljem rada uređaja za pročišćavanje otpadnih voda baziranih na aktivnom mulju.
- Postrojenja koja zajednički pročišćavaju komunalnu i industrijsku otpadnu vodu, kao što je otpadna voda šećerane, mogu profitirati uslijed miješanja otpadnih voda te učinaka razrjeđenja organske tvari, odnosno mikrobioloških parametara. Mikrofauna aktivnog mulja različito reagira na influente K u odnosu na K+I režim rada.
- Ključne skupine trepetljikaša vrlo su dobro korelirane s parametrima pročišćavanja otpadne vode. Osobito je vidljiva dobra korelacija između pričvršćenih trepetljikaša i parametara učinkovitosti pročišćavanja KPK i BPK_5, pa stoga ova grupa trepetljikaša može poslužiti kao indikator dobrog vođenja procesa pročišćavanja.
- Redovno mikroskopsko pretraživanja aktivnog mulja kao i utvrđivanje brojnosti pojedinih vrsta protozoa može biti od velike pomoći u upravljanju uređajem za pročišćavanje otpadnih voda. Ovo potvrđuje korelacija između uvjeta rada tj. parametara u toku procesa pročišćavanja (otopljenog kisika, pH, KPK, BPK_5, suspendirane tvari, nutrijenata…) i prisutnih vrsta i brojnosti protozoa.
- Pristup baziran na dodatnim analizama grupa indikatora, a posebno pristup baziran na vrstama dodatno ukazuje na stanje aktivnog mulja i učinkovitost pročišćavanja. Kao dobri indikatori utvrđeni su trepetljikaši *Vorticella microstoma*, *Opercularia* sp. i *Aspidisca cicada*.
- Pričvršćeni trepetljikaši, uglavnom peritrihni, dominirali su u oba režima pročišćavanja (K) i (K+I). Oba razdoblja imala su dobro stanje aktivnog mulja, potvrdivši uporabu ove ključne grupe u procjeni stanja aktivnog mulja.
- Dodatna analiza indikatorskih svojti protozoa ukazala je na veću učinkovitost aktivnog mulja pri pročišćavanju komunalne i industrijske otpadne vode (K+I) u odnosu na pročišćavanje samo komunalne vode (K).
- Fizikalno-kemijski pokazatelji ulazne i izlazne vode pokazuju značajnu redukciju KPK, BPK_5, suspendirane tvari, ukupnog dušika i ukupnog fosfora, koji su u korelaciji s

indikatorskim svojtama te SBI vrijednostima. Dobru učinkovitost pročišćavanja potvrdila je i redukcija broja bakterija od influenta do efluenta.

- Sastav protozoa i mikro-metazoa se razlikovao između dva režima rada, vjerojatno uslijed razlika u influentu. Određene svojte su preferirale K+I uvjete, primjerice sesilna vrsta trepetljikaša *Epistilis coronata,* i okućen *Euglypha* sp.
- Mikrofauna uređaja za pročišćavanje, odnosno njene dominantne svojte, zahtijevaju specifične uvjete te se nisu mogle aklimatizirati na laboratorijske uvjete. Stoga je bilo nemoguće provesti test određivanja stabilnosti lizosomske membrane, jer su i sami laboratorijski uvjeti doveli do stresa.
- S obzirom na ekološki značaj i indikaciju trebalo bi standardizirati upotrebu protozoa kao bioindikatora u pročišćavanju otpadnih voda aktivnim muljem.

7. LITERATURA

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredeicq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J, Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moenstrup, Ø., Mozley-Standridge, S., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. The Journal of Eukaryotic Microbiology 52, 399-451.

Agersborg, H. P. K., Hatfield, W. D. (1929). The biology of a sewage-treatment plant- A preliminary survey. Sewage Works Journal 1, 411-415.

Al-Shahwani, S., Horan, N. (1991). The use of protozoa to indicate changes in the perfomance of activated-sludge plants. Water Research 25(6), 633-638.

Antonietti, R., Madoni, P., Ghetti, P. (1981). Some notes on the biological self-purification process: Biological water-treatment plants as man-made ecosystems. Societa Italiana di Ecologia 1, 379-382.

Arregui, L., Lièbana, R., Rodriguez, E., Murciano, A., Conejero, F., Pèrez-Uz, B., Serrano, S. (2012). Analysis of the usefulness of biological parameters for the control of activated sludge wastewater treatment plants in an interlaboratory study context. Journal of Environmental Monitoring 14, 1444-1452.

Arévalo, J., Moreno, B., Perez, J., Gomez, M. (2009). Applicability of the Sludge Biotic Index (SBI) for MBR activated sludge control. Journal of Hazardous Materials 167, 784-789.

Barker, A. N. (1943). The protozoan fauna of sewage disposal plants. Naturalist, Hull 806, 65-69.

Barth, E., Eltinger, M., Salloto, B., McDermont, G. (1965). Summary report on the effectc of heavy metals on the biological treatment process. Journal of Water Pollution and Control 37, 86-96.

Bedogni, G., Falanelli, A., Pedrazzi, R. (1991). Evaluation of abundance ratio between crawling and attached ciliates in the management of an activated sludge sewage-tretment plant. U: Madoni, P. (ur.) Biological Aproach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives, Peruga, Centro Bazzucchi, 229-233.

Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z. (2003). The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. Biomedicine & Pharmacotherapy 57, 203-8.

Bernat, K., Kulikowska, D., Drzewicki, A. (2017). Microfauna community during pulp and paper wastewater treatment in a UNOX system. European Journal of Protistology 58, 143-151.

Calero, C. X., Mara, D. D., Pena, M. R. (2000). Anoxic ponds in the sugar cane industry: a case study from Colombia. Water Science and Technology 42(10-11), 67-74.

Cardinaletti, M., Zitelli, A. (1991). Taxonomic distribution of microfauna in a joint urban-industrial activated sludge bench-acale unit. Effect of zinc addition. U: Madoni, P. (ur.) Biological Aproach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives, Peruga, Centro Bazzucchi, 59-74.

Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: In sickness and in health. Trends in Cell Biology 14, 70-77.

Curds, C. R. (1973). A theoretical study of factors influencing the microbial population dynamics of the activated-sludge process—I the effects of diurnal variations of sewage and carnivorous ciliated protozoa. Water Research, 7(9), 1269-1284.

Curds, C. R. (1975). Protozoa. U: Curds, C. R., Hawkes, H. A. (ur.) Ecological Aspects of Used Water Treatment, Academic Press, London, 203-268.

Curds, C. R. (1992). Protozoa and water industry. I-IV. Cambridge University Press, Cambridge, New Xork, Sydney.

Curds, C. R., Cockburn, A. (1970a). Protozoa in biological sewage-treatment process I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants. Water Research 4, 225-236.

Curds, C. R., Cockburn, A. (1970b). Protozoa in biological sewage-treatment processes II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. Water Research 4, 237-249.

De Marco, N., Gabelli, A., Cattaruzza, C., Petronio, L. (1991). Perfomance of biological sewage treatment plants: some experiences on municipal plants in the province of Pordenone (Italy). U: Madoni, P. (ur.) Biological Aproach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives, Peruga, Centro Bazzucchi, 247-251.

Dubber, D., Gray, N. F. (2009). Enumeration of protozoan ciliates in activated sludge: determination of replicate number using probability. Water research 43(14), 3443-3452.

dos Santos, L. A., Ferreira, V., Pereira, M. O., Nicolau, A. (2014). Relationship between protozoan and metazoan communities and operation and performance parameters in a textile sewage activated sludge system. European Journal of Protistology 50(4), 319-328.

Drakides, C. (1980). La microfaune des boues activees. Etude d une methode d observationet application au suivi d un pilote en phasecde demarrage. Water Research 4, 1199-1207.

Drzewicki, A., Kulikowska, D. (2011). Limitation of sludge biotic index application for control of a wastewater treatment plant working with shock organic and ammonium loadings. European Journal of Protistology, 47, 287-294.

Drzewicki, A., Cydzik-Kwiatkowska, A., Mieczkowski, D. (2017a). Impact of high-nitrogen leachate on microfauna of aerobic granular sludge. Water Environment Research 89, 890-895.

Drzewicki, A., Dębowski, M., Zieliński, M. (2017b). Effect of a static magnetic field on activated sludge community. Environmental Technology 38, 2373-2380.

Esteban, G., Tellez, C., Bautista, L. (1991). Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process. Water Research 25, 967-972.

Fenchel, T., Finlay, B. J. (2004). The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. BioScience 54, 777-784.

Foissner, W. (2016). Protists as bioindicators in activated sludge: Identification, ecology and future needs. European Journal of Protistology 55, 74-95.

Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H., Kohmann, F. (1991). Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Informationsberichte Bayer Landes amt für Wasserwirtschaft 1/91: 1-478.

Foissner, W., Berger, H., Kohmann, F. (1992). Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationsberichte Bayer Landesamt für Wasserwirtschaft 5/92: 1-502.

Foissner, W., Berger, H., Kohmann, F. (1994). Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Informationsberichte Bayer Landesamt für Wasserwirtschaft 1/94: 1-548.

Foissner, W., Berger, H., Blatterer, H., Kohmann, F. (1995). Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria. Informationsberichte Bayer Landesamt für Wasserwirtschaft 1/95: 1-540.

Foissner, W., Berger, H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes and waste waters, with notes on their ecology. Freshwater Biology 35, 375-482.

Foissner, W., Strüde-Kypke, M., van der Staay, G. W. M., Moon-van der Staay, S.-Y., Hackstein, J.H.P. (2003). Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. European Journal of Protistology 39, 365-372.

Fontaneto, D., Hortal, J. (2012). Microbial biogeography: is everything small everywhere. U: Ogilvie, L. A., Hirsch, P. R. (ur.) Microbial Ecological Theory: Current Perspectives. Caister Academic Press, Norfolk,

Glancer-Šoljan, M., Landeka Dragičević, T., Šoljan, V., Zanoški, M. (2005) Biotehnologija i okoliš (skripta). Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Gomiero, A., Sforzini, S., Dagnino, A., Nasci, C., Viarengo, A. (2012) The use of multiple endpoints to assess cellular responses to environmental contaminants in the interstitial marine ciliate *Euplotes crassus*. Aquatic Toxicology 114, 206-216.

Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., Lucena F. (2007). Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. Journal of Applied Microbiology, 103(6), 2420-2429.

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011). Protista-Protozoa Metazoa-Invertebrata. Alfa, Zagreb.

Henze, M., Comeau, Y. (2008). Wastewater characterization. U: Henze, M. van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., Brdjanovic, D (ur.) Biological Wastewater Treatment: Principles modelling and design. IWA Publishing, 33-52.

Junkins, R., Deeny, K. J., Eckhoff, T. H. (1983). The Activated sludge Process: Fundamentals of operation. M and M Mars, Inc., United States.

Kepec, S. (2016). Ekotoksikološka i mikrobiološka karakterizacija pročišćenih otpadnih voda grada Virovitice. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (doktorski rad).

Kepec, M. (1997). Uređaj za pročišćavanje otpadnih voda u Virovitici, Croatian Sugar Review (CROS) 3 (1), 6-13.

Klionsky, D. J., Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 290, 1717-1721.

Köhler, A., Deisemann, H., Lauritzen, B. (1992). Ultrastructural and cytochemical indices of toxic injury in dab liver. Marine Ecology Progress Series 91, 141-153.

Leal, A. L., Dalzochio, M. S., Flores, T. S., de Alves, A. S., Macedo, J. C., Valiati, V. H. (2013). Implementation of the sludge biotic index in a petrochemical WRRF in Brazil: improving operational control with traditional methods. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 40(12), 1415-1422.

Livingstone, D. E. (1992). Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel Mytlus edulis L. Marine Biology 112, 265-276.

Lockshin, R. A., Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy and more. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36, 2405-19.

Madoni, P. (1986). Protozoa in waste treatment systems. U: Megusar, F., Gantar, M. (ur.) Perspectives in Microbial Ecology, Slovene Society of Microbiologists, Ljubljana, 86-90.

Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performace of activated sludge plants based on the microfauna analysis. Water Research 28, 67-75.

Madoni, P. (1996). The Sludge Biotic Index for Evaluation of the Activated-sludge Plant Perfomance: The Allocation of the Ciliate Acineria uncinata to its Correct Functional Group. Acta Protozoologica 35, 209-214.

Madoni, P. (2011). Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. Italian Journal of Zoology 78 (1), 3-11.

Madoni, P., Antonietti, R. (1984). Colonization dynamics of ciliated protozoa populations in as activated sludge plant. Proceedings of IV Italian Symposium on population Dynamics, 105-112.

Madoni, P., Ghetti, P. (1981). The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage-treatment plants. Hydrobiologia 83, 207-215.

Madoni, P., Davoli, D., Chierici, E. (1993). Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. Water Research 27, 1485-1491.

Madoni, P., Romeo, M. G. (2006). Acute toxicityof heavy metals towards freshwater ciliated protist. Environmental Pollution 141, 1-7.

Martin-Cereceda M, Serrano S, Guinea A. (1996). A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants. FEMS Microbiology Ecology 21, 267-276.

Mistri, M. G., Gavinelli, M., Gorni, A. (1994). Structure of a protozoan community in a percolating filter. Bollettino di Zoologia 61, 65-71.

Moore, M. N. (2002). Biocomplexity: The post-genome challenge in ecotoxicology. Aquatic Toxicology 59, 1-15.

Nicolau, A., Mota, M., Lima, N., Martins, M. (2005). Effect of copper in the protistan community of activated sludge. Chemosphere 58, 605-614.

Papadimitriou, C., Palaska, G., Lazaridou, M., Samaras, P., Sakellaropoulos, G. (2007). The effects of toxic substaces on the activated sludge microfauna. Desalination 211, 177-191.

Papadimitriou, C., Papatheodoulou, A., Takavakoglou, V., Zdragas, A., Samaras, P. (2010). Investigation of protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency in constructed wetlands. Desalination 250, 378-382.

Pauli, W., Jax, K., Berger, S. (2001). Protozoa in wastewater treatment: function and importance. U: Beek, B. (ur.) Biodegradation and Persistence. The Handbook of Environmental Chemistry, Springer, 203-252.

Pedrazzani, R., Menoni, L., Nembrini, S., Manili, L., Bertanza, G. (2016). Suitability of Sludge Biotic Index (SBI), Sludge Index (SI) and filamentous bacteria analysis for assessing activated sludge process performance: the case of piggery slaughterhouse wastewater. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 43(7), 953-964.

Pejić, S. (2014). Prisutnost i uklanjanje mikroorganizama u vodama različitog porijekla. Sveučilište Josipa Jurja Strossmyera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek (završni rad).

Petrović, M., Tomašić, V., Macan, J. (2013). Zagađenje okoliša. U: Kaštelan-Macan, M., Petrović, M. (ur.) Analitika okoliša. HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 52-57

Pike, E. B. (1975). Aerobic bacteria. U: Curds, C. R., Hawkes, H. A. (ur.) Ecological aspects of used-water treatment. Academic Press, London.

Poole, J. (1984). A study of relationship between the mixed liquor fauna and plant perfomance for variety of activated sludge sewage treatment works. Water Research 18, 281-287.

Ratsak, C. H., Maarsen, K. A., Kooijman, S. A. L. M. (1996). Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. Water Research, 30(1), 1-12.

Salvadó, H., Gracia, M. P. (1993). Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. Water Research 27(5), 891-895.

Salvadó, H., Gracia, M., Amigo, J. (1995). Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. Water Research 29(4), 1041-1050.

Serrano, S., Arregui, L., Perez-Uz, B., Calvo, P., Guinea, A. (2008). Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants. IWA Publishing, London.

Sladecek, V. (1973). System of water quality from the biological point of view. Archiv fur Hydrobiologie 7, 1-217.

Sobczyk, M., Pajdak-Stós, A., Fiałkowska, E., Fyda, J. (2020). The influence of *Aspidisca cicada* on nitrifying bacteria and the morphology of flocs in activated sludge. Water and Environment Journal 34, 699-709.

Sobczyk, M., Pajdak-Stós, A., Fiałkowska, E., Sobczyk, Ł., Fyda, J. (2021). Multivariate analysis of activated sludge community in full-scale wastewater treatment plants. Environmental Science and Pollution Research 28(3), 3579-3589.

Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., March, B., Falugi, C., Corrado, M.U.D. (2007). Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of Euplotes crassus a single-cell eukariotic test organism for the study of the pollution of marine sediment. Aquatc toxicology 83, 272-283.

Warren, A., Salvadó, H., Curds, C. R., Roberts, D. M. (2010). Protozoa in activated sludge processes. U: Seviour, R., Nielsen, P. H. (ur.): Microbial ecology of activated sludge. IWA Publishing, London, New York.

Woodiwiss, F. (1980). Biological monitoring of surface water quality. Summary report E.E.C. ENV/787/80-EN, Bruxelles.

Zhou, K., Xu, M, Liu, B. Hong, C. A. O. (2008). Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. Journal of Environmental Sciences 20(4), 482-486.

www.lo-laboroptik.de (pristupljeno 1.2.2019.)

ŽIVOTOPIS

Mirjana Kepec, rođena 8. kolovoza 1958. godine u Podinama kod Šibenika završila je osnovnu školu i gimnaziju u Šibeniku. Diplomirala je biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer eksperimentalna biologija i stekla zvanje diplomirani inženjer biologije. Diplomski rad „Histokemijsko dokazivanje T–limfocita" izradila je pod vodstvom prof. dr. sc. Bojana Rodèa.

Odmah nakon završetka fakulteta zaposlila se kao profesor biologije i kemije u Centru za odgoj i usmjereno obrazovanje u Virovitici. Na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu položila je predmete iz pedagoško-psihološke skupine predmeta. Rad u školi je bio na određeno vrijeme, pa se 1987. godine zapošljava u Tvornici šećera Viro. Tijekom redovne suradnje sa Institutom industrije šećera bivše države sudjeluje u izradi nekoliko stručnih radova.

Poslijediplomski specijalistički studij iz područja biotehnologije – analitika i mikrobiologija namirnica, završila je obranom rada „Primjena kvaternih amonijevih soli i formalina kao dezinfekcijskih sredstava u proizvodnji šećera" 1993. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U redovnoj suradnji Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i Tvornice šećera Viro sudjelovala je u pripremi vježbi i predavanja za studente Prehrambene tehnologije (kroz kolegije Proizvodnja šećera – prof. Karlović i Obrada otpadnih voda – prof. Glancer-Šoljan). Također je bila mentor stranim studentima u tvornici šećera u okviru razmjene studenata i obavljanja stručne prakse. Za dugogodišnju suradnju i doprinos na promicanju znanosti i struke, dobila je priznanje Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu 1996. godine.

Uspješno je završila seminar Smjernice Europske unije za ekotoksikološka ispitivanja u Zagrebu u organizaciji Instituta Ruđer Bošković, 1997. godine. Redovno je imala predavanja na engleskom i hrvatskom jeziku na godišnjim skupovima Hrvatske industrije šećera sa međunarodnim sudjelovanjem. Na Hrvatskom zavodu za toksikologiju završila je tečaj za stjecanje znanja za obavljanje poslova odgovorne osobe za rad sa otrovima. Bila je član tima za izradu Operativnog plana intervencija u zaštiti okoliša u Tvornici šećera Viro 2005. godine. Sudjelovala je u izradi HACCP studije proizvodnje šećera u tvornici šećera 2006. godine. Od 2006. do 2009. godine je radila kao ravnateljica Javne ustanove za upravljanje zaštićenim prirodnim vrijednostima Virovitičko-podravske županije. Višegodišnji je član Hrvatskog

mikrobiološkog društva i sudjelovala je u radionicama i seminarima koje je društvo organiziralo od 1994. do 2006. godine.

Trenutno radi u Osnovnoj školi Suhopolje i u Strukovnoj školi u Đurđevcu. Udata je i ima dva sina.

Popis radova:

1. Kepec, M. (1996). Application of Quaternary Ammonium Compounds and Formalin as Disinfectants in Sugar Production. Food Technology and Biotechnology Review 34 (2-3), 101-105.
2. Kepec, M. (1997). Uređaj za pročišćavanje otpadnih voda. Croatian Sugar Review 3(1), 6-13.
3. Kepec, M. (1997). Mikrobiološki izvještaj za 1997. godinu. Godišnji zbornik radova industrije šećera Hrvatske 1997.
4. Kepec, M. (1999). Mikrobiološka kontrola pogona sa dodacima: rafinoza u repi i melasi i mliječna kiselina u repi i sirovom soku. Godišnji izvještaj industrije šećera Hrvatske 1999. godine.
5. Kepec, M., Idzojtić, M. (2007). Arboretum Lisičine, Zavičaj 21-22; 11-19.