

# Primjena mikroorganizama u procesima uklanjanja dušikovih spojeva iz otpadnih voda

M. Mitrović<sup>a</sup> i T. Rezić<sup>b\*</sup>

Ovo djelo je dano na korištenje pod  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License



<sup>a</sup> Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10 000 Zagreb

<sup>b</sup> Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

## Sažetak

Biološko uklanjanje dušikovih spojeva uporabom mikroorganizama ključan je proces u mnogim postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. Iznimno korisnim u uklanjanju dušikovih spojeva pokazali su se predstavnici amonijak oksidirajućih bakterija i arheja kojima pripadaju rodovi poput *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosopumilus*, ali i nitrit oksidirajućih bakterije poput *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira* i *Nitrospina*. Denitrifikaciju u postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda provode rodovi poput *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*. U ovom radu dan je pregled mikroorganizama koji se upotrebljavaju u biološkoj obradi otpadnih voda opterećenih dušikovima, odnosno u procesima nitrifikacije, denitrifikacije te "anammox" i "comammox" procesima.

## Ključne riječi

Mikroorganizmi, nitrifikacija, denitrifikacija, ciklus dušika

## 1. Uvod

Biološko uklanjanje dušikovih spojeva iz otpadnih voda uporabom mikroorganizama ima široku primjenu u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, a poznavanje karakteristika mikroorganizama ključno je za uspješno provođenje procesa. Nitrifikacija doprinosi smanjenju, a denitrifikacija porastu pH-vrijednosti.<sup>1</sup> U prvom stupnju (nitrifikacija) amonijak se aerobno prevodi u nitrat. U drugom stupnju (denitrifikacija) nitrat se pretvara u plinoviti dušik pod anoksičnim uvjetima. Nitrifikacija je autotrofni proces, što znači da bakterije energiju za rast dobivaju oksidacijom dušikovih spojeva, ponajprije amonijaka. Denitrifikaciju pokreću anoksični uvjeti, nakon što mikroorganizmi tijekom nitrifikacije potroše kisik te nitrat postaje krajnji akceptor elektrona u metaboličkim putevima oksidacije organskih spojeva.<sup>2</sup> Stoga se mikroorganizmi koji sudjeluju u procesima nitrifikacije i denitrifikacije razlikuju prema fiziološkim svojstvima, a uvjeti odvijanja procesa su različiti. Ipak postoje mikroorganizmi koji pri optimalnim uvjetima mogu provoditi procese nitrifikacije i denitrifikacije u jednom stupnju. Prednosti odvijanja procesa u jednom stupnju su manji troškovi, manji utrošak kisika u odnosu na procese koji se provode u dva stupnja, to jest upotreba mješovitih mikrobnih kultura koje su otpornije na mikrobiološko onečišćenje od čistih mikrobnih kultura.<sup>3–5</sup> Nedostaci uporabe mikroorganizama sposobnih za provođenje nitrifikacije i denitrifikacije u jednom stupnju su spori rast i nemogućnost zadovoljavajuće kontrole procesnih parametara, osobito u industrijskom mjerilu.<sup>6–8</sup> Mikrobne vrste koje imaju sposobnost provođenja reakcija redukcije, odnosno oksidacije dušikovih spojeva dijele se prema fiziološkim značajkama na mikroorganizme koji sudjeluju u procesima: amonifikacije, nitrifikacije, denitrifikacije, anaerobnoj oksidaciji amonijaka (poznata kao "anammox"

proces) i interkonverziji nitrita i nitrata.<sup>8</sup> Anaerobna oksidacija amonijaka te interkonverzija nitrita i nitrata procesi su tijekom kojih mikroorganizmi istodobno provode više reakcija redukcije i oksidacije, u jednom stupnju. Razvoju navedenih procesa doprinijela je identifikacija mikroorganizama koji imaju sposobnost heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije.<sup>9–12</sup>

Dosadašnja istraživanja uklanjanja dušikovih spojeva iz otpadnih voda uporabom mikroorganizama bila su usmjerena na identifikaciju mikroorganizama koji provode te procese i razumijevanje mehanizama kojima mikroorganizmi provode oksidaciju odnosno redukciju dušikovih spojeva. Također je istražen i utjecaj okolišnih uvjeta na provođenje procesa nitrifikacije i denitrifikacije, a osobito je istražen utjecaj procesnih parametara (koncentracije kisika, omjera C/N, pH-vrijednosti i temperature) na odvijanje procesa biološkog uklanjanja dušikovih spojeva.<sup>13–16</sup> Stoga je u ovom radu prikazan pregled mikroorganizama koji provode te procese, mehanizmi djelovanja kao i utjecaj najvažnijih okolišnih uvjeta na odvijanje procesa.

## 2. Biogeokemijski ciklus dušika

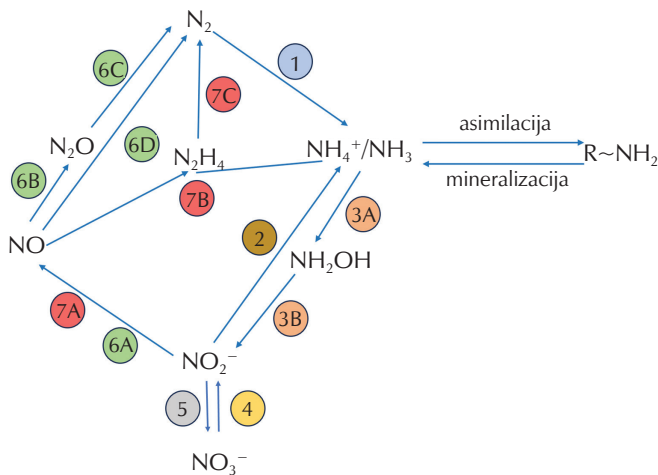
Ciklus dušika je kompleksna biokemijska transformacija koja uključuje razne dušikove spojeve i njihovo kruženje kroz atmosferu, kopnene i vodene ekosustave. Biljke, životinje i mikroorganizmi, poput bakterija, arheja i određenih protista, igraju ključnu ulogu u tom ciklusu, jer omogućuju prelazak dušika iz jednog oblika koji je nedostupan drugim živim bićima, u drugi oblik koji je dostupniji. Uobičajeno se u ciklusu dušika prepoznaju tri glavna procesa: fiksacija dušika (N<sub>2</sub>), nitrifikacija i denitrifikacija.<sup>17</sup> Mikroorganizmi koji su identificirani kao sudionici tih procesa nazivaju se fiksatori dušika, nitrifikatori i denitrifikatori. Međutim, daljnja istraživanja otkrila su postojanje dodatnih procesa,

\* Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Tonči Rezić  
E-pošta: [trezic@pbf.hr](mailto:trezic@pbf.hr)

što je dovelo do prepoznavanja ukupno pet prihvaćenih procesa (sedam glavnih reakcija) unutar ciklusa dušika (slika 1). Ti procesi uključuju:

- 1) amonifikaciju, koja obuhvaća fiksaciju dušika, kao i asimilacijsku i disimilacijsku redukciju nitrita/nitrata u amonijak (reakcije 1 i 2 na slici 1),
  - 2) nitrifikaciju (reakcije 3A, 3B i 4 na slici 1),
  - 3) denitrifikaciju (reakcije 6A – D na slici 1),
  - 4) anaerobnu oksidaciju amonijaka, poznatu kao "anammox" proces (reakcije 7A – C na slici 1),
  - 5) interkonverziju nitrita i nitrata (reakcije 4 i 5 na slici 1).<sup>18</sup>
- Proces mineralizacije organske tvari često se pogrešno smatra kao amonifikacija, dok se za asimilaciju često netočno tvrdi da uključuje procese regulacije stvaranja amonijaka i njegov unos. Svakako, oba procesa sudjeluju u ciklusu dušika i njegovom kretanju kroz biosferu (slika 1).<sup>18,19</sup>

Nitrifikacija i denitrifikacija, kao ključni procesi u kontekstu pročišćavanja otpadnih voda, ostvaruju značajne rezultate u učinkovitom uklanjanju štetnih dušikovih spojeva iz otpadnih voda.



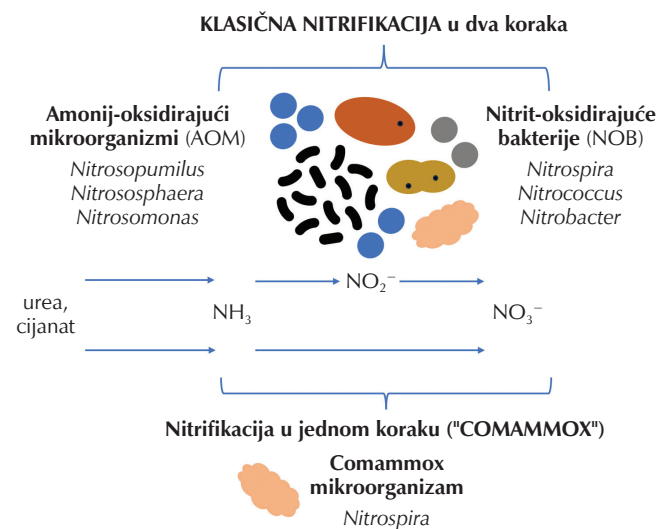
Slika 1 – Glavni procesi ciklusa kruženja dušika u prirodi<sup>18</sup>  
Fig. 1 – Main processes of the nitrogen cycle in nature<sup>18</sup>

### 2.1. Nitrifikacija

Proces nitrifikacije sastoji se od oksidacije amonijaka ( $\text{NH}_4^+$ ) u nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) (slika 1, reakcija 3) i oksidacije nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) u nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) (slika 1, reakcija 4), a uključuje tri skupine mikroorganizama: I) mikroorganizme koji oksidiraju amonijev ion, II) mikroorganizme koji oksidiraju ione nitrita i III) "comammox" organizme (engl. *complete ammonia oxidizers*; prijevod: mikroorganizmi koji u potpunosti oksidiraju amonijak  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ), odnosno mikroorganizmi koji oksidiraju  $\text{NH}_4^+$  sve do  $\text{NO}_3^-$  u jednom koraku (slika 1, reakcije 3A, 3B i 4; slika 2). Mikroorganizmi koji oksidiraju amonijev ion (AOM, engl. *ammonia-oxidizing microbes*; prijevod: amonijak oksidirajući mikroorganizmi) mogu biti amonijak oksidirajuće arheje (AOA, engl. *ammonia-oxidizing archaea*) i amonijak oksidirajuće bak-

terije (AOB, engl. *ammonia-oxidizing bacteria*), dok su mikroorganizmi koji oksidiraju nitrite nitrit oksidirajuće bakterije (NOB, engl. *nitrite-oxidizing bacteria*) (slika 2).<sup>17,20,21</sup> Neki od kemolitotrofnih predstavnika *Betaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria* te *Crenarchaeota* pripadaju mikrobnim vrstama koje oksidiraju amonij iona. Isto tako, postoje metanotrofni i heterotrofni mikroorganizmi koji uspješno oksidiraju  $\text{NH}_4^+$  u  $\text{NO}_2^-$ , ali iz njega se ne koriste energijom za rast.<sup>18</sup> Predstavnički skupina II i III uključuju kemolitotrofne mikroorganizme koji se koriste  $\text{NO}_2^-$ , odnosno  $\text{NH}_4^+$  kao jedinim izvorima energije za stanični rast i razvoj. NOB predstavnici pripadaju nekim razredima unutar koljena *Proteobacteria* i *Nitrospirota*, dok zasad poznati predstavnici "comammox" organizama pripadaju isključivo rodu *Nitrospira* (slika 2).<sup>20,22</sup> Dosad poznate i uzgojene vrste *Nitrospira* poput *N. moscoviensis*, *N. japonica* i *N. lenta* dokazano ne mogu upotrebljavati  $\text{NH}_4^+$  kao supstrat, to jest kao izvor energije za razliku od "comammox" organizama.<sup>23,24</sup> Proizvedeni  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$  u aerobnim reakcijama nitrifikacije mogu se interkonvertirati (slika 1, reakcije 4 i 5) te mogu poslužiti kao supstrati u asimilacijskoj/disimilacijskoj redukciji nitrita/nitrata u amonijak (slika 1, reakcija 2), a posljedično stvoreni  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  može se asimilirati (slika 1).<sup>18,19</sup>

AOM i NOB mikroorganizmi nisu filogenetski blisko povezani i nemaju predstavnika koji može oksidirati oba supstrata ( $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_2^-$ ). Stoga postoji interakcija tih mikroorganizama, pri čemu jedna mikroba vrsta rabi produkte metabolizma dušika druge vrste. S druge strane, odvijanje potpune nitrifikacije oksidacijom  $\text{NH}_4^+$  u  $\text{NO}_3^-$  energetski je povoljnije, te time "comammox" organizmi imaju prednost u rastu u odnosu na "nepotpune organizme" kao što su AOM i NOB (slika 2) (potpuna nitrifikacija –  $\Delta C^{\circ} = -349 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NH}_3$ ; oksidacija  $\text{NH}_4^+ - \Delta C^{\circ} = -275 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NH}_3$  i oksidacija  $\text{NO}_2^- - G^{\circ} = -74 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_2^-$ ).<sup>22,25</sup>



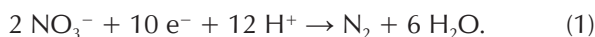
Slika 2 – Jednostupanjski i dvostupanjski postupak nitrifikacije s poznatim predstavnicima nitrificirajućih mikroorganizama<sup>25-28</sup>  
Fig. 2 – One- and two-step nitrification process with known representatives of nitrifying microorganisms<sup>25-28</sup>

Kao primjer “comammox” organizma navodi se *Candidatus Nitrospira inopinata* (*Ca. N. inopinata*) koji posjeduje enzime potrebne za oksidaciju i  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_2^-$ . Zanimljivo je da se *Ca. N. inopinata* po niskoj identičnosti nukleotida razlikuje od druge dvije poznate “comammox” vrste *Candidatus Nitrospira nitrosa* i *Candidatus Nitrospira nitrificans*.<sup>22,29</sup> NOB *Nitrospira* posjeduju dvije do pet paralognih kopija gena *nxA* i *nxB*, dok *Ca. N. inopinata* ima samo jednu kopiju navedenih gena za oksidaciju  $\text{NO}_2^-$ . S druge strane, *Ca. N. inopinata* posjeduje homologe karakterističnih enzima bitnih za oksidaciju  $\text{NH}_4^+$  poput AMO i HAO. Za razliku od redoslijeda gena *amoCAB* kao u AOM, *Ca. N. inopinata* posjeduje novi tip *amoA* gena koji pripadaju u posebnu *amoA* klasu A i *amoA* klasu B unutar loze II, a služe kao njihov filogenetski marker. “Comammox” *amoA* geni ne mogu se detektirati s klasičnim PCR početnicama za AOM *amoA* gene. Jedini *hao* gen koji posjeduje taj “comammox” organizam kodira proteinski kompleks citokrom C koji u konačnici nalikuje na istoimene komplekse pronađene u svim AOM. Slično kao *amoA*, geni *amoB* i *amoC*, kao i *hao*, spadaju u različite klase povezane s odgovarajućim homologima AOM te međusobno dijele zajedničkog pretka. Prisutnost novih tipova AMO i HAO koji dijele zajedničko podrijetlo s istoimenim enzimima predstavnika AOB poput Betaproteobacteria unutar filogenetski razgranatog roda *Nitrospira* ukazuje na modularnu evoluciju dušikova ciklusa i daje mu dodatnu složenost u procesu nitrifikacije.<sup>18–20</sup>

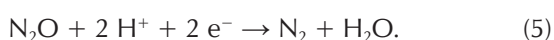
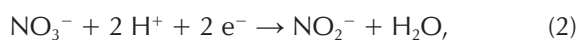
## 2.2. Denitrifikacija

Denitrifikacija je proces redukcije  $\text{NO}_2^-$  preko intermedijera poput dušikova oksida (NO) i didušikova oksida ( $\text{N}_2\text{O}$ ) u molekularni dušik u anoksičnim uvjetima ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) (slika 1, reakcija 6A – D). Mikroorganizmi koji mogu izvršiti sve tri reakcije denitrifikacije s dodatnom redukcijom  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{NO}_2^-$  nazivaju se potpuni denitrifikatori (engl. *complete denitrifiers*). Ipak, većina kemolitotrofnih bakterija i arheja sadržava samo neke gene (*nar*, *nir*, *nor*, *nos*) koji kodiraju enzime uključene u reakcije 5, 6A, 6B i/ili 6C (slika 1). Stoga, često takvi nepotpuni metabolički putevi mogu dovesti do nakupljanja i, posljedično, emisije dušikovitih stakleničkih plinova izravno u atmosferu i okoliš, kao što su NO i  $\text{N}_2\text{O}$  ili do neuspjeha u iscrpljivanju  $\text{NO}_3^-$  prisutnog u okolišu u velikim koncentracijama. Enzimi uključeni u reakcije denitrifikacije su reduktaze s pripadajućim supstratima:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , NO i  $\text{N}_2\text{O}$ .<sup>18</sup>

Ukupna reakcija denitrifikacije je:



Redoks-reakcije unutar procesa denitrifikacije su:



Najčešći predstavnici denitrifikatora su vrste roda *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium* i *Serratia* te poznati predstavnici poput *Thiobacillus denitrificans* i *Micrococcus denitrificans*. Isto tako, dokazano je da nekoliko eukariota, uključujući gljive i krednjake (protiste), mogu reducirati  $\text{NO}_2^-$  ili  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$  odnosno  $\text{N}_2$ .<sup>18</sup>

## 2.3. “Anammox” proces i amonifikacija

“Anammox” (engl. *anaerobic ammonium oxidation*) je anaerobna oksidacija  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  koja upotrebljava  $\text{NO}_2^-$  kao akceptor elektrona, a u konačnici stvara molekularni dušik (slika 1, reakcija 7). Osim  $\text{NO}_2^-$ , bakterije koje sudjeluju u “anammox” procesu upotrebljavaju i supstrat  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  za stvaranje  $\text{N}_2$  preko intermedijara poput NO i hidrazina ( $\text{N}_2\text{H}_4$ , reakcije 7A – C). Radi svojih karakteristika, “anammox” je glavni proces uklanjanja viška dušika u oceanu i zonama s minimalnom koncentracijom kisika. U “anammox” proces uključeni su isključivo predstavnici bakterija *Brocadia* iz reda *Planctomycetales* poput *Brocadia*, *Kuenenia* i *Scalindua* koji sadržavaju organelu anamoksom. Proces anaerobne oksidacije  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  koristan je za pročišćavanje otpadnih voda, jer istodobno uklanja  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NH}_3$  bez stvaranja stakleničkog plina kao što je  $\text{N}_2\text{O}$ .<sup>18</sup>

Proces amonifikacije obuhvaća razgradnju molekula proteina preko aminokiselina do amonijaka, a može se postići fiksacijom dušika (slika 1, reakcija 1) ili asimilacijskom/dissimilacijskom redukcijom nitrita u amonijak (slika 1, reakcija 2, ANRA/DNRA, engl. *assimilatory/dissimilatory nitrite reduction to ammonium*). Ti procesi mogu uključivati i redukciju nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) u nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) (slika 1, reakcija 5), pri čemu se tad nazivaju asimilacijskom/dissimilacijskom redukcijom nitrata u amonijak ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ). Skupni naziv za sve mikroorganizme koji sudjeluju u procesu amonifikacije jesu amonifikatori.

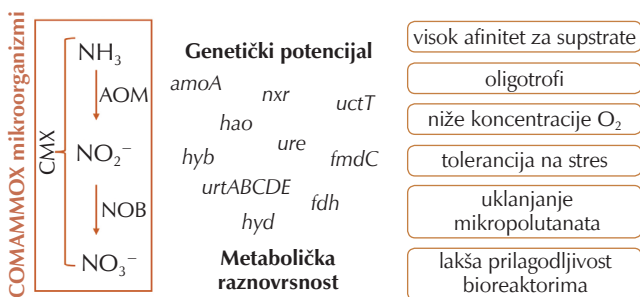
Mikroorganizmi koji fiksiraju dušik nazivaju se diazotrofi, a najpoznatiji predstavnici su neke vrste iz porodice *Azotobacteraceae*, zatim rodovi *Rhizobia*, *Frankia* te predstavnici cijanobakterija *Trichodesmium* i *Cyanothece*. Fiksacija dušika je iznimno osjetljiva na prisutnost kisika, a proizvedeni  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  asimiliraju se u biomasu ili ga dalje rabe anaerobni i aerobni mikroorganizmi koji oksidiraju  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ .<sup>19</sup>

ANRA i DNRA drugi su načini odvijanja procesa amonifikacije. DNRA je anaerobni proces s mikroorganizmima koji  $\text{NO}_3^-$  upotrebljavaju kao akceptor elektrona za stanično disanje umjesto kisika, reducirajući ga u  $\text{NO}_2^-$ . Isto tako, DNRA može započeti izravno s  $\text{NO}_2^-$  kao akceptorom elektrona. Dušik se dalje pretvara iz oblika  $\text{NO}_2^-$  u  $\text{NH}_4^+$ . Zatim može doći do asimilacije  $\text{NH}_4^+$  u biomasu mikroorganizama, pri čemu tad govorimo o ANRA procesu.<sup>18</sup> DNRA i ANRA procesi sastavljeni su od dvaju izravnih koraka te ne dolazi do proizvodnje intermedijara, poput NO i  $\text{N}_2\text{O}$ , kao u procesu denitrifikacije ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ ). Ipak, navedeni staklenički plinovi mogu biti otpušteni kao nusprodukt, budući da  $\text{NO}_2^-$  stvoren procesima DNRA i ANRA i dalje može ući u proces

denitrifikacije te uzrokovati njihovo stvaranje ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow (\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2) \rightarrow \text{NH}_4^+$ ). Dosad su utvrđeni mnogi morski prokariotski mikroorganizmi sa sposobnošću odvijanja ANRA/DNRA procesa, kao i neki predstavnici eukariota poput krednjaka.<sup>18,19</sup>

#### 2.4. "Comammox" proces

Otkriće novog procesa kao što je potpuna nitrifikacija preko "comammox" organizama, s rodom *Nitrospira* kao predstavnikom, u usporedbi s klasičnom nitrifikacijom ima niz prednosti tijekom provođenja procesa u industrijskom mjerilu. "Comammox" organizmi imaju širok metabolički potencijal što pridonosi poboljšanom uklanjanju niskih koncentracija onečišćujućih tvari iz otpadnih voda (slika 3).<sup>30</sup> Tijekom bioremedijacije, "comammox" *Nitrospira* može imati ključnu ulogu zbog mogućnosti obavljanja potpune nitrifikacije koja rezultira manjom emisijom stakleničkih plinova. Stoga su "comammox" organizmi bolji odabir za procese bioremedijacije, jer su prilagodljiviji uvjetima poput stresa i nove životne okoline, niže koncentracije hranjivih tvari i kisika te su metabolički raznovrsniji za razliku od AOM i NOB mikroorganizama (slika 3).<sup>22,31</sup> Treba napomenuti da su tijekom istraživanja geotermalnih voda u Republici Hrvatskoj identificirani geni koji pokazuju prisutnost "comammox" mikroorganizama. Uporabom identificiranih gena i sintetske biologije moguće je kreirati mikroorganizme koji će omogućiti uspješno provođenje opisanih procesa u industrijskom mjerilu.<sup>32</sup>



Slika 3 – Prednosti "comammox" organizama<sup>30</sup>

Fig. 3 – Advantages of "comammox" organisms<sup>30</sup>

### 3. Utjecaj okolišnih čimbenika na procese uklanjanja dušikovitih spojeva iz otpadnih voda

Promjene u koncentracijama kisika, izvora ugljika i dušika, odnosno udjela donora i akceptora elektrona te temperature i pH-vrijednosti znatno utječu na procese uklanjanja dušikovitih spojeva iz otpadnih voda.<sup>33</sup>

Amonifikaciji pogoduje visok udio elektron donora u odnosu na udio elektron akceptora, u suprotnom se provodi proces denitrifikacije. Vrijednosti biokinetičkih parametara, specifične brzine rasta i konstante zasićenja mogu ukazati na ograničenja i smjer odvijanja procesa uklanja-

nja dušikovitih spojeva. Visoka vrijednost omjera navedenih konstanti ukazuje na visok afinitet mikroorganizma prema supstratu i omogućuje uspješno provođenje procesa i pri vrlo niskim koncentracijama supstrata, u suprotnom dolazi do ograničenja i utjecaja koncentracije pojedinih tvari na ukupnu brzinu procesa. Inaktivacija i inhibicija dušikovim spojevima prisutna je kod procesa nitrifikacije i denitrifikacije i karakterizira se konstantama inhibicije za pojedini mikroorganizam. Vrijednosti tih konstanti ovise o vrsti mikroorganizma, vrsti dušikova spoja te pH-vrijednosti. Koncentracija slobodnog amonijaka od 10 do 150 mg l<sup>-1</sup> i od 0,1 do 1,1 mg l<sup>-1</sup> može inhibirati aktivnost nitrit oksidirajućih bakterija, to jest amonijak oksidirajućih bakterija.<sup>1,34</sup> Također, neki od dušikovitih oksida imaju izraziti inhibicijski učinak na enzime koji sudjeluju u procesima nitrifikacije i denitrifikacije te u niskim koncentracijama mogu negativno utjecati na brzine tih procesa. Prisutnost nitrata ili nitrita u koncentracijama 3 – 4 puta većim od konstante zasićenja smanjuje brzinu heterotrofne nitrifikacije u usporedbi s procesima u kojima je amonijev ion jedini izvor dušika.<sup>35</sup>

Optimalne temperature za provođenje autotrofne nitrifikacije su od 22 do 27 °C, a za heterotrofnu denitrifikaciju od 20 do 40 °C.<sup>33</sup> Na proces denitrifikacije značajan utjecaj ima temperatura i pH-vrijednost. Pri niskim temperaturama (0 – 5 °C) brzina denitrifikacije znatno se smanjuje. Općenito, povećanjem temperature za svakih 10 °C brzina denitrifikacije se udvostručava. Procesu simultane nitrifikacije i denitrifikacije pogoduje temperatura u intervalu od 15 do 35 °C. Promjene temperature mogu utjecati na druge parametre, uključujući omjer C/N, pH te sastav mikrobne zajednice, stoga su potrebna daljnja istraživanja da bi se dodatno odredili utjecaji navedenih parametara.<sup>35</sup>

Oksidacija amonijaka tijekom nitrifikacije s *Thiosphaera pantotropha* najuspješnije se provodila u alkalnom području. Stabilnosti hidroksil-amina (inhibitora nitrifikacije) smanjena je pri višim pH-vrijednostima, dok je aktivnost enzima nitrifikacije povećana.<sup>14</sup> Kinetička istraživanja denitrifikacije s *P. denitrificans* pri različitim pH-vrijednostima ukazala su na različitost metaboličkih puteva tijekom provođenja procesa kod različitih pH-vrijednosti. Tijekom procesa redukcije nitrata pri pH-vrijednosti 5,5 dolazi do akumulacije nitrita i dušikovitih oksida, a proces se provodi postupno u koracima. Kod 8,5 dolazi do akumulacije nitrita, ali ne i nitrata. Sličan utjecaj pH-vrijednosti primijećen je i tijekom redukcije nitrita. Pri pH 5,5 proces se provodio u dva stupnja uz akumulaciju dušikovitih oksida. Alkalna sredina (pH 9,5) pogoduje odvijanju procesa u jednom stupnju.<sup>14</sup> Nitrifikacija doprinosi smanjenju, a denitrifikacija porastu pH-vrijednosti, stoga se tijekom istodobne nitrifikacije i denitrifikacije pH-vrijednost lakše održava.<sup>5</sup>

Vrsta i koncentracija hranjivih sastojaka (izvora ugljika i dušika te koncentracija otopljenog kisika) imaju važan utjecaj na dinamiku procesa nitrifikacije i denitrifikacije.<sup>6</sup> Najuspješnije uklanjanje amonijevih iona (80 %) ostvareno je pri omjeru C/N 4. Nasuprot tome, slabo uklanjanje amonijevih iona (42 %) postignuto je pri višem omjeru C/N 10. Rezultati istraživanja pokazali su da pri visokom omjeru C/N heterotrofne bakterije dominiraju nad autotrofnim bakterijama, što rezultira smanjenjem učinkovitosti uklanjanja dušikovitih spojeva, osobito amonijevih iona.<sup>2</sup>

U procesima obrade otpadnih voda dolazi do promjena omjera C/N, te je za postizanje učinkovite denitrifikacije potrebno dodavati organski ugljik kao npr. metanol, etanol ili octenu kiselinu.<sup>14</sup> Dodavanje metanola ili drugih izvora ugljika poskupljuje proces obrade otpadnih voda te su stoga razvijeni postupci autotrofne denitrifikacije uz vodik, sumpor ili neki drugi anorganski donor elektrona. *Paracoccus denitrificans* ima sposobnost autotrofnog i heterotrofnog rasta. Navedeno svojstvo pogoduje primjeni bakterije *Paracoccus denitrificans* u procesima autotrofne denitrifikacije.<sup>6</sup>

### 3.1. Utjecaj koncentracije kisika na procese nitrifikacije i denitrifikacije

Aerobni uvjeti pogoduju procesu nitrifikacije, dok je efikasna denitrifikacija limitirana pri visokim koncentracijama otopljenog kisika i uspješno se provodi pri mikroaerofilnim ili anaerobnim uvjetima.<sup>6</sup> Omjer specifične brzine respiracije i konstante brzine zasićenja kisikom ukazuje na potrebu mikroorganizma za kisikom. Kad omjer ima višu vrijednost, ograničenost kisikom je manje izgledna nego kod mikroorganizama kod kojih su te vrijednosti niže.<sup>14</sup> Konstante zasićenja kisikom za amonijak oksidirajuće bakterije i nitrat oksidirajuće bakterije su  $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ , odnosno  $1,1 \text{ mg l}^{-1}$ , što ukazuje na to da nitrat oksidirajuće bakterije imaju više vrijednosti kritične koncentracije otopljenog kisika kod kojih se ostvaruje maksimalna brzina respiracije od amonij-oksidirajućih bakterija. Stoga, smanjenje koncentracije otopljenog kisika može povećati nakupljanje  $\text{NO}_2^-$ . Prevladavanje ovakvih problema moguće je prilagodavanjem koncentracije otopljenog kisika potrebama mikroorganizma za kisikom, u suprotnom, tijekom nitrifikacije dolazi do nakupljanja amonijaka i nitrita kao međuprodukta oksidacije amonijaka te smanjene produkcije nitrata.<sup>1,16</sup>

Da bi se provela potpuna nitrifikacija, uobičajeno je da koncentracija otopljenog kisika bude viša od  $5 \text{ mg l}^{-1}$ . Do nepotpune nitrifikacije dolazi ako je koncentracija otopljenog kisika u interval od  $0,3$  do  $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ . Proces denitrifikacije uspješno se provodi kad je koncentracija otopljenog kisika niža od  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ . Koncentracije više od  $1 \text{ mg l}^{-1}$  imaju negativan utjecaj na proces denitrifikacije, te dolazi do inhibicije.<sup>36</sup> Navedene razlike u koncentracijama otopljenog kisika posljedica su utjecaja kisika na aktivnost enzima koji sudjeluju u procesima nitrifikacije i denitrifikacije. Visoke koncentracije kisika inhibiraju redukciju nitrata. Istraživanja su pokazala da niske koncentracije otopljenog kisika imaju pozitivan utjecaj na rast i aktivnost bakterija iz roda *Nitrospira* koje sudjeluju u "comammox" procesima. Koncentracija otopljenog kisika ključna je i kod regulacije "anammox" procesa. Za provođenje uspješnog procesa koncentraciju otopljenog kisika treba regulirati i održavati u intervalu od  $0,6$  do  $0,8 \text{ mg l}^{-1}$ . Koncentracije kisika koje su niže od  $2 \%$  koncentracije zasićenja inhibiraju aktivnost "anammox" bakterija, nadalje, visoke koncentracije kisika ireverzibilno inhibiraju aktivnosti "anammox" bakterija. Ako se želi uspješno provoditi "anammox" proces zajedno s procesom denitrifikacije, koncentracija otopljenog kisika ne bi smjela biti veća od  $0,7 \text{ mg l}^{-1}$ .<sup>37</sup>

Potrebno je spomenuti i istraživanja *Robertsona* i *Kuena* s *T. pantotropha*, bakterijom koja može provoditi aerobnu denitrifikaciju. Taj proces nazvan je korespiracijom. Pri navedenom procesu dolazi do usporavanja u prijenosu elektrona tijekom kojeg stanice prilagođavaju metabolizam uvjetima okoline tako da nakupljene elektrone prenose na denitrifikacijske enzime. Stoga, da bi se otkrio mehanizam aerobne denitrifikacije, bitno je razjasniti regulaciju prijenosa elektrona.<sup>38</sup> Smatra se da dolazi do natjecanja sustava za nitrifikaciju i respiraciju za kisikom, pri čemu proces nitrifikacije prevladava. S fiziološkog gledišta oksidacijom NADP elektroni u prisutnosti dovoljne količine kisika reduciraju kisik. Ako je koncentracija kisika nedostatna, dolazi do oksidacije nitrata ili nitrita i provodi se denitrifikacija. Nedostatak nitrata i nitrita usmjerava proces u smjeru nitrifikacije i redukcije amonijaka do nitrita, koji onda pokreće denitrifikaciju i osigurava protok elektrona.<sup>39</sup>

## 4. Zaključak

Prilagodavanjem okolišnih uvjeta (koncentracijama kisika, izvora ugljika i dušika, to jest udjela donora i akceptora elektrona te temperature i pH-vrijednosti) može se znatno povećati učinkovitost uklanjanja dušikovim spojeva u sustavima za biološku obradu otpadnih voda. Metabolički potencijal mikroorganizama koji rabe dušikove spojeve ključan je za uspješno odvijanje procesa amonifikacije, nitrifikacije, denitrifikacije te "anammox" i "comammox" procesa. Identifikacija mikroorganizama koji imaju mogućnosti uklanjanja dušikovim spojeva olakšana je primjenom metoda molekularne biologije i genetike, odnosno identifikacijom gena i enzima ključnih za odvijanje tih procesa. Potrebno je naglasiti da uzgoj pojedinih mikrobnih vrsta s izraženim potencijalom nije moguć u laboratorijskim uvjetima, a njihova je taksonomska identifikacija otežana. Nadalje, određivanje biokinetičkih parametara važno je za postavljanje procesa i procjenu utjecaja okolišnih uvjeta na tijek odvijanja bioprocasa. Dodatno, potrebno je prilagoditi i razviti odgovarajuće bioreaktorske sustave koji će omogućiti optimalne uvjete potrebne za uspješno provođenje procesa uklanjanja dušikovih spojeva iz otpadnih voda upotrebom mikroorganizama.

### Popis kratica

#### List of abbreviations

AMO	– amonij monooksigenaza – ammonia monooxygenase
anammox	– anaerobna oksidacija amonija – anaerobic ammonium oxidation
ANRA	– asimilacijska redukcija nitrita u amonijak – assimilatory nitrite reduction to ammonium
AOA	– amonij-oksidirajuće arheje – ammonia-oxidising archaea
AOB	– amonij-oksidirajuće bakterije – ammonia-oxidising bacteria
AOM	– amonij-oksidirajući mikrobi – ammonia-oxidising microbes

comammox – potpuni oksidanti amonija/potpuna oksidacija amonija	– complete ammonia oxidisers/oxidation
DNRA	– disimilacijska redukcija nitrita u amonijak – dissimilatory nitrite reduction to ammonium
HAO	– hidroksilamin oksidoreduktaza – hydroxylamine oxidoreductase
NOB	– nitrit-oksidirajuće bakterije – nitrite-oxidising bacteria
NXR	– nitrit oksidoreduktaza – nitrite oxidoreductase

## Literatura References

- L. Yan, S. Liu, Q. Liu, M. Zhang, Y. Liu, Y. Wen, Z. Chen, Y. Zhang, Q. Yang, Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO, *Bioresour. Technol.* **275** (2019) 153–162, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.05>.
- M. Chang, Y. Wang, Y. Pan, K. Zhang, L. Lyu, M. Wang, T. Zhu, Nitrogen removal from wastewater via simultaneous nitrification and denitrification using a biological folded non-aerated filter, *Bioresour. Technol.* **289** (2019) 121696, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121696>.
- W. Ma, Y. Han, W. Ma, H. Han, H. Zhu, C. Xu, K. Li, D. Wang, Enhanced nitrogen removal from coal gasification wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) in an oxygen-limited aeration sequencing batch biofilm reactor, *Bioresour. Technol.* **244** (2017) 84–91, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.083>.
- S. N. H. Abu Bakar, H. Abu Hasan, A. W. Mohammad, S. R. S. Abdullah, T. Y. Haan, R. Ngteni, K. M. M. Yusof, A review of moving-bed biofilm reactor technology for palm oil mill effluent treatment, *J. Clean. Prod.* **171** (2018) 1532–1545, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.100>.
- R. F. Bueno, R. P. Piveli, F. Campos, P. A. Sobrinho, Simultaneous nitrification and denitrification in the activated sludge systems of continuous flow, *Environ. Technol.* **39** (2018) 2641–2652, doi: <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1363820>.
- T. Rezić, B. Šantek, S. Novak, V. Marić, Heterotrophic cultivation of *Paracoccus denitrificans* in a horizontal rotating tubular bioreactor, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23** (2007) 987–996, <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9324-0>.
- F. Di Capua, F. Iannacone, F. Sabba, G. Esposito, Simultaneous nitrification–denitrification in biofilm systems for wastewater treatment: Key factors, potential routes, and engineered applications, *Bioresour. Technol.* **361** (2022) 127702, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127702>.
- V. Singh, B. Ormeci, S. Mishra, A. Hussain, Simultaneous partial Nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) – a review of critical operating parameters and reactor configurations, *Chem. Eng. J.* **433** (2022) 133677, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133677>.
- D. Qu, C. Wang, Y. Wang, R. Zhou, H. Ren, Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel ground-water origin cold-adapted bacterium at low temperatures, *RSC Adv.* **7** (2015) 5149–5157, doi: <https://doi.org/10.1039/c4ra13141j>.
- T. He, Z. Li, D. Xie, Q. Sun, Y. Xu, Q. Ye, J. Ni, Simultaneous nitrification and denitrification with different mixed nitrogen loads by a hypothermia aerobic bacterium, *Biodegradation* **29** (2018) 159–170, doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9820-6>.
- H. Chai, Y. Xiang, R. Chen, Z. Shao, L. Gu, L. Li, Q. He, Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen wastewater: Treatment performance and nitrogen removal pathway, *Bioresour. Technol.* **280** (2019) 51–58, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.022>.
- Y. Jia, M. Zhou, Y. Chen, Y. Hu, J. Luo, Insight into short-cut of simultaneous nitrification and denitrification process in moving bed biofilm reactor: Effects of carbon to nitrogen ratio, *Chem. Eng. J.* **400** (2020) 125905, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125905>.
- S. M. Hocaoglu, G. Insel, U. U. Cokgor, D. Orhon, Effect of low dissolved oxygen on simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor treating black water, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 4333–4340, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.096>.
- T. Rezić, B. Šantek, S. Novak, V. Marić, Comparison between the heterotrophic cultivation of *Paracoccus denitrificans* in continuous stirred tank reactor and horizontal rotating tubular bioreactor, *Process Biochem.* **41** (2006) 2024–2028, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.001>.
- Y. C. Chiu, L. L. Lee, C. N. Chang, A. C. Chao, Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **59** (2007) 1–7, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.08.001>.
- L. Zhang, C. Wei, K. Zhang, K. Zhang, C. Zhang, Q. Fang, S. Li, Effects of temperature on simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in a sequencing batch biofilm reactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32** (2009) 175–182, doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0235-3>.
- L. Y. Stein, Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49** (2019) 9–15, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.003>.
- L. Y. Stein, M. G. Klotz, The nitrogen cycle, *Curr. Biol.* **26** (2016) 94–98, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>.
- D. D. Myrold, Transformations of nitrogen, In: *Principles and Applications of Soil Microbiology-Third Edition* (2021) str. 385–421, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820202-9.00015-0>.
- P. Pjevac, C. Schaubberger, L. Poghosyan, C. W. Herbold, A. Maartje, H. J. van Kessel, A. Daebeler, M. Steinberger, M. S. M. Jetten, S. Lueker, M. Wagner, H. Daims, AmoA-Targeted Polymerase Chain Reaction Primers for the Specific Detection and Quantification of Comammox *Nitrospira* in the Environment, *Front. Microbiol.* **8** (2017) 1508, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01508>.
- D. E. Holmes, Y. Dang, J. A. Smith, Nitrogen cycling during wastewater treatment, *Adv. Appl. Microbiol.* **106** (2019) 113–192, doi: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.10.003>.
- H. Daims, E. Lebedeva, P. Pjevac, P. Han, C. Herbold, M. Albertsen, Jehmlich, N. M. Palatinszky, J. Vierheilig, A. Bulaev, R. H. Kirkegaard, M. von Bergen, T. Rattei, B. Bendinger, P. H. Nielsen, M. Wagner, Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria, *Nature* **528** (2015) 504–509. doi: <https://doi.org/10.1038/nature16461>.
- H. Daims, J. L. Nielsen, P. H. Nielsen, K. H. Schleifer, M. Wagner, *In Situ* Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 5273–5284, doi: <https://doi.org/10.1128/aem.67.11.5273-5284.2001>.
- N. Ushiki, H. Fujitani, Y. Aoi, S. Tsuneda, Isolation of *Nitrospira* belonging to Sublineage II from a Wastewater Treatment Plant, *Microbes. Environ.* **28** (2013) 346–353, doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9461-2>.

- doi.org/10.1264/jsme2.me13042.
25. A. E. Santoro, The do-it-all-nitrifier, *Science* **351** (2016) 342–343, doi: <https://doi.org/10.1126/science.aad9839>.
  26. M. Pester, F. Maixner, D. Berry, T. Rattei, H. Koch, S. Lücker, B. Nowka, Richter, A. E. Spieck, E. Lebedeva, A. Loy, M. Wagner, H. Daims, NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*, *Environ. Microbiol.* **16** (2014) 3055–3071, doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12300>.
  27. M. Pester, T. Rattei, S. Flechl, A. Grönröft, A. Richter, J. Overmann, B. Reinhold-Hurek, A. Loy, M. Wagner, *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions, *Environ. Microbiol.* **14** (2011) 525–539, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02666.x>.
  28. S. Lucker, M. Wagne, F. Maixner, E. Pelletier, H. Koch, B. Vacherie, T. Rattei, J. S. S. Damste, E. Spieck, D. Le Paslier, H. Daims, A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** (2010) 13479–13484, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1003860107>.
  29. M. A. H. J. van Kessel, D. R. Speth, M. Albertsen, P. H. Nielsen, H. J. M. Op den Camp, B. Kartal, M. S. M. Jetten, S. Lücker, Complete nitrification by a single microorganism, *Nature* **528** (2015) 555–559, doi: <https://doi.org/10.1038/nature16459>.
  30. N. R. Maddela, Z. Gan, Y. Meng, F. Fan, F. Meng, Occurrence and Roles of Comammox Bacteria in Water and Wastewater Treatment Systems: A Critical Review, *Engineering* **17** (2022) 196–206, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.024>.
  31. H. Koch, M. A. H. J. van Kessel, S. Lucker Complete nitrification insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103** (2018) 177–189, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>.
  32. M. Mitrović, E. Kostešić, T. Marković, L. Selak, B. Hausmann, P. Pjevac, S. Orlić, Microbial community composition and hydrochemistry of underexplored geothermal waters in Croatia, *Syst. Appl. Microbiol.* **45** (2022) 126359, doi: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126359>.
  33. S. N. James, A. Vijayanandan, Recent advances in simultaneous nitrification and denitrification for nitrogen and micro-pollutant removal: a review, *Biodegradation* **34** (2023) 103–123, doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10015-8>.
  34. M. Soliman, A. Eldyasti, Development of partial nitrification as a first step of nitrite shunt process in a sequential batch reactor (SBR) using ammonium oxidizing bacteria (AOB) controlled by mixing regime, *Bioresour. Technol.* **221** (2016) 85–95, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.023>.
  35. L. A. Robertson, J. G. Kuenen, Nitrogen removal from water and waste, in: *Microbial control of pollution*, J. C. Fry, G. M. Gadd, R. A. Herbert, C. W. Jones, I. A. Watson-Craik (Eds.), Society for General Microbiology, 1992., str. 227–267.
  36. Y. Cheng, J. Y. Li, X. Ren, Y. Li, Y. Y. Kou, K. Chon, M. H. Hwang, M. H. Ko, High efficiency of simultaneous nitrification, denitrification, and organics removal in the real-scale treatment of high C/N ratio food-processing wastewater using micro-aerobic reactors, *Biochem. Eng. J.* **177** (2022) 108218, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108218>.
  37. Z. Zheng, J. Li, J. Ma, J. Du, W. Bian, Y. Li, Y. Zhang and B. Zhao, Nitrogen removal via simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process under high DO condition, *Biodegradation* **27** (2016) 195–208, doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-016-9766-5>.
  38. L. A. Robertson, J. G. Kuenen, The effect of electron acceptor variations on the behaviour of *Thiosphaera pantotropha* and *Paracoccus denitrificans* in pure and mixed cultures, *FEMS Microbiol. Lett.* **86** (1992) 221–228, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb04813.x>.
  39. L. A. Robertson, J. G. Kuenen, Combined nitrification-denitrification processes, *FEMS Microbiol.* **15** (1994) 109–117, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00129.x>.

## SUMMARY

### Application of Microorganisms in the Processes of Removing Nitrogen Compounds from Wastewater

Maja Mitrović<sup>a</sup> and Tonči Rezić<sup>b\*</sup>

The biological removal of nitrogen compounds using microorganisms is a key process in many wastewater treatment plants. Representatives of ammonia-oxidising bacteria and archaea, belonging to genera such as *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosopumilus*, as well as nitrite-oxidising bacteria such as *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, and *Nitrospina*, have proven to be extremely effective in removing nitrogen compounds. Denitrification in plants for biological wastewater treatment is carried out by genera such as *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*. This paper provides an overview of the microorganisms used in the biological treatment of wastewater loaded with nitrogen compounds, including processes such as nitrification, denitrification, “anammox” and “comammox”.

#### Keywords

*Microorganisms, nitrification, denitrification, nitrogen cycle*

<sup>a</sup> Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54,  
10 000 Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> University of Zagreb Faculty of Food  
Technology and Biotechnology,  
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Professional paper  
Received October 27, 2023  
Accepted February 15, 2024