

Aerobni granulirani mulj u obradi otpadnih voda: mehanizam granulacije i svojstva aerobnih granula

Grgas, Dijana; Galant, Mirjana; Štefanac, Tea; Ladavac, Adelina; Brozinčević, Adrijana; Štrkalj, Anita; Landeka Dragičević, Tibela

Source / Izvornik: **Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 2021, 16, 20 - 27**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

<https://doi.org/10.31895/hcptbn.16.1-2.3>

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:115:025131>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
METALURŠKI FAKULTET
UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF METALLURGY

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb - Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ



PREGLEDNI RAD / REVIEW

Aerobni granulirani mulj u obradi otpadnih voda: mehanizam granulacije i svojstva aerobnih granula

Aerobic granular sludge in wastewater treatment: granulation mechanism and properties of aerobic granules

Dijana Grgas¹, Mirjana Galant², Tea Štefanac¹, Adelina Ladavac³, Andrijana Brozinčević⁴, Anita Štrkalj⁵, Tibela Landeka Dragičević^{1*}¹Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska²Usluga odvodnja d.o.o., Šime Kurelića 22, 52000 Pazin, Hrvatska³Via Konzalting d.o.o., Karigador 93, 52466 Novigrad, Hrvatska⁴Nacionalni park Plitvička jezera, Josipa Jovića 19, 53231 Plitvička Jezera, Hrvatska⁵Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Aleja narodnih heroja 3, 44000, Sisak, Hrvatska

*Corresponding author: tlandekadragicevic@pbf.hr

Sažetak

Aerobni granulirani mulj (AGS, engl. Aerobic Granular Sludge) predstavlja obećavajuću tehnologiju u obradi otpadnih voda kućanstva i industrije. Aerobne granule su samoimobilizirane mikrobnе nakupine, bez nosača, a karakterizira ih kompaktna gusta struktura, visoko zadržavanje biomase, visoka učinkovitost uklanjanja onečišćenja i svojstvo brzog taloženja. Na formiranje i stabilnost aerobnog granuliranog mulja utječu brojni čimbenici, poput koncentracija otopljenog kisika, vrijeme prozračivanja, vrsta izvora ugljika, sile smicanja, period gladovanja, vrijeme taloženja. Zbog slojevite strukture granule, sa vanjskim aerobnim slojem i anoksičnim i anaerobnim zonama prema središtu granule, moguće je istovremeno uklanjanje C, N i P. AGS tehnologija ima potencijal smanjenja infrastrukture i operativnih troškova pročišćavanja otpadnih voda. Ovaj rad daje pregled najnovijih spoznaja iz literature o mehanizmu granulacije i svojstvima aerobnih granula.

Ključne riječi: *aerobni granulirani mulj, mehanizam granulacije, struktura i svojstva granula*

Abstract

Aerobic granular sludge (AGS) is a promising technology in domestic and industrial wastewater treatment. Aerobic granules are self-immobilized microbial aggregates, without carriers, characterized by compact dense structure, high retention of biomass, high efficiency for pollution removal, and good settling ability. The formation and stability of aerobic granular sludge are influenced by a number of factors, such as dissolved oxygen concentrations, aeration time, type of carbon source, shear forces, starvation period, settling time. Due to the layered structure of the granule, with an outer aerobic layer and anoxic and anaerobic zones towards the center of the granule a simultaneous removal of C, N and P is possible. AGS technology has the potential to reduce infrastructure and operating costs of wastewater treatment. This work presents an up-to-date review of the literature focusing on AG granulated mechanism and properties of aerobic granules.

Keywords: *aerobic granulated sludge, granulated mechanisms, granule structure and properties*

Uvod

Tehnologija aerobnog granuliranog mulja (AGS, engl. *Aerobic Granulated Sludge*) smatra se nadolazećim novim standardom za obradu kućanskih i industrijskih otpadnih voda (Franca i sur., 2018; de Kreuk i sur., 2005a). Aerobne granule (AG, engl. *Aerobic Granules*) su nakupine mikroorganizama, vrsta biofilma koji se uglavnom sastoji od bakterija samoimobiliziranih bez nosača u guste kompaktne agregate sferičnog oblika (Yae i sur., 2019; Gao i sur., 2011; Liu i sur., 2007; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b; Liu i Tay, 2004). AGS karakterizira mogućnost održavanja različitih redoks reakcija unutar granule, veliko zadržavanje biomase, mogućnost podnošenja visokog organskog i hidrauličkog opterećenja i tolerancija toksičnih sastojaka. AGS tehnologija ima potencijal smanjenja infrastrukture i operativnih troškova pročišćavanja otpadnih voda za 25%, potrebe za prostorom za 75% i potrebe za energijom za 30% (Sarma i Tay, 2018; Kent i sur., 2018). Istraživanje AGS-a provodi se primjenom sekvencijalnog šaržnog reaktora (SBR, engl. *Sequencing Batch Reactor*) (Gao i sur., 2011; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b) koji ima važnu ulogu u unaprijeđivanju AGS tehnologije zbog fleksibilnosti u radu i brzog i pouzdanog uzgoja AGS (Nancharaiah i Reddy, 2018). Na formiranje i stabilnost granula utječu brojni okolišni i procesni čimbenici, poput: sastav supstrata, organsko opterećenje, vrsta izvora ugljika, vrijeme taloženja, dizajn reaktora, intenzitet aeracije, strategija hranjenja, period gladovanja, hidrodinamičke smične sile, izvanstanične polimerne tvari (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*), brzina rasta mikroorganizama, gradijent supstrata u granulama i drugo (Wilén i sur., 2018; Franca i sur., 2018; Gao i sur., 2011). AGS omogućava istovremeno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora i drugih onečišćenja u jednomuljnom sustavu obrade otpadne vode, zbog slojevite strukture granule sa vanjskim aerobnim slojem i anoksičnim i anaerobnim zonama prema središtu granule (Nancharaiah i Reddy, 2018; Cydzik-Kwiatkowska et al., 2014). Različite funkcionalne skupine mikroorganizama prisutne su i koegzistiraju u granulama (Winkler i sur., 2013), prisutni su mikroorganizmi aerobnih i anaerobnih metaboličkih aktivnosti (Li i sur., 2014a; Li i sur., 2014b; Yilmaz i sur., 2008; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b). Ipak, tijekom dugotrajnog rada i tijekom pohrane (čuvanja) aerobnih granula dolazi do gubitka stabilnosti i aktivnosti granula što može biti ozbiljna

prepreka njihovoj praktičnoj primjeni (Franca i sur., 2018; Adav i sur., 2008; Zhang i sur., 2005).

U ovom radu istaknute su spoznaje o mehanizmu formiranja aerobnih granula kao i svojstva aerobnih granula kroz pregled novije literature.

Formiranje aerobnog granularnog mulja

Formiranje granula je kompleksan proces na kojem utječu fizikalni, kemijski i stanični mehanizmi. Početni stadij granulacije određuju različite sile i svojstva biomase, poput: hidrodinamičke sile, pokretljivost stanica, svojstva staničnih površina, difuzija i dr. (Liu i sur., 2009; Liu i Tay, 2002). Formirani prvi mikrobnii agregati dalje rastu i formiraju guste kompaktne nakupine u kojima mogu biti različite mikrobnne zajednice u ekološkim nišama različitih specifičnih funkcija, ovisno o uvjetima u reaktoru (Winkler i sur., 2013; Liu i sur., 2004a). Granule se formiraju iz aktivnog mulja u šaržnom reaktoru (SBR) primjenom režima hranjenja obilje/gladovanje, kratkog vremena taloženja i djelovanjem hidrodinamičkih sila smicanja. Čestice aktivnog mulja procesom granulacije mijenjaju morfologiju, formirajući zrele granule kroz prilagodbu aktivnog mulja, granulaciju i stabilizaciju (Wang i sur., 2009). Režim hranjenja obilje/gladovanje i hidrodinamičke sile smicanja povećavaju hidrofobnost površine stanica i ubrzavaju agregaciju biomase. Hidrodinamičke sile utječu na strukturu, sastav mikrobnne populacije i biokemijske reakcije unutar granule mulja. Ispiranje negranularane biomase odnosno ispiranje manje zastupljenih mikrobnnih vrsta zbiva se kao posljedica erozije dok se vrste unutar granula dalje razvijaju (Szabó i sur., 2017). Pravilno proveden proces granulacije rezultira postizanjem uspješnog uklanjanja nutrijenata i postizanje niskih koncentracija suspendiranih čestica u obrađenoj vodi (Wilén i sur., 2018). U agregaciji mikroorganizma, formiranju granula i stabilnosti strukture važnu ulogu ima ekstracelularna polimerna tvar (EPS, engl. *Extracellular Polymer Substances*) (Seviour i sur., 2010; McSwain i sur., 2005).

Procesi uključeni u aerobnu granulaciju (Slika 1) (Sharma i sur., 2019; Sarma i sur., 2017; Liu i Tay, 2002) su: (i) fizički kontakt između bakterija i stabilizacija kontakata djelovanjem privlačnih sila, (ii) sazrijevanje udruženih stanica formiranjem EPS na kojeg se stanice vežu i razmnožavaju, (iii) stvaranje trodimenzionalne strukture djelovanjem hidrodinamičkih sila smicanja. Zbog hidrofobne površine stanica i van

der Waalsovih sila zbiva se međusobna adhezija stanica, a interakcija različitih iona sa EPS kao i hidrodinamičko smicanje zbog protoka zraka i vode omogućava granulaciju mikrobnnih kolonija koje tvore kompleks više granula a koje se odvajaju u slobodne granule pri smanjenoj opskrbi kisikom zbog sila smicanja između granula (Slika 1) (Liu i Tay, 2008).

Mehanizam aerobne granulacije predložili su Liu i Tay (2002), a zbiva se kroz korake:

stanični kontakt fizičkim pokretima – različite sile uključene su u fizičku interakciju: hidrodinamičke, termodinamičke odnosno Brownovo gibanje, prirodna mobilnost stanica (cilije, flagele, pseudopodi), sile difuzije, sila gravitacije.

stabilni međustanični kontakt zbog privlačnih sila – fizičke, kemijske i biokemijske

fizičke sile: van der Waals-ove sile, privlačenje suprotnih naboja, termodinamičke sile koje uključuju slobodnu energiju površine i površinsku napetost, hidrofobnost, filamentozne bakterije koje stvaraju mostove i povezuju pojedinačne stanice.

U stvaranju granula hidrofobnost stanica ima glavnu ulogu. Povećanje hidrofobnosti stanične površine smanjuje slobodnu Gibbsovu energiju površine i pojačava agregaciju stanica.

kemijske sile: vodikove veze, ionsko uparivanje, stvaranje ionskih tripleta i formiranje mostova između čestica. Te interakcije tvore ionsku vezu između nabijenih molekula i jačaju složenost granule.

biokemijske sile: fuzija staničnih membrana i dehidracija stanične površine.

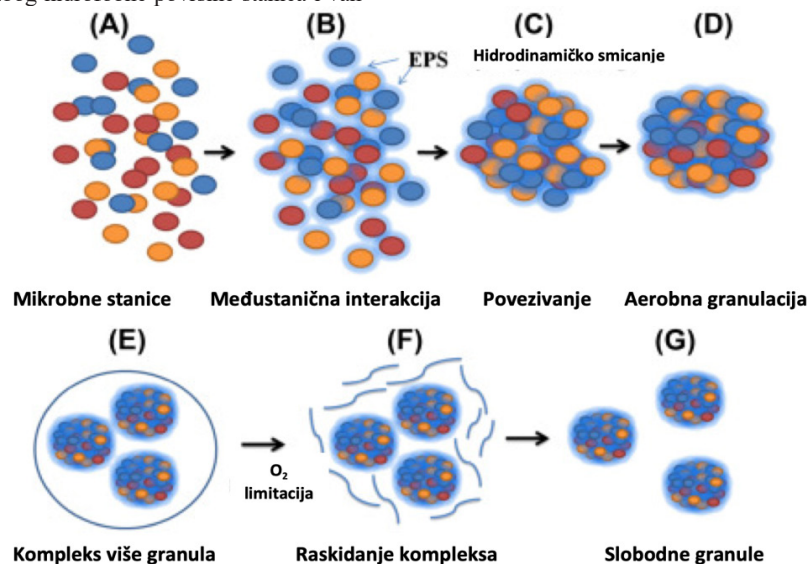
mikrobne sile koje rezultiraju stvaranjem zrelih mikrobnnih agregata – proizvodnja EPS, rast staničnog klastera i metaboličke promjene.

ustaljeno stanje (engl. *Steady state*) trodimenzionalne strukture.

Trodimenzionalni oblik granulama daju hidrodinamičke sile smicanja.

Smicanje potiče proizvodnju polisaharida i omogućuje veću stabilnost struktura granula. Potpuno stabilne granule su poput čvrstih kuglica koje sadrže milijune mikrobnnih stanica.

Neka istraživanja pokazuju da granule uzgojene na različitim izvorima ugljika mogu imati različite mikrobnne zajednice, morfologiju granula i unutarnju strukturu. Izvor ugljika utječe na stabilnost AGS kao i učinkovitost ciljanog biološkog procesa, posebice kada se uklanjanje



Slika 1. Formiranje granula: slobodne mikrobne stanice (A), međustanična interakcija (B), povezivanje-agregacija (C), aerobna granulacija (D), kompleks više granula (E), raskidanje kompleksa (liza) (F), slobodne granule (G) (preuzeto i prilagođeno iz Sharma i sur., 2019)

Figure 1. Granule formation: free microbial cells (A), cell-cell interaction (B), aggregation (C), aerobic granulation (D), multiple granule complex (E), free granules (G) (adapted from Sharma et al., 2019)



ugljika i hranjivih sastojaka procjenjuje zajedno (de Sousa Rollemberg i sur., 2019).

Struktura zrelih aerobnih granula podijeljena je u tri zone (Sharma i sur., 2019), s opadajućim gradijentom kisika i supstrata izvana prema središtu granule (Winkler i sur., 2013). Vanjski sloj granule, debljine oko 600 ± 50 μm , čine međusobno povezane aktivne bakterijske stanice koje su u izravnom kontaktu s aerobnim okolišem u reaktoru, (Toh i sur., 2003). Središnji dio granule čini biomasa mrtvih stanica prekrivena anoksično-anaerobnim kontaktnim područjem rastuće bakterijske biomase. Od vanjskog sloja granule prema unutrašnjosti zastupljeni su nitrificirajući mikroorganizmi, potom denitrificirajući i fosfor akumulirajući organizmi (PAOs, engl. *Phosphate Accumulation Organisms*), a prema središtu granule u najvećoj koncentraciji zastupljeni su glikogen akumulirajući mikroorganizmi (GAOs, engl. *Glycogen Accumulating Organisms*). Također, polisaharidi su više zastupljeni u vanjskom sloju granule, a proteini u unutrašnjim slojevima granule (Nancharaiah i Reddy, 2018). Raspodjela mikroorganizama, ugljikohidrata i proteina EPS matrice, te put uklanjanja dušika u granuliranim prikazani su slikom 2.

Na morfologiju granula, koje su sfernog ili eliptičnog oblika, mogu utjecati brojni operativni čimbenici, poput: sastav mikrobne populacije, strategija vođenja procesa, organsko opterećenje supstrata-otpadne vode. Aerobne granule su uglavnom žute, ali mogu biti i crne boje, a boja ovisi o kemijskom sastavu i mikrobnoj populaciji (Zheng i sur., 2006). Važna fizikalna karakteristika aerobnih granula je veličina granula. Prosječni promjer aerobne granule je širokog raspona veličine od 0,2 do najviše 16 mm (Gao i sur., 2011). Granule veličine < 4 mm imaju bolju sposobnost taloženja i gustoću, dok promjer granula > 4 mm može dovesti do smanjenja sposobnosti taloženja i gustoće (Toh i sur., 2003). Predložena je optimalna veličina aerobnih granula, manja od 0,5 mm, zbog najboljih svojstava prijenosa mase unutar granule (Lin i sur., 2005).

Za tvorbu trodimenzionalne matrice – kalupa u koji se mogu ugraditi bakterije odgovorne su ekstracelularne polimerne tvari (EPS), makromolekule koje izlučuju pretežno bakterije pri određenim okolišnim uvjetima. EPS je građen od proteina, lipida, polisaharida, huminske kiseline, nukleinskih kiselina, i drugih tvari u micelarnom obliku. U aerobnoj granuliranoj mikrobnoj stanici i polisaharidi su smješteni

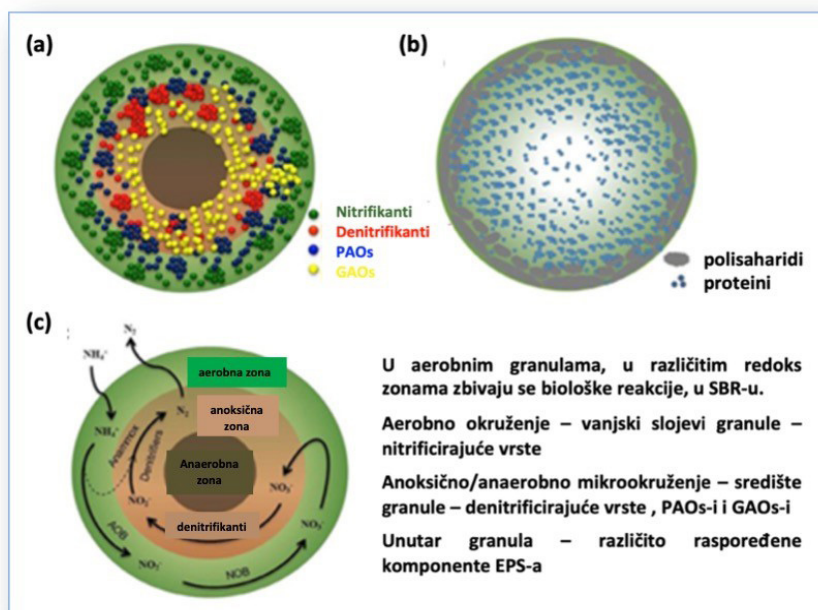
u vanjskom sloju, dok središnji dio granula je bez stanica i uglavnom su prisutni proteini kojima se pripisuje važna uloga u formiranju i stabilnosti aerobnog granuliranog mulja (McSwain i sur., 2005). Distribucija EPS-a unutar aerobne granule ovisi o vrsti supstrata i režimu hranjenja (Gao i sur., 2011). Komponente EPS-a dijele se na: (i) biorazgradive, većinom prisutne u središnjem dijelu granule i (ii) bio-nerazgradive, uočene u drugim slojevima aerobnih granula. Samo bio-nerazgradivi EPS doprinosi stabilnosti aerobne granule.

Važan mehanizam uključen u granulaciju je sofisticirana organizacija koja je u nekim organizmima pod nadzorom komunikacijskog sustava stanica-stanica, poznat kao «osjet kvorum» (QS, engl. *Quorum Sensing*). Važnost QS-a za granulaciju i granularnu stabilnost pokazala su nedavna istraživanja. Čini se da je veća QS aktivnost tijekom granulacije povezana s većom proizvodnjom EPS-a za oblikovanje gela, većom hidrofobnošću, te povećava agregaciju i stabilnost-održavanje granula. Razvoj veličine granule ovisi o kompleksnoj interakciji različitih parametara okoliša i relativno je nekontrolirano. Čini se da granule dosežu veću ili manju stabilnost veličine određeno ravnotežom između rasta, istrošenosti i lomljenja granula, što je posljedica djelovanja hidrodinamičkih sila smicanja (Wilén i sur., 2018).

Definicija granula

Definicija aerobnog granuliranog mulja, koja glasi: «Granule koje čine aerobni granulirani mulj su agregati mikrobnog podrijetla koji se ne združuju pri smanjenom hidrodinamičkom smicanju i znatno se brže talože od aktivnog mulja» donešena je tijekom prve radionice o aerobnom granuliranom mulju održane 2004. godine pod pokroviteljstvom Međunarodnog udruženja za vode (IWA, engl. *International Water Association*). Objasnjenje definicije aerobnog granuliranog mulja (de Kreuk i sur., 2007) dogovoreno je na 2. radionici o aerobnom granuliranom mulju, održanoj 2006. godine u Delftu, Nizozemska, kako slijedi:

(1) nakupine mikrobnog podrijetla: govoreći o granuliranom (zrnatom) aktivnom mulju podrazumijeva se da aerobne granule moraju sadržavati aktivne mikroorganizme i ne mogu se sastojati samo od komponenata



Slika 2. Grafički prikaz: a) raspodjele mikroorganizama; b) ugljikohidrata i proteina EPS matrice; c) put uklanjanja dušika u granuliranim (preuzeto i prilagođeno iz Nancharaiah i Reddy, 2018)

Figure 2. Graphical scheme: a) microorganisms distribution; b) carbohydrates and proteins EPS matrix distribution; c) nitrogen removal pathway, in granula (adapted from Nancharaiah and Reddy, 2018)

mikrobnog podrijetla (poput bjelančevina, EPS itd.). Očekuje se da će populacija mikroba u aerobnom granuliranom mulju biti manje ili više slična onima u aktivnom mulju i/ili biofilmu, tako da u definiciji ne treba opisivati određene skupine mikroorganizama. Nadalje, granule se formiraju bez dodavanja nosača.

(2) pri smanjenom hidrodinamičkom smicanju nema povezivanja mikroorganizama: ovo opisuje razliku u ponašanju između aktivnog mulja i aerobnog granuliranog mulja. Flokule aktivnog mulja se povezuju u veće nakupine kad se talože (kada se miješana tekućina mulja ne prozračuje ili ne miješa), dok se granule ne povezuju i talože se kao zasebne jedinice.

(3) granule se talože znatno brže od aktivnog mulja: to znači da SVI_{10} (engl. *Sludge volume indeks*, indeks taloženja mulja, SVI nakon 10 minuta taloženja) u kombinaciji sa SVI_{30} treba koristiti za karakterizaciju taloživosti granuliranog aktivnog mulja, kako su predložili Schwarzenbeck i sur. (2004). Razlika između vrijednosti SVI_{10} i SVI_{30} je izvrstan pokazatelj formiranja granula i ukazuje na stupanj zadržavanja nakon taloženja.

(4) minimalna veličina granula trebala bi biti takva da biomasa i dalje ispunjava navode točke 3. Minimalna veličina postavljena je na 0,2 mm, što je odlučeno na temelju mjerenja u prošlosti. Ova se granica može prilagoditi prema vrsti granule, sve dok su ispunjeni ostali zahtjevi definicije.

(5) prosijavanje se smatra ispravnom metodom za skupljanje granula iz spremnika aktivnog mulja ili iz reaktora aerobnih granula, što također određuje određenu čvrstoću potrebne matrice za biomasu.

Mikrobni agregat može se nazvati aerobnim granuliranim (zrnatim) muljem kad ispuni sve opisane karakteristike. Na taj način pojednostavljuje se tumačenje eksperimentalnih rezultata i pojašnjava kada treba govoriti o aerobnom granuliranom (zrnatom) mulju, o aktivnom mulju ili o biofilmu.

Fizikalna svojstva aerobnih granula

Fizikalna svojstva aerobnih granula karakteriziraju:

1. struktura i veličina – aerobne granule su kompaktne strukture, velike gustoće. Manje granule imaju veću čvrstoću od većih granula (Show i sur., 2012; Yang i sur., 2004; Toh i sur., 2003), a optimalna veličina granula je 600-800 μm (Verawaty i sur., 2013). Prosječan promjer aerobne granule iznosi između 0,1 i 3,0 mm (Li i sur., 2014a; Abdullah i sur., 2013; Verawaty i sur., 2013; Liu i sur., 2012; Li i sur., 2008), a povezano s prijenosom mase sugerirano je da je optimalna veličina aerobnih granula < 0,5 mm, (Li i sur., 2008). Velike granule su sklonije raspadanju, a male imaju slabiju sposobnost taloženja (Dahalan i sur., 2015). Porastom veličine granula aerobnog mulja povećava se brzina taloženja i gustoća biomase, dok istovremeno dolazi do smanjenja čvrstoće granula, specifične hidrofobnosti i volumnog indeksa mulja (SVI , engl. *Sludge Volume Index*). Nema ograničenja difuzije supstrata kod aerobnih granula dijametra < 0,4 mm, a glavni ograničavajući čimbenik metaboličke aktivnosti aerobnih granula > 0,5 mm je otopljeni kisik. Kod granula veličine 0,5 mm brzina uklanjanja supstrata je tri puta veća u usporedbi s granulama veličine 1 mm. Kompaktna struktura granula i velika brzina taloženja omogućavaju obradu otpadne vode i odvajanje biomase u istom spremniku. Time se omogućava održavanje odgovarajuće retencije biomase u bioreaktoru, i dva do četiri puta veća koncentracija granulirane biomase u usporedbi s postupkom aktivnog mulja (Nancharaiyah i sur., 2019). Doprinos formiranju kompaktne guste strukture aerobnih granula imaju i dvovalentni ioni prisutni u otpadnoj vodi, posebice ioni kalcija, Ca^{2+} i ioni magnezija, Mg^{2+} koji olakšavaju povezivanje ekstracelularnih komponenti i doprinose stabilnosti strukture na način da neutraliziraju negativni naboj na površini mikroorganizama i olakšavaju povezivanje mikroorganizama, doprinose proizvodnji EPS-a i formiranju matriksa – okosnice na koju se bakterije mogu pričvrstiti (Sarma i sur., 2017)

2. poroznost – veličina granule utječe na fiziološka i fizička svojstva

granule, može ograničiti transport i difuziju mase tvari zbog poroznosti strukture koja se smanjuje s porastom veličine granula. Poroznost aerobnih granula određuje dostupnost hranjivih tvari te prodiranje nepoželjnih tvari kao i ograničenja otopljenog kisika (Dahalan i sur., 2015). Pozitivna je korelacija između poroznosti i bioaktivnosti aerobnih granula (Zheng i Yu, 2007; Tay i sur., 2002a). Aerobne granule imaju relativno malu poroznost od 0,68 do 0,93 i smanjuje se s veličinom, dok aktivni mulj uobičajeno ima poroznost veću od 0,95 (Zheng i Yu, 2007).

3. sadržaj vode – u aerobnim granulama je oko 94-97% (Lin i sur., 2005), a aktivni mulj sadrži > 99% vode

4. mehanička čvrstoća – aerobne granule obično imaju dovoljno mehaničke čvrstoće da održe stabilnost zrnatog oblika i strukture. Granule zbog čvrstoće mogu podnijeti visoku abraziju i smične sile (Show i sur., 2012; Tay i sur., 2002b)

5. specifična težina – aerobnih granula je u rasponu 1,04-1,1 kg suhe tvari/ m^3 (Shi i sur., 2009; Zheng i sur., 2005)

6. oblik – aerobne granule su jasnih vanjskih linija, sferičnog ili eliptičnog oblika. Oblik granula ovisi o procesnim čimbenicima, poput: sastav mikrobnog populacije, strategija vođenja procesa, kakvoća supstrata, organsko opterećenje otpadne vode (Gao i sur., 2011). Uobičajeno su aerobne granule žute ali mogu biti i crne boje što ovisi o supstratu i mikrobnim vrstama u populaciji (Zheng i sur., 2006)

7. svojstvo taloženja – brzina taloženja aerobnih granula je u rasponu od 18-90 m/sat, i do 130 m/sat (Shi i sur., 2009; Zheng i sur., 2005), ovisi o veličini i gustoći granula (Gao i sur., 2011)

Svojstva taloženja se kvantificiraju prema vrijednosti volumnog indeksa mulja (SVI , engl. *Sludge Volume Index*), koji definira volumen (mL) koji zauzima 1 g mulja nakon 30 minuta taloženja. Li i sur. (2006) odredili su vrijednosti SVI_{30} od 20 do 40 mL/g, te su predložili da se za opisivanje brzine taloženja aerobno granuliranog mulja određuje SVI_{10} , odnosno za granulirane sustave SVI_{30} je revidiran do SVI_5 (vrijeme taloženja 5 minuta) budući je vrijednost SVI_5 slična SVI_{30} (Nancharaiyah i sur., 2019).

Kemijska svojstva aerobnih granula

Kemijska svojstva aerobnih granula karakteriziraju:

1. Hidrofobnost površine aerobnih granula – važan čimbenik za inicijaciju razvoja granula (Show i sur., 2012; Liu i sur., 2004b; Qin i sur., 2004). Tijekom granulacije biomasa postaje sve više hidrofobna. Na hidrofobnost površine aerobnih granula utječe više čimbenika, kao što su: organsko opterećenje, EPS, odnosno metabolički produkti stanice i smične sile (Show i sur., 2012; Liu i sur., 2004b).

Povećanje omjera protein/polisaharid u granulama smanjuje negativni naboj na površini granula, što bi trebalo dovesti do smanjene elektrostatske odbojnosti između bakterijskih stanica i time poboljšati granulaciju (Wilén i sur., 2018). Qin i sur. (2004) otkrili su da je hidrofobnost stanične površine granula za 2,5 do 3,5 puta veća u odnosu na aktivni mulj. Vanjski sloj aerobnih granula je veće hidrofobnosti od jezgre granula (Wang i sur., 2005). Formiranjem granuliranog mulja iz aktivnog mulja u SBR reaktoru hidrofobnost površine stanice povećala se od 43,2% na oko 78,2% (Zhang i sur., 2007). Povećanjem smičnih sila povećava se i hidrofobnost površine (Show i sur., 2012; Liu i sur. 2004b). Osim toga, veće smične sile mogu djelovati stimulirajuće na respiraciju aerobnih mikroorganizama (Show i sur., 2012; Tay i sur., 2001) te pogoduju formiranju kompaktnijih i čvršćih granula (Show i sur., 2012; Liu i Tay, 2002). Tay i sur. (2003) dokazali su postojanje proporcionalnih odnosa između smičnih sila i taloženja, gustoće i mehaničke čvrstoće aerobnih granula. Također, omjer polisaharida i proteina u mulju značajno se povećava sa smičnom silom. Veća smična sila potiče proizvodnju više polisaharida u usporedbi s proteinima, a stanični polisaharidi pogoduju kompaktnoj strukturi i stabilnosti zrnatog mulja (Liu i Tay, 2004).

2. Ekstracelularne polimerne tvari (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*) – akumuliraju se na površini bakterija, mogu utjecati na promjenu hidrofobnosti i druge fizikalno kemijske osobine stanične površine. EPS su izvanstanični proizvodi bakterijskog metabolizma,



Ijepljivi organski polimeri koji sadrže proteine, polisaharide, lipide, nukleinske kiseline i druge tvari te omogućavaju udruživanje bakterija u veće nakupine u prvim koracima procesa formiranja granula (Gao i sur., 2011; Lee i sur., 2010; Liu i sur. 2004b; Tay i sur. 2001; Schmidt i Ahring, 1994). Jezgra aerobnih granula sadrži veću količinu EPS i to biorazgradivog, za razliku od vanjskog sloja koji sadrži manju količinu EPS. U vanjskom je sloju aerobnih granula prisutan nerazgradivi EPS koji pridonosi stabilnosti granula (Wang i sur., 2005).

Biošoka svojstva aerobnih granula

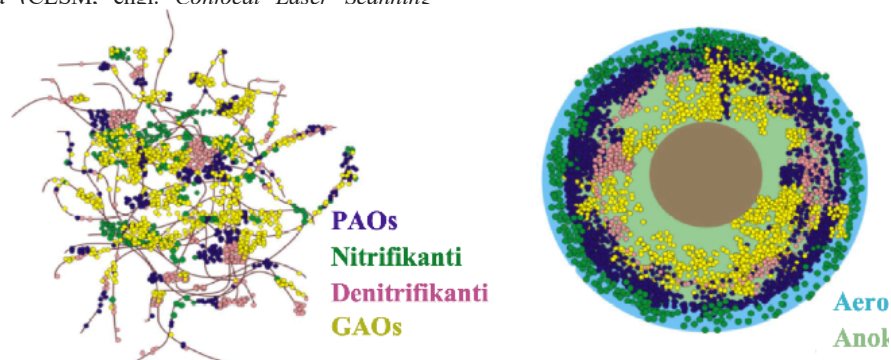
Raznovrsnost mikrobne zajednice i dominantne bakterijske vrste u njoj ovise o izvoru ugljika (Lee i sur., 2010; Liu i Tay, 2004; Tay i sur., 2001). Mikrobnu zajednicu aerobnih granula mogu činiti svega nekoliko specifičnih vrsta ili vrlo raznolika mikrobiološka zajednica, ovisno o sastavu inokuluma, sastavu otpadne vode, procesnih i okolišnih čimbenika, poput: redoks uvjeti, vrijeme taloženja, koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved Oxygen*), organsko opterećenje (OLR, engl. *Organic Loading Rate*) (Wilén i sur., 2018). U flokuliranom i granuliranom mulju prisutne su iste skupine mikroorganizama, razlika je u omjeru na razini reda ili razreda, iako se smatralo da je mikrobna struktura aerobnog granuliranog mulja raznovrsnija od flokuliranog mulja zbog gradijenta supstrata unutar granule koji osigurava različite ekološke niše (Winkler i sur., 2013; Gao i sur., 2011). Većina vrsta bakterija u granuliranom i flokuliranom mulju pripada rodovima: β -Proteobacteria, Sphingobacteria i *Flavobacteria* (Zhou i sur., 2014), dok su u aerobnom granuliranom mulju količine β -Proteobacteria, δ -Proteobacteria, *Flavobacteria* i *Cytophagia* znatno povećane (Świątczak i Cydzik-Kwiatkowska, 2018). Mikrobna struktura aerobnih granula istraživana je pomoću svjetlosnog mikroskopa, skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, engl. *Scanning Electron Microscope*), konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa (CLSM, engl. *Confocal Laser Scanning*

Microscope) i molekularno citogenetičke metode, FISH analize (engl. *Fluorescent in Situ Hybridization*) (Adav i sur. 2008; Lee i sur., 2010; Yi i sur., 2003; Tsuneda i sur., 2003). U strukturi granula prisutne su i koegzistiraju različite funkcionalne skupine mikroorganizama (Winkler i sur., 2013), aerobnih i anaerobnih metaboličkih aktivnosti (Li i sur., 2014b; Yilmaz i sur., 2008; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b). Na mikrobnu raznolikost utječe i postupak ispiranja biomase tijekom formiranja granula, a rodovi bakterija zastupljeni u ispranoj biomasi slični su bakterijama prisutnim u granuliranom mulju (Szabó i sur., 2017).

Usporedba aerobnog granuliranog mulja i flokuliranog mulja

Brojne su prednosti primjene aerobnog granuliranog mulja nad flokuliranim muljem, poput: održavanje različitih redoks okruženja, dobra svojstva taloženja, veliko zadržavanje biomase, podnošenje velikog organskog opterećenja zbog jedinstvene zrnate strukture i velike koncentracije biomase u reaktoru kao i primjena u obradi različitih vrsta otpadnih voda, manji kapitalni, odnosno investicijski i operativni troškovi jer nema potrebe za taložnikom i manji je utrošak energije (Nancharai i sur., 2019; Nancharai i Reddy, 2018; Gao i sur., 2011; Moy i sur., 2002). Znatne razlike u koncentraciji i raspodjeli proteina i polisaharida EPS-a pokazale su *in-situ* mikroskopske i *ex-situ* kemijske analize flokuliranog i aerobnog granuliranog mulja (Seviour i sur., 2010; McSwain i sur., 2005). Više proteina nego ugljikohidrata je prisutno kod aerobnog granuliranog mulja, a također sadržaj proteina u EPS-u aerobnog granuliranog mulja je 50% veći u usporedbi s flokuliranim aktivnim muljem.

Strukturne i funkcionalne razlike aerobnog granuliranog i flokuliranog mulja prikazane su slikom 3 (Winkler i sur., 2013).



Funkcionalnost sustava: Po funkcionalnosti mikrobne zajednice oba sustava su aerobnim uvjetima se prevodi $\text{NH}_4\text{-N}$ u $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ (nitrifikacija), a u anoksičnim organske donore elektrona $\text{NO}_3\text{-N}$ se reducira do plinovitog N_2 (denitrifikacija). Pr anaerobno-aerobnim uvjetima uklanja se fosfat.

Flokulirani mulj: U konvencionalnom sustavu obrade recikliranjem kroz različite mulj se podvrgava aerobnim i anaerobnim uvjetima i različitoj dostupnosti supstrata su sve bakterije podjednako izložene posmičnom naprezanju i koncentraciji supstrata

Granulirani mulj: Unutar granule u različitim slojevima, u jednom reaktoru u uvjetima aerobnim i anaerobnim u SBR-u, zbivaju se sve pretvorbe. Bakterije su razložene granule: nitrifikanti u vanjskom aerobnom sloju, denitrifikanti i PAOs u anoksičnim slojevima. Veliko zadržavanje biomase selektira spororastuće organizme

Slika 3. Strukturne i funkcionalne razlike između flokuliranog aktivnog mulja i aerobnog granuliranog mulja (preuzeto i prilagođeno iz Winkler i sur., 2013)

Figure 3. Structural and functional differences between flocculated activated sludge and aerobic granular sludge (adapted from Winkler et al., 2013)

Karakteristike aerobnog granuliranog i flokuliranog aktivnog mulja istaknute su u tablici 1 (Nancharaiah i Reddy, 2018).

Zaključci

AGS tehnologiju karakterizira kompaktna mikroba struktura i velika brzina taloženja mikrobnog biomase a zbog učinkovite obrade otpadne vode, smanjene potrebe za prostorom i nižih troškova procesa smatra se poželjnom metodom obrade. Aerobne granule se formiraju samoudruživanjem mikroorganizama različitih i specifičnih uloga u razgradnji organskih spojeva i nutrijenata iz otpadne vode. Struktura i veličina granula su ključni čimbenici provođenja sustava obrade otpadne vode aerobnim granulama. Daljnje istraživanje i razvoj treba usmjeriti ka stjecanju spoznaja o temeljnim principima razvoja granula i održavanja njihove stabilnosti. AG tehnologija daje doprinos u smanjenju okolišnog otiska i predstavlja novi standard biološke obrade gradskih i industrijskih otpadnih voda.

Tablica 1. Karakteristike aerobnog granuliranog i flokuliranog mulja (preuzeto i prilagođeno iz Nancharaiah i Reddy, 2018; Nancharaiah i sur., 2019)

Table 1. Characteristic of aerobic granular and floccular sludge (adapted from Nancharaiah and Reddy, 2018; Nancharaiah et al., 2019)

Parametar	Flokulirani mulj	Granulirani mulj	Opaska
oblik i prosječna veličina	nepravilan oblik; < 0,2 mm	milimetarske granule sferičnog oblika, > 0,2 mm	veći promjer granula, uz gustoću omogućava brzo taloženje u uvjetima mirovanja
mikrostruktura	labava i flokulentna	gusta i kompaktna	kompaktna struktura i velika gustoća granula omogućava dobro odvajanje biomase od obrađene vode i zadržavanje biomase u reaktoru
specifična težina	0,997-1,01	1,010-1,017	aerobne granule s većom specifičnom težinom omogućavaju brže odvajanje od obrađene vode
brzina taloženja	manja brzina taloženja, < 10 m/h	veće brzine taloženja, > 10 m h ⁻¹ (oko 90 m/h)	aerobne granule se samostalno talože, bez obzira na vanjske utjecaje
volumni indeks mulja - SVI	> 100 mL/g	< 50 mL/g	
SVI ₅ i SVI ₃₀	SVI ₅ ≠ SVI ₃₀	SVI ₅ = SVI ₃₀	izvršna svojstva taloženja, omogućavaju mjerenje SVI ₅
mikrookolina – slojevita struktura; aerobne, anoksične i anaerobne faze	minimalna mogućnost za postojanje anaerobne regije	postojanje aerobne, anoksične i anaerobne regije u milimetarskim granulama aerobnog mulja	prisutnost različitih redoks uvjeta u granulama omogućava provedbu oksidacijskih i redukcijskih reakcija
EPS	manji udio EPS	veći udio EPS	EPS ima važnu ulogu u razvoju, stabilnosti i funkcionalnosti granula
tolerancija prema toksičnim tvarima	manja tolerancija prema toksičnim tvarima	veća tolerancija prema toksičnim tvarima	AGS, vrsta biofilma veće tolerancije prema toksičnim tvarima

Literatura

- Abdullah N., Yuzir A., Curtis T.P., Yahya A., Ujang Z. (2013) Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresource Technology*, 127 181-187.
- Adav S.S., Lee D.J., Show K.Y., Tay J.H. (2008) Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnology Advances*, 26 411-423.
- Cydzik-Kwiatkowska A., Bernat K., Zielińska M., Wojnowska-Baryła I. (2014) Cycle length and COD/N ratio determine properties of aerobic granules treating high-nitrogen wastewater. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 37 1305-1313.
- Dahalan F.A., Abdullah N., Yuzir A., Olsson G., Salmiati Hamdazah M., Din M.F.M., Ahmad S.A., Khalil K.A., Anuar A.N., Noor Z.Z., Ujang Z. (2015) A proposed aerobic granules size development scheme for aerobic granulation process. *Bioresource Technology*, 181 291-296.
- de Kreuk M.K., Heijnen J.J., van Loosdrecht M.C.M. (2005a) Simultaneous COD, nitrogen and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 90 761-769.
- de Kreuk M.K., McSwain B.S., Bathe S., Tay J., Schwarzenbeck S.T.L., Wilderer P.A. (2005b) Aerobic granular sludge, water and environmental management series. *Munich: IWA Publishing*: 165-169.
- de Kreuk M.K., Kishida N., van Loosdrecht M.C.M. (2007) Aerobic granular sludge – state of the art. *Water Science and Technology*, 55 75-81.
- de Sousa Rollemberg S.L., de Oliveira L.Q., Barros A.R.M., Melo V.M.M., Firmino P.I.M., Santos A.B.D. (2019) Effects of carbon source on the formation, stability, bioactivity and biodiversity of the aerobic granule sludge. *Bioresource Technology*, 278 195-204.
- Franca R.G.D., Pinheiro H.M., van Loosdrecht M.C.M., Lourenço N.D. (2018) Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. *Biotechnology Advances*, 36 (1) 228-246.
- Gao D., Liu L., Liang H., Wu W.M. (2011) Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31 (2) 137-152.
- Kent T.R., Bott C.B., Wang Z.-W. (2018) State of the art of aerobic granulation in continuous flow bioreactors. *Biotechnology Advances*, 36 (4) 1139-



- 1166.
- Lee D.J., Chen Y.Y., Show K.Y., Whiteley C.G., Tay J.H. (2010) Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. *Biotechnology Advances*, 28 919-934.
- Li Z.H., Kuba T., Kusuda T. (2006) Aerobic granular sludge: a promising technology for decentralised wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 53 (9) 79-85.
- Li Y., Liu Y., Shen L., Chen F. (2008) DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(34) 349-354.
- Li J., Ding L.B., Cai A., Huang G.X., Horn H. (2014a) Aerobic Sludge Granulation in a Full – Scale Sequencing Batch Reactor. *BioMed Research International*, 2014, Article ID 268789
- Li Y., Zou J., Zhang L., Sun J. (2014b) Aerobic granular sludge for simultaneous accumulation of mineral phosphorus and removal of nitrogen via nitrite in wastewater. *Bioresource Technology*, 154 178-184.
- Lin L.H., Jian L.W., Xiang H.W., Yi Q. (2005) The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules. *Process Biochemistry*, 40 1-7.
- Liu Y., Yang S. Y., Tay J.H., Liu Q.S., Qin L., Li Y. (2004b) Cell hydrophobicity is triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 34 371-379
- Liu Y., Yang S.F., Tay J.H. (2004a) Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *Journal of Biotechnology*, 108 161-169
- Liu Y.Q., Moy B.Y.P., Tay J.H. (2007) COD removal and nitrification of low-strength domestic wastewater in aerobic granular sludges sequencing batch reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (1) 23-28.
- Liu H., Li Y., Yang C., Pu W., He L., Bo F. (2012) Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane. *Bioresource Technology*, 121 111-118.
- Liu X-W., Sheng G-P., Yu H-Q. (2009) Physicochemical characteristics of microbial granule. *Biotechnology Advances*, 27 1061-1070.
- Liu Y., Tay J.H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36 (7) 1653-1665.
- Liu Y., Tay J.H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 34 533-563.
- Liu Y.Q., Tay J.H. (2008) Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 99 980-985.
- McSwain B.S., Irvine R.L., Hausner M., Wilderer P.A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 1051-1057.
- Moy B.Y.P., Tay J.H., Toh S.K., Liu Y., Tay S.T.L. (2002) High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Letters in Applied Microbiology*, 34 (6) 407-412.
- Nancharaiyah Y.V., Reddy K.K.G. (2018) Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresource Technology* 247 1128-1143.
- Nancharaiyah Y.V., Sarvajith M., Mohan T. K. (2019) Aerobic granular sludge: the future of wastewater treatment. *Current Science*, 117 (3) 395-404.
- Qin L., Tay J.H., Liu Y. (2004) Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Process Biochemistry*, 39 579-584.
- Sarma S.J., Tay J.H., Chu A. (2017) Finding knowledge gaps in aerobic granulation Technology. *Trends in biotechnology*, 35 66-78.
- Sarma S.J., Tay J.-H. (2018) Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38 1077-1088.
- Schmidt J.E., Ahring B.K. (1994) Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42 457-462.
- Schwarzenbeck N., Erley R., McSwain B.S., Wilderer P.A., Irvine R.I. (2004) Treatment of malting wastewater in a granular sludge sequencing batch reactor (SBR). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 32 16-24.
- Seviour T.W., Lambert L.K., Pijuan M., Yuan Z. (2010) Structural determination of a key exopolysaccharide in mixed culture aerobic granules using NMR spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 44 8964-8970.
- Sharma S., Sarma S.J., Tay J.H. (2019) Aerobic Granulation in Wastewater Treatment. U: Microbial Wastewater Treatment, Elsevier Inc., 57-81.
- Shi Y-J., Wang X-H., Yu H-B., Xie H-J., Teng S-X., Sun X-F., Tian B-H., Wang S-G. (2009) Aerobic granulation for nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor and emission of nitrous oxide. *Bioresource Technology*, 102 2536-2541.
- Show K. Y., Lee D. J., Tay J. H. (2012) Aerobic Granulation: Advances and Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167 1622-1640.
- Świąteczak P., Cydzik-Kwiatkowska A. (2018) Performance and microbial characteristics of biomass in a full-scale aerobic granular sludge wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 1655-1669.
- Szabó E., Liébana R., Hermansson M., Modin O., Persson F., Wilén B.M. (2017) Comparison of the bacterial community composition in the granular and the suspended phase of sequencing batch reactor. *AMB Express*, 7 168.
- Tay J. H., Liu Q. S., Liu Y. (2003) Shear force influences the structure of aerobic granules cultivated in sequencing batch reactor. 5th International conference of biofilm systems, 14-19 September, Cape Town, South Africa.
- Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y. (2001) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, 33 222-226.
- Tay J.H., Ivanov V., Pan S. (2002a) Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Letters in Applied Microbiology*, 34 254-257
- Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y. (2002b) Characteristics of aerobic granules grown on glucose and acetate in sequential aerobic sludge blanket reactors. *Environmental Technology*, 23 931-936.
- Toh S.K., Tay J.H., Moy B.Y.P., Ivanov V., Tay S.T.L. (2003) Size - effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 687-695.
- Tsuneda S., Nagano T., Hoshino T., Noda N., Hirata A. (2003) Characterization of nitrifying granules produced in aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Research*, 37 4965-4973.
- Verawaty M., Tait S., Pijuan M., Yuan Z., Bond P.L. (2013) Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research*, 47 5338-5349.

- Wang Z.W., Liu Y., Tay J.H. (2005) Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 469-473.
- Wang S.G., Gai L.H., Zhao L.J., Fan M.H., Gong W.X., Gao B.Y., Ma Y. (2009) Aerobic granules for low-strength wastewater treatment: formation, structure, and microbial community. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84 1015-1020.
- Wilén B.M., Liébana R., Persson F., Modin O., Hermansson M. (2018) The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (12) 5005-5020.
- Winkler M.K.H., Kleerebezem R., de Bruin L. M., Verheijen P.J., Abbas B., Habermacher J., van Loosdrecht M.C.M. (2013) Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 7447-7458.
- Yae J., Ryu J., Van Tuyen N., Kim H., Hong S., Ahn D. (2019) An aerobic granular sludge process for treating low carbon/nitrogen ratio sewage. *Environmental Engineering Research*, 24 238-245.
- Yang S.F., Liu Q.S., Tay J.H., Liu Y. (2004) Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactors. *Letters in Applied Microbiology*, 38 106-112.
- Yi S., Tay J.H., Maszenan A.M., Tay S.T.L.A. (2003) Culture-independent approach for studying microbial diversity in aerobic granules. *Water Science and Technology*, 47 283-290.
- Yilmaz G., Lemaire R., Keller J., Yuan Z. (2008) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 100 529-541.
- Zhang L.L., Zhang B., Huang Y.F., Cai W.M. (2005) Re-activation characteristics of preserved aerobic granular sludge. *Journal of Environmental Science*, 17 655-658.
- Zhang L., Feng X., Zhu N., Chen J. (2007) Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, 41 551-557.
- Zheng Y.M., Yu H.Q., Sheng G.P. (2005) Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry*, 40 (2) 645-650.
- Zheng Y. M., Yu H. Q., Liu S. J., Liu X. Z. (2006) Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere*, 63 1791-1800.
- Zheng Y.M., Yu H.Q. (2007) Determination of the pore size distribution and porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. *Water Research*, 41 39-46.
- Zhou D., Niu S., Xiong Y., Yang Y., Dong S. (2014) Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: Dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. *Bioresource Technology*, 161 102-108.