

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA – INŻYNIERIA ŚRODOWISKA, GÓRNICTWO
I ENERGETYKA

DZIEDZINA NAUK - NAUKI INŻYNIERYJNO-TECHNICZNE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Olga Zając

**Analiza wpływu naprzemiennego napowietrzania na przebieg
i efektywność procesu nitryfikacji w reaktorach ze złożem
ruchomym**

Promotor

dr hab. inż. Monika Żubrowska-Sudoł, prof. uczelni

WARSZAWA 2024

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
Pani dr hab. inż. Monice Żubrowskiej-Sudoł, prof. PW.
Dziękuję za całą wiedzę, którą mi Pani przekazała oraz wprowadzenie mnie w świat nauki.
Za cierpliwość, zrozumienie i nieustające zachęty do pogłębiania wiedzy,
a także za to, że zawsze we mnie Pani wierzyła i motywowała do pokonywania kolejnych wyzwań.*

*Serdeczne podziękowania za wspólną pracę nad publikacjami kieruję również do
Pana prof. dr hab. inż. Sławomira Ciesielskiego,
Pani dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej, prof. UWM
oraz mgr inż. Martyny Godzieby.
Wasza wiedza, doświadczenie i wsparcie
znacząco przyczyniły się do powstania tej pracy.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom Zakładu Zaopatrzenia w Wodę i Odprowadzania Ścieków
oraz wspieranym Studentom, którzy realizowali badania w laboratorium 527.
Wasza pomoc, zaangażowanie, uśmiech i cenne rady były dla mnie nieocenione.*

*Z całego serca dziękuję mojej kochanej Mamie, Babciom, Dziadkowi i Bratu
za wasze nieustające wsparcie i wiarę w moje możliwości, nawet wtedy, gdy sama w siebie wątpiłam.
Bez waszej miłości i wyrzeczeń nigdy nie dotarłabym do miejsca, w którym teraz jestem!*

*Dziękuję wszystkim moim Bliskim,
a w szczególności Weronice, Alicji i Hubertowi.
Dziękuję za to, że byliście dla mnie oparciem w każdej sytuacji i motywowaliście mnie do działania.
Wasza przyjaźń, obecność i wsparcie dodawały mi sił w trudnych momentach.
Bez Was ta droga byłaby znacznie trudniejsza.*

*Mojemu Michałowi,
za wsparcie, cierpliwość, miłość
i wyrozumiałość dla mojej nieobecności w Naszym życiu.
Dziękuję, że byłeś przy mnie w każdej chwili tej wymagającej podróży
i pomagałeś mi zachować równowagę między pracą a życiem prywatnym.*

STRESZCZENIE

Przedmiotem dysertacji była analiza przebiegu i efektywności procesu nitryfikacji w sekwencyjnych reaktorach porcjowych ze złożem ruchomym, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu strategii napowietrzania (zdefiniowanej stosunkiem czasu trwania podfaz bez i z napowietrzaniem oraz stężeniem tlenu) i formy, w jakiej biomasa rozwijała się w reaktorach (błona biologiczna, osad czynny). W pracy zdefiniowano następujące cele cząstkowe: 1) analiza wpływu strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji, przy uwzględnieniu różnych konfiguracji pracy reaktorów ze złożem ruchomym (czysta i hybrydowa); 2) określenie wpływu wykształcenia biomasy w postaci osadu czynnego w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego na efektywność oczyszczania ścieków; 3) analiza wpływu różnych wariantów strategii napowietrzania na zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie; 4) określenie wpływu temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nitryfikacji; 5) analiza przebiegu i efektywności procesu nitryfikacji podczas przekształcenia hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym do zintegrowanego usuwania związków C, N i P na nitryfikacyjny reaktor pracujący w czystej technologii złoża ruchomego w warunkach ciągu bocznego. Badania przeprowadzono w laboratoryjnych modelach sekwencyjnych reaktorów porcjowych o objętości czynnej 28 l. Jako nośniki biomasy wykorzystano złożo ruchome EvU-Pearl® o powierzchni czynnej 600 m²/m³. Zakres badań obejmował: analizę jakości ścieków dopływających i odpływających z reaktorów (ChZT, BZT₅, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, N_{og}, P_{og}, P-PO₄³⁻, pH, zasadowość), testy szybkości utleniania azotu amonowego, testy szybkości utleniania azotu azotynowego, pomiar emisji N₂O, ilościową reakcję łańcuchową polimerazy oraz sekwencjonowanie nowej generacji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że strategia napowietrzania była istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność i liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych, determinując uzyskanie porównywalnej efektywności procesu nitryfikacji przy różnym zapotrzebowaniu na energię elektryczną na proces napowietrzania, wpływając dodatkowo na wielkość emisji N₂O. Wykazano, że bakterie Comammox odgrywają kluczową rolę w nitryfikacji, a wielkość ich populacji może przewyższać liczebność kanonicznych bakterii AOB. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły również na wyznaczenie współczynnika korekcji temperatury dla reaktora hybrydowego, który może znaleźć praktyczne zastosowanie w projektowaniu i optymalizacji systemów oczyszczania ścieków.

Słowa kluczowe: błona biologiczna, nitryfikacja, osad czynny, strategia napowietrzania, złożo ruchome

ABSTRACT

This dissertation focuses on the analysis of the course and efficiency of the nitrification process in moving bed biofilm reactors, with particular attention to the impact of different aeration strategies (defined by the ratio between non-aerated and aerated subphases' time, and dissolved oxygen concentration) and the form of biomass development in the reactors (biofilm vs. activated sludge). The research aimed to achieve the following key objectives: 1) to assess how aeration strategies influence the course and efficiency of the nitrification process in various moving bed reactor configurations (pure or hybrid); 2) to evaluate the effect of activated sludge development in a pure moving bed reactor on wastewater treatment efficiency; 3) to analyse the impact of different aeration strategies on energy use for aeration; 4) to investigate how temperature affects the rates of particular stages of the nitrification process; 5) to examine how mainstream-sidestream switching affected the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria (shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor). The experiments were conducted in laboratory-scale sequencing batch reactors with an active volume of 28 litres, using EvU-Pearl® moving bed media with a specific surface area of 600 m²/m³ as biomass carriers. The scope of the research included an analysis of wastewater influent and effluent quality (COD, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, N_{og}, P_{og}, P-PO₄³⁻, pH, alkalinity), ammonia utilization rate tests, nitrite utilization rate tests, N₂O emission measurements, quantitative polymerase chain reaction and next-generation sequencing. The results indicated that the aeration strategy was a key factor affecting the activity and abundance of particular groups of nitrifying microorganisms, enabling comparable nitrification performance at varying energy consumption for aeration, while also affecting N₂O emissions. It was demonstrated that Comammox bacteria play an important role in nitrification, dominating even the canonical AOB. Additionally, a temperature correction coefficient was proposed, applicable in hybrid wastewater treatment systems, which could be practically used in the design and optimization of wastewater treatment systems.

Keywords: activated sludge, aeration strategy, biofilm, moving bed, nitrification

SPIS TREŚCI

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW	9
1. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	11
2. PRZEDMIOT PRACY	13
3. WPROWADZENIE.....	14
3.1. Wstęp – oczyszczanie ścieków, jego znaczenie i wyzwania.....	14
3.2. Technologia złoża ruchomego.....	18
3.2.1. Od czego to wszystko się zaczęło i w jakim kierunku zmierza?	18
3.2.2. Rodzaje ruchomych nośników	20
3.2.3. Podział reaktorów ze złożem ruchomym	24
3.2.4. Zalety i wady technologii złoża ruchomego	24
3.3. Znaczenie procesu nitrifikacji w oczyszczaniu ścieków	25
3.3.1. Podstawy teoretyczne.....	25
3.3.2. Czynniki wpływające na przebieg i efektywność procesu nitrifikacji	29
3.4. Strategia napowietrzania: znaczenie dla efektywnej nitrifikacji i redukcji zużycia energii w oczyszczalniach ścieków	34
3.5. Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie	39
3.6. Nitrifikacja a emisja N_2O	42
4. METODYKA BADAWCZA.....	47
4.1. Koncepcja realizacji pracy badawczej.....	47
4.2. Charakterystyka stanowisk badawczych	58
4.3. Charakterystyka złoża ruchomego	60
4.4. Metodyka wyznaczania szybkości utleniania azotu amonowego.....	60
4.5. Metodyka wyznaczania szybkości utleniania azotu azotynowego	61
4.6. Metodyka analityczna.....	62
4.7. Metodyka obliczeniowa.....	62
4.7.1. Efektywność jednostkowych procesów usuwania ze ścieków związków węgla, azotu i fosforu.....	62
4.7.2. Wskaźniki wyznaczone na podstawie wyników porcjowych testów szybkości utleniania azotu amonowego	63
4.7.3. Wskaźniki wyznaczone na podstawie wyników porcjowych testów szybkości utleniania azotu azotynowego.....	64
4.7.4. Współczynnik korekcji temperatury	64
4.7.5. Emisja podtlenku azotu.....	65
4.7.6. Zużycie energii na napowietrzanie.....	65
4.7.7. Wartości stężenia wolnego amoniaku i wolnego kwasu azotowego (III).....	66
4.8. Analiza statystyczna	66

5. OMÓWIENIE ZAGADNIEŃ BADAWCZYCH.....	67
5.1. Zagadnienie nr 1: Wpływ strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji w reaktorach ze złożem ruchomym	67
5.1.1. Czysta technologia złoża ruchomego.....	68
5.1.2. Hybrydowa technologia złoża ruchomego.....	70
5.2. Zagadnienie nr 2: Wpływ wykształcenia biomasy w postaci osadu czynnego w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego na efektywność oczyszczania ścieków, ze szczególnym uwzględnieniem procesu nitryfikacji	74
5.3. Zagadnienie nr 3: Wpływ strategii napowietrzania na zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie.....	79
5.4. Zagadnienie nr 4: Wpływ temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nitryfikacji	82
5.5. Zagadnienie nr 5: Wpływ modyfikacji parametrów pracy reaktora na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji. Przekształcenie hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym (IFAS-MBSBBR) do zintegrowanego usuwania związków węgla, azotu i fosforu w głównym ciągu oczyszczania ścieków na nitryfikacyjny reaktor pracujący w czystej technologii złoża ruchomego (MBSBBR) w warunkach ciągu bocznego	85
5.5.1. Zmiany aktywności i liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych w odpowiedzi na zmiany parametrów technologicznych pracy reaktora	86
5.5.2. Bakterie Comammox – występowanie w głównym i bocznym ciągu oczyszczania ścieków	90
6. WNIOSKI.....	92
7. BIBLIOGRAFIA	96
8. SPIS TABEL	111
9. SPIS RYSUNKÓW I ZDJĘĆ	111
PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ.....	113
Publikacja nr 1.....	115
Publikacja nr 2.....	159
Publikacja nr 3.....	197
Publikacja nr 4.....	231
Publikacja nr 5.....	291
Publikacja nr 6.....	317

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

A/O – ang. *anoxic-oxic* – układ anoksyczno-tlenowy

A2/O – ang. *anaerobic-anoxic-oxic* – układ beztlenowo-anoksyczno-tlenowy

AMO – monooksygenaza amonowa

AOA – ang. *ammonia oxidizing archaea* – archeony utleniające amoniak

AOB – ang. *ammonia oxidizing bacteria* – bakterie utleniające azot amonowy

AOR – ang. *ammonia oxidation rate* – szybkość utleniania azotu amonowego

AS – ang. *activated sludge* – osad czynny

AUR – ang. *ammonia utilization rate test* – test szybkość utleniania azotu amonowego

B – błona biologiczna

Comammox – ang. *complete ammonia oxidizing bacteria* – bakterie zdolne do utleniania azotu amonowego do azotu azotanowego

DO – ang. *dissolved oxygen* – stężenie tlenu rozpuszczonego

E_o – zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie

FA – ang. *free ammonia* – wolny amoniak

FNA – ang. *free nitrous acid* – wolny kwas azotowy (III)

H – hybryda

HAO – oksydoreduktaza hydroksyloaminy

HNAD – ang. *heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria* – bakterie zdolne do przeprowadzenia heterotroficznej nitryfikacji połączonej z autotroficzną denitryfikacją

HNB – ang. *heterotrophic nitrification bacteria* – bakterie zdolne do przeprowadzenia heterotroficznej nitryfikacji

IFAS-MBSBBR – ang. *integrated fixed-film activated sludge-moving-bed sequencing batch biofilm reactor* – hybrydowy sekwencyjny reaktor porcjowy ze złożem ruchomym

MBBR – ang. *moving bed biofilm reactor* – reaktor ze złożem ruchomym

MBSBBR – ang. *moving bed sequencing batch biofilm reactor* – sekwencyjny reaktor porcjowy ze złożem ruchomym

N – nitryfikacja

N/D – nitryfikacja/denitryfikacja

NGS – ang. *next-generation sequencing* – sekwencjonowanie nowej generacji

NIR – reduktaza azotynowa

NitOR – ang. *nitrite oxidation rate* – szybkość utleniania azotu azotynowego

NitUR – ang. *nitrite utilization rate test* – test szybkości utleniania azotu azotynowego

NLR – obciążenie reaktora ładunkiem azotu

NOB – ang. *nitrite oxidizing bacteria* – bakterie utleniające azot azotynowy

NOR – reduktaza tlenku azotu

NXR – oksydoreduktaza azotynowa

OLR – obciążenie reaktora ładunkiem związków organicznych

PCV – polichlorek winylu

qPCR – ang. *quantitative polymerase chain reaction* – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

R – stosunek czasu trwania podfaz bez (t_2) i z (t_1) napowietrzaniem

SBR – ang. *sequencing batch reactor* – sekwencyjny reaktor porcjowy

SND – ang. *simultaneous nitrification and denitrification* – symultaniczna nitryfikacja i denitryfikacja

SRT – ang. *solids retention time* – wiek biomasy

θ – współczynnik korekcji temperatury

1. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niniejsza rozprawa doktorska składa się ze zbioru sześciu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Poniżej przedstawiono zestawienie tych publikacji, wraz z przypisanymi oznaczeniami, którymi posługiwano się w dalszej części opracowania:

❖ Publikacja nr 1 – P1

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor - A Long-Term Study. *Water*, 16 (4), 534, <https://doi.org/10.3390/w16040534>. **IF: 3,00; punkty MNiSW: 100**

❖ Publikacja nr 2 – P2

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Ciesielski, S., Godzieba, M. (2022). Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water*, 14 (1), 72, <https://doi.org/10.3390/w14010072>. **IF: 3,40; punkty MNiSW: 100**

❖ Publikacja nr 3 – P3

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M. (2023). Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20 (9), 10061–10074, <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04715-6>. **IF: 3,00; punkty MNiSW: 70**

❖ Publikacja nr 4 – P4

Zajac, O., Zielińska, M., Żubrowska-Sudoł, M. (2024). Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies. *Bioresource Technology*, 399, 130593, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>. **IF: 9,70; punkty MNiSW: 140**

❖ Publikacja nr 5 – P5

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2023). Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor.

Desalination and Water Treatment, 288, 165–177, <https://doi.org/10.5004/dwt.2023.29304>.

IF: 1,00; punkty MNiSW: 100

❖ **Publikacja 6 – P6**

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 57, 104655, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>. **IF: 6,30; punkty MNiSW: 100**

Łączna punktacja prac wchodzących w skład zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych zgodnie z rokiem opublikowania wynosi:

- **wg listy czasopism punktowanych MNiSW – 610 punktów,**
- **łączny współczynnik wpływu Impact Factor – 26,40.**

Przedstawione w dysertacji badania przeprowadzono w ramach trzech projektów badawczych. Poniżej przedstawiono ich wykaz:

1. Projekt badawczy pt. „Identyfikacja, charakterystyka i modelowanie procesu COMAMMOX - nowego ogniwa w obiegu azotu w układach oczyszczania ścieków”. 2017/27/B/NZ9/01039, OPUS 14, NCN. Czas trwania: 15.10.2018 – 14.04.2023. Konsorcjum: Politechnika Gdańska (Lider), Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Politechnika Warszawska (P1, P2, P3, P5, P6).
2. Grant dziekański nr 504/04613 pt. „Analiza wpływu konfiguracji technologicznej sekwencyjnego reaktora porcjowego na przebieg i efektywność procesu nityfikacji” przyznany w ramach konkursu na granty dziekańskie Dziekana Wydziału dla pracowników oraz doktorantów, finansowanego ze środków subwencji, służącego rozwojowi młodych naukowców Wydziału Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej. Czas trwania: 08.03.2021 – 21.02.2022 (P4).
3. Grant na finansowanie badań naukowych dla pracowników Politechniki Warszawskiej w dyscyplinie Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka w roku 2022 pt. „Wpływ naprzemiennego napowietrzania na aktywność i liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów nityfikacyjnych rozwijających się w hybrydowym reaktorze z nityfikacją/denitryfikacją”. Czas trwania: 06.04.2022 – 30.09.2023 (P4).

2. PRZEDMIOT PRACY

Przedmiotem dysertacji była analiza przebiegu i efektywności procesu nitryfikacji w sekwencyjnych reaktorach porcjowych ze złożem ruchomym, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu strategii napowietrzania i formy, w jakiej biomasa rozwija się w reaktorach.

W pracy zdefiniowano następujące cele cząstkowe:

- analiza wpływu strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji, przy uwzględnieniu różnych konfiguracji pracy reaktorów ze złożem ruchomym (tj. czystej i hybrydowej technologii złoża ruchomego) (Zagadnienie nr 1),
- określenie wpływu wykształcenia biomasy w postaci osadu czynnego w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego na efektywność oczyszczania ścieków, ze szczególnym uwzględnieniem procesu nitryfikacji (Zagadnienie nr 2),
- analiza wpływu różnych wariantów strategii napowietrzania na zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie (Zagadnienie nr 3),
- określenie wpływu temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nitryfikacji (Zagadnienie nr 4),
- analiza przebiegu i efektywności procesu nitryfikacji podczas przekształcenia hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym (IFAS-MBSBBR) zapewniającego zintegrowane usuwanie związków węgla, azotu i fosforu na nitryfikacyjny reaktor pracujący w czystej technologii złoża ruchomego (MBSBBR) w warunkach ciągu bocznego (Zagadnienie nr 5).

3. WPROWADZENIE

3.1. Wstęp – oczyszczanie ścieków, jego znaczenie i wyzwania

W ciągu ostatnich dziesięcioleci doszło do gwałtownego wzrostu urbanizacji na całym świecie. Jej szybkie tempo otwiera szanse rozwoju gospodarczego, jednakże jednocześnie prowadzi do większego zużycia zasobów słodkiej wody. Czysta woda i globalne ocieplenie to dwie kluczowe i wzajemnie powiązane kwestie, które stwarzają istotne wyzwania w skali światowej. W kontekście tych wyzwań skuteczne oczyszczanie ścieków odgrywa fundamentalną rolę, ponieważ jest niezbędne dla ochrony wód przed zanieczyszczeniem. Aby to osiągnąć, kluczowe są innowacyjne technologie oczyszczania ścieków, dobrze rozwinięta infrastruktura kanalizacyjna i zwiększona świadomość społeczna. Działania podejmowane na rzecz ochrony zasobów wodnych mają nie tylko zasadnicze znaczenie dla zdrowia ludzkiego, ale także dla zachowania równowagi ekosystemów, co ma znaczący wpływ na globalne wysiłki na rzecz przeciwdziałania zmianom klimatycznym. Odbiór i oczyszczanie ścieków stanowi więc nieodłączny element współczesnej działalności inżynierskiej, mający na celu minimalizowanie negatywnego wpływu działalności człowieka na środowisko naturalne oraz ograniczanie potencjalnych niebezpieczeństw dla zdrowia ludzkiego. Współczesne oczyszczalnie ścieków mają za zadanie nie tylko usuwanie zanieczyszczeń, takich jak związki organiczne oraz związki biogenne, zapewniając tym samym ochronę ekosystemów wodnych, ale również podejmowanie działań na rzecz ich regeneracji. W tym kontekście dobór stosowanych technologii i procesów oczyszczania ścieków, jak również parametrów, przy których procesy te są realizowane, odgrywają kluczową rolę w zapewnieniu wysokiej jakości ścieków oczyszczonych odprowadzanych do środowiska naturalnego.

W miarę wzrostu populacji, poprawy dostępu do wody, podnoszenia standardów życia oraz rozwoju gospodarczego, ilość generowanych ścieków stale rośnie. Według danych z raportu „Wastewater as a Resource: May 2022” roczna produkcja ścieków komunalnych na świecie wyniosła 380 miliardów m³ (EIB, 2022). Prognozy przygotowane na bazie dostępnych danych wskazują, że z dużym prawdopodobieństwem do 2030 roku produkcja ta wzrośnie o 24%, a do 2050 roku aż o 51% (Qadir i in., 2020). Warto jednak zwrócić uwagę na to, że mimo potencjalnych zagrożeń, jakie stwarzają ścieki, tylko niewielka część z nich jest obecnie zbierana i poddawana procesom oczyszczania. Według opracowań dostępnych w literaturze, około 48% generowanych ścieków trafia do środowiska bez oczyszczenia (Jones i in., 2021). Jest to znacznie mniej niż w powszechnie cytowanych globalnych danych statystycznych, które mówią, że około 80% ścieków jest odprowadzanych do środowiska bez uprzedniej

obróbki (UNESCO, 2017). Jones i in. (2021) bazowali na dostępnych danych z roku 2015, co stanowi znaczne uaktualnienie w stosunku do danych prezentowanych w raporcie UNESCO (dane do 2008 roku). Wartości procentowe dotyczące zbierania i oczyszczania ścieków kształtują się podobnie jak produkcja ścieków pod względem poziomu dochodów. W krajach o wysokich dochodach większość ścieków jest zarówno zbierana (82%), jak i oczyszczana (74%), podczas gdy w krajach o niskich dochodach wskaźniki te wynoszą odpowiednio 9% i 4%. Wraz ze spadkiem poziomu dochodów, maleje również odsetek zbieranych ścieków, które są poddawane oczyszczaniu: 91% w krajach o wysokich dochodach, 73% w krajach o wyższych średnich dochodach, 60% w krajach o niższych średnich dochodach i 47% w krajach o niskich dochodach (Jones i in., 2021). Z danych Water Information System for Europe z 2024 roku wynika, że 82% ścieków komunalnych w Europie jest zbieranych i oczyszczanych zgodnie ze standardami Unii Europejskiej (WISE, 2024). Gospodarstwa domowe oraz niektóre gałęzie przemysłu na obszarach miejskich generują codziennie około 108,85 mln m³ ścieków. Z zebranych danych wynika, że w Unii Europejskiej działa 20 087 oczyszczalni ścieków, z czego aż w 70% z nich wykorzystywane są technologie opierające się na metodach biologicznych, uwzględniających usuwanie związków azotu i fosforu.

Azot jest jednym z głównych składników biogennych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, jednakże jego nadmiar może prowadzić do problemów ekologicznych, takich jak eutrofizacja, czyli nadmierne wzbogacenie wód w składniki odżywcze (Preisner i in., 2020). Wprowadzenie zbyt dużej ilości azotu amonowego ze ściekami do wód powierzchniowych zaburza naturalną równowagę ekosystemu wodnego poprzez spowodowanie deficytu tlenowego (Klaczyński, 2019). Procesy utleniania są ograniczone przez dostępność tlenu w wodzie, co prowadzi do zakłócenia procesów życiowych organizmów wodnych. W rezultacie naturalne mechanizmy samooczyszczania, zwłaszcza w wodach stojących, takich jak stawy czy jeziora, ulegają osłabieniu lub całkowitemu zanikowi, co w skrajnych przypadkach może prowadzić do masowego obumierania ryb. Kolejnym istotnym problemem związanym z wprowadzaniem azotu jest nadmierne nawożenie odbiornika co prowadzi do zwiększenia ilości dostępnych substancji biogennych, co z kolei powoduje szybki wzrost roślinności i zarastanie akwenu. Zmniejszenie ilości azotu, który dostaje się do środowiska wraz ze ściekami oczyszczonymi, jest więc jednym z kluczowych zadań stawianych komunalnym oczyszczalniom ścieków.

Głównym źródłem azotu w ściekach jest azot organiczny i mocznik, produkty przemian metabolicznych białka z pokarmu spożywanego przez ludzi. Azot w strumieniu ścieków, który

trafia do oczyszczalni, może przyjmować formę zarówno związków organicznych, jak i nieorganicznych. W trakcie przepływu ścieków przez system kanalizacyjny, w warunkach anaerobowych, związki te przechodzą szereg przemian biochemicznych. Większość azotu w ściekach surowych stanowi azot amonowy (50% >) i azot organiczny (40-50%). Ilość azotynów i azotanów jest natomiast bardzo niska albo formy te wcale nie występują (Metcalf i Eddy, 2014).

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, azot może być usuwany ze ścieków na drodze procesów fizycznych, chemicznych i biologicznych (Winkler i Straka, 2019). Ostatnia z wymienionych metod, czyli biologiczne usuwanie azotu poprzez naturalny metabolizm specyficznych grup mikroorganizmów jest najczęściej stosowaną technologią. Jest to nie tylko najbardziej rozpowszechniona metoda, ale także korzystna ekonomicznie, skuteczna, łatwa w obsłudze i nie generuje dodatkowych wtórnych zanieczyszczeń (Zhou i in., 2023). Najczęściej usuwanie azotu na drodze biologicznej opiera się na konwencjonalnym połączeniu dwóch procesów – czyli nitryfikacji i denitryfikacji. W dużym skrócie azot dopływający do reaktora biologicznego w formie organicznej przekształcany jest na drodze amonifikacji w jony amonowe, a następnie w warunkach tlenowych, powstałe związki amonowe utleniane są do azotu azotynowego i azotu azotanowego na drodze nitryfikacji. Utlenione formy azotu w warunkach anoksycznych, przy udziale mikroorganizmów denitryfikacyjnych, redukowane są do azotu gazowego. Poza szeregiem zalet tego rozwiązania występują jednak pewne ograniczenia powodujące, że naukowcy na całym świecie cały czas szukają metod alternatywnych do „klasycznego szlaku” usuwania azotu ze ścieków. Coraz większą uwagę poświęca się zużyciu energii elektrycznej, produkcji osadów i emisji gazów cieplarnianych.

W niniejszej pracy skupiono się na jednym z kluczowych procesów zachodzących w oczyszczalniach ścieków, jakim jest nitryfikacja. Jego zrozumienie i kontrola są niezwykle ważne dla efektywnego funkcjonowania oczyszczalni ścieków, jak również ograniczenia negatywnego wpływu tego typu obiektów na zmiany klimatyczne. Nitryfikacja wymaga energochłonnego napowietrzania, stanowiącego około 50-75% wydatku energetycznego całej oczyszczalni, co poza zwiększeniem kosztów ponoszonych przez przedsiębiorstwo, wpływa również na zmiany klimatyczne wywoływane przez produkcję energii elektrycznej (Luo i in., 2019). Przy niewłaściwie dobranych parametrach napowietrzania straty energii mogą sięgać nawet około 40% całkowitego zużycia energii w całym procesie (Foladori i in., 2015). Badania wskazują, że aż około 80% emisji gazów cieplarnianych związanych z funkcjonowaniem

oczyszczalni ścieków pochodzi z procesu spalania paliw kopalnych do produkcji energii elektrycznej (Yerushalmi i in., 2013). Ponadto, w procesach nitryfikacji i denitryfikacji może dochodzić do wytworzenia podtlenku azotu, który następnie jest emitowany do atmosfery (Liu i in., 2021b). Ten silny gaz cieplarniany, po dwutlenku węgla i metanie, jest trzecim co do wielkości czynnikiem przyczyniającym się do antropogenicznego ocieplenia klimatu i uznano go za najbardziej dominujący czynnik niszczący warstwę ozonową (Thakur i Medhi, 2019). W 2020 roku globalna emisja N_2O osiągnęła około 10,1 miliona megagramów (Paltsev i in., 2023). Jak wskazują cytowane statystyki, prognozy zakładają, że przy kontynuacji obecnych trendów produkcji do roku 2050 wartość ta może osiągnąć około 10,8 miliona megagramów. Oczyszczalnie ścieków są czwartym co do wielkości źródłem emisji tego silnego gazu cieplarnianego, odpowiadając za 5,6% całkowitych emisji N_2O (Kemmu i Amanatidou, 2023). Jak podają dostępne badania, udział N_2O w całkowitym śladzie węglowym oczyszczalni ścieków szacuje się na poziomie około 50-78% (Daelman i in., 2013; Rodríguez-Caballero i in., 2015; Hwang i in., 2016). Uważa się, iż zwiększenie wskaźnika emisji N_2O o zaledwie 1% powoduje, że ślad węglowy oczyszczalni ścieków może zwiększyć się o około 30% (De Haas i Hartley, 2004). Dlatego tak ważny jest staranny dobór parametrów eksploatacyjnych i zastosowanie odpowiednich technologii, aby osiągnąć zarówno wysoką jakość oczyszczonych ścieków, zmniejszone zużycie energii elektrycznej, jak i ograniczyć emisję gazów cieplarnianych. Warto również podkreślić, że minimalizowanie emisji N_2O jest bardzo ważne dla osiągnięcia neutralności węglowej oczyszczalni ścieków.

Jednym z rozwiązań, które pozwalają na intensyfikację procesu nitryfikacji i utrzymanie jego wysokiej efektywności jest technologia złoża ruchomego, będąca stosunkowo nowym rozwiązaniem. Eksploatatorzy oczyszczalni ścieków coraz częściej decydują się na jej zastosowanie. To korzystna alternatywa dla klasycznej technologii osadu czynnego, mogąca w znacznym stopniu pomóc zmodernizować istniejące już oczyszczalnie ścieków bez dużych nakładów finansowych. Idea technologii złoża ruchomego, jak również korzyści wynikające z jej wykorzystania zostaną szczegółowo omówione w kolejnych podrozdziałach. Jednym z wyzwań związanych z zastosowaniem tej technologii jest minimalizacja zużycia energii niezbędnej na wprowadzenie do reaktora biologicznego wymaganej ilości tlenu. W literaturze przedmiotu jako jedno z rozwiązań w tym zakresie wymienia się naprzemienne napowietrzanie. Mimo, iż to rozwiązanie charakteryzuje się dużym potencjałem, nadal brakuje dogłębnych badań, szczególnie w odniesieniu do reaktorów wykorzystujących technologię złoża ruchomego, co stanowi istotną lukę badawczą. Niniejsza praca ma na celu jej uzupełnienie

poprzez szczegółowe zbadanie naprzemiennego napowietrzania w kontekście reaktorów ze złożem ruchomym.

Głównym celem badawczym niniejszej pracy jest analiza wpływu strategii napowietrzania (w tym naprzemiennego napowietrzania) na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji w reaktorach ze złożem ruchomym. Poprzez głębsze zrozumienie tego procesu oraz ocenę skuteczności zastosowania reaktorów ze złożem ruchomym dąży się do identyfikacji nowych możliwości doskonalenia oczyszczania ścieków, które będą zarówno skuteczne, jak i zrównoważone środowiskowo. Technologia złoża ruchomego sprzyja bowiem rozwojowi wolno rosnących bakterii nitryfikacyjnych, a efektywne zastosowanie naprzemiennego napowietrzania bezpośrednio łączyć się będzie z perspektywą zmniejszenia zużycia energii niezbędnej do zasilania dmuchaw. Pozwoli to na redukcję zużycia energii elektrycznej przez całe przedsiębiorstwo, co może mieć bezpośredni i realny wpływ na zmniejszenie negatywnych skutków środowiskowych związanych z produkcją energii elektrycznej oraz ograniczenie jej szkodliwego wpływu na naszą planetę.

3.2. Technologia złoża ruchomego

3.2.1. Od czego to wszystko się zaczęło i w jakim kierunku zmierza?

Historia technologii złoża ruchomego rozpoczyna się w Norwegii, w latach 80. XX wieku, kiedy to profesor Hallvard Ødegaard we współpracy z firmą Kaldnes Miljøteknologi opracowali technologię MBBR (ang. *moving bed biofilm reactor*), czyli reaktora biologicznego opartego na wzroście błony biologicznej na swobodnie poruszających się nośnikach. Rozwiązanie to miało na celu poprawę usuwania substancji organicznych i związków biogennych zawartych w ściekach, tak aby spełnić wymagania stawiane w porozumieniach dotyczących jakości ścieków odprowadzanych do Morza Północnego. Technologia złoża ruchomego szybko zyskała popularność i zaczęła być stosowana w oczyszczalniach ścieków komunalnych i przemysłowych na całym świecie (Di Biase i in., 2019).

Przed pojawieniem się złoża ruchomego, oczyszczanie ścieków oparte o biofilm realizowano głównie poprzez złoża zraszane, reaktory ze złożem fluidalnym, złoża tarczowe oraz zanurzone złoża tarczowe (Rittmann, 1982). Jednakże systemy te miały pewne wady, takie jak problemy z efektywnością pracy czy podatność na awarie mechaniczne. Technologie wykorzystujące mikroorganizmy rozwinięte w formie biofilmu napotykały również istotne ograniczenia związane z dyfuzją ze względu na słaby transfer masy, co prowadziło do zmniejszenia szybkości reakcji (Rusten i in., 2006). To właśnie w tym kontekście zrodził się

pomysł na zastosowanie swobodnie poruszających się nośników, który był postrzegany jako cenna alternatywa i rozwiązanie wad innych systemów.

Jak już wspomniano, w latach 80. i 90. XX wieku, w odpowiedzi na potrzeby małych społeczności oraz konieczność modernizacji istniejących oczyszczalni ścieków w Norwegii, rozpoczęto prace nad złożem ruchomym. Technologia ta miała być łatwa w instalacji i obsłudze, a jednocześnie efektywna i niezawodna (Di Biase i in., 2019). Rozwiązaniem okazało się zastosowanie niewielkich rozmiarów nośników porośniętych biofilmem, które swobodnie poruszają się w reaktorze, zapewniając odpowiednie warunki do wzrostu dużej ilości biomasy. Na początku lat 90-tych przeprowadzono pierwsze badania nad technologią złoża ruchomego (Ødegaard i in., 1994). Dwa lata później, w 1996 roku Ødegaard i naukowcy z firmy Kaldnes Miljøteknologi opracowali patent na technologię złoża ruchomego (Ødegaard, 1999). W 2004 r., w wyniku fuzji firm Kaldnes Miljøteknologi i Anox AB, powstało AnoxKaldnes, które kontynuowało badania nad technologią złoża ruchomego i jest jednym z najbardziej rozpoznawalnych producentów kształtek na świecie. Dwa lata później technologia złoża ruchomego była już z powodzeniem stosowana w ponad 400 oczyszczalniach ścieków w ponad 22 różnych krajach na świecie (Rusten i in., 2006). Od tego czasu wiele firm zajęło się przygotowaniem różnego rodzaju wariantów złożów ruchomych. Obecnie technologia złoża ruchomego jest szeroko stosowana na całym świecie. Z danych firmy Veolia, która w 2006 roku wykupiła AnoxKaldnes, technologia oczyszczania ścieków oparta na AnoxKaldnes jest stosowana w ponad 1200 oczyszczalniach (dane z 2023 roku).

Mimo że badania nad usuwaniem substancji organicznych i składników odżywczych są nadal prowadzone, technologia MBBR jest uważana za jedno z najsukuteczniejszych i najbardziej obiecujących rozwiązań w obszarze oczyszczania ścieków. W ostatnich latach, ze względu na wzrost populacji i ilości generowanych ścieków, rośnie zapotrzebowanie na modernizację istniejących oczyszczalni. Duży nacisk kładzie się na zwiększenie ich wydajności objętościowej przy minimalnych dodatkowych kosztach. Rosnąca presja na zmniejszenie negatywnego oddziaływania oczyszczalni ścieków na środowisko sprawia, że technologie pozwalające na kompaktową instalację, zajmujące jak najmniejszą przestrzeń fizyczną, a przede wszystkim dające dobrą jakość ścieków oczyszczonych stają się coraz atrakcyjniejsze. Niewątpliwie przyczynia się do tego również malejący na przestrzeni lat koszt nośników.

3.2.2. Rodzaje ruchomych nośników

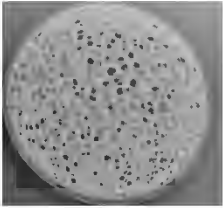
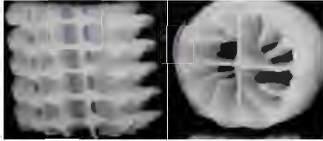
Złoże ruchome stanowią swobodnie poruszające się w toni ścieków elementy, na których rozwija się błona biologiczna. Konstrukcja i materiał, z którego wykonane są ruchome nośniki, odgrywają kluczową rolę w efektywności działania systemów opartych na technologii złoża ruchomego. Odpowiednio zaprojektowane nośniki nie tylko wspierają szybki wzrost biomasy w postaci biofilmu, ale również chronią go przed ścieraniem i degradacją mechaniczną. Mikroorganizmy tworzące biofilm rozwijają się głównie na wewnętrznych częściach nośników. Aby zapewnić optymalne warunki, nośniki powinny charakteryzować się dużą i chropowatą powierzchnią właściwą oraz hydrofobowością, co sprzyja osiedlaniu się mikroorganizmów. Dodatkowo, ich gęstość powinna być zbliżona do gęstości wody, aby mogły swobodnie unosić się w reaktorze i być równomierne rozmieszczone (Podedworna i in., 2014).

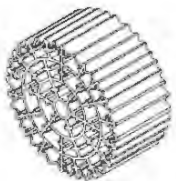
Obecnie kształtki wykonywane są najczęściej z tworzyw sztucznych, takich jak wysokiej gęstości polietylen (HDPE), polietylen (PE), polipropylen (PP), polichlorek winylu (PVC) czy pianka poliuretanowa (PU). Najbardziej klasyczny i popularny kształt złoża ruchomego ma cylindryczną formę z wewnętrznymi przegrodami zwiększającymi powierzchnię czynną, na której mogą się rozwijać mikroorganizmy. Coraz częściej stosuje się również złoże ruchome w kształcie porowatych chipów, dysków lub kostek. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie zastosowaniem niekonwencjonalnych i ekologicznych materiałów jako ruchomych nośników. Te alternatywne materiały mają na celu zmniejszenie śladu węglowego i promowanie zrównoważonego rozwoju w technologii oczyszczania ścieków. Wykorzystywane są tworzywa sztuczne z recyklingu. Niektóre projekty badawcze eksplorują wykorzystanie biodegradowalnych polimerów, takich jak polihydroksyalkaniany (PHA) (Chang i in., 2024). Takie materiały mogą ulegać rozkładowi biologicznemu po zakończeniu cyklu, co znacząco zmniejsza problem odpadów z tworzyw sztucznych. Istnieją również badania dotyczące wykorzystania jako nośników biofilmu łusek ryżu (Alitaleshi i in., 2024) lub kolb kukurydzy (Akankshya i Mohanty, 2021). Materiały te, ze względu na ich naturalne pochodzenie i biodegradowalność, mogą stanowić zrównoważoną alternatywę dla tradycyjnych nośników polimerowych, redukując negatywny wpływ na środowisko oraz wspierając rozwój technologii oczyszczania ścieków opartych na zasadach zrównoważonego rozwoju. Nowatorskim rozwiązaniem stosowanym w technologii złoża ruchomego jest również wykorzystywanie jako nośników biofilmu kompozytów polimerowo-drzewnych (Kruszelnicka i in., 2014; Kruszelnicka i in., 2018; Kruszelnicka i in., 2022). Materiał ten charakteryzuje się dużą powierzchnią czynną dostępną do rozwoju błony biologicznej.

W tabeli nr 3.1. przedstawiono zestawienie różnych rodzajów złóż ruchomych wykorzystywanych w praktyce.

Tabela 3.1. Różne rodzaje złóż ruchomych

Lp.	Nazwa producenta	Nazwa nośnika	Powierzchnia właściwa (m ² /m ³)	Materiał	Zdjęcie
1.	Veolia AnoxKaldnes®	K1	500	PE	
2.		K3	500		
3.		K5	800		
4.		BiofilmChip P	900		
5.		BiofilmChip M	1200		
6.		AnoxK™Z-200	b.d.	b.d.	
7.		AnoxK™Z-400	b.d.		
8.	Aqwise/ Bluegengroup	ABC Media	650	HDPE	

Lp.	Nazwa producenta	Nazwa nośnika	Powierzchnia właściwa (m ² /m ³)	Materiał	Zdjęcie
9.	MUTAG Biochip	Mutag BioChip 30™	5 5500	PE	
10.	Hell-X BIOCARRIERS	HELL-X FLAKE	5000-5500	HDPE	
11.	EMW Filtertechnik	PORET® aqua	1000	PU	
12.	Nighao	PU40	2000	PU	
13.	Hell-X BIOCARRIERS	HXF12KLL	859	HDPE	
14.		HXF13KLL+	955		
15.		HX17KLL	602		
16.	EvU® Innovative Umwelttechnik GmbH	EvU-Pearl	400 – 800 m ² /m ³	PVC z recyklingu	
17.	GeoTierre	New-Pond®	500	HDPE	

Lp.	Nazwa producenta	Nazwa nośnika	Powierzchnia właściwa (m ² /m ³)	Materiał	Zdjęcie
18.	Headworks	AC 450	402	HDPE	
19.		AC 920	680		
20.		AC 1200	800		
21.	Warden Biomedia	Biopebble	500	HDPE	
22.		Biopipe 600	600	PP z recyklingu	
23.		Biopipe +500	500	PP	
24.		Bioflow +800	800	PP	

PE – polichlorek winylu; HDPE – wysokiej gęstości polietylen; PE – polietylen; PU – pianka poliuretanowa; PP – polipropylen; PVC – polichlorek winylu; b.d. – brak danych.

3.2.3. Podział reaktorów ze złożem ruchomym

Reaktory ze złożem ruchomym podzielić można w odniesieniu do kilku kryteriów, takich jak rodzaj przepływu ścieków oraz postać, w jakiej rozwija się biomasa zasiedlana przez mikroorganizmy oczyszczające ścieki (Żubrowska-Sudoł i Jasińska, 2014). W zależności od rodzaju przepływu ścieków wyróżniamy reaktory o przepływie ciągłym – MBBR (ang. *moving bed biofilm reactor*) (Annavaiah i in., 2018; Leyva-Díaz i in., 2020) oraz o przepływie porcjowym – MBSBBR (ang. *moving bed sequencing batch biofilm reactor*) (Wang i in., 2020a). W kontekście drugiego kryterium wyróżniamy reaktory ze złożem ruchomym opierające się na tzw. „czystej technologii złoża ruchomego”, gdzie biomasa rozwija się głównie w postaci biofilmu porastającego ruchome nośniki (udział mikroorganizmów w postaci osadu czynnego jest na tyle mały, że zostaje pominięty) lub reaktory hybrydowe, w których za oczyszczanie ścieków odpowiadają wspólnie mikroorganizmy zasiedlające biofilm i te tworzące kłaczki osadu czynnego. Każde z tych rozwiązań może być wykorzystywane w reaktorach typu MBBR i MBSBBR.

3.2.4. Zalety i wady technologii złoża ruchomego

Rozwój technologii złoża ruchomego miał na celu przewyższenie ograniczeń dotychczasowych metod stosowanych do oczyszczania ścieków. W porównaniu z innymi technologiami opartymi na biofilmie oraz konwencjonalnymi systemami osadu czynnego, technologia złoża ruchomego wyróżnia się wieloma zaletami. Jako jedną z pierwszych wymienia się zwiększoną wydajność i efektywność oczyszczania ścieków w związku ze znacznie większą ilością biomasy rozwijającej się w reaktorze biologicznym (m.in. Gu i in., 2017; Chaali i in., 2018; Vyrides i in., 2018; Di Biase i in., 2019). Jak podaje Safwat (2018) to rozwiązanie technologiczne przewyższa konwencjonalne systemy biologicznego oczyszczania ścieków również pod względem większej aktywności mikrobiologicznej, różnorodności mikroorganizmów zasiedlających układy i stabilności całego systemu. Biofilm rozwijający się na ruchomych nośnikach wykazuje bowiem dużą odporność na zmiany charakterystyki ścieków dopływających do układów, takie jak zmiany obciążeń hydraulicznych, wahań odczynu, temperatury i stężeń zanieczyszczeń (Chrispim in., 2016; Di Biase i in., 2019). Technologia złoża ruchomego charakteryzuje się również łatwością obsługi i niskimi wymaganiami konserwacyjnymi, a także niewielkimi rozmiarami kompaktowych jednostek (Di Biase i in., 2019). Do jej zalet zaliczyć można również możliwość ograniczenia wymaganej objętości reaktorów oraz uniezależnienie czasu zatrzymania biomasy w reaktorze od hydraulicznego zatrzymania ścieków (Podedworna i in., 2014). Warunki panujące w reaktorach

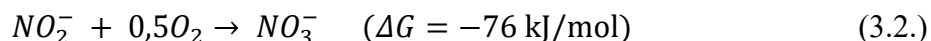
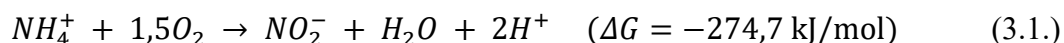
wykorzystujących technologię złoża ruchomego sprzyjają również występowaniu procesu symultanicznej nitryfikacji i denitryfikacji, jak również umożliwiają usuwanie związków azotu i fosforu na drodze denitryfikacji defosfatacyjnej (Podedworna i Żubrowska-Sudoł, 2011). W związku z tym, że biomasa rozwija się w postaci biofilmu na ruchomych nośnikach, w reaktorach wykorzystujących czystą technologię złoża ruchomego eliminowany jest problem pęcznienia osadu i nie ma konieczności jego recyrkulacji (Gu i in., 2017; Di Biase i in., 2019). Z kolei w porównaniu z reaktorami z błoną biologiczną rozwiniętą na nieruchomych nośnikach, MBBR cechuje się mniejszym ryzykiem zatykania oraz nie wymaga częstego płukania wstecznego, co przekłada się na oszczędność czasu i zasobów (Di Biase i in., 2019). Technologia złoża ruchomego posiada również pewne wady. Jej wykorzystanie może być związane z wysokimi kosztami energii, wynikającymi z konieczności napowietrzania w celu utrzymania w ciągłym ruchu nośników oraz zapewnienia wymaganej ilości tlenu do usuwania zanieczyszczeń dopływających do reaktora biologicznego. Zastosowanie tej technologii może wiązać się również z tworzeniem się w reaktorze stref stagnacji, które utrudniają pełne wymieszanie, oraz z wysokimi kosztami kapitałowymi związanymi z konstrukcją reaktora i zakupem nośników (Ødegaard, 2016; Di Biase i in., 2019; Leyva-Díaz i in., 2020; Santos i in., 2020).

3.3. Znaczenie procesu nitryfikacji w oczyszczaniu ścieków

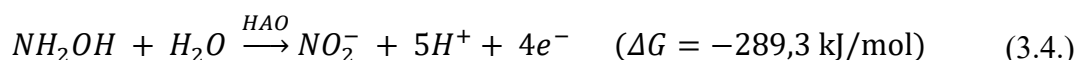
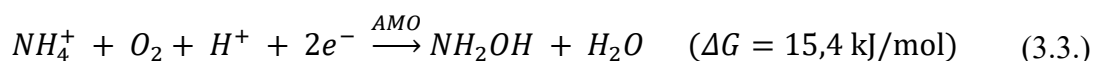
3.3.1. Podstawy teoretyczne

Nitryfikacja stanowi jedno z głównych ogniw cyklu azotowego w przyrodzie, będąc jednocześnie procesem limitującym usuwanie tego biogenu ze ścieków. Ponad 130 lat temu, rosyjski mikrobiolog Sergei Winogradsky, odkrył, że ten autotroficzny proces składa się z dwóch etapów i każdy z nich prowadzi odrębna grupa chemolitoautotroficznych mikroorganizmów (Winogradsky, 1892; Dworkin i Gutnick, 2012). Zachodzi on w warunkach tlenowych, a dla mikroorganizmów jest procesem dostarczającym im energii.

W pierwszym etapie azot amonowy utleniany jest do azotu azotynowego (tzw. nitrytacja) przy udziale bakterii autotroficznych z rodzaju *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosomonadaceae* i *Nitrosolobus* znanych jako AOB (ang. *ammonia oxidizing bacteria*), podczas gdy drugi etap, utleniania azotu azotynowego do azotu azotanowego (tzw. nitratacja), jest prowadzony przez bakterie należące do rodzajów *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* i *Nitrospina*, znanych jako NOB (ang. *nitrite oxidizing bacteria*) (Zhang i in., 2019):

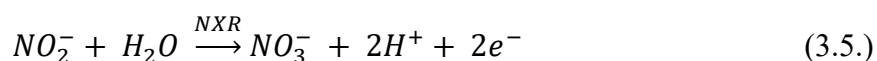


Utlenianie azotu amonowego do azotynów przebiega dwufazowo. W pierwszej fazie azot amonowy przekształcany jest do hydroksyloaminy (NH_2OH) przy katalitycznym udziale enzymu charakterystycznego dla AOB, tj. monooksygenazy amonowej (ang. *ammonia monooxygenase* – AMO). W drugiej fazie powstała hydroksyloamina utleniania jest do azotynów. Reakcja ta katalizowana jest przez oksydoreduktazę hydroksyloaminy (ang. *hydroxylamine oxidoreductase* – HAO):



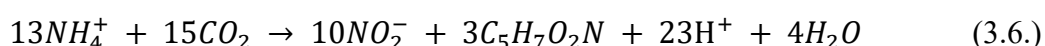
Podczas tych reakcji uwolnione zostają cztery elektrony. Dwa z nich kierowane są z powrotem do AMO, aby utrzymać proces utleniania. Pozostałe dwa elektrony są dostępne do redukcji dwutlenku węgla (CO_2) i służą jako źródło energii dla procesu, wykorzystując tlen jako akceptor elektronów.

Drugi etap nitryfikacji, czyli utlenianie azotynów do azotanów jest procesem jednostopniowym i zachodzi w obecności katalizatora, jakim jest oksydoreduktaza azotynowa (ang. *nitrite oxidoreductase* – NXR). Przebiega on zazwyczaj znacznie szybciej, co powoduje, że w ściekach oczyszczonych na ogół nie występują azotyny (Bartoszewski, 2011):

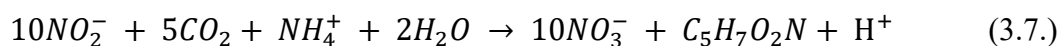


Bakterie nitryfikacyjne wykorzystują energię uzyskaną z utleniania azotu amonowego i azotynowego do wzrostu swoich komórek (Sadecka, 2010). Równania reakcji uwzględniających przyrost bakterii nitryfikacyjnych przedstawiono poniżej (Henze i in., 2002):

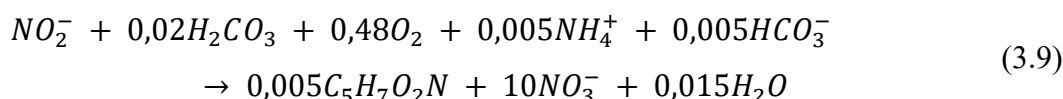
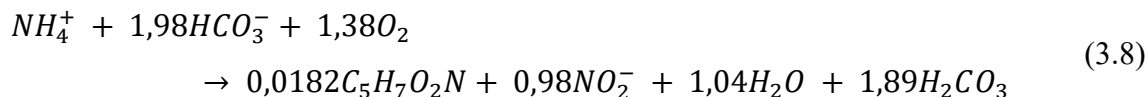
- dla bakterii AOB:



- dla bakterii NOB:



Sumaryczne reakcje stechiometryczne utlenienia azotu amonowego i azotu azotynowego, z uwzględnieniem procesów katabolicznych i anabolicznych, są następujące:



Na przestrzeni wielu dekad uwagę badaczy skupiał szczególnie I etap nitryfikacji, wyróżniony przez rosyjskiego mikrobiologa, który uważano za limitujący dla całego procesu utleniania azotu amonowego (Li i in., 2016b). Przez wiele lat sądzono, że utlenianie azotu amonowego do azotynów prowadzone jest wyłącznie przez bakterie AOB. Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej wykazano, że gen odpowiadający za utlenianie amoniaku *amoA*, występuje u dużej liczby archeonów (Venter i in., 2004). Pierwsze doniesienia o występowaniu archeonów utleniających amoniak (ang. *ammonia oxidizing archaea* – AOA) w oczyszczalniach ścieków przedstawił w 2006 roku Park i in. (2006). Cytowani autorzy wykryli archealny gen *amoA* w osadzie czynnym pochodzącym z komór nitryfikacyjnych pięciu oczyszczalni ścieków w USA. Od tego czasu trwają intensywne badania dotyczące rzeczywistego udziału AOA w utlenianiu amoniaku w oczyszczalniach ścieków. Przykładowo, Liu i in. (2021a) wykazali, że w reaktorze membranowym, pracującym przez długi czas przy niskim stężeniu tlenu (około 0,40 mg O₂/l), AOA zaczęły dominować nad AOB.

Ograniczona ilość badań dotyczących bakterii utleniających azotyny do azotanów wynikała głównie z trudności związanych z hodowlą tych mikroorganizmów w warunkach laboratoryjnych. Ponadto bakterie II etapu procesu nitryfikacji uważane były za chemolitoautotrofy o bardzo ograniczonych możliwościach fizjologicznych, co prowadziło do przekonania, że ich potencjał badawczy jest niewielki (Daims i in., 2016). W efekcie tempo postępu w badaniach nad NOB było wyraźnie niższe niż w przypadku bakterii utleniających azot amonowy. Wraz z rozwojem nauki, zwłaszcza w zakresie technik molekularnych i innowacyjnych procesów oczyszczania ścieków, zainteresowanie badaczy zaczęło się koncentrować również na II etapie nitryfikacji. Udoskonalone narzędzia badawcze pozwoliły

naukowcom ujawnić szerokie zróżnicowanie niehodowlanych bakterii NOB. Dwie niezależne grupy badaczy, Gruber-Dorninger i in. (2015) oraz Cao i in. (2017), wykazały, że bakterie z rodzaju *Nitrospira* sp. stanowią najbardziej różnorodną i najliczniejszą grupę bakterii NOB w komunalnych oczyszczalniach ścieków.

Niewątpliwym punktem zwrotnym w rozwoju wiedzy dotyczącej procesu nitryfikacji, który zakwestionował jej znany do tej pory ścisły dwuetapowy podział, była dokonana w 2015 roku identyfikacja mikroorganizmów posiadających zdolność do utlenienia azotu amonowego do azotanów – bakterii Comammox (ang. *complete ammonia oxidizing bacteria*) z rodzaju *Nitrospira* sp. (Daims i in., 2015; van Kessel i in., 2015). W przeciwieństwie do powszechnie znanych bakterii AOB i NOB, Comammox *Nitrospira* w swoim genomie posiada pełen zestaw genów kodujących AMO, HAO i NXR, co świadczy o ich genetycznym potencjale do prowadzenia pełnej nitryfikacji (Daims i in., 2015; Camejo i in., 2017; Hu i He, 2017). Tym przełomowym odkryciem udowodniono, że bakterie te mogą charakteryzować się większą aktywnością, a ich metabolizm nie ogranicza się jedynie do utleniania azotynów do azotanów, ale również do pełnej nitryfikacji. Odkrycie to nadało całkowicie nowy wymiar bieżącemu zrozumieniu cyklu azotu w przyrodzie, zarazem zachęcając do zrewidowania podejścia do zarządzania procesem usuwania azotu w systemach oczyszczania ścieków wykorzystujących nowe procesy, takie jak deamonifikacja lub skrócona nitryfikacja/denitryfikacja. Pomimo iż istnienie Comammox *Nitrospira* w systemach oczyszczania ścieków, zarówno w tych opartych na błonie biologicznej jak i na osadzie czynnym, zostało już potwierdzone przez wiele grup badawczych, ich znaczenie w procesie usuwania azotu, jak również warunki sprzyjające rozwojowi tych mikroorganizmów, nie zostały jeszcze jednoznacznie zdefiniowane (Annavaiahala i in., 2018; Mehrani i in., 2020). Niektórzy sugerują, że to biofilm zapewnia optymalne warunki dla wzrostu tych mikroorganizmów (Annavaiahala i in., 2018; Cotto i in., 2020), podczas gdy inni wskazują osad czynny jako środowisko sprzyjające ich rozwojowi (Wang i in., 2018; Roots i in., 2019). Dotychczas zidentyfikowane bakterie Comammox to: „*Candidatus Nitrospira inopinata*”, „*Candidatus Nitrospira nitrosa*”, „*Candidatus Nitrospira nitrificans*” i „*Candidatus Nitrospira krefftii*” (Daims i in., 2015; van Kessel i in., 2015; Sakoula i in., 2021; Luo i in., 2022).

Chociaż proces nitryfikacji tradycyjnie uznawany jest za autotroficzny, to w ostatnich latach uwagę badaczy skupia również fenomen heterotroficznych bakterii nitryfikacyjnych (ang. *heterotrophic nitrification bacteria* – HNB). To jedyna grupa mikroorganizmów, która przekształca azot amonowy, wykorzystując substancje organiczne jako główne źródło energii

(Bagchi i in., 2012; Holmes i in., 2019). Podobnie jak w procesie autotroficznym, w nitryfikacji heterotroficznej, w obecności enzymu AMO azot amonowy najpierw przekształca się w hydroksyloaminę, która następnie utlenia się do azotu azotynowego pod wpływem enzymu HAO, a następnie azotyny utleniane są do azotanów. Wiele heterotroficznych nitryfikatorów może następnie denitryfikować swoje produkty nitryfikacji do azotu gazowego w warunkach tlenowych – HNAD (ang. *heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria*) (Zhao i in., 2012; Song i in., 2021). Mikroorganizmy te, w porównaniu z autotroficznymi nitryfikatorami, charakteryzują się zazwyczaj wyższą szybkością wzrostu, tolerują bardziej kwaśne warunki środowiska i są mniej wymagające co do stężenia tlenu. Zaliczane są do rodzajów: *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cuprobacter*, *Halomonas*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Rhodococcus*, *Niabella*, *Diaphorobacter*, *Photobacterium* (Chen i Ni, 2011; Silva i in., 2019; Jia i in., 2019; Jaffer i in., 2019; Jia i in., 2020; Bucci i in., 2020; Song i in., 2021). Chociaż bakterie HNAD mogą wzrastać w środowisku wolnym od materii organicznej, obecność węgla organicznego znacznie zwiększa usuwanie azotu amonowego w procesie nitryfikacji heterotroficznej i asymilacji. Wyższe C/N może znacznie przyspieszyć szybkość nitryfikacji i transfer elektronów w denitryfikacyjnym łańcuchu oddechowym. Bakterie HNAD, ze względu na większą szybkość wzrostu niż autotroficzne nitryfikatory, lepiej przystosowują się do niskich temperatur i niskiego odczynu czy do wysokiego zasolenia, niż bakterie odpowiedzialne za konwencjonalny przebieg usuwania azotu, tj. nitryfikację autotroficzną w warunkach tlenowych/denitryfikację heterotroficzną w warunkach anoksycznych (Chen i Ni, 2011; Song i in., 2021).

3.3.2. Czynniki wpływające na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji

Mikroorganizmy prowadzące nitryfikację wykazują wrażliwość na różnorodne warunki środowiskowe. Poniżej opisano główne czynniki mogące mieć wpływ na szybkość i skuteczność analizowanego procesu. Zrozumienie tych aspektów jest kluczowe dla utrzymania optymalnych warunków środowiskowych w oczyszczalniach ścieków oraz osiągnięcia wysokiej wydajności nitryfikacji.

Temperatura

Od wielu już lat wiadomo, że nitryfikacja jest jednym z najbardziej wrażliwych na temperaturę etapów, pośród procesów biologicznego oczyszczania ścieków. W wielu krajach na świecie warunki sezonowe związane z porami roku wpływają na temperaturę ścieków, która

może wahać się od poniżej 10°C zimą do ponad 20°C latem (Henze, 2002). Niska temperatura wpływa głównie na tempo metabolizmu drobnoustrojów, ogólnie wyrażane jako tempo wzrostu lub wchłaniania, prowadząc tym samym do zmniejszenia szybkości przebiegu procesu nitryfikacji, a w konsekwencji do obniżenia efektywności usuwania ze ścieków azotu amonowego (Hülsen i in., 2016). Nagła zmiana temperatury może uniemożliwić prawidłowe funkcjonowanie białka bakterii, uszkodzając zewnętrzną błonę komórki i/lub czyniąc ją żelową (MacLeod i Calcott, 1976), w wyniku czego następuje zmniejszenie szybkości transferu substratu, w tym tlenu. Według Beales (2004), stopień wpływu „szoku zimna” zależy od gradientu temperatury, szybkości chłodzenia, stanu pożywki hodowlanej i szczepu drobnoustrojów. Cytowani autorzy twierdzą, że wraz ze spadkiem temperatury lag faza przed rozpoczęciem wzrostu się wydłuża, tempo wzrostu spada, a końcowa liczba komórek może się zmniejszyć. Bakterie zdolne do utleniania azotu amonowego i utleniania azotu azotynowego mają różne współczynniki wzrostu i korekcji temperatury (Hwang i Oleszkiewicz, 2007). Zgodnie z danymi prezentowanymi w literaturze, optymalną temperaturą dla utleniania azotu amonowego do azotynów przez bakterie AOB jest 25-36°C. Niższe temperatury przyczyniają się do obniżenia maksymalnej szybkości wzrostu tych mikroorganizmów. Poniżej 15°C następuje zmniejszenie efektywności nitryfikacji, w wyniku czego w ściekach oczyszczonych zwiększa się stężenie azotu amonowego (Young i in., 2017), a w temperaturze ok. 5°C utlenianie azotu amonowego ulega całkowitemu zahamowaniu (Miksch i Sikora, 2010). W przypadku bakterii NOB sytuacja przedstawia się zupełnie inaczej. W zakresie temperatur od 5 do 15°C szybkość ich przyrostu jest wyższa, w porównaniu do szybkości wzrostu bakterii AOB (Yang i in., 2007). Z kolei w temperaturze 30°C szybkość wzrostu bakterii NOB jest hamowana i jest niższa niż bakterii AOB w tej samej temperaturze (Shiu i in., 2024).

pH i zasadowość

Nitryfikatory to organizmy mogące rozwijać się w szerokim zakresie pH. Jak podają Ruiz i in. (2003) pH niższe niż 6,45 i wyższe niż 8,95 powoduje zahamowanie utleniania zarówno azotu amonowego jak i azotu azotynowego. pH odgrywa istotną rolę w aktywności enzymów nitryfikacyjnych. W literaturze istnieje wiele różnych informacji odnośnie optymalnego odczynu dla poszczególnych grup mikroorganizmów prowadzących proces nitryfikacji. W badaniach przeprowadzonych przez Grunditz i Dalhammar (2001) ustalono, że optymalne wartości pH dla bakterii AOB i NOB wynoszą odpowiednio 8,1 i 7,9. Równocześnie, obserwowano, że przy wartościach pH wynoszących 6,5 lub 9,0, aktywność NOB spadała do około 20%, podczas gdy aktywność AOB zmniejszała się odpowiednio do 17% i 60%. Podobne

wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych przez Park i in. (2007). Cytowani autorzy wykazali, że optymalne pH dla bakterii AOB wynosiło $8,3 \pm 0,3$, a dla NOB $7,9 \pm 0,4$. Dodatkowo zaobserwowali, że bakterie NOB były bardziej wrażliwe na zmiany pH niż AOB. Natomiast Jiménez i in. (2011) ustalili, że pH poniżej 6,5 całkowicie hamowało aktywność NOB, podczas gdy wysokie pH nie miało wpływu na tę grupę mikroorganizmów. Aktywność NOB była podobna w zakresie pH od 7,5 do 9,95.

Kolejnym bardzo istotnym czynnikiem, mającym bezpośredni wpływ na utrzymanie odpowiedniego pH, jest poziom zasadowości ścieków. Podczas pierwszej fazy nitryfikacji, jak i w skutek syntezy biomasy, dochodzi do zużycia zasadowości. Z równania stechiometrycznego procesu nitryfikacji wynika, że w wyniku utleniania 1 g N-NH_4^+ zasadowość ścieków zmniejsza się o 7,14 g CaCO_3 (Dymaczewski i in., 1997). W przypadku, kiedy zasadowość ścieków jest zbyt niska, może wystąpić nadmierna, mogąca spowodować zakłócenie przebiegu procesu, zmiana odczynu.

Wiek biomasy

Pomyślny przebieg procesu nitryfikacji, zarówno w układach opartych na osadzie czynnym, jak również w tych działających w oparciu o biomasę rozwijającą się w postaci biofilmu, zależy również od wieku biomasy (ang. *solids retention time* – SRT). Parametr ten odgrywa kluczową rolę w kontroli ilości mikroorganizmów rozwijających się w reaktorze (Okabe i in., 2011). Warto podkreślić, że szybkość wzrostu bakterii autotroficznych jest znacznie niższa niż heterotrofów, co czyni SRT niezwykle istotnym w kontekście zatrzymywania w układzie wolno rosnących bakterii nitryfikacyjnych (Khanongnuch i in., 2019). Minimalny wiek biomasy niezbędny do uzyskania pełnej nitryfikacji wynosi 8-10 dni. Powolny wzrost nitrifikatorów, wynikający z ich naturalnie długiego czasu generacji, sprawia, że zbyt krótki wiek biomasy prowadzi do wypłukiwania tych mikroorganizmów z systemów oczyszczania ścieków. Uważa się, że bakterie AOB mają znacznie wyższy współczynnik tempa wzrostu niż NOB (Munz i in., 2011). Jednym z rozwiązań wspomagających rozwój nitrifikatorów w układach jest zastosowanie technologii złoża ruchomego. To rozwiązanie technologiczne pozwala na zapewnienie dłuższego SRT niż w konwencjonalnej technologii osadu czynnego, co sprzyja powolnemu wzrostowi bakterii nitryfikacyjnych (Shao i in., 2017).

Tlen

Kolejnym bardzo istotnym czynnikiem determinującym przebieg procesu nitryfikacji jest stężenie tlenu rozpuszczonego (ang. *dissolved oxygen* – DO) w reaktorze biologicznym.

Zgodnie z równaniami 3.1. i 3.2., sumaryczne zapotrzebowanie na tlen podczas nitryfikacji wynosi 4,57 g O₂/g N. Do utleniania 1g N-NH₄⁺ do N-NO₂⁻ potrzeba 3,43 g O₂, natomiast do utleniania 1g N-NO₂⁻ do N-NO₃⁻ niezbędne jest 1,14 g O₂. W praktyce wartość ta jest nieco niższa i wynosi 4,25 g O₂/g N (Crites i Tchobanglous, 1998; Miksh i Sikora, 2010). Dzieje się tak dlatego, że część azotu amonowego nie jest utleniana do azotanów, a wykorzystywana do syntezy nowej biomasy. Z kolei pewna część azotynów jest redukowana do azotu gazowego w niedotlenionych miejscach komory napowietrzania.

Istotnym jest również fakt, że bakterie NOB wykazują większe powinowactwo do tlenu niż bakterie AOB, co może skutkować ich wypłukiwaniem z reaktorów przy niskich poziomach tego wskaźnika (Ciudad i in., 2007). Z uwagi na to, że współczynnik półnasyceń tlenu bakterii AOB (0,2-0,4 mg O₂/l) jest niższy niż NOB (0,7-2,0 mg O₂/l), wartości stężenia tlenu poniżej 0,5 mg O₂/l mogą sprzyjać wzrostowi AOB, podczas gdy równolegle obserwowana będzie wówczas supresja NOB (Mishra i in., 2022). Prowadzenie procesów oczyszczania ścieków przy niskich stężeniach tlenu jest więc zalecane w celu uzyskania efektywnej supresji NOB i zatrzymania nitryfikacji na jej pierwszym etapie (Zeng i in., 2013; Ma i in., 2015; Wang i in., 2019, Su i in., 2023). Dobór odpowiedniego poziomu stężenia tlenu, przy którym prowadzony jest proces nitryfikacji, zależy również od formy, w jakiej biomasa rozwija się w reaktorze. Dzieje się tak ze względu na opór dyfuzyjny powstający w biofilmie i kłaczkach osadu czynnego. Współczynnik półnasyceń tlenu jest w biofilmie nawet 10-krotnie wyższy niż w osadzie czynnym, co świadczy o mniejszym transporcie tlenu wewnątrz biofilmu (Shao i in., 2017). Według Wang i in. (2006) oraz Water Environment Federation (2005) stężenie tlenu do usuwania substancji organicznych i zapewnienia całkowitej nitryfikacji w MBBR powinno być wyższe niż 2 mg O₂/l, w przeciwnym razie DO może być czynnikiem limitującym. Aspekty związane z wpływem stężenia tlenu zostaną omówione w kolejnym rozdziale.

Inhibitory procesu nitryfikacji

Proces nitryfikacji może być hamowany przez obecność wysokich stężeń wolnego amoniaku (ang. *free ammonia* – FA) i wolnego kwasu azotowego (III) (ang. *free nitrous acid* – FNA) (Anthonisen i in., 1976). Choć FA uważany jest za główny substrat azotowy dla bakterii AOB (Suzuki i in., 1974), jego nadmierny poziom może negatywnie wpływać na każdy etap procesu nitryfikacji. Wzrost pH, temperatury i stężenia N-NH₄⁺ prowadzi do zwiększenia ilości wolnego amoniaku, co niekorzystnie wpływa na mikroorganizmy nitryfikacyjne. Bakterie utleniające azotyny do azotanów są bardziej wrażliwe na działanie FA niż bakterie

AOB. Wykazano, że inhibicja NOB pojawia się przy stężeniach FA powyżej 0,10 mg FA/l, a całkowite zahamowanie ich aktywności następuje powyżej stężenia 1,0 mg FA/l. Dla bakterii AOB te wartości progowe wynoszą odpowiednio 10 mg FA/l i 150 mg FA/l (Anthonisen i in., 1976). Późniejsze badania wykazały inne poziomy progowe hamujące nitryfikację. Przykładowo, Kim i in. (2006) zaobserwowali, że aktywność NOB zmalała o ok. 50% przy stężeniu FA wynoszącym 0,70 mg FA/l, podczas gdy Balmelle i in. (1992) stwierdzili, że aktywność AOB zmniejszyła się o 40% przy stężeniu FA wynoszącym 25 mg FA/l (hodowla wzbogacona o *Nitrosomonas*). Z kolei Vadivelu i in. (2007) podali, że hamowanie NOB na skutek FA odnotowano już poniżej 1 mg FA/l, a całkowita inhibicja wystąpiła przy stężeniu powyżej 6 mg FA/l. Dla porównania, nie stwierdzono hamowania AOB, dopóki stężenie tego inhibitora nie przekroczyło 16 mg FA/l (Vadivelu i in., 2006). Ta kluczowa różnica wykorzystywana jest do osiągnięcia akumulacji azotynów w celu uzyskania procesu skróconej nitryfikacji. W pracy Chung i in. (2007) zauważono, że przy poziomie 20 mg FA/l współczynnik kumulacji azotynów osiągnął aż 90%, co sugeruje niemal całkowite zatrzymanie aktywności bakterii drugiej fazy nitryfikacji. W badaniach przeprowadzonych przez Hellinga i in. (1999) odnotowano inhibicję bakterii *Nitrosomonas* przy stężeniu FA na poziomie 70 mg FA/l. Warto jednak zauważyć, że cytowani autorzy tak wysoką wartość utożsamiali ze specyficznymi warunkami hodowli. Biomasa była już wcześniej poddana działaniu wysokiego stężenia amoniaku, co mogło wpłynąć na jej ewentualną aklimatyzację do wyższych stężeń FA.

Podobnie jak w przypadku oddziaływana FA, również od stężenia FNA zależy, w jakim stopniu będzie on oddziaływał na poszczególne typy bakterii nitryfikacyjnych różniących się pod względem oporności (Meng i in., 2022). Według badań Anthonisen (1976) inhibicja bakterii nitryfikacyjnych rozpoczyna się przy stężeniu FNA wynoszącym powyżej 0,20 mg FNA/l, a całkowite zahamowanie ich aktywności następuje powyżej 2,80 mg FNA/l. Pedrouso i in. (2017) dowiedli, że *Nitrospirę* (należąca do NOB) całkowicie hamuje stężenie FNA już na poziomie 0,02 mg FNA/l, natomiast w przypadku *Nitrobacter* (należącego również do NOB) jest ono dwa rzędy wielkości wyższe. 90% redukcję aktywności tych mikroorganizmów obserwowano przy stężeniu FNA na poziomie 1,0 mg FNA/l (Blackburne i in., 2007). W przypadku bakterii AOB wykazano, że stężenie FNA w zakresie 0,42-1,72 mg FNA/l skutkowało 50% redukcją aktywności tej grupy mikroorganizmów (Zhou i in., 2011). Vadivelu i in. (2006) odnotowali, że hamowanie wzrostu bakterii *Nitrosomonas* rozpoczęło się przy stężeniu FNA około 0,10 mg FNA/l. Gdy stężenie inhibitora wynosiło 0,40 mg FNA/l ich biosynteza została całkowicie zatrzymana. Aczkolwiek

mikroorganizmy, które już znajdowały się w układzie, zachowywały swoją aktywność w utlenianiu azotu amonowego nawet po ekspozycji na 0,50-0,63 mg FNA/l.

Poza FA i FNA obecność w ściekach substancji toksycznych, takich jak metale ciężkie (kadm, miedź, cynk, nikiel, rtęć, srebro i chrom), pestycydy, fenole i rozpuszczalniki organiczne, może być również przyczyną wystąpienia inhibicji procesu nitryfikacji (Çeçen i in., 2010).

3.4. Strategia napowietrzania: znaczenie dla efektywnej nitryfikacji i redukcji zużycia energii w oczyszczalniach ścieków

Dobór odpowiedniej strategii napowietrzania ma kluczowe znaczenie dla efektywności procesu nitryfikacji. Powietrze do reaktorów biologicznych może być dostarczane w trybie ciągłym lub naprzemiennym, a każde z tych rozwiązań znajduje szerokie zastosowanie w oczyszczalniach ścieków. Naprzemienne napowietrzanie pozwala jednak na bardziej efektywne usuwanie azotu oraz znaczącą redukcję zużycia energii w całym przedsiębiorstwie. Popularność tej metody potwierdzają liczne badania (Tabela 3.2.).

Strategię naprzemiennego napowietrzania stosuje się zarówno w reaktorach przepływowych (Cao i in., 2013), jak i sekwencyjnych (Yang i Yang, 2011; Huang i in., 2020). Jest ona aplikowana w systemach opartych na osadzie czynnym (Bao i in., 2017), biofilmie (Luan i in., 2022) oraz w rozwiązaniach hybrydowych (Singh i in., 2017; Di Bella i Mannina, 2020). Ponadto rozwiązanie to sprawdza się przy wielostopniowo zasilanych sekwencyjnych reaktorach porcjowych (ang. *sequencing batch reactor* – SBR) (Guerrero i in., 2016; Sun i in., 2018) oraz w wieloetapowych procesach w układzie anoksyczno-tlenowym (A/O) (Cao i in., 2013; Chen i in., 2023), pozwalając na zwiększenie efektywności wykorzystania źródeł węgla organicznego. Uniwersalność i skuteczność tej metody dostarczania tlenu do reaktora biologicznego sprawiają, że jest to istotne narzędzie, przyczyniające się do poprawy wydajności biologicznych procesów oczyszczania ścieków przy jednoczesnym zminimalizowaniu kosztów energetycznych i środowiskowych. Stwierdzono również, że strategia ta pozwala na stworzenie optymalnych warunków do procesu symultanicznej nitryfikacji i denitryfikacji, co przekłada się na dalsze zwiększenie efektywności usuwania azotu ze ścieków (Feng i in., 2018).

Istotnym aspektem poruszonym w pracach naukowych w odniesieniu do strategii naprzemiennego napowietrzania jest jej wpływ na supresję bakterii NOB. Zjawisko to wynika z różnic w dynamice „odzyskiwania” aktywności bakterii AOB i NOB po okresach, w których tlen nie jest dostarczany do układu. W fazach bez napowietrzania zarówno AOB, jak i NOB

przechodzą w stan „głodowania” z powodu braku tlenu, jednak NOB znacznie wolniej odzyskują pełną aktywność po ponownym dostarczeniu tlenu. Jeśli faza napowietrzania zakończy się, zanim NOB w pełni wrócą do swojej aktywności, ich wzrost zostaje zahamowany, co prowadzi do ich supresji (Miao i in., 2022). Dodatkowo, supresja NOB podczas naprzemiennego napowietrzania wynika z różnic w kinetyce wzrostu poszczególnych grup nityfikatorów. Szybkość wzrostu bakterii NOB w warunkach niskiego stężenia tlenu, spowodowanego wprowadzeniem faz bez napowietrzania, jest znacznie niższa niż u bakterii AOB (Ma i in., 2015). Warto również podkreślić, że w takich warunkach aktywność bakterii utleniających azot amonowy jest wyższa niż tych utleniających azotyny. Wynika to z faktu, że stała pónasycenia tlenem dla AOB jest niższa niż dla NOB, co sprawia, że przy mniejszej dostępności tlenu ilość NOB w biomacie stopniowo się zmniejsza (Manser i in., 2005). Liczne badania wskazują, że jest to skuteczna metoda pozwalająca na osiągnięcie częściowej nityfikacji (Yang i Yang, 2011; Ma i in., 2015). Przykładowo, Ma i in. (2015), prowadząc badania w SBR przy stężeniu tlenu w fazach tlenowych na poziomie 0,08-0,25 mg O₂/l i porównując różne czasy trwania podfaz z (t₁) i bez (t₂) napowietrzania, R=t₂/t₁ (t₁=30 min, t₂=30 min, R=1; t₁=30 min, t₂=60 min, R=2; t₁=15 min, t₂=90 min, R=6; t₁=15 min, t₂=15 min, R=1), odnotowali najwyższą kumulację NO₂⁻ (27,3 mg NO₂⁻/l) przy największej wartości R. Z kolei Katsogiannis i in. (2003) zaobserwowali ponad 95% kumulację azotu azotynowego, przypisując to stłumieniu aktywności NOB ze względu na krótki czas trwania podfazy z napowietrzaniem (t₁=20 min, t₂=60min; R=1/3, DO=2-6,5 mg O₂/l). Równie wysoką akumulację azotynów, wynoszącą 92,25%, wykazali Li i in. (2011) stosując strategię naprzemiennego napowietrzania z jednoczesnym utrzymaniem niskiego DO (t₁=30 min, t₂=10 min; R=1/3, DO=0,2 mg O₂/l). Yang i Yang (2011) odnotowali wzrost kumulacji NO₂⁻ z 4,50% do 49,10% po wydłużeniu czasu trwania podfaz bez napowietrzania z 2 min do 4 min (zmiana z t₁=2 min, t₂=2 min, R=1 na t₁=2 min, t₂=4 min, R=2). Uzykali wówczas kumulację NO₂⁻ na poziomie 79,40% (eksperyment przeprowadzono w bioreaktorze membranowym ze złożem ruchomym). Obserwacje te utożsamiano z zahamowaniem aktywności NOB, a nie z ich całkowitym wypłukaniem z reaktora. Bhatia i in. (2017), badając wpływ naprzemiennego napowietrzania na różnorodność mikrobiologiczną w laboratoryjnym modelu hybrydowego reaktora ze stacjonarnym złożem w postaci kurtyń, wykazali, że zmniejszenie wartości R z 0,66 do 0,20 wiązało się ze spadkiem liczebności bakterii z rodzaju *Nitrospira*, które zidentyfikowano jako dominującą grupę bakterii utleniających azotyny.

Uważa się, że wprowadzenie naprzemiennego napowietrzania może mieć największe znaczenie aplikacyjne w porównaniu do innych metod supresji NOB. Coraz więcej badaczy stwierdza, że bakterie utleniające azotyny po długotrwałej ekspozycji mogą aklimatyzować się do niskich stężeń DO, wysokich stężeń FA i FNA (Li i in., 2012; Liu i Wang, 2013; Ma i in., 2017; Le i in., 2023).

W niniejszej dysertacji strategię napowietrzania zdefiniowano poprzez stosunek czasu trwania podfaz z i bez napowietrzania oraz poziom stężenia tlenu w podfazach z napowietrzaniem. Często bowiem w badaniach łączy się te dwa aspekty (Li i in., 2011; Bao i in., 2017; Liu i in., 2021b). Warto podkreślić, że właściwy dobór poziomu stężenia tlenu ma istotny wpływ na proces nitryfikacji. Poza wspomnianym już w poprzednim rozdziale wpływie niskiego stężenia tlenu na supresję NOB, czynnik ten wpływa również na rozwój innych mikroorganizmów zdolnych do prowadzenia nitryfikacji. Przykładowo, bakterie nitryfikacyjne zaliczane do *Nitrosospira*, czy *Nitrosomonas oligotropha* wykazują wyższą aktywność w warunkach niższego stężenia tlenu (Park i in., 2002). Niższe stężenie tlenu jest również jednym z czynników uważanych przez niektórych badaczy za korzystne dla bakterii Comammox (Camejo i in., 2017; Roots i in., 2019). Liu i in. (2021b) prowadząc badania w dwóch reaktorach SBR, różniących się między sobą zastosowaną strategią napowietrzania, znacznie większą częstość występowania bakterii Comammox stwierdzili w reaktorze, który pracował przy napowietrzaniu naprzemiennym (SBR1) i stężeniu tlenu poniżej 0,40 mg O₂/l (średnio 0,14 mg O₂/l), niż w tym pracującym przy napowietrzaniu ciągłym (SBR2) (stężenie tlenu na poziomie 0,29-0,65 mg O₂/l, wartość średnia 0,40 mg O₂/l). Autorzy zasugerowali, że niższe stężenie tlenu w naprzemiennie napowietrzanym SBR1 może sprzyjać rozwojowi bakterii Comammox, ponieważ posiadają one specjalne zestawy genów, które pozwalają im na adaptację do warunków mikroaerofilnych (Lawson i Lücker, 2018; Palomo i in., 2018). Niektóre badania udokumentowały jednak brak związku między poziomem stężenia tlenu a występowaniem bakterii Comammox (Cotto i in., 2020; Wang i in., 2018; Zhao i in., 2022b). Na przykład Zhao i in. (2022b) prowadząc badania w MBBR, zaobserwowali selektywne wzbogacenie bakterii Comammox, gdy stężenie tlenu wynosiło ponad 6 mg O₂/l. Z kolei Wang i in. (2018) odnotowali wysoką liczebność bakterii Comammox w oczyszczalniach ścieków z osadem czynnym pracujących przy stężeniu wyższym niż 3,5 mg O₂/l.

Tabela 3.2. Zestawienie badań prowadzonych przez różne grupy badawcze w obszarze naprzemiennego napowietrzania ścieków

Lp.	Rodzaj układu	Realizowany proces	Forma biomasy	Rodzaj ścieków	Strategia napowietrzania	Źródło
1.	Laboratoryjny model reaktora SBR	N	osad czynny	ścieki bytowe po wcześniejszym usuwaniu związków organicznych	R=1 ($t_1=10$ min, $t_2=10$ min) DO: $0,30 \pm 0,14$ mg O_2/l lub DO: $1,80 \pm 0,32$ mg O_2/l	Bao i in. (2017)
2.	Laboratoryjny model reaktora SBR	N/D	osad czynny	ścieki syntetyczne	R=1/3 ($t_1=30$ min, $t_2=10$ min) DO=0,20 mg O_2/l	Li i in. (2011)
3.	Laboratoryjne modele sekwencyjnych reaktorów porcjowych (SBR): SBR1 – z napowietrzaniem naprzemiennym SBR2 – z napowietrzaniem ciągłym	N/D	osad czynny	ścieki syntetyczne	SBR1: R=1 ($t_1=30$ min, $t_2=30$ min) DO< 0,40 mg O_2/l (wartość średnia 0,14 mg O_2/l) SBR2: R=0 DO= 0,29-0,65 mg O_2/l (wartość średnia 0,40 mg O_2/l)	Liu i in. (2021b)
4.	Laboratoryjny model reaktora membranowego ze złożem ruchomym (MBMBR)	SND	biłona biologiczna + osad czynny	ścieki syntetyczne	R=0 R=1 ($t_1=2$ min, $t_2=2$ min) R=2 ($t_1=2$ min, $t_2=4$ min)	Yang i Yang (2011)
5.	Laboratoryjny model reaktora SBR	N/D	osad czynny	ścieki syntetyczne	W jednym cyklu napowietrzanie odbywało się w kolejnych fazach: 60 min bez napowietrzania, 60 min z napowietrzaniem, 240 min bez napowietrzania, 20 min z napowietrzaniem, 200 min bez napowietrzania, 20 min z napowietrzaniem	Huang i in. (2020)
6.	Laboratoryjny model reaktora ze złożem ruchomym (MBBR)	N/D	biłona biologiczna	ścieki bytowe	R=1 ($t_1=60$ min, $t_2=60$ min) DO=0,1-4,0 mg O_2/l R=1 ($t_1=60$ min, $t_2=60$ min) DO=0,1-2,5 mg O_2/l R=1 ($t_1=15$ min, $t_2=15$ min) DO=0,1-1,0 mg O_2/l	Luan i in. (2022)
7.	Laboratoryjny model reaktora hybrydowego ze złożem stacjonarnym w postaci kurtyn	N/D	biłona biologiczna + osad czynny	ścieki syntetyczne	R=0,20 ($t_1=2,5$ h, $t_2=0,5$ h) R=0,50 ($t_1=2$ h, $t_2=1$ h) R=0,66 ($t_1=1,5$ h, $t_2=1$ h) DO=3,0 mg O_2/l	Singh i in. (2017)

Lp.	Rodzaj układu	Realizowany proces	Forma biomasy	Rodzaj ścieków	Strategia napowietrzania	Źródło
8.	Laboratoryjny model hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym (IFAS-MBBR)	N/D	biłona biologiczna + osad czynny	ścieki syntetyczne	R=0 R=1 ($t_1=15$ min, $t_2=15$ min, $t_1=30$ min, $t_2=30$ min) R=1/2 ($t_1=40$ min, $t_2=20$ min)	Di Bella i Mannina (2020)
9.	Laboratoryjny model reaktora SBR ze stopniowym dawkowaniem ścieków	SND	osad czynny	ścieki syntetyczne	R=0,66 ($t_1=8,5$ h, $t_2=5,5$ h)	Guerrero i in. (2016)
10.	Laboratoryjny model reaktora SBR ze stopniowym dawkowaniem ścieków pracujący w strategii wieloetapowego A/O	ND	osad czynny	ścieki syntetyczne	R=1 ($t_1=30$ min, $t_2=30$ min)	Sun i in. (2018)

N – nitryfikacja; N/D – nitryfikacja/denitryfikacja; SND – symultaniczna nitryfikacja i denitryfikacja; A/O – (układ anoksyczno-tlenowy, ang. *anoxic-oxic*).

3.5. Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie

Globalne zużycie energii elektrycznej stale rośnie z powodu wzrostu liczby ludności, industrializacji i rozwoju technologicznego. Według Międzynarodowej Agencji Energetycznej, w 2019 roku całkowite światowe zużycie energii elektrycznej wyniosło 22 848 TWh (IEA, 2021). Amerykańska Administracja Informacji Energetycznej wskazuje, że do 2022 roku wartość ta zwiększyła się o ponad 16%, co odzwierciedla wysoki wskaźnik wzrostu w ciągu zaledwie dwóch lat (U.S. EIA, 2023).

Oczyszczalnie ścieków są istotnymi konsumentami energii, odpowiadając za około 4% całkowitego światowego zużycia energii elektrycznej (IEA, 2017). Energia wykorzystywana jest do różnych celów, m.in. do zasilania pomp, dmuchaw, mieszadeł i innych urządzeń stosowanych w procesach oczyszczania. Ponadto energia elektryczna służy do zasilania systemów monitorowania, kontroli i sterowania oraz oświetlenia terenów oczyszczalni ścieków i budynków administracyjno-użytkowych. Od 25% do 60% kosztów operacyjnych w konwencjonalnych oczyszczalniach ścieków związanych jest ze zużyciem energii na wszystkie wymienione cele, przy czym napowietrzanie może stanowić 50-75% całkowitego zapotrzebowania na energię w tego typu obiektach (Luo i in., 2019). Nieefektywne napowietrzanie może prowadzić do strat energii sięgających nawet 40% całkowitego zużycia energii w procesie oczyszczania ścieków (Foladori i in., 2015), co znacząco wpływa na koszty eksploatacyjne całego przedsiębiorstwa. Zapotrzebowanie energetyczne oczyszczalni ścieków będzie się różnić w zależności od jej lokalizacji i warunków środowiskowych otoczenia, rozmiaru oczyszczalni, przepływu ścieków, wartości obciążenia reaktora biologicznego ładunkiem zanieczyszczeń, docelowej jakości oczyszczonych ścieków, rodzaju systemu napowietrzania oraz sposobu określania zużycia energii elektrycznej (Zhang i in., 2016a; Cardoso i in., 2021). Przykładowo, zużycie energii elektrycznej w konwencjonalnych systemach oczyszczania wykorzystujących metodę osadu czynnego waha się w zakresie 0,0786-3,18 kWh/m³. Dla zraszanych i tarczowych złóż biologicznych zużycie energii elektrycznej określono w zakresie odpowiednio 0,19-1,82 kWh/m³ i 0,012-1,206 kWh/m³ (Tabela 3.3.). Niewiele jest jednak danych dotyczących oczyszczalni ścieków wykorzystujących technologię złoża ruchomego.

Wśród proponowanych rozwiązań mających na celu minimalizację zużycia energii na napowietrzanie, jako jedną z głównych metod wyróżniono naprzemienne napowietrzanie. Badania w tym kierunku przeprowadzono dla systemów z osadem granulowanym (Huang i in., 2021), osadem czynnym (Sun et al., 2018), błoną biologiczną (Yang i in., 2015) oraz dla

rozwiązań hybrydowych (Singh et al., 2017). Stwierdzono, że zastosowanie takiego reżimu napowietrzania pozwala na osiągnięcie porównywalnych lub nawet lepszych efektywności w usuwaniu azotu niż przy napowietrzaniu ciągłym, przy jednoczesnym mniejszym zużyciu energii elektrycznej. Yang i in. (2015) wykazali, że przy zachowaniu zbliżonego poziomu stężenia tlenu ($1,5 \text{ mg O}_2/\text{l}$), zarówno przy napowietrzaniu ciągłym, jak i naprzemiennym ($R=1/3$; $t_1=15 \text{ min}$, $t_2=45 \text{ min}$), skuteczność usuwania azotu ze ścieków była porównywalna. Naprzemienne napowietrzanie okazało się bardziej opłacalne ze względu na oszczędności związane ze zużyciem energii elektrycznej do zasilania dmuchaw. Z badań Huang i in., (2021) wynika natomiast, że wprowadzenie naprzemiennego napowietrzania pozwoliło zmniejszyć zużycie energii na napowietrzanie o 40%. Prac na ten temat jednak wciąż jest niewiele, a jeszcze mniej z nich skupia się na dokładnym określeniu zużycia energii elektrycznej przez dmuchawy napowietrzające. Jest to istotna kwestia, ponieważ dane dotyczące zużycia energii przy różnych wariantach naprzemiennego napowietrzania umożliwią ocenę możliwości ich aplikacji i ekonomicznych korzyści wynikających z zastosowania. To z kolei może prowadzić do ulepszeń technologicznych, udoskonalania procesów i bardziej zrównoważonego wykorzystania energii elektrycznej.

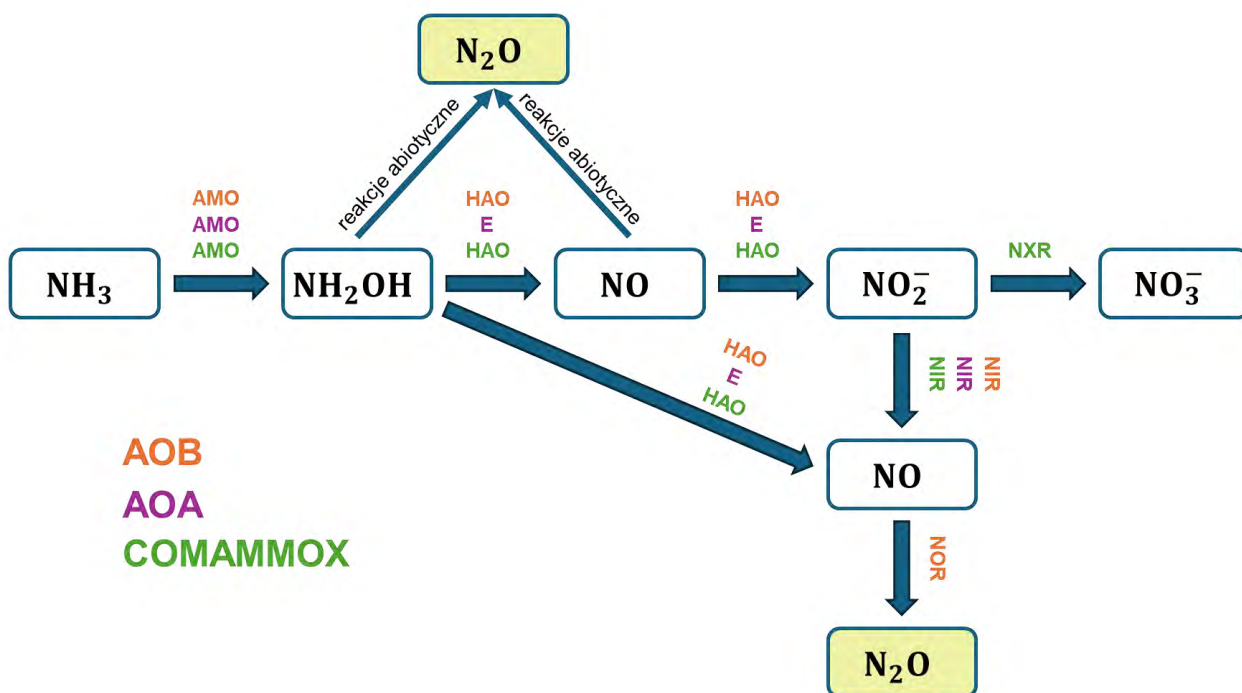
Tabela 3.3. Zużycie energii elektrycznej podczas oczyszczania ścieków dla różnych rozwiązań technologicznych

Lp.	Technologia oczyszczania ścieków	Forma biomasy	Zużycie energii (kWh/m ³)	Źródło
1.	CAS	osad czynny	0,109-1,630 (0,631)	Molinos-Senante i in. (2018b)
2.	CAS	osad czynny	0,11-1,78 (0,52)	Molinos-Senante (2018a)
3.	CAS	osad czynny	0,33-0,60	Gude (2015)
4.	CAS	osad czynny	0,27-1,89	Vergara-Araya i in. (2021)
5.	MBR	osad czynny	0,10-0,82	Wakeel i in. (2016)
6.	MBR	osad czynny	0,39-0,89 (0,52)	Wang i in. (2020b)
7.	CAS	osad czynny	0,0845-3,18	Zhang i in. (2016a)
8.	SBR	osad czynny	0,0786-1,61	Zhang i in. (2016a)
9.	A2/O	osad czynny	0,091-2,28	Zhang i in. (2016a)
10.	AS	osad czynny	0,33-0,61	Wang i in. (2016b)
11.	AS	osad czynny	0,18-0,96	Gurung i in. (2018)
12.	AS	osad czynny	0,128-2,280 (0,903)	Siatou i in. (2020)
13.	CAS	osad czynny	0,88	Christoforidou i in. (2020)
14.	AS	osad czynny	0,45	Vaccari i in. (2018)
15.	CAS	osad czynny	0,4-0,9	Brôco i in. (2017)
16.	TF	błona biologiczna	0,085-1,316 (0,550)	Molinos-Senante i in. (2018b)
17.	RBC	błona biologiczna	0,012-1,206 (0,399)	Molinos-Senante i in. (2018b)
18.	TF	błona biologiczna	0,19-1,82 (0,55)	Molinos-Senante (2018a)
19.	TF	błona biologiczna	0,18-0,42	Gude (2015)
20.	TF	błona biologiczna	0,19-0,41	Wang i in. (2016b)

A/O (układ anoksyczno-tlenowy, ang. *anoxic-oxic*); A2/O (układ beztlenowo-anoksyczno-tlenowy, ang. *anaerobic-anoxic-oxic*); AS (osad czynny, ang. *activated sludge*); CAS (konwencjonalny osad czynny, ang. *conventional activated sludge*); MBR (reaktor membranowy, ang. *membrane bioreactor*); RBC (tarczowe złoża biologiczne, ang. *rotating biological contactor*); SBR (sekwencyjny reaktor porcjowy, ang. *sequencing batch reactor*); TF (zraszane złoża biologiczne, ang. *trickling filter*).

3.6. Nitryfikacja a emisja N₂O

Jak już wspomniano we wstępie, podtlenek azotu stanowi jeden z produktów ubocznych procesu nitryfikacji. Na emisję N₂O podczas nitryfikacji wpływa wiele czynników, takich jak stężenie tlenu, pH oraz stężenie azotynów (Kampschreur i in., 2009; Desloover i in., 2012; Massara i in., 2017). Do generowania N₂O podczas nitryfikacji dochodzi w wyniku dwóch różnych mechanizmów, istnieją bowiem dwie ścieżki metaboliczne bakterii AOB prowadzące do produkcji tego silnego gazu cieplarnianego (Rysunek nr 3.1.).



Rysunek 3.1. Szlaki produkcji N₂O podczas procesu nitryfikacji. Enzymy wykorzystywane do utleniania azotu amonowego przez poszczególne grupy bakterii utleniających oznaczono kolorami: pomarańczowym dla AOB (ang. *ammonia oxidizing bacteria*), fioletowym dla AOA (ang. *ammonia oxidizing archaea*) i zielonym dla bakterii Comammox (ang. *complete ammonia oxidizing bacteria*).

Pierwszy mechanizm opiera się na niepełnym utlenianiu hydroksyloaminy do azotynów. Podczas utleniania NH₂OH do NO₂⁻ w obecności HAO jako produkt uboczny powstaje tlenek azotu (NO), który następnie redukowany jest do N₂O poprzez reduktazę tlenku azotu (ang. *nitric oxide reductase* – NOR) (Sabba i in., 2018; Zhao i in., 2022a). Emisja N₂O na drodze niepełnego utleniania hydroksyloaminy zachodzi głównie w warunkach tlenowych, gdy stężenie tlenu jest na wysokim poziomie oraz gdy stężenie NO₂⁻ jest relatywnie wysokie (Hu i in., 2011; Peng i in., 2014). W przypadku, gdy stężenie tlenu spada, ale w dalszym ciągu jego ilość jest wystarczająca, aby umożliwić utlenianie azotu amonowego, dominuje drugi

mechanizm tworzenia się N_2O . Bakterie nitryfikacyjne z rodzaju *Nitrosomonas* (zaliczanych do AOB) produkują wówczas N_2O w wyniku redukcji NO_2^- w warunkach niskiego stężenia tlenu, podczas autotroficznej denitryfikacji (Chen i in., 2018; Liu i in., 2021b). Denitryfikacja zachodząca przy udziale bakterii AOB jest dość nietypowym procesem, azot amonowy jest wówczas utleniany do azotynów, a następnie redukowany do tlenku azotu poprzez reduktazę azotynową (ang. *nitrite reductase* – NIR). NO jest następnie redukowany do podtlenku azotu (N_2O) przy udziale enzymu NOR. W związku z tym, że bakterie AOB nie posiadają enzymów odpowiedzialnych za redukcję N_2O , podtlenek azotu pozostaje produktem końcowym autotroficznej denitryfikacji. Uważa się, że przy przejściach z warunków beztlenowych/anoksyicznych do tlenowych lub z tlenowych do beztlenowych/anoksyicznych mogą nastąpić „skoki produkcji” N_2O , w wyniku braku równowagi elektronowej (Domingo-Félez i in. 2014; Sabba i in. 2015; Sabba i in., 2018). W związku z tym emisje podtlenku azotu mogą odgrywać istotną rolę w systemach, które obejmują etapy beztlenowe/anoksyiczne i tlenowe, a także w tych, które bazują na naprzemiennym napowietrzaniu. Według Su i in. (2017) oraz Zheng i in. (2021) stężenie tlenu rozpuszczonego i schemat w jakim tlen dostarczany jest do układu, mają znaczący wpływ na emisję N_2O . Według niektórych badań skutecznym sposobem redukcji emisji N_2O okazało się wprowadzenie naprzemiennego napowietrzania. Ni i in. (2013) stwierdzili, że zwiększenie częstotliwości przełączania pomiędzy fazą z i bez napowietrzania może prowadzić do zmniejszenia emisji N_2O . Liu i in. (2021b), badając emisję N_2O w dwóch reaktorach SBR z osadem czynnym, zaobserwowali niższą emisję N_2O dla systemu pracującego z napowietrzaniem naprzemiennym SBR1 (średnio 0,19%) w porównaniu z systemem pracującym z ciągłym napowietrzaniem (SBR2) (średnio 0,42%) (Tabela 3.4.). Lo i in. (2010) sugerują, że wielkość emisji N_2O zależy również od formy w jakiej biomasa rozwija się w reaktorze oraz od stężenia tlenu rozpuszczonego. Z kolei Ren i in. (2024) wykazali, że obniżając stężenie tlenu i pH odpowiednio do 0,5 mg O_2/l i 6,3, przy jednoczesnym rosnącym stężeniu azotynów, radykalnie zwiększa się emisja N_2O w nitryfikacyjnym reaktorze bazującym na osadzie czynnym.

Ścieżki produkcji N_2O przy udziale AOA nie zostały jeszcze w pełni poznane i opisane, szczególnie z uwagi na fakt, że mikroorganizmy te występują głównie w środowiskach morskich i glebach. Wiadomo natomiast, iż mimo że w podobny sposób jak AOB prowadzą utlenianie azotu amonowego, to brakuje im jednak zdolności do enzymatycznego tworzenia N_2O poprzez niepełne utlenianie hydroksyloaminy czy autotroficzną

denitryfikację (Spang i in., 2012; Sabba i in., 2018). Mimo że kanoniczne geny NOR, które przekształcają NO w N_2O , nie zostały wykryte u AOA, w glebie i środowiskach morskich notuje się generowanie N_2O podczas utleniania amoniaku przez AOA (Stieglmeier i in., 2014). Może to wynikać z abiotycznego powstawania N_2O z NH_2OH lub NO (Lehtovirta-Morley, 2018), jak również z występowania nierozpoznanych do dziś enzymów.

Niewiele jest również informacji dotyczących emisji podtlenku azotu przez bakterie zdolne do przeprowadzania pełnej nitryfikacji. Na bazie dotychczasowych doniesień, uważa się, że bakterie Comammox mogą być „obiecującą alternatywą” dla AOB z uwagi na niższą emisję N_2O . W genomie tych mikroorganizmów, podobnie jak w przypadku AOA, brakuje bowiem enzymów NOR, co zamyka ścieżkę produkcji N_2O w wyniku redukcji NO (Camejo i in., 2017; Lawson i Lüscher, 2018; Palomo i in., 2018; Han i in., 2021). W rezultacie wydajność generowania N_2O jest stosunkowo niska w porównaniu do AOB, ponieważ N_2O pochodzi raczej z abiotycznej konwersji NH_2OH , pośredniego produktu utleniania azotu amonowego przez bakterie Comammox (Kits i in., 2019). Li i in. (2021) dowiedli, że w reaktorze, w którym dominowały bakterie Comammox, emisja N_2O była o 20% mniejsza niż w reaktorze z dominacją AOB. Do podobnych wniosków doszli Ren i in. (2024), którzy odnotowali, że współczynnik emisji N_2O w nitryfikacyjnym w reaktorze zdominowanym przez Comammox *Nitrospira* wyniósł 0,35%, natomiast w reaktorze zdominowanym przez kanoniczne AOB był on na poziomie 2,20% (Tabela 3.4.). Autorzy wykazali również, że zwiększając względną liczebność Comammox *Nitrospira* w środowisku, w którym wcześniej dominowały kanoniczne AOB, emisja N_2O podczas nitryfikacji zmniejszała się wykładniczo, co sugeruje, że mikroorganizmy te nie tylko bezpośrednio przyczyniają się do zmniejszenia tworzenia N_2O , ale także mogą wpływać na ilość N_2O wytwarzanego przez kanoniczne AOB.

Tabela 3.4. Wartości współczynników emisji N₂O dla różnych rozwiązań technologicznych oczyszczania ścieków

Lp.	Typ i konfiguracja reaktora	Realizowany proces	Forma biomasy	Współczynnik emisji N ₂ O	Źródło
1.	Laboratoryjny model tlenowego reaktora sekwencyjnego typu air-lift	SND	tlenowy osad granulowany	21,9±7,1%	Zhang i in. (2015)
2.	Laboratoryjny model anoksyczno-tlenowego reaktora sekwencyjnego typu airlift (R=1/5; t ₁ =225 min, t ₂ =45 min)		tlenowy osad granulowany	7,0±1,6%	
3.	Laboratoryjny model reaktora SBR ze stopniowym dawkowaniem ścieków pracujący w strategii wieloetapowego A/O; (R=1; t ₁ =30 min, t ₂ =30 min)	SND	osad czynny	4,38%	Sun i in. (2018)
4.	Laboratoryjny model reaktora SBR ze stopniowym dawkowaniem ścieków pracujący w strategii wieloetapowego A/O; (R=1; t ₁ =30 min, t ₂ =30 min)		osad czynny	4,66%	
5.	Laboratoryjny model reaktora SBR pracujący w strategii wieloetapowego A/O; napowietrzanie – 600 ml/min; (R=1; t ₁ =30 min, t ₂ =30 min)	N/D	osad czynny	10,1%	Wang i in. (2016a)
6.	Laboratoryjny model reaktora SBR pracujący w strategii wieloetapowego A/O; napowietrzanie – 1200 ml/min; (R=1; t ₁ =30 min, t ₂ =30 min)		osad czynny	2,3%	
7.	Laboratoryjny model reaktora SBR z napowietrzaniem naprzemiennym (SBR1); (R=1; t ₁ =30 min, t ₂ =30 min)	N/D	osad czynny	0,01-0,53%	Liu i in. (2021b)
8.	Laboratoryjny model reaktora SBR z napowietrzaniem ciągłym (SBR2)		osad czynny	0,11-2,09%	
9.	Laboratoryjny model reaktora SBR z napowietrzaniem ciągłym	N/D	biłona biologiczna	0,4%	Lo i in. (2010)
			osad czynny	4,2%	
			hybryda	21,2%	
10.	Oczyszczalnia ścieków w Helsinkach zlokalizowana całkowicie pod ziemią A/O; DO=3,5 mg O ₂ /l (w strefach napowietrzanych)	N/D	osad czynny	1,9-2,8%	Kosonen i in. (2016)
11.	Reaktor przepływowy z osadem czynnym	N/D	osad czynny	0,12%	Rodriguez-Caballero i in. (2014)
12.	Laboratoryjny model nityfikacyjnego reaktora membranowego; DO=2,0 mg O ₂ /l	N	osad czynny	0,11-0,36%	Liu i in. (2021a)
13.	Laboratoryjny model nityfikacyjnego reaktora membranowego; DO=0,40 mg O ₂ /l		osad czynny	0,042-0,27%	
14.	Laboratoryjny model reaktora membranowego z pełnym wymieszaniem; DO > 4,0 mg O ₂ /l (dominacja Comammox)	N	osad czynny	0,35%	Ren i in. (2024)
15.	Laboratoryjny model reaktora membranowego z pełnym wymieszaniem; DO > 4,0 mg O ₂ /l (dominacja kanonicznych AOB)		osad czynny	2,2%	

Lp.	Typ i konfiguracja reaktora	Realizowany proces	Forma biomasy	Współczynnik emisji N ₂ O	Źródło
16.	Laboratoryjny model reaktora membranowego pracujący przy wysokim stężeniu tlenu i słabo kwaśnym odczynie; DO > 2,0 mg O ₂ /l	N	osad czynny	0,09-0,40%	Li i in. (2021)
17.	Laboratoryjny model reaktora membranowego pracujący przy niskim stężeniu tlenu i słabo kwaśnym odczynie; DO=0,50 mg O ₂ /l		osad czynny	0,04-0,34%	
18.	Laboratoryjny model reaktora SBR; napowietrzanie 0,80 l/min	N	osad czynny	2,8%	Kampschreur i in. (2008)
19.	Laboratoryjny model tlenowego reaktora SBR; (DO=2,5-3,0 mg O ₂ /l); pomiar emisji w testach porcjowych przy DO=0,2 mg O ₂ /l	N	osad czynny	10,6%	Peng i in. (2014)
20.	Laboratoryjny model tlenowego reaktora SBR; (DO=2,5-3,0 mg O ₂ /l); pomiar emisji w testach porcjowych przy DO=0,5 mg O ₂ /l		osad czynny	5,2%	
21.	Laboratoryjny model tlenowego reaktora SBR; (DO=2,5-3,0 mg O ₂ /l); pomiar emisji w testach porcjowych przy DO=2,0 mg O ₂ /l		osad czynny	2,4%	

SND – symultaniczna nityfikacja i denityfikacja; N – nityfikacja; N/D – nityfikacja/denitryfikacja; A/O (układ anoksyczno-tlenowy, ang. *anoxic-oxic*); SBR (sekwencyjny reaktor porcjowy, ang. *sequencing batch reactor*).

4. METODYKA BADAWCZA

4.1. Koncepcja realizacji pracy badawczej

Prace badawcze stanowiące podstawę niniejszej dysertacji zrealizowano w ramach 6 eksperymentów (Tabela 4.1.). Przeprowadzone eksperymenty umożliwiły określenie wpływu następujących zmiennych, determinujących przebieg i efektywność procesu nitryfikacji:

- 1) Strategia napowietrzania definiowana poprzez stosunek czasu trwania podfaz bez napowietrzania (t_2) do podfaz z napowietrzaniem (t_1) – $R=t_2/t_1$ oraz stężenie tlenu (DO) w podfazach z napowietrzaniem. Przeanalizowano następujące wartości tych parametrów:
 - wartości R w zakresie od 0 do 2,
 - stężenie tlenu w fazach tlenowych w zakresie od 1,0 do 6,0 mg O_2/l (w systemie sterującym określono wówczas maksymalną wartość stężenia tlenu) oraz stężenie tlenu wynikające z maksymalnej wydajności dmuchaw i warunków panujących w reaktorze (w systemie sterującym nie określono wówczas maksymalnej wartości stężenia tlenu; dmuchawy pracowały w sposób ciągły);
- 2) Temperatura symulująca warunki letnie – 20°C i zimowe – 12°C;
- 3) Obciążenie reaktora ładunkiem związków organicznych (OLR) w zakresie od 557 g ChZT/ $m^3 \cdot d$ do 0 g ChZT/ $m^3 \cdot d$;
- 4) Obciążenie reaktora ładunkiem azotu (NLR) w zakresie od 48 g N/ $m^3 \cdot d$ do 172 g N/ $m^3 \cdot d$.

Jako narzędzia służące śledzeniu zmian aktywności mikroorganizmów nitryfikacyjnych wykorzystano testy porcjowe umożliwiające wyznaczenie szybkości utleniania azotu amonowego (AUR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitUR). W zakres prowadzonej analizy wchodziły również badania jakości ścieków dopływających i odpływających z reaktorów (ChZT, BZT₅ (w wybranych seriach badawczych), $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, N_{og} , P_{og} , $P-PO_4^{3-}$, pH, zasadowość) oraz pomiar emisji podtlenku azotu (w wybranych seriach badawczych).

Poza testami technologicznymi do oceny zmian liczebności i różnorodności mikroorganizmów rozwijających się w analizowanych układach przeprowadzono badania mikrobiologiczne, wykorzystując ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction* – qPCR) i sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next-generation*

sequencing – NGS). Badania mikrobiologiczne realizowano przy współpracy z Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie.

Tabela 4.1. Koncepcja realizacji pracy badawczej – wyróżnione zagadnienia i eksperymenty

Zagadnienie badawcze	Eksperyment badawczy	Publikacja
Zagadnienie nr 1: Wpływ strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nityfikacji w reaktorach ze złożem ruchomym.	Eksperyment nr 1 (E1)	P1
	Eksperyment nr 2 (E2)	P2
	Eksperyment nr 3 (E3)	P3
Zagadnienie nr 2: Wpływ wykształcenia biomasy w postaci osadu czynnego w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego na efektywność oczyszczania ścieków, ze szczególnym uwzględnieniem procesu nityfikacji.	Eksperyment nr 4 (E4)	P4
Zagadnienie nr 3: Wpływ strategii napowietrzania na zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie.	Eksperyment nr 3 (E3)	P2
	Eksperyment nr 4 (E4)	P3
Zagadnienie nr 4: Wpływ temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nityfikacji.	Eksperyment nr 5 (E5)	P5
Zagadnienie nr 5: Wpływ modyfikacji parametrów pracy reaktora na przebieg i efektywność procesu nityfikacji. Przekształcenie hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym (IFAS-MBSBBR) do zintegrowanego usuwania związków węgla, azotu i fosforu w głównym ciągu oczyszczania ścieków na nityfikacyjny reaktor pracujący w czystej technologii złoża ruchomego (MBSBBR) w warunkach ciągu bocznego.	Eksperyment nr 6 (E6)	P6

Szczegółowe informacje dotyczące harmonogramu pracy reaktorów, składu i charakterystyki ścieków syntetycznych, wartości i zakresów badanych parametrów oraz wykorzystanych narzędzi w poszczególnych eksperymentach przedstawiono w tabelach 4.2. – 4.7.

Tabela 4.2. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 1

WARUNKI I GŁÓWNE ZAŁOŻENIA BADAWCZE						
Etap	Seria	Warunki pracy reaktora – REKATOR SBRI			Technologia złoża ruchomego	Wykorzystane narzędzia
		Strategia napowietrzania		Obciążenie reaktora ładunkiem zw. org. (OLR) (g ChZT/m ³ · d) i azotem (NLR) (g N/m ³ · d)		
		Czas trwania podfaz z (t ₁) i bez (t ₂) napowietrzania; R= t ₂ / t ₁	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)			
ETAP 1	seria 1 (e1.s1.)	napowietrzanie CIĄGŁE R=0	6,0	OLR=537 NLR=64	CZYSTA TECHNOLOGIA ZŁOŻA RUCHOMEGO Reaktor MBSBBR	1. Porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu amonowego (AUR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitUR). 2. Analiza jakości ścieków dopływających i odpływających z układu. 3. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). 4. Analiza ilościowa qPCR.
	seria 2 (e1.s2.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ =40 min, t ₂ =10 min; R=1/4				
	seria 3 (e1.s3.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ =30 min, t ₂ =10 min; R=1/3				
ETAP 2	seria 1 (e2.s1.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ =20 min, t ₂ =10 min; R=1/2	3,5	OLR=402 NLR=48 OLR=537 NLR=64		
	seria 2 (e2.s2.)					
	seria 3 (e2.s3.)					
	seria 4 (e2.s4.)					
SKŁAD I CHARAKTERYSTYKA ŚCIEKÓW, HARMONOGRAM CYKLU						
Skład ścieków syntetycznych		Charakterystyka ścieków syntetycznych			Harmonogram cyklu	
pepton – 135 mg/l; skrobia – 45 mg/l; glukoza – 45 mg/l; gliceryna – 0,049 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 15 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 4,5 mg/l.		ChZT: 512,35±9,08 mg O ₂ /l; N _{og} : 61,99±2,69 mg N/l; NTK: 60,24±2,76 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 39,06±1,21 mg N-NH ₄ ⁺ /l; N-NO ₃ ⁻ : 1,75±0,41 mg N-NO ₃ ⁻ /l; P _{og} : 7,52±0,50 mg P/l, pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.			Trzy ośmiogodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składały się następujące po sobie fazy: 50 min – I bez napowietrzania (I BN), 190 min – I tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (I TL), 30 min – II bez napowietrzania (II BN), 200 min – II tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (II TL), 10 min – dekantacja (D). Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10 l na cykl: 2/3 obj. w I BN i 1/3 obj. w II BN (ETAP 1; ETAP 2 – seria 1, 2, 4), • 6,6 l na cykl: 1/2 obj. w I BN i 1/2 obj. w II BN (ETAP 2 – seria 3).	

Tabela 4.3. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 2

WARUNKI I GŁÓWNE ZAŁOŻENIA BADAWCZE						
Warunki pracy reaktora – REKATOR SBR2				Technologia złoża ruchomego	Wykorzystane narzędzia	
Seria	Strategia napowietrzania		Obciążenie reaktora ładunkiem zw. org. (OLR) (g ChZT / m ³ · d) i azotem (NLR) (g N / m ³ · d)			
	Czas trwania podfazy z (t ₁) i bez (t ₂) napowietrzania; R= t ₂ / t ₁	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)				
seria 1 (s1)	napowietrzanie CIĄGŁE R=0	3,0	OLR=556 NLR=69	HYBRYDOWA TECHNOLOGIA ZŁOŻA RUCHOMEGO Reaktor IFAS-MBSBBR	1. Porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu amonowego (AUR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitUR). 2. Analiza jakości ścieków dopływających i odpływających z układu. 3. Analiza ilościowa qPCR.	
seria 2 (s2)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 40 min, t ₂ = 10 min; R= 1/4					
seria 3 (s3)	2,0					
seria 4 (s4)			napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 30 min, t ₂ = 10 min; R= 1/3			
SKŁAD I CHARAKTERYSTYKA ŚCIEKÓW, HARMONOGRAM CYKLU						
Skład ścieków syntetycznych		Charakterystyka ścieków syntetycznych		Harmonogram cyklu		
pepton – 135 mg/l; skrobia – 45 mg/l; glukoza – 45 mg/l; gliceryna – 0,049 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 15 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 4,5 mg/l.		ChZT: 518,76 ±9,02 mg O ₂ /l; N _{og} : 63,96±0,83 mg N/l; NTK: 62,04±0,84 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 39,91±1,00 mg N-NH ₄ ⁺ /l; N-NO ₃ ⁻ : 0,95±0,71 mg N-NO ₃ ⁻ /l; P-PO ₄ ³⁻ : 7,22±0,68 mg P-PO ₄ ³⁻ /l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.		Trzy ośmiodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składały się następujące po sobie fazy: 50 min – I bez napowietrzania (I BN), 190 min – I tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (I TL), 30 min – II bez napowietrzania (II BN), 150 min – II tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (II TL), 50 min – sedimentacja (S), 10 min – dekantacja (D). Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10 l na cykl: 2/3 obj. w I BN i 1/3 obj. w II BN.		

Tabela 4.4. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 3

WARUNKI I GŁÓWNE ZAŁOŻENIA BADAWCZE						
Warunki pracy reaktora – REKATOR SBR2				Technologia złoża ruchomego	Wykorzystane narzędzia	
Seria	Strategia napowietrzania		Obciążenie reaktora ładunkiem zw. org. (OLR) i azotem (NLR) (g N/m ³ · d)			
	Czas trwania podfazy z (t ₁) i bez (t ₂) napowietrzania; R= t ₂ / t ₁	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)				
	seria 1 (s1)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 30 min, t ₂ = 10 min; R=1/3	OLR=536 NLR=64	HYBRYDOWA TECHNOLOGIA ZŁOŻA RUCHOMEGO Reaktor IFAS-MBSBBR		
	seria 2 (s2)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 20 min, t ₂ = 10 min; R=1/3	OLR=402 NLR=48			
seria 3 (s3)	OLR=536 NLR=64					
seria 4 (s4)						
SKŁAD I CHARAKTERYSTYKA ŚCIEKÓW, HARMONOGRAM CYKLU						
Skład ścieków syntetycznych			Charakterystyka ścieków syntetycznych		Harmonogram cyklu	
pepton – 135 mg/l; skrobia – 45 mg/l; glukoza – 45 mg/l; gliceryna – 0,049 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 15 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 4,5 mg/l.			ChZT: 511,61±7,86 mg O ₂ /l; N _{org} : 60,81±1,74 mg N/l; NTK: 59,33±1,56 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 39,04±1,30 mg N-NH ₄ ⁺ /l; N-NO ₃ ⁻ : 1,47±0,58 mg N-NO ₃ ⁻ /l; P-PO ₄ ³⁻ : 7,61±0,26 mg P-PO ₄ ³⁻ /l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.		Trzy ośmiogodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składały się następujące po sobie fazy: 50 min – I bez napowietrzania (I BN), 190 min – I tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (I TL), 30 min – II bez napowietrzania (II BN), 150 min – II tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (II TL), 50 min – sedimentacja (S), 10 min – dekantacja (D). Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10 l na cykl: 2/3 obj. w I BN i 1/3 obj. w II BN (seria 1, 2, 4), • 6,6 l na cykl: 1/2 obj. w I BN i 1/2 obj. w II BN (seria 3).	

Tabela 4.5a. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 4

WARUNKI I GŁÓWNE ZAŁOŻENIA BADAWCZE							
Etap	Seria	Warunki pracy reaktora – REKATOR SBRI			Technologia złoža ruchomego	Wykorzystane narzędzia	
		Strategia napowietrzania		Obciążenie reaktora ładunkiem zw. org. (OLR) (g ChZT/m ³ · d) i azotem (NLR) (g N/m ³ · d)			
		Czas trwania podfaz z (t ₁) i bez (t ₂) napowietrzania; R= t ₂ / t ₁	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)				
ETAP 1	seria 1 (e1.s1.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 20 min, t ₂ =10 min; R= 1/2	3,5	OLR=557 NLR=63	CZYSTA TECHNOLOGIA ZŁOŻA RUCHOMEGO Reaktor MBSBBR	1. Porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu amonowego (AUR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitUR). 2. Analiza jakości ścieków dopływających i odpływających z układu. 3. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS).	
	seria 2 (e1.s2.)						
	seria 3 (e1.s3.)						
	seria 4 (e1.s4.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 30 min, t ₂ =10 min; R= 1/3					1,5
	seria 5 (e1.s5.)						
ETAP 2	seria 1 (e2.s1.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ =2 min, t ₂ =4 min; R=2	Bez zadanego stężenia tlenu				
	seria 2 (e2.s2.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ =8 min, t ₂ =16 min; R=2					
	seria 3 (e2.s3.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 16 min, t ₂ =32 min; R=2					

Tabela 4.5b. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 4

SKŁAD I CHARAKTERYSTYKA ŚCIEKÓW, HARMONOGRAM CYKLU		
Skład ścieków syntetycznych	Charakterystyka ścieków syntetycznych	Harmonogram cyklu
pepton – 135 mg/l; skrobia – 45 mg/l; glukoza – 45 mg/l; gliceryna – 0,049 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 15 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 4,5 mg/l.	ChZT: 520,20±17,56 mg O ₂ /l; N _{og} : 59,89±1,53 mg N/l; NTK: 58,93±1,48 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 39,01±1,10 mg N-NH ₄ ⁺ /l; N-NO ₃ ⁻ : 0,95±0,71 mg N-NO ₃ ⁻ /l; P _{og} : 6,47±0,64 mg P/l; P-PO ₄ ³⁻ : 6,25±0,63 mg P-PO ₄ ³⁻ /l pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.	Trzy ośmiogodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składały się następujące po sobie fazy: • ETAP 1 seria 1 – tak jak w przypadku eksperymentu nr 1 • ETAP 1 seria 2,3,4 ETAP 2: 50 min – I bez napowietrzania (I BN), 190 min – I tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (I TL), 30 min – II bez napowietrzania (II BN), 150 min – II tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (II TL), 50 min – sedymентация (S), 10 min – dekantacja (D). Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10l na cykl: 2/3 obj. w I BN i 1/3 obj. w II BN.

Tabela 4.6. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 5

WARUNKI I GŁÓWNE ZAŁOŻENIA BADAWCZE				
Warunki pracy reaktora – REKATOR SBR2			Technologia złoza ruchomego	Wykorzystane narzędzia
Strategia napowietrzania		Obciążenie reaktora ładunkiem zw. org. (OLR) (g ChZT/m ³ · d) i azotem (NLR) (g N/m ³ · d)		
Czas trwania podfaz z (t ₁) i bez (t ₂) napowietrzania; R = t ₂ / t ₁	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)			
napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 20 min, t ₂ = 10 min; R=1/3	1,5	OLR=536 NLR=64	HYBRYDOWA TECHNOLOGIA ZŁOŻA RUCHOMEGO Reaktor IFAS-MBSBBR	1. Porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu amonowego (AUR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitUR). 2. Analiza jakości ścieków dopływających i odpływających z układu. 3. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS).
SKŁAD I CHARAKTERYSTYKA ŚCIEKÓW, HARMONOGRAM CYKLU				
Skład ścieków syntetycznych	Charakterystyka ścieków syntetycznych	Harmonogram cyklu		
pepton – 135 mg/l; skrobia – 45 mg/l; glukoza – 45 mg/l; gliceryna – 0,049 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 15 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 4,5 mg/l.	ChZT: 511,04±7,89 mg O ₂ /l; N _{og} : 60,52±1,35 mg N/l; NTK: 58,95±1,38 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 38,49±1,00 mg N-NH ₄ ⁺ /l; N-NO ₃ ⁻ : 1,56±0,57 mg N-NO ₃ ⁻ /l; P _{og} : 7,66±0,21 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.	Trzy ośmiogodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składały się następujące po sobie fazy: 50 min – I bez napowietrzania (I BN), 190 min – I tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (I TL), 30 min – II bez napowietrzania (II BN), 150 min – II tlenowa (z ciągłym lub naprzemiennym napowietrzaniem) (II TL), 50 min – sedymентация (S), 10 min – dekantacja (D). Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10 l na cykl: 2/3 obj. w I BN i 1/3 obj. w II BN.		

Tabela 4.7a. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 6

WARUNKI I GŁÓWNE ZAŁOŻENIA BADAWCZE								
Etap	Seria	Warunki pracy reaktora – REKATOR SBR2			Technologia złoŜa ruchomego	Wykorzystane narzędzia		
		Strategia napowietrzania		Obciążenie reaktora ładunkiem zw. org. (OLR) i azotem (NLR) (g N/m ³ · d)				
		Czas trwania podfaz z (t ₁) i bez (t ₂) napowietrzania; R= t ₂ / t ₁	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)					
ETAP 1	seria 1 (e1.s1.)	napowietrzanie NAPRZEMIENNE t ₁ = 20 min; t ₂ = 10 min; R= 1/2	1,5	OLR=554 NLR=76	20°C ciąg główny	HYBRYDOWA TECHNOLOGIA ZŁOŜA RUCHOMEGO Reaktor IFAS-MBSBBR	1. Porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu amonowego (AUR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitUR). 2. Analiza jakości ścieków dopływających i odpływających z układu. 3. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). 4. Analiza ilościowa qPCR.	
	seria 2 (e1.s2.)			OLR=384 NLR=76				
	seria 3 (e1.s3.)			OLR=213 NLR=77				
	seria 4 (e1.s4.)			OLR=0 NLR=76				
ETAP 2	napowietrzanie CIĄGŁE R=0		3,0	OLR=0 NLR=76	20°C → 30°C	CZYSTA TECHNOLOGIA ZŁOŜA RUCHOMEGO Reaktor MBSBBR		
				OLR=0 NLR=77	30°C ciąg boczny			
ETAP 3	seria 1 (e3.s1.)	napowietrzanie CIĄGŁE R=0	3,0	OLR=0 NLR=108		30°C ciąg boczny	CZYSTA TECHNOLOGIA ZŁOŜA RUCHOMEGO Reaktor MBSBBR	
	seria 2 (e3.s2.)			OLR=0 NLR=131				
	seria 3 (e3.s3.)			OLR=0 NLR=172				
	seria 4 (e3.s4.)							

Tabela 4.7b. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 6

HARMONOGRAM CYKLU	
ETAP 1	Trzy ośmiogodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składają się następujące po sobie fazy: 50 min – I bez napowietrzania (I BN), 190 min – I tlenowa (z ciągłym lub przemiennym napowietrzaniem) (I TL), 30 min – II bez napowietrzania (II BN), 150 min – II tlenowa (z ciągłym lub przemiennym napowietrzaniem) (II TL), 50 min – sedimentacja (S), 10 min – dekantacja (D).
ETAP 2	Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10 l na cykl: 2/3 obj. w I BN i 1/3 obj. w II BN.
ETAP 3	Trzy ośmiogodzinne cykle w ciągu doby. Na jeden pełny cykl składają się następujące po sobie fazy: 5 min – I bez napowietrzania (I BN), 95 min – I tlenowa (z ciągłym napowietrzaniem) (I TL), 5 min – II bez napowietrzania (II BN), 95 min – II tlenowa (z ciągłym napowietrzaniem) (II TL), 5 min – III bez napowietrzania (III BN), 95 min – III tlenowa (z ciągłym napowietrzaniem) (III TL), 5 min – IV bez napowietrzania (IV BN), 115 min – IV tlenowa (z ciągłym napowietrzaniem) (IV TL), 50 min – sedimentacja (S), 10 min – dekantacja (D). Na początku każdej z podfaz bez napowietrzania do reaktora dawkowano ścieki syntetyczne: • 10 l na cykl: 1/4 obj. w I BN, 1/4 obj. w II BN, 1/4 obj. w III BN i 1/4 w IV BN.

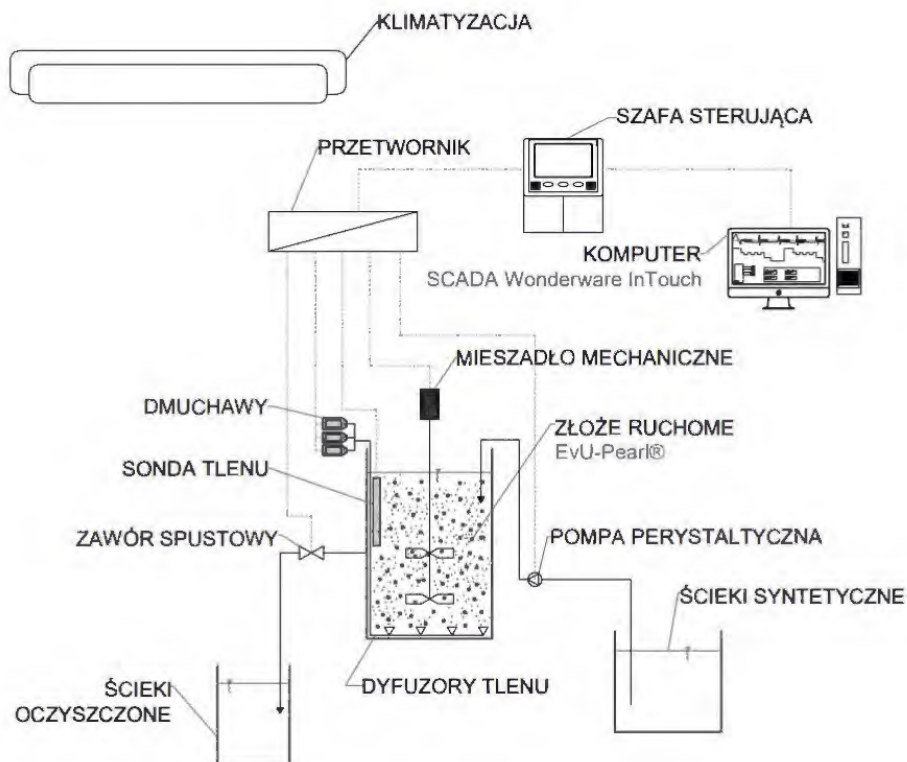
Tabela 4.7c. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 6

SKŁAD I CHARAKTERYSTYKA ŚCIEKÓW			
Etap	Seria	Skład ścieków	Charakterystyka ścieków
ETAP 1	seria 1 (e1.s1.)	pepton – 135 mg/l; skrobia – 45 mg/l; glukoza – 45 mg/l; gliceryna – 0,049 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 4,5 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 15 mg/l	ChZT: 517,00±4,38 mg O ₂ /l; N _{og} : 71,05±1,26 mg N/l; NTK: 70,18±1,23 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 39,32±1,25 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 7,55±0,29 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.
	seria 2 (e1.s2.)	pepton – 63 mg/l; skrobia – 21 mg/l; glukoza – 21 mg/l; gliceryna – 0,023 ml/l; octan amonu – 225 mg/l; NH ₄ HCO ₃ – 105 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 10 mg/l KH ₂ PO ₄ – 3 mg/l;	ChZT: 358,56±7,88 mg O ₂ /l; N _{og} : 71,30±1,15 mg N/l; NTK: 70,87±1,27 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 52,17±1,87 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 4,59±0,19 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.
	seria 3 (e1.s3.)	octan amonu – 200 mg/l; NH ₄ HCO ₃ – 165 mg/l; NH ₄ Cl – 28,65 mg/l; NaHCO ₃ – 125 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 5 mg/l; KH ₂ PO ₄ – 1,5 mg/l; CaCl ₂ – 1,41 mg/l; MgSO ₄ – 60 mg/l; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 10 mg/l; roztwór pierwiastków śladowych – 1 ml/l	ChZT: 199,00±8,72 mg O ₂ /l; N _{og} : 71,78±1,10 mg N/l; NTK: 70,43±1,14 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 63,70±1,48 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,54±0,16 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 350-400 mg CaCO ₃ /l.
	seria 4 (e1.s4.)		N _{og} : 71,00±0,71 mg N/l; NTK: 68,93±0,71 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 68,70±0,56 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,37±0,12 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 500 mg CaCO ₃ /l.
ETAP 2		NH ₄ HCO ₃ – 300 mg/l; NH ₄ Cl – 59,97 mg/l; NaHCO ₃ – 300 mg/l; Na ₂ HPO ₄ – 5 mg/l KH ₂ PO ₄ – 1,5 mg/l; CaCl ₂ – 1,41 mg/l; MgSO ₄ – 60 mg/l; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 10 mg/l; roztwór pierwiastków śladowych – 1 ml/l	N _{og} : 70,72±1,03 mg N/l; NTK: 68,50±1,07 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 68,08±1,18 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,27±0,21 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość 500 mg CaCO ₃ /l.
ETAP 3	seria 1 (e3.s1.)		N _{og} : 71,64±1,75 mg N/l; NTK: 69,20±1,59 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 67,23±1,84 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,42±0,17 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 500 mg CaCO ₃ /l.
	seria 2 (e3.s2.)	NH ₄ HCO ₃ – 430 mg/l; NH ₄ Cl – 103,1 mg/l; NaHCO ₃ – 550 mg/l; CaCl ₂ – 1,41 mg/l; MgSO ₄ – 60 mg/l; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 10 mg/l; roztwór pierwiastków śladowych – 1 ml/l	N _{og} : 99,33±2,89 mg N/l; NTK: 96,64±2,89 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 93,50±2,60 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,55±0,15 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 720 mg CaCO ₃ /l.
	seria 3 (e3.s3.)	NH ₄ HCO ₃ – 560 mg/l; NH ₄ Cl – 133,7 mg/l; NaHCO ₃ – 785 mg/l; CaCl ₂ – 1,41 mg/l; MgSO ₄ – 60 mg/l; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 10 mg/l; roztwór pierwiastków śladowych – 1 ml/l	N _{og} : 121,87±1,15 mg N/l; NTK: 119,16±1,11 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 118,17±1,53 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,64±0,12 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 960 mg CaCO ₃ /l.
	seria 4 (e3.s4.)	NH ₄ HCO ₃ – 790 mg/l; NH ₄ Cl – 152,8 mg/l; NaHCO ₃ – 1070 mg/l; CaCl ₂ – 1,41 mg/l; MgSO ₄ – 60 mg/l; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 10 mg/l; roztwór pierwiastków śladowych – 1 ml/l	N _{og} : 160,44±3,17 mg N/l; NTK: 158,76±3,25 mg N/l; N-NH ₄ ⁺ : 154,69±4,40 mg N-NH ₄ ⁺ /l; P _{og} : 2,40±0,18 mg P/l; pH: 7,6-7,9; zasadowość: 1200 mg CaCO ₃ /l.

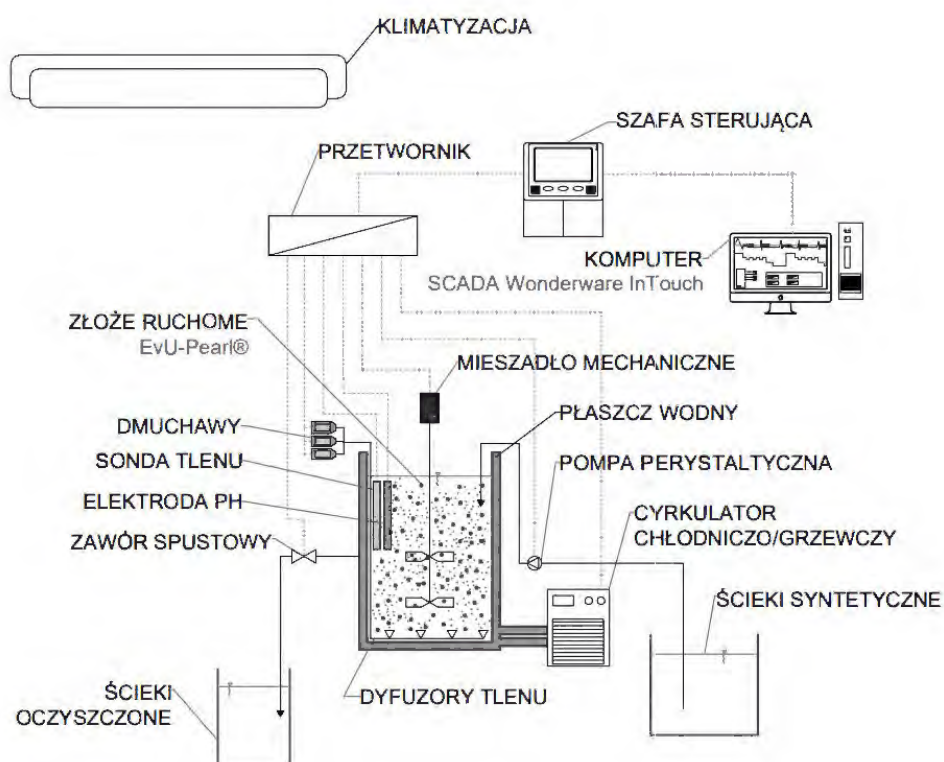
4.2. Charakterystyka stanowisk badawczych

Badania przeprowadzono w dwóch stanowiskach badawczych, których schematy przedstawiono na rysunkach 4.1. (SBR1) i 4.2. (SBR2). Każde z nich składało się z prostopadłościennego zbiornika, wykonanego z pleksiglasu, o wymiarach 270x270x500 mm i objętości czynnej równej 28 litrów. Całkowita objętość każdego reaktora wynosiła 29 litrów. Ścieki były doprowadzane do układu za pomocą pompy perystaltycznej Masterflex® Ismatec® Ecoline (Masterflex Ismatec, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA). Mieszanie zapewniało wolnoobrotowe, łopatkowe mieszadło mechaniczne R-50 firmy CAT (Ballrechten-Dottingen, Niemcy), pracujące ze stałą prędkością 100 obr./min. Tlen dostarczano za pomocą dmuchaw Tetrattec® APS (2x2 W – 100 l/h + 1x4,5 W – 300 l/h) (Tetra GmbH, Melle, Niemcy) oraz dyfuzorów (Marina-Hagen, MA, USA) umieszczonych na dnie zbiornika. Poziom stężenia tlenu rozpuszczonego oraz temperatury stale monitorowano przy użyciu optycznej sondy tlenowej Oxymax firmy Endress+Hauser (Weil am Rhein, Niemcy) (E1, E2, E3, E4, E5 – model COS61D, E6 – model COS81D). Na króćcu wylotowym zamontowano elektromagnetyczny zawór spustowy BE230AS firmy Danfoss (Nordborg, Dania). Wszystkie urządzenia były połączone z przetwornikiem Liquiline CM442 firmy Endress+Hauser (Weil am Rhein, Niemcy), który przesyłał dane do systemu automatyki SCADA Wonderware InTouch (wersja 2017-Update 2), umożliwiając kontrolę i utrzymanie zadanych parametrów procesu. Stałą temperaturę w układach zapewniał zewnętrzny system klimatyzacji (poza E6).

Zbiornik reaktora SBR2, oprócz standardowego wyposażenia, składał się dodatkowo z płaszcza wodnego, który współpracował z cyrkulatorem chłodniczo/grzewczym JULABO F32-ME (JULABO GmbH, Seelbach, Niemcy), pozwalającym na utrzymywanie stałej temperatury w zakresie –35 do +200°C. Dzięki temu w eksperymencie nr 6 możliwe było precyzyjne sterowanie temperaturą, przy której pracował reaktor. Dodatkowo, podczas E6 w SBR2 zainstalowano jonoselektywną elektrodę pH Tophit CPS471D (Endress+Hauser, Weil am Rhein, Niemcy), za pomocą której monitorowano odczyn oczyszczanych ścieków.



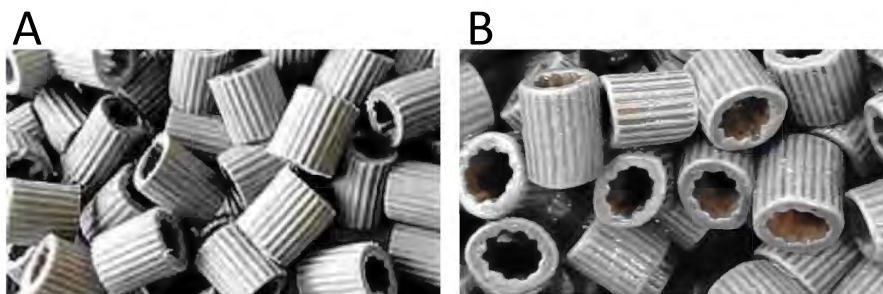
Rysunek 4.1. Schemat stanowiska badawczego – SBR1



Rysunek 4.2. Schemat stanowiska badawczego – SBR2

4.3. Charakterystyka złoża ruchomego

Jako nośnik biomasy zastosowano złożo ruchome EvU-Pearl® (EvU Innovative Umwelttechnik GmbH, Gröditz, Niemcy) (Zdjęcie 4.1.). Wypełnienie to ma formę cylindrycznych kształtek, o średnicy 5 mm i wysokości 8 mm, wykonanych z polichlorku winylu (PVC) z recyklingu. Dzięki uźebrowanej powierzchni zewnętrznej i wewnętrznej powierzchnia właściwa nośników wynosi $600 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Z uwagi na gęstość złoża wynoszącą $1,1 \text{ g/cm}^3$, kształtki utrzymują się w stanie zawieszenia w całej objętości reaktorów podczas ich mieszania, natomiast w fazie sedymentacji opadają na dno reaktorów. Objętość nasypowa złoża ruchomego w każdym z reaktorów wynosiła 7 litrów, co stanowiło 1/4 objętości czynnej danego układu.



Zdjęcie 4.1. Złożo ruchome EvU-Pearl® przed (A) i po wykształceniu biofilmu (B)

4.4. Metodyka wyznaczania szybkości utleniania azotu amonowego

Jako narzędzie służące do śledzenia zmian aktywności bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego wykorzystano porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu amonowego (ang. *ammonia utilization rate test* – AUR). Ich zasada polegała na kontroli zmian stężenia azotu amonowego, azotynowego i azotanowego w czasie w ściśle określonych warunkach prowadzenia testu.

Przyjęto, że każdy test AUR wykonywany będzie przy zachowaniu jednakowego poziomu następujących parametrów:

- 1) Stężenie osadu czynnego na poziomie ok. $0,90 \text{ g}_{\text{s.m.}}/\text{l}$ (dotyczy testów AUR-AS), procentowa zawartość złoża ruchomego wynosząca 25% objętości czynnej reaktora testowego (dotyczy testów AUR-B);
- 2) Początkowe stężenie azotu amonowego na poziomie $15 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}$ (E1-E6) lub $30 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}$ (E6);
- 3) Początkowa wartość zasadowości na poziomie $200 \text{ mg CaCO}_3/\text{l}$.

Przed przystąpieniem do testów biomasę pobraną z analizowanego układu (MBSBBR lub IFAS-MBSBBR) płukano w odchlorowanej wodzie kranowej, tak aby usunąć pozostające w niej N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , a następnie umieszczano w reaktorze testowym. Objętość reaktora uzupełniano do 95-99% objętości czynnej odchlorowaną wodą wodociągową, która w zależności od sprecyzowanego celu była uprzednio: podgrzana do 20°C i nasycona tlenem (P1, P2, P3, P4, P6), podgrzana do 20°C i odtleniona do 1,5 mg O_2/l lub 1,0 mg O_2/l (P3, P5), schłodzona do 12°C i odtleniona do 1,5 mg O_2/l (P5).

Test rozpoczynał się w momencie, gdy do reaktora testowego dodawano 4% roztwór NH_4Cl , w ilości zapewniającej uzyskanie założonego stężenia N-NH_4^+ (15 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{l}$ (E1-E6) lub 30 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{l}$ (E6)). Zawartość reaktora była stale mieszana. System napowietrzania stanowiła dmuchawa i kostki akwarystyczne. Przez cały czas trwania eksperymentu kontrolowano założony poziom stężenia tlenu.

Co 15 lub 30 minut z reaktora pobierano próby o objętości 30 ml i natychmiast filtrowano przez sączki o średnicy porów 0,45 μm . W przesączu oznaczano stężenie: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- . Test trwał do momentu, gdy stężenie azotu amonowego spadło do wartości bliskiej 0 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{l}$ lub gdy przez kolejne 60 minut stężenie tego wskaźnika utrzymywało się na porównywalnym poziomie. W przypadku testu wykonywanego dla osadu czynnego (AUR-AS) określano również stężenie suchej masy i suchej masy organicznej. W przypadku testów przeprowadzanych z wykorzystaniem nośników (AUR-B) określano natomiast ilość biomasy rozwiniętej na kształtkach (jako sucha masa i sucha masa organiczna).

Aby określić szybkość utleniania azotu amonowego wykorzystano prostoliniowy fragment funkcji zmiany stężenia azotu amonowego w czasie charakteryzujący się współczynnikiem $R^2 \geq 0,97$. Szybkość wyliczano jako iloraz wartości współczynnika kierunkowego prostej obrazującej zmiany stężenia N-NH_4^+ w jednostce czasu i stężenia suchej masy organicznej. Wartość AOR wyrażano w mg N-NH_4^+ na $\text{g}_{\text{s.m.o.}}$ i h.

4.5. Metodyka wyznaczania szybkości utleniania azotu azotynowego

Do monitorowania zmian aktywności bakterii zdolnych do utleniania azotu azotynowego wykorzystano porcjowe testy kinetyczne szybkości utleniania azotu azotynowego (ang. *nitrite utilization rate test* – NitUR). Ich ogólna zasada opiera się na kontroli zmian stężenia azotu azotynowego i azotanowego w ściśle określonych warunkach prowadzenia testu. Pojedynczy test NitUR wykonywano analogicznie do testu AUR z tą różnicą, że jako substrat zamiast chlorku amonu wykorzystano 5% roztwór KNO_2 . Początkowe stężenie azotu azotynowego

wynosiło 15 mg N-NO₂⁻/l (E1-E6) lub 30 mg N-NO₂⁻/l (E6). Kolejną różnicę stanowił zakres analityczny, a mianowicie w teście NitUR określano stężenie N-NO₂⁻ i N-NO₃⁻, a test prowadzono do momentu, gdy stężenie azotu azotynowego spadło do poziomu bliskiego 0 N-NO₂⁻/l lub gdy przez kolejne 60 min stężenie tego wskaźnika utrzymywało się na stałym poziomie.

Aby określić szybkość utleniania azotu azotynowego wykorzystano prostoliniowy fragment funkcji zmiany stężenia azotu azotynowego w czasie charakteryzujący się współczynnikiem $R^2 \geq 0,97$. Szybkość wyliczano jako iloraz wartości współczynnika kierunkowego prostej obrazującej zmiany stężenia N-NO₂⁻ w jednostce czasu i stężenia suchej masy organicznej. Wartość NitOR wyrażano w mg N-NO₂⁻ na g_{s.m.o.} i h.

4.6. Metodyka analityczna

Wartości ChZT, stężenia: N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, N_{og}, P_{og} oraz P-PO₄³⁻ określano przy wykorzystaniu testów kuwetowych Hach Lange (Dusseldorf, Niemcy), zgodnie z metodyką podaną przez producenta. Wartości BZT₅ oznaczano za pomocą zestawu OxiTop®-IDS SET 12 i 2-kanalowego miernika Multi 3620 IDS (Weilheim, Niemcy). Wartości pH mierzono miernikiem firmy Elmetron, model CP-401 (Zabrze, Polska). Analizę stężenia suchej masy i suchej masy organicznej osadu czynnego oraz błony biologicznej wykonano metodą wagową według normy PN-EN 872:2007.

4.7. Metodyka obliczeniowa

4.7.1. Efektywność jednostkowych procesów usuwania ze ścieków związków węgla, azotu i fosforu

Efektywność jednostkowych procesów usuwania ze ścieków związków węgla, azotu i fosforu wyznaczono wykorzystując dane dotyczące jakości ścieków dopływających i odpływających z reaktorów biologicznych, zgodnie z metodyką przedstawioną w pracy Podedwornej i Żubrowskiej-Sudoł (2012).

- Efektywność usuwania związków organicznych (η_{ChZT}):

$$\eta_{ChZT} = \frac{C_{ChZT}^d - C_{ChZT}^o}{C_{ChZT}^d} \cdot 100 [\%] \quad (4.1.)$$

gdzie:

C_{ChZT}^d – wartość ChZT w ściekach dopływających do reaktor [mg O₂/l],

C_{ChZT}^o – wartość ChZT w ściekach odpływających do reaktora [mg O₂/l].

- Efektywność procesu nitryfikacji ($\eta_{Nitryfikacji}$):

$$\eta_{Nitryfikacji} = \frac{C_{NTK}^d - C_{NTK}^o}{C_{NTK}^d} \cdot 100 [\%] \quad (4.2.)$$

gdzie:

C_{NTK}^d – stężenie azotu Kjeldahla w ściekach dopływających do reaktora [mg N/l],

C_{NTK}^o – stężenie azotu Kjeldahla w ściekach odpływających do reaktora [mg N/l].

- Efektywność procesu denitryfikacji ($\eta_{Denitryfikacji}$):

$$\eta_{Denitryfikacji} = \frac{C_{Nog}^d - C_{Nog}^o}{C_{Nog}^d} \cdot 100 [\%] \quad (4.3.)$$

gdzie:

C_{Nog}^d – stężenie azotu ogólnego w ściekach dopływających do reaktora [mg N/l],

C_{Nog}^o – stężenie azotu ogólnego w ściekach odpływających do reaktora [mg N/l].

- Efektywność usuwania fosforu (η_{BPR}):

$$\eta_{BPR} = \frac{C_{Pog}^d - C_{Pog}^o}{C_{Pog}^d} \cdot 100 [\%] \quad (4.4.)$$

gdzie:

C_{Pog}^d – stężenie fosforu ogólnego w ściekach dopływających do reaktora [mg P/l],

C_{Pog}^o – stężenie fosforu ogólnego w ściekach odpływających do reaktora [mg P/l].

4.7.2. Wskaźniki wyznaczone na podstawie wyników porcjowych testów szybkości utleniania azotu amonowego

- Szybkość utleniania azotu amonowego (AOR) określono zgodnie z formułą:

$$AOR = \frac{a}{C_b} [\text{mg N-NH}_4^+ / \text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}] \quad (4.5.)$$

gdzie:

a – współczynnik kierunkowy prostej obrazującej zmiany stężenia N-NH_4^+ w czasie [mg N-NH_4^+ / l · h],

C_b – stężenie biomasy rozwijającej się w układzie w postaci osadu czynnego lub błony biologicznej wyrażone w gramach suchej masy organicznej [$\text{g}_{\text{s.m.o.}}$ / l].

- Kumulację azotu azotynowego ($K^{N-NO_2^-}$) obliczono z zależności:

$$K^{N-NO_2^-} = \sum_{i=1}^{i=n} \max(0, \Delta N-NO_2^- (i)) [\text{mg N-NO}_2^-/\text{l}] \quad (4.6.)$$

$$\Delta N-NO_2^- (i) = N-NO_2^- (i) - N-NO_2^- (i-1) [\text{mg N-NO}_2^-/\text{l}] \quad (4.7.)$$

gdzie:

n – liczba prób,

$\Delta N-NO_2^- (i)$ – przyrost stężenia $N-NO_2^-$ określony między kolejnymi próbami $[\text{mg N-NO}_2^-/\text{l}]$.

- Do określenia stosunku pomiędzy przyrostem azotynów a ubytkiem azotu amonowego (RNIAL) wykorzystano następujące formuły:

$$RNIAL = \frac{K^{N-NO_2^-}}{\sum_{i=1}^{i=n} (\Delta N-NH_4^+ (i))} \cdot 100 [\%] \quad (4.8.)$$

$$\Delta N-NH_4^+ (i) = N-NH_4^+ (i) - N-NH_4^+ (i+1) [\text{mg N-NH}_4^+/\text{l}] \quad (4.9.)$$

gdzie:

$\Delta N-NH_4^+ (i)$ – ubytek stężenia $N-NH_4^+$ określony między kolejnymi próbami $[\text{mg N-NH}_4^+/\text{l}]$.

4.7.3. Wskaźniki wyznaczone na podstawie wyników porcjowych testów szybkości utleniania azotu azotynowego

- Szybkość utleniania azotu azotynowego (NitOR) określono zgodnie z formułą:

$$NitOR = \frac{a}{C_b} [\text{mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}] \quad (4.10.)$$

gdzie:

a – współczynnik kierunkowy prostej obrazującej zmiany stężenia $N-NO_2^-$ w czasie $[\text{mg N-NO}_2^-/\text{l} \cdot \text{h}]$,

C_b – stężenie biomasy rozwijającej się w układzie w postaci osadu czynnego lub błony biologicznej wyrażone w gramach suchej masy organicznej $[\text{g}_{\text{s.m.o.}}/\text{l}]$.

4.7.4. Współczynnik korekcji temperatury

W celu wyznaczenia współczynnika korekcji temperatury dla układu hybrydowego oraz określenia oczekiwanego teoretycznego wpływu temperatury na wartości szybkości utleniania azotu amonowego dla biomasy rozwijającej w analizowanym układzie (osadu czynnego i błony biologicznej) wykorzystano równanie Arrheniusa:

$$AOR_{T_2} = AOR_{T_1} \cdot \ddot{\Theta}^{(T_2 - T_1)} [\text{mg N-NH}_4^+ / \text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}] \quad (4.11.)$$

gdzie:

AOR_{T_1} – szybkość utleniania azotu amonowego wyznaczona podczas testu prowadzonego przy temperaturze $T_1 = 20^\circ\text{C} = 293,15 \text{ K}$ $[\text{mg N-NH}_4^+ / \text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}]$,

AOR_{T_2} – szybkość utleniania azotu amonowego wyznaczona podczas testu prowadzonego przy temperaturze $T_2 = 12^\circ\text{C} = 285,15 \text{ K}$ $[\text{mg N-NH}_4^+ / \text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}]$,

$\ddot{\Theta}$ – współczynnik korekcji temperatury.

4.7.5. Emisja podtlenku azotu

Współczynnik emisji N_2O ($E_{\text{N}_2\text{O}}$) obliczono jako iloraz masy podtlenku azotu powstającej podczas pełnego cyklu pracy reaktora ($M_{\text{N}_2\text{O}}$) i obciążenia reaktora ładunkiem azotu (NLR), zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Al-Hazmi i in. (2021). $M_{\text{N}_2\text{O}}$ wyznaczono poprzez scałkowanie szybkości tworzenia się N_2O ($r_{\text{N}_2\text{O}}$) przez jednostkę czasu (dt [d]) i podzielenie przez całkowity czas reakcji (t [d]):

$$E_{\text{N}_2\text{O}} = \frac{M_{\text{N}_2\text{O}}}{\text{NLR}} \times 100 [\%] \quad (4.12.)$$

$$M_{\text{N}_2\text{O}} = \int \frac{r_{\text{N}_2\text{O}} \times dt}{t} [\text{mg N-N}_2\text{O} / \text{l} \cdot \text{d}] \quad (4.13.)$$

gdzie:

$M_{\text{N}_2\text{O}}$ – masa podtlenku azotu powstająca podczas cyklu pracy układu $[\text{mg N-N}_2\text{O} / \text{l} \cdot \text{d}]$,

$r_{\text{N}_2\text{O}}$ – szybkość tworzenia się N_2O $[\text{mg N-N}_2\text{O} / \text{l} \cdot \text{d}]$.

4.7.6. Zużycie energii na napowietrzanie

Zużycie energii elektrycznej w procesie napowietrzania (E_o) wyznaczono zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Luo i in. (2019):

$$E_o = \frac{E_d}{\Delta m} [\text{kWh/kg}] \quad (4.14.)$$

$$\Delta m = \frac{Q \cdot \Delta C_{\text{ChZT}} + 4,18 \cdot Q \cdot \Delta C_{\text{N-NH}_4^+}}{1000} [\text{kg/d}] \quad (4.15.)$$

gdzie:

E_o – dobowe zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie w celu usunięcia 1 kg zanieczyszczeń $[\text{kWh/kg}]$,

E_d – dobowe zużycie energii elektrycznej na zasilanie dmuchaw (wartość obliczona jako iloczyn mocy dmuchaw i czasu ich pracy w ciągu doby) [kWh/d],

Δm – ładunek zanieczyszczeń utlenionych w ciągu doby [kg/d],

Q – przepływ ścieków [m^3/d],

ΔC_{ChZT} – różnica w wartościach ChZT w ściekach dopływających i odpływających z układu [g/m^3],

$\Delta C_{N-NH_4^+}$ – różnica w wartościach stężeń $N-NH_4^+$ w ściekach dopływających i odpływających z układu z uwzględnieniem ilości $N-NH_4^+$ powstającego w procesie amonifikacji [g/m^3],

4,18 – współczynnik zapotrzebowania na tlen w celu utleniania 1 g $N-NH_4^+$.

4.7.7. Wartości stężenia wolnego amoniaku i wolnego kwasu azotowego (III)

Wartości stężenia wolnego amoniaku (FA) i wolnego kwasu azotowego (III) (FNA) określono przy wykorzystaniu następujących zależności (Anthonisen i in., 1976):

$$FA = \frac{17}{14} \times \frac{C_{N-NH_4^+} \cdot 10^{pH}}{e^{(6344/273+T^\circ C)} + 10^{pH}} \text{ [mg FA/l]} \quad (4.16.)$$

$$FNA = \frac{46}{14} \times \frac{C_{N-NO_2^-}}{e^{(-2300/273+T^\circ C)} \cdot 10^{pH}} \text{ [mg FNA/l]} \quad (4.17.)$$

gdzie:

$C_{N-NH_4^+}$ – stężenie azotu amonowego dopływające do układu [mg $N-NH_4^+$ /l],

$C_{N-NO_2^-}$ – stężenie azotu azotynowego dopływające do układu [mg $N-NO_2^-$ /l].

4.8. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona w odniesieniu do wyników jakości ścieków oczyszczonych, efektywności jednostkowych procesów usuwania zanieczyszczeń oraz stężenia biomasy rozwijającej się w analizowanych układach. W tym celu wykorzystano program Statistica 13.3PL. Weryfikację hipotezy dotyczącej rozkładu każdej analizowanej zmiennej przeprowadzono przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka. Aby ocenić istotność różnic między zmiennymi, przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), gdzie zmienną grupującą była seria eksperymentu (w danej serii badawczej w reaktorach utrzymywano stałe warunki pracy). Jednorodność wariancji w poszczególnych grupach została zweryfikowana za pomocą testu Levene'a. Do określenia istotności różnic między analizowanymi zmiennymi wykorzystano test RIR Tukeya. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy ustalonym poziomie istotności $\alpha=0,05$.

5. OMÓWIENIE ZAGADNIENÍ BADAWCZYCH

5.1. Zagadnienie nr 1: Wpływ strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji w reaktorach ze złożem ruchomym

Jednym z celów cząstkowych dysertacji było znalezienie odpowiedzi na pytanie w jaki sposób strategia napowietrzania, definiowana jako stosunek czasu trwania podfaz bez (t_2) i z (t_1) napowietrzaniem ($R=t_2/t_1$) oraz stężenie tlenu w podfazach z napowietrzaniem (DO), wpływa na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji, przy uwzględnieniu różnej konfiguracji pracy sekwencyjnych reaktorów porcjowych ze złożem ruchomym. W pracy przeanalizowano dwa warianty technologii złoża ruchomego: czystą (MBSBBR) i hybrydową (IFAS-MBSBBR). Wyniki badań dotyczące pierwszego z wymienionych wariantów zaprezentowano w publikacji pt. „*Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification*” (Water, 2024 – P1). Hybrydowej technologii złoża ruchomego poświęcono dwie następujące prace: „*Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification*” (Water, 2022 – P2) oraz „*Nitrification kinetics, N_2O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates*” (International Journal of Environmental Science and Technology, 2023 – P3).

Systemy oczyszczania ścieków oparte na technologii złoża ruchomego zyskują w ostatnich latach coraz większą popularność. Wynika to z ich licznych zalet, w porównaniu do konwencjonalnych technologii, takich jak metoda osadu czynnego czy złoża zraszane (aspekt ten opisano w rozdziale 3.2.4.). Wciąż jednak nie została wyjaśniona kwestia wpływu strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji w tego typu układach. Niniejsza dysertacja stanowi próbę uzupełnienia wiedzy w przedmiotowym obszarze. Warto przy tym podkreślić, że jest ona pierwszą pracą, w której opisano występowanie bakterii Comammox w sekwencyjnych reaktorach porcjowych ze złożem ruchomym. Nowatorskim aspektem podjętym w dysertacji jest również analiza emisji podtlenku azotu w reaktorze typu IFAS-MBSBBR.

W kolejnych podrozdziałach przedstawiono najważniejsze spostrzeżenia omówione we wskazanych powyżej publikacjach.

5.1.1. Czysta technologia złoza ruchomego

W ramach eksperymentu nr 1 przeprowadzono badania w reaktorze pracującym w czystej technologii złoza ruchomego (P1). Układ działał nieprzerwanie przez 445 dni, podczas których przeanalizowano wpływ pięciu różnych strategii napowietrzania ($R=0$, $DO=6,0$ mg O_2/l ; $R=1/4$, $DO=6,0$ mg O_2/l ; $R=1/3$, $DO=6,0$ mg O_2/l ; $R=1/3$, $DO=3,5$ mg O_2/l i $R=1/2$, $DO=3,5$ mg O_2/l) (Tabela 4.2., rozdz. 4.1.).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że bez względu na zmiany strategii napowietrzania, polegające na wprowadzeniu naprzemiennego napowietrzania, skróceniu czasu trwania podfaz z napowietrzaniem (zwiększenie wartości R) oraz obniżeniu stężenia tlenu, efektywność procesu nityfikacji pozostawała na porównywanym poziomie. Dla całego okresu badawczego wynosiła ona średnio $93,63 \pm 2,13\%$. Pozwalało to na uzyskanie stężenia azotu amonowego w ściekach oczyszczonych na poziomie $0,80 \pm 0,47$ mg $N-NH_4^+/l$. Wprowadzane modyfikacje skutkowały natomiast różnicami w aktywności i liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów nityfikacyjnych.

Na podstawie wyników porcjowych testów AUR i NitUR wykazano, że strategia napowietrzania miała większy wpływ na aktywność i liczebność mikroorganizmów zdolnych do utleniania azotu amonowego, niż tych utleniających azotyny do azotanów. Co więcej, aktywność bakterii utleniających azot amonowy zmieniała się inaczej niż aktywność bakterii utleniających azot azotynowy. Wyniki qPCR pozwoliły natomiast na stwierdzenie, że tendencje zmian częstości występowania wszystkich analizowanych grup bakterii nityfikacyjnych (AOB, NOB i bakterie Comammox) były podobne. Przykładowo, po zmianie strategii napowietrzania z ciągłego ($R=0$) na naprzemienne z $R=1/4$ ($t_1=40$ min, $t_2=10$ min), odnotowano 1,24-krotny spadek szybkości utleniania azotu amonowego (AOR), podczas gdy szybkość utleniania azotu azotynowego (NitOR) pozostała na porównywalnym poziomie. Równolegle, w badaniach mikrobiologicznych, wykazano, że częstość występowania każdej z analizowanych grup nityfikatorów wzrosła, odpowiednio 6,9-krotnie (AOB), 8,1-krotnie (NOB) i 2,7-krotnie (bakterie Comammox).

Niezależnie od zastosowanej strategii napowietrzania, bakterie zdolne do utleniania azotynów do azotanów charakteryzowały się znacznie wyższą aktywnością i liczebnością w porównaniu z drobnoustrojami zdolnymi do utleniania azotu amonowego. Stosunek wartości NitOR do AOR wahał się w zakresie 1,17-4,30, a wielkość populacji NOB była przynajmniej 4,97-krotnie wyższa niż AOB. Do podobnych wniosków doszli m.in. Luan i in. (2023)

wykazując znacznie wyższą aktywność bakterii NOB niż AOB (testy prowadzono w laboratoryjnym modelu złoża tarczowego).

Na podstawie wyników badań zrealizowanych w ramach eksperymentu nr 1 wykazano również, że za każdym razem, gdy zmiana strategii napowietrzania polegała na zwiększeniu wartości R , następowało zmniejszenie szybkości utleniania azotu amonowego. W przypadku, gdy R wynosiło 0 (napowietrzanie ciągłe), AOR była równa $4,089 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$. Zwiększenie wartości analizowanego wskaźnika do $1/4$ ($t_1=40 \text{ min}$, $t_2=10 \text{ min}$) spowodowało zmniejszenie AOR do $3,289 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$. Podczas kolejnych zmian, z $1/4$ na $1/3$ oraz z $1/3$ na $1/2$, odnotowano odpowiednio 1,29-krotne i 1,25-krotne obniżenie szybkości utleniania azotu amonowego. Wbrew oczekiwaniom, wzrost aktywności bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego nastąpił po obniżeniu stężenia tlenu (z $6 \text{ mg O}_2/\text{l}$ do $3,5 \text{ mg O}_2/\text{l}$), przy którym w podfazach tlenowych pracował MBSBBR. Wartość AOR zwiększyła się wówczas prawie 2,40-krotnie z $2,555 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $6,059 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$. Można przypuszczać, że w błonie biologicznej rozwinęły się wówczas takie mikroorganizmy nityfikacyjne, które w warunkach niższego stężenia tlenu wykazywały większą aktywność. Z badań Park i in. (2002) wynika, że do takich drobnoustrojów należą *Nitrosospira* i *Nitrosomonas oligotropha*. Niższe stężenie tlenu jest również jednym z czynników wymienianym jako sprzyjający rozwojowi bakterii Comammox (Lawson i Lücker, 2018; Palomo i in., 2018; Roots i in., 2019). Odnotowane zmiany szybkości utleniania azotu amonowego nie w każdym z przypadków szły w parze z obserwowanymi zmianami liczebności bakterii nityfikacyjnych. Świadczą o tym następujące spostrzeżenia: po przejściu z warunków napowietrzania ciągłego na naprzemienne z $R=1/4$, odnotowano wzrost częstości występowania wszystkich analizowanych grup nityfikatorów; skrócenie czasu trwania podfazy z napowietrzaniem do 30 minut skutkowało obniżeniem wielkości ich populacji; po zmianie wartości R z $1/3$ na $1/2$, nastąpił wzrost częstości występowania AOB i bakterii Comammox; obniżenie poziomu stężenia tlenu przyczyniło się do zwiększenia populacji wszystkich analizowanych grup bakterii nityfikacyjnych.

Warto również podkreślić, że mimo stabilnej pracy MBSBBR przy identycznych warunkach technologicznych ($R=1/2$ ($t_1=20 \text{ min}$, $t_2=10 \text{ min}$), $\text{DO}=3,5 \text{ mg O}_2/\text{l}$, $\text{OLR}=537 \text{ g ChZT}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ i $\text{NLR}=64 \text{ g N}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$) w dwóch odrębnych seriach badawczych (serie 2. i 4. wyróżnione w drugim etapie badawczym), pomiędzy którymi reaktor przez 99 dni pracował przy innych wartościach parametrów technologicznych, aktywność i liczebność zbiorowisk mikroorganizmów nityfikacyjnych była odmienna. W okresie pomiędzy

wskazanymi seriami obciążenie reaktora ładunkiem związków organicznych i azotem zmniejszono o 1/4 poprzez ograniczenie ilości ścieków dopływających do układu (seria 3.). Zmiany te były spowodowane wybuchem pandemii Covid-19 i koniecznością dostosowania pracy w laboratorium do wprowadzonych wówczas ograniczeń. Częstość występowania AOB, NOB i bakterii Comammox w serii 4 była odpowiednio 1,40-krotnie, 1,49-krotnie i 2,20-krotnie niższa od określonej dla serii 2. Odnotowano również wówczas 1,43-krotne zwiększenie szybkości utleniania azotu amonowego. Obserwacje te wskazują, że mimo iż reaktor w serii 4. działał przy takich samych warunkach technologicznych co w serii 2., biomasa nie wróciła do swojej poprzedniej charakterystyki.

W publikacji P1 omówiono także w jaki sposób strategia napowietrzania wpływała na występowanie i liczebność bakterii Comammox w błonie biologicznej rozwiniętej na ruchomych nośnikach. Na podstawie uzyskanych wyników udokumentowano, że znaczący wpływ na częstość występowania bakterii Comammox w reaktorze MBSBBR miało przejście z napowietrzania ciągłego na naprzemienne z $R=1/4$, jak również obniżenie stężenia tlenu w podfazach z napowietrzaniem. W każdym z wymienionych przypadków wielkość populacji tych mikroorganizmów zwiększyła się. Najwyższą liczebność populacji bakterii Comammox (216184 kopii) odnotowano, gdy reaktor działał z największą liczbą podfaz bez napowietrzania podczas faz tlenowych ($R=1/2$) i najniższym stężeniem tlenu (3,5 mg O_2/l). Wówczas, gdy napowietrzanie odbywało się w reżimie ciągłym, a stężenie tlenu utrzymywano na poziomie 6 mg O_2/l częstość występowania bakterii Comammox była najniższa i wynosiła jedynie 1085 kopii. Uzyskane obserwacje były zgodne z wynikami badań prezentowanych przez Roots i in. (2019). Według cytowanych autorów niższe stężenie tlenu jest jednym z czynników stymulujących rozwój bakterii Comammox.

5.1.2. Hybrydowa technologia złoża ruchomego

W przypadku badań prowadzonych dla reaktora pracującego w hybrydowej technologii złoża ruchomego wyróżniono dwa eksperymenty (eksperyment nr 2 i 3). Eksperyment nr 2 (publikacja P2) obejmował pierwsze 100 dni pracy IFAS-MBSBBR, podczas których przeanalizowano wpływ czterech różnych strategii napowietrzania ($R=0$, $DO=3,0$ mg O_2/l ; $R=1/4$, $DO=3,0$ mg O_2/l ; $R=1/4$, $DO=2,0$ mg O_2/l i $R=1/3$, $DO=2,0$ mg O_2/l). Eksperyment nr 3 (publikacja P3) trwał 517 dni i stanowił kontynuację badań zapoczątkowanych w ramach eksperymentu nr 2. Przeanalizowano wówczas dwie strategie napowietrzania ($R=1/3$, $DO=1,5$ mg O_2/l oraz $R=1/2$, $DO=1,5$ mg O_2/l) (Tabela 4.3., rozdz. 4.1.).

Badania przeprowadzone w ramach eksperymentu nr 2 wykazały, że niezależnie od zastosowanych zmian strategii napowietrzania, takich jak wprowadzenie naprzemiennego napowietrzania, skrócenie czasu trwania podfaz z napowietrzaniem (zwiększenie wartości R) oraz obniżenie stężenia tlenu, efektywność procesu nitryfikacji kształtowała się na porównywalnym poziomie ($98,61 \pm 0,93\%$). Stężenie azotu amonowego w ściekach oczyszczonych wynosiło $0,56 \pm 0,37$ mg N-NH₄⁺/l. Modyfikacje te prowadziły jednak do zróżnicowania w aktywności i liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych, podobnie jak w przypadku czystej technologii złoża ruchomego.

Porównując wartości szybkości utleniania azotu amonowego (AOR) uzyskane dla osadu czynnego (AS) i błony biologicznej rozwiniętej na ruchomych nośnikach (B) stwierdzono, że osad czynny stanowił środowisko, w którym bakterie zdolne do utleniania azotu amonowego były bardziej aktywne. Stosunek wartości AOR-AS do AOR-B wahał się w zakresie 1,20-1,69. Prowadząc analogiczne porównanie, ale w odniesieniu do szybkości utleniania azotu azotynowego (NitOR), odnotowano, że wyższe wartości tego wskaźnika, świadczące o większej aktywności bakterii NOB, wystąpiły dla błony biologicznej. Wartości NitOR-B były od 3,18-krotnie do 5,41-krotnie wyższe niż NitOR-AS. Analizując częstości występowania AOB, NOB i bakterii Comammox potwierdzono, że błona biologiczna stanowi środowisko sprzyjające rozwojowi mikroorganizmów nitryfikacyjnych. Analogiczne doniesienia można znaleźć w pracach m.in. Li i in. (2016a), Chao i in. (2016) i Shao i in. (2017). W badaniach własnych wykazano ponadto, że dominującą grupą nitryfikatorów, zarówno w osadzie czynnym jak i biofilmie były bakterie AOB.

Z badań przeprowadzonych w ramach eksperymentu nr 2 wynika również, że modyfikacje strategii napowietrzania miały analogiczny wpływ na aktywność bakterii utleniających azot amonowy, bez względu na formę w jakiej te mikroorganizmy rozwijały się w reaktorze (tj. osad czynny i błona biologiczna), lecz prowadziły do odmiennych zmian w częstości występowania AOB i bakterii Comammox w tych środowiskach. Zwiększenie wartości R powodowało każdorazowo obniżenie szybkości utleniania azotu amonowego, wyznaczonych dla osadu czynnego i biofilmu, podczas, gdy zmniejszenie stężenia tlenu skutkowało ich wzrostem. Na początku eksperymentu, gdy układ pracował przy napowietrzaniu ciągłym ($R=0$), wartości AOR dla osadu czynnego i biofilmu wynosiły odpowiednio $6,310$ mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h i $3,727$ mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h. Po zwiększeniu wartości R do 1/4, szybkość utleniania azotu amonowego zmniejszyła się odpowiednio 1,88-krotnie i 1,37-krotnie. W kolejnej serii, po obniżeniu stężenia tlenu z $3,0$ mg O₂/l do

2,0 mg O₂/l, odnotowano wzrost analizowanych wartości. AOR wyznaczona dla osadu czynnego wynosiła 6,231 mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h, a dla błony biologicznej 4,842 mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h. Skrócenie czasu trwania podfazy z napowietrzaniem z 40 min (R=1/4) do 30 min (R=1/3) spowodowało natomiast 1,15-krotne i 1,08-krotne zmniejszenie analizowanych szybkości, odpowiednio w testach AUR dla osadu czynnego i biofilmu. Na podstawie prowadzonych równolegle badań mikrobiologicznych stwierdzono, że wówczas, gdy częstość występowania bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego w jednej z analizowanych form biomasy rosła lub malała, to w drugiej z nich tendencja zmian wielkości ich populacji była odwrotna. Przykładowo, po zwiększeniu wartości R z 0 do 1/4 częstość występowania AOB i bakterii Comammox w biofilmie uległa znacznemu zmniejszeniu, podczas gdy w osadzie czynnym obserwowano istotny wzrost wielkości ich populacji. Negatywnie na liczebność populacji AOB i bakterii Comammox w osadzie czynnym wpłynęło natomiast obniżenie stężenia tlenu. W biofilmie nie odnotowano wówczas znaczących zmian w częstości występowania tych mikroorganizmów. Istotne zmniejszenie wielkości populacji AOB i bakterii Comammox zasiedlających błonę biologiczną zaobserwowano natomiast po zwiększeniu R z 1/4 do 1/3.

Zmiany aktywności mikroorganizmów utleniających azotyny do azotanów zasiedlających kłaczki osadu czynnego były analogiczne jak w przypadku tych obserwowanych dla bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego. Aktywność NOB w osadzie czynnym zmniejszała się bowiem sukcesywnie ze zwiększeniem wartości R (2,21-krotnie przy zmianie R z 0 na 1/4 i 1,24-krotnie przy zmianie R z 1/4 na 1/3) i rosła przy obniżaniu poziomu stężenia tlenu (1,51-krotnie przy zmianie DO z 3 mg O₂/l do 2 mg O₂/l). Natomiast na aktywność analizowanej grupy mikroorganizmów, ale zasiedlających błonę biologiczną, wpływ miało jedynie przejście z warunków napowietrzania ciągłego (R=0) na naprzemienne z R=1/4. Wartość NitOR zmniejszyła się wówczas 1,30-krotnie, z 13,906 mg N-NO₂⁻/g_{s.m.o.} · h do 10,687 mg N-NO₂⁻/g_{s.m.o.} · h.

W badaniach opisanych w publikacji P2 wykazano również, że kumulacja azotu azotynowego w testach AUR występowała jedynie dla osadu czynnego. Rosła ona po zwiększeniu wartości R, z kolei obniżenie stężenia tlenu nie miało na nią wpływu. Obserwacje te są zgodne ze zmianami szybkości utleniania azotu azotynowego odnotowanymi na podstawie wyników testów NitUR prowadzonych dla osadu czynnego. Na tej podstawie stwierdzono, że naprzemienne napowietrzanie jest czynnikiem powodującym supresję bakterii NOB zasiedlających kłaczki osadu czynnego, powodując obniżenie ich aktywności.

Jak już wspomniano, eksperyment nr 3 (P3) był kontynuacją badań przeprowadzonych dla IFAS-MBSBBR w ramach eksperymentu nr 2 (P2). W publikacji 3. analogicznie do publikacji 2. omówiono wpływ strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitryfikacji w hybrydowym reaktorze ze złożem ruchomym. Dodatkowo, aby lepiej zrozumieć oddziaływanie stężenia tlenu na aktywność poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych, przy jednoczesnym uwzględnieniu formy w jakiej w układzie rozwijała się biomasa, zakres badań rozszerzono o testy porcjowe prowadzone przy stężeniu tlenu równym 1,5 mg O₂/l oraz 1,0 mg O₂/l (podobnie jak w P2 przedmiotowe testy porcjowe prowadzono również przy poziomie stężenia tlenu w warunkach nasycenia przy 20°C).

Wartości szybkości utleniania azotu amonowego (AOR) i szybkości utleniania azotu azotynowego (NitOR) określone na podstawie wyników testów porcjowych przedstawiono w tabeli 5.1. Interesujące obserwacje poczyniono w serii 2. w odniesieniu do szybkości utleniania azotu amonowego. Wyższą wartość tego wskaźnika uzyskano bowiem dla niższego poziomu stężenia tlenu. Dodatkowo, w serii 4., w testach prowadzonych przy najniższym z analizowanych stężeń tlenu (1,0 mg O₂/l), wartości AOR-AS i AOR-B były odpowiednio 1,25-krotnie i 1,24-krotnie wyższe od tych, które wyznaczono, gdy test prowadzono przy DO=1,5 mg O₂/l. Poczynione obserwacje sugerują, że w kłaczkach osadu czynnego i biofilmie, tak jak w przypadku wcześniej opisanego reaktora MBSBBR, mogły się rozwinąć mikroorganizmy zdolne do utleniania azotu amonowego, które w warunkach niższego stężenia tlenu charakteryzują się wyższą aktywnością.

Tabela 5.1. Szybkość utleniania azotu amonowego i szybkość utleniania azotu azotynowego wyznaczone w testach AUR i NitUR prowadzonych przy różnych stężeniach tlenu

Wskaźnik	Stężenie tlenu (mg O ₂ /l)	Seria 1			Seria 2			Seria 4		
		AS	B	H	AS	B	H	AS	B	H
Szybkość utleniania azotu amonowego (AOR) (mg N-NH ₄ ⁺ /g _{s.m.o.} · h)	nasycenie tlenem przy 20°C	6,841	3,374	-	3,856	6,993	-	8,061	3,623	-
	1,5	3,806	1,478	2,614	4,555	1,733	3,102	2,887	1,504	1,911
	1,0	3,855	0,890	-	-	-	-	3,607	1,865	-
Szybkość utleniania azotu azotynowego (NitOR) (mg N-NO ₂ ⁻ /g _{s.m.o.} · h)	nasycenie tlenem przy 20°C	4,211	9,239	-	3,503	21,446	-	4,868	18,588	-
	1,5	2,275	4,786	2,577	2,516	7,024	5,249	1,960	6,778	3,641

AS – osad czynny; B – błona biologiczna; H – hybryda (osad czynny + błona biologiczna).

Zgodnie z danymi przedstawionymi w literaturze (Onnis-Hayden i in., 2011; Regmi i in., 2011) oczekiwano, że w badaniach prowadzonych dla połączenia obydwu analizowanych form biomasy w jednym reaktorze, tj. dla hybrydy, wartości AOR-H i NitOR-H będą wyższe, lub co najmniej zbliżone do najwyższych wartości odnotowanych dla osadu czynnego lub biofilmu. Jednakże, w przypadku szybkości utleniania azotu amonowego, wartości AOR-H były średnio 1,48-krotnie niższe niż wartości AOR-AS i 1,61-krotnie wyższe niż AOR-B. Wartość NitOR-H była z kolei średnio 1,69-krotnie niższa niż w przypadku błony biologicznej i 1,69-krotnie wyższa niż w osadzie czynnym. Obserwacje te mogą wskazywać na konkurencję o substrat i tlen pomiędzy bakteriami należącymi do tej samej grupy, ale rozwijającymi się w różnej formie w reaktorze hybrydowym.

W publikacji P3 przedstawiono również wyniki badań dotyczące wpływu strategii napowietrzania na emisję N_2O . Wykazano, że konsekwencją skrócenia czasu trwania podfaz z napowietrzaniem z 30 min do 20 min było 1,22-krotne zwiększenie emisji podtlenku azotu. Wartość współczynnika emisji N_2O zwiększyła się z 0,896% do 1,091%. Skrócenie czasu podfaz z napowietrzaniem o 10 minut (z 30 min na 20 min) skutkowało częstszym przełączaniem się między podfazami z napowietrzaniem i bez napowietrzania. Uważa się, że tego typu zmiany mogą prowadzić do nagłych skoków produkcji N_2O (Domingo-Félez i in., 2014; Sabba i in., 2015; Sabba i in., 2018), co również potwierdzono w badaniach własnych.

5.2. Zagadnienie nr 2: Wpływ wykształcenia biomasy w postaci osadu czynnego w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego na efektywność oczyszczania ścieków, ze szczególnym uwzględnieniem procesu nitryfikacji

Kolejnym zagadnieniem, które analizowano w badaniach własnych, było określenie wpływu zmiany formy w jakiej w sekwencyjnym reaktorze porcjowym ze złożem ruchomym rozwija się biomasa na efektywność oczyszczania ścieków. Eksperyment nr 4 polegał na wykształceniu w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego biomasy w postaci osadu czynnego i dla tak wpracowanego reaktora hybrydowego określeniu wpływu różnych strategii napowietrzania na przebieg procesu nitryfikacji. Uzyskane wyniki zaprezentowano w artykule pt. „*Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies*” opublikowanym w czasopiśmie Bioresource Technology (2024, P4).

W literaturze przedmiotu podkreśla się potencjał zwiększenia efektywności usuwania zanieczyszczeń w systemach osadu czynnego poprzez wprowadzenie do reaktora ruchomych nośników i tym samym uzyskanie systemu hybrydowego (np. Dang et al., 2020). Brakuje

jednak badań nad poprawą efektywności pracy systemów opartych na biofilmie poprzez rozwój w nich dodatkowej biomasy w postaci kłaczków osadu czynnego. Niniejsza dysertacja stanowi próbę uzupełnienia wiedzy w przedmiotowym obszarze. W przeprowadzonym eksperymencie wykorzystano sekwencyjny reaktor porcjowy pracujący w czystej technologii złoża ruchomego. Wprowadzając fazę sedimentacji, umożliwiono rozwój osadu czynnego bez konieczności dodatkowego zewnętrznego zaszczepienia. Inokulum dla tworzenia się kłaczków osadu czynnego stanowiła w tym przypadku błona biologiczna odrywająca się od ruchomych nośników. Mimo że obserwowane zjawisko, określane mianem zaszczepiania, było już wcześniej dokumentowane w publikacjach dotyczących reaktorów hybrydowych, nigdy nie zaobserwowano go od samego początku, czyli tworzenia osadu czynnego „od podstaw” bezpośrednio z biofilmu.

W badaniach opisanych w P4 wykazano, że niezależnie od wariantu technologii złoża ruchomego, w której pracował reaktor (czysta lub hybrydowa) oraz od zastosowanej strategii napowietrzania, efektywność procesu nityfikacji utrzymywała się na porównywalnym poziomie ($96,32 \pm 1,94\%$). Wyniki analizy mikrobiologicznej sugerują, że o wysokiej efektywności analizowanego procesu w dużej mierze decydowały mikroorganizmy zdolne do przeprowadzenia heterotroficznej nityfikacji połączonej z autotroficzną denityfikacją (HNAD). W próbkach biomasy wykryto bowiem wysoką liczebność takich rodzajów bakterii jak *Pseudomonas* (0-30%), *Acinetobacter* (0-53%), *Rhodococcus* (ok. 0,1%), *Niabella* (0-6%) i *Bacillus* (0-25%). Wielkości ich populacji były znacznie wyższe niż autotroficznych bakterii nityfikacyjnych, których liczebność w większości serii utrzymywała się poniżej 1%. Wśród zidentyfikowanych w biomasie autotroficznych nityfikatorów występowały jedynie bakterie z rodzajów *Nitrosomonas*, *Nitrospira* i *Nitrosomonadaceae*.

Podobnie jak w przypadku procesu nityfikacji, analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w efektywności usuwania ze ścieków związków organicznych wyrażonych ChZT. Średnia wartość tego wskaźnika wynosiła $96,96 \pm 0,83\%$. W biomasie rozwijającej się w reaktorze niezależnie od warunków technologicznych obserwowano obecność takich mikroorganizmów jak Proteobacteria (głównie z rodzaju *Pseudomonas*), Firmicutes (głównie z rodzaju *Bacillus*), Actinobacteria i Bacteroidetes, które odpowiadają za usuwanie związków organicznych (Zhang i in., 2019).

Wykształcenie biomasy w postaci osadu czynnego przyczyniło się natomiast do zwiększenia efektywności procesu denityfikacji oraz biologicznej defosfatacji. W serii,

w której trwało wykształcenie osadu czynnego (e1.s2.), efektywność wymienionych powyżej procesów wzrosła odpowiednio z 79,43% (dzień 12, e1.s1.) do 84,35% (dzień 48, e1.s2.) i z $35,03 \pm 4,25\%$ (e1.s1.) do $87,32 \pm 3,64\%$ (e1.s2.). Uważa się, że biomasa w postaci osadu czynnego sprzyja rozwojowi bakterii heterotroficznych, zapewniając im lepszy dostęp do substratów (Shao i in., 2017). Na sprawność analizowanych procesów miały również wpływ zmiany wprowadzane w strategii napowietrzania. Wraz ze zwiększeniem efektywności usuwania związków N i P, w biomasie rozwijającej się w IFAS-MBSBBR, obserwowano istotny wzrost ilości bakterii z rodzaju *Bacteroidetes*. Mikroorganizmy te wskazywane są jako kluczowa grupa odpowiedzialna za przebieg procesów denitryfikacji oraz biologicznej defosfatacji (Gao i in., 2020, Wu i in., 2021). Udział ich populacji w stosunku do całkowitej liczby bakterii wzrósł 7,39-krotnie w osadzie czynnym i 4,21-krotnie w błonie biologicznej.

Chociaż efektywność nitryfikacji pozostawała na podobnym poziomie we wszystkich seriach omawianego eksperymentu, sugerując brak znaczących zmian w aktywności nitrifikatorów obecnych w systemie, testy porcjowe wykazały zróżnicowaną dynamikę utleniania azotu amonowego i azotu azotynowego.

W testach AUR, przeprowadzonych bezpośrednio po wykształceniu biomasy w formie zawieszony, nie zaobserwowano znaczących zmian w szybkości utleniania azotu amonowego przez mikroorganizmy zasiedlające biofilm (e1.s2.). Wartość AOR-B zmieniła się, gdy system działał już jako hybryda przy stałym stężeniu osadu czynnego przez 45 dni (e1.s3.). Zaobserwowano wówczas 1,34-krotne zmniejszenie AOR-B, z $6,558 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s2.) do $4,893 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s3.). Równolegle w testach AUR, prowadzonych dla osadu czynnego, wykazano 1,40-krotny wzrost szybkości utleniania azotu amonowego. Wartości AOR-AS zwiększyła się z $4,500 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s2.) do $6,311 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s3.). Biorąc pod uwagę znaczącą rolę gradientów stężeń tlenu i substratu w środowisku jakim jest biofilm, można przypuszczać, że osad czynny został wybrany jako środowisko bardziej sprzyjające rozwojowi mikroorganizmów zdolnych do utleniania azotu amonowego.

Wykształcenie biomasy w postaci osadu czynnego miało natomiast znaczący wpływ na aktywność bakterii utleniających azotyny do azotanów zasiedlających biofilm. Świadczyło o tym ponad 2-krotne zwiększenie wartości NitOR-B (z $10,063 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s1.) do $21,829 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s2.)). Po 45 dniowym okresie pracy reaktora jako systemu hybrydowego NitOR-B uległa zmniejszeniu, osiągając poziom zbliżony do tego, jaki

obserwowano, gdy układ funkcjonował w czystej technologii złoża ruchomego ($9,968 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$) (e1.s3). Wartym przytoczenia spostrzeżeniem jest również fakt, że w testach NitUR, przeprowadzonych bezpośrednio po wykształceniu osadu czynnego, uzyskano najwyższą w całym eksperymencie wartość NitOR-AS ($4,164 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$) (e1.s2.).

W przeciwieństwie do wyników, które uzyskano dla reaktora, który od samego początku pracował jako hybryda (eksperymenty nr 2 i 3, publikacje P2 i P3), na podstawie badań prowadzonych w ramach eksperymentu nr 4, nie można jednoznacznie wskazać środowiska, w którym bakterie zdolne do utleniania azotu amonowego były bardziej aktywne. W etapie 1. biofilm stanowił środowisko, w którym mikroorganizmy te charakteryzowały się wyższą aktywnością (poza serią 3.). Wartość AOR-B była wyższa od AOR-AS 1,46-krotnie w serii 2., 1,22-krotnie w serii 4. i 1,42-krotnie w serii 5. W etapie 2., w którym czas trwania podfaz bez napowietrzania był dwukrotnie wyższy niż tych z napowietrzaniem, tendencja ta się odwróciła i wartości AOR były każdorazowo wyższe dla osadu czynnym niż dla biofilmu. Największą różnicę w wartościach AOR dla rozpatrywanych form biomasy odnotowano, gdy czasy trwania podfaz z i bez napowietrzania wynosiły odpowiednio 2 min i 4 min (e2.s1.). Aktywność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego rozwijających się w osadzie czynnym była wówczas prawie dwa razy większa niż AOB występujących w biofilmie. Podobne zależności opisano zarówno we wcześniejszych badaniach własnych (eksperyment nr 2 (P2) i eksperyment nr 3 (P3)), jak i w badaniach prowadzonych przez inne zespoły naukowe (m.in. Zhang i in., 2016b). W zacytowanych pracach szybkość utleniania azotu amonowego była zawsze wyższa w testach prowadzonych dla osadu czynnego.

Wydłużenie czasu trwania podfaz z napowietrzaniem z 20 min – $R=1/2$ (e1.s3.) do 30 min – $R=1/3$ (e1.s4.) spowodowało, że całkowity czas trwania podfaz bez napowietrzania w jednym cyklu oczyszczania został skrócony ze 110 min do 70 min. Wbrew oczekiwaniom, aktywność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego wyznaczona dla obydwu analizowanych form biomasy zmniejszyła się, a wprowadzone modyfikacje strategii napowietrzania w większym stopniu wpłynęły na mikroorganizmy zasiedlające kłaczki osadu czynnego. Wartość AOR-AS zmalała 1,68-krotnie (z $6,311 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s3.) do $3,766 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s4.)), osiągając zarazem najniższą wartość podczas całego eksperymentu. W przypadku biofilmu odnotowano natomiast 1,06-krotne zmniejszenie szybkości utleniania azotu amonowego (z $4,893 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s3.) do $4,608 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ (e1.s4.)). Biorąc pod uwagę, że w kolejnej serii, po obniżeniu

stężenia tlenu z 3,5 mg O₂/l (e1.s4.) do 1,5 mg O₂/l (e1.s5.), w testach AUR obserwowano wzrost szybkości utleniania azotu amonowego dla osadu czynnego (1,11-krotny) i błony biologicznej (1,29-krotny), można przypuszczać, że w biomacie rozwinęły się wówczas bakterie zdolne do utleniania azotu amonowego, które preferują niższe wartości stężenia tlenu. Jednym z przedstawicieli tego typu mikroorganizmów są bakterie Comammox (Roots i in., 2019). W niniejszym badaniu spośród mikroorganizmów typu Comammox w próbkach biomasy pochodzącej z IFAS-MBSBBR wykryto rodzaj *Nitrospira* sp. Ich największą liczebność (10%) zaobserwowano w osadzie czynnym właśnie w serii, w której obniżono stężenie tlenu (e1.s5.).

W ramach eksperymentu nr 4, w etapie, w którym strategia napowietrzania zakładała brak zadanego poziomu stężenia tlenu w podfazach z napowietrzaniem i stałą wartość R (R=2), przeanalizowano wpływ trzech różnych konfiguracji czasów trwania podfaz z i bez napowietrzania, tj. t₁=2 min, t₂=4 min; t₁=8 min, t₂=16 min; t₁=16 min, t₂=32 min. Stopniowe wydłużanie czasu podfaz z i bez napowietrzania powodowało sukcesywny wzrost wartości AOR zarówno w testach prowadzonych dla osadu czynnego jak i dla błony biologicznej. Po przejściu z t₁=2 min i t₂=4 min (e2.s1.) na t₁=8 min i t₂=16 min (e2.s2.) większe zmiany w aktywność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego odnotowano w przypadku biofilmu. AOR-B wzrosła wówczas 1,94-krotnie (z 2,301 mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h do 4,473 mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h), podczas gdy AOR-AS tylko 1,15-krotnie. Dwukrotne wydłużenie czasów trwania podfaz z i bez napowietrzania (z t₁=8 min i t₂=16 min (e2.s2.) do t₁=16 min i t₂=32 min (e2.s3.)) spowodowało 1,29-krotny wzrost AOR-AS (z 5,283 mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h do 6,806 mg N-NH₄⁺/g_{s.m.o.} · h). Osad czynny charakteryzował się wówczas najwyższą wartością AOR w trakcie trwania całego eksperymentu. Aktywność mikroorganizmów zdolnych do utleniania azotu amonowego zasiedlających biofilm utrzymywała się natomiast na porównywalnym poziomie.

Dla szybkości utleniania azotu azotynowego, analogiczne zmiany jak w przypadku AOR obserwowano jedynie dla błony biologicznej. Czterokrotne wydłużenie czasów trwania podfaz z i bez napowietrzania (z t₁=2 min i t₂=4 min (e2.s1.) do t₁=8 min i t₂=16 min (e2.s2.)) spowodowało 1,17-krotny wzrost NitOR-B (z 9,288 mg N-NO₂⁻/g_{s.m.o.} · h do 10,863 mg N-NO₂⁻/g_{s.m.o.} · h). Wartość NitOR-B zwiększyła się również 1,19-krotnie, gdy wprowadzono napowietrzanie z czasami trwania podfaz z i bez napowietrzania wynoszącymi odpowiednio t₁=16 min i t₂=32 min (e2.s3.). Dla osadu czynnego znaczącą różnicę w wartościach NitOR-AS w tym etapie eksperymentu odnotowano jedynie w pierwszym

z analizowanych przypadków. Wartość NitOR-AS zmniejszyła się 2,48-krotnie z 2,883 mg N-NO₂⁻/g_{s.m.o.} · h do 1,161 mg N-NO₂⁻/g_{s.m.o.} · h.

Wyniki uzyskane w eksperymencie nr 4 wskazują na duży potencjał hybrydowych reaktorów ze złożem ruchomym jako rozwiązań pozwalających na zwiększenie efektywności biologicznego oczyszczania ścieków. Potwierdzono, że jednocześnie występowanie biofilmu i osadu czynnego w jednym reaktorze sprzyja wzrostowi bakterii autotroficznych i heterotroficznych, co prowadzi do intensyfikacji usuwania azotu i fosforu oraz skutecznej eliminacji związków węgla organicznego. Udokumentowano również, że strategia napowietrzania realizowana przy założeniu, że czas trwania podfaz z napowietrzaniem będzie dwukrotnie niższy niż ten bez napowietrzania może w znacznym stopniu zwiększyć aktywność bakterii nityfikacyjnych rozwijających się w postaci kłacek osadu czynnego i biofilmu prowadząc jednocześnie do znacznego skrócenia czasu trwania podfaz z napowietrzaniem.

5.3. Zagadnienie nr 3: Wpływ strategii napowietrzania na zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie

Zakres przeprowadzonych badań obejmował również analizę i ocenę wpływu różnych wariantów strategii napowietrzania na zużycie energii elektrycznej niezbędnej do tego procesu (E₀). Wyniki badań opisano w publikacjach: „*Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates*” (International Journal of Environmental Science and Technology, 2023 – P3) oraz „*Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies*” (Bioresource Technology, 2024 – P4).

Jak wskazano we wprowadzeniu do niniejszej dysertacji, zagadnienie to jest niezwykle istotne z uwagi na fakt, że proces nityfikacji wymaga energochłonnego napowietrzania, które stanowi aż 50-75% wydatku energetycznego całej oczyszczalni ścieków (Luo i in., 2019). Warto podkreślić, że niewłaściwy dobór parametrów strategii napowietrzania może prowadzić do strat energii sięgających nawet 40% całkowitego zużycia energii w procesie oczyszczania ścieków. To z kolei znacząco wpływa na koszty eksploatacyjne całego przedsiębiorstwa (Foladori i in., 2015). W literaturze przedmiotu naprzemienne napowietrzanie wymieniane jest jako jedno z rozwiązań minimalizujących zużycie energii niezbędnej do dostarczenia wymaganej ilości tlenu w celu usunięcia ze ścieków wymaganego ładunku zanieczyszczeń. Temat ten jest nadal niewystarczająco zbadany, szczególnie w kontekście reaktorów wykorzystujących hybrydową technologię złoża ruchomego. Celem niniejszych badań było wypełnienie tej luki. Uważa się bowiem, że jednym z głównych wyzwań tego rozwiązania

technologicznego, ograniczającym zarazem jego zastosowanie, jest wyższe zużycie energii na napowietrzanie w porównaniu do systemów wykorzystujących technologię osadu czynnego (Singh i in., 2017).

W badaniach opisanych w P3 porównano zużycie energii elektrycznej dla dwóch wariantów naprzemiennego napowietrzania. Charakteryzowały się one wartościami R na poziomie 1/3 ($t_1=30\text{min}$, $t_2=10\text{min}$; s.1.) i 1/2 ($t_1=20\text{min}$, $t_2=10\text{min}$; s.2. i s.4.) oraz stałym zadaniem poziomem stężenia tlenu w podfazach z napowietrzaniem wynoszącym 1,5 mg O₂/l (Tabela 5.2.).

Tabela 5.2. Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie (E_o) i efektywność procesu nitryfikacji w zależności od zastosowanej strategii napowietrzania – wyniki zaprezentowane w publikacji P3

Typ reaktora	Oznaczenie serii badawczej	Strategia napowietrzania		Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie E_o (kWh/kg)	Efektywność procesu nitryfikacji (%)
		Czas trwania podfaz z (t_1) i bez (t_2) napowietrzania $R= t_2/ t_1$	Stężenie O ₂ w podfazach z napowietrzaniem (mg O ₂ /l)		
IFAS-MBSBBR hybrydowa technologia złoża ruchomego	seria 1 (s.1.)	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=30\text{min}$, $t_2=10\text{min}$; $R=1/3$	1,5	2,04±0,04	89,80±4,34
	seria 2* (s.2.)	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=20\text{min}$, $t_2=10\text{min}$; $R=1/2^*$		2,38±0,06	88,21±5,58
	seria 4* (s.4)			2,31±0,04	89,98±2,13

*Dwie wskazane serie charakteryzowały się identycznymi założeniami technologicznymi pracy IFAS-MBSBBR. Pomiędzy wskazanymi seriami wystąpił 68 dniowy okres, w którym obciążenie reaktora ładunkiem związków organicznych i azotem zmniejszono o 1/4 poprzez ograniczenie ilości ścieków dopływających do układu. Zmiany te były spowodowane wybuchem pandemii Covid-19 i koniecznością dostosowania pracy w laboratorium do wprowadzonych wówczas ograniczeń.

Wyniki analizy statystycznej wykazały brak istotnych różnic w efektywności procesu nitryfikacji dla obu analizowanych przypadków. Stwierdzono, że skrócenie czasu trwania podfaz z napowietrzaniem z 30 min do 20 min nie prowadzi do zmniejszenia zużycia energii, pomimo, że ich całkowity czas trwania zmniejszył się z 780 min do 690 min. Czas pracy dmuchaw wzrósł bowiem o ok. 15%, co zwiększyło koszty operacyjne związane ze zużyciem energii elektrycznej o ok. 14-15% w skali całego roku. Można przypuszczać, że obserwowany wzrost czasu pracy dmuchaw wynikał ze zwiększonego zapotrzebowania na tlen przez mikroorganizmy prowadzące proces nitryfikacji. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosku, że w systemach z naprzemiennym napowietrzaniem, gdzie działanie dmuchaw jest kontrolowane zarówno przez wartość R, jak i zadane stężenie tlenu (taki system

sterowania jest zazwyczaj stosowany w oczyszczalniach ścieków), skrócenie czasu napowietrzania nie zawsze prowadzi do oszczędności energetycznych.

W publikacji P4, poza analizą zużycia energii elektrycznej (E_o) dla różnych wariantów strategii napowietrzania ($R=1/2$ i $DO=3,5$ mg O_2/l ; $R=1/3$ i $DO=3,5$ mg O_2/l ; $R=1/3$ i $DO=1,5$ mg O_2/l ; $R=2$ bez zadanego stężenia tlenu), przedstawiono również wyniki badań nad wpływem wykształcenie biomasy w postaci osadu czynnego na wartość E_o (przejście z reaktora MBSBBR na IFAS-MBSBBR). Warto podkreślić, że wprowadzane zmiany nie miały wpływu na uzyskiwaną efektywność procesu nitrifikacji (Tabela 5.3.).

Tabela 5.3. Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie (E_o) i efektywność procesu nitrifikacji w zależności od zastosowanej strategii napowietrzania – wyniki zaprezentowane w publikacji P4

Typ reaktora	Strategia napowietrzania		Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie E_o (kWh/kg)	Efektywność procesu nitrifikacji (%)
	Czas trwania podfaz z (t_1) i bez (t_2) napowietrzania $R= t_2/ t_1$	Stężenie O_2 w podfazach z napowietrzaniem (mg O_2/l)		
MBSBBR czysta technologia złoża ruchomego	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=20min, t_2=10min; R=1/2$	3,5	4,14±0,03	96,25±2,90
IFAS-MBSBBR hybrydowa technologia złoża ruchomego	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=20min, t_2=10min; R=1/2$		3,09±0,04	96,90±1,69
	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=30min, t_2=10min; R=1/3$		3,95±0,07	96,12±1,77
	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=30min, t_2=10min; R=1/3$	1,5	2,81±0,06	96,43±1,78
	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=2min, t_2=4min; R=2$	Bez zadanego stężenia tlenu	2,18±0,07	97,02±1,46
	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=8min, t_2=16min; R=2$		2,22±0,08	95,92±2,49
	Napowietrzanie NAPRZEMIENNE $t_1=16min, t_2=32min; R=2$		2,20±0,03	95,43±2,54

Analizując dane uzyskane dla reaktora IFAS-MBSBBR stwierdzono, że wraz z obniżaniem zadanego poziomu stężenia tlenu z 3,5 mg O₂/l do 1,5 mg O₂/l, bez wprowadzania zmian w wartości R (R=1/3), nastąpiło 1,40-krotne skrócenie czasu pracy dmuchaw. W efekcie uzyskano 29% zmniejszenie wartości E_O. W przypadku, gdy IFAS-MBSBBR pracował bez zadanego poziomu stężenia tlenu, a czas trwania podfaz bez napowietrzania był dwukrotnie wyższy niż tych z napowietrzaniem, R=2 (t₁=2 min, t₂=4 min; t₁=8 min, t₂=16 min; t₁=16 min, t₂=32 min), zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie zmniejszyło się średnio o 22%, w porównaniu do wartości E_O określonej dla wariantu z R=1/3 i DO= 1,5 mg O₂/l. Najniższe zużycie energii (2,18±0,07 kWh/kg, Tabela 5.3.) odnotowano dla czasu trwania podfaz z i bez napowietrzania wynoszących odpowiednio 2 min i 4 min. Warto podkreślić, że wartość ta jest prawie 2-krotnie niższa od maksymalnej wartości E_O określonej w przeprowadzonych badaniach (uzyskanej dla reaktora pracującego w czystej technologii złoża ruchomego).

Z przeprowadzonych badań wynika, że zarówno hybrydowa technologia złoża ruchomego, jak i odpowiednie modyfikacje strategii napowietrzania, prowadzą do znaczących oszczędności energetycznych. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki potencjał systemów hybrydowych w kontekście zrównoważonego zarządzania zasobami energetycznymi.

5.4. Zagadnienie nr 4: Wpływ temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nitryfikacji

Kolejnym zagadnieniem badawczym podjętym w dysertacji było określenie wpływu temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nitryfikacji, tj. utleniania azotu amonowego i utleniania azotu azotynowego. Był to główny wątek artykułu pt. „*Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor*” opublikowanego w czasopiśmie Desalination and Water Treatment (2023; P5). Badania przeprowadzono dla hybrydowej technologii złoża ruchomego w ramach eksperymentu nr 5.

Pomimo że rozwiązanie technologiczne, jakim są reaktory wykorzystujące hybrydową technologię złoża ruchomego, znajduje coraz szersze zastosowanie w oczyszczalniach ścieków, to dostępność informacji dotyczących wpływu gwałtownych spadków temperatury na przebieg jednostkowych procesów usuwania zanieczyszczeń w tych systemach jest nadal ograniczona. Warto przy tym podkreślić, że zagadnienie to jest niezwykle istotne, gdyż proces nitryfikacji uważany jest za jeden z najbardziej wrażliwych na temperaturę etapów biologicznego oczyszczania ścieków. Niska temperatura wpływa na tempo metabolizmu drobnoustrojów,

w wyniku czego obserwowany jest spadek wydajności i szybkości procesu utleniania azotu amonowego (Hülßen i in., 2016).

W badaniach własnych porównano wpływ gwałtownego spadku temperatury na szybkość poszczególnych etapów procesu nitryfikacji w systemie hybrydowym. Porcjowe testy szybkości utleniania azotu amonowego i szybkości utleniania azotu azotynowego zostały przeprowadzone dla dwóch temperatur, 20°C i 12°C, w trzech wariantach różniących się formą, w jakiej rozwinięta była biomasa, tj. dla osadu czynnego (AS), błony biologicznej rozwiniętej na ruchomych nośnikach (B) oraz ich połączenia – hybrydy (H) (Tabela 5.4.). Ponadto, w celu identyfikacji bakterii nitryfikacyjnych zasiedlających osad czynny i błonę biologiczną, przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji. Podobnie jak w poprzednich podrozdziałach, poniżej zawarto najważniejsze obserwacje omówione we wskazanej powyżej publikacji.

Tabela 5.4. Wartości szybkości utleniania azotu amonowego i szybkości utleniania azotu azotynowego przy 20°C i 12°C w zależności od formy w jakiej rozwija się biomasa

Wskaźnik	Forma biomasy	Pierwsze powtórzenie (I powt.)		Drugie powtórzenie (II powt.)	
		20°C	12°C	20°C	12°C
Szybkość utleniania azotu amonowego (AOR) (mg N-NH ₄ ⁺ /g _{s.m.o.} · h)	AS	4,555	3,543	2,887	1,249
	B	1,733	0,750	1,504	0,937
	H	4,234	1,880	1,828	0,936
Szybkość utleniania azotu azotynowego (NitOR) (mg N-NO ₂ ⁻ /g _{s.m.o.} · h)	AS	2,516	1,847	1,960	1,071
	B	7,024	4,551	6,778	3,223
	H	6,128	4,074	3,641	1,922

AS – osad czynny, B – błona biologiczna, H – hybryda (osad czynny + błona biologiczna).

Wyniki sekwencjonowania wykazały obecność nitrifikatorów w obu formach biomasy rozwijających się w IFAS-MBSBBR. Wśród bakterii AOB najliczniejszy był rodzaj *Nitrosomonas* (45,94%-100%), natomiast wśród NOB *Nitrospira* (83,14-99,61%). Ponadto, we wszystkich badanych próbkach, liczebność bakterii NOB była znacznie wyższa niż AOB, w przeciwieństwie do teoretycznego modelu termodynamicznego, który zakłada, że AOB powinny być grupą dominującą. Warto jednak podkreślić, że większość NOB stanowiły *Nitrospira*. Mikroorganizmy te, oprócz zdolności do utleniania azotu azotynowego, mogą charakteryzować się możliwością utleniania azotu amonowego do azotu azotanowego (Daims i in., 2015; van Kessel i in., 2015).

Na podstawie wyników uzyskanych w testach porcjowych stwierdzono, że forma w jakiej rozwija się biomasa w układach hybrydowych, ma istotny wpływ na aktywność mikroorganizmów zdolnych do utleniania azotu amonowego i azotu azotynowego (Tabela 5.4.). Odnotowane różnice w reakcji bakterii zasiedlających poszczególne formy biomasy na gwałtowne wahania temperatury mają kluczowe znaczenie dla projektowania i eksploatacji hybrydowych systemów oczyszczania ścieków, szczególnie w kontekście sezonowej zmienności temperatur.

W wyniku gwałtownego spadku temperatury z 20°C na 12°C aktywność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego zasiedlających kłaczki osadu czynnego zmniejszyła się o 22% (I powt.) i o 57% (II powt.) (Tabela 5.4.). Znaczne zmniejszenie szybkości utleniania azotu amonowego po obniżeniu temperatury w testach prowadzonych dla osadu czynnego odnotowali również Gnida i in. (2016). W badaniach własnych wykazano również, że szybkość utleniania azotu amonowego przez mikroorganizmy rozwinięte w IFAS-MBSBBR w formie osadu czynnego przy 12°C była o 14% niższa niż przewidywana na podstawie współczynników korekcji temperatury podanych dla osadu czynnego przez Hwang i Oleszkiewicza (2007) ($\Theta=1,072-1,127$). Odnotowane różnice skłoniły do wyznaczenia wartości współczynnika korekcji temperatury na podstawie wyników badań własnych. Wykorzystując równanie Arrheniusa (4.11.) wartość współczynnika korekcji temperatury dla osadu czynnego rozwijającego się w reaktorze hybrydowym wyniosła 1,032. Wartość ta jest 1,04-krotnie niższa od dolnej granicy zakresu wartości Θ podanego przez Hwang i Oleszkiewicza (2007).

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, w przypadku reaktorów pracujących w czystej technologii złoża ruchomego, współczynnik korekcji temperatury dla błony biologicznej waha się od 1,023 do 1,081 (wartość średnia 1,058) (Salveti i in, 2006). W badaniach własnych wartość AOR-B wyznaczona dla temperatury 12°C była o 32% niższa (I powt.) od przewidywanej po zastosowaniu średniej wartości współczynnika korekcji temperatury zaproponowanego przez cytowanych autorów, a w drugim powtórzeniu były one niemal identyczne. Współczynnik korekcji temperatury, obliczony na podstawie danych uzyskanych w przeprowadzonym eksperymencie, wyniósł 1,110. Wartość ta jest nieco wyższa od górnej granicy zakresu wartości analizowanego współczynnika zaproponowanego w literaturze.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano również, że bakterie NOB zasiedlające biofilm były bardziej wrażliwe na nagły spadek temperatury z 20°C do 12°C niż

te występujące w osadzie czynnym. Różnice, w odnotowanych po obniżeniu temperatury wartościach NitOR-B, były 1,32-krotnie (I powt.) i 1,16-krotnie (II powt.) wyższe niż różnice w wartościach NitOR-AS. W przypadku biofilmu uważa się, że gwałtowne obniżenie temperatury może powodować zakłócenia w podstawowych funkcjach komórkowych spowalniając tym samym proces nityfikacji. Dzieje się tak na skutek zaburzenia mechanizmów transkrypcji i translacji, przez co błona biologiczna staje się bardziej „sztywna”. W konsekwencji zmniejsza się absorpcja substratów i ograniczany jest ich transport wewnątrz błony (Phadtare i Severinov, 2010; Barria i in., 2013; Ahmed i in., 2019).

Podczas testów prowadzonych dla wariantu hybrydowego (w reaktorze testowym jednocześnie występowała biomasa w formie osadu czynnego i błony biologicznej), gwałtowne obniżenie temperatury powodowało większe zmiany w aktywności bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego niż tych utleniających azotyny do azotanów. AOR-H wyznaczona dla $T=12^{\circ}\text{C}$ była o 56% (I powt.) i o 49% (II powt.) niższa od określonej dla $T=20^{\circ}\text{C}$. Wartości NitOR-H zmniejszyły się natomiast o 34% (I powt.) i o 47% (II powt.). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono współczynnik korekcji temperatury dla reaktora hybrydowego. Dla pierwszego powtórzenia przedmiotowego eksperymentu jego wartość wyniosła 1,107, a dla drugiego 1,087. Otrzymane wartości Θ różnią się od określonych dla osadu czynnego przez Hwang i Oleszkiewicz (2007) jedynie o 1,4% i 1,8%. Porównując je z wartościami uzyskanymi przez Salvetti i in. (2006) dla błony biologicznej, daje się zauważyć, że były one o 6,3% i 2,4% wyższe. Na tej podstawie można przypuszczać, że w układzie hybrydowym większe znaczenie mają mikroorganizmy nityfikacyjne rozwijające się w kłaczkach osadu czynnego niż te występujące w biofilmie. Warto również podkreślić, że dotychczas żaden zespół badawczy nie podjął się próby wyznaczenia wartości współczynnika korekcji temperatury dla tego typu układów. Jak wspomniano na wstępie niniejszego rozdziału, zagadnienie to jest niezwykle istotne z praktycznego punktu widzenia, szczególnie przy rosnącym zainteresowaniu eksploatatorów oczyszczalni ścieków układami hybrydowymi.

5.5. Zagadnienie nr 5: Wpływ modyfikacji parametrów pracy reaktora na przebieg i efektywność procesu nityfikacji. Przekształcenie hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym (IFAS-MBSBBR) do zintegrowanego usuwania związków węgla, azotu i fosforu w głównym ciągu oczyszczania ścieków na nityfikacyjny reaktor pracujący w czystej technologii złoża ruchomego (MBSBBR) w warunkach ciągu bocznego

W ramach ostatniego z zagadnień badawczych podjętych w dysertacji analizowano aktywność i liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów nityfikacyjnych podczas sukcesywnych zmian wprowadzanych w pracy reaktora IFAS-MBSBBR symulującego

oczyszczanie ścieków w głównym ciągu technologicznym, których celem było przekształcenie tego układu w reaktor nitryfikacyjny symulujący oczyszczanie ścieków w ciągu bocznym (eksperyment nr 6). Istotnym elementem poznawczym tej części pracy były również badania nad wpływem formy, w jakiej biomasa rozwija się w reaktorach ze złożem ruchomym, na występowanie i liczebność bakterii Comammox, z uwzględnieniem relacji pomiędzy tymi mikroorganizmami a kanonicznymi nitryfikatorami.

Eksperyment nr 6 trwał 338 dni. Rozpoczęto go w hybrydowym reaktorze ze złożem ruchomym zapewniającym zintegrowane usuwanie ze ścieków związków węgla organicznego, azotu i fosforu (badania prowadzono w układzie, w którym wcześniej wykonywano eksperyment nr 2 i 3). Poprzez stopniowe obniżanie obciążenia reaktora ładunkiem związków organicznych (etap 1.), zwiększenie temperatury (etap 2.), a następnie zwiększenie obciążenia reaktora ładunkiem azotu (etap 3.) uzyskano reaktor nitryfikacyjny zapewniający wysokosprawne usunięcie ze ścieków azotu amonowego. Wprowadzane zmiany spowodowały, że w reaktorze zaczęły dominować mikroorganizmy rozwijające się w postaci błony biologicznej na ruchomych nośnikach. Uzyskano zatem reaktor pracujący w czystej technologii złoża ruchomego. Wyniki przedmiotowego eksperymentu zaprezentowano w artykule pt. *„Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor”* opublikowanym w czasopiśmie Journal of Water Process Engineering (2023; P6).

5.5.1. Zmiany aktywności i liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych w odpowiedzi na zmiany parametrów technologicznych pracy reaktora

Stopniowe zmniejszanie obciążenia reaktora ładunkiem związków organicznych – etap 1.

Wraz z obniżaniem obciążenia reaktora ładunkiem związków organicznych (OLR) z $554 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ do $384 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ aktywność bakterii nitryfikacyjnych zasiedlających kłaczki osadu czynnego zmalała. Wartość AOR-AS zmniejszyła się 1,26-krotnie (z $8,061 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $6,375 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$), a w teście NitUR odnotowano 1,75-krotnie spadek wartości NitOR-AS (z $4,868 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $2,789 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$). Równolegle analiza wyników qPCR wykazała, że częstość występowania NOB i bakterii Comammox zmniejszyła się odpowiednio 3,01-krotnie i 1,25-krotnie, podczas gdy liczba bakterii AOB wzrosła 1,69-krotnie. Uzyskane wyniki sugerują, że mimo zwiększenia wielkości populacji kanonicznych bakterii utleniających azot

amonowy (AOB), na obserwowany spadek wartości AOR-AS mogło wpłynąć zmniejszenie populacji bakterii Comammox. W przypadku błony biologicznej nie odnotowano natomiast znaczących zmian w wartościach AOR i NitOR. Obniżenie OLR spowodowało natomiast, że liczebność wszystkich analizowanych grup nityfikatorów w biofilmie wzrosła. Wartości częstości występowania AOB, NOB i bakterii Comammox zwiększyły się odpowiednio 1,15-krotnie, 2,19-krotnie i 1,24-krotnie.

Dalsze obniżanie wartości OLR skutkowało wzrostem szybkości utleniania azotu amonowego prowadzonego przez mikroorganizmy zasiedlające zarówno błonę biologiczną jak i kłaczki osadu czynnego. Po zmniejszeniu OLR z $384 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ do $213 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ wartości AOR-B i AOR-AS zwiększyły się odpowiednio 2,26-krotnie i 1,63-krotnie. Równolegle w biofilmie odnotowano wówczas 1,47-krotny spadek liczebności bakterii AOB, natomiast w osadzie czynnym wielkość ich populacji zwiększyła się 1,12-krotnie. W obydwu analizowanych środowiskach wzrosła również częstość występowania bakterii Comammox, odpowiednio 1,20-krotnie w błonie biologicznej i 1,46-krotnie w osadzie czynnym. W biofilmie bakterie Comammox stały się wówczas dominującą grupą mikroorganizmów zdolnych do utleniania azotu amonowego i można przypuszczać, że to właśnie ich obecności przypisywać można zwiększoną szybkość utleniania azotu amonowego. Zmniejszenie wartości OLR do $213 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ spowodowało również 2,25-krotny wzrost aktywności bakterii NOB zasiedlających kłaczki osadu czynnego i 1,18-krotne obniżenie aktywności tych mikroorganizmów występujących w błonie biologicznej. Co ciekawe, w badaniach qPCR wykazano, że częstość występowania bakterii NOB w osadzie czynnym zmniejszyła się 2,90-krotnie, podczas gdy w biofilmie wzrosła 1,50-krotnie.

Po całkowitym wyeliminowaniu związków organicznych ze ścieków dopływających do reaktora szybkości utleniania azotu amonowego określone dla osadu czynnego i błony biologicznej wzrosły jeszcze odpowiednio 2,41-krotnie i 1,26-krotnie. W biofilmie odnotowano wówczas spadek częstości występowania zarówno AOB (1,62-krotny) jak i bakterii Comammox (1,50-krotny), podczas gdy w osadzie czynnym 1,15-krotnie zmniejszyła się jedynie populacja AOB. Liczebność bakterii Comammox w kłaczkach osadu czynnego wzrosła wówczas 2,32-krotnie i tak jak w biofilmie mikroorganizmy te stały się dominującą grupą zdolną do utleniania azotu amonowego. Równolegle odnotowano również 1,19-krotny wzrost wartości NitOR dla błony biologicznej, mimo że wielkość populacji bakterii NOB w tym środowisku zmniejszyła się prawie 1,80-krotnie. Warto podkreślić, że prawie 10-krotnemu

zwiększeniu częstości występowania bakterii NOB w osadzie czynnym nie towarzyszyła znacząca zmiana w wartościach NitOR-AS.

Dla wszystkich analizowanych powyżej warunków pracy reaktora uzyskiwano analogiczną efektywność procesu nitryfikacji.

Istotne jest również, że w wyniku całkowitego usunięcia związków organicznych ze ścieków dopływających do reaktora odnotowano znaczny ubytek ilości osadu czynnego. Dominującą formą biomasy w układzie stała się błona biologiczna. W kolejnych etapach eksperymentu nr 6 biomasa w reaktorze rozwijała się wyłącznie w postaci biofilmu porastającego ruchome nośniki, co jest charakterystyczne dla czystej technologii złoża ruchomego.

Zwiększenie temperatury – etap 2.

W drugim etapie badawczym, aby zasymulować warunki panujące w bocznym ciągu technologicznym, stopniowo zwiększano temperaturę w nitryfikacyjnym reaktorze MBSBBR z 20°C do 30°C. Podczas analizowanego etapu przeprowadzono dwie serie testów porcjowych AUR i NitUR, odpowiednio po 7 i 14 dniach od uzyskania zadanego poziomu temperatury. Wyniki tych badań pokazują, że po 7 dniach pracy nitryfikacyjnego MBSBBR w temperaturze 30°C aktywność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego i tych utleniających azotyny do azotanów zmniejszyła się, odpowiednio 1,33-krotnie i 1,46-krotnie, w stosunku do wartości wyznaczonych na początku etapu 2 ($T=20^{\circ}\text{C}$). Wartość AOR zmalała z $9,994 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $7,535 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$, natomiast NitOR z $18,527 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $12,671 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$. Równolegle w badaniach mikrobiologicznych wykazano zmniejszenie częstości występowania bakterii Comammox i NOB, natomiast liczba kanonicznych bakterii AOB wbrew oczekiwaniom wzrosła 2,20-krotnie. Obserwacje te mogą świadczyć o tym, że to nitryfikatory zdolne do przeprowadzenia pełnej nitryfikacji mogły wówczas w większym stopniu odpowiadać za utlenianie azotu amonowego, a zmniejszenie liczebności ich populacji w istotny sposób wpłynęło na spadek wartości AOR. Za słusznością tej tezy przemawiają wyniki testów przeprowadzonych po 14 dniach od zwiększenia temperatury do 30°C. Zaobserwowano wówczas 1,54-krotny wzrost wartości AOR przy jednoczesnym 2,68-krotnym spadku częstości występowania AOB i 1,23-krotnym wzroście liczebności populacji bakterii Comammox. Nie odnotowano natomiast znaczących zmian w wartościach NitOR, choć częstość występowania NOB zwiększyła się 1,80-krotnie. Warto jednak zaznaczyć, że startery PCR stosowane do

określenia częstości występowania NOB, wykrywają również bakterie Comammox. Odnotowany wzrost częstości występowania NOB mógł być zatem spowodowany występowaniem mikroorganizmów utleniających azot amonowy do azotu azotanowego.

Stopniowe zwiększanie obciążenia reaktora ładunkiem azotu – etap 3.

Z przeprowadzonych badań wynika, że stopniowe zwiększanie obciążenia nitryfikacyjnego reaktora MBSBBR ładunkiem azotu (NLR) miało większy wpływ na aktywność NOB niż AOB. Wartość NitOR zwiększała bowiem sukcesywnie wraz ze wzrostem NLR. Gdy NLR podniesiono z $77 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ (seria 1.) do $108 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ (seria 2.) analizowana wartość wzrosła 1,90-krotnie (z $15,012 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $28,458 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$). Wyniki qPCR wykazały wówczas ponad 3,30-krotny wzrost częstości występowania bakterii NOB. W kolejnych seriach po zwiększeniu NLR do $131 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ (seria 3.) i do $172 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ (seria 4.), wartości NitOR zwiększyły się odpowiednio 1,10-krotnie (do $31,182 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$) i 1,19-krotnie (do $37,251 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$). Pomimo obserwowanego wzrostu szybkości utleniania azotu azotynowego liczebność bakterii NOB w kolejnych seriach malała, co sugeruje, że NOB, które występowały w reaktorze w serii 4. charakteryzowały się wyższą aktywnością od NOB obecnych w serii 1. Mimo wzmożonej aktywności bakterii utleniających azotyny, warunki panujące wówczas w MBSBBR musiały być czynnikiem hamującym ich dalszy rozwój.

Prowadząc analogiczną analizę, ale w odniesieniu do szybkości utleniania azotu amonowego, stwierdzono, że jedyna znacząca zmiana wartości tego wskaźnika wystąpiła po zwiększeniu NLR z $77 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ (seria 1.) do $108 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ (seria 2.). AOR wzrosła wówczas 1,40-krotnie, z $11,308 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$ do $15,810 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{g}_{\text{s.m.o.}} \cdot \text{h}$. Na zbliżonym poziomie pozostała już do końca eksperymentu.

Analiza uzyskanych wyników wykazała również, że w trakcie trzech pierwszych serii etapu 3. efektywność procesu nitryfikacji utrzymywała się na zbliżonym poziomie, a jej średnia wartość wynosiła $94,76 \pm 2,79\%$. Pozwalało to na uzyskanie średniego stężenia azotu amonowego w oczyszczonych ściekach na poziomie $0,98 \pm 1,30 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}$. Po zwiększeniu obciążenia reaktora ładunkiem azotu do $172 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$ efektywność analizowanego procesu zmniejszyła się do $82,91 \pm 11,47\%$ (seria 4.). Stężenie azotu amonowego w ściekach oczyszczonych wynosiło wówczas średnio $20,36 \pm 16,82 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}$.

Wraz ze wzrostem stężenia azotu amonowego w ściekach oczyszczonych odnotowano również znaczący wzrost kumulacji azotu azotynowego, w odpływie z reaktora. W 4. serii badawczej kumulację azotynów na poziomie $20,39 \pm 9,70$ mg N-NO₂⁻/l obserwowano do 318 dnia badań. W kolejnych dniach eksperymentu (319-338), wraz ze zmniejszeniem stężenia azotu amonowego w ściekach oczyszczonych, zmniejszyła się również kumulacja azotynów. Od 319 dnia do końca serii 4. wynosiła ona średnio $6,61 \pm 4,55$ mg N-NO₂⁻/l. Obserwowane zjawisko mogło być związane z wysokim stężeniem wolnego amoniaku (FA) w układzie. Wartość tego wskaźnika w serii 4. wynosiła średnio $3,64 \pm 0,10$ mg FA/l. Początkowo, na skutek stresu wywołanego wzrostem stężenia tego inhibitora, bakterie NOB zmniejszyły swoją aktywność, co skutkowało wysoką kumulacją azotynów w ściekach oczyszczonych. Można przypuszczać, że z biegiem czasu bakterie NOB „przyzwyczyły się” do panujących warunków i poprzez zmianę szlaków metabolicznych udało im się zmniejszyć wpływ FA na przebieg procesu utleniania azotu amonowego.

5.5.2. Bakterie Comammox – występowanie w głównym i bocznym ciągu oczyszczania ścieków

Przeprowadzone badania pozwoliły również na porównanie występowania bakterii Comammox w osadzie czynnym i błonie biologicznej dla dwóch konfiguracji pracy hybrydowego reaktora ze złożem ruchomym, tj. w układzie do zintegrowanego usuwania związków węgla, azotu i fosforu oraz w reaktorze nitryfikacyjnym. W pierwszym z analizowanych przypadków wielkość populacji bakterii Comammox w biofilmie znacznie przewyższała tę w osadzie czynnym. Analogiczne doniesienia można znaleźć w pracy Tsuchiya i in. (2020). Cytowani autorzy, analizując próbki osadu czynnego i biofilmu pobrane z głównego ciągu oczyszczalni ścieków z nitryfikacją/denitryfikacją, bakterie Comammox zidentyfikowali jedynie w biofilmie. Skorelowali to z faktem, że biofilm porastający ruchome nośniki zapewniając warunki oligotroficzne sprzyjał rozwojowi tych mikroorganizmów. Błona biologiczna jest środowiskiem, w którym gradienty stężeń tlenu i składników odżywczych odgrywają istotną rolę. Ze względu na warstwową strukturę biofilmu, inne warunki będą panować na jego powierzchni, a inne w jego wnętrzu – zapewniając środowisko dostosowane do rozwoju poszczególnych grup mikroorganizmów. Według niektórych doniesień literaturowych bakterie Comammox zasiedlają głębsze partie biofilmu, wybierając warunki charakteryzujące się niższymi wartościami stężenia tlenu i azotu amonowego (Lawson i Lücker, 2018).

Po przekształceniu układu w hybrydowy reaktor nitryfikacyjny zaobserwowano zmianę w częstotliwości występowania bakterii Comammox w osadzie czynnym i biofilmie. Względna liczebność bakterii Comammox w biofilmie zmalała, podczas gdy ich populacja w kłaczkach osadu czynnego wzrosła. W rezultacie, liczebność tych bakterii w osadzie czynnym przewyższyła ich liczebność w biofilmie. Jest to ciekawa obserwacja, gdyż w przypadku reaktora hybrydowego do zintegrowanego usuwania związków C, N i P, niezależnie od wprowadzonych zmian (skrócenie czasu trwania podfaz z napowietrzeniem – wzrost wartości R, obniżenie stężenia tlenu, zmniejszenie OLR), populacja bakterii Comammox była każdorazowo większa w biofilmie. Dotychczas nie opisano hybrydowego reaktora nitryfikacyjnego, w którym liczebność bakterii Comammox w osadzie czynnym przewyższałaby ich liczebność w biofilmie. Eliminację związków organicznych ze ścieków doprowadzanych do reaktora można zatem uznać za czynnik wpływający na zmianę „preferowanej” przez bakterie Comammox formy, w jakiej się rozwijają, z błony biologicznej na kłaczkę osadu czynnego.

Jednym z zagadnień poruszanych w najnowszej literaturze jest również dominacja bakterii Comammox nad kanonicznymi bakteriami AOB. Niniejsze badania wykazały, że w określonych warunkach liczebność bakterii Comammox w biofilmie i kłaczkach osadu czynnego może być wyższa niż AOB.

W przypadku biofilmu zjawisko to zaobserwowano, gdy OLR obniżono z $384 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ do $213 \text{ g ChZT/m}^3 \cdot \text{d}$ i gdy związki organiczne całkowicie zostały wyeliminowane ze ścieków dopływających do układu. Dominację bakterii Comammox nad AOB w próbkach biofilmu odnotowali m.in. Huang i in. (2022) oraz Spasov i in. (2020). Pierwsza z cytowanych grup badaczy wykazała wysoką liczebność bakterii Comammox i stwierdziła, że w określonych warunkach (stężenie amoniaku na poziomie $0,01\text{--}15,0 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}$ i wiek biomasy > 1000 dni) bakterie te mogą nawet dominować w biofilmie rozwijającym się w nitryfikacyjnym MBBR. Z kolei Spasov i in. (2020) zauważyli, że bakterie Comammox zdecydowanie dominują w próbkach biofilmu pobranego z tarczowego złoża biologicznego.

W odniesieniu do wyników dotyczących osadu czynnego stwierdzono, że po przekształceniu systemu w hybrydowy reaktor nitryfikacyjny, bakterie Comammox przewyższały kanoniczne AOB. Roots i in. (2019) również wykazali dużą liczebność i dominację bakterii Comammox nad AOB w kłaczkach osadu czynnego w reaktorze nitryfikacyjnym. Po ponad 400 dniach

badan bakterie Comammox stanowiły ponad 94% mikroorganizmów utleniających amoniak i to one były odpowiedzialne za wysoką efektywność procesu nitryfikacji.

W przypadku osadu czynnego zaobserwowano także inne interesujące zjawisko. Po zmniejszeniu OLR z 384 g ChZT/m³ · d do 213 g ChZT/m³ · d, odnotowano wzrost szybkości utleniania azotynów, mimo że analiza mikrobiologiczna wykazała istotny spadek częstości występowania NOB. Równocześnie zaobserwowano znaczący wzrost liczebności bakterii Comammox. Połączenie tych informacji pozwala stwierdzić, że bakterie Comammox mogły być odpowiedzialne za utlenianie NO₂⁻ do NO₃⁻. Genom tych mikroorganizmów zawiera enzymy odpowiedzialne za utlenianie zarówno NH₄⁺, jak i NO₂⁻, co umożliwia im przekształcanie nie tylko azotu amonowego do azotu azotanowego, ale również azotu azotynowego.

6. WNIOSKI

- 1) Istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg procesu nitryfikacji w sekwencyjnych reaktorach porcjowych ze złożem ruchomym była strategia napowietrzania. Czynniki ten determinował aktywność i liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych, czego konsekwencją było wykorzystywanie różnych szlaków metabolicznych (konwencjonalna dwuetapowa autotroficzna nitryfikacja, skrócona nitryfikacja, nitryfikacja heterotroficzna, Comammox), które pozwalały na uzyskanie porównywalnej efektywności procesu nitryfikacji, ale przy różnym zapotrzebowaniu na energię elektryczną niezbędną do procesu napowietrzania, wpływając dodatkowo na wielkość emisji N₂O.
- 2) W przypadku czystej technologii złoża ruchomego zmiany strategii napowietrzania miały większy wpływ na aktywność i liczebność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego (AOB) niż na drobnoustroje utleniające azotyny do azotanów (NOB). Aktywność bakterii AOB malała wraz ze wzrostem wartości stosunku czasu trwania podfaz bez i z napowietrzaniem (R) i zwiększała się po obniżeniu stężenia tlenu (DO). Dodatkowo udokumentowano, iż niezależnie od zastosowanej strategii napowietrzania (R: 0, 1/4, 1/3, 1/2; DO: 3,5 mg O₂/l, 6,0 mg O₂/l), bakterie NOB charakteryzowały się wyższą aktywnością i liczebnością niż bakterie AOB.
- 3) W przypadku hybrydowej technologii złoża ruchomego, istotny wpływ na aktywność poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych miała forma w jakiej biomasa rozwijała się w reaktorze. Bakterie zdolne do utleniania azotu amonowego wykazywały

wyższą aktywność rozwijając się w postaci kłaczków osadu czynnego, podczas gdy bakterie utleniające azotyny do azotanów były bardziej aktywne w błonie biologicznej porastającej ruchome nośniki. Aktywność bakterii zdolnych do utleniania azotu amonowego malała wraz ze wzrostem wartości R i zwiększała się po obniżeniu stężenia tlenu.

- 4) Porównując liczebność mikroorganizmów nityfikacyjnych, które zasiedlały błonę biologiczną i osad czynny, wykazano, że błona biologiczna stanowiła środowisko sprzyjające rozwojowi tych drobnoustrojów. Dominującą grupą nityfikatorów zarówno w błonie biologicznej, jak i w kłaczkach osadu czynnego, były bakterie NOB.
- 5) Głównym czynnikiem powodującym supresję bakterii NOB w obu formach biomasy występujących w reaktorze hybrydowym było zwiększenie wartości R.
- 6) Na zwiększenie emisji podtlenku azotu w hybrydowym reaktorze ze złożem ruchomym wpłynęło skrócenie czasu trwania podfaz z napowietrzaniem (z 30 minut do 20 minut). Współczynnik emisji N_2O wzrósł wówczas z 0,896% do 1,091%.
- 7) Na podstawie badań nad wpływem wykształcenia biomasy w postaci osadu czynnego w reaktorze pracującym w czystej technologii złoża ruchomego wykazano, że rozwój tej formy biomasy przyczynił się do zwiększenia efektywności procesów denitryfikacji i biologicznej defosfatacji. Współwystępowanie błony biologicznej i osadu czynnego w jednym układzie zwiększało różnorodność mikroorganizmów uczestniczących w procesach oczyszczania ścieków, sprzyjając rozwojowi zarówno bakterii autotroficznych, jak i heterotroficznych. Wykształcenie biomasy w postaci osadu czynnego pozwoliło także na znaczące zmniejszenie zużycia energii elektrycznej na napowietrzanie, wskazując na duży potencjał tego rozwiązania w kontekście zrównoważonego zarządzania zasobami energetycznymi.
- 8) Na znaczące obniżenie zużycia energii na napowietrzanie, zwłaszcza w kontekście hybrydowych reaktorów ze złożem ruchomym, wpływ miały modyfikacje strategii napowietrzania, polegające na założeniu, że czasy trwania podfaz bez napowietrzania będą dwukrotnie dłuższe od podfaz z napowietrzaniem. Uzyskane wyniki wskazują również, że w układach hybrydowych z naprzemiennym napowietrzaniem, gdzie działanie dmuchaw jest kontrolowane zarówno przez wartość współczynnika R, jak i zadane stężenie tlenu, efektem skrócenia czasu trwania podfaz z napowietrzaniem nie

zawsze jest zmniejszenie zużycia energii, co sugeruje konieczność precyzyjnej regulacji tych parametrów w celu maksymalizacji efektywności energetycznej.

- 9) Gwałtowne obniżenie temperatury z 20°C do 12°C w hybrydowym reaktorze ze złożem ruchomym wywołało większe różnice w wartościach szybkości utleniania azotu amonowego, niż w wartościach szybkości utleniania azotu azotynowego. Bakterie NOB zasiedlające biofilm wykazywały większą wrażliwość na spadek temperatury, niż te występujące w osadzie czynny. Wyznaczony na podstawie zebranych danych współczynnik korekcji temperatury (Θ : 1,107–1,087) może znaleźć praktyczne zastosowanie w projektowaniu i optymalizacji hybrydowych systemów oczyszczania ścieków, umożliwiając precyzyjne dostosowanie procesów do zmiennych warunków termicznych.
- 10) Przeprowadzone badania pozwoliły także na analizę występowania bakterii Comammox w reaktorach ze złożem ruchomym i ocenę ich roli w procesie nitrifikacji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że:
- bakterie Comammox odegrały istotną rolę w procesie nitrifikacji w przypadku obu analizowanych konfiguracji technologii złoża ruchomego;
 - obniżenie obciążenia reaktora ładunkiem związków organicznych z 384 g ChZT/m³ · d do 213 g ChZT/m³ · d i całkowite wyeliminowanie związków organicznych ze ścieków dopływających do układu spowodowało, że liczebność bakterii Comammox była wyższa niż kanonicznych bakterii utleniających azot amonowy;
 - czynnikami mającymi istotny wpływ na liczebność bakterii Comammox były: zmiana strategii napowietrzania z ciągłego na naprzemienne, obniżenie stężenia tlenu, eliminacja związków organicznych ze ścieków doprowadzanych do reaktora, przejście z warunków symulujących główny ciąg oczyszczania ścieków na warunki symulujące ciąg boczny.
- 11) Proponuje się kontynuację badań nad wpływem strategii napowietrzania na przebieg i efektywność procesu nitrifikacji, obejmujących następujące cele cząstkowe:
- a. Analiza szlaków metabolicznych procesu nitrifikacji dla poszczególnych konfiguracji technologii złoża ruchomego, przy równoczesnym uwzględnieniu formy w jakiej biomasa rozwija się w reaktorze, i ocena roli alternatywnych

szlaków, takich jak Comammox oraz heterotroficzna nitryfikacja, w utlenianiu azotu amonowego.

- b. Ocena efektywności energetycznej poszczególnych szlaków metabolicznych procesu nitryfikacji oraz ich potencjalnego wpływu na eliminację związków azotu ze ścieków (analiza sprawności procesu denitryfikacji prowadzonego przez mikroorganizmy nitryfikacyjne).
- c. Poszukiwanie powiązań pomiędzy występowaniem poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych a emisją podtlenku azotu oraz określenie wpływu formy, w jakiej w reaktorze rozwija się biomasa, na emisję tego gazu cieplarnianego.
- d. Ocena możliwości optymalizacji strategii napowietrzania w reaktorach ze złożem ruchomym poprzez wprowadzenie zaawansowanych technik monitoringu i kontroli procesu nitryfikacji, w tym zastosowanie sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego.
- e. Analiza wpływu nowoczesnych technik napowietrzania opartych na nanopęcherzykach, w kontekście aktywności poszczególnych grup mikroorganizmów nitryfikacyjnych.
- f. Ocena wpływu strategii napowietrzania na stabilność procesów biologicznych w obecności substancji inhibitujących proces nitryfikacji, takich jak metale ciężkie, pestycydy i farmaceutyki.

Wyniki uzyskane w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą zostać wykorzystane do optymalizacji strategii napowietrzania w oczyszczalniach ścieków wykorzystujących technologię złoża ruchomego, szczególnie w kontekście minimalizacji zużycia energii elektrycznej, zmniejszenia emisji podtlenku azotu oraz śladu węglowego oczyszczalni. Tego typu rozwiązania są kluczowe w dążeniu przedsiębiorstw wodociągowo-kanalizacyjnych do samowystarczalności energetycznej oraz ograniczenia emisji gazów cieplarnianych, co przyczynia się do bardziej zrównoważonego zarządzania zasobami i ochrony środowiska, wpisując się zarazem w najnowsze trendy rozwoju gospodarki wodno-ściekowej.

7. BIBLIOGRAFIA

Ahmed, W., Tian, X., Delatolla, R. (2019). Nitrifying moving bed biofilm reactor: Performance at low temperatures and response to cold-shock. *Chemosphere*, 229, 295-302.

Akankshya, Dash, R.R., Mohanty, S. (2021). Removal of organic matters and nutrients by using bio-balls and corn cobs as bio-film carrier in MBBR technology. W: Bhuiyan, C., Flügel, W.A., Jain, S.K. (red.) *Water Security and Sustainability: Proceedings of Down To Earth 2019, Lecture Notes in Civil Engineering*. Singapur: Springer, 115, 237–250.

Al-Hazmi, H.E., Lu, X., Majtacz, J., Kowal, P., Xie, L., Makinia, J. (2020). Optimization of the aeration strategies in a deammonification sequencing batch reactor for efficient nitrogen removal and mitigation of N₂O production. *Environmental Science & Technology*, 55 (2), 1218-1230.

Alitaleshi, F., Daghbandan, A., Pendashteh, A. (2024). Performance of rice husk biocarrier on ammonia nitrogen removal in the MBBR treating aquaculture wastewater using biological attached growth process: Performance and kinetic study. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12 (1), 111446.

Annavajhala, M.K., Kapoor, V., Santo-Domingo, J., Chandran, K. (2018). Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems. *Environmental Science & Technology Letters*, 5 (2), 110-116.

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B. S., Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 48 (5), 835-852.

Bagchi, S., Biswas, R., Nandy, T. (2012). Autotrophic ammonia removal processes: Ecology to technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42 (13), 1353-1418.

Balmelle, B., Nguyen, K., Capdeville, B., Cornier, J., Deguin, A., 1992. Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Water Science and Technology*, 26 (5–6), 1017–1025.

Bao, P., Wang, S., Ma, B., Zhang, Q., Peng, Y. (2017). Achieving partial nitrification by inhibiting the activity of Nitrospira-like bacteria under high-DO conditions in an intermittent aeration reactor. *Journal of Environmental Sciences*, 56, 71-78.

Barria, C., Malecki, M., Arraiano, C.M. (2013). Bacterial adaptation to cold. *Microbiology*, 159 (Pt_12), 2437-2443.

Bartoszewski K. (2011). Technologie oczyszczania ścieków i przeróbki osadów stosowane w warunkach krajowych. *Ochrona Środowiska*, 3-5, 54-55.

Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 1-20.

Bhatia, A., Singh, N.K., Bhando, T., Pathania, R., Kazmi, A.A. (2017). Effect of intermittent aeration on microbial diversity in an intermittently aerated IFAS reactor treating municipal wastewater: a field study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52 (5), 440-448.

- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Keller, J. (2007). Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Research*, 41 (14), 3033-3042.
- Brôco, N., Carvalho, M. (2017). Management tool to assess, benchmark and support energy efficiency actions in more than 800 WWTP. *Water Practice and Technology*, 12 (3), 745-749.
- Bucci, P., Coppotelli, B., Morelli, I., Zaritzky, N., Caravelli, A. (2020). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of wastewater in granular reactor: Microbial composition by next generation sequencing analysis. *Journal of Water Process Engineering*, 36, 101254.
- Camejo, P. Y., Santo Domingo, J., McMahon, K. D., Noguera, D.R. (2017). Genome-enabled insights into the ecophysiology of the comammox bacterium “Candidatus *Nitrospira nitrosa*”. *mSystems* 2:e00059-17.
- Cao, G., Wang, S., Peng, Y., Miao, Z. (2013). Biological nutrient removal by applying modified four step-feed technology to treat weak wastewater. *Bioresource Technology*, 128, 604-611.
- Cao, Y., van Loosdrecht, M.C., Daigger, G.T. (2017). Mainstream partial nitrification-anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (4), 1365–1383.
- Cardoso, B.J., Rodrigues, E., Gaspar, A.R., Gomes, Á. (2021). Energy performance factors in wastewater treatment plants: A review. *Journal of Cleaner Production*, 322, 129107.
- Çeçen, F., Semerci, N., Geyik, A.G. (2010). Inhibition of respiration and distribution of Cd, Pb, Hg, Ag and Cr species in a nitrifying sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 178 (1-3), 619-627.
- Chaali, M., Naghdi, M., Brar, S.K., Avalos-Ramirez, A. (2018). A review on the advances in nitrifying biofilm reactors and their removal rates in wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93 (11), 3113-3124.
- Chang, J. Y., Syauqi, T.A., Sudesh, K., Ng, S.L. (2024). Insights into biofilm development on polyhydroxyalkanoate biofilm carrier for anoxic azo dye decolourization of acid orange 7. *Bioresource Technology*, 393, 130054.
- Chao, Y., Mao, Y., Yu, K., Zhang, T. (2016). Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 8225-8237.
- Chen, J., Wang, J., Wang, X., Lv, Y., Chen, R., Xu, J., Li, D., Hou, J., He, X. (2023). Enhanced nitrogen removal in constructed wetlands with a multistage-A/O process. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 9 (10), 2472-2486.
- Chen, Q., Ni, J. (2011). Heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by novel isolated bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38 (9), 1305–1310.
- Chen, X., Yuan, Z., Ni, B.J. (2018). Nitrite accumulation inside sludge flocs significantly influencing nitrous oxide production by ammonium-oxidizing bacteria. *Water Research*, 143, 99-108.
- Chrispim, M.C., Nolasco, M.A. (2017). Greywater treatment using a moving bed biofilm reactor at a university campus in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 142, 290-296.

- Christoforidou, P., Bariamis, G., Iosifidou, M., Nikolaidou, E., Samaras, P. (2020). Energy benchmarking and optimization of wastewater treatment plants in Greece. *Environmental Sciences Proceedings*, 2 (1), 36.
- Chung, J., Bae, W., Lee, Y.W., Rittmann, B.E. (2007). Shortcut biological nitrogen removal in hybrid biofilm/suspended growth reactors. *Process Biochemistry*, 42 (3), 320-328.
- Ciudad, G., Gonzalez, R., Bornhardt, C., Antielo, C. (2007). Modes of operation and pH control as enhancement factors for partial nitrification with oxygen transport limitation. *Water Research*, 41 (20), 4621-4629.
- Cotto, I., Dai, Z., Huo, L., Anderson, C.L., Vilardi, K.J., Ijaz, U., Khunjar, W., Wilson, C., De Clippeleir, H., Gilmore, K., Bailey, E., Pinto, A.J. (2020). Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of comammox bacteria in nitrogen removal systems. *Water Research*, 169, 115268.
- Crites, R. Tchobanoglous, G. (1998). Small and Decentralized Wastewater Management Systems. Boston: WCB/McGraw-Hill.
- Daelman, M.R.J., van Voorthuizen, E.M., Van Dongen, L.G.J.M., Volcke, E.I.P., Van Loosdrecht, M.C.M. (2013). Methane and nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment—results from a long-term study. *Water Science and Technology*, 67 (10), 2350-2355.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria, *Nature*, 528 (7583), 504–509.
- Daims, H., Lücker, S., Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in microbiology*, 24 (9), 699-712.
- Dang, H.T., Dinh, C.V., Nguyen, K.M., Tran, N.T., Pham, T.T., Narbaitz, R.M. (2020). Loofah sponges as bio-carriers in a pilot-scale integrated fixed-film activated sludge system for municipal wastewater treatment. *Sustainability*, 12 (11), 4758.
- De Haas, D., Hartley, K. (2004, April). Greenhouse gas emissions from BNR plant—Do we have the right focus? W: *Proceedings of EPA Workshop: Sewage Management: Risk Assessment and Triple Bottom Line*. Queensland, Australia: 5-7 lipca.
- Desloover, J., Vlaeminck, S.E., Clauwaert, P., Verstraete, W., Boon, N. (2012). Strategies to mitigate N₂O emissions from biological nitrogen removal systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (3), 474-482.
- Di Bella, G., Mannina, G. (2020). Intermittent aeration in a hybrid moving bed biofilm reactor for carbon and nutrient biological removal. *Water*, 12 (2), 492.
- di Biase, A., Kowalski, M.S., Devlin, T.R., Oleszkiewicz, J.A. (2019). Moving bed biofilm reactor technology in municipal wastewater treatment: a review. *Journal of Environmental Management*, 247, 849-866.
- Domingo-Félez, C., Mutlu, A.G., Jensen, M.M., Smets, B.F. (2014). Aeration strategies to mitigate nitrous oxide emissions from single-stage nitrification/anammox reactors. *Environmental Science & Technology*, 48 (15), 8679-8687.
- Dworkin, M., Gutnick, D. (2012). Sergei Winogradsky: a founder of modern microbiology and the first microbial ecologist, *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2), 364–379.

Dymaczewski, Z., Oleszkiewicz, J.A. i Sozański, M.M. (red.) (1997). Poradnik eksploatatora oczyszczalni ścieków. Polska: Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział w Poznaniu.

EIB Projects Directorate (2022). *Wastewater as a resource: May 2022*. Environment and Natural Resources Department Luksemburg: European Investment Bank (EIB), 1-40.

Feng, L., Jia, R., Zeng, Z., Yang, G., Xu, X. (2018). Simultaneous nitrification–denitrification and microbial community profile in an oxygen-limiting intermittent aeration SBBR with biodegradable carriers. *Biodegradation*, 29, 473-486.

Foladori, P., Vaccari, M., Vitali, F. (2015). Energy audit in small wastewater treatment plants: methodology, energy consumption indicators, and lessons learned. *Water Science and Technology*, 72 (6), 1007-1015.

Gao, L., Han, F., Zhang, X., Liu, B., Fan, D., Sun, X., Zhang, Y., Yan, L., Wei, D. (2020). Simultaneous nitrate and dissolved organic matter removal from wastewater treatment plant effluent in a solid-phase denitrification biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 314, 123714.

Gnida, A., Wiszniowski, J., Felis, E., Sikora, J., Surmacz-Górska, J., Miksch, K. (2016). The effect of temperature on the efficiency of industrial wastewater nitrification and its (geno) toxicity. *Archives of Environmental Protection*, 42 (1), 27-34.

Gruber-Dorninger, C., Pester, M., Kitzinger, K., Savio, D. F., Loy, A., Rattei, T., Wagner, M., Daims, H. (2015). Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge. *The ISME Journal*, 9 (3), 643–655.

Grunditz, C., Dalhammar, G. (2001). Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Research*, 35 (2), 433-440.

Gu, J., Xu, G., Liu, Y. (2017). An integrated AMBBR and IFAS-SBR process for municipal wastewater treatment towards enhanced energy recovery, reduced energy consumption and sludge production. *Water Research*, 110, 262-269.

Gude, V.G. (2015). Energy and water autarky of wastewater treatment and power generation systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 52-68.

Guerrero, L., Montalvo, S., Huiliñir, C., Barahona, A., Borja, R., Cortés, A. (2016). Simultaneous nitrification–denitrification of wastewater: Effect of zeolite as a support in sequential batch reactor with step-feed strategy. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 2325-2338.

Gurung, K., Tang, W.Z., Sillanpää, M. (2018). Unit energy consumption as benchmark to select energy positive retrofitting strategies for Finnish wastewater treatment plants (WWTPs): a case study of Mikkeli WWTP. *Environmental Processes*, 5, 667-681.

Han, P., Wu, D., Sun, D., Zhao, M., Wang, M., Wen, T., Zhang J., Hou, L., Liu, M., Klümper, U., Zheng, Y., Dong, H.P., Liang, X., Yin, G. (2021). N₂O and NO_y production by the comammox bacterium *Nitrospira inopinata* in comparison with canonical ammonia oxidizers. *Water Research*, 190, 116728.

Hellings, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1999). Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flows. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, 5 (4), 351-371.

- Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J.C. i Arvin, E. (2002). Oczyszczanie ścieków. Procesy biologiczne i chemiczne. Wydawnictwo Politechniki Świętokrzyskiej.
- Holmes, D. E., Dang, Y., Smith, J.A. (2019). Nitrogen cycling during wastewater treatment. *Advances in Applied Microbiology*, 106, 113-192.
- Homepage (2024) AnoxKaldnes Veolia Water Technologies, [online], [Dostęp: 15.09.2024], Dostępny w Internecie: <https://www.anoxkaldnes.com/en>
- Hu, H.W., He, J.Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 2709-2717.
- Hu, Z., Zhang, J., Li, S., Wang, J., Zhang, T. (2011). Effect of anoxic/aerobic phase fraction on N₂O emission in a sequencing batch reactor under low temperature. *Bioresource Technology*, 102 (9), 5486-5491.
- Huang, J., Xu, L., Guo, Y., Liu, D., Chen, S., Tang, Q., Zheng, H., Tan, J., Peng, F. (2021). Intermittent aeration improving activated granular sludge granulation for nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100739.
- Huang, T., Xia, J., Liu, T., Su, Z., Guan, Y., Guo, J., Wang, C., Zheng, M. (2022). Comammox Nitrospira bacteria are dominant ammonia oxidizers in mainstream nitrification bioreactors emended with sponge carriers. *Environmental Science & Technology*, 56 (17), 12584-12591.
- Huang, W., Gong, B., He, L., Wang, Y., Zhou, J. (2020). Intensified nutrients removal in a modified sequencing batch reactor at low temperature: Metagenomic approach reveals the microbial community structure and mechanisms. *Chemosphere*, 244, 125513.
- Hülßen, T., Barry, E.M., Lu, Y., Puyol, D., Batstone, D.J. (2016). Low temperature treatment of domestic wastewater by purple phototrophic bacteria: Performance, activity, and community. *Water Research*, 100, 537-545.
- Hwang, J.H., Oleszkiewicz, J.A. (2007). Effect of cold-temperature shock on nitrification. *Water Environment Research*, 79 (9), 964-968.
- Hwang, K.L., Bang, C.H., Zoh, K.D. (2016). Characteristics of methane and nitrous oxide emissions from the wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, 214, 881-884.
- International Energy Agency (IEA) (2021), Electricity Information: Overview, IEA, Paryż. Dostępny w Internecie: <https://www.iea.org/reports/electricity-information-overview>, Licencja: CC BY 4.0.
- International Energy Agency (IEA) (2017), Water-Energy Nexus, IEA, Paryż. Dostępny w Internecie: <https://www.iea.org/reports/water-energy-nexus>.
- Jaffer, Y.D., Kumar, H.S., Vinothkumar, R., Irfan, A.B., Ishfaq, N.M., Ganie, P.A., Bhat, R.A.H., Vennila, A. (2019). Isolation and characterization of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification and sulphur-oxidizing bacterium *Paracoccus saliphilus* strain SPUM from coastal shrimp ponds. *Aquaculture International*, 27, 1513–1524.
- Jia, Y., Zhou, M., Chen, Y., Hu, Y., Luo, J. (2020). Insight into short-cut of simultaneous nitrification and denitrification process in moving bed biofilm reactor: Effects of carbon to nitrogen ratio. *Chemical Engineering Journal*, 400, 125905.
- Jia, Y., Zhou, M., Chen, Y., Luo, J., Hu, Y. (2019). Carbon selection for nitrogen degradation pathway by *Stenotrophomonas maltophilia*: Based on the balances of nitrogen, carbon and electron. *Bioresource Technology*, 294, 122114.

- Jiménez, E., Giménez, J.B., Ruano, M.V., Ferrer, J., Serralta, J. (2011). Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate. *Bioresource Technology*, 102 (19), 8741-8747.
- Jones, E.R., van Vliet, M.T., Qadir, M., Bierkens, M.F. (2021). Country-level and gridded estimates of wastewater production, collection, treatment and reuse. *Earth System Science Data*, 13 (2), 237-254.
- Kampschreur, M.J., Tan, N.C., Kleerebezem, R., Picioreanu, C., Jetten, M.S., van Loosdrecht, M.C.V. (2008). Effect of dynamic process conditions on nitrogen oxides emission from a nitrifying culture. *Environmental Science & Technology*, 42 (2), 429-435.
- Kampschreur, M.J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S., van Loosdrecht, M.C. (2009). Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, 43 (17), 4093-4103.
- Katsogiannis, A.N., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2003). Enhanced nitrogen removal in SBRs bypassing nitrate generation accomplished by multiple aerobic/anoxic phase pairs. *Water science and technology*, 47 (11), 53-59.
- Kemmou, L., Amanatidou, E. (2023). Factors Affecting Nitrous Oxide Emissions from Activated Sludge Wastewater Treatment Plants—A Review. *Resources*, 12 (10), 114.
- Khanongnuch, R., Di Capua, F., Lakaniemi, A.M., Rene, E.R., Lens, P.N. (2019). H₂S removal and microbial community composition in an anoxic biotrickling filter under autotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 367, 397-406.
- Kim, D.J., Lee, D.I., Keller, J. (2006). Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology*, 97 (3), 459-468.
- Kits, K.D., Jung, M.Y., Vierheilig, J., Pjevac, P., Sedlacek, C.J., Liu, S., Herbold, C., Stein, L.Y., Richter, A., Wissel, H., Bruggemann, N., Wagner, M., Daims, H. (2019). Low yield and abiotic origin of N₂O formed by the complete nitrifier *Nitrospira inopinata*. *Nature Communications*, 10 (1), 1836.
- Klaczynski E. (2019). Biologiczne usuwanie azotu ze ścieków komunalnych. W: *Forum Eksploatatora*. Józefosław, Polska: Wydawnictwo Seidel Przywecki, 1, 14-18.
- Kosonen, H., Heinonen, M., Mikola, A., Haimi, H., Mulas, M., Corona, F., Vahala, R. (2016). Nitrous oxide production at a fully covered wastewater treatment plant: results of a long-term online monitoring campaign. *Environmental Science & Technology*, 50 (11), 5547-5554.
- Kruszelnicka, I., Ginter-Kramarczyk, D., Michałkiewicz, M., Kloziński, A., Zajchowski, S., Jakubowska, P., Tomaszewska, J. (2014). Kompozyty polimerowo-drzewne w technologii zawieszonego złoża ruchomego. *Polimery*, 59 (10), 739-746.
- Kruszelnicka, I., Ginter-Kramarczyk, D., Muszyński, P. (2022). Influence of surfactants used in the paper industry on polymer-wood composites under static test conditions. *Desalination and Water Treatment*, 268, 146-152.
- Kruszelnicka, I., Rudawska, A., Ginter-Kramarczyk, D., Michałkiewicz, M., Zajchowski, S., Tomaszewska, J. (2018). Wpływ zwilżalności powierzchni kompozytów polimerowo-drzewnych na tworzenie biofilmu w procesach oczyszczania ścieków. *Polimery*, 63 (9), 619-625.
- Lawson, C.E., Lückner, S. (2018). Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 158-165.

- Le, L.T., Nghiem, L.D., Bui, X.T., Jahng, D. (2023). Improve nitrogen removal of the biofilm single-stage PN/A process by optimizing the intermittent aeration strategy. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103078.
- Lehtovirta-Morley, L.E. (2018). Ammonia oxidation: ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS Microbiology Letters*, 365 (9), fny058.
- Leyva-Díaz, J.C., Monteoliva-García, A., Martín-Pascual, J., Munio, M.M., García-Mesa, J.J., Poyatos, J.M. (2020). Moving bed biofilm reactor as an alternative wastewater treatment process for nutrient removal and recovery in the circular economy model. *Bioresource Technology*, 299, 122631.
- Li, B., Qiu, Y., Zhang, C., Chen, L., Shi, H. (2016a). Understanding biofilm diffusion profiles and microbial activities to optimize integrated fixed-film activated sludge process. *Chemical Engineering Journal*, 302, 269-277.
- Li, D., Fang, F., Liu, G. (2021). Efficient nitrification and low-level N₂O emission in a weakly acidic bioreactor at low dissolved-oxygen levels are due to comammox. *Applied and Environmental Microbiology*, 87 (11), e00154-21.
- Li, J., Elliott, D., Nielsen, M., Healy, M. G., Zhan, X. (2011). Long-term partial nitrification in an intermittently aerated sequencing batch reactor (SBR) treating ammonium-rich wastewater under controlled oxygen-limited conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 55 (3), 215-222.
- Li, S., Chen, Y.P., Li, C., Guo, J.S., Fang, F., Gao, X. (2012). Influence of free ammonia on completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 694-704.
- Li, Y., Ding, K., Wen, X., Zhang, B., Shen, B., Yang, Y. (2016b). A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: Its enrichment, physiological and genomic characteristics. *Scientific Reports*, 6, 23747.
- Liu, G., Wang, J. (2013). Long-term low DO enriches and shifts nitrifier community in activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 47 (10), 5109-5117.
- Liu, G., Wu, X., Li, D., Jiang, L., Huang, J., Zhuang, L. (2021a). Long-term low dissolved oxygen operation decreases N₂O emissions in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology*, 55 (10), 6975-6983.
- Liu, T., Liu, S., He, S., Tian, Z., Zheng, M. (2021b). Minimization of N₂O emission through intermittent aeration in a sequencing batch reactor (SBR): main behavior and mechanism. *Water*, 13 (2), 210.
- Lo, I. W., Lo, K.V., Mavinic, D.S., Shiskowski, D., Ramey, W. (2010). Contributions of biofilm and suspended sludge to nitrogen transformation and nitrous oxide emission in hybrid sequencing batch system. *Journal of Environmental Sciences*, 22 (7), 953-960.
- Luan, Y.N., Yin, Y., An, Y., Zhang, F., Wang, X., Zhao, F., Xiao, Y., Liu, C. (2022). Investigation of an intermittently-aerated moving bed biofilm reactor in rural wastewater treatment under low dissolved oxygen and C/N condition. *Bioresource Technology*, 358, 127405.
- Luan, Y.N., Yin, Y., Xu, Y., Zhang, F., Wang, X., Zhao, F., Xiao, Y., Liu, C. (2023). Simultaneous nitrification and denitrification in a novel rotating self-aerated biofilm reactor for decentralized wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 369, 128513.

- Luo, L., Dzakpasu, M., Yang, B., Zhang, W., Yang, Y., Wang, X.C. (2019). A novel index of total oxygen demand for the comprehensive evaluation of energy consumption for urban wastewater treatment. *Applied Energy*, 236, 253-261.
- Luo, S., Peng, Y., Liu, Y., Peng, Y. (2022). Research progress and prospects of complete ammonia oxidizing bacteria in wastewater treatment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 16, 123.
- Ma, B., Bao, P., Wei, Y., Zhu, G., Yuan, Z., Peng, Y. (2015). Suppressing nitrite-oxidizing bacteria growth to achieve nitrogen removal from domestic wastewater via anammox using intermittent aeration with low dissolved oxygen. *Scientific Reports*, 5, 13048.
- Ma, B., Yang, L., Wang, Q., Yuan, Z., Wang, Y., Peng, Y. (2017). Inactivation and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria when exposed to free nitrous acid. *Bioresource Technology*, 245, 1266-1270.
- MacLeod, R.A., Calcott, P.H. (1976). Cold shock and freezing damage to microbes. W: *The Survival of Vegetative Microbes*, Gray, T.R.G., Postgate, J.R. (red.). *Twenty-Sixth Symposium of the Society for General Microbiology*. Cambridge, Anglia: Cambridge University Press, 81-109.
- Manser, R., Gujer, W., Siegrist, H. (2005). Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. *Water Research*, 39 (19), 4633-4642.
- Massara, T.M., Malamis, S., Guisasola, A., Baeza, J.A., Noutsopoulos, C., Katsou, E. (2017). A review on nitrous oxide (N₂O) emissions during biological nutrient removal from municipal wastewater and sludge reject water. *Science of the Total Environment*, 596, 106-123.
- Mehrani, M.J., Sobotka, D., Kowal, P., Ciesielski, S., Makinia, J. (2020). The occurrence and role of Nitrospira in nitrogen removal systems. *Bioresource Technology*, 303, 122936.
- Meng, J., Hu, Z., Wang, Z., Hu, S., Liu, Y., Guo, H., Li, J., Yuan, Z., Zheng, M. (2022). Determining factors for nitrite accumulation in an acidic nitrifying system: influent ammonium concentration, operational pH, and ammonia-oxidizing community. *Environmental Science & Technology*, 56 (16), 11578-11588.
- Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Tsuchihashi, R., Stensel, H.D. (2013). Wastewater engineering: Treatment and resource recovery (5 ed.). New York: McGraw-Hill.
- Miao, Y., Zhang, L., Yu, D., Zhang, J., Zhang, W., Ma, G., Zhao, X., Peng, Y. (2022). Application of intermittent aeration in nitrogen removal process: development, advantages and mechanisms. *Chemical Engineering Journal*, 430, 133184.
- Miksch, K., Sikora, J. (2010). *Biotechnologia ścieków*. Warszawa, Polska: PWN.
- Mishra, S., Singh, V., Cheng, L., Hussain, A., Ormeci, B. (2022). Nitrogen removal from wastewater: A comprehensive review of biological nitrogen removal processes, critical operation parameters and bioreactor design. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (3), 107387.
- Molinos-Senante, M. (2018a). Comparative energy efficiency of wastewater treatment technologies: a synthetic index approach. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20, 1819-1834.

- Molinos-Senante, M., Sala-Garrido, R., Iftimi, A. (2018b). Energy intensity modeling for wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, 630, 1565-1572.
- Munz, G., Lubello, C., Oleszkiewicz, J.A. (2011). Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria. *Chemosphere*, 83 (5), 720-725.
- Ni, B.J., Smets, B.F., Yuan, Z., Pellicer-Nàcher, C. (2013). Model-based evaluation of the role of Anammox on nitric oxide and nitrous oxide productions in membrane aerated biofilm reactor. *Journal of Membrane Science*, 446, 332-340.
- Ødegaard, H. (1999). The moving bed biofilm reactor. *Water Environmental Engineering And Reuse Of Water*, 250-305.
- Ødegaard, H. (2016). A road-map for energy-neutral wastewater treatment plants of the future based on compact technologies (including MBBR). *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 10 (2), 1-17.
- Ødegaard, H., Rusten, B., Westrum, T.J.W.S. (1994). A new moving bed biofilm reactor-applications and results. *Water Science and Technology*, 29 (10-11), 157.
- Okabe, S., Aoi, Y., Satoh, H., Suwa, Y. (2011). Nitrification in Wastewater Treatment. W: Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M.G. (red.), *Nitrification*. Washington D.C., USA: ASM Press, 405–433.
- Onnis-Hayden, A., Majed, N., Schramm, A., Gu, A.Z. (2011). Process optimization by decoupled control of key microbial populations: distribution of activity and abundance of polyphosphate-accumulating organisms and nitrifying populations in a full-scale IFAS-EBPR plant. *Water Research*, 45 (13), 3845-3854.
- Palomo, A., Pedersen, A.G., Fowler, S.J., Dechesne, A., Sicheritz-Pontén, T., Smets, B.F. (2018). Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox Nitrospira. *The ISME Journal*, 12 (7), 1779-1793.
- Paltsev, J., Schlosser, A.C., Chen, H., Gao, X., Gurgel, A., Jacoby, H., Morris, J., Prinn, R., Reilly J., Salunke P., Sokolov, A. (2023). Global Change Outlook: Charting the earth's future energy, managed resources, climate, and policy prospects. *MIT Joint Program on the Science and Policy of Global Change*. Massachusetts Institute of Technology.
- Park, H.D., Regan, J.M., Noguera, D.R. (2002). Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic Orbal processes. *Water Science and Technology*, 46 (1-2), 273-280.
- Park, H.D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S., Francis, C.A. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5643-5647.
- Park, S., Bae, W., Chung, J., Baek, S.C. (2007). Empirical model of the pH dependence of the maximum specific nitrification rate. *Process Biochemistry*, 42 (12), 1671-1676.
- Pedrouso, A., del Rio, A.V., Morales, N., Vazquez-Padín, J.R., Campos, J.L., Mendez, R., Mosquera-Corral, A. (2017). Nitrite oxidizing bacteria suppression based on in-situ free nitrous acid production at mainstream conditions. *Separation and Purification Technology*, 186, 55-62.
- Peng, L., Ni, B.J., Erler, D., Ye, L., Yuan, Z. (2014). The effect of dissolved oxygen on N₂O production by ammonia-oxidizing bacteria in an enriched nitrifying sludge. *Water Research*, 66, 12-21.

Phadtare, S., Severinov, K. (2010). RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biology*, 7 (6), 788-795.

PN-EN 872:2007. Jakość wody — Oznaczanie zawiesin — Metoda z zastosowaniem filtracji przez sączki z włókna szklanego. Polski Komitet Normalizacyjny: Warszawa, Polska, 2007.

Podedworna, J., Żubrowska-Sudoł, M. (2011). Dlaczego warto w technologii ścieków wykorzystywać bioreaktory ze złożem ruchomym? *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, 324-327.

Podedworna, J., Żubrowska-Sudoł, M. (2012). Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase. *Environmental technology*, 33(2), 237-245.

Podedworna, J., Żubrowska-Sudoł, M., Sytek, K. (2014). Miejsce technologii złoża ruchomego w biologicznym oczyszczaniu ścieków. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, (4), 132-137.

Preisner, M., Neverova-Dziopak, E., Kowalewski, Z. (2020). Analysis of eutrophication potential of municipal wastewater. *Water Science and Technology*, 81 (9), 1994-2003.

Qadir, M., Drechsel, P., Jiménez Cisneros, B., Kim, Y., Pramanik, A., Mehta, P., Olaniyan, O. (2020). Global and regional potential of wastewater as a water, nutrient and energy source. *Natural Resources Forum*. 44: 40–51.

Regmi, P., Thomas, W., Schafran, G., Bott, C., Rutherford, B., Waltrip, D. (2011). Nitrogen removal assessment through nitrification rates and media biofilm accumulation in an IFAS process demonstration study. *Water Research*, 45 (20), 6699-6708.

Ren, Z., Li, D., Zhang, Z., Sun, W., Liu, G. (2024). Enhancing the relative abundance of comammox nitrospira in ammonia oxidizer community decreases N₂O emission in nitrification exponentially. *Chemosphere*, 356, 141883.

Rittmann, B.E. (1982). Comparative performance of biofilm reactor types. *Biotechnology and bioengineering*, 24 (6), 1341-1370.

Rodríguez-Caballero, A., Aymerich, I., Marques, R., Poch, M., Pijuan, M. (2015). Minimizing N₂O emissions and carbon footprint on a full-scale activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research*, 71, 1-10.

Rodríguez-Caballero, A., Aymerich, I., Poch, M., Pijuan, M. (2014). Evaluation of process conditions triggering emissions of green-house gases from a biological wastewater treatment system. *Science of the Total Environment*, 493, 384-391.

Roots, P., Wang, Y., Rosenthal, A.F., Griffin, J.S., Sabba, F., Petrovich, M., Yang, F., Kozak, J.A., Zhang H., Wells, G.F. (2019). Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Research*, 157, 396-405.

Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R. (2003). Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*, 37 (6), 1371-1377.

Rusten, B., Eikebrokk, B., Ulgenes, Y., Lygren, E. (2006). Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural Engineering*, 34 (3), 322-331.

Sabba, F., Picioreanu, C., Pérez, J., Nerenberg, R. (2015). Hydroxylamine diffusion can enhance N₂O emissions in nitrifying biofilms: a modeling study. *Environmental Science & Technology*, 49 (3), 1486-1494.

- Sabba, F., Terada, A., Wells, G., Smets, B.F., Nerenberg, R. (2018). Nitrous oxide emissions from biofilm processes for wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 9815-9829.
- Sadecka, Z. (2010). Podstawy biologicznego oczyszczania ścieków. Józefosław, Polska: Wydawnictwo Seidel-Przywecki.
- Safwat, S.M. (2018). Performance of moving bed biofilm reactor using effective microorganisms. *Journal of Cleaner Production*, 185, 723-731.
- Sakoula, D., Koch, H., Frank, J., Jetten, M.S., van Kessel, M.A., Lücker, S. (2021). Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *The ISME Journal*, 15 (4), 1010-1024.
- Salveti, R., Azzellino, A., Canziani, R., Bonomo, L. (2006). Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors. *Water Research*, 40 (15), 2981-2993.
- Santos, A.D., Martins, R.C., Quinta-Ferreira, R.M., Castro, L.M. (2020). Moving bed biofilm reactor (MBBR) for dairy wastewater treatment. *Energy Reports*, 6 (8), 340-344.
- Shao, Y., Shi, Y., Mohammed, A., Liu, Y. (2017). Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 38-47.
- Shiu, N., Guo, H., Kim, Y. (2024). Heated Aeration for Nitrite-Oxidizing Bacteria (NOB) Control in Anammox-Integrated Membrane-Aerated Biofilm Reactors (MABR). *Environments*, 11 (7), 155.
- Siatou, A., Manali, A., Gikas, P. (2020). Energy consumption and internal distribution in activated sludge wastewater treatment plants of Greece. *Water*, 12 (4), 1204.
- Silva, L.C.F., Lima, H.S., de Oliveira Mendes, T.A., Sartoratto, A., de Paula Sousa, M., de Souza, R.S., de Paula, S.O., de Oliveira, V.M., da Silva, C.C. (2019). Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. *Journal of Environmental Management*, 248, 109294.
- Singh, N.K., Bhatia, A., Kazmi, A.A. (2017). Effect of intermittent aeration strategies on treatment performance and microbial community of an IFAS reactor treating municipal waste water. *Environmental Technology*, 38 (22), 2866-2876.
- Song, T., Zhang, X., Li, J., Wu, X., Feng, H., Dong, W. (2021). A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs). *Science of the Total Environment*, 801, 149319.
- Spang, A., Poehlein, A., Offre, P., Zumbrägel, S., Haider, S., Rychlik, N., Nowka, B., Schmeisser, C., Lebedeva, E.V., Rattei, T., Böhm, C., Schmid, M., Galushko, A., Hatzenpichler, R., Weinmaier, T., Daniel, R., Schleper, C., Spieck, E., Streit, W., Wagner, M. (2012). The genome of the ammonia-oxidizing *Candidatus Nitrososphaera gargensis*: insights into metabolic versatility and environmental adaptations. *Environmental microbiology*, 14 (12), 3122-3145.
- Spasov, E., Tsuji, J.M., Hug, L.A., Doxey, A.C., Sauder, L.A., Parker, W.J., Neufeld, J.D. (2020). High functional diversity among *Nitrospira* populations that dominate rotating

biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant. *The ISME Journal*, 14 (7), 1857-1872.

Stieglmeier, M., Mooshammer, M., Kitzler, B., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., Richter, A., Schleper, C. (2014). Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea. *The ISME Journal*, 8 (5), 1135-1146.

Su, Q., Ma, C., Domingo-Félez, C., Kiil, A.S., Thamdrup, B., Jensen, M.M., Smets, B.F. (2017). Low nitrous oxide production through nitrifier-denitrification in intermittent-feed high-rate nitrification reactors. *Water Research*, 123, 429-438.

Su, Z., Liu, T., Guo, J., Zheng, M. (2023). Nitrite oxidation in wastewater treatment: microbial adaptation and suppression challenges. *Environmental Science & Technology*, 57 (34), 12557-12570.

Sun, Y., Wang, H., Wu, G., Guan, Y. (2018). Nitrogen removal and nitrous oxide emission from a step-feeding multiple anoxic and aerobic process. *Environmental Technology*, 39 (7), 814-823.

Suzuki, I., Dular, U., Kwok, S. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *Journal of Bacteriology*, 120 (1), 556-558.

Thakur, I.S., Medhi, K. (2019). Nitrification and denitrification processes for mitigation of nitrous oxide from waste water treatment plants for biovalorization: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 282, 502-513.

Tsuchiya, Y., Nakagawa, T., Takahashi, R. (2020). Quantification and phylogenetic analysis of ammonia oxidizers on biofilm carriers in a full-scale wastewater treatment plant. *Microbes and Environments*, 35 (2), ME19140.

U.S. Energy Information Administration (U.S. EIA) (2023). Electricity Consumption, [online], [Dostęp: 12 września 2024], Dostępny w Internecie: <https://www.eia.gov/international/data/world/electricity/electricity-consumption>

UNESCO World Water Assessment Programme (2017). The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource. Paris: United Nations Education (UNESCO), Scientific and Cultural Organization.

Vaccari, M., Foladori, P., Nembrini, S., Vitali, F. (2018). Benchmarking of energy consumption in municipal wastewater treatment plants—a survey of over 200 plants in Italy. *Water Science and Technology*, 77 (9), 2242-2252.

Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z. (2006). Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 95 (5), 830-839.

Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z. (2007). Free ammonia and free nitrous acid inhibition on the anabolic and catabolic processes of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Science and Technology*, 56 (7), 89-97.

van Kessel, M.A., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J., Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528, 555-559.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J.,

- Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, T.-H., Smith, H.O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304 (5667), 66-74.
- Vergara-Araya, M., Hilgenfeldt, V., Peng, D., Steinmetz, H., Wiese, J. (2021). Modelling to lower energy consumption in a large WWTP in China while optimising nitrogen removal. *Energies*, 14 (18), 5826.
- Vyrides, I., Drakou, E.M., Ioannou, S., Michael, F., Gatidou, G., Stasinakis, A.S. (2018). Biodegradation of bilge water: Batch test under anaerobic and aerobic conditions and performance of three pilot aerobic Moving Bed Biofilm Reactors (MBBRs) at different filling fractions. *Journal of Environmental Management*, 217, 356-362.
- Wakeel, M., Chen, B., Hayat, T., Alsaedi, A., Ahmad, B. (2016). Energy consumption for water use cycles in different countries: A review. *Applied Energy*, 178, 868-885.
- Wang, H., Guan, Y., Pan, M., Wu, G. (2016a). Aerobic N₂O emission for activated sludge acclimated under different aeration rates in the multiple anoxic and aerobic process. *Journal of Environmental Sciences*, 43, 70-79.
- Wang, H., Xu, G., Qiu, Z., Zhou, Y., Liu, Y. (2019). NOB suppression in pilot-scale mainstream nitrification-denitrification system coupled with MBR for municipal wastewater treatment. *Chemosphere*, 216, 633-639.
- Wang, H., Yang, Y., Keller, A.A., Li, X., Feng, S., Dong, Y.N., Li, F. (2016b). Comparative analysis of energy intensity and carbon emissions in wastewater treatment in USA, Germany, China and South Africa. *Applied Energy*, 184, 873-881.
- Wang, J., Rong, H., Cao, Y., Zhang, C. (2020a). Factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND) in a moving bed sequencing batch reactor (MBSBR) system as revealed by microbial community structures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 1833-1846.
- Wang, M., Huang, G., Zhao, Z., Dang, C., Liu, W., Zheng, M. (2018). Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 270, 580-587.
- Wang, S., Zou, L., Li, H., Zheng, K., Wang, Y., Zheng, G., Li, J. (2020b). Full-scale membrane bioreactor process WWTPs in East Taihu basin: Wastewater characteristics, energy consumption and sustainability. *Science of The Total Environment*, 723, 137983.
- Wang, X.J., Xia, S.Q., Chen, L., Zhao, J.F., Renault, N.J., Chovelon, J.M. (2006). Nutrients removal from municipal wastewater by chemical precipitation in a moving bed biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 41 (4), 824-828.
- Water Environment Federation, American Society of Civil Engineers, Environmental and Water Resource Institute (2005). Biological Nutrient Removal (BNR) Operation in Wastewater Treatment Plants. New York: McGraw-Hill.
- Winkler, M.K., Straka, L. (2019). New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater. *Current Opinion in Biotechnology*, 57, 50-55.
- Winogradsky, S. (1892) Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. *Archives of Biological Sciences*. Petersburg: 1, 88–137.

WISE – Water Information System for Europe. Country profiles on urban waste water treatment: European Union, [online], [Dostęp: 12 września 2024], Dostępny w Internecie: <https://water.europa.eu/freshwater/countries/uwwt/european-union>

Wu, P., Zhang, X., Wang, Y., Wang, C., Ma, L., Jenario, F.W.V., Liu, W., Xu, L. (2021). Development of a novel denitrifying phosphorus removal and partial denitrification anammox (DPR+ PDA) process for advanced nitrogen and phosphorus removal from domestic and nitrate wastewaters. *Bioresource Technology*, 327, 124795.

Yang, J., Trela, J., Zubrowska-Sudol, M., Plaza, E. (2015). Intermittent aeration in one-stage partial nitrification/anammox process. *Ecological Engineering*, 75, 413-420.

Yang, Q., Peng, Y., Liu, X., Zeng, W., Mino, T., Satoh, H. (2007). Nitrogen removal via nitrite from municipal wastewater at low temperatures using real-time control to optimize nitrifying communities. *Environmental Science & Technology*, 41 (23), 8159-8164.

Yang, S., Yang, F. (2011). Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 318-323.

Yerushalmi, L., Ashrafi, O., Haghighat, F. (2013). Reductions in greenhouse gas (GHG) generation and energy consumption in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 67 (5), 1159-1164.

Young, B., Delatolla, R., Kennedy, K., Laflamme, E., Stintzi, A. (2017). Low temperature MBBR nitrification: Microbiome analysis. *Water Research*, 111, 224-233.

Zeng, W., Wang, X., Li, B., Bai, X., Peng, Y. (2013). Nitritation and denitrifying phosphorus removal via nitrite pathway from domestic wastewater in a continuous MUCT process. *Bioresource Technology*, 143, 187-195.

Zhang, F., Li, P., Chen, M., Wu, J., Zhu, N., Wu, P., Chaing, P., Hu, Z. (2015). Effect of operational modes on nitrogen removal and nitrous oxide emission in the process of simultaneous nitrification and denitrification. *Chemical Engineering Journal*, 280, 549-557.

Zhang, L., Shen, Z., Fang, W., Gao, G. (2019). Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 689, 1181-1191.

Zhang, Q.H., Yang, W.N., Ngo, H.H., Guo, W.S., Jin, P.K., Dzakpasu, M., Yang, S.J., Wang, Q., Ao, D. (2016a). Current status of urban wastewater treatment plants in China. *Environment International*, 92, 11-22.

Zhang, X., Liang, Y., Ma, Y., Du, J., Pang, L., Zhang, H. (2016b). Ammonia removal and microbial characteristics of partial nitrification in biofilm and activated sludge treating low strength sewage at low temperature. *Ecological Engineering*, 93, 104-111.

Zhao, B., An, Q., He, Y.L., Guo, J.S. (2012). N₂O and N₂ production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR. *Bioresource Technology*, 116, 379-385.

Zhao, J., Zhao, J., Yang, W., Hu, B., Huang, T., Xie, S., Lei, S., Hou, W. (2022a). Mechanisms of NO and N₂O production by enriched nitrifying sludge in a sequencing batch reactor: effects of hydroxylamine. *Journal of Environmental Management*, 316, 115237.

Zhao, J., Zheng, M., Su, Z., Liu, T., Li, J., Guo, J., Yuan, Z., Hu, S. (2022b). Selective enrichment of comammox *Nitrospira* in a moving bed biofilm reactor with sufficient oxygen supply. *Environmental Science & Technology*, 56 (18), 13338-13346.

Zheng, M., Zhou, N., He, S., Chang, F., Zhong, J., Xu, S., Wang, Z., Liu, T. (2021). Nitrous oxide (N₂O) emissions from a pilot-scale oxidation ditch under different COD/N ratios, aeration rates and two shock-load conditions. *Journal of Environmental Management*, 280, 111657.

Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V., Ng, W.J. (2011). The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Research*, 45 (15), 4672-4682.

Zhou, Y., Zhu, Y., Zhu, J., Li, C., Chen, G. (2023). A comprehensive review on wastewater nitrogen removal and its recovery processes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20 (4), 3429.

Żubrowska-Sudoł, M., Jasińska, A. (2007). Podział reaktorów ze złożem ruchomym. *Gaz, woda i technika sanitarna*, 3, 29-31.

8. SPIS TABEL

Tabela 3.1. Różne rodzaje złożeń ruchomych	21
Tabela 3.2. Zestawienie badań prowadzonych przez różne grupy badawcze w obszarze naprzemiennego napowietrzania ścieków	37
Tabela 3.3. Zużycie energii elektrycznej podczas oczyszczania ścieków dla różnych rozwiązań technologicznych.....	41
Tabela 3.4. Wartości współczynników emisji N ₂ O dla różnych rozwiązań technologicznych oczyszczania ścieków	45
Tabela 4.1. Koncepcja realizacji pracy badawczej – wyróżnione zagadnienia i eksperymenty	48
Tabela 4.2. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 1.....	49
Tabela 4.3. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 2.....	50
Tabela 4.4. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 3.....	51
Tabela 4.5a. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 4.....	52
Tabela 4.5b. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 4	53
Tabela 4.6. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 5.....	54
Tabela 4.7a. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 6.....	55
Tabela 4.7b. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 6	56
Tabela 4.7c. Koncepcja realizacji pracy badawczej – eksperyment nr 6.....	57
Tabela 5.1. Szybkość utleniania azotu amonowego i szybkość utleniania azotu azotynowego wyznaczone w testach AUR i NitUR prowadzonych przy różnych stężeniach tlenu	73
Tabela 5.2. Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie (E _o) i efektywność procesu nitryfikacji w zależności od zastosowanej strategii napowietrzania – wyniki zaprezentowane w publikacji P3	80
Tabela 5.3. Zużycie energii elektrycznej na napowietrzanie (E _o) i efektywność procesu nitryfikacji w zależności od zastosowanej strategii napowietrzania – wyniki zaprezentowane w publikacji P4	81
Tabela 5.4. Wartości szybkości utleniania azotu amonowego i szybkości utleniania azotu azotynowego przy 20°C i 12°C w zależności od formy w jakiej rozwija się biomasa.....	83

9. SPIS RYSUNKÓW I ZDJĘĆ

Zdjęcie 4.1. Złoże ruchome EvU-Pearl® przed (A) i po wykształceniu biofilmu (B)	60
Rysunek 3.1. Szalki produkcji N ₂ O podczas procesu nitryfikacji. Enzymy wykorzystywane do utleniania azotu amonowego przez poszczególne grupy bakterii utleniających oznaczono kolorami: pomarańczowym dla AOB (ang. <i>ammonia oxidizing bacteria</i>), fioletowym dla AOA (ang. <i>ammonia oxidizing archaea</i>) i zielonym dla bakterii Comammox (ang. <i>complete ammonia oxidizing bacteria</i>).....	42
Rysunek 4.1. Schemat stanowiska badawczego – SBR1	59
Rysunek 4.2. Schemat stanowiska badawczego – SBR2	59

**PUBLIKACJE
STANOWIĄCE
ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ**

Publikacja nr 1

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S.

(2024)

Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor - A Long-Term Study

Water, 16 (4), 534,

<https://doi.org/10.3390/w16040534>

IF:3,00; punkty MNiSW: 100

Article

Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—A Long-Term Study

Olga Zajac ¹, Monika Zubrowska-Sudol ^{1,*}, Martyna Godzieba ² and Sławomir Ciesielski ²

¹ Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland; olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

² Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland; martyna.godzieba@uwm.edu.pl (M.G.); slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S.C.)

* Correspondence: monika.sudol@pw.edu.pl

Abstract: A lab-scale pure moving bed sequencing batch biofilm reactor (MBSBBR) was employed to investigate changes in nitrification kinetics and microbial diversity. The MBSBBR operated under different aeration strategies (defined by the ratio of the duration of the subphases with (t_1) and without (t_2) aeration ($R = t_2/t_1$)) – continuous ($R = 0$) and intermittent (with constant time of non-aerated subphases ($t_2 = 10$ min) and variable duration of subphases with aeration ($t_1 = 40$ min– $R = 1/4$, $t_1 = 30$ min– $R = 1/3$, $t_1 = 20$ min– $R = 1/2$) and dissolved oxygen (DO) concentrations (6 mg/L; 3.5 mg/L). Moreover, the reactor's organic (OLR) and nitrogen (NLR) loading rates were changed in the following ranges: OLR—537–402 gCOD/m³·d, NLR—64–48 gN/m³·d. The obtained results showed that, irrespective of changes introduced in particular series, a highly effective nitrification process ($93.36 \pm 2.13\%$) was achieved. The activity of bacteria capable of oxidizing ammonia nitrogen changed differently from that of bacteria capable of oxidizing nitrites (NOB). An increase in R was the primary factor changing the activity of ammonia-oxidizing microorganisms. NOB activity was affected only by the reduction of OLR and NLR. NOB were the predominant bacterial group, consistent with the kinetics studies. A DO decrease caused an increase in the abundance of AOB, NOB, and Comammox bacteria. Comammox bacteria were the most abundant at $R = 1/2$ and DO = 3.5 mg/L.

Keywords: moving bed; nitrification kinetics; ammonia oxidation rate; nitrite oxidation rate; aeration strategy; Comammox bacteria



Citation: Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M.; Godzieba, M.; Ciesielski, S. Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—A Long-Term Study. *Water* **2024**, *16*, 534. <https://doi.org/10.3390/w16040534>

Academic Editor: Min Ji

Received: 27 December 2023

Revised: 5 February 2024

Accepted: 6 February 2024

Published: 8 February 2024

Corrected: 17 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

As a result of intensive agricultural and industrial activities, as well as the expansion of urban areas, increasing amounts of nitrogen compounds (in particular, ammonia nitrogen) enter the natural environment, causing its degradation. In order to prevent this as much as possible, new and modernized wastewater treatment plants (WWTPs) are being designed globally, and processes aimed at biological nitrogen removal are being developed [1]. Biofilm-based wastewater treatment systems are gaining prominence because they demonstrate considerable resilience against variations in hydraulic loads, pH levels, temperature fluctuations, and pollutant concentrations [2]. Leyva-Diaz et al. (2015) assert that biofilm-based systems achieve a higher nitrification rate compared to traditional activated sludge systems [3]. Biofilm-based wastewater treatment processes facilitate the accumulation and retention of biomass without the necessity for external devices for separation and retention. These technological solutions are especially advantageous for retaining slow-growing nitrifying bacteria due to their extremely high solids retention time (SRT) [4]. This is particularly important due to the fact that the nitrification process is one of the key links in the natural nitrogen cycle and, at the same time, the limiting stage.

If there are problems with the efficiency of nitrification, it will lead to challenges in the subsequent steps of wastewater nitrogen removal. Therefore, it is imperative to properly select the operating parameters of biological reactors and to ensure that the biomass used for wastewater treatment fosters the robust growth of nitrifying organisms.

One example of a biofilm-based wastewater treatment system is pure moving bed technology. This is a simple and efficient wastewater treatment technology, with biomass immobilized on moving plastic carriers. Compared to systems based on activated sludge technology or those with fixed beds, this solution offers many advantages, such as: no sludge bulking, small size of compact units, increased treatment capacity, complete solids removal, and reduced sludge production [5]. The implementation of pure moving bed technology is also associated with easy operation and low maintenance and energy requirements [6]. As reported by Safwat (2018), this technological solution prevails over conventional biological wastewater treatment systems in terms of greater microbial activity, diversity, and stability [7]. Pure moving bed technology is used in both continuous-flow systems—moving bed biofilm reactors (MBBR) as well as moving bed sequencing batch biofilm reactors (MBSBBR). The former solution has already been widely described in the literature [8], whereas MBSBBR has only been reported in several papers to date [9].

The most frequently studied factors affecting the course and effectiveness of wastewater treatment using pure moving bed technology are the following: intermittent aeration (IA) [10], temperature [11], dissolved oxygen (DO) concentration [12], and type of media used [13]. It is worth emphasizing that these studies have mainly focused on continuous-flow systems. A comparison of MBBR with MBSBBR in the context of the impact of influent characteristics and feeding regime (continuous and sequencing-batch) on the nitrification process and nitrifying biofilm development on different types of moving bed biofilm reactors can be found in the work of Bassin et al. (2012) [14]. For instance, these authors observed that in the sequencing batch system, the time required to develop a thick biofilm was shorter than that in MBBR. Moreover, the conditions under which wastewater treatment processes are conducted can affect the composition and activity of particular bacterial communities present in the systems. A review of the literature on wastewater treatment using pure moving bed technology also indicates that a little-recognized issue is how a community of nitrifying organisms in biofilm, especially Comammox bacteria, changes in response to different operating conditions of wastewater treatment systems and how they affect the activity of particular groups of nitrifying bacteria. For example, Zhao et al. (2022) observed selective enrichment of Comammox bacteria in the MBBR, further proving that they can even dominate the canonical ammonia oxidizers [15]. Another group of researchers confirmed the presence of Comammox bacteria in various full-scale WWTPs based on continuous-flow pure moving bed technology [16]. However, these reports still do not permit a clear identification of the factors influencing the development of Comammox bacteria in reactors operating with pure moving bed technology, highlighting the need for more research in this area. To the best of our knowledge, there have been no attempts to describe the abundance of Comammox bacteria in pure moving bed sequencing batch reactors, which creates a significant gap regarding the occurrence of these microorganisms. In our previous studies, we explored the presence of Comammox bacteria and canonical nitrifiers. However, these studies were conducted in a moving bed sequencing batch biofilm reactor operating as a hybrid technology with biomass in the form of activated sludge and biofilm [17,18]. The focus was on analyzing how changes in aeration strategy and DO concentration affected the size of their populations and activities. Promising results led the authors to conduct further research in a reactor employing pure moving bed technology.

In light of this background, in this study, a MBSBBR operated in pure moving bed technology with nitrification/denitrification was employed to investigate the effect of different aeration strategies (defined by the ratio of the duration of the subphases with (t_1) and without (t_2) aeration ($R = t_2/t_1$), and dissolved oxygen concentration in aerated subphases), as well as the organic (OLR) and nitrogen (NLR) loading rates on the course of the nitrification process and microbial diversity. The specific objectives are as follows:

(1) to assess the impact of the aforementioned factors on the ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR) in biofilm; (2) to assess changes in the frequency of occurrence of particular groups of nitrifying microorganisms in biofilm as a result of the introduced changes; (3) to characterize the structures of communities of nitrifying microorganisms that develop in the form of biofilm; (4) to determine the abundance of Comammox bacteria in biofilm; and (5) to correlate changes in activity of particular groups of nitrifying microorganisms with microbial community composition in biofilm. These studies were conducted continuously for over a year (445 days), which undoubtedly distinguishes them compared to previously published research.

2. Materials and Methods

2.1. Reactor Description

The experiment was conducted in a laboratory-scale plexiglass MBSBBR with an active volume of 28 L (Figure 1).

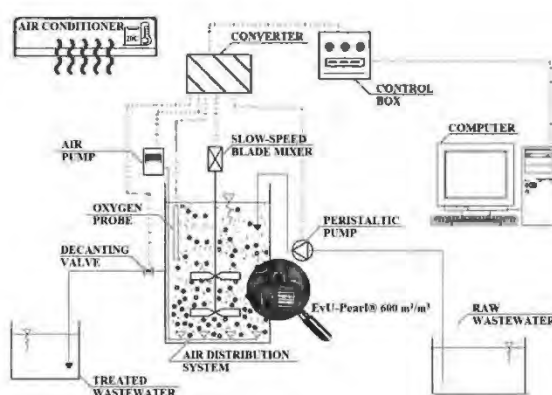


Figure 1. Schematic of the moving bed sequencing batch biofilm reactor with accessories.

As a carrier of biofilm, an EvU-Pearl[®] moving bed was applied, in the shape of a cylinder with an active surface area of $600 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ($\Phi = 5 \text{ mm}$, $h = 8 \text{ mm}$) (EvUInnovative Umwelttechnik GmbH, Gröditz, Germany) (Figure 2). The moving carriers constituted 25% of the active volume of the reactor, i.e., 7 L.

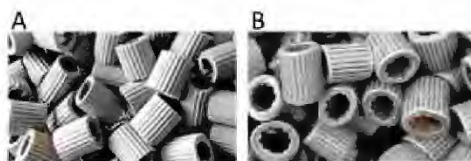


Figure 2. Photographs of the EvU-Pearl[®] moving carriers (A) before and (B) after biofilm formation.

The content of the reactor was stirred using a slow-speed blade mixer R-50D (CAT, Ballrechten-Dottingen, Germany), with an engine speed of 110 rev/min. The aeration system consisted of blowers and aquarium filters mounted at the bottom of the reactor. Continuous measurements of DO concentration and temperature were conducted by an optical sensor Oxymax COS61D (Endress + Hauser, Weil am Rhein, Germany) connected to a converter Liquiline CM442 (Endress + Hauser, Weil am Rhein, Germany), which modified and relayed the acquired signals to the control box and then to the computer. An important element of the model was the automated control system, SCADA Wonderware InTouch (version 2017-Update 2), cooperating with an oxygen probe, which was responsible for maintaining the assumed oxygen concentration and conducting the remaining technological operations through switching on a pump dosing synthetic wastewater, as well as a mixer and decanting valve.

The schedule of the system's cycle of operation in particular stages and series of the experiment is presented in Figure 3. One complete reactor's operation cycle spanned 8 h and consisted of two unaerated phases (first: 50 min; second: 30 min), two aerated phases (first: 190 min; second: 200 min), and a 10-min decantation phase. Depending on the experimental series, continuous (S.I.1.) or intermittent (S.I.2.–S.II.4.) aeration was applied during the aerated phases. Intermittent aeration was implemented during the aerobic phases by introducing sequences consisting of subphases with (t_1) and without (t_2) aeration. The duration of the subphases with aeration differed between the series, while those without aeration were constant, i.e., 10 min. Each IA strategy was characterized by the ratio between the times of non-aerated and aerated subphases ($R = t_2/t_1$). A detailed description of the aeration strategies employed is presented in Table 1.

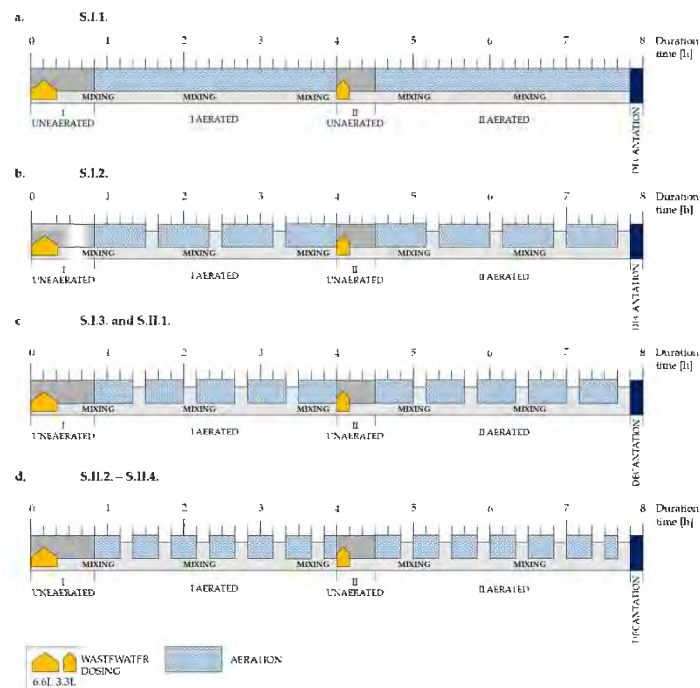


Figure 3. Schedule of the reactor operation cycle: (a) S.I.1.; (b) S.I.2.; (c) S.I.3.; S.II.1.; (d) S.II.2–4.

Table 1. Reactor operation stages.

Stage	Series	Duration	Oxygen Concentration during Aerated Subphases (DO)	Ratio between Times of Non-Aerated and Aerated Subphases (R)	Organic Loading Rate (OLR)	Nitrogen Loading Rate (NLR)
	Unit	[d]	[mgO ₂ /L]	[-]	[gCOD/m ³ ·d]	[gN/m ³ ·d]
I	S.I.1.	1–40	6	0	537	64
	S.I.2.	41–79		1/4		
	S.I.3.	80–100		1/3		
II	S.II.1.	101–196	3.5	1/3	537	64
	S.II.2.	197–330		1/2	537	64
	S.II.3.	331–430		1/2	402	48
	S.II.4.	431–445		1/2	537	64

Employing a peristaltic pump, Masterflex® Ismatec® Ecoline (Masterflex Ismatec® Cole-Parmer, Chicago, IL, USA), at the beginning of each non-aerated phase, the reactor was supplied with synthetic wastewater with a composition simulating that of municipal wastewater in a volume of 10 L per cycle (S.I.; S.II.1,2,4) and 6.6 L per cycle (S.II.3.). The detailed list of the compounds used to prepare synthetic wastewater is presented in Supplementary Material (Table S1). The use of synthetic wastewater was necessary to maintain identical loading conditions in each series. The characteristics of synthetic sewage were the same throughout the experiment: COD: 512.35 ± 9.08 mgO₂/L, TN: 61.99 ± 2.69 mgN/L, TKN: 60.24 ± 2.76 mgN/L, N-NH₄⁺: 39.06 ± 1.21 mgN-NH₄⁺/L; N-NO₃⁻: 1.75 ± 0.41 mgN-NO₃⁻/L, TP: 7.52 ± 0.50 mgP/L, pH: 7.6–7.9. Synthetic wastewater was prepared daily, with the exception of the pandemic period, when it was prepared every six days.

The dissolved oxygen concentration during the aerated subphases was maintained at the level assumed for a given stage of the experiment. For stage I, it was 6.0 mgO₂/L, and for stage II, it was 3.5 mgO₂/L (Table 1). The DO set-point was selected based on literature reports and the authors' previous studies to ensure that this parameter does not act as a limiting factor for the efficiency of the nitrification process in biofilm-based systems [19,20]. The temperature in the reactor was maintained at 20 °C throughout the study using external air conditioning.

2.2. Operating Conditions

The study started on a previously operated MBSBBR system for integrated carbon and nitrogen compound removal with biomass developed in the form of biofilm overgrowing moving carriers (22.4278 gVSS). The nitrification, denitrification, and organic compound removal efficiencies were 99.37%, 79.53%, and 94.97%, respectively (N-NH₄⁺, TN, and COD in the effluent were: 0.18 mgN-NH₄⁺/L, 13.30 mgN/L, and 27.60 mgO₂/L).

Two research stages were designated in the experiment lasting 445 days (S.I.–S.II.). They differed in the adopted level of oxygen concentration maintained in the reactor during the subphases of aeration. During each of the stages, the assumed changes were successively introduced by designating a particular series. Detailed characteristics of the basic parameters of the reactor's operation during particular stages and series are presented in Table 1.

Stage I involved three research series (S.I.1.–S.I.3.) differing in the applied aeration strategy, each time with DO maintained at a level of 6.0 mgO₂/L. The experiment began with a series in which the system operated with continuous aeration—R = 0 (S.I.1.), followed by intermittent aeration (IA), with the introduction of changes in R values through a reduction of the duration of the aerated subphases. In series 2, the duration of aerated subphases was 40 min—R = 1/4 (S.I.2.), followed by its reduction to 30 min in series 3—R = 1/3 (S.I.3.).

At stage II, DO concentration was decreased to 3.5 mgO₂/L, and the aeration strategy remained the same—R = 1/3 (S.II.1.). In the following series, the duration of aerated subphases was reduced to 20 min—R = 1/2 (S.II.2.). As a result of the outbreak of the COVID-19 pandemic, changes were introduced in the methodology of operation of MBSBBR. They included a decrease in the reactor's organic and nitrogen loading rates (OLR = 402 gCOD/m³·d, NLR = 48 gN/m³·d) through lowering the volume of wastewater dosed to the reactor. The introduced changes permitted the designation of series 3 (S.II.3.). Along with the elimination of some of the restrictions, the initially assumed reactor's organic and nitrogen loading rates were restored (S.II.4.).

Throughout the experiment, the amount of biomass in the form of biofilm averaged 23.2514 ± 5.3619 gVSS. To confirm that the reactor was operated as a pure moving bed technology, volatile suspended solids of biomass present in the reactor in suspended form were checked in parallel. It remained on average at the level of 0.3507 ± 0.0408 gMLVSS, which was less than 1.65% of the biomass in the form of biofilm (see Supplementary Material–Table S2). This confirms that the reactor was operated as a pure moving bed technology throughout the experiment, and this small amount of biomass in suspended form was primarily detached biofilm.

The following was conducted in all series:

- daily control of ammonia nitrogen concentration in the effluent (except the pandemic period—S.II.3.);
- analysis of the influent and effluent, in the following scope: COD, TN, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , TP, alkalinity, pH—twice a week (once a week in the pandemic period);
- determination of the quantity of biomass developed in the form of biofilm;
- batch tests of the ammonia utilization rate (AUR) and nitrite utilization rate (NitUR);
- microbiological analyses: quantification of nitrifying bacteria using the absolute qPCR method; description of microbial communities in biofilm based on new generation sequencing data (NGS).

Batch tests and quantitative PCR analysis were conducted at the end of each series. NGS was conducted only in selected series.

2.3. Ammonia and Nitrite Utilization Rate Batch Test

All batch tests were conducted under the same conditions, allowing for tracking changes in the activity of bacteria capable of oxidizing ammonia and nitrite nitrogen.

The tests were carried out for the carriers taken from the MBSBBR in a continuously aerated and mixed 2 L batch test reactor, maintaining the proportions of carriers as in the MBSBBR (25% of active volume—0.25 L), under DO concentration near saturation levels at a temperature of 20 °C (DO concentration was determined based on the oxygen solubility in water at a temperature of 20 °C and reached approx. 9 mgO₂/L). Depending on the type of test, the solution of NH₄Cl (AUR test) or KNO₂ (NitUR test) was added to the test reactor (the initial concentration of N-NH_4^+ or N-NO_2^- was 15 mg/L), and the loss of N-NH_4^+ and N-NO_2^- was tracked, respectively. Samples with a volume of 30 mL were collected from the reactor every 30 min and immediately filtered through filters with a mesh of 0.45 µm. In the filtrate, the concentration of N-NH_4^+ , N-NO_2^- , and N-NO_3^- (AUR test) or N-NO_2^- and N-NO_3^- (NitUR test) was measured. The test lasted until the concentrations of ammonia (AUR test) or nitrite (NitUR test) reached values approximately equal to 0 mg/L. The slope of the linear regression for the decrease in N-NH_4^+ and N-NO_2^- with $R > 0.9$ was utilized to determine the ammonia oxidation rate (AOR) or nitrite oxidation rate (NitOR). The determined AOR and NitOR values indicate changes in the activity of specific groups of nitrifying microorganisms. A detailed methodology of AUR and NitUR batch tests was presented in our previous paper [17], with the difference that in this work, tests were performed only for biomass immobilized on moving carriers (because the reactor worked as a pure moving bed technology).

2.4. Quantity of Biofilm

At the end of each series, the amount of biofilm immobilized on moving carriers was measured using gravimetric methods by calculation of weight loss. Five carriers were randomly collected from the reactor. They were rinsed with demineralized water to remove loosely attached biomass. Then, the biofilm was mechanically removed from the carriers. Total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were determined in biofilm in accordance with the Polish Standard PN-EN 872:2007 [21].

2.5. Microbiological Analysis

2.5.1. DNA Extraction

DNA was extracted from the biofilm samples by means of a FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The amount of extracted DNA was measured using a Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The isolated DNA was stored at −18 °C until further analysis.

2.5.2. qPCR

The PCR reaction was performed in an ABI7500 real-time PCR thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in MicroAmp™ Optical 96-well reaction plates using Mix

SYBR® A RT PCR reagents (A and A Biotechnology, Gdynia, Poland). AOB were detected with primers targeting the ammonia monooxygenase gene: A189 (5'-GGHACTGGGAYTTCTGG-3') [22] and amoA-2R (5'-CCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') [23]. NOB was detected with primers corresponding to the 16S rRNA gene: NSR1113F (5'-CCTGCTTTCAGTTGCTACCG-3') and NSR1264R (5'-GTTTGCAGCGCTTTGTACCG-3') [24]. The abundance of Comammox bacteria was estimated using primers designed by Fowler et al. (2018): NTSP-amoA 162F (5'-GGATTTCTGGNTSGATTGGA-3'), NTSP-amoA 359R (5'-WAGTTNGACCACCASTACCA-3') [25]. The final volume of the reaction mixture was 20 µL. The following temperature profile was applied: incubation at 50 °C for 2 min, initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing and extension at 60 °C for 60 s. Each sample was analyzed in triplicate. In addition, the melting curves were generated for each primer pair to exclude non-specific amplifications.

The results of qPCR experiments were calculated using absolute quantification with the application of the standard curve method. The copy numbers of the studied genes were calculated using the software of the ABI 7500 real-time PCR system (version 2.3).

Standard curve preparation (see Supplementary Material—Figure S1): The *AmoA* gene fragment was amplified for AOB and Comammox bacteria, whereas the 16S rRNA gene fragment was used for NOB with the application of the aforementioned primers. The quality of the obtained products was verified electrophoretically on a 1% agarose gel and using a molecular mass marker (FastGene100bp DNA Ladder, Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany). PCR products were cleaned by means of a Monarch PCR and DNA Cleanup Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and ligated into the pTZ57R/T vector. Competent *E. coli* cells were transformed with recombinant vectors using an InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Clones were verified with Luria-Bertani (LB) agar medium, supplemented with ampicillin, X-Gal, and IPTG. The plates were incubated overnight at 37 °C. Several white colonies were collected from each plate, transferred to a liquid LB medium supplemented with ampicillin, and incubated overnight at 37 °C. The combined plasmids were extracted using a Plasmid mini kit (A and A Biotechnology, Gdynia, Poland) and sequenced to confirm the presence of the correct DNA insert. Standard curves for each primer pair were constructed using tenfold serial dilutions of the recombinant plasmids, used as standard templates for qPCR amplifications.

2.5.3. 16S rRNA Amplicon Sequencing

The taxonomic composition of samples S.I.1., S.I.3., S.II.1., S.II.2., and S.II.4. was determined by sequencing of the V3–V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. High-throughput Illumina sequencing was performed with S-d-Bact-0341-b-S-17 and S-d-Bact-0785-a-A-21 primers [26] and NEBNext® High-Fidelity 2X PCR Master Mix (Bio Labs Inc., Boston, MA, USA) following the manufacturer's manual. The sequencing reaction was performed on a MiSeq sequencer with a MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA), applying pair-end technology with a read length of 250 base pairs.

Raw sequencing data were analyzed using the QIIME 2 package (version 2022.4) [27]. Pairs of sequences were merged using the fast-join algorithm. Unmerged sequences were excluded from further analysis. Low quality sequences (under 20) were filtered by the Cutadapt algorithm [28]. Chimeric sequences were detected and excluded from analyses using USEARCH [29]. 16S rRNA OTUs were picked from the Illumina reads using a closed-reference OTU picking protocol against the SILVA_V_138 database [30]. Sequences were clustered at 97% identity and trimmed to span only the 16S rRNA V4 region flanked by the sequencing primers. Taxonomy assignments were associated with OTUs based on the taxonomy associated with the SILVA_V_138 reference sequence defining each OTU.

2.6. Analytical Methods

Concentrations of COD, N-NH₄⁺, N-NO₂[−], N-NO₃[−], TN, and TP were analyzed spectrophotometrically using cuvette tests (Hach Lange GmbH, Dusseldorf, Germany) and DR

3900 spectrophotometer (Hach Lange, GmbH, Loveland, CO, USA) according to APHA Standard Methods [31]. All chemical analyses were performed in duplicate.

2.7. Statistical Analysis

The statistical analysis of the obtained results in the scope of the quality of treated wastewater and the efficiency of the removal of particular pollutants employed program Statistica 13.3PL. A RiR Tukey test was applied for the determination of the significance of differences between the analyzed variables (p -value smaller than 0.05 pointed to a statistically significant difference).

3. Results and Discussion

3.1. Nutrient Removal Performance

According to the results presented in Table 2, a highly effective nitrification process ($E_{\text{Nit}} = 93.36 \pm 2.13\%$) was achieved in all series ($p > 0.277031$), pointing to the lack of effect of IA, DO decrease, and reduction of OLR and NLR on the efficiency of the analyzed process. Nonetheless, the RiR Tukey test showed significant differences between N-NH_4^+ for S.II.1.–S.II.2. ($p = 0.005225$) and S.II.1.–S.II.3. ($p = 0.000803$). Despite the recorded differences, the concentrations of N-NH_4^+ were at a low level and remained in a range of 0.10–2.68 mg/L throughout the experiment.

Table 2. Effluent characteristics and efficiencies of nitrification, denitrification, and organic compound removal.

Parameter	Unit	Stage I			Stage II			
		S.I.1.	S.I.2.	S.I.3.	S.II.1.	S.II.2.	S.II.3.	S.II.4.
COD	mgO ₂ /L	21.42 ± 2.68	17.53 ± 2.16	18.25 ± 3.96	18.39 ± 4.79	21.20 ± 2.52	21.99 ± 3.23	18.84 ± 2.88
TN	mgN/L	13.98 ± 2.26	17.71 ± 2.50	18.70 ± 1.02	14.10 ± 2.27	12.94 ± 1.06	18.77 ± 2.01	15.43 ± 2.93
TKN	mgN/L	3.99 ± 1.92	3.20 ± 0.75	3.39 ± 1.35	3.80 ± 1.23	4.26 ± 1.16	4.34 ± 0.95	4.28 ± 0.29
N-NH ₄ ⁺	mgNH ₄ ⁺ /L	0.77 ± 0.52	0.77 ± 0.40	0.60 ± 0.33	0.61 ± 0.48	0.87 ± 0.44	0.99 ± 0.46	1.07 ± 0.49
N-NO ₂ ⁻	mgN-NO ₂ ⁻ /L	0.24 ± 0.16	0.29 ± 0.37	0.03 ± 0.02	0.15 ± 0.17	0.13 ± 0.13	0.30 ± 0.22	0.22 ± 0.24
N-NO ₃ ⁻	mgN-NO ₃ ⁻ /L	9.74 ± 3.45	14.22 ± 2.85	16.14 ± 2.40	10.13 ± 2.34	8.55 ± 1.17	14.14 ± 1.97	10.93 ± 2.75
E _{COD} *	%	95.80 ± 0.55	96.59 ± 0.41	96.57 ± 0.72	96.42 ± 0.95	95.84 ± 0.48	95.69 ± 0.63	96.32 ± 0.57
E _{Nit} *	%	93.86 ± 2.96	94.64 ± 1.68	94.52 ± 2.22	93.56 ± 2.04	93.15 ± 2.29	92.68 ± 1.56	92.64 ± 0.67
E _{Denitr} *	%	79.02 ± 3.42	72.19 ± 3.68	70.56 ± 3.69	76.77 ± 3.69	78.79 ± 1.57	69.10 ± 3.49	74.05 ± 4.71

Note: * Calculated in accordance with the methodology provided by Podedworna and Zubrowska-Sudol [32].

The transition from continuous ($R = 0$) to intermittent aeration ($R = \frac{1}{4}$) resulted in a certain decrease in the efficiency of the denitrification process (E_{Denitr}) ($p = 0.000450$). The average E_{Denitr} decreased from $79.02 \pm 3.42\%$ (S.I.1.) to $71.56 \pm 3.53\%$ (S.I.2.), accompanied by a 1.27-fold increase in TN concentration in the effluent. An almost 50% increase in the concentration of nitrate nitrogen was simultaneously observed in treated wastewater, with N-NO_3^- constituting 80% of TN in the effluent (S.I.2.). Another substantial ($p = 0.003520$) change in the efficiency of the denitrification process was recorded after the reduction of oxygen concentration to 3.5 mgO₂/L. It caused an increase in the E_{Denitr} from $70.56 \pm 3.69\%$ (S.I.3.) to $76.77 \pm 3.69\%$ (S.II.1.), and the mean TN concentration in the effluent decreased by 1/3. Due to the reduction of the reactor's organic and nitrogen loading rates, the average E_{Denitr} decreased from $78.79 \pm 1.57\%$ (S.II.2.) to $69.10 \pm 3.50\%$ (S.II.3.), therefore reaching the lowest level among all average values recorded throughout the experiment. Simultaneously with a decrease in the analyzed efficiency, a 1.47-fold increase in TN concentration in the effluent was recorded in comparison with S.II.2. A certain increase in the efficiency of the denitrification process occurred in the last series (S.II.4.), where the average E_{Denitr} reached a level of $74.05 \pm 4.71\%$, although the RiR Tukey test showed that the differences were not statistically significant ($p = 0.214883$).

No accumulation of nitrite nitrogen in treated wastewater was recorded in any of the series, either at stage I or II.

The obtained results also suggest that irrespective of changes introduced in particular series, the effectiveness of COD removal (E_{COD}) was maintained at a high and comparable

level— $96.07 \pm 0.74\%$ ($p > 0.065506$). The COD did not exceed $27 \text{ mgO}_2/\text{L}$. The RiR Tukey test also showed no statistically significant difference between COD in the effluent for any of the series ($p > 0.085551$).

The nitrification, denitrification, and organic compound removal efficiencies obtained in this study are similar to those reported in full-scale MBBRs described in the work by Phanwilai et al. (2020) [33]. This indicates a high likelihood of success in wastewater treatment using the MBSBBR with the analyzed in this paper also on a full-scale (i.e., DO of 3.5 or 6.0 $\text{mg O}_2/\text{L}$ and IA with R equal to 0, 1/4, 1/3, or 1/2). Feng et al. (2018), conducting research in lab-scale sequencing batch biofilm reactors, demonstrated slightly higher values of the analyzed processes with respect to nitrification—96.6–98.9% and denitrification—88.1–89.2%, while E_{COD} was at the level of 77.1–89.2% [34]. The observed discrepancies may arise from the strategy of IA that they employed, which could positively influence the denitrification process ($R = 2$, the duration of the subphase without aeration was longer).

3.2. Analysis of the Microbial Community Composition

The microbial composition of biofilm was characterized by Illumina MiSeq paired-end sequencing of the V3–V4 regions of the 16S rRNA gene. The alpha and beta diversity of the analyzed samples was estimated using the EzBioCloud platform [35]. The data were normalized by the number of reads (60,000). The number of OTUs increased in the last series of the first stage, when the aeration phase was the shortest (see Supplementary Material–Table S3). At the beginning of the second stage, it decreased to its initial value and then gradually increased until the end of the experiment. Species richness (based on the CHAO1 index) increased in series S.I.3. and was the highest of all the studied series. A sharp decrease in this value occurred after lowering DO, followed by an increase in the next series. A different trend was observed in community diversity (based on the Shannon index). Its value gradually increased across all series, reaching the highest value in series S.II.4., with the lowest DO and shortest aeration phase (Figure 4).

Proteobacteria were the most abundant phylum in all samples, with the highest abundance (47.8%) in the sample from the first series of the experiment, although their proportion decreased after shortening the aeration phase (see Supplementary Material–Figure S2a). In most experimental series, *Bacteroidota* and *Actinobacteriota* were second and third in abundance, respectively. The only exceptions were series S.II.2. and S.II.4., where the R value was the highest. In sample S.II.2, the number of *Actinobacteriota* decreased to 6.3%. This sample also had the highest percentage of *Bacteroidota* (20.8%) and *Nitrospirota* (7.1%). Sample S.II.4. had the highest proportion of *Chloroflexi* (14.9%) compared to the other series.

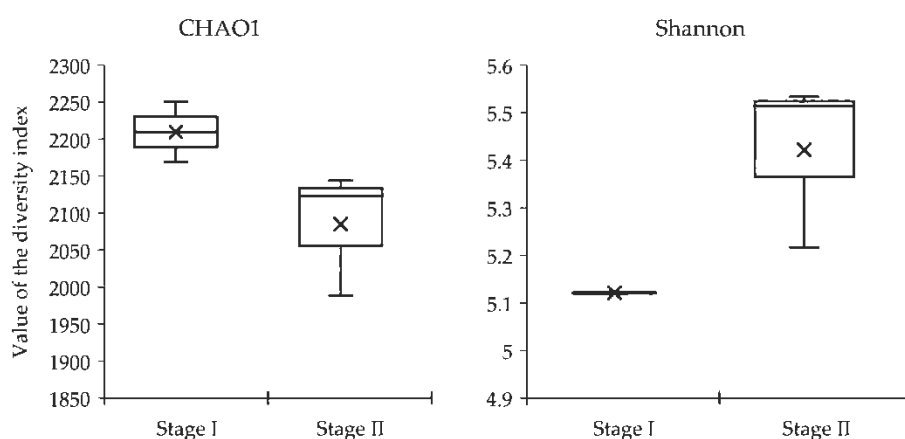


Figure 4. Comparison of species richness and diversity indices in two stages of the experiment.

At the genus level, a large percentage of the bacterial population consisted of less abundant and unidentified taxa (see Supplementary Material–Figure S2b). At the first stage of the experiment, *Ornithinibacter* and *Rhodobacter* were the most abundant genera. *Ornithinibacter* was particularly abundant in series S.I.3. (19.5%). At the next stage, with lower DO and higher R, the abundance of these two bacterial groups decreased, reaching the lowest values in sample S.II.2. Series S.II.2. was characterized by a high percentage of *Nitrospira* (7.1%). A gradual increase throughout the experiment occurred in *Kouleothrix*, whose abundance increased with decreasing R, from 0.1% in the sample from series S.I.1. to 5.23% in the sample from series S.II.4. In all series, the abundance of NOB bacteria was higher than that of AOB (see Supplementary Material–Figure S3). Moreover, the abundance of NOB increased steadily from series to series. Only in the last series, after reducing the loading rate of the reactor, there was a significant decrease in their abundance.

3.3. Nitrification Kinetics and Nitrifier Diversity in the Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor

This study combined kinetics batch tests and microbiological analysis to assess the influence of different intermittent aeration strategies, dissolved oxygen concentration, and the reactor's organic and nitrogen loading rate on the nitrification process and nitrifying microorganism diversity in a pure moving bed sequencing batch biofilm reactor—MBSBBR with Nitrification/Denitrification. The values of AOR and NitOR determined in a particular series are presented in Figure 5, whereas changes in the abundance of nitrifying bacteria are shown in Figure 6 (charts with results of batch tests providing the basis for the determination of AOR and NitOR are presented in the Supplementary Materials—Figures S4–S10).

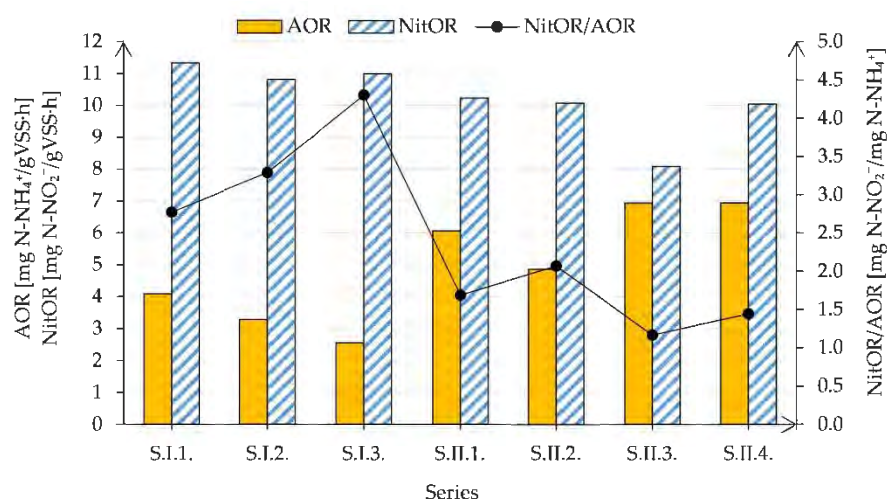


Figure 5. Ammonia Oxidation Rate (AOR) and Nitrite Oxidation Rate (NitOR) determined in AUR and NitUR batch tests and NitOR/AOR ratio.

The analysis of the data collected from batch tests shows that changes introduced in MBSBBR operation parameters had a greater effect on the activity of ammonia-oxidizing bacteria. Previous studies also reported that the activity of ammonia oxidizers was more susceptible to changes in system operation than those capable of oxidizing nitrite [17,18]. It is worth emphasizing that in that case, the biofilm came from a hybrid reactor, where, next to this form of biomass, also activated sludge developed. This study investigated the system with pure moving bed technology. Nevertheless, a similar trend was observed. Furthermore, the batch test results showed that the activity of bacteria capable of oxidizing ammonia nitrogen changed in a different way than that of those capable of oxidizing nitrite. However, the results of qPCR showed a similar direction of change in the amount of AOB

and NOB bacteria except S.II.4. For example, after changing the aeration strategy from continuous to intermittent ($R = 1/4$) (S.I.2.), the abundance of all studied bacteria increased by 6.9-fold, 8.1-fold, and 2.7-fold, for AOB, NOB, and Comammox bacteria, respectively. The opposite trend was observed in the biofilm from the aforementioned hybrid reactor, where, upon introducing intermittent aeration in the same regime, the abundance of these bacteria decreased [17].

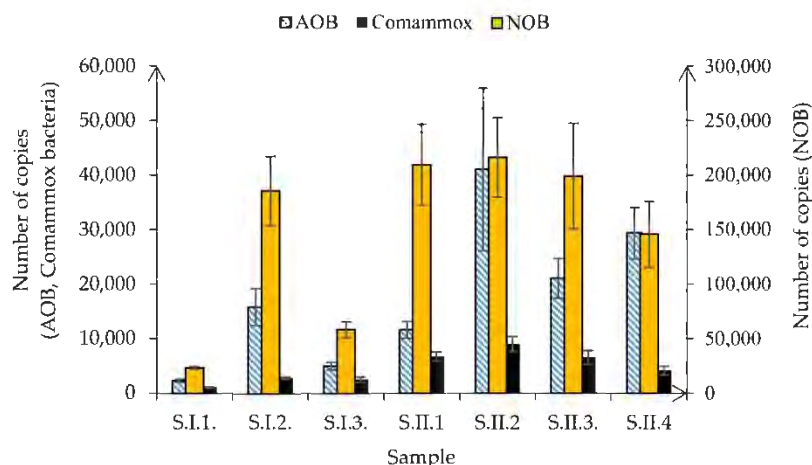


Figure 6. Absolute quantification of the AOB, NOB, and Comammox bacteria.

Each time, shortening the duration of subphases with aeration (increase in R) led to a drop in the activity of bacteria capable of oxidizing ammonia nitrogen by approximately 20% (from S.I.1. to S.I.2., from S.I.2. to S.I.3., from S.II.1. to S.II.2.), whereas reducing the OLR and NLR and a decrease in DO concentration followed in an increase in their activity. The greatest difference between AOR values was recorded after a decrease in DO (S.I.3. vs. S.II.1.). This aligns with the observations made for the biofilm from hybrid systems [17,18].

Data presented in Figure 5 also suggest that irrespective of the research stage, nitrite-oxidizing bacteria showed greater activity, which is consistent with qPCR results, where NOB were the predominant bacterial group in all samples. Interestingly, in the biofilm developing within the hybrid reactor, despite the markedly higher NitOR than AOR, the detected abundance of nitrite oxidizers was lower than that of AOB [17].

In the further series of stage I, with an increase in R , the difference between NitOR and AOR increased. The NitOR values were then 2.769 (S.I.1.), 3.284 (S.I.2.), and 4.296 (S.I.3.) fold higher than those of AOR. At stage II, the differences between the analyzed values decreased, and the lowest NitOR/AOR ratio was recorded after a decrease in the OLR and NLR (S.II.3.). The values of the analyzed rates differed only 1.17-fold. Undoubtedly, all these observations can be attributed to the fact that in the second stage of the experiment, changes in the reactor conditions had a much greater effect on the AOB bacteria, whose abundance fluctuated significantly compared to the other groups. In studies conducted in a laboratory-scale novel rotating self-aerated biofilm reactor by Luan et al. (2023), a higher activity of nitrite oxidizers was also demonstrated [36]. In the literature, there are also studies that describe this phenomenon in full-scale WWTPs [37,38]. For example, Regmi et al. (2011), conducting batch tests with carriers taken from a hybrid reactor, demonstrated that NitOR was 1.52 times higher than AOR [37]. Interestingly, they did not observe similar relationships in parallel tests conducted on activated sludge from the same system. Meanwhile, Yao and Pang (2017) investigated nitrification activity in 10 full-scale activated sludge biological nutrient removal WWTPs [38]. In batch tests conducted for activated sludge samples from WWTPs, the cited authors demonstrated that in each case, the NitOR was higher than the AOR. This was explained by the fact that, stoichiometrically,

six electrons are needed for oxidizing one mole of ammonia to nitrite, but only two for nitrite to nitrate. It is also interesting that the rates they obtained were, in most cases, lower than those determined in this study. The average AOR value from all 10 WWTPs was 1.53 times lower than that obtained in this work, while the difference between the average NitOR values was as much as 2.25 times. This can be considered evidence that systems based on biofilm provide a better environment for the development of nitrifiers, promoting a higher nitrification rate.

The comparison of the NitOR values obtained in subsequent series showed that the activity of nitrite-oxidizing bacteria was only influenced by the reduction of the OLR and NRL, suggesting greater stability of these microorganisms. It led to a 1.25-fold drop in the NitOR in comparison with that from S.II.2. (from 10.063 mgN-NO₂⁻/gVSS·h to 8.076 mgN-NO₂⁻/gVSS·h). The observed decline in NitOR value can be primarily attributed to a decrease in the activity of NOB due to no significant change in their number (less than 8%). After the change in the OLR and NLR, in the case of the biofilm from the hybrid system, a decrease in the rate of nitrite nitrogen oxidation was also observed [18]. In contrast, Yang and Yang (2011), conducting research in a moving bed membrane bioreactor with SND, observed a decrease in the nitrite oxidation rate after increasing the R value [39]. The cited authors, however, did not shorten the duration of the subphases with aeration such as in this work but extended the one during which aeration was not taking place.

As mentioned before, the reduction of the reactor's organic and nitrogen loading rates also caused an increase in AOR, although the number of AOB bacteria decreased two-fold. It is worth emphasizing that a 1.4-fold decrease in the amount of Comammox bacteria was recorded in parallel. These observations provide the basis for the conclusion that the nitrifiers capable of oxidizing ammonia, remaining in the biofilm at that time, showed much greater activity than those before the reduction of the OLR and NLR values. It is also possible that microorganisms capable of oxidizing ammonia nitrogen that were not detected with the used primers, due to their high phylogenetic diversity, appeared in MBSBBR. Shao et al. (2017) also observed an increase in the AOR after reducing the OLR. The cited authors conducted tests for biomass taken from a hybrid reactor [40]. After a two-fold reduction in OLR, they recorded a 1.51-fold increase in AOR, and after reducing it again by 1.66 times, the AOR value rose from 7.99 mgN-NH₄⁺/gVSS·h to 18.25 mgN-NH₄⁺/gVSS·h.

Lowering the concentration of DO by almost half increased the activity of microorganisms oxidizing ammonia nitrogen almost 2.4 times. In parallel, qPCR results provided the basis for recording an increase in the frequency of occurrence of AOB and Comammox bacteria, 2.3-fold and 2.7-fold, respectively. The abundance of NOB also increased (3.6-fold), although no significant changes were recorded in the NitOR value. The observations suggest that despite reducing DO, its concentration was sufficiently high for diffusion within biofilm not to be of significant importance. These conditions were also conducive to the growth of types of nitrifying microorganisms that prefer lower concentrations of DO and are more active at such concentrations. According to the literature, such organisms include the oligotropha lineages of *Nitrospira* and *Nitrosomonas* [41]. Based on the relative abundance of the most prevalent phyla in the studied samples, an increase in *Proteobacteria* and *Nitrospirota* was observed. *Proteobacteria* are widely known to include various microorganisms responsible for removing nitrogen, among them AOB and NOB [42]. On the other hand, *Nitrospirota* was recognized as a microorganism responsible for the removal of ammonia and nitrite during biological treatment under aerobic conditions [43]. At the genus level, an increase in the abundance of *Nitrospira*, *Thaurea*, *Zoogloa*, and *Paracoccus* was detected. According to Luan et al. (2022), *Nitrospira* is widely known as the dominant NOB in biofilm reactors [44]. *Paracoccus* is a genus commonly recognized as a heterotrophic AOB [45].

It is also worth looking at the results presented in S.II.2. and S.II.4. MBSBBR operated under identical technological conditions during both series. Although the effectiveness of the nitrification process during these two series was comparable, some differences were observed in the activity of individual groups of nitrifying microorganisms as well as their

abundance. There were no significant changes in the NitOR values, but the AOR in S.II.4. was almost 1.5 times higher than that before OLR and NLR reduction (S.II.2.). This suggests that the number of bacteria capable of oxidizing ammonia nitrogen in the sample from series S.II.4. will be higher than in series S.II.2., and the abundance of NOB will be at a comparable level. The qPCR results showed, however, that contrary to expectations, despite identical operating conditions of the MBSBBR in S.II.2. and S.II.4., biomass was then poorer in all the analyzed groups of nitrifiers. AOB and NOB abundance decreased more than 1.40 times, and the amount of Comammox bacteria was 2.2 times lower than in S.II.2. Changes were also evident at the phyla and genera level. The relative abundance of *Nitrospira* decreased 2.67 times. This suggests that changes in the activity and abundance of individual groups of nitrifying microorganisms could have resulted from a decrease in the OLR and NLR in series S.II.3. Although the reactor operated for a long time under the same conditions as set in S.II.2., biomass did not return to its previous characteristics.

In addition to the canonical nitrifiers that oxidize ammonia nitrogen to nitrites and nitrites to nitrates, referred to as AOB and NOB, Comammox bacteria were detected in the MBSBBR. These microorganisms are believed to be genetically adapted to carry out the full nitrification process because their genome contains a full set of genes enabling the oxidation of both ammonia and nitrite nitrogen [46]. Biofilm is considered a favorable environment for the development of these microorganisms due to the low growth rate of Comammox *Nitrospira* [47]. Comammox *Nitrospira* may even dominate nitrification in biofilm under certain conditions [48,49]. Although it has been 7 years since the discovery of these microorganisms in wastewater treatment systems, the conditions conducive to their development are still not well defined. The results of the qPCR showed that the frequency of occurrence of Comammox bacteria was mostly affected by the transition from continuous to intermittent aeration (S.I.1.–S.I.2.), as well as by reducing the DO. Next to the obvious decrease in DO concentration in MBSBBR, the introduction of IA also resulted in the biomass being periodically subjected to lower oxygen concentrations. According to Roots et al. (2019), lower DO is one of the factors considered favorable for Comammox bacteria [50]. Other studies have shown, however, a lack of significance in the relationship between DO and the occurrence of Comammox bacteria [51]. For example, in analogous research conducted for a hybrid system, a reduction in DO did not yield any discernible impact on the abundance of Comammox bacteria in the biofilm [17]. In contrast to this study, a significant decrease in this group of microorganisms occurred when continuous aeration was switched to intermittent aeration. Zhao et al. (2022), conducting research in the MBBR reactor, observed selective enrichment of Comammox bacteria while the system operated at a DO concentration above 6 mgO₂/L [15]. In contrast to the findings of Zhao et al. (2022) [15], this study determined the highest abundance of Comammox bacteria during the series, with the highest number of subphases without aeration during the aerobic phase ($R = 1/2$) and the lowest concentration of DO (3.5 mgO₂/L). The observed differences, could among others result from continuous feeding of the MBBR in the cited paper with synthetic wastewater containing only ammonia and no organic carbon. Moreover, unlike this work, they did not use IA. These discrepancies indicate the need for further research on different systems that may, in the future, clearly determine how the concentration of DO affects Comammox bacteria.

Based on this study, the intermittently aerated pure biofilm reactor (MBSBBR) may be considered a promising technological solution applicable to biological wastewater treatment. The analysis of the quality of treated wastewater showed high efficiency in the removal of pollutants, regardless of the modifications applied to the operation of the reactor.

Future research should focus on further investigating the effect of the operational conditions of MBSBBR as a long-term gradual decrease of the reactor's organic and nitrogen loading rate and DO lowering to improve the operation of full-scale MBSBBRs as much as possible. Reducing the costs associated with aeration will help reduce the energy expenditure of sewage treatment plants, which has benefits for the environment. Such

research will also be promising in terms of the analysis of microorganisms inhabiting biofilm developing on moving carriers, with a particular focus on Comammox bacteria, to better understand the environmental conditions in which these poorly characterized nitrifiers can exist.

4. Conclusions

The findings from this long-term study have provided valuable information on the use of intermittently aerated pure biofilm reactors, such as the MBSBBR, for municipal wastewater treatment. In this research, particular emphasis was placed on the nitrification process, which represents one of the primary links in the nitrogen cycle in nature. Shortly, the main conclusions are summarized in the following points:

- The analysis of the quality of treated wastewater showed high efficiency in COD ($96.07 \pm 0.74\%$), N-NH_4^+ ($93.36 \pm 2.13\%$), and TN (75.77 ± 4.57) removal across a wide range of system operating parameters, indicating its high versatility and adaptability to prevailing technological conditions.
- Despite no significant shifts in nitrification efficiency, disparities were observed in the activities and abundance of particular nitrifying microbial populations.
- The activity of bacteria capable of oxidizing ammonia nitrogen changed differently from that of bacteria capable of oxidizing nitrite in response to modifications in the MBSBBR operation, while the abundance of AOB, NOB, and Comammox bacteria shifted in the same direction.
- The oxygen concentration had a significant influence on the diversity of the bacterial community. The reduction of DO in the second stage led to a decrease in the number of taxa (based on the Chao1 index) and an increase in the homogeneity of the bacterial community (based on the Shannon index). This indicates that not all taxa present at the beginning of the experiment were able to adapt to the low DO concentration.
- The primary factor causing the reduction of the activity of ammonia oxidizers was shortening the duration of subphases with aeration during intermittent aeration. The change in the activity of the NOB was only affected by the reduction of the reactor's organic and nitrogen loading rates.
- The most significant shifts in the abundance of both AOB and NOB were noted after the change in aeration strategy from continuous to intermittent.
- The frequency of occurrence of Comammox bacteria was mostly affected by the transition from continuous to intermittent aeration, as well as by reducing the DO from $6 \text{ mgO}_2/\text{L}$ to $3.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$.
- Despite long-term stable MBSBBR operation under the same conditions in two separate series, the characteristics of microorganism communities were different.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/w16040534/s1>, Figure S1: qPCR standard curves created for amoA gene fragments of canonical AOB, 16S gene fragments of NOB, and amoA of Comammox bacteria; Figure S2: Relative abundance of the most prevalent (a) phyla and (b) genera in the studied samples. The graphs show only taxa which contributed more than 1.0% to the total bacterial community. The abundance of the remaining taxa was summed and labeled as "ETC"; Figure S3: Relative abundance of the nitrifying guilds; Table S1: Compounds of the synthetic wastewater; Table S2: Volatile suspended solids of biomass present in the MBSBBR; Table S3: Estimates of microbial diversity and richness indices in the studied series; Figure S4: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.I.1.; Figure S5: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.I.2.; Figure S6: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.I.3.; Figure S7: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.II.1.; Figure S8: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.II.2.; Figure S9: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.II.3.; Figure S10: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR—S.II.4.

Author Contributions: Conceptualization, O.Z. and M.Z.-S.; Methodology, O.Z., M.Z.-S., M.G. and S.C.; Formal analysis, O.Z. and M.G.; Investigation, O.Z. and M.G.; Writing—Original Draft Preparation, O.Z. (1.; 2.1.; 2.2.; 2.3.; 2.4.; 2.6.; 2.7.; 3.1.; 3.3.; 4) and M.G. (2.5.; 3.2.); Writing—review and editing, M.Z.-S. and S.C.; Visualization, O.Z. and M.G.; Supervision, M.Z.-S.; Project Administration, M.Z.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish National Science Center under project no. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the Supplementary Material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Ren, Y.; Hao Ngo, H.; Guo, W.; Wang, D.; Peng, L.; Ni, B.J.; Wei, W.; Liu, Y. New perspectives on microbial communities and biological nitrogen removal processes in wastewater treatment systems. *Bioresour. Technol.* **2020**, *297*, 122491. [\[CrossRef\]](#)
- Deena, S.R.; Kumar, G.; Vickram, A.S.; Singhanian, R.R.; Dong, C.D.; Rohini, K.; Anbarasu, K.; Thanigaivel, S.; Ponnusamy, V.K. Efficiency of various biofilm carriers and microbial interactions with substrate in moving bed-biofilm reactor for environmental wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **2022**, *359*, 127421.
- Leyva-Díaz, J.C.; González-Martínez, A.; Muñoz, M.M.; Poyatos, J.M. Two-step nitrification in a pure moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor for wastewater treatment: Nitrifying and denitrifying microbial populations and kinetic modeling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 10333–10343. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Khanongnuch, R.; Di Capua, F.; Lakanjemi, A.M.; Rene, E.R.; Lens, P.N.L. H₂S removal and microbial community composition in an anoxic biotrickling filter under autotrophic and mixotrophic conditions. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *367*, 397–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chaali, M.; Naghdi, M.; Brar, S.K.; Avalos-Ramirez, A. A review on the advances in nitrifying biofilm reactors and their removal rates in wastewater treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, *93*, 3113–3124. [\[CrossRef\]](#)
- Sodhi, V.; Singh, C.; Cheema, P.P.S.; Sharma, R.; Bansal, A.; Jha, M.K. Simultaneous sludge minimization, pollutant and nitrogen removal using integrated MBBR configuration for tannery wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **2021**, *341*, 125748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Safwat, S.M. Performance of moving bed biofilm reactor using effective microorganisms. *J. Clean. Prod.* **2018**, *185*, 723–731. [\[CrossRef\]](#)
- Leyva-Díaz, J.C.; Monteoliva-García, A.; Martín-Pascual, J.; Munio, M.M.; GarcíaMesa, J.J.; Poyatos, J.M. Moving bed biofilm reactor as an alternative wastewater treatment process for nutrient removal and recovery in the circular economy model. *Bioresour. Technol.* **2020**, *299*, 122631. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wang, J.; Rong, H.; Cao, Y.; Zhang, C. Factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND) in a moving bed sequencing batch reactor (MBSBR) system as revealed by microbial community structures. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1833–1846. [\[CrossRef\]](#)
- Iannaccone, F.; Di Capua, F.; Granata, F.; Gargano, R.; Esposito, G. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a continuous-flow moving bed biofilm reactor alternating microaerobic and aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* **2020**, *310*, 123453. [\[CrossRef\]](#)
- Hoang, V.; Delatolla, R.; Laflamme, E.; Gadbois, A. An investigation of moving bed biofilm reactor nitrification during long-term exposure to cold temperatures. *Water Environ. Res.* **2014**, *86*, 36–42. [\[CrossRef\]](#)
- Sabba, F.; Terada, A.; Wells, G.; Smets, B.F.; Nerenberg, R. Nitrous oxide emissions from biofilm processes for wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 9815–9829. [\[CrossRef\]](#)
- Massoompour, A.R.; Borghei, S.M.; Raie, M. Enhancement of biological nitrogen removal performance using novel carriers based on the recycling of waste materials. *Water Res.* **2020**, *170*, 115340. [\[CrossRef\]](#)
- Bassin, J.P.; Kleerebezem, R.; Rosado, A.S.; van Loosdrecht, M.C.; Dezotti, M. Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1546–1555. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao, J.; Zheng, M.; Su, Z.; Liu, T.; Li, J.; Guo, J.; Yuan, Z.; Hu, S. Selective Enrichment of *Comammox nitrospira* in a Moving Bed Biofilm Reactor with Sufficient Oxygen Supply. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *48*, 2934–2941. [\[CrossRef\]](#)
- Annavaiahala, M.K.; Kapoor, V.; Santo-Domingo, J.; Chandran, K. Comammox Functionality Identified in Diverse Engineered Biological Wastewater Treatment Systems. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2018**, *5*, 110–116. [\[CrossRef\]](#)
- Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M.; Ciesielski, S.; Godzieba, M. Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water* **2022**, *14*, 72. [\[CrossRef\]](#)
- Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M. Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2023**, *20*, 10061–10074. [\[CrossRef\]](#)

19. Pal, L.; Kraigher, B.; Brajer-Humar, B.; Levstek, M.; Mandic-Mulec, I. Total bacterial and ammonia-oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. *Bioresour. Technol.* **2012**, *110*, 135–143. [\[CrossRef\]](#)
20. Rother, E.; Cornel, P. Optimising design, operation and energy consumption of biological aerated filters (BAF) for nitrogen removal of municipal wastewater. *Water Sci. Technol.* **2004**, *50*, 131–139. [\[CrossRef\]](#)
21. PN-EN872:2007; Water Quality—Determination of Suspended Solids—Method by Filtration through Glass Fibre Filters. Polish Committee for Standardization: Warszawa, Poland, 2007.
22. Holmes, A.J.; Costello, A.; Lidstrom, M.E.; Murrell, J.C. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *Microbiol. Lett.* **1995**, *132*, 203–208. [\[CrossRef\]](#)
23. Rothauwe, J.H.; Witzel, K.P.; Liesack, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4704–4712. [\[CrossRef\]](#)
24. Dionisi, H.M.; Layton, A.C.; Harms, G.; Gregory, I.R.; Robinson, K.G.; Saylor, G.S. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 245–253. [\[CrossRef\]](#)
25. Fowler, S.J.; Palomo, A.; Dechesne, A.; Mines, P.D.; Smets, B.F. *Comammox nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 1002–1015. [\[CrossRef\]](#)
26. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e1. [\[CrossRef\]](#)
27. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [\[CrossRef\]](#)
28. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet J.* **2011**, *17*, 10–12. [\[CrossRef\]](#)
29. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461. [\[CrossRef\]](#)
30. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [\[CrossRef\]](#)
31. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd ed.; APHA: Washington, DC, USA, 2017; pp. 1–23710.
32. Podedworna, J.; Zubrowska-Sudoł, M. Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase. *Environ. Technol.* **2012**, *33*, 237–245. [\[CrossRef\]](#)
33. Phanwilai, S.; Kangwannarakul, N.; Noophan, P.; Kasahara, T.; Terada, A.; Munakata-Marr, J.; Figueroa, L.A. Nitrogen removal efficiencies and microbial communities in full-scale IFAS and MBBR municipal wastewater treatment plants at high COD: N ratio. *Front. Environ. Sci. Eng.* **2020**, *14*, 115. [\[CrossRef\]](#)
34. Feng, L.; Jia, R.; Zeng, Z.; Yang, G.; Xu, X. Simultaneous nitrification-denitrification and microbial community profile in an oxygen-limiting intermittent aeration SBBR with biodegradable carriers. *Biodegradation* **2018**, *29*, 473–486. [\[CrossRef\]](#)
35. Yoon, S.H.; Ha, S.M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1613–1617. [\[CrossRef\]](#)
36. Luan, Y.N.; Yin, Y.; Xu, Y.; Zhang, F.; Wang, X.; Zhao, F.; Xiao, Y.; Liu, C. Simultaneous nitrification and denitrification in a novel rotating self-aerated biofilm reactor for decentralized wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **2023**, *369*, 128513. [\[CrossRef\]](#)
37. Regmi, P.; Thomas, W.; Schafran, G.; Bott, C.; Rutherford, B.; Waltrip, D. Nitrogen removal assessment through nitrification rates and media biofilm accumulation in an IFAS process demonstration study. *Water Res.* **2011**, *45*, 6699–6708. [\[CrossRef\]](#)
38. Yao, Q.; Peng, D.C. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *Amb Express* **2017**, *7*, 25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Yang, S.; Yang, F. Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *195*, 318–323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Shao, Y.; Shi, Y.; Mohammed, A.; Liu, Y. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2017**, *116*, 38–47. [\[CrossRef\]](#)
41. Park, H.D.; Regan, J.M.; Noguera, D.R. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic orbital processes. *Water Sci. Technol.* **2002**, *46*, 273280. [\[CrossRef\]](#)
42. Fang, F.; Wang, S.N.; Li, K.Y.; Dong, J.Y.; Xu, R.Z.; Zhang, L.L.; Xie, W.M.; Cao, J.S. Formation of microbial products by activated sludge in the presence of a metabolic uncoupler o-chlorophenol in long-term operated sequencing batch reactors. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *384*, 121311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Yang, L.; Xu, X.; Wang, H.; Yan, J.; Zhou, X.; Ren, N.; Lee, D.J.; Chen, C. Biological treatment of refractory pollutants in industrial wastewaters under aerobic or anaerobic condition: Batch tests and associated microbial community analysis. *Bioresour. Technol. Rep.* **2022**, *17*, 100927. [\[CrossRef\]](#)
44. Luan, Y.N.; Yin, Y.; An, Y.; Zhang, F.; Wang, X.; Zhao, F.; Xiao, Y.; Liu, C. Investigation of an intermittently-aerated moving bed biofilm reactor in rural wastewater treatment under low dissolved oxygen and C/N condition. *Bioresour. Technol.* **2022**, *358*, 127405. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Bian, X.; Wu, Y.; Li, J.; Yin, M.; Li, D.; Pei, H.; Chang, S.; Guo, W. Effect of dissolved oxygen on high C/N wastewater treatment in moving bed biofilm reactors based on heterotrophic nitrification and aerobic denitrification: Nitrogen removal performance and potential mechanisms. *Bioresour. Technol.* **2022**, *365*, 128147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Daims, H.; Lebedeva, E.V.; Pjevac, P.; Han, P.; Herbold, C.; Albertsen, M.; Jehmlich, N.; Palatinszky, M.; Vierheilig, J.; Bulaev, A.; et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **2015**, *528*, 504–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sakoula, D.; Koch, H.; Frank, J.; Jetten, M.S.M.; van Kessel, M.A.H.J.; Lückner, S. Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *ISME J.* **2021**, *15*, 1010–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Huang, T.; Xia, J.; Liu, T.; Su, Z.; Guan, Y.; Guo, J.; Wang, C.; Zheng, M. Comammox *nitrospira* Bacteria Are Dominant Ammonia Oxidizers in Mainstream Nitrification Bioreactors Emended with Sponge Carriers. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56*, 12584–12591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M.; Godzieba, M.; Ciesielski, S. Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor. *J. Water Process. Eng.* **2024**, *57*, 104655. [[CrossRef](#)]
50. Roots, P.; Wang, Y.; Rosenthal, A.F.; Griffin, J.S.; Sabba, E.; Petrovich, M.; Yang, F.; Kozak, J.A.; Zhang, H.; Wells, G.F. Comammox *nitrospira* are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Res.* **2019**, *157*, 396–405. [[CrossRef](#)]
51. Cotto, I.; Dai, Z.; Huo, L.; Anderson, C.L.; Vilardi, K.J.; Ijaz, U.; Khunjar, W.; Wilson, C.; De Clippeleir, H.; Gilmore, K.; et al. Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of Comammox bacteria in nitrogen removal systems. *Water Res.* **2020**, *169*, 115268. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—A Long-Term Study

Olga Zajac ¹, Monika Zubrowska-Sudol ^{1,*}, Matyna Godzieba ² and Slawomir Ciesielski ²

¹ Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland; olga.zajac.dokt@pw.edu.pl (O.Z.); monika.sudol@pw.edu.pl (M.Z.-S)

² Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland; martyna.godzieba@uwm.edu.pl (M.G.); slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S.C.)

* Correspondence: monika.sudol@pw.edu.pl;

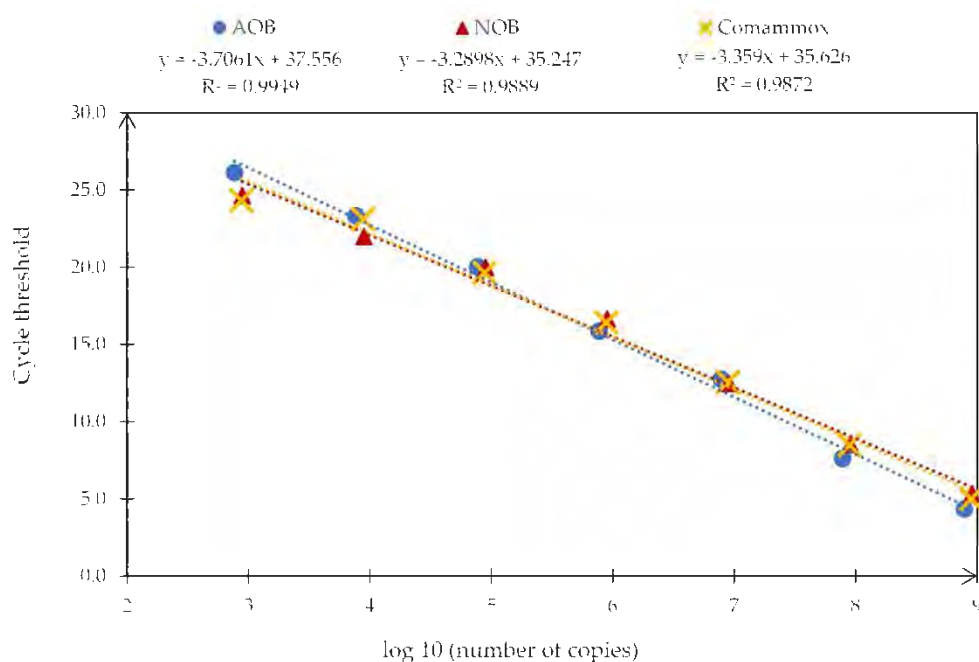
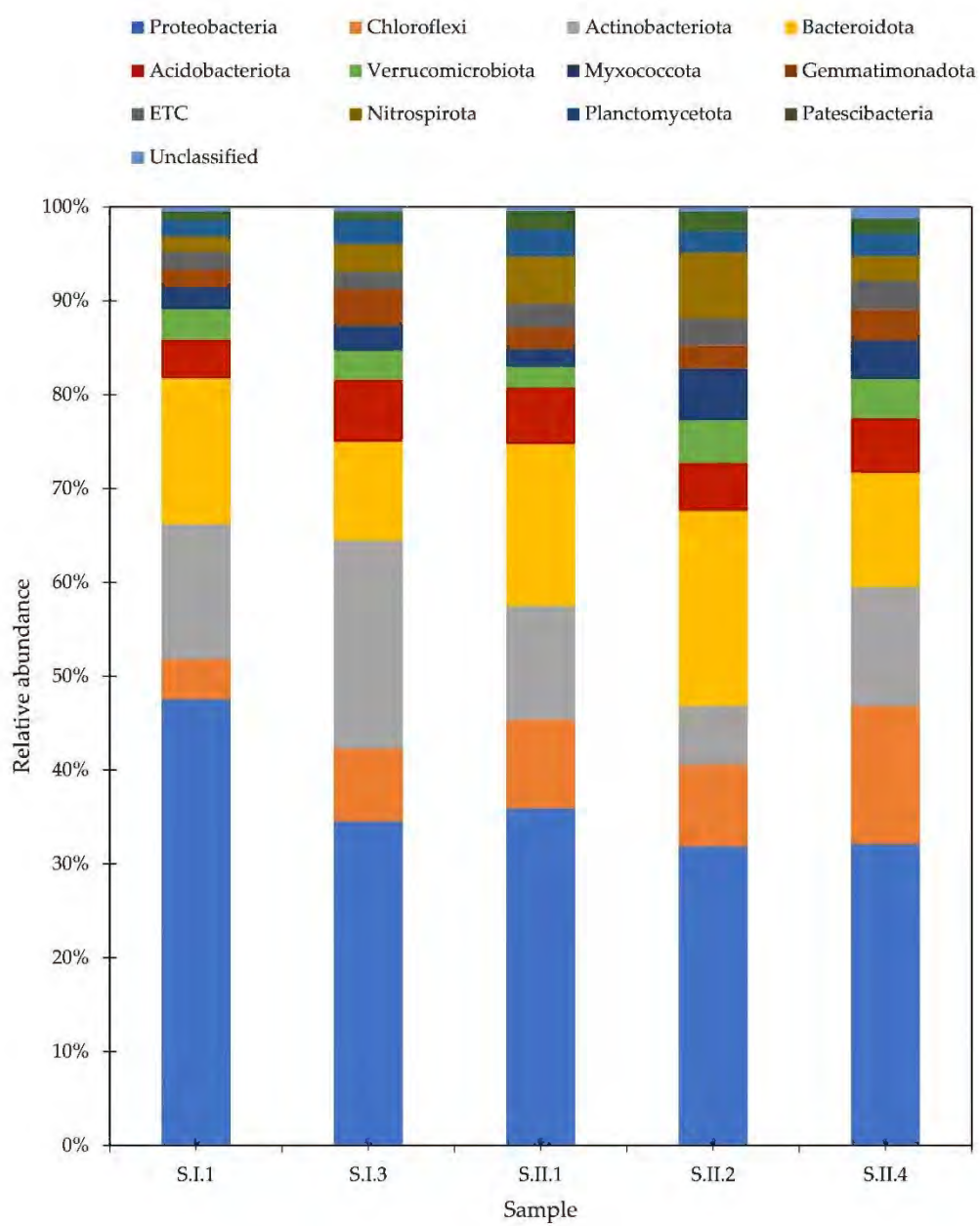


Figure S1. qPCR standard curves created for amoA gene fragment of canonical AOB, 16S gene fragment of NOB, and amoA of Comammox bacteria.

a.



b.

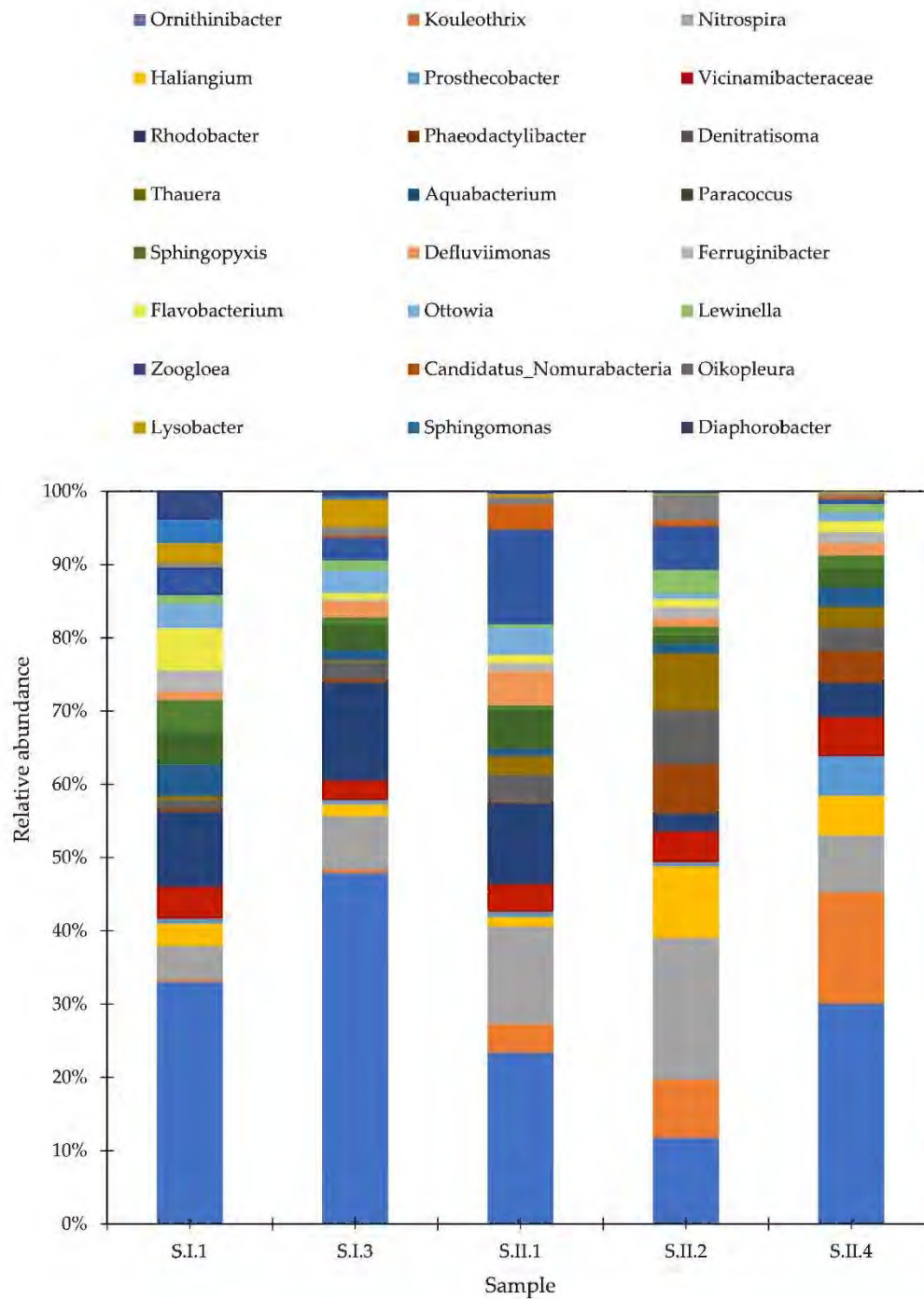


Figure S2. Relative abundance of the most prevalent (a) phyla and (b) genera in the studied samples. The graphs shows only taxa which contributed more than 1.0% to the total bacterial community. The abundance of the remaining taxa was summed and labelled as "ETC"

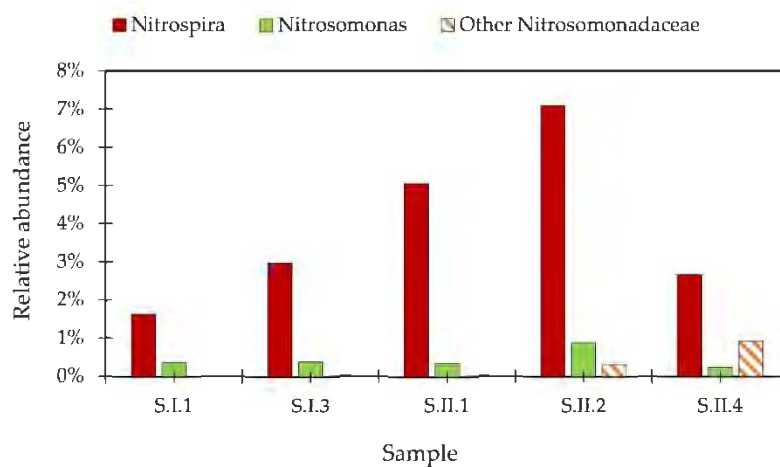


Figure S3. Relative abundance of the nitrifying guilds.

Table S1 Compounds of the synthetic wastewater

Synthetic wastewater	
Compound	Concentration
Ammonium acetate	225 mg/L
Peptone	135 mg/L
Starch	45 mg/L
Glucose	45 mg/L
Glycerine	0.049 ml/L
NaHCO ₃	125 mg/L
Na ₂ HPO ₄	15 mg/L
KH ₂ PO ₄	4.5 mg/L

Table S2 Volatile suspended solids of biomass present in the MBSBBR.

Stage	Series	Suspended biomass	Biofilm*	Suspended biomass/ Biofilm
		g MLVSS	g MLVSS	%
I	S.I.1.	0.3652±0.0216	22.3498±0.0170	1.62±0.12
	S.I.2.	0.3706±0.0329	22.4532±0.0020	1.60±0.01
	S.I.3.	0.3851±0.0469	22.3688±0.0139	1.65±0.24
II	S.II.1.	0.3431±0.0334	22.9696±0.7417	1.30±0.02
	S.II.2.	0.3507±0.0309	34.0494±0.0217	1.10±0.01
	S.II.3.	0.3013±0.0712	16.0246±0.0346	1.39±0.56
	S.II.4.	0.3372±0.0140	21.6676±0.0030	1.45±0.01

* NOTE: Because the carriers did not return to the reactor to avoid disturbance of the system operation caused by excessive loss of biomass, 5 carriers were randomly collected from MBSBBR. This amount was less than 1% of all moving carriers in the reactor. Due to further experiments planned for MBSBBR, the amount of collected carriers was selected as follows so avoid affecting the system performance.

Table S3 Estimates of microbial diversity and richness indices in the studied series.

Stage	Sample name	OTUs	CHAO	Shannon
I	S.I.1	1838	2109.56	5.10
	S.I.3	2085	2241.16	5.13
II	S.II.1	1832	2002.28	5.21
	S.II.2	1958	2138.43	5.51
	S.II.4	2056	2131.61	5.55

Supplementary material - - Results of particular Ammonia Utilisation Rate (AUR) and Nitrite Utilisation Rate (NitUR) tests

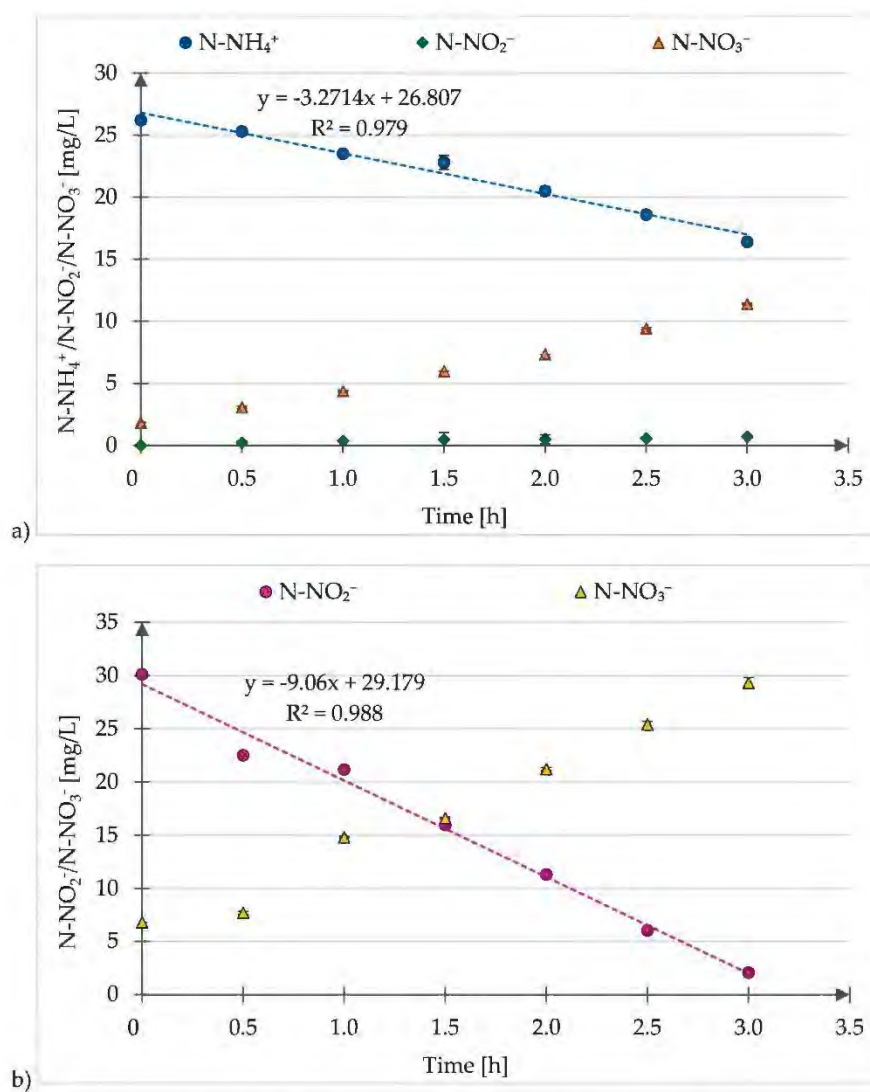


Figure S4. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.1.

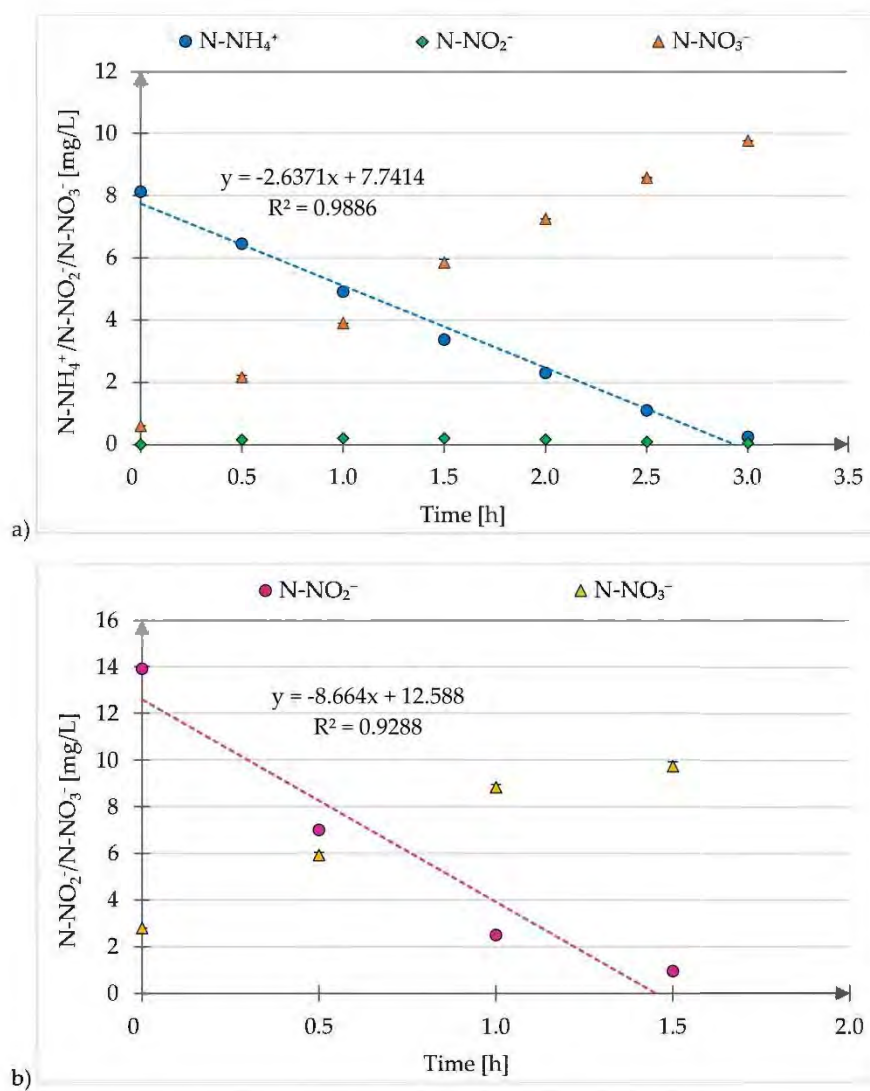


Figure S5. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR - S.I.2.

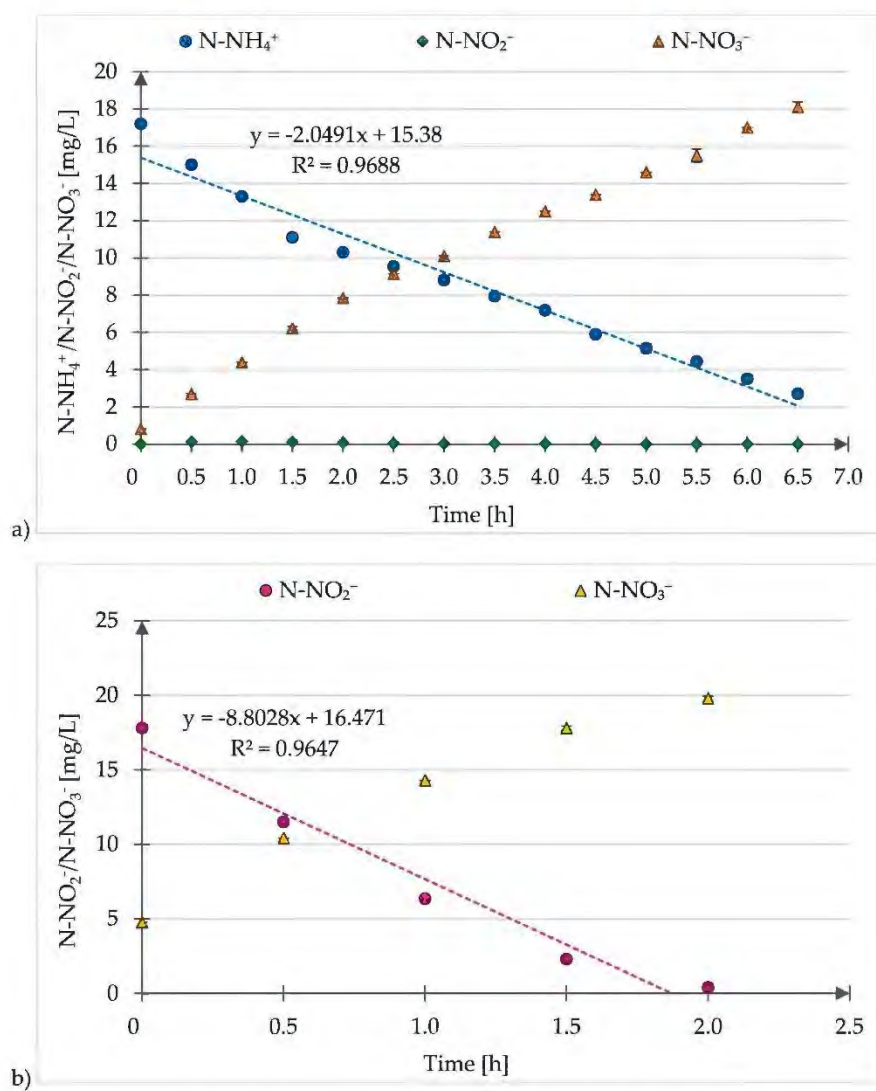


Figure S6. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.3.

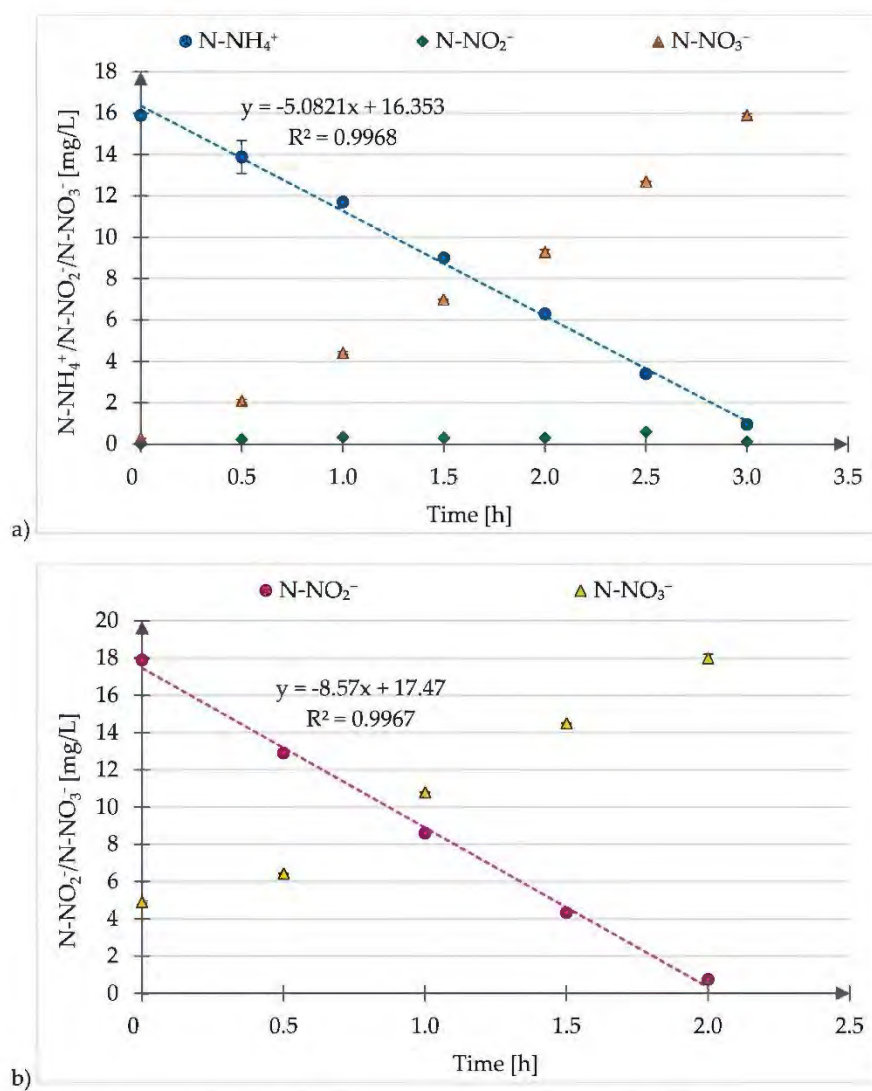


Figure S7. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.II.1.

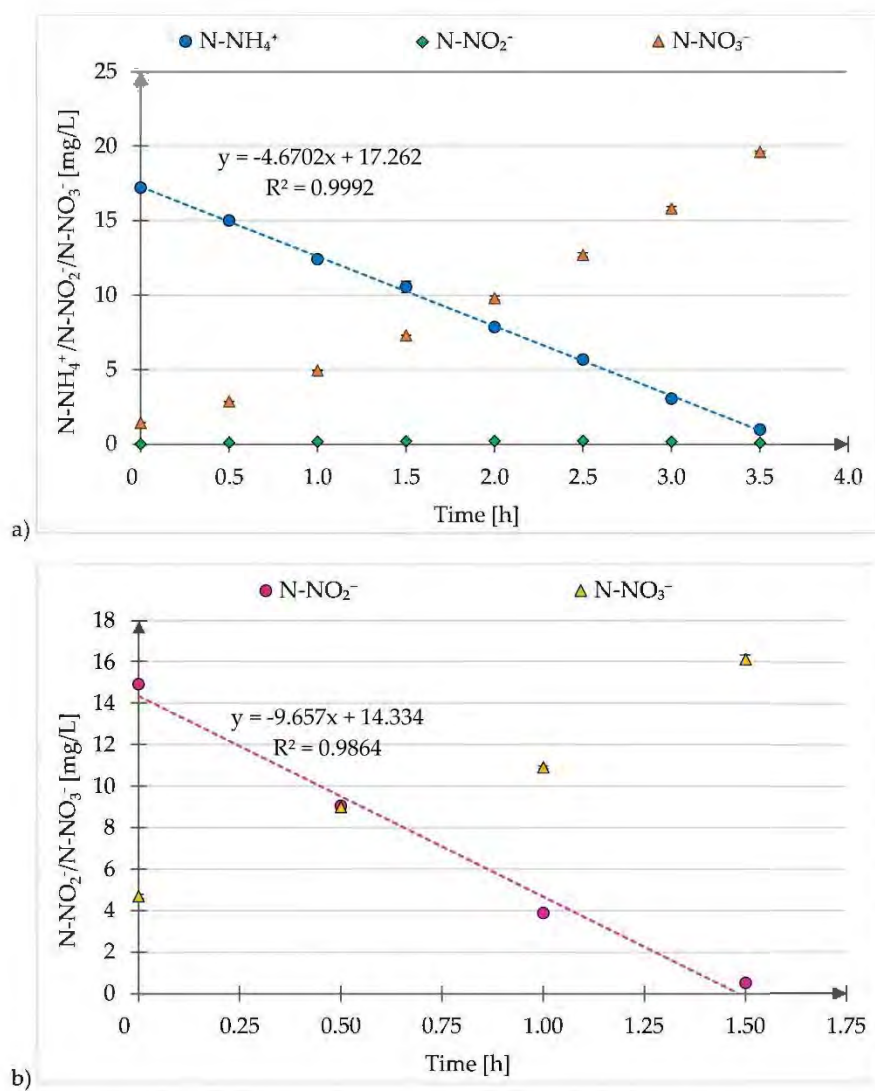


Figure S8. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.II.2.

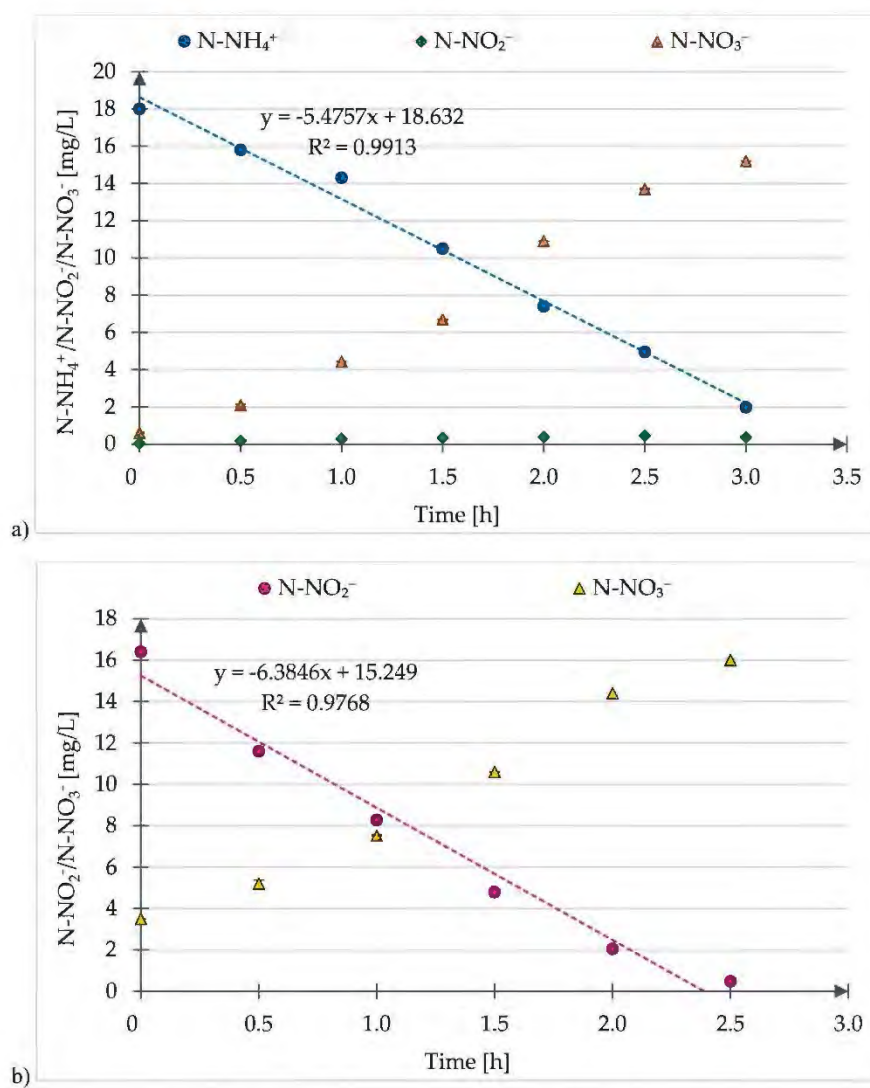


Figure S9. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR - S.II.3.

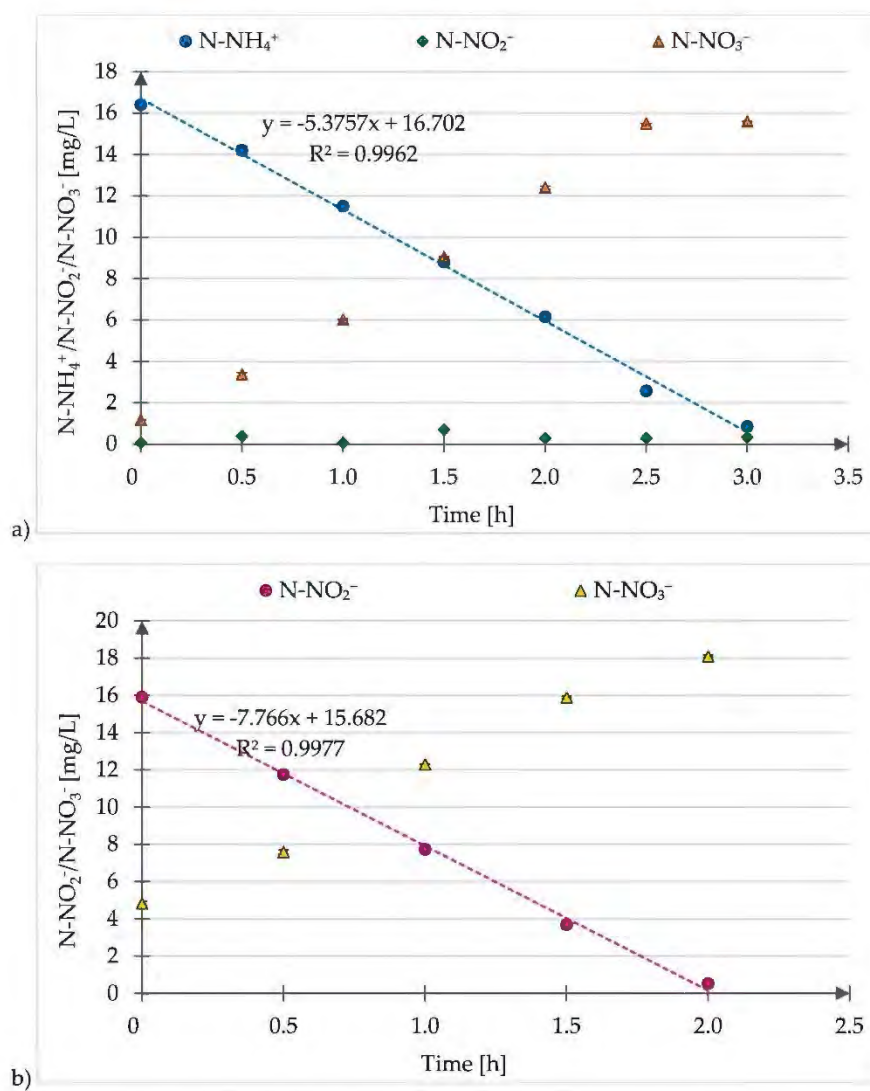


Figure S10. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.II.4.

Correction

Correction: Zajac et al. Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—A Long-Term Study. *Water* 2024, 16, 534

Olga Zajac ¹, Monika Zubrowska-Sudol ^{1,*}, Martyna Godzieba ² and Slawomir Ciesielski ²

¹ Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland; olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

² Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland; martyna.godzieba@uwm.edu.pl (M.G.); slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S.C.)

* Correspondence: monika.sudol@pw.edu.pl



Citation: Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M.; Godzieba, M.; Ciesielski, S. Correction: Zajac et al. Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—A Long-Term Study. *Water* 2024, 16, 534. *Water* 2024, 16, 2019. <https://doi.org/10.3390/w16142019>

Received: 10 July 2024

Accepted: 11 July 2024

Published: 17 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

There was an error in the original publication [1]. The inaccuracies are found in Section 3.3. Nitrification Kinetics and Nitrifier Diversity in the Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor and pertain to references to the authors' previous work.

A correction has been made to Section 3.3. Nitrification Kinetics and Nitrifier Diversity in the Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor, paragraph 2:

The analysis of the data collected from batch tests shows that changes introduced in MBSBBR operation parameters had a greater effect on the activity of ammonia-oxidizing bacteria. Previous studies also reported that the activity of ammonia oxidizers was more susceptible to changes in system operation than those capable of oxidizing nitrite [17,18]. It is worth emphasizing that in that case, the biofilm came from a hybrid reactor, where, next to this form of biomass, also activated sludge developed. This study investigated the system with pure moving bed technology. Nevertheless, a similar trend was observed. Furthermore, the batch test results showed that the activity of bacteria capable of oxidizing ammonia nitrogen changed in a different way than that of those capable of oxidizing nitrite. However, the results of qPCR showed a similar direction of change in the amount of AOB and NOB bacteria except S.II.4. For example, after changing the aeration strategy from continuous to intermittent ($R = 1/4$) (S.I.2.), the abundance of all studied bacteria increased by 6.9-fold, 8.1-fold, and 2.7-fold, for AOB, NOB, and Comammox bacteria, respectively. The opposite trend was observed in the biofilm from the aforementioned hybrid reactor, where, upon introducing intermittent aeration in the same regime, the abundance of these bacteria decreased [17].

A correction has also been made to Section 3.3. Nitrification Kinetics and Nitrifier Diversity in the Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor, paragraph 10:

In addition to the canonical nitrifiers that oxidize ammonia nitrogen to nitrites and nitrites to nitrates, referred to as AOB and NOB, Comammox bacteria were detected in the MBSBBR. These microorganisms are believed to be genetically adapted to carry out the full nitrification process because their genome contains a full set of genes enabling the oxidation of both ammonia and nitrite nitrogen [46]. Biofilm is considered a favorable environment for the development of these microorganisms due to the low growth rate of Comammox *Nitrospira* [47]. Comammox *Nitrospira* may even dominate nitrification in biofilm under certain conditions [48,49]. Although it has been 7 years since the discovery of these microorganisms in wastewater treatment systems, the conditions conducive to their development are still not well defined. The results of the qPCR showed that the frequency of occurrence of Comammox bacteria was mostly affected by the transition from

continuous to intermittent aeration (S.I.1.–S.I.2.), as well as by reducing the DO. Next to the obvious decrease in DO concentration in MBSBBR, the introduction of IA also resulted in the biomass being periodically subjected to lower oxygen concentrations. According to Roots et al. (2019), lower DO is one of the factors considered favorable for Comammox bacteria [50]. Other studies have shown, however, a lack of significance in the relationship between DO and the occurrence of Comammox bacteria [51]. For example, in analogous research conducted for a hybrid system, a reduction in DO did not yield any discernible impact on the abundance of Comammox bacteria in the biofilm [17]. In contrast to this study, a significant decrease in this group of microorganisms occurred when continuous aeration was switched to intermittent aeration. Zhao et al. (2022), conducting research in the MBBR reactor, observed selective enrichment of Comammox bacteria while the system operated at a DO concentration above 6 mgO₂/L [15]. In contrast to the findings of Zhao et al. (2022) [15], this study determined the highest abundance of Comammox bacteria during the series, with the highest number of subphases without aeration during the aerobic phase ($R = 1/2$) and the lowest concentration of DO (3.5 mgO₂/L). The observed differences, could among, others result from continuous feeding of the MBBR in the cited paper with synthetic wastewater containing only ammonia and no organic carbon. Moreover, unlike this work, they did not use IA. These discrepancies indicate the need for further research on different systems that may, in the future, clearly determine how the concentration of DO affects Comammox bacteria.

The authors state that the scientific conclusions are unaffected. This correction was approved by the Academic Editor. The original publication has also been updated.

Reference

1. Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M.; Godzieba, M.; Ciesielski, S. Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—A Long-Term Study. *Water* **2024**, *16*, 534. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW
O UDZIALE W PUBLIKACJI**

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Olga Zając oświadczam, że mój wkład merytoryczny w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60%.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor - A Long-Term Study. *Water*, 16 (4), 534, <https://doi.org/10.3390/w16040534>. IF:3,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmował szczegółowy przegląd literatury, który posłużył do identyfikacji problemu badawczego oraz opracowania koncepcji pracy. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie metodyki badań technologicznych, a także za zaplanowanie i wykonanie eksperymentów technologicznych (sprawowanie kontroli nad układem badawczym i aparaturą pomiarową, przygotowywanie ścieków, przeprowadzanie testów kinetycznych, wykonywanie analizy fizyko-chemicznej jakości ścieków surowych i oczyszczonych) oraz pobór prób biomasy do badań mikrobiologicznych. Koordynowałam całym procesem badawczym, monitorując wszystkie etapy badań. Przeprowadziłam analizę statystyczną uzyskanych wyników badań technologicznych. Odpowiadałam za interpretację i dyskusję wyników badań, w zakresie jakości ścieków, efektywności jednostkowych procesów oczyszczania, wyników testów kinetycznych AUR i NitUR oraz za analizę zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych. Przygotowałam znaczącą część manuskryptu (100% – rozdział: 1., 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.6, 2.7, 3.1, 3.3, 4.). Byłam odpowiedzialna za wizualizację danych, opracowując tabele (Tab. 1., Tab. 2.) oraz rysunki (Rys. 1., Rys. 2., Rys. 3., Rys. 5.). Dodatkowo, przygotowałam materiały uzupełniające, w tym tabele (Tab. S1., Tab. S2.) oraz rysunki (Rys. S4.–S10.).

.....20.09.2024r. Olga Zając.....

Data i podpis współautora

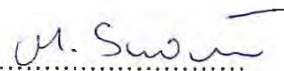
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Monika Żubrowska-Sudoł, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor - A Long-Term Study. *Water*, 16 (4), 534, <https://doi.org/10.3390/w16040534>. IF:3,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy wynikał z pełnionej funkcji promotora. Obejmował:
1) nadzór merytoryczny nad przeglądem literatury prowadzonym przez Doktorantkę, 2) korektę merytoryczną koncepcji badawczej, metodyki badań technologicznych oraz manuskryptu.
3) nadzór nad czynnościami badawczymi prowadzonymi przez Doktorantkę, 4) pozyskanie funduszy, 5) pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 20%.

20.08.2024 

Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Martyna Godzieba, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor - A Long-Term Study. *Water*, 16 (4), 534, <https://doi.org/10.3390/w16040534>. IF:3,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w opracowaniu metodyki badań mikrobiologicznych, 2) wykonanie eksperymentów mikrobiologicznych, 3) interpretację i dyskusję wyników badań mikrobiologicznych, 4) przygotowanie manuskryptu (rozdział: 2.5.; 3.2.), 5) wizualizację danych w zakresie: rysunek 4, rysunek 6, rysunek S1., rysunek S2., rysunek S3., tabela S3.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 15%.

18.08.2024 Martyna Godzieba
Data i podpis współautora

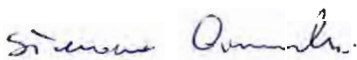
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Sławomir Ciesielski, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in Nitrification Kinetics and Diversity of Canonical Nitrifiers and Comammox Bacteria in a Moving Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor - A Long-Term Study. *Water*, 16 (4), 534, <https://doi.org/10.3390/w16040534>. IF:3,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w opracowaniu metodyki badań mikrobiologicznych, 2) współudział w korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 5%.

12.09.2024 

.....
Data i podpis współautora

Publikacja nr 2

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Ciesielski, S., Godzieba, M.

(2022)

Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm
in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification

Water, 14 (1), 72,

<https://doi.org/10.3390/w14010072>

IF: 3,40; punkty MNiSW: 100

Article

Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification

Olga Zajac ^{1,*}, Monika Zubrowska-Sudol ¹, Sławomir Ciesielski ² and Martyna Godzieba ²

¹ Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland; monika.sudol@pw.edu.pl

² Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland; slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S.C.); martyna.godzieba@uwm.edu.pl (M.G.)

* Correspondence: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

Abstract: The purpose of the study was to analyse the impact of aeration strategies defined by the changes in the duration of aerated sub-phases, the ratio between non-aerated and aerated sub-phase times (R), and dissolved oxygen concentrations (DO) on the suppression of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in activated sludge and biofilm developing in a hybrid reactor with nitrification/denitrification. The primary factor causing NOB suppression both in biofilm and in activated sludge was an increase in the R-value (from 0 to 1/4 and from 1/4 to 1/3). After reducing the DO from 3 to 2 mg O₂/L, there were no changes in the frequency of NOB occurrence, and no reduction in the nitrite oxidation rate was recorded. The abundance of Comammox bacteria was considerably affected by the change from continuous to intermittent aeration. Activated sludge showed a substantial increase in the quantity of clade A and B, whereas the quantity considerably decreased in biofilm.

Keywords: nitrite-oxidizing bacteria; Comammox; IFAS; partial nitrification; dissolved oxygen; intermittent aeration



Citation: Zajac, O.; Zubrowska-Sudol, M.; Ciesielski, S.; Godzieba, M. Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water* **2022**, *14*, 72. <https://doi.org/10.3390/w14010072>

Academic Editors: Mehrab Mehrvar and Marta Gmurek

Received: 24 November 2021

Accepted: 28 December 2021

Published: 1 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

An intriguing research problem is the possibility of inhibition of the nitrification process at its first stage, namely nitrification. In comparison to the traditional model of biological nitrogen removal in nitrification/denitrification (N/D) systems, the implementation of processes based on partial nitrification offers the possibility of saving 25% of energy costs used for aeration, reducing the demand for organic carbon for conducting the denitrification process by 40%, and reducing sludge production by 50% [1]. Suppression of nitrification at its first stage is also necessary for the application of innovative systems of nitrogen removal in wastewater treatment plants, such as Sharon, Canon, Oland, or SNAD [2,3]. The aforementioned effects permit reduction in the energy consumption in the wastewater treatment process, therefore contributing to an increase in the energy self-sufficiency of a wastewater treatment plant. They also respond to the challenges of the circular economy.

The literature offers many publications regarding suppression of nitrification at its first stage, but most of them concern deammonification systems operating based on the biofilm [4,5], granular sludge [6], or activated sludge technology [7,8], or those focusing exclusively on the nitrification process, where biomass develops in the form of activated sludge [9,10] or biofilm [11,12]. One of the methods of suppression of bacteria that oxidize nitrites to nitrates (NOB) is conducting the wastewater treatment process at a low concentration of dissolved oxygen (DO) [10,12]. It is believed that in such conditions, the activity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) is higher than that of nitrite-oxidizing bacteria (NOB). This is due to the fact that the half-saturation constant (K_o) of AOB is lower than the index

value for NOB. As a result, at lower availability of oxygen, the quantity of NOB in the biomass gradually decreases [13]. Another frequently used method of NOB suppression is a combination of a low dissolved oxygen concentration and the application of intermittent aeration in the case of which an important factor affecting the suppression of NOB are durations of aerated (t_1) and non-aerated phases (t_2), and the related ratio t_2/t_1 (R) [4,8]. For example, Ma et al. [8], conducting research in an SBR at oxygen concentration in aerobic phases at a level of 0.08–0.25 mg O₂/L and comparing different durations of aerated and non-aerated phases (30 min:30 min, R = 1; 30 min:60 min, R = 2; 15 min:90 min, R = 6; 15 min:15 min, R = 1), recorded the highest accumulation of NO₂[−] (27.3 mg N-NO₂[−]/L) at the highest value of R. According to the literature, low DO in intermittent aeration systems does not always favor NOB suppression. For DO of 0.3 ± 0.14 mg O₂/L, Bao et al. [9] observed ammonia nitrogen oxidation to nitrates, and obtained accumulation of NO₂[−] by increasing the DO level to 1.8 ± 0.32 mg O₂/L (the system operated at R = 1, and t_1 and t_2 reached 10 min).

Publications discussing NOB suppression in the mainstream systems with N/D are still scarce. Most of them concern activated sludge technology [1,14–18]. In addition, in this case, one of the reported methods of NOB suppression is conducting the treatment process at low DO concentration. According to most researchers, a decrease in oxygen concentration in the reactor has a positive effect on the suppression of NOB [1,16,17]. More than 95% accumulation of nitrites in the effluent was obtained by maintaining oxygen concentration within a range of 0.4–0.7 mg O₂/L. An increase in the value of the indicator to 2–3 mg O₂/L resulted in the domination of nitrates in the effluent [16]. Equally high accumulation of NO₂[−] (90%) was obtained when the DO level in the reactor was in a range of 0.2–0.3 mg O₂/L by Zeng et al. [1]. It was additionally evidenced that a decrease in hydraulic retention time (HRT) is a factor contributing to NOB suppression. By decreasing DO from 5.7 to 0.7 mg O₂/L, Ruiz et al. [17] only observed the accumulation of nitrites when the concentration of the analyzed indicator reached 1.4 mg O₂/L. Maximum accumulation of NO₂[−] was recorded at DO = 0.7 mg O₂/L; it was 65%. In systems with N/D, NOB suppression was also obtained by the introduction of intermittent aeration. Katsogiannis et al. [14] reported more than 95% accumulation of nitrite nitrogen, attributing it to the suppression of the activity of NOB due to the short duration of the aerated phase. In the system applied by the authors, the durations of aerated and non-aerated phases were 20 min and 60 min, respectively (R = 3), and DO was in a range of 2–6.5 mg O₂/L. Equally high accumulation of nitrites (92.25%) was recorded by Li et al. [15] using the strategy of intermittent aeration with simultaneous maintenance of a low DO (the duration of aerated and non-aerated phases was 30 min and 10 min, respectively; R = 1/3, DO was 0.2 mg O₂/L).

Little investigation has been so far performed regarding NOB suppression in the mainstream system with N/D operating in the biofilm or hybrid technology [19,20]. After a change in the aeration strategy from continuous to intermittent (2 min with aeration: 2 min without aeration; R = 1), Yang and Yang [20] recorded an increase in the accumulation of nitrites from 4.5% to 49.1%. After prolonging the non-aerated phase to 4 min (R = 2), they obtained an accumulation of NO₂[−] at a level of 79.4% (the study was conducted in a moving-bed membrane bioreactor). The observations were equated with the suppression of the activity of NOB, not with their complete washing out from the reactor. Bhatia et al. [19], conducting research regarding the effect of intermittent aeration on microbial diversity in an integrated fixed-film activated sludge reactor, evidenced that a decrease in the value of R from 0.66 to 0.2 was accompanied by a decrease in the abundance of bacteria from genus *Nitrospira*, identified as the dominating nitrite oxidizers. The authors, however, did not explain the recorded changes in the abundance of *Nitrospira* sp. in reference to the form in which biomass developed in the reactor (i.e., suspended biomass and attached biomass on fixed curtains).

This study presents results of research aimed at the determination of the effect of different aeration strategies on the suppression of NOB in a hybrid system with nitrifi-

cation/denitrification, with consideration of the form in which biomass develops in the reactor (i.e., suspended biomass and attached biomass on moving carriers). The experiment was conducted in an integrated fixed-film activated sludge moving-bed sequencing batch biofilm reactor (IFAS-MBSBBR) with N/D. To the best knowledge of the authors, it is the first attempt of explaining the suppression of NOB in this type of reactor. The experiment involved changes in the durations of aerated sub-phases, values of the R index, and values of dissolved oxygen concentration in aerated sub-phases, in search for the determination in what way the aforementioned factors affect the suppression of NOB developing in activated sludge flocs and how they affect biomass developing in the same reactor but in the form of biofilm. Solving the defined problem involved the application of two types of batch tests: (I) ammonia utilization rate test (AUR), permitting the determination of the rate of ammonia nitrogen oxidation and observation of the accumulation of nitrites; (II) nitrite utilization rate test (NitUR) permitting the determination of the rate of nitrite nitrogen oxidation. The determination of changes in the frequency of occurrence of ammonia-oxidizing bacteria (AOB), nitrite-oxidizing bacteria (NOB), and Comammox bacteria employed the quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results presented in this paper will allow broadening the knowledge on the impact of various aeration strategies on NOB suppression in the IFAS-MBSBBR systems, providing support in the design and operation of such systems on a technical scale.

2. Materials and Methods

2.1. Reactor Set-Up and Operation

2.1.1. Reactor Description

A laboratory-scale IFAS-MBSBBR with an active volume of 28 L is shown in Figure 1. Raw wastewater was dosed into the reactor using an IsmatecEcoline peristaltic pump. Its content was mixed by means of a slow-speed blade mixer R-50D. At the bottom of the reactor, an air distribution system was installed in the form of an aquarium filter. Air was introduced to the system by air pumps. The automatic control system (DreamSpark Premium software based on the SCADA system) was responsible for the maintenance of the assumed level of DO in aerobic phases of the cycle, as well as for conducting the remaining technological operations through the activation of the pump dosing raw wastewater as well as the mixer and decanting valve. The control system cooperated with the optical oxygen probe OXY-MAX COS 61Dc connected to a converter Liguline CM442. The temperature in the reactor was maintained at a level of 20 °C owing to a system of external air conditioning. As a carrier of biofilm, EvU-Perl moving bed was applied, with an active surface of 600 m²/m³.

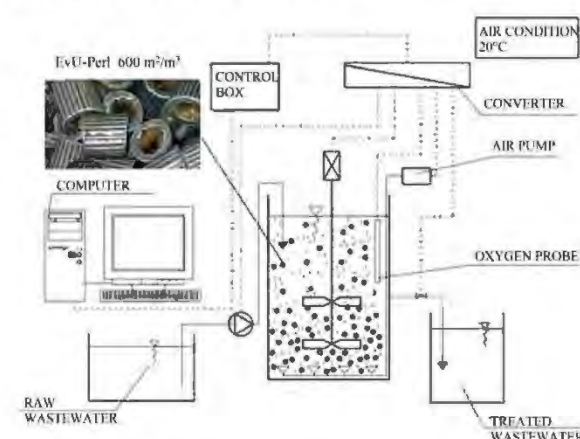


Figure 1. Schematic of reactor with accessories.

2.1.2. Synthetic Wastewater

The IFAS-MBSBBR was supplied with synthetic wastewater simulating municipal wastewater. The wastewater was prepared based on dechlorinated tap water and a mixture of: peptone 135 mg/L; starch 45 mg/L; glucose 45 mg/L; glycerine 0.0495 mL/L; ammonium acetate 225 mg/L; NaHCO_3 125 mg/L; Na_2HPO_4 15 mg/L; KH_2PO_4 4.5 mg/L. The characteristics of the influent were as follows: COD 518.76 ± 9.02 mg O_2 /L; TN 63.96 ± 0.83 mg N/L; N-NH_4^+ 39.91 ± 1.00 mg N-NH_4^+ /L; P-PO_4^{3-} 7.22 ± 0.68 mg P-PO_4^{3-} /L; alkalinity 397.2 ± 32.6 mg CaCO_3 /L; pH 7.6–7.9. A new portion of wastewater was prepared every day except for weekends and holidays, when wastewater was prepared once every two days.

2.1.3. Operation Conditions

In the experiment lasting for 100 days, four research stages were designated (I–IV), differing in the applied aeration strategy (Table 1).

Table 1. Reactor operation stages.

Stage	Duration (Days)	Description of Aeration Strategy			Day of Performance of Batch Tests and Collection of Samples for Microbiological Analyses
		Times of Aerated t_1 and Non-Aerated t_2 Sub-Phases	Ratio between Times of Non-Aerated and Aerated Sub-Phases (R)	O_2 Concentration during Aerated Sub-Phases (mg/L)	
I	0–39	Continuous	0	3	32
II	40–70	Intermittent aeration: $t_1 = 40$ min, $t_2 = 10$ min	1/4	3	67
III	71–84	Intermittent aeration: $t_1 = 40$ min, $t_2 = 10$ min	1/4	2	82
IV	85–100	Intermittent aeration: $t_1 = 30$ min, $t_2 = 10$ min	1/3	2	97

The study was launched on an operating IFAS-MBSBBR where biomass developing in the form of biofilm on moving carriers and in the form of activated sludge (1.885 g MLSS/L) provided for highly efficient nitrification (98.16%, concentration of ammonia nitrogen in treated wastewater 0.70 mg/L). The efficiency of removal of organic compounds, nitrogen, and phosphorus compounds, in that case, reached 97.17%, 80.79%, and 74.86%, respectively (COD values, TN and P concentration in treated wastewater reached 14.50 mg O_2 /L, 12.10 mg N/L, and 1.85 mg P/L). It was an important methodical assumption that common features for all research stages were as follows:

- An 8 h operation cycle composed of the following phases: 50 min anoxic/anaerobic phase I with wastewater dosage (2/3 of the total amount of wastewater dosed to the reactor in a single cycle (V_C)), 190 min aerobic phase I (with continuous or intermittent aeration), 30 min anoxic/anaerobic phase II with wastewater dosing (1/3 V_C), 150 min aerobic phase II (with continuous or intermittent aeration), 50 min sedimentation, and 10 min decantation;
- The volume (V_C) and composition of raw wastewater dosed into the reactor, and therefore organic loading rate (L): $V_C = 10$ L, the qualitative characteristics of the

wastewater are described in point 2.1.2., organic compounds load and nitrogen load on the reactor was: $L_{\text{COD}} = 555 \pm 17 \text{ g COD/m}^3 \cdot \text{d}$, $L_{\text{N}} = 68.9 \pm 1.8 \text{ g N/m}^3 \cdot \text{d}$;

- Concentration of biomass developing in the form of activated sludge: it was assumed that the value of this parameter would be maintained at the level obtained after the development of the reactor, i.e., approximately 1.8 g MLSS/L;
- The quantity of carriers in the reactor constituting 25% of the active volume of the reactor, i.e., 7 L;
- Temperature in the reactor: 20 °C.

The experiment began with the stage at which the reactor operated with continuous aeration and DO at a level of 3.0 mg O₂/L (Stage I). At subsequent stages, intermittent aeration was applied, with the introduction of changes: (I) in R values through the reduction in the duration of aerobic sub-phases (the duration of non-aerated sub-phases was constant and reached 10 min), and (II) in DO values in aerobic sub-phases. Detailed characteristics of the aeration strategies applied at subsequent research stages are presented in Table 1. Throughout the experiment, analysis of raw and treated wastewater was performed twice a week in the following scope: COD, TN, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, P-PO₄³⁻, alkalinity, pH, and determination of the concentration of activated sludge. The concentration of ammonia nitrogen in the effluent from the reactor was controlled six times a week (Monday–Saturday).

In order to trace how technological changes introduced at subsequent stages of the experiment affected the suppression of the bacteria of the II nitrification phase, batch tests AUR and NitUR were conducted, as well as microbiological analyses. It was presumed that batch tests would be performed when for at least 10 subsequent days after changing the aeration strategy, the IFAS-MBSBBR shows comparable efficiency of the nitrification process (as concluded based on the concentration of ammonia nitrogen in treated wastewater). On the day of batch tests, samples of activated sludge and biofilm were collected for microbiological analyses.

2.2. Batch Experiments Testing the Suppression of Nitrite-Oxidizing Bacteria

Batch tests were used as a tool for tracking NOB suppression in IFAS-MBSBBR: ammonia utilization rate test—AUR and nitrite utilization rate test—NitUR. In sequencing reactors in which nitrification and denitrification occur in a single reactor, it is possible not to record the shortcut nitrification process that is associated with the appearance of nitrites in the effluent. It is due to the fact that the nitrite nitrogen produced in that process can be simultaneously used by denitrification bacteria. Therefore, lack of nitrites in the effluent does not point to the fact that no nitrification occurs in the system. It also provides no possibility to answer the question of how the applied aeration strategy affects NOB suppression.

Each test was performed separately for suspended biomass and biofilm. The tests were marked as follows: AUR-SB—ammonia utilization test for suspended biomass; AUR-B—ammonia utilization test for biofilm; NitUR-SB—nitrite utilization rate test for suspended biomass; NitUR-B—nitrite utilization test for biofilm.

Each test was performed with the following assumptions:

1. Oxygen concentration at a level of 7 mg O₂/L.

The value of this parameter was assumed at a level that does not constitute a factor limiting the rate of ammonia nitrogen oxidation in the AUR test and the rate of nitrite nitrogen oxidation in the NitUR test. In the case of biofilm, one of the factors determining the course of aerobic processes is oxygen diffusion into the biofilm [21,22]. Limiting the effect of this factor in the treated medium requires the maintenance of high dissolved oxygen concentration. According to Rother and Cornel [23] and Pal et al. [24], the provision of highly efficient nitrification in pure moving-bed technology requires the maintenance of DO concentration at least at a level of 5 mg O₂/L. Oxygen diffusion does not play such an important role in the case of activated sludge flocs, although in order to maintain identical conditions in test reactors, the same oxygen concentration as for tests with biofilm was also adopted for this form of biomass.

2. Activated sludge concentration at a level of approximately 0.9 g MLSS/L (concerns tests AUR-SB and NitUR-SB), percent content of moving bed of 25% of the active volume of the test reactor, i.e., 2 L (concerns tests AUR-B and NitUR-B);
3. Initial concentration of ammonia nitrogen in the AUR test of 15 mg N-NH₄⁺/L and nitrite nitrogen in the NitUR test of 15 mg N-NO₂⁻/L;
4. Temperature at a level of 20 °C. Based on the results of AUR tests, the following was determined:
 - Ammonia nitrogen oxidation rate—AOR, mg N-NH₄⁺/gVSS·h;
 - Accumulation of nitrite nitrogen—ΔN-NO₂⁻, mg N-NO₂⁻/L;
 - Ratio between nitrite increase and ammonia loss—RNIAL, %.
 Based on the results of NitUR tests, the following was determined:
 - Nitrite nitrogen oxidation rate—NitOR, mg N-NO₂⁻/gVSS·h.

2.2.1. Ammonia Utilization Batch Test (AUR)—Test Procedure

A single AUR test was conducted in the test reactor with an active volume of 2 L. Before the tests, biomass sampled from the IFAS-MBSBBR was washed in dechlorinated tap water to remove N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, and then placed in the test reactor. The reactor was filled to 1.9 L with dechlorinated tap water previously heated to 20 °C and saturated with oxygen to 7 mg O₂/L. Then, the oxygen concentration was controlled by means of a digital meter Multi 3410 (WTW, Wroclaw, Poland). If it was lower than 7 mg O₂/L, the content of the reactor was aerated until obtaining the assumed level of the indicator. The initial alkalinity value was assumed to be 200 mg CaCO₃/L. After dosing of the appropriate amount of 5% KHCO₃ solution, the pH was adjusted to 7.6–7.8 with 10% HCl. At the next stage, 4% NH₄Cl solution was added to the reactor in quantity, providing an N-NH₄⁺ concentration of 15 mg/L. During the test, the alkalinity value was monitored on an ongoing basis. When it was found to be lower than 50 mg CaCO₃/L, KHCO₃ solution was added to ensure the indicator value in the reactor was at a level of approximately 150 mg CaCO₃/L.

Throughout the experiment, the reactor was aerated using an air pump and aquarium filter. The beaker content was mixed with a magnetic mixer. Samples with a volume of 30 mL were collected from the reactor every 30 min and immediately filtered through filters with a mesh of 0.45 μm. In the filtrate, the concentration of the following was determined: N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻. The test lasted until the moment when ammonia concentration decreased to a value approximate to 0 mg N-NH₄⁺/L or when the concentration of the indicator was maintained at a comparable level for the subsequent 60 min. In the case of the test conducted for suspended biomass, mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) concentrations were also determined. In the case of tests conducted with the application of carriers, the mass of the biofilm was determined (as volatile suspended solids).

The determination of the ammonia nitrogen oxidation rate involved the application of a straight line fragment of the function of the change in ammonia nitrogen concentration in time characterized by coefficient $R^2 \geq 0.97$. The rate was expressed in mg N-NH₄⁺ per (gVSS·h).

2.2.2. Nitrite Utilization Batch Test (NitUR)—Test Procedure

A single NitUR test was conducted analogically to the AUR test, except that a 5% solution of KNO₂ was used instead of ammonium chloride in order to ensure initial N-NO₂⁻ concentration at a level of 15 mg/L. Another difference was the analytical scope. The test determined the concentration of N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, and it was conducted until nitrite nitrogen concentration decreased to a level approximate to 0 mg/L or until the concentration of the indicator was maintained at a constant level for a subsequent 60 min.

The determination of the nitrite nitrogen oxidation rate involved the application of a straight line fragment of the function of change in concentration of nitrite nitrogen in time, characterized by coefficient $R^2 \geq 0.97$. The rate was expressed in mg N-NO₂⁻ per (gVSS·h).

2.3. Microbiological Analysis

2.3.1. DNA Extraction

Biomass samples for microbiological tests were collected from sludge and biofilm at specified intervals. Until DNA isolation, the samples were stored at -25°C . DNA was isolated from 200 ng of biomass (both sludge and biofilm) using the FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). The isolation procedure was performed according to the manufacturer's instructions. A Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to measure the amount of isolated DNA. The obtained DNA was stored at -18°C until further analysis.

2.3.2. Quantitative Polymerase Chain Reaction

AOB was detected using PCR primers corresponding to 16 S rRNA: CTO189f (5' GGAG-mAAAGyAGGGGATCG3') and CTO-654R (CTAGCyTTGTAGTTTCAAACGC) designed by Kowalchuk et al. [25]. NOB were analyzed using primers NSR1113f (5' kowaCCT-GCTTTCAGTTGCTACCG 3') and NSR1264r (5' GTTTCAGCGCTTTGTACCG 3') in accordance with Dionisi et al. [26]. For detection of Comammox *Nitrospira* clade A and B in the tested samples, two sets of primers were used: comaA-244F and coma-659 R and comaB-244F and comaB-659R [27]. These primers targeted the ammonia monooxygenase gene (amoA).

The PCR reaction was performed in an ABI 7500 real-time PCR thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), in MicroAmp™ Optical 96-well reaction plates, using Mix SYBR® A RT PCR reagents (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). Each sample was analyzed in triplicate. The obtained data were analyzed using the relative quantification method. The biomass used for the development process was used as the reference sample. Relative quantification was calculated based on the formula $RQ = 2^{-\Delta C_t}$, where ΔC_t is the difference between the C_t of the marker gene in the test sample and the same gene in the biomass at the beginning of the process [28].

2.4. Analytical Methods

Concentrations of COD, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , TN, P-PO_4^{3-} were analyzed spectrometrically by means of cuvette tests (Hach Lange GmbH) and DR 3900 spectrophotometer (Hach Lange GmbH, Berlin, Germany) according to APHA Standard Methods [29]. Mixed liquor suspended solids (MLSS), and mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) were determined using gravimetric methods in accordance with the Polish standard PN-EN 872:2007. Total volatile solids in the biofilm were also measured in accordance with the Polish standard by calculation of weight loss. The biofilm was mechanically removed from the carriers. All chemical analyses were performed in duplicates.

3. Results

3.1. Reactor Performance

Table 2 presents concentration values of pollutants in influent and effluent from the IFAS-MBSBBR and the mean efficiency of removal of organic compounds, nitrification, and denitrification determined for particular stages of the experiment.

Table 2. Influent and effluent characteristics.

Parameter			Influent	Effluent			
			I	II	III	IV	
COD	mg O ₂ /L	min	508.00	10.20	11.70	11.80	10.90
		max	535.00	16.50	18.40	18.40	18.30
		average	518.76 ± 9.02	13.58 ± 2.28	14.78 ± 2.21	15.80 ± 2.69	14.10 ± 3.11
TN	mg N/L	min	63.00	12.00	12.35	8.76	9.75
		max	65.00	15.80	14.65	14.00	12.40
		average	63.96 ± 0.83	13.25 ± 1.26	13.48 ± 0.86	11.09 ± 1.95	11.46 ± 1.23
TKN	mg N/L	min	60.91	0.95	1.78	0.28	0.70
		max	63.36	3.50	4.91	2.13	3.06
		average	62.04 ± 0.84	2.04 ± 0.76	3.09 ± 1.16	1.51 ± 0.72	1.76 ± 0.99
N-NH ₄ ⁺	mg N-NH ₄ ⁺ /L	min	38.00	0.14	0.14	0.19	0.07
		max	42.00	1.33	1.75	0.76	0.61
		average	39.91 ± 1.00	0.71 ± 0.34	0.69 ± 0.45	0.36 ± 0.19	0.28 ± 0.13
N-NO ₂ ⁻	mg N-NO ₂ ⁻ /L	min		0	0.01	0.01	0.01
		max	nd	0.56	0.23	0.07	0.20
		average		0.09 ± 0.19	0.04 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.05
N-NO ₃ ⁻	mg N-NO ₃ ⁻ /L	min	1.63	9.84	8.95	7.13	8.34
		max	2.48	12.30	12.20	12.20	10.50
		average	1.99 ± 0.25	11.12 ± 0.93	10.37 ± 1.05	9.56 ± 1.85	9.64 ± 1.20
COD removal efficiency ¹			%	97.36 ± 0.45	97.19 ± 0.42	96.96 ± 0.49	97.24 ± 0.62
Nitrification efficiency ¹			%	98.38 ± 0.85	98.19 ± 1.16	99.05 ± 0.49	99.23 ± 0.29
Denitrification efficiency ¹			%	79.21 ± 2.00	78.81 ± 1.37	82.79 ± 3.02	82.19 ± 2.06

nd—not detected, ¹—values calculated in accordance with the methodology provided in the [30].

For each of the stages, comparable efficiency of the organic compounds removal (E_{COD}) and the nitrification process (E_{N}) was recorded in the IFAS-MBSBBR. The mean value of E_{COD} and E_{N} determined based on results obtained at all stages reached $97.21\% \pm 0.47\%$ and $98.61\% \pm 0.93\%$, and COD and N-NH₄⁺ concentration in treated wastewater 14.49 ± 2.46 mg O₂/L and 0.56 ± 0.37 mg N-NH₄⁺/L, respectively.

At stages I and II of the experiment, mean values of the efficiency of the denitrification process (E_{D}) were maintained at a comparable level, and TN concentration in the effluent from the IFAS-MBSBBR reached 13.25 ± 1.26 mg N/L and 13.48 ± 0.86 mg N/L, respectively. A certain increase in the value of E_{D} was recorded for stage III when it increased from $78.81\% \pm 1.37\%$ (stage II) to $82.79\% \pm 3.02\%$. The contributing factor could have been a decrease in oxygen concentration from 3 to 2 mg O₂/L, resulting in conditions more beneficial for the course of the process of simultaneous denitrification in deeper layers of the biofilm and/or activated sludge flocs to which dissolved oxygen did not diffuse [31]. The mean value of E_{D} at the last stage of the experiment was approximate to that recorded at stage III and reached $82.30\% \pm 2.27\%$. No accumulation of nitrite nitrogen was observed in the effluent in the study, which is explained in Section 2.2, in SBR cannot be equated with the lack of NOB suppression.

3.2. Analysis of the Suppression of the Nitrite Nitrogen Oxidation Process Based on the Results of Batch Experiments

3.2.1. Ammonia Oxidation Rate for Suspended Biomass and Biofilm

Figure 2 presents ammonia nitrogen oxidation rates for activated sludge and biofilm determined in batch tests (results of particular tests are presented in Supplementary Material). Because all tests were conducted in the same conditions (described in detail in Section 2.2), it was assumed that the change in the ammonia nitrogen oxidation rate would indirectly indicate that the technological conditions of operation of the IFAS-MBSBBR caused changes in the population of microorganisms able to oxidize ammonia nitrogen.

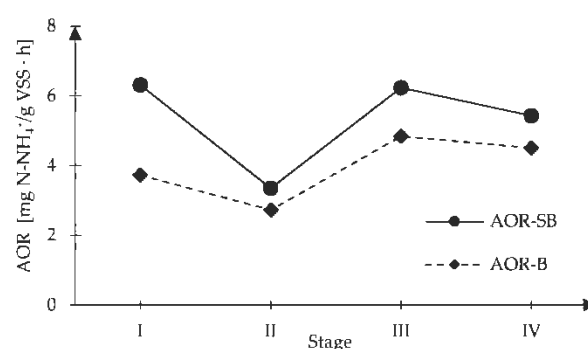


Figure 2. Ammonia oxidation rate for suspended biomass (AOR-SB) and biofilm (AOR-B).

The analysis of the presented data shows that microorganisms able to oxygenate ammonia nitrogen inhabiting both forms of biomass developing in the IFAS-MBSBBR responded to changes in the aeration strategy introduced at subsequent stages of the experiment in a similar way.

The comparison of AOR values determined for stages I and II shows that the change in aeration strategy from continuous to intermittent ($R = 1/4$), both in the case of suspended biomass and biofilm, caused a decrease in the AOR value by 47% (from 6.310 mg N-NH₄⁺/gVSS·h to 3.347 mg N-NH₄⁺/gVSS·h) and 27% (from 3.727 mg N-NH₄⁺/gVSS·h to 2.725 mg N-NH₄⁺/gVSS·h, respectively). A larger percent decrease in the AOR value in the case of suspended biomass form suggests that the microorganisms inhabiting activated sludge flocs were more sensitive to changes introduced in the aeration strategy applied in the operation of the IFAS-MBSBBR.

Results of AUR tests conducted at the end of stage III, involving a decrease in DO value in the IFAS-MBSBBR (from 3 to 2 mg O₂/L), pointed to an increase in the AOR value for both forms of biomass. The value of the analyzed indicator recorded at stage III for suspended biomass was 6.231 mg N-NH₄⁺/gVSS·h and was approximate to that determined for stages I with continuous aeration. This suggests that AOB bacteria adjusted to the specific conditions of intermittent aeration, and through the selection of particular metabolic pathways, they returned to their previous activity. The value obtained in that case for biofilm (4.842 mg N-NH₄⁺/gVSS·h) was 78% higher than that recorded at stage II and 30% higher than the value obtained at stage I.

The reduction in the duration of aerobic sub-phases to 30 min at the last of the research stages (IV) had no substantial effect on changes in AOR values observed both in the case of suspended biomass and biofilm in comparison to those recorded for the previous stage.

3.2.2. N-NO₂⁻ Accumulation Based on Ammonia Utilization Rate Test Results

AUR tests are primarily used for the assessment of the ammonia nitrogen oxidation rate, although through tracking changes in the concentration of ammonia nitrogen, nitrites, and nitrates, their results can also be used to assess NOB suppression. The experiment assumed that if NOB suppression occurs in the IFAS-MBSBBR, an increase in accumulation of nitrites ($\Delta N\text{-NO}_2^-$) and an increase in RNIAL would be recorded in AUR tests.

In the case of biomass in the form of biofilm, no accumulation of N-NO₂⁻ was recorded in any of the tests. The concentration of this indicator during the tests oscillated in a range of 0.08–0.15 mg N-NTaO₂⁻/L (Figure 3a).

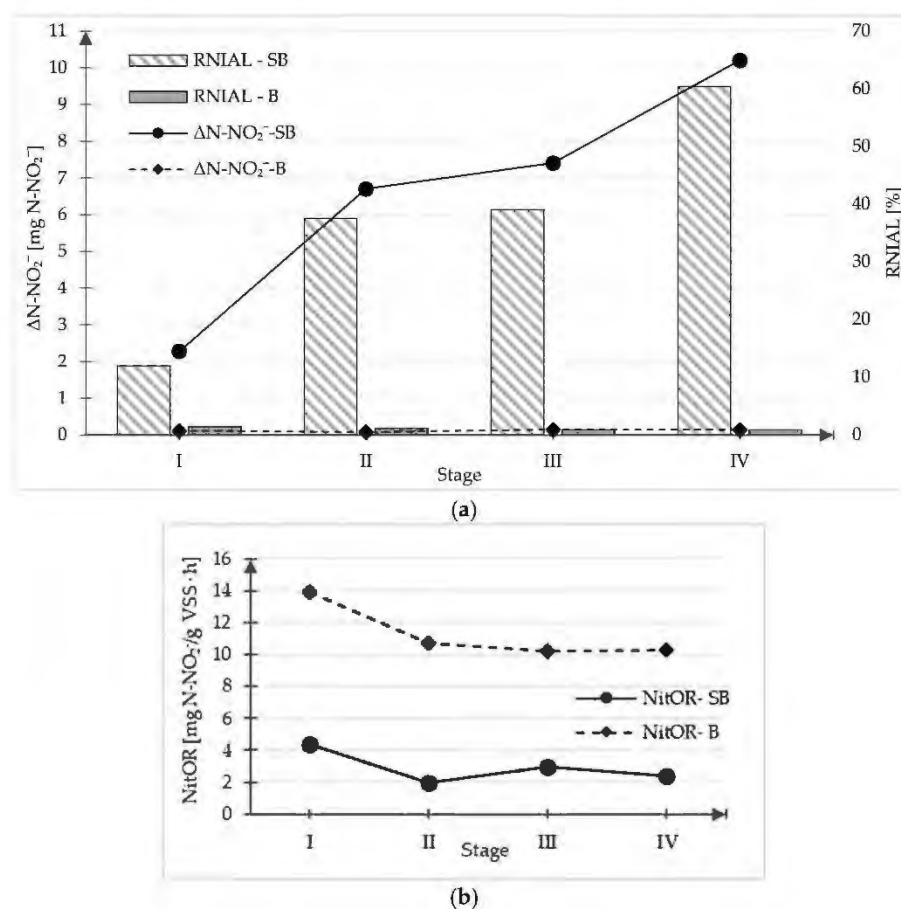


Figure 3. (a) Accumulation of nitrites ($\Delta N-NO_2^-$), RNIAL values, (b) nitrite nitrogen oxidation rate (NitOR) for suspended biomass (SB) and biofilm (B).

Accumulation of nitrites was, on the other hand, observed in tests conducted for activated sludge. After a change in the aeration strategy from continuous to intermittent with $R = 1/4$ introduced at stage II of the experiment, the recorded accumulation of nitrite nitrogen increased by 194% in comparison with the value obtained for stage I reaching $2.28\ mg\ N-NO_2^-/L$. The consequence was more than a three-fold increase in the RNIAL value from 11.9% (stage I) to 37.5% (stage II). Another change involving a decrease in oxygen concentration from 3 to $2\ mg\ O_2/L$ only resulted in an inconsiderable increase in $\Delta N-NO_2^-$ value (increase by 10% in comparison to stage II). RNIAL values for stages II and III were at a comparable level. The reduction in the duration of aeration sub-phases at the last stage of the experiment by 25% in comparison to research stage III caused, such as after the introduction of intermittent aeration at stage II, an increase in $\Delta N-NO_2^-$ value and RNIAL index. The nitrite accumulation value recorded in the AUR test conducted at the end of research stage IV was $10.20\ mg\ N-NO_2^-/L$ and was 52% and 38% higher than the values recorded for stage II ($6.70\ mg\ N-NO_2^-/L$) and III ($7.40\ mg\ N-NO_2^-/L$), respectively. RNIAL reached a level of 60.4%, constituting a value 1.5 times and 1.6 times higher than those determined for stage III (RNIAL = 39.1%) and stage II (RNIAL = 37.5%), respectively. In comparison to stage I, the value was as many as five times higher.

3.2.3. Nitrite Nitrogen Oxidation Rate Based on Nitrite Utilization Rate Test Results

According to reports presented in the literature, since 2015, oxidation of ammonia nitrogen can be carried out directly to nitrates by Comammox bacteria [32,33]. Therefore, conducting only AUR tests and tracking $\Delta\text{N-NO}_2^-$ and the RNIAL index may be insufficient to assess how the applied aeration strategy affected NOB suppression. Due to this, parallel conducting of the nitrite utilization rate test—NitUR was proposed in the study, and the nitrite nitrogen oxidation rates (NitOR) determined based on the test are presented in Figure 3b. Because each NitUR test was conducted in the same conditions, it was assumed that the occurrence of NOB suppression in the IFAS-MBSBBR would result in a decrease in NitOR values.

The analysis of NitOR values obtained at subsequent research stages for biofilm shows that their decrease occurred only after the change of aeration strategy from continuous to intermittent. The value of the analyzed indicator decreased by 23% from 13.906 mg N- NO_2^- /gVSS·h (stage I) to 10.687 mg N- NO_2^- /gVSS·h (stage II), and at the following stages, it was maintained at a comparable level (10.242 mg N- NO_2^- /gVSS·h—stage III, 10.306 mg N- NO_2^- /gVSS·h—stage IV).

In the case of activated sludge, NitOR values decreased each time after an increase in the R index. When R increased from 0 (stage I) to 1/4 (stage II), they decreased by 55%, and when R increased from 1/4 (stage III) to 1/3 (stage IV), they decreased by 19%. Decreases in the NitOR value were also expected after a decrease in oxygen concentration in the IFAS-MBSBBR. Contrary to expectations, an almost 51% increase in the value of the index was recorded (from 1.976 mg N- NO_2^- /gVSS·h for stage II to 2.977 mg N- NO_2^- /gVSS·h for stage III).

3.3. Changes in AOB, NOB, and Comammox Bacteria Abundance

Quantitative PCR analysis showed the presence of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in both forms of biomass. In the biofilm, a significant increase in AOB was observed at the first stage (fold change of approximately 5500). At the second and third stages, the AOB abundance was at a similar level, although lower than at the first stage (fold change of approximately 400). The abundance of NOB was at a similar level at the first, second, and third stages (fold change in a range of 237–386). At the fourth stage, the abundance of both AOB and NOB decreased significantly. In the activated sludge, the abundance of AOB was the highest at the first (fold change 73) and second stage (fold change 168). After that, at the third and fourth stages, their abundance significantly decreased.

Comammox bacteria were analyzed with the application of the qPCR approach by means of two PCR primer pairs specific for different *Nitrospira* Comammox lineages [27]. In the biofilm, a significant increase in bacteria belonging to both lineages was observed at the first stage (Figure 4). The fold changes for comA and comB were almost 1400 and 200, respectively. After that, at the second and third stages, both groups of Comammox bacteria decreased. At the end of the process, at the fourth stage, their abundance was even lower than at the beginning of the process. Similarly, in activated sludge, the highest abundance was determined for comA. The abundance of bacteria belonging to this group was the highest at the second stage (fold change 254), followed by the first stage (fold change 30). At the third and fourth stages, their abundance significantly decreased. The comB group showed the highest abundance at the second stage (fold change 60). At the remaining stages, the fold change was lower than 3.5.

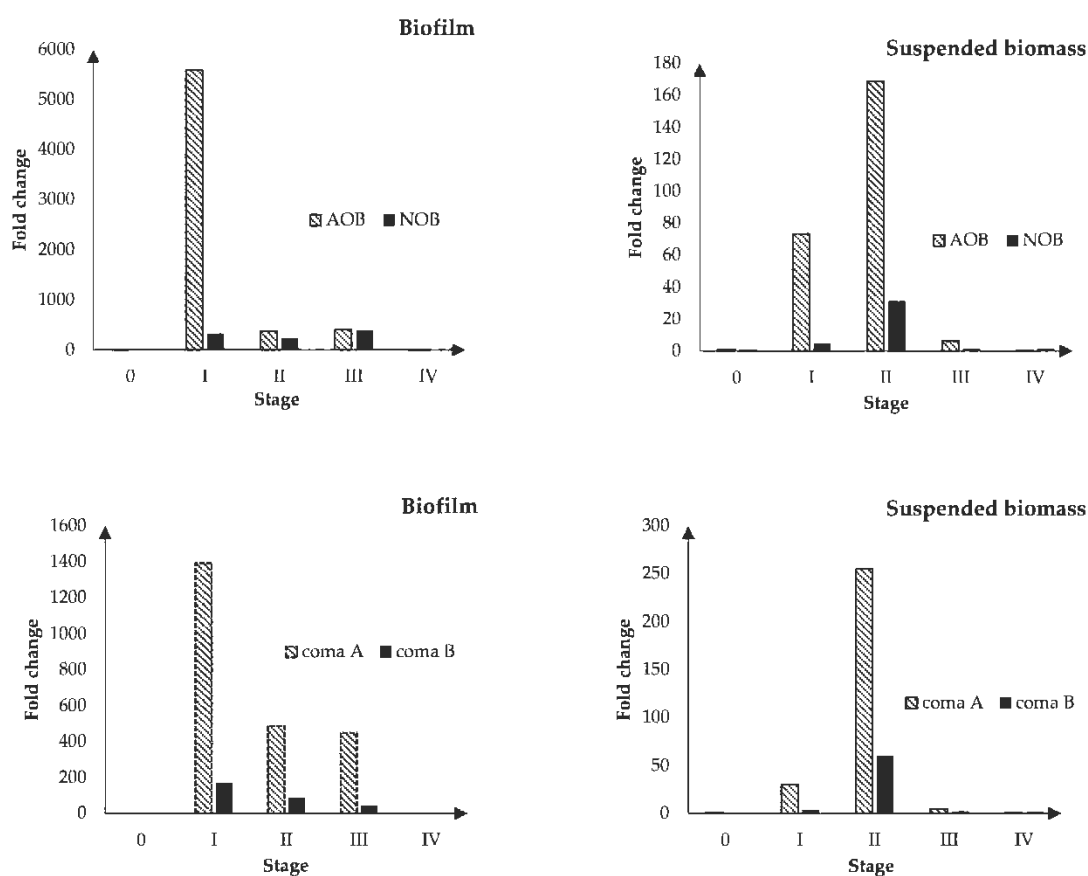


Figure 4. Relative qPCR analysis of bacterial population changes in IFAS-MBSBBR. The results show the values of fold changes for biofilm and activated sludge at four stages of the process (I–IV) in relation to biomass at the beginning of the process (0). AOB—ammonia-oxidizing bacteria, NOB—nitrite-oxidizing bacteria, coma A—lineage A of Comammox bacteria, coma B—lineage B of Comammox bacteria.

4. Discussion

The primary objective of the study was the comparison of the effect of the aeration strategy (continuous and intermittent aeration with different R and DO concentrations) on NOB suppression in activated sludge and biofilm in the IFAS-MBSBBR with nitrification/denitrification. The analysis of literature reports suggests that NOB suppression is usually identified based on the appearance of nitrites in the effluent from the biological reactor [1,16–18]. In the case of sequencing reactors where nitrification and denitrification occur in a single reactor, even in the conditions of the complete elimination of bacteria-oxidizing nitrites to nitrates or complete suppression of their activity, substantial accumulation of nitrites in the effluent from the reactor may not be recorded. Nitrite nitrogen developed in the course of shortcut nitrification can be simultaneously used by denitrification bacteria that reduce it to gas nitrogen. Therefore, for the purpose of tracking NOB suppression, parallel batch tests were conducted after each of the four research stages (differing in the aeration strategy) for both forms of biomass. NitUR and AUR tests were conducted, providing the basis for the determination of the nitrite nitrogen oxidation rate (NitOR) and volume of accumulation of nitrite nitrogen ($\Delta N\text{-NO}_2^-$), as well as the ratio between nitrite increase and ammonia loss (RNIAL). Because all tests were conducted in the same

conditions (described in detail in Section 2.2), it was assumed that a change in values of the aforementioned indicators would indirectly indicate that the aeration strategy applied at a given research stage in the IFAS-MBSBBR affected NOB suppression. Based on the results of AUR tests, ammonia nitrogen oxidation rates (AOR) were also determined. Moreover, microbiological analyses were conducted to determine the effect of the aeration strategy on the occurrence of bacteria responsible for nitrogen transformations. The research employed quantitative PCR analysis with primer pairs detecting the presence of microorganisms responsible for the oxidation of nitrites. In order to perform a complex assessment of changes occurring in activated sludge and biofilm, the abundance of AOB was also determined using primers corresponding to 16S rRNA (CTO189f and CTO-654R) and Comammox *Nitrospira* clade A and B (using primers comaA-244F and coma-659R and comaB-244F and comaB-659R).

The obtained results showed that the primary factor causing NOB suppression both in biofilm and activated sludge was an increase in the value of the R index, i.e., the transition from continuous ($R = 0$) to intermittent aeration with durations of aeration and non-aeration sub-phases of 40 min and 10 min, respectively ($R = 1/4$), and a reduction in the duration of aeration sub-phases from 40 to 30 min (change in R from $1/4$ to $1/3$). After changing continuous ($R = 0$, stage I) to intermittent aeration ($R = 1/4$, stage II), suppression of nitrite-oxidizing bacteria was observed for each form of biomass. In the case of biofilm, it was suggested by a decrease in the abundance of NOB bacteria and a lower nitrite nitrogen oxidation rate evidenced in batch tests. In activated sludge, NOB suppression was observed as a decrease in the value of NitOR-SB and an increase in the accumulation of nitrites, and therefore an increase in the value of RNIAL recorded in the batch tests (NitUR and AUR, respectively). The reduction in the duration of aeration sub-phases from 40 to 30 min (changes introduced between stage III and IV) caused a decrease in the abundance of NOB developing in the biofilm. Results of NitUR tests conducted for activated sludge showed that the nitrite nitrogen oxidation rate decreased during that time, and an AUR test showed a considerable increase in the accumulation of nitrite nitrogen and an increase in the value of RNIAL. Because microbiological analyses between stage I and II and between stage III and IV showed no decrease in the abundance of NOB bacteria in activated sludge flocs, it is highly probable that the suppression observed in the batch tests resulted from a change in the activity of microorganisms responsible for nitrites oxidation. It also cannot be excluded that microorganisms able to oxidize nitrite nitrogen that are not detected with the applied starters due to their high phylogenetic diversity occurred at the time in the IFAS-MBSBBR [34]. Yang and Yang [20], conducting research in a moving-bed membrane bioreactor with simultaneous nitrification and denitrification, also evidenced an increase in NOB suppression in biofilm and suspended biomass after a change of the aeration strategy from continuous to intermittent (2 min with aeration: 2 min without aeration; $R = 1$). These observations were equated by the authors with the suppression of NOB activity and not with their complete flushing from the reactor. The suppression was concluded based on an increase in the nitrite accumulation rate (NAR) in the effluent from the reactor, as well as a comparison of results of batch tests aimed at the assessment of the nitrification characteristics under the intermittently aerated mode and results of microbiological analyses. The effect of intermittent aeration on NOB suppression was also evidenced by Katsogiannis et al. [14] conducting research in an SBR reactor with N/D with activated sludge. The phenomenon was attributed to the suppression of the activity of bacteria-oxidizing nitrites to nitrates due to a short duration of the aeration phase—the durations of aeration and non-aeration phases were 20 min and 60 min ($R = 3$), respectively. NOB suppression was concluded based on N-NO_2^- accumulation at the end of each aeration phase during the observation of the entire operation cycle of the reactor.

Considering literature reports [1,10,12,16,17], NOB suppression was also expected after the reduction in oxygen concentration in aeration phases from 3 to 2 mg O_2/L (i.e., between stages II and III). After the introduction of such changes in the operation of the IFAS-MBSBBR, however, no changes in the frequency of occurrence of NOB occurred,

nor a reduction in the nitrites to nitrates oxidation rate. In the case of activated sludge, qPCR results provided the basis for recording a decrease in the frequency of occurrence of NOB, although it was not accompanied by a decrease in the rate of oxidation of nitrite nitrogen in the NitUR-SB test or a considerable increase in the accumulation of nitrites in the AUR-SB test. Lack of NOB suppression after a decrease in oxygen concentration was also observed by Liu and Wang [35], Bao et al. [9], and Cao et al. [7] according to the first of the aforementioned research groups, as a result of a long-term operation of the nitrification reactor at DO at a level of 0.3 and 0.16 mg O₂/L, nitrite-oxidizing bacteria become a better oxygen competitor than AOB, resulting in complete nitrification. Cao et al. [7] recorded an increase in the abundance and activity of NOB in activated sludge, accompanied by a change in the dominant genus from *Nitrobacter* to *Nitrospira*, as a result of a decrease in DO from 1.7 to 1.0 mg O₂/L. Bao et al. [9], conducting research in a nitrification reactor, for DO at a level of 0.3 ± 0.14 mg O₂/L, observed complete nitrification, and accumulation of NO₂[−] was only obtained after an increase in the DO level to 1.8 ± 0.32 mg O₂/L (the system operated at R = 1, and t₁ and t₂ reached 10 min).

During AUR tests for the separated forms of biomass coming from the same reactor, it was observed that the accumulation of nitrite nitrogen, constituting one of the indicators of NOB suppression, occurred only for activated sludge. In the case of biofilm, despite a decrease in the frequency of occurrence of NOB bacteria and/or nitrite nitrogen oxidation rate (NitUR tests), accumulation of N-NO₂[−] never occurred in AUR tests. In order to explain that phenomenon, ratios between the nitrite nitrogen oxidation rates and the ammonia nitrogen oxidation rates were determined ($\frac{NitOR}{AOR}$) for both forms of biomass. They were 0.44–0.69 for activated sludge and 2.12–3.73 for biofilm, which in the first case pointed to the much higher activity of microorganisms-oxidizing ammonia nitrogen, and in the second case, to the much higher activity of microorganisms-oxidizing nitrites. This suggests that in the case of biofilm, nitrites produced by AOB were immediately used by NOB, and therefore no N-NO₂[−] accumulation was observed in AUR tests. It is particularly supported by the consideration that in the case of biofilm, an important role in the course of biochemical processes is played by the diffusion of substrates/products within the biofilm [36].

Until recently, in the case of suppression of the nitrification process, at its first stage, emphasis was put on the suppression of bacteria able to oxidize nitrite nitrogen to nitrates with concurrent maximization of the activity of AOB bacteria. After the discovery of Comammox bacteria able to oxidize ammonia nitrogen directly to nitrates [7,32,33,37], this approach had to be verified. The bacteria compete for ammonia nitrogen with bacteria conducting nitrification, resulting in a decrease in the quantity of produced nitrites. Based on the obtained results, it was found that the frequency of occurrence of Comammox bacteria was largely determined by the change of aeration strategy from continuous to intermittent, whereas it was different for both studied forms of biomass. The biofilm showed a considerable decrease in the abundance of both clades, whereas its substantial increase occurred in activated sludge. A further decrease in the frequency of occurrence of Comammox bacteria in the biofilm was recorded with another increase in the R-value. The observations lead to the conclusion that in the studied system, a reduction in the duration of aeration sub-phases contributed to a decrease in the abundance of Comammox bacteria. It was a relatively surprising observation, considering the fact that the introduction of intermittent aeration results in prolongation of time in which biomass is subject to lower DO concentrations, and such conditions are considered favorable for the development of Comammox bacteria [37,38]. Roots et al. [37] observed that Comammox bacteria constituted the majority of ammonia-oxidizing microorganisms in the intermittently aerated SBR reactor operating at DO concentrations in aeration phases at a level of 0.2–1 mg O₂/L. Liu et al. [39], conducting research in two SBR reactors differing in the applied aeration strategy, determined a considerably higher abundance of Comammox bacteria in the reactor operating with intermittent aeration (SBR1) with DO below 0.40 mg/L (averaged 0.14 mg/L) than in that with continuous aeration (SBR2) (range 0.29–0.65 mg/L, average 0.40 mg/L).

The authors suggested that lower DO concentration in intermittently aerated SBR1 may favor the development of Comammox bacteria because, in their genomes, they had the reductive tricarboxylic acid cycle and cytochrome bd-like oxidases for microaerophilic adaptations [40,41]. Considering the cited literature reports, an increase in the frequency of occurrence of Comammox was also expected after a decrease in oxygen concentration from 3 to 2 mg O₂/L. In this study, the abundance of Comammox in the biofilm was, however, at a comparable level, and in activated sludge, a considerably lower abundance of these microorganisms was recorded. Lack of expected changes in the frequency of occurrence of Comammox bacteria in the observed system may result from the fact that despite a decrease in the DO concentration, it remained on a level sufficiently high for Comammox bacteria.

The division of Comammox into two distinct clades is caused by phylogenetic differences in the alpha subunit of ammonium monooxygenase. The ecological distribution and factors determining the niche differentiation of these two phylotypes are currently poorly understood. Between two groups of Comammox, the comaA lineage was more abundant. It is consistent with the study by Spasov et al. [42], who found no clade B in rotating biological contactors. Clade A was also dominant in 14 out of 18 samples from various environments, including the activated sludge and anaerobic sludge samples, in the study by Xia et al. [43]. It was observed, however, that this disproportion may result from limited coverage of the used primers. The authors of the primers used in this study determined the coverage of these primers at 95% for clade A and 83% for clade B [27]. Therefore, the differences in the proportions between clade A and B may be, to some extent, the result of imperfections in the available primers. Moreover, the primers used to detect Comammox bacteria are degenerate primers, which can lead to non-specific amplification and overestimation of their abundance [44].

The comparison of the occurrence of the analyzed groups of microorganisms in activated sludge and biofilm showed that the biofilm was an environment in which more nitrification organisms developed. Similar conclusions were drawn by Chao et al. [45], Li et al. [46], and Shao et al. [47]. Conducting research in hybrid reactors, due to longer SRT, the authors identified this form of biomass as an environment favorable for the development of slow-growing nitrifiers. The conducted research also evidenced the effect of the adopted aeration strategy on the frequency of occurrence of microorganisms able to oxidize ammonia nitrogen to nitrites present both in the biofilm and in activated sludge. After the transition from continuous to intermittent aeration, a considerable decrease in the abundance of AOB was determined in the biofilm developed on moving beds. Nonetheless, no related negative effect on the efficiency of the nitrification process was recorded in the IFAS-MBSBBR. At each of the stages, the efficiency of ammonia nitrogen removal was higher than 98%, and the concentration of the indicator in treated wastewater was lower than 1 mg N-NH₄⁺/L. The observations suggest that despite changes in the abundance of AOB, their quantity was sufficient to obtain high efficiency of removal of the load of ammonia nitrogen supplied to the IFAS-MBSBBR.

5. Conclusions

- The primary factor causing NOB suppression in the biomass developing in the IFAS-MBSBBR, both in biofilm and activated sludge, was an increase in the ratio between non-aerated and aerated sub-phase times;
- The accumulation of nitrite nitrogen, constituting one of the indicators of NOB suppression, was only recorded in AUR tests performed for activated sludge;
- The abundance of Comammox bacteria was largely determined by a change in the aeration strategy from continuous to intermittent, whereas it was different for both analyzed forms of biomass. Activated sludge showed a considerable increase in the quantity clade A and B, whereas, in biofilm, the quantity substantially decreased;
- Biofilm was the environment in which more nitrification organisms developed;
- The AUR and NitUR batch test performed in parallel can be an indirect tool to track the suppression of nitrite-oxidizing microorganisms in wastewater treatment systems.

Indicators determined on their basis, i.e., $\Delta\text{N-NO}_2^-$, RNIAL, nitrite nitrogen oxidation rate and ratios between the nitrite nitrogen oxidation rates and the ammonia nitrogen oxidation rates, can be used to assess the impact of the studied factors on the suppression of NOB occurring in the analyzed wastewater treatment system.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/w14010072/s1>, Figure S1: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage I; Figure S2: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage I; Figure S3: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage II; Figure S4: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage II; Figure S5: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage III; Figure S6: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage III; Figure S7: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage IV; Figure S8: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage IV.

Author Contributions: Conceptualization, O.Z. and M.Z.-S.; Formal analysis, O.Z. and M.G.; Investigation, O.Z. and M.G.; Methodology, O.Z., M.Z.-S., and S.C.; Project administration, M.Z.-S.; Supervision, M.Z.-S.; Visualization, O.Z.; Writing—original draft, O.Z. (Sections 1, 2.1, 2.2, 2.4, 3.1, 3.2, 4 and 5) and M.G. (2.3; 3.3); Writing—review and editing, M.Z.-S., S.C., and M.G. All authors will be informed about each step of manuscript processing including submission, revision, revision reminder, etc. via emails from our system or assigned assistant editor. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish National Science Center under project no. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Zeng, W.; Wang, X.; Li, B.; Bai, X.; Peng, Y. Nitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite pathway from domestic wastewater in a continuous MUCT process. *Bioresour. Technol.* **2013**, *143*, 187–195. [CrossRef]
2. Ali, M.; Okabe, S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. *Chemosphere* **2015**, *141*, 144–153. [CrossRef]
3. Bagchi, S.; Biswas, R.; Nandy, T. Autotrophic ammonia removal processes: Ecology to technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2012**, *42*, 1353–1418. [CrossRef]
4. Zubrowska-Sudol, M.; Yang, J.; Trela, J.; Plaza, E. Evaluation of deammonification process performance at different aeration strategies. *Water Sci. Technol.* **2011**, *63*, 1168–1176. [CrossRef] [PubMed]
5. Persson, F.; Sultana, R.; Suarez, M.; Herinansson, M.; Plaza, E.; Wilén, B.M. Structure and composition of biofilm communities in a moving bed biofilm reactor for nitrification-anammox at low temperatures. *Bioresour. Technol.* **2014**, *154*, 267–273. [CrossRef] [PubMed]
6. Wang, X.; Gao, D. In-situ restoration of one-stage partial nitrification-anammox process deteriorated by nitrate build-up via elevated substrate levels. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37500. [CrossRef]
7. Cao, Y.; Kwok, B.H.; van Loosdrecht, M.C.M.; Daigger, G.; Png, H.Y.; Long, W.Y.; Eng, O.K. The influence of dissolved oxygen on partial nitrification/ anammox performance and microbial community of the 200,000 m³/d activated sludge process at the Changi water reclamation plant (2011 to 2016). *Water Sci. Technol.* **2018**, *78*, 634–643. [CrossRef]
8. Ma, B.; Bao, P.; Wei, Y.; Zhu, G.; Yuan, Z.; Peng, Y. Suppressing nitrite-oxidizing bacteria growth to achieve nitrogen removal from domestic wastewater via anammox using intermittent aeration with low dissolved oxygen. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13048. [CrossRef]
9. Bao, P.; Wang, S.; Ma, B.; Zhang, Q.; Peng, Y. Achieving partial nitrification by inhibiting the activity of Nitrospira-like bacteria under high-DO conditions in an intermittent aeration reactor. *J. Environ. Sci. (China)* **2017**, *56*, 71–78. [CrossRef]
10. Blackburne, R.; Yuan, Z.; Keller, J. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation* **2008**, *19*, 303–312. [CrossRef] [PubMed]

11. Bougard, D.; Bernet, N.; Chêneby, D.; Delgenès, J.P. Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: Effect of temperature on nitrite accumulation. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 106–113. [\[CrossRef\]](#)
12. Park, S.; Chung, J.; Rittmann, B.E.; Bae, W. Nitrite Accumulation from Simultaneous Free-Ammonia and Free-Nitrous-Acid Inhibition and Oxygen Limitation in a Continuous-Flow Biofilm Reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 43–52. [\[CrossRef\]](#)
13. Manser, R.; Gujer, W.; Siegrist, H. Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. *Water Res.* **2005**, *39*, 4633–4642. [\[CrossRef\]](#)
14. Katsogiannis, A.N.; Kornaros, M.; Lyberatos, G. Enhanced nitrogen removal in SBRs bypassing nitrate generation accomplished by multiple aerobic/anoxic phase pairs. *Water Sci. Technol.* **2003**, *47*, 53–59. [\[CrossRef\]](#)
15. Li, J.; Elliott, D.; Nielsen, M.; Healy, M.G.; Zhan, X. Long-term partial nitrification in an intermittently aerated sequencing batch reactor (SBR) treating ammonium-rich wastewater under controlled oxygen-limited conditions. *Biochem. Eng. J.* **2011**, *55*, 215–222. [\[CrossRef\]](#)
16. Ma, Y.; Peng, Y.; Wang, S.; Yuan, Z.; Wang, X. Achieving nitrogen removal via nitrite in a pilot-scale continuous pre-denitrification plant. *Water Res.* **2009**, *43*, 563–572. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Ruiz, G.; Jeison, D.; Rubilar, O.; Ciudad, G.; Chamy, R. Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 330–335. [\[CrossRef\]](#)
18. Ge, S.; Peng, Y.; Qiu, S.; Zhu, A.; Ren, N. Complete nitrogen removal from municipal wastewater via partial nitrification by appropriately alternating anoxic/aerobic conditions in a continuous plug-flow step feed process. *Water Res.* **2014**, *55*, 95–105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Bhatia, A.; Singh, N.K.; Bhandu, T.; Pathania, R.; Kazmi, A.A. Effect of intermittent aeration on microbial diversity in an intermittently aerated IFAS reactor treating municipal wastewater: A field study. *J. Environ. Sci. Health A-Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2017**, *52*, 440–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Yang, S.; Yang, F. Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *195*, 318–323. [\[CrossRef\]](#)
21. Ødegaard, H.; Rusten, B.; Westrum, T. A new moving bed biofilm reactor-applications and results. *Water Sci. Technol.* **1994**, *29*, 157–165. [\[CrossRef\]](#)
22. Hem, L.; Rusten, B.; Ødegaard, H. Nitrification in a moving bed biofilm reactor. *Water Res.* **1994**, *28*, 1425–1433. [\[CrossRef\]](#)
23. Rother, E.; Cornel, P. Optimising design, operation and energy consumption of biological aerated filters (BAF) for nitrogen removal of municipal wastewater. *Water Sci. Technol.* **2004**, *50*, 131–139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Pal, L.; Kraigher, B.; Brajer-Humar, B.; Levstek, M.; Mandic-Mulec, I. Total bacterial and ammonia-oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. *Bioresour. Technol.* **2012**, *110*, 135–143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Kowalchuck, G.A.; Stephen, J.R.; De Boer, W.; Prosser, J.I.; Embley, T.M.; Woldendorp, J.M. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 1489–1497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Dionisi, H.M.; Layton, A.C.; Harms, G.; Gregory, I.R.; Robinson, K.G.; Sayler, G.S. Quantification of Nitrosomonas oligotropha-like ammonia-oxidizing bacteria and Nitrospira spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 245–253. [\[CrossRef\]](#)
27. Pjevac, P.; Schaubberger, C.; Poghosyan, L.; Herbold, C.W.; van Kessel, M.A.H.J.; Daebeler, A.; Steinberger, M.; Jetten, M.S.M.; Lückner, S.; Wagner, M.; et al. AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox Nitrospira in the environment. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1508. [\[CrossRef\]](#)
28. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed.; American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation: Washington, DC, USA, 2005; pp. 1–1368.
30. Podedworna, J.; Zubrowska-Sudoł, M. Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase. *Environ. Technol.* **2021**, *33*, 237–245. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Wang, J.; Rong, H.; Zhang, C. Evaluation of the impact of dissolved oxygen concentration on biofilm microbial community in sequencing batch biofilm reactor. *J. Biosci. Bioeng.* **2018**, *125*, 532–542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. van Kessel, M.A.H.J.; Speth, D.R.; Albertsen, M.; Nielsen, P.H.; Op Den Camp, H.J.M.; Kartal, B.; Jetten, M.S.M.; Lückner, S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* **2015**, *528*, 555–559. [\[CrossRef\]](#)
33. Daims, H.; Lebedeva, E.V.; Pjevac, P.; Han, P.; Herbold, C.; Albertsen, M.; Jehmlich, N.; Palatinszky, M.; Vierheilig, J.; Bulaev, A.; et al. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature* **2015**, *528*, 504–509. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Diwan, V. Composition and Abundance of Nitrifiers in Engineered Systems: Molecular and Community Ecology Approaches. Ph.D Thesis, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark, 2019.
35. Liu, G.; Wang, J. Long-term low DO enriches and shifts nitrifier community in activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 5109–5117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Pérez, J.; Picioreanu, C.; van Loosdrecht, M. Modeling biofilm and floc diffusion processes based on analytical solution of reaction-diffusion equations. *Water Res.* **2005**, *39*, 1311–1323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

37. Roots, P.; Wang, Y.; Rosenthal, A.F.; Griffin, J.S.; Sabba, F.; Petrovich, M.; Yang, F.; Kozak, J.A.; Zhang, H.; Wells, G.F. Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Res.* **2019**, *157*, 396–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Camejo, P.Y.; Santo Domingo, J.; McMahon, K.D.; Noguera, D.R. Genome-Enabled Insights into the Ecophysiology of the Comammox Bacterium “Candidatus Nitrospira nitrosa”. *mSystems* **2017**, *2*, e00059-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Liu, T.; Liu, S.; He, S.; Tian, Z.; Zheng, M. Minimization of N₂O emission through intermittent aeration in a sequencing batch reactor (SBR): Main behavior and mechanism. *Water* **2021**, *13*, 210. [[CrossRef](#)]
40. Lawson, C.E.; Lückner, S. Complete ammonia oxidation: An important control on nitrification in engineered ecosystems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *50*, 158–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Palomo, A.; Pedersen, A.G.; Fowler, S.J.; Dechesne, A.; Sicheritz-Pontén, T.; Smets, B.F. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox Nitrospira. *ISME J.* **2018**, *12*, 1779–1793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Spasov, E.; Tsuji, J.M.; Hug, L.A.; Doxey, A.C.; Sauder, L.A.; Parker, W.J.; Neufeld, J.D. High functional diversity among Nitrospira populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant. *ISME J.* **2020**, *14*, 1857–1872. [[CrossRef](#)]
43. Xia, F.; Wang, J.G.; Zhu, T.; Zou, B.; Rhee, S.K.; Quan, Z.X. Ubiquity and diversity of complete ammonia oxidizers (comammox). *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Harringer, M.; Alfrieder, A. Primer evaluation and development of a droplet digital PCR protocol targeting amoA genes for the quantification of Comammox in lakes. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chao, Y.; Mao, Y.; Yu, K.; Zhang, T. Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomic approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 8225–8237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Li, B.; Qiu, Y.; Zhang, C.; Chen, L.; Shi, H. Understanding biofilm diffusion profiles and microbial activities to optimize integrated fixed-film activated sludge process. *Chem. Eng. J.* **2016**, *302*, 269–277. [[CrossRef](#)]
47. Shao, Y.; Shi, Y.; Mohammed, A.; Liu, Y. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2017**, *116*, 38–47. [[CrossRef](#)]

Effect of the aeration strategy on NOB suppression in activated sludge and biofilm in a hybrid reactor with nitrification/denitrification

Olga Zajac ^{1,*}, Monika Zubrowska-Sudol ¹, Slawomir Ciesielski ² and Martyna Godzieba ^{2,*}

Supplementary material - Results of particular AUR and NitUR tests

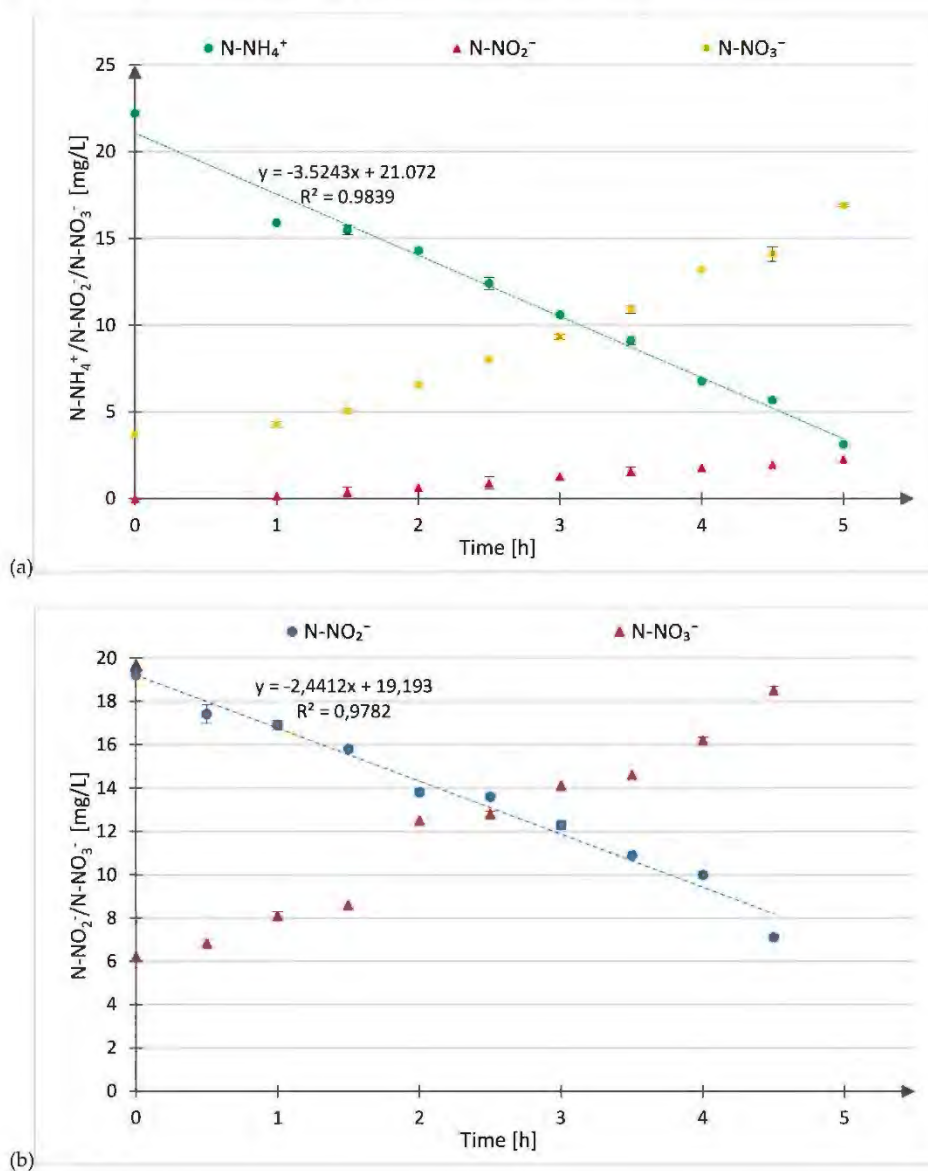


Figure S1 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage I

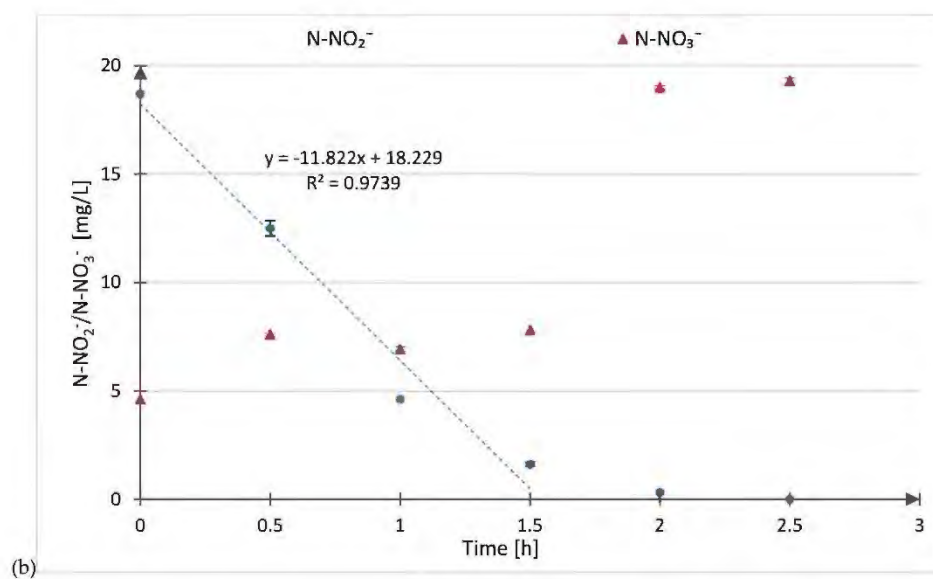
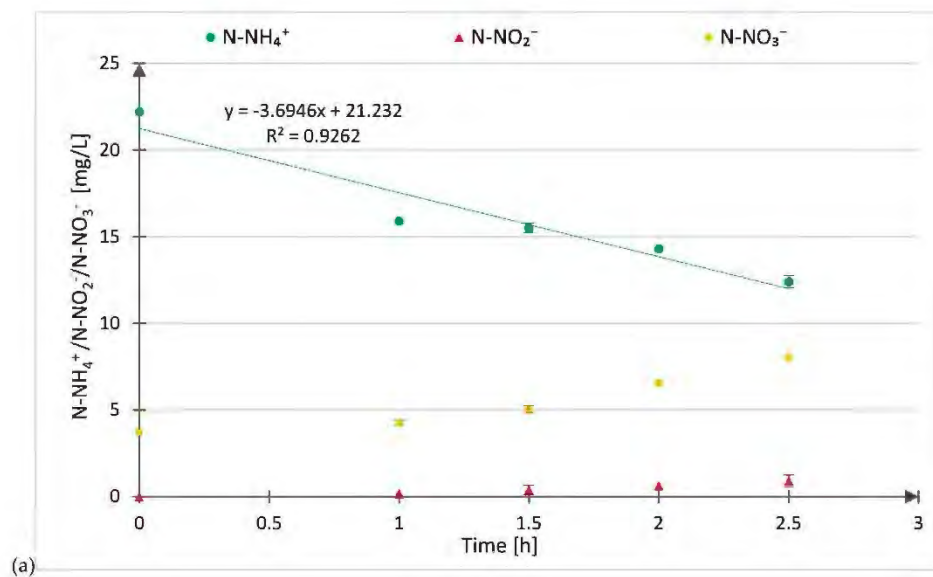


Figure S2 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage I

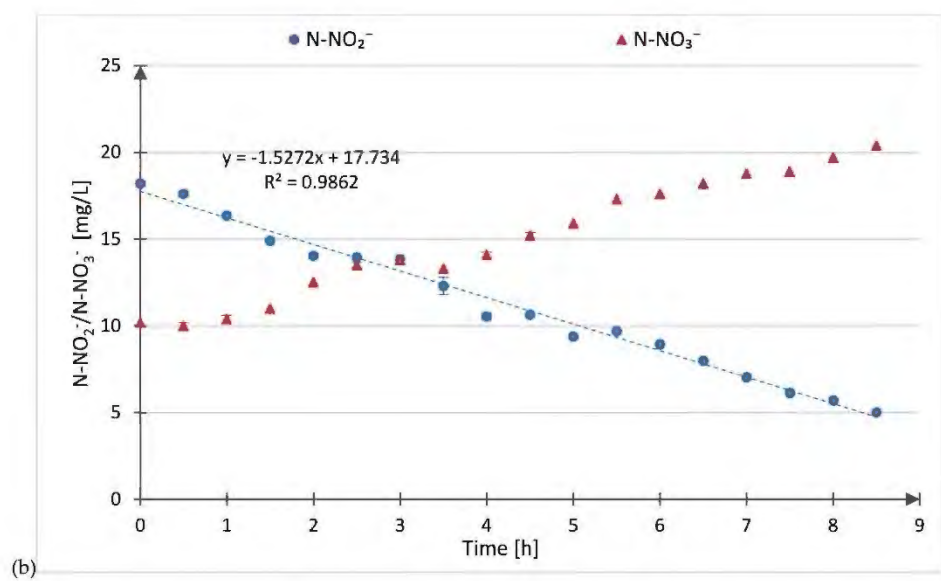
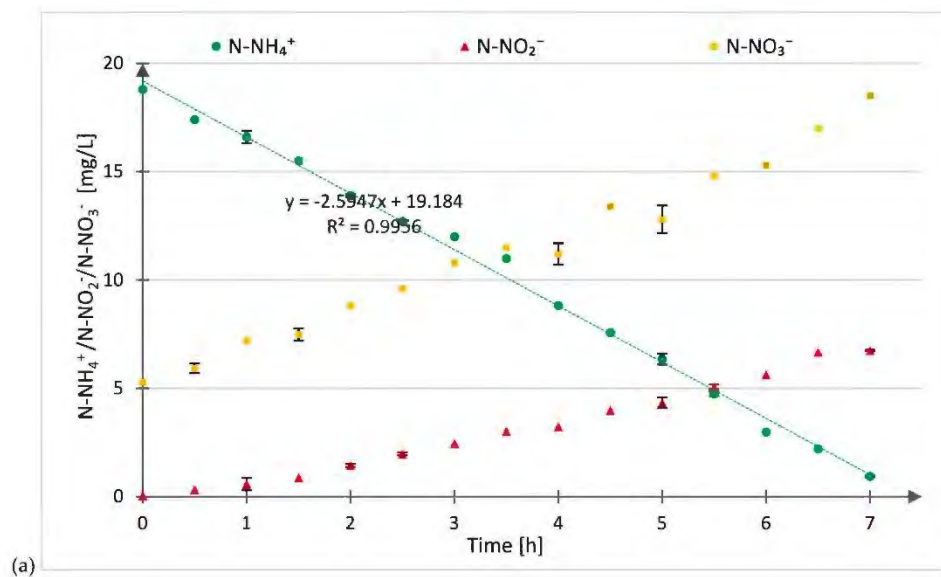


Figure S3 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage II

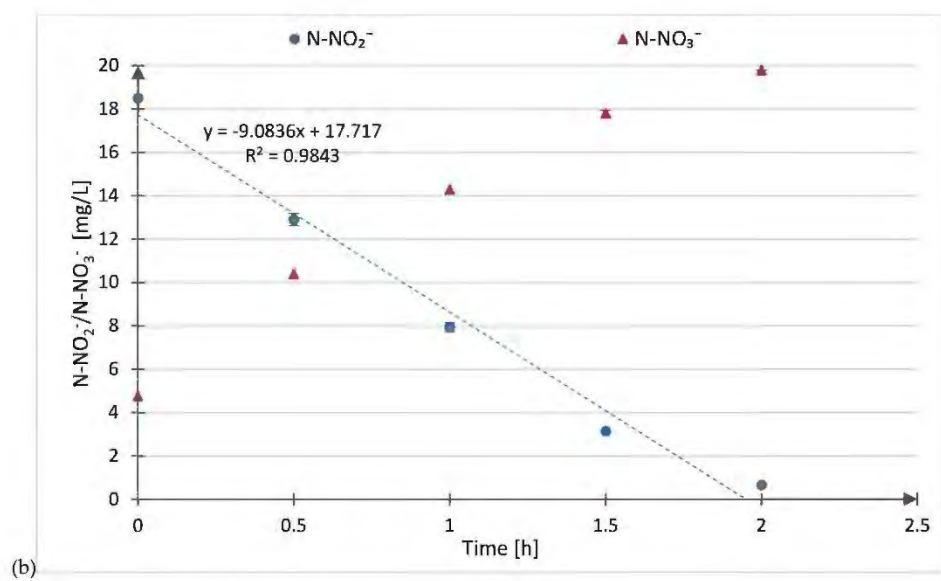
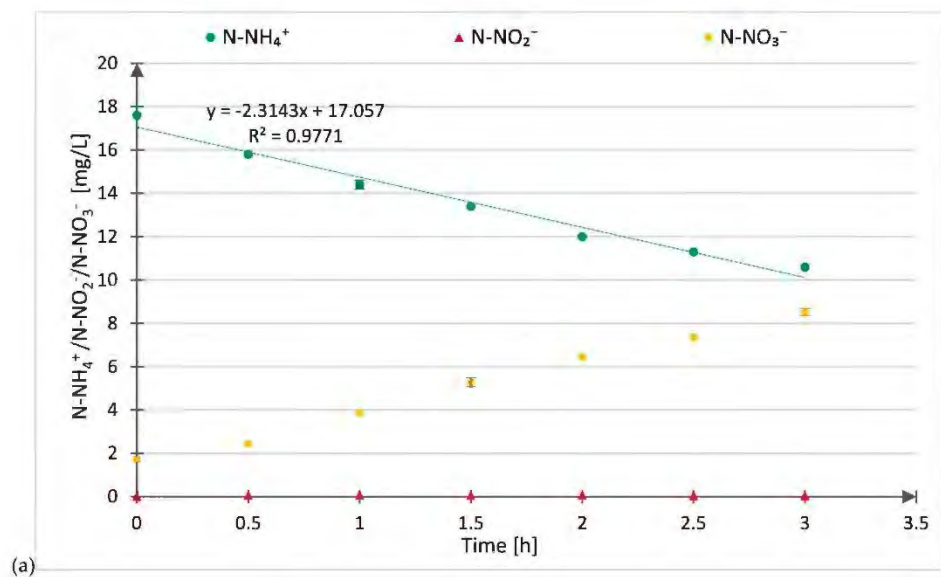


Figure 54 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B, Stage II

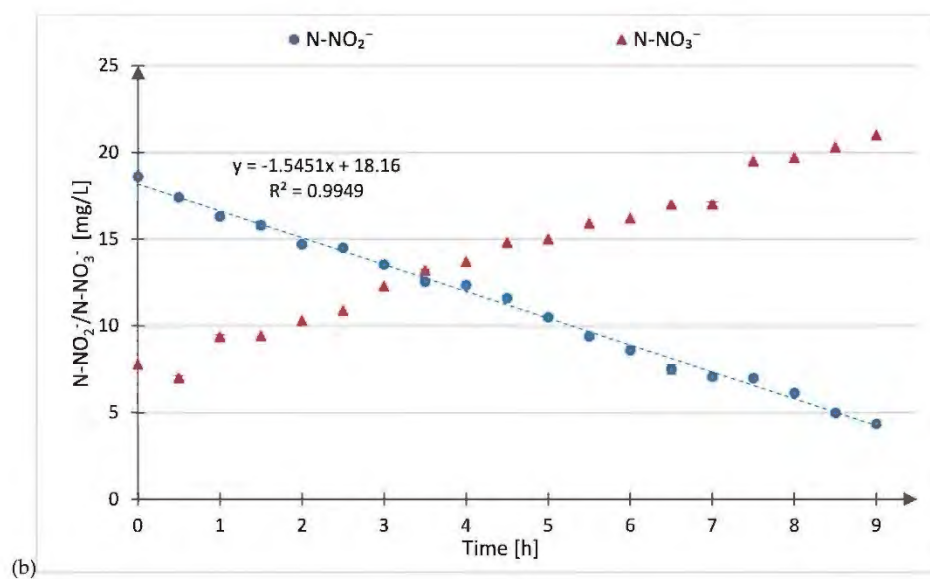
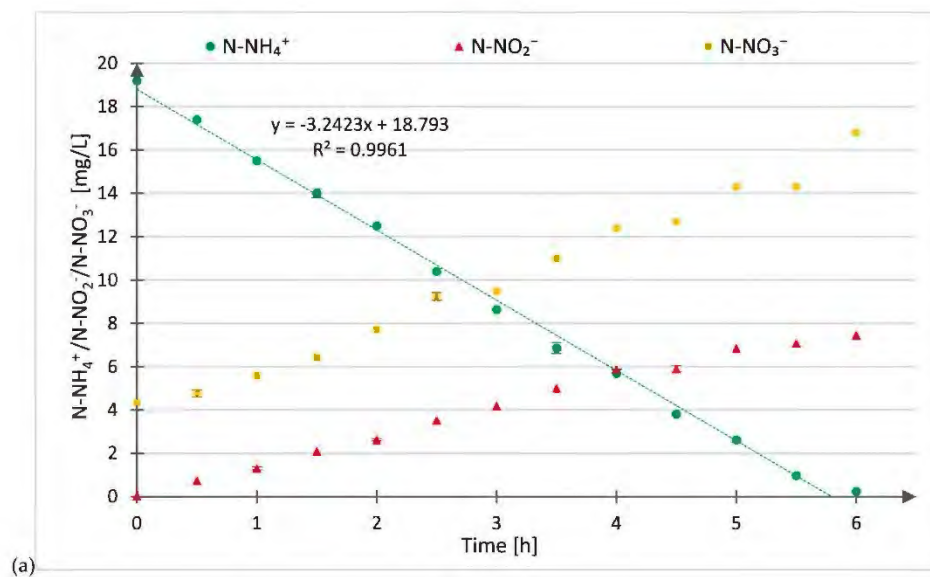


Figure S5 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage III

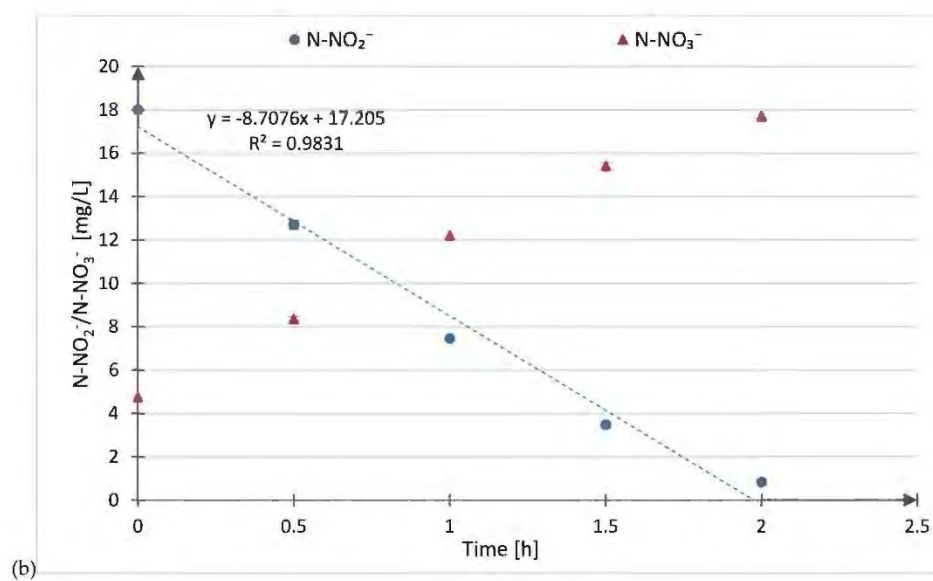
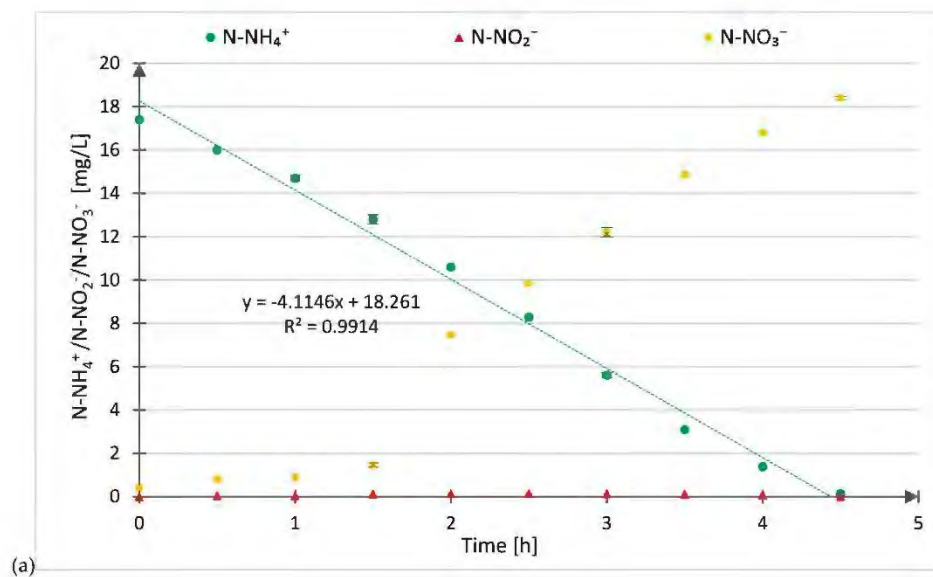


Figure S6 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage III

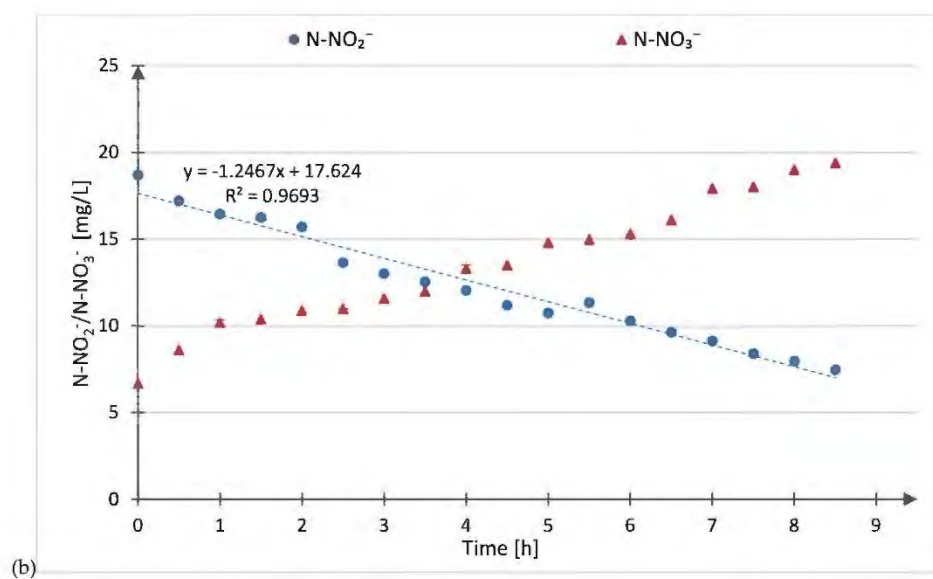
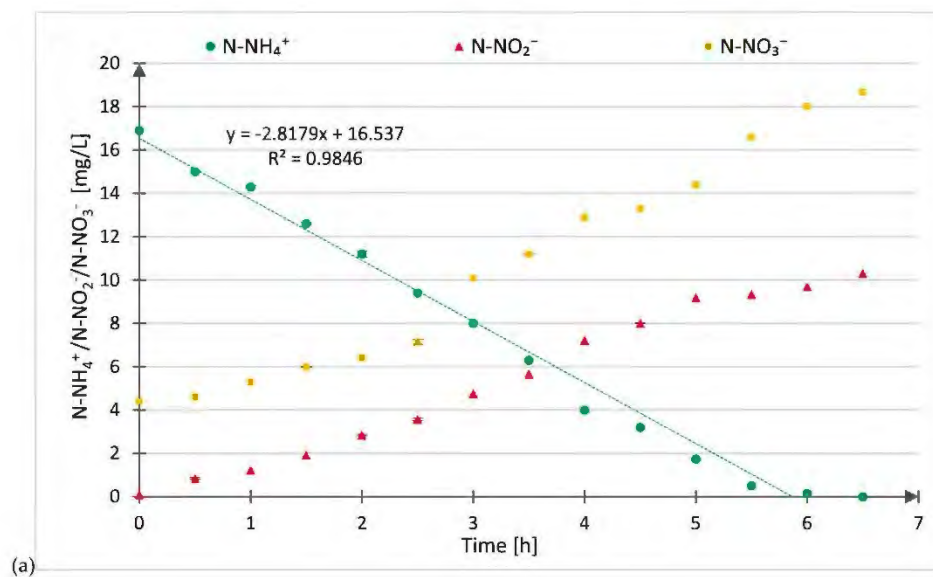


Figure S7 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Stage IV

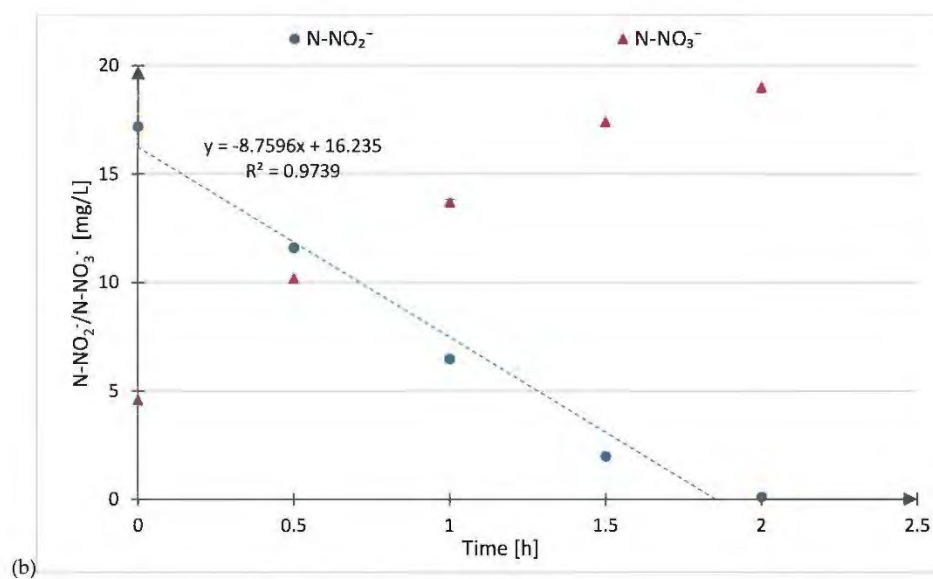
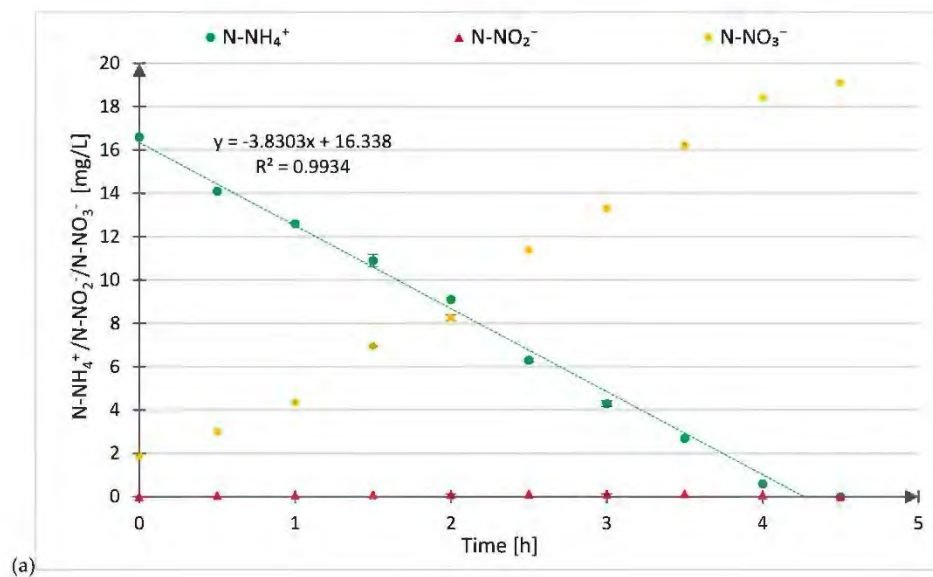


Figure S8 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Stage IV

**OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW
O UDZIALE W PUBLIKACJI**

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Olga Zając oświadczam, że mój wkład merytoryczny w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60%.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Ciesielski, S., Godzieba, M. (2022). Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water*, 14 (1), 72, <https://doi.org/10.3390/w14010072>. IF:3,40; punkty MNiSW:100.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmował szczegółowy przegląd literatury, który posłużył do identyfikacji problemu badawczego oraz opracowania koncepcji pracy. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie metodyki badań technologicznych, a także za zaplanowanie i wykonanie eksperymentów technologicznych (sprawowanie kontroli nad układem badawczym i aparaturą pomiarową, przygotowywanie ścieków, przeprowadzanie testów kinetycznych, wykonywanie analizy fizyko-chemicznej jakości ścieków surowych i oczyszczonych) oraz pobór prób biomasy do badań mikrobiologicznych. Koordynowałam całym procesem badawczym, monitorując wszystkie etapy badań. Odpowiadałam za interpretację i dyskusję wyników badań, w zakresie jakości ścieków, efektywności jednostkowych procesów oczyszczania, wyników testów kinetycznych AUR i NitUR oraz za analizę zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych. Przygotowałam znaczącą część manuskryptu (100% – rozdział: 1., 2.1., 2.2., 2.4., 3.1., 3.2., 5; 90% – rozdział: 4.). Byłam odpowiedzialna za wizualizację danych. Przygotowałam materiały uzupełniające oraz pełniłam obowiązki autora korespondencyjnego.

.....20.09.2024r. Olga Zając.....

Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Monika Żubrowska-Sudoł, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Ciesielski, S., Godzieba, M. (2022). Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water*, 14 (1), 72, <https://doi.org/10.3390/w14010072>. IF:3,40; punkty MNiSW:100.

Mój udział jako współautora pracy wynikał z pełnionej funkcji promotora. Obejmował:
1) nadzór merytoryczny nad przeglądem literatury prowadzonym przez Doktorantkę, 2) korektę merytoryczną koncepcji badawczej, metodyki badań technologicznych oraz manuskryptu, 3) nadzór nad czynnościami badawczymi prowadzonymi przez Doktorantkę, 4) pozyskanie funduszy.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 20%.

20.08.2024 M. Sudoł

Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Sławomir Ciesielski, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Ciesielski, S., Godzieba, M. (2022). Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water*, 14 (1), 72, <https://doi.org/10.3390/w14010072>. IF:3,40; punkty MNiSW:100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) opracowanie metodyki badań mikrobiologicznych, 2) współudział w korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 5%.

19.09.2024 Sławomir Ciesielski

.....
Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Martyna Godzieba, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Ciesielski, S., Godzieba, M. (2022). Effect of the Aeration Strategy on NOB Suppression in Activated Sludge and Biofilm in a Hybrid Reactor with Nitrification/Denitrification. *Water*, 14 (1), 72, <https://doi.org/10.3390/w14010072>. IF:3,40; punkty MNiSW:100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) wykonanie eksperymentów mikrobiologicznych, 2) interpretację i dyskusję wyników badań mikrobiologicznych, 3) przygotowanie manuskryptu (rozdział: 2.3.; 3.3.), 4) współudział w przygotowaniu rozdziału 4. (10%), 5) współudział w korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 15%.

18.08.2024... Martyna... Godzieba
Data i podpis współautora

Publikacja nr 3

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M.

(2023)

Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated
hybrid reactor under different organic loading rates

International Journal of Environmental Science and Technology, 20 (9), 10061–10074,

<https://doi.org/10.1007/s13762-022-04715-6>

IF: 3,00; punkty MNiSW: 70



Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates

O. Zajac¹ · M. Zubrowska-Sudol¹

Received: 29 July 2022 / Revised: 17 November 2022 / Accepted: 10 December 2022 / Published online: 20 December 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

This study investigated the impact of intermittent aeration strategies and reduction in the reactor's organic and nitrogen loading rates on the course of particular stages of the nitrification process, as well as energy consumption and N₂O emissions in a hybrid reactor with nitrification/denitrification. Each of the analysed series revealed the greatest ammonia oxidation activity in activated sludge flocs. The highest activity of nitrite nitrogen oxidation was demonstrated in the case of biofilm. A reduction in the reactor's organic and nitrogen loading rate value had a greater effect on changes in the activity of ammonia-oxidizing bacteria than nitrite-oxidizing bacteria. In a system where the operation of air pumps was controlled through switching them and off according to the adopted ratio between non-aerated and aerated sub-phase times and the assumed oxygen concentration, a reduction in the duration of aerated sub-phases caused no decrease in energy use for aeration. Lower N₂O emission was recorded when the reactor operated with a longer duration of aerated sub-phases.

Keywords Ammonia oxidation rate · Intermittent aeration · Nitrite oxidation rate · Energy · Nitrous oxide · Biofilm · Activated sludge

Introduction

The twenty-first century has brought dynamic development in the scope of biological nutrient removal (BNR). It is manifested in a number of technological solutions applied in wastewater treatment plants (WWTP). Next to the widely known activated sludge technology, biofilm systems are already in common use. Hybrid technology (Integrated Fixed-Film Activated Sludge—IFAS) is also becoming increasingly popular. This technological solution employs combined activated sludge and biofilm developing on moving or fixed beds with a large active surface. It considerably increases the amount of biomass in the hybrid reactor in comparison with reactors operating only based on activated sludge. Biofilm can also provide for longer biomass

retention time (SRT). This contributes to the development of slow-growing nitrifiers, therefore improving the efficiency of the nitrification process (Shao et al. 2017). In comparison with conventional wastewater treatment systems, IFAS systems guarantee a number of advantages. They include: high organics and nitrogen removal efficiencies, low sludge production rates, and lack of problems with sludge bulking. They have one considerable drawback, however, namely higher energy use in comparison with other systems (Singh et al. 2017). According to the cited authors, solving this problem requires the application of the intermittent aeration (IA) strategy that decreases unitary energy use with no substantial effect on nutrient removal efficiency. One of the important aspects of IA is a compromise between energy reduction and the achieved nutrient removal efficiency.

The literature regarding hybrid systems with nitrification/denitrification (N/D) applying the IA strategy is still scarce. Next to Singh et al. (2017) cited above, the issue was also investigated by Bhatia et al. (2017) and Singh et al. (2019) (Table 1). Bhatia et al. (2017) studied the effect of IA on the suppression of nitrite-oxidizing bacteria (NOB), and Singh et al. (2019) analysed the efficiency of IFAS operating with three different IA variants with respect to pre-set high aeration rate.

Editorial responsibility: Chongqing Wang.

✉ O. Zajac
olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

¹ Department of Water Supply and Wastewater Treatment,
Faculty of Building Services, Hydro and Environmental
Engineering, Warsaw University of Technology,
Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland



Springer

Table 1 Comparison of different hybrid reactors with intermittent aeration

Type of reactor	Operation conditions			Removal efficiencies				Refs.
	DO [mg O ₂ /L]	Intermit- tent aera- tion (Oxic/ Anoxic) [min]	R	COD [%]	N-NH ₄ ⁺ [%]	TN [%]	TP [%]	
IFAS reactor operating in conventional ASP configuration (aeration tank followed by settling tank)	~4.5 ^a	150/30	1/5	92.71	100	58	81.4 ^x	Singh et al. (2019)
		120/60	1/2	89.87	100	63	66.1 ^x	
		90/60	2/3	86.96	94.8	55	66.4 ^x	
Biofilm carriers: Biotextil Cleartec® media Activated sludge concen- tration: 2 ± 0.2 gMLSS/L								
IFAS reactor operating in conventional ASP configuration (aeration tank followed by settling tank)	~ 3.0 ^b	150/30	1/5	96	97.2	77.8	80.4	Singh et al. (2017)
		120/60	1/2	97	85.8	73.5	63.3	
		90/60	2/3	96	80.3	74.1	43.6	
Biofilm carriers: Biotextil Cleartec® media Activated sludge concen- tration: 1.28–1.45 gMLSS/L								
IFAS-MBSBBR	1.5 ^c	30/10	1/3	96.55 ± 0.95*	89.80 ± 4.34*,**	79.27 ± 2.77*	89.17 ± 1.59*	This study
Biofilm carriers:		20/10	1/2	96.32 ± 0.70*	88.21 ± 5.58*,**	79.97 ± 2.12*	89.12 ± 2.86*	
EvU-Pearl®		20/10	1/2	96.21 ± 0.16*	89.02 ± 3.14*,**	79.69 ± 2.61*	89.48 ± 5.90*	
Activated sludge concen- tration:		20/10	1/2	96.85 ± 0.85*	89.98 ± 2.13*,**	79.05 ± 2.00*	89.41 ± 2.09*	
1.71 ± 0.23 gMLSS/L								

^aAir pumps in aerated phases operate with a constant air flow of 110 m³/h; ^bAir pumps in aerated phases operate with a constant air flow of 75 m³/h; ^cThe operation of air pumps in aerated phases is controlled by the pre-set level of oxygen concentration (the air pumps switch off when the level exceeds 1.5 mg O₂/L, and switch on when it falls below 1.5 mgO₂/L); [^] with chemical precipitation; * values calculated in accordance with the methodology provided by Podedworna et al. (2012); ** the determination of the efficiency of N-NH₄⁺ removal considered the N-NH₄⁺ load supplied to the reactor with raw wastewater, and N-NH₄⁺ load developing in the course of treatment as a result of the process of ammonification of organic nitrogen

The cited papers therefore primarily focused on the analysis of the effect of IA on the efficiency of operation of IFAS. This study also presents an attempt to determine the effect of a decrease in the reactor's organic (L_{COD}) and nitrogen (L_N) loading rate on the efficiency of removal of pollutants.

As already mentioned before, IA applied in IFAS systems is an alternative that permits a decrease in the operation costs related to energy used for aeration, with simultaneous maintenance of high efficiency of nutrients removal. Focusing on this issue, this study also involved an analysis of the amount of energy used for aeration in different variants of IA. The analysis pointed to a strategy allowing for a decrease in the operation costs of IFAS with simultaneous maintenance of high efficiency of nutrients removal. It is also worth mentioning that this energy is largely used in the nitrification process. An important element of the study is therefore the

analysis of the effect of the aforementioned factors on the ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR) for activated sludge and biofilm, and in the case of a hybrid combination of these two forms of biomass. The experiment was conducted from May 2019 to August 2020 at the Warsaw University of Technology (Warsaw, Poland).

In selected series of the experiment, the effect of IA on the emission of nitrous oxide (N₂O) was additionally determined. It is a strong greenhouse gas that primarily originates as a by-product of ammonia oxidation. Due to its high stability, the gas can persist in the atmosphere for even more than 120 years (Schreiber et al. 2012), causing irreversible changes in the environment. Over the recent years, Integrated Fixed-Film Activated Sludge–Moving-Bed Sequencing Batch Biofilm Reactors (IFAS-MBSBBR) have become increasingly popular due to their high treatment efficiency

combined with low operation costs and simplicity of operation (Sabba et al. 2018). It is therefore important to investigate their effect on the environment, and the issue of climate warming Earth is facing as a result of human activity.

Materials and methods

Reactor set-up and operation

The study was conducted on a laboratory model of IFAS-MBSBBR with an active volume of 28L (Fig. 1). The system was equipped with the following: a slow-speed overhead stirrer R-50D by CAT, air pumps, and an air distributing system placed at the bottom of the reactor, peristaltic pump Ismatec Ecoline, optical oxygen probe Oxymax COS61D connected to a transmitter Liguiline CM442 (measurement of dissolved oxygen concentration and temperature), and an automatic control system (DreamSpark Premium software based on the SCADA system).

The study was launched on an operating IFAS-MBSBBR for nitrogen, carbon, and phosphorus removal with biomass developed in the form of biofilm on moving carriers EvU-Pearl (0.43 gSS/m²) and activated sludge (1.758 gMLSS/L). The carriers had a specific surface area of 600 m²/m³ and constituted 25% of the active volume of the reactor, i.e. 7 L.

Throughout the experiment, the average concentration of activated sludge was maintained at the level obtained at the beginning of the experiment, i.e. approximately 1.7 gMLSS/L.

IFAS-MBSBBR operated in three 8-h cycles per day, with the following subsequent phases: 1st phase without aeration—50 min, 1st phase with aeration (with intermittent aeration)—190 min, 2nd phase without aeration—30 min, 2nd phase with aeration (with intermittent aeration)—150 min, sedimentation—50 min, decantation—10 min. At the beginning of each of the phases without aeration, the reactor was fed synthetic wastewater, with a composition simulating municipal wastewater. It was prepared based on dechlorinated tap water and a mixture of the following: ammonium acetate 225 mg/L; peptone 135 mg/L; starch 45 mg/L; glucose 45 mg/L; glycerine 0.049 ml/L; NaHCO₃ 125 mg/L; Na₂HPO₄ 15 mg/L; KH₂PO₄ 4.5 mg/L with a volume of 10L per cycle (S. I., II., IV.) and 6.6L per cycle (S.III.). The composition of raw wastewater was the same in all series; COD: 511.61 ± 7.86 mgO₂/L, TN: 60.81 ± 1.74 mgN/L, TKN: 59.33 ± 1.56 mgN/L, N-NH₄⁺: 39.04 ± 1.30 mgN-NH₄⁺/L; N-NO₃⁻: 1.47 ± 0.58 mgN-NO₃⁻/L, P-PO₄³⁻: 7.61 ± 0.26 mgP-PO₄³⁻/L, pH: 7.6–7.8. A new portion of wastewater was prepared: i) daily, with the exception of weekends (S.I., II., IV.); ii) in accordance with the methodology described in point 2.2. (S.III.).

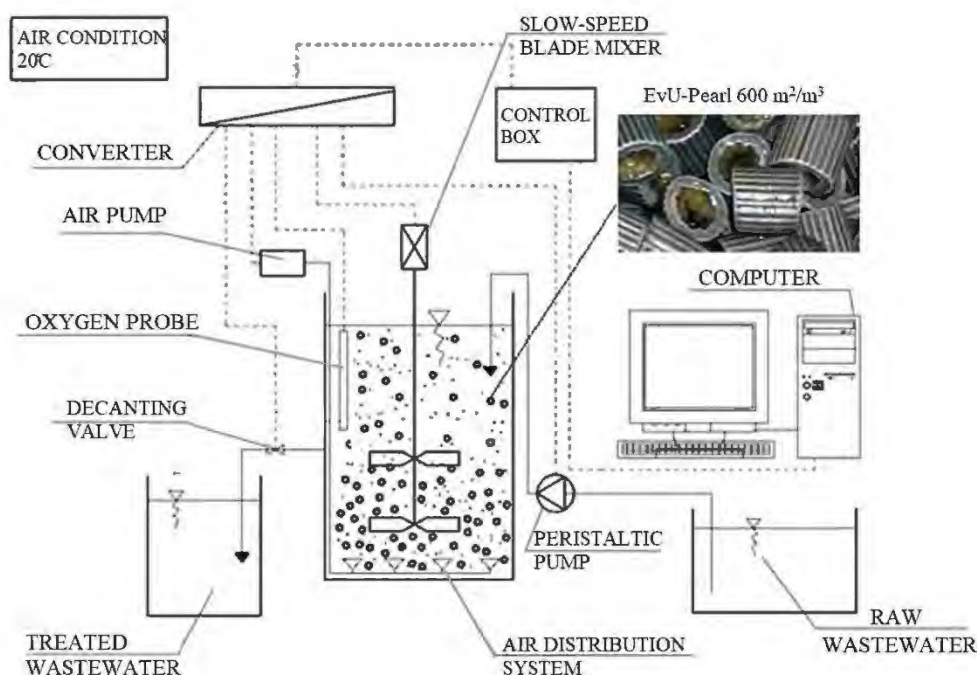


Fig. 1 Schematic of the reactor with accessories

In all series, dissolved oxygen (DO) concentration in phases with aeration was maintained at 1.5 mgO₂/L. The temperature in the reactor was kept at a constant level of 20 °C by means of external air-conditioning.

Study series

Four series were designated in the experiment (I–IV), differing in the applied intermittent aeration strategy and reactor's organic loading rate (L_{COD}) and nitrogen loading rate (L_{N}) (Table 2).

The study was launched on an operating IFAS-MBSBBR ensuring highly efficient nitrification (96.97%, N-NH₄⁺ concentration in treated wastewater 0.29 mg/L). The efficiency of removal of organic compounds and nitrogen and phosphorus compounds reached 97.23%, 80.78%, and 71.25%, respectively (COD, TN, and P concentration in treated wastewater 14.20 mgO₂/L, 12.30 mgN/L, 2.55 mgP/L).

Between series I (S.I.) and II (S.II.), the duration of aerated sub-phases was reduced from 30 min to 20 min. The L_{COD} and L_{N} values were at the same level at the time.

Due to the outbreak of the Covid-19 pandemic, changes have been introduced in the methodology of operation of IFAS-MBSBBR. They aimed at the maintenance of stable operation of the system for as long as possible. Due to the further development of the pandemic and restrictions introduced by the government, a decision was taken to reduce the reactor's organic and nitrogen loading rate through a decrease in the volume of wastewater supplied to the reactor from 10 L to 6.6 L per cycle. This way, a new portion of raw wastewater could be prepared only once in 5 days. In reference to the introduced changes, series III (S.III.) was designated.

On cancelling part of restrictions, the reactor's organic and nitrogen loading rate returned to that assumed at the beginning of the experiment—series IV (S.IV.).

During series I, II, and IV twice a week, and in series III once a week, raw and treated wastewater was analysed in the following scope: COD, TN, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, P-PO₄³⁻, alkalinity, pH, and determination of the activated sludge concentration. N-NH₄⁺ was controlled daily. The exception was series III where the analyses were conducted once a week.

Batch tests of the course of ammonia and nitrite oxidation

The determination of the effects of the operation conditions of IFAS-MBSBBR on the ammonia and nitrite oxidation process conducted by microorganisms inhabiting activated sludge flocs and those developing in the form of biofilm employed batch tests: Ammonia Utilization Rate Test (AUR) and Nitrite Utilization Rate Test (NitUR). The tests were conducted in two different variants:

- (1) V.I.—for a strictly specified level of oxygen concentration—1.5 mgO₂/L (V.I.1.5)—and 1.0 mgO₂/L (V.I.1.0)—the selection of the former corresponded with DO concentration maintained throughout the experiment in the aerated phases of the cycle in IFAS-MBSBBR. The selection of the latter was preceded by literature review according to which low DO concentrations may cause NOB bacteria suppression and contribute to favouring bacteria showing greater activity in such conditions (Park et al. 2002).
- (2) V.II.—with the assumption that oxygen concentration will be approximate to saturation in the conditions of 20 °C—in this case it was important that DO concentration does not constitute a factor limiting the ammo-

Table 2 Reactor operation series

Series	Duration [days]	Organic Loading Rate [gCOD/m ³ ·d] (L_{COD}) Nitrogen Loading Rate [gN/m ³ ·d] (L_{N})	Description of aeration strategy		
			Times of aerated t_1 and non-aerated t_2 sub-phases [min]	Ratio between times of non-aerated and aerated sub-phases (R)	O ₂ concentration during aerated sub-phases [mg/L] (DO)
I	0–131 (22–44)*	$L_{\text{COD}}=536$ $L_{\text{N}}=64$	$t_1=30$ min, $t_2=10$ min	1/3	1.5
II	132–375 (154–226)*	$L_{\text{COD}}=536$ $L_{\text{N}}=64$	$t_1=20$ min, $t_2=10$ min	1/2	
III	376–443	$L_{\text{COD}}=402$ $L_{\text{N}}=48$	$t_1=20$ min, $t_2=10$ min	1/2	
IV	444–517	$L_{\text{COD}}=536$ $L_{\text{N}}=64$	$t_1=20$ min, $t_2=10$ min	1/2	

*Failure period caused by an uncontrolled loss of activated sludge as a result of damaged electromagnetic valve

nia or nitrite oxidation rate (at too low DO, such a phenomenon occurs in biofilm) (Pal et al. 2012).

In variant II, the tests were conducted for activated sludge (SB) and biofilm (B).

Methodological assumptions shared by both the variants were as follows:

- (A) Initial N-NH_4^+ concentration in the $\text{AUR}_{\text{V.I.}}$ and $\text{AUR}_{\text{V.II.}}$ test equal to $15 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{L}$ and N-NO_2^- concentration in $\text{NitUR}_{\text{V.I.}}$ and $\text{NitUR}_{\text{V.II.}}$ equal to $15 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$.
- (B) Temperature – 20°C .
- (C) In tests for the designated forms of biomass: activated sludge concentration at a level of approximately 0.9 gMLSS/L , percent moving bed content at 25% of the active volume of the reactor.

It was assumed that batch tests will be conducted when comparable efficiency of the nitrification process is recorded for at least 10 subsequent days after changes in particular series in IFAS-MBSBBR.

N_2O emission

During series I and II, measurements of nitrous oxide emission were conducted using a N_2O -R Microsensor (Unisense, Denmark). The analysis covered measurements selected from 3 days of stable operation of the IFAS-MBSBBR. It was assumed that the N_2O emission coefficient ($E_{\text{N}_2\text{O}}$) would be calculated as mass of nitrous oxide ($M_{\text{N}_2\text{O}}$) emitted in the reactor operation cycle divided by nitrogen loading rate (L_N), modifying the methodology proposed by Al-Hazmi et al. (2020) (Eq. 1).

$$E_{\text{N}_2\text{O}} = \frac{M_{\text{N}_2\text{O}}}{L_N} \times 100\%[\%] \quad (1)$$

$M_{\text{N}_2\text{O}}$ [mg $\text{N-N}_2\text{O/L} \cdot \text{d}$] was calculated by integrating the rate of N_2O emission ($r_{\text{N}_2\text{O}}$ [mg $\text{N-N}_2\text{O/L} \cdot \text{d}$]) over the unit time ($dt[\text{d}]$) and dividing by total reaction time ($t[\text{d}]$) (Eq. 2).

$$M_{\text{N}_2\text{O}} = \int \frac{r_{\text{N}_2\text{O}} \times dt}{t} [\text{mg N-N}_2\text{O/L} \cdot \text{d}] \quad (2)$$

Analytical methods

Concentrations of COD, TN, N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , P-PO_4^{3-} were analysed spectrometrically according to APHA Standard Methods (APHA 2005) using cuvette tests (Hach Lange GmbH) and a DR 3900 spectrophotometer (Hach Lange GmbH, Berliu, Germany). The determination of mixed liquor suspended solids (MLSS) and

mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) employed gravimetric methods in accordance with Polish standard PN-EN 872:2007. Measurement of total volatile solids in biofilm was performed in accordance with the Polish standard by calculating weight loss. The biofilm was mechanically removed from the carries.

Free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) were calculated according to Eqs. (3) and (4) (Anthonisen et al. 1976)

$$\text{FA} = \frac{17}{14} \times \frac{\text{total ammonia as N} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 10^{\text{pH}}}{e^{(6344/273+T^\circ\text{C})} + 10^{\text{pH}}} [\text{mgFA/L}] \quad (3)$$

$$\text{FNA} = \frac{46}{14} \times \frac{\text{N-NO}_2^- \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{e^{(-2300/273+T^\circ\text{C})} \times 10^{\text{pH}}} [\text{mgFNA/L}] \quad (4)$$

Statistical analysis

The statistical analysis of the obtained results regarding treated wastewater quality and efficiency of removal of particular pollutants was conducted in program Statistica 13.3PL. A RiR Tukey test was applied for the determination of the significance of differences between the analysed variables (p -value smaller than 0.05 indicated a statistically significant difference).

Results and discussion

Organics, nitrogen, and phosphorus removal

According to the data presented in Table 3, irrespective of the duration of aerated sub-phases and values of L_{COD} and L_N , throughout all series a comparable high efficiency of the nitrification process was obtained, namely $E_N = 89.31 \pm 4.34\%$ ($p > 0.620$). N-NH_4^+ concentrations in wastewater discharged from IFAS-MBSBBR were approximate to $0.20\text{--}1.75 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{L}$. The statistical analysis showed a significant differences between N-NH_4^+ values for S.I.–S.II. ($p = 0.000008$) and S.I.–S.III. ($p = 0.005949$).

A highly efficient process of COD removal ($E_{\text{COD}} = 96.52 \pm 0.83\%$) was also achieved. The value of COD in treated wastewater did not exceed $29 \text{ mgO}_2/\text{L}$ in any of the series and remained far below the discharge standard in Poland ($125 \text{ mgO}_2/\text{L}$) (Regulation of the Minister of Marine Economy and Inland Navigation, 2019). The statistical analysis showed lack of significant differences between the values of E_{COD} and COD in the effluent for all of the series, pointing to the lack of effect of the analysed aeration strategies and L_{COD} on the efficiency of organics removal. In the conducted research series, no

Table 3 Effluent characteristics of IFAS-MBSBBR

Parameter			Series			
			I	II	III	IV
COD*	mgO ₂ /L	Min	11.50	12.43	18.00	10.60
		Max	28.60	26.00	20.00	24.40
		Average	17.63 ± 4.82	18.67 ± 3.49	19.36 ± 0.78	16.27 ± 4.40
TN*	mgN/L	Min	10.90	10.50	10.30	10.00
		Max	15.87	14.70	13.70	14.50
		Average	12.70 ± 1.64	12.29 ± 1.36	12.02 ± 1.41	12.25 ± 1.25
TKN	mgN/L	Min	1.26	1.09	5.15	3.98
		Max	10.92	11.51	8.94	7.97
		Average	6.04 ± 2.52	7.06 ± 3.35	3.01 ± 1.08	2.85 ± 1.36
N-NH ₄ ⁺ *	mgN-NH ₄ ⁺ /L	Min	0.20	0.32	0.29	0.20
		Max	1.75	1.75	1.59	1.55
		Average	0.55 ± 0.35	0.82 ± 0.32	0.83 ± 0.41	0.69 ± 0.30
N-NO ₂ ⁻ *	mgN-NO ₂ ⁻ /L	Min	0.01	0.02	0.00	0.01
		Max	0.87	0.20	0.26	0.44
		Average	0.08 ± 0.18	0.07 ± 0.06	0.09 ± 0.12	0.05 ± 0.12
N-NO ₃ ⁻ *	mgN-NO ₃ ⁻ /L	Min	3.17	2.87	4.50	4.13
		Max	12.40	9.88	7.10	9.07
		Average	6.59 ± 2.32	5.16 ± 2.35	5.48 ± 1.12	6.69 ± 1.49
TP *	mgP-PO ₄ ³⁻ /L	Min	0.60	0.89	0.76	0.60
		Max	1.05	1.05	0.99	1.05
		Average	0.82 ± 0.11	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.10	0.80 ± 0.14
L _{COD}	gCOD/m ³ ·d		548.10 ± 10.45	545.24 ± 8.36	410.81 ± 0.44	543.43 ± 39.71
L _N	gN/m ³ ·d		65.69 ± 2.24	65.73 ± 0.85	47.97 ± 1.08	63.71 ± 1.24

*Courses of changes in the analysed indicators throughout the experiment are provided in Supplementary Information: Figs. 1–5

statistically significant changes were recorded in the efficiency of nitrogen and phosphorus compounds removal or in TN and TP concentrations in treated wastewater.

A comparison of results obtained in this study with research presented in Table 1 showed that at an identical value of the R indicator, the nitrification efficiency is approximately 11% lower than that determined by Singh et al. (2019). DO concentration and duration of particular aerated sub-phases in the cited paper were, respectively, 3 times and 6 times higher than in this study, potentially affecting the analysed process.

The efficiency of TN removal was higher than in research conducted by Singh et al. (2019), although TN concentration in the effluent was at an approximate or somewhat higher level in comparison with the remaining papers cited in Table 1.

To sum up, IFAS-MBSBBR was characterized by high stability of contaminant removal irrespective of changes in the values of R, L_{COD}, and L_N.

Batch test results

The analysis of the quality of raw and treated wastewater showed a comparable efficiency of the nitrification process, irrespective of the duration of aerated sub-phases and values of L_{COD} and L_N. In order to understand the role of microorganisms developed in the form of activated sludge flocs and those in the form of biofilm in particular stages of nitrification, batch tests were conducted, aimed at the assessment of the ammonia oxidation and nitrite oxidation rate. The tests were conducted for biofilm (B), activated sludge (SB), and combination of both these forms—hybrid (H). Their results are collected in Table 4 (detailed results of particular batch tests are presented in the Supplementary Information: Figs. 6–13). They provided the basis for the identification of the form of biomass showing the highest ammonia or nitrite oxidation activity, and determination of how the reactor operation conditions during particular series of the experiment contributed to changes in such values.

Table 4 Summary of batch test results

Parameter	DO [mg O ₂ /L]	Series I			Series II			Series III			Series IV		
		SB	B	H	SB	B	H	SB	B	H	SB	B	H
Ammonia oxidation rate (AOR)	nl	6.841	3.374	–	3.856	6.993	–	5.112	4.700	–	8.061	3.623	–
mgN–NH ₄ ⁺ /gVSS·h	1.5	3.806	1.478	2.614	4.555	1.733	3.102	–	–	–	2.887	1.504	1.911
	1.0	3.855	0.890	–	–	–	–	–	–	–	3.607	1.865	–
Nitrite oxidation rate (NitOR)	nl	4.211	9.239	–	3.503	21.446	–	3.851	19.276	–	4.868	18.588	–
mgN–NO ₂ [–] /gVSS·h	1.5	2.275	4.786	2.577	2.516	7.024	5.249	–	–	–	1.960	6.778	3.641
NitOR/AOR	nl	0.62	2.76	–	0.91	3.07	–	0.75	4.10	–	0.60	5.14	–
mgN–NO ₂ [–] /mgN–NH ₄ ⁺	1.5	0.60	3.24	0.99	0.55	4.05	1.69	–	–	–	0.68	4.51	1.91

Ammonia oxidation rate and nitrite oxidation rate depending on the form of biomass in the reactor

The objective of batch tests conducted at 1.5 mg O₂/L (AUR_{V.L.I.1.5}, NitUR_{V.L.I.1.5}) was to compare the activity of particular groups of nitrification microorganisms developing in the form of activated sludge and biofilm, and in the case of both these biomass forms cooperating as a hybrid. A separate paper describing the composition of microorganisms inhabiting the biomass developing in the discussed reactor showed that the community of biofilm microorganisms was richer and more diverse than in the activated sludge (Godzieba et al. 2022).

In each of the analysed series, the highest AOR values were recorded for activated sludge. In comparison with values obtained for biofilm, it was higher: 2.58 times (S.I.), 2.63 times (S.II.), and 1.92 times (S.IV.), respectively, pointing to

greater ammonia oxidation activity in activated sludge flocs than in biofilm. Microbiological analysis showed that in S.I. and S.II. *Rhodobacter*, considered a facultative anaerobic bacterium able to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification, was present in the activated sludge with much higher relative abundance (Godzieba et al. 2022).

In research presented in the literature analysing the ammonia oxidation rate in hybrid systems, a higher value of the analysed indicator was obtained in tests conducted for moving carriers (Table 5) (Christensson et al. 2004; Onnis-Hayden et al. 2011; Regmi et al. 2011; Di Trapani et al. 2013). Onnis et al. (2011) and Regmi et al. (2011) observed more than 75% higher values of nitrification activity in tests conducted for biofilm in comparison with those observed for activated sludge. Another group of researchers evidenced that 85% of the nitrification activity took place on a suspended carrier (Christensson et al. 2004). Lack of similar

Table 5 N–NH₄⁺ and N–NO₂[–] oxidation rate for different hybrid reactors

Aeration strategy	Unit	N–NH ₄ ⁺ oxidation rate			N–NO ₂ [–] oxidation rate			References
		AS	B	H	AS	B	H	
Continuous	mgNH ₄ –N/gTS/h	2.64	5.89	4.77	–	–	–	Onnis-Hayden et al. (2011)
	mgNO _x –N/gTS/h	2.02	5.87	5.16	–	–	–	
Continuous	mgNO _x /gMLSS/h	1.72	4.97	–	0.82	7.55	–	Regmi et al. (2011)
Continuous	mgNH ₄ ⁺ –N/gVSS/h	–	–	5.28	–	–	–	Shao et al., (2017)
		–	–	(COD:N = 10:1)	–	–	–	
		–	–	7.99	–	–	–	
		–	–	(COD:N = 5:1)	–	–	–	
		–	–	18.25	–	–	–	Christensson et al. 2004
		–	–	(COD:N = 3:1)	–	–	–	
Continuous	gNH ₄ –N/m ³ /h	–	–	18.8–23	–	–	–	
	gNH ₄ –N /m ² /d	–	0.86–1.18	–	–	–	–	
Continuous	gNH ₄ –N/m ² ·d	–	0.92	–	–	–	–	Di Trapani et al. 2013
		–	0.71	–	–	–	–	
		–	0.92	–	–	–	–	
	gNH ₄ –N/gVSS h	2.05	–	–	–	–	–	
		1.27	–	–	–	–	–	
		2.57	–	–	–	–	–	

dependencies in this study, however, may be related to the type of the analysed wastewater treatment system and DO concentration lower than in the cited papers (1.5 mgO₂/L vs. 3–5 mgO₂/L). It is also important that in the case of biofilm, oxygen diffusion plays a considerably greater role than in activated sludge. According to Shao et al. (2017), due to the diffusion resistance through biofilm, the oxygen half-saturation coefficient (K_O) was up to 10 times higher in the biofilm than in the sludge (the higher the K_O value, the smaller oxygen transport in biofilm), leading to a considerable decrease in DO concentration of the already shallow depth of biofilm. In the case of NitUR tests conducted at 1.5 mgO₂/L, the highest values of the analysed indicator in all series were recorded for biofilm. In reference to values determined for SB, they were 2.10 times (S.I.), 2.79 times (S.II.), and 3.46 times higher (S.IV.), pointing to higher nitrite oxidation activity in biofilm. A higher nitrite oxidation rate for biofilm in comparison with activated sludge was also recorded in the literature (Onnis-Hayden et al. 2011; Regmi et al. 2011; Shao et al. 2017). Regmi et al. (2011) showed NitOR for biofilm as much as 9.21 times greater than that for activated sludge. In microbiological analyses, in the case of biofilm, Onnis et al. (2011) and Shao et al. (2017) recorded higher NOB abundance. The microbiological analysis of biomass samples from this study is consistent with what the cited authors presented. The microbiological tests showed that *Nitrospirita* and genus *Nitrospira* were much more numerous in the biofilm than in the activated sludge. This could have undoubtedly influenced the obtained NitOR values and suggested that biofilm was a better environment to develop nitrifiers (Godzieba et al. 2022).

In accordance with data presented in the literature (Onnis-Hayden et al. 2011; Regmi et al. 2011), it was expected that in tests conducted for the combination of both forms of biomass, the AOR and NitOR values would be higher, or at least approximate to the highest values recorded for SB or B. Nonetheless, in the case of AUR-H_{V,1.5} tests, in each series, AOR were approximately 1.46 (S.I.), 1.47 (S.II.), and 1.51 times (S.IV.) lower than the values observed for SB and were 1.77 (S.I.), 1.78 (S.II.), and 1.27 times (S.IV.) higher than values recorded in AUR-B_{V,1.5} tests. In reference to NitUR-H_{V,1.5} tests, in each series, the NitOR was 1.86 (S.I.), 1.34 (S.II.), and 1.86 times (S.IV.) lower than that determined for biofilm. These observations may point to competition for substrate and oxygen of ammonia-oxidizing bacteria (AUR tests) and nitrite-oxidizing bacteria (NitUR tests) in particular forms of biomass.

It is also worth emphasizing that although the reactor operation conditions during series II and IV were identical, the obtained values of the rate of the analysed processes were different. AOR for SB and H recorded in series IV decreased 0.63 and 0.62 times, respectively, in reference to the values observed in series II, and the value recorded

for B constituted 86% of that from series II. In reference to the NitOR, the greatest difference between the values of the analysed indicator in series II and IV was evidenced for H. The recorded value was 1.44 times lower than that presented in series II. Also in the case of tests conducted in series IV for SB, the NitOR_{V,1.5} value was 1.28 times lower than in S.II. A temporary reduction in the reactor's organic loading rate in series III caused changes in the ammonia and nitrite oxidation rate. Microbiological analysis also showed discrepancies in relative abundances, both in phyla and genera, while in both cases they were greater in the case of activated sludge (Godzieba et al. 2022). For example, *Rhodobacter* was present in the sample in series II, while in series IV it was already gone, which can contribute to differences in AOR values for SB and H.

Effect of DO concentration on the activity of nitrification microorganisms

In series I and IV, the highest AOR by microorganisms inhabiting activated sludge flocs was observed in the case of unlimited oxygen concentration. Values recorded in tests at oxygen concentration of 1.5 mgO₂/L and 1.0 mgO₂/L were 1.80 and 1.77 times (S.I.), and 2.79 and 2.23 times (S.IV.) lower, respectively. When the tests were conducted at the lowest of the analysed DO concentrations (1.0 mgO₂/L), at each of those stages the value of the analysed indicator was higher than when the test was conducted for 1.5 mgO₂/L. In series II, the value of AOR-SB_{V,1.5} was 1.18 times higher than that obtained in tests for variant II. The observations suggest that ammonia-oxidizing microorganisms could develop in activated sludge flocs showing higher activity in the conditions of lower DO concentration (Park et al. 2002). According to the study by Park et al. (2002), such microorganisms include *Nitrosospira* and *Nitrosomonas oligotropha* lineages. Lower DO concentration is also one of the factors considered favourable for the recently investigated Comamox bacteria (Roots et al. 2019).

Effect of the pre-set conditions of operation of IFAS-MBSBBR on the ammonia oxidation rate and nitrite oxidation rate

Conducting batch tests with the assumption that oxygen concentration would be approximate to saturation at 20 °C aimed at limiting the effect of DO concentration on the ammonia and nitrite oxidation rate. The tests were conducted at the end of each series designated in the experiment, allowing for a comparison of the effect of all changes introduced in subsequent series.

After reducing the duration of aerated sub-phases from 30 min (S.I.) to 20 min (S.II.), a 1.77 times decrease was recorded in the value of AOR-SB_{V,II} (from

6.841 mgN-NH₄⁺/gVSS·h to 3.856 mgN-NH₄⁺/gVSS·h) and a 2.07 times increase in the values of the analysed indicator in the case of biofilm (from 3.374 mgN-NH₄⁺/gVSS·h to 6.993 mgN-NH₄⁺/gVSS·h). The activity of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge therefore decreased, with a simultaneous increase in their activity in biofilm. Moreover, the value recorded in series I for activated sludge was approximate to that evidenced for biofilm in series II, and the value of AOR-B_{V,II} in series I corresponded with that recorded for activated sludge after the change in the aeration strategy. In the case of NitOR, a decrease in the analysed value for activated sludge was also observed, and its increase in tests conducted for biofilm. The NitOR-SB decreased 1.20 times (from 4.211 mgN-NO₂⁻/gVSS·h to 3.503 mgN-NO₂⁻/gVSS·h), whereas NitOR-B increased 2.32 times (from 9.239 mgN-NO₂⁻/gVSS·h to 21.446 mgN-NO₂⁻/gVSS·h). In series II, the nitrite nitrogen oxidation rate in the biofilm was the highest throughout the experiment, possibly due to the largest relative abundance of *Nitrospira* in biofilm recorded in the microbiological analysis (Godzieba et al. 2022).

Such observations lead to the conclusion that ammonia- and nitrite-oxidizing microorganisms inhabiting each of the discussed forms of biomass showed different responses to the introduced changes in the reactor's aeration strategy. Interestingly, although the reduction in the duration of aerated sub-phases resulted in the occurrence of more sub-phases with the air pumps switched off in aerated phases (S.I.-8 vs. S.II.-11), the NitOR in the case of biomass in the form of biofilm increased. Considering study results by Yang and Yang (2011) who conducted research in a moving bed membrane bioreactor with simultaneous nitrification and denitrification, an increase in the R value was expected to cause suppression of NOB bacteria, observed as a decrease in the value of NitOR.

A reduction in the reactor's organic and nitrogen loading rate introduced in series III caused a 1.33-fold increase in AOR for activated sludge, whereas in tests conducted for biofilm, a 1.49-fold decrease was recorded. The observations point to an increase in the activity of ammonia-oxidizing bacteria that developed in activated sludge flocs, with a simultaneous decrease in the activity of such bacteria inhabiting biofilm. In series III, results of NitUR tests also showed a decrease in NitOR-B, suggesting a decrease in the activity of NOB bacteria developing in the form of biofilm. Presumably, the ammonia nitrogen supplied with raw wastewater to IFAS-MBSBBR was first oxidized by the microorganisms inhabiting activated sludge, resulting in insufficient load supplied to the microorganisms inhabiting biofilm, causing a decrease in their population. It could also be presumed that oxygen and substrate diffusion within biofilm was of considerable importance here. Microbiological analysis also showed that the relative abundance of *Nitrospira* in the biofilm then decreased (Godzieba et al. 2022).

Due to the return to the values of L_{COD} and L_N assumed at the beginning of the experiment in reference to the values recorded in series III, for activated sludge, an increase in AOR (1.58-fold) and NitOR (1.26-fold) was observed and in the case of biofilm a decrease in both of the analysed values 1.30 times (AOR-B) and 1.04 times (NitOR-B), respectively. The predefined reactor's operation conditions therefore contributed to an increase in the activity of nitrification bacteria in activated sludge and its decrease in biofilm.

Effect of free ammonia and free nitrous acid on changes in the activity of particular groups of nitrifying microorganisms

The concentration of free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) may affect the kinetics of the nitrification process. According to Jiang et al. (2019), nitrite-oxidizing bacteria are more sensitive to FA than AOB. It is reported that NOB can be inhibited by FA at about 0.1 to 1 mgFA/L, whereas AOB inhibition threshold was 10–150 mgFA/L. Some previous works reported that nitrification was achieved even at 20 mgFA/L (Chung et al. 2007).

In the AUR tests, the FA concentration was within a range of 0.349–0.474 mgFA/L, significantly lower than the thresholds reported for the inhibition of AOB (Table 6). These values, however, may have had an effect on bacteria capable of oxidizing nitrite nitrogen. During the test conducted for activated sludge, accumulation of nitrite nitrogen was observed which can be equated with the occurrence of NOB suppression. The ratio between nitrite increase and ammonia loss (RNIAL) in each of the tests conducted for this form of biomass exceeded 21.98% (except S.II. when the test was conducted at unlimited DO). The highest accumulation of N-NO₂⁻ was observed in AUR-SB in series S.I. when oxygen concentration was maintained at a level of 1.5 mgO₂/L. Almost 50% of the initial N-NH₄⁺ was accumulated as nitrite. Concentration of FA was then 0.375 mgFA/L. In the case of the tests conducted for the biofilm, none of them showed significant accumulation of N-NO₂⁻ (RNIAL < 1%), although the FA concentration was slightly higher than in tests carried out for other forms of biomass. In S.I., certain nitrite accumulation was also observed in the test for hybrid. As mentioned before, in the same series, the highest N-NO₂⁻ accumulation in AUR-SB was recorded. This may give rise to the assumption that in the case of simultaneous tests carried out for activated sludge and biofilm, NOB suppression in activated sludge flocs resulted in the accumulation of nitrite. The observations made in this study suggest that the observed partial inhibition of NOB could be influenced by the concentration of FA at a level of 0.349 mgFA/L.

FNA is considered a universal NOB inhibitor, but its concentration determines to what extent it will affect individual types of nitrifying bacteria differing in terms of resistance

Table 6 Free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) at the beginning of batch tests

Parameter	Type of biomass	Series I			Series II		Series III	Series IV		
		DO [mgO ₂ /L]			DO [mgO ₂ /L]		DO [mgO ₂ /L]	DO [mgO ₂ /L]		
		nl	1.5	1.0	nl	1.5	nl	nl	1.5	1.0
AUR test	SB	15.90	15.90	15.00	15.20	16.10	14.80	18.00	15.30	15.80
Initial concentration of substrate [mgN-NH ₄ ⁺ /L]	B	16.50	18.70	18.70	18.20	20.10	17.30	17.30	18.30	18.60
	H	–	17.60	–	–	19.90	–	–	17.40	–
	SB	26.54	49.83	30.31	10.17	21.98	24.08	32.25	31.63	29.28
RNIAL [%]	B	1.03	0.36	0.47	0.18	0.19	0.17	0.31	0.92	0.25
	H	–	12.80	–	–	3.85	–	–	3.82	–
	SB	17.80	18.10	–	14.80	16.10	14.80	15.60	15.40	–
NitUR test	SB	17.80	18.10	–	14.80	16.10	14.80	15.60	15.40	–
Initial concentration of substrate [mgN-NO ₂ ⁻ /L]	B	17.90	20.60	–	16.90	18.30	18.00	15.10	17.60	–
	H	–	20.00	–	–	18.90	–	–	17.40	–
	SB	0.375	0.375	0.354	0.358	0.380	0.349	0.424	0.361	0.373
FA [mg/L] (AUR test)	B	0.389	0.441	0.441	0.429	0.474	0.408	0.408	0.431	0.439
	H	–	0.415	–	–	0.469	–	–	0.410	–
	SB	2.994·10 ⁻³	3.044·10 ⁻³	–	2.489·10 ⁻³	2.708·10 ⁻³	2.489·10 ⁻³	2.624·10 ⁻³	2.590·10 ⁻³	–
FNA [mg/L] (NitUR test)	B	3.010·10 ⁻³	3.464·10 ⁻³	–	2.842·10 ⁻³	3.078·10 ⁻³	3.027·10 ⁻³	2.539·10 ⁻³	2.960·10 ⁻³	–
	H	–	3.364·10 ⁻³	–	–	3.179·10 ⁻³	–	–	2.926·10 ⁻³	–
	SB	–	–	–	–	–	–	–	–	–

(Meng et al. 2022). According to Pedrouso et al. (2017), *Nitrospira* (belonging to NOB) completely inhibits FNA concentration at a level of 0.02 mgFNA/L, while in the case of *Nitrobacter* (belonging to AOB), it is 20 times higher, i.e. 1 TN/L (Blackburne et al. 2007). FNA concentrations in the conducted tests remained significantly below the threshold values reported in the literature.

Energy use

Most of the energy supplied to a wastewater treatment plant is used for aeration, necessary for biochemical oxidation of organic compounds and nitrite oxidation. According to Luo et al. (2019), in conventional wastewater treatment plants, from 25% to 60% of operational costs are associated with energy use, whereas aeration accounts for 50–75% of total energy expenditure of wastewater treatment plants.

The methodology proposed by the cited authors (Luo et al. 2019) provided the basis for the calculation of energy consumption (Eq. 5)— E_O (kWh/kg):

$$E_O = \frac{E_d}{\Delta m} \text{ [kWh/kg]} \quad (5)$$

E_d is daily electric energy consumption (kWh/d), and Δm [kg/d] was calculated as a product of Q (volume of wastewater flow (m^3/d)), ΔC_{COD} , $\Delta C_{\text{N-NH}_4^+}$ (differences in COD and N-NH_4^+ concentrations in influent and effluent with consideration of N-NH_4^+ released in the ammonification process (g/m^3)), and 4.18 (oxygen consumption for 1 g of N-NH_4^+ oxidation) (Eq. 6):

$$\Delta m = \frac{Q \cdot \Delta C_{\text{COD}} + 4.18 \cdot Q \cdot \Delta C_{\text{N-NH}_4^+}}{1000} \text{ [kg/d]} \quad (6)$$

The comparison of E_O values covered series in which IFAS-MBSBBR operated with identical reactor's organic and nitrite loading rate (Fig. 2). Due to the reduction in the duration of aerated sub-phases from 30 min (S.I.) to 20 min (S.II., S.IV.), the total duration of aerated sub-phases in a day decreased from 780 min to 690 min. Contrary to expectations, however, the duration of the operation of air pumps in a day increased by 16% (S.II. vs. S.I.) and 13% (S.IV. vs. S.I.). The consequence was higher E_O value in series II and IV in comparison with that determined in series I. In the analysed system, an increase in the value of R therefore determined the amount of energy used for aeration. Different conclusions were drawn by Singh et al. (2018), conducting research in a field-scale IFAS reactor. With an increase in the R value, they observed a decrease in energy used for powering the air pumps. In the analysed system, however, there was no established DO set-point. Due to that, in aerated sub-phases, air pumps operated continuously throughout the sub-phases, and a reduction in the duration of aerated

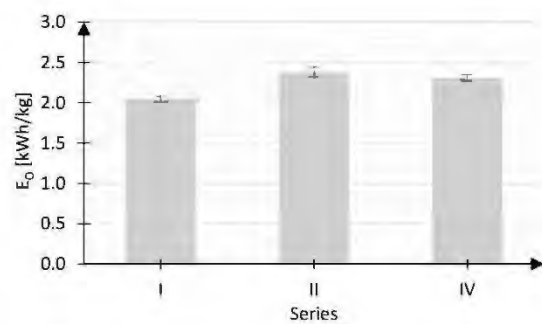


Fig. 2 Average energy consumption (E_O)

sub-phases in subsequent series was directly related to the reduction in the time of operation of air pumps. The obtained results showed that in the case of systems with intermittent aeration in which the operation of air pumps is controlled through switching them on and off not only according to the adopted R value, but also the assumed oxygen concentration (it is worth emphasizing that such a control system is usually applied in wastewater treatment plants), it cannot be assumed that a reduction in the duration of aerated sub-phases will permit a decrease in energy use for aeration.

Considering the average price of 1 kWh of energy in Warsaw (Poland)—0.79 PLN (0.17 €), the costs of aeration for removal of pollutants increased from 1.61 PLN/kg (0.35 €/kg) (S.I.) to 1.88 PLN/kg (0.41 €/kg) (S.II.), 1.82 PLN/kg (0.40 €/kg) (S.IV.). At the scale of 1 year, it would generate approximately 14–15% higher costs related to energy used for powering air pumps.

N₂O emission

Due to the high value of the global warming potential (GWP), nitrous oxide is considered as one of significant greenhouse gases. Its value is almost 300 times higher than that determined for carbon dioxide (Schreiber et al. 2012). Papers focusing on N_2O emission in wastewater treatment plants operating in the moving bed hybrid technology, however, are scarce (Lo et al., 2010; Sabba et al. 2018;). The processes of biological nitrogen removal (BNR) through nitrification and denitrification (N/D) are considered the primary sources of N_2O emission, due to the fact that both autotrophic and heterotrophic bacteria can be responsible for the production of nitrous oxide. In the nitrification process, nitrous oxide is produced as a by-product of ammonia oxidation by AOB bacteria in two different ways: 1) incomplete oxidation of hydroxylamine (NH_2OH) to nitrite and 2) reduction in nitrite as an acceptor of electrons to N_2O (autotrophic denitrification conducted by AOB bacteria).

Table 7 N₂O emission factors in various systems with nitrification/denitrification

Type of reactor and configuration	Biomass form	N ₂ O emission factor (%)	References
Fully aerobic SND sequencing batch air-lift reactor	Acrobic granule	21.9 ± 7.1	Zhang et al. (2015)
Anoxic-aerobic SND sequencing batch air-lift reactor (R = 1/5; 225 min:45 min)	Aerobic granule	7.0 ± 1.6	
Step-feeding multiple A/O SBR (R = 1; 30 min:30 min)	Activated sludge	4.38	Sun et al. (2018)
One-feeding multiple A/O SBR (R = 1; 30 min:30 min)	Activated sludge	4.66	
multiple anoxic-aerobic SBR—600 mL/min (R = 1; 30 min:30 min)	Activated sludge	10.1	Wang et al. (2016)
multiple anoxic-aerobic SBR—1200 mL/min (R = 1; 30 min:30 min)	Activated sludge	2.3	
Intermittently aerated SBR1 (R = 1; 30 min:30 min)	Activated sludge	0.01–0.53	Liu et al. (2021)
Continuously aerated SBR2	Activated sludge	0.11–2.09	
Continuously aerated Hybrid SBRs	Biofilm	0.4	Lo et al. (2010)
	Activated sludge	4.2	
	Hybrid	21.2	
Intermittently aerated IFAS-MBSBBR R = 1/3 (30 min:10 min)	Hybrid	0.896	This study
Intermittently aerated IFAS-MBSBBR R = 1/2 (20 min:10 min)	Hybrid	1.091	

N₂O can also be a by-product of incomplete heterotrophic denitrification (Liu et al. 2021).

According to Su et al. (2017) and Zheng et al. (2021), the parameters of operation of a wastewater treatment plant such as low DO concentration and the aeration strategy have a considerable effect on the N₂O emission. An effective way to reduce N₂O emission proved to be the introduction of IA. According to Ni et al. (2013), increasing the cycle frequency of periodic aeration may cause a reduction in N₂O emission.

Liu et al. (2021), investigating N₂O emission in two activated sludge SBR reactors, observed lower N₂O emission for the system operating with IA SBR1 (average 0.19%) than for that operating with continuous aeration (SBR2) (average 0.42%) (Table 7). The analysis of study results of Lo et al. (2010) suggests that the amount of N₂O emission also depends on the form of biomass in the reactor and DO concentration. In their research in a hybrid SBR reactor for simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal, the cited authors conducted an experiment for the hybrid system, then separated activated sludge and biofilm to different reactors, and analysed the emission of N₂O in each of these solutions. The highest N₂O emission was recorded when the reactor operated as a hybrid—21.2%. When particular forms of biomass were separated, N₂O emission reached 0.5% for biofilm and 4.2% for activated sludge, respectively. Low emission of N₂O in tests conducted for biofilm was associated with the fact that a higher abundance of microorganisms inhabiting this form of biomass was constituted by heterotrophic bacteria and the internal part of

the biofilm provided for anoxic conditions suitable for N₂O reduction (Table 7).

In this study, reducing the duration of aerated sub-phases from 30 min (S.I.) to 20 min (S.II.) caused an increase in N₂O emission from 0.896% to 1.091%. The obtained values are, respectively, 4.72 times and 5.74 times higher than those determined for activated sludge with intermittent aeration by Liu et al. (2021). This suggests that the form of biomass in the reactor has a considerable effect on the analysed phenomenon. Differences between the values recorded in this study and those determined for the hybrid system by Lo et al. (2010) are almost 24 (S.I.) and 20 (S.II.) times lower. It could have been determined by oxygen concentration values and the applied aeration strategy, because they conducted the experiment with continuous aeration and DO reaching 0–1.5 mgO₂/L. Microbiological analysis done by Godzieba et al. (2022) showed that bacteria able to conduct autotrophic denitrification, one of potential sources of N₂O, also developed in the system. The biomass contained e.g. *Hydrogenophaga* sp., *Paracoccus*, *Thauera*, and *Rhodobacter*, but there was no increase in any of them between the two analysed series.

According to Polish legislation, the fee for the emission of 1 mgN₂O in 2022 is 94.36 PLN (20.56 €). With a reduction in the duration of non-aerated sub-phases from 30 min to 20 min, the average payment for the emission of one of the primary greenhouse gases from the discussed system in 1 day would increase by almost 32% from 51.53 PLN/d (11.23 €/d) to 67.60 PLN/d (14.73 €/d).

To sum up, this study evidenced that in the IFAS-MBSBBR system with intermittent aeration at $R = 1/3$ and $DO = 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$, next to a reduction in costs related to aeration, lower N_2O emission is also obtained in comparison with the system operating at the same DO and $R = 1/2$.

Conclusions

- The greatest ammonia oxidation activity was evidenced in activated sludge flocs, while the activity of nitrite nitrogen oxidation was higher for biofilm.
- The response of ammonia-oxidizing bacteria to the reduction in the reactor's organic and nitrogen loading rate was stronger than that of nitrite-oxidizing bacteria.
- A reduction in the duration of aerated sub-phases in a system with intermittent aeration and air pumps controlled through switching them on and off according to both the adopted R value and the assumed oxygen concentration caused no decrease in energy use for aeration. Lower energy use was recorded when the duration of aerated sub-phases was longer.
- In intermittently aerated IFAS-MBSBBR, lower N_2O emission was recorded when the reactor operated with a longer duration of aerated sub-phases.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04715-6>.

Acknowledgements This research was funded by the Polish National Science Centre under Project No. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

Author contributions Conceptualization was performed by OZ and MZ-S; formal analysis by OZ; investigation by OZ; methodology by OZ, MZ-S; project administration by MZ-S; supervision by MZ-S; visualization by OZ; writing—original draft—by OZ; writing—review & editing—by MZ-S. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Declarations

Conflict of interest The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose. The authors declare that they have no conflict of interest.

Human and animal rights This article does not any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in

the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Al-Hazmi HE, Lu X, Majtacz J, Kowal P, Xie L, Makinia J (2020) Optimization of the aeration strategies in a deammonification sequencing batch reactor for efficient nitrogen removal and mitigation of N_2O production. *Environ Sci Technol* 55(2):1218–1230. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04229>
- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* 48(5):835–852
- Bhatia A, Singh NK, Bhando T, Pathania R, Kazmi AA (2017) Effect of intermittent aeration on microbial diversity in an intermittently aerated IFAS reactor treating municipal wastewater: a field study. *J Environ Sci Health A* 52(5):440–448. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1271665>
- Blackburne R, Vadivelu VM, Yuan Z, Keller J (2007) Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Res* 41(14):3033–3042. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.043>
- Christensson M, Welander T (2004) Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area. *Water Sci Technol* 49(11–12):207–214. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0843>
- Chung J, Bae W, Lee YW, Rittmann BE (2007) Shortcut biological nitrogen removal in hybrid biofilm/suspended growth reactors. *Process Biochem* 42:320–328. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.002>
- Di Trapani D, Christensson M, Torregrossa M, Viviani G, Ødegaard H (2013) Performance of a hybrid activated sludge/biofilm process for wastewater treatment in a cold climate region: influence of operating conditions. *Biochem Eng J* 77:214–219. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.06.013>
- Federation WE, Association A (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA), Washington, DC, USA, p 21
- Godzieba M, Zubrowska-Sudol M, Walczak J, Ciesielski S (2022) Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Sci Rep* 12:12558. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>
- Jiang Y, Poh LS, Lim CP, Pan C, Ng WJ (2019) Effect of free ammonia inhibition on process recovery of partial nitrification in a membrane bioreactor. *Bioresour Technol Rep* 6:152–158. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.02.014>
- Liu T, Liu S, He S, Tian Z, Zheng M (2021) Minimization of N_2O emission through intermittent aeration in a sequencing batch reactor (SBR): main behavior and mechanism. *Water* 13(2):210. <https://doi.org/10.3390/w13020210>
- Lo IW, Lo KV, Mavinic DS, Shiskowski D, Ramey W (2010) Contributions of biofilm and suspended sludge to nitrogen transformation and nitrous oxide emission in hybrid sequencing batch system. *J Environ Sci (china)* 22(7):953–960. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60204-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60204-7)
- Luo L, Dzakupasu M, Yang B, Zhang W, Yang Y, Wang XC (2019) A novel index of total oxygen demand for the comprehensive evaluation of energy consumption for urban wastewater treatment. *Appl Energy* 236:253–261. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.11.101>
- Meng J, Hu Z, Wang Z, Hu S, Liu Y, Guo H, Li J, Yuan Z, Zheng M (2022) Determining factors for nitrite accumulation in an

- acidic nitrifying system: influent ammonium concentration, operational pH, and ammonia-oxidizing community. *Environ Sci Technol* 56(16):11578–11588. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07522>
- Ni BJ, Smets BF, Yuan Z, Pellicer-Nàcher C (2013) Model-based evaluation of the role of Anammox on nitric oxide and nitrous oxide productions in membrane aerated biofilm reactor. *J Membr Sci* 446:332–340. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.06.047>
- Onnis-Hayden A, Majed N, Schramm A, Gu AZ (2011) Process optimization by decoupled control of key microbial populations: distribution of activity and abundance of polyphosphate-accumulating organisms and nitrifying populations in a full-scale IFAS-EBPR plant. *Water Res* 45(13):3845–3854. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.039>
- Pal L, Kraigher B, Brajer-Humar B, Levstek M, Mandic-Mulec I (2012) Total bacterial and ammonia-oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. *Bioresour Technol* 110:135–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.130>
- Park HD, Regan JM, Noguera DR (2002) Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic Orbal processes. *Water Sci Technol* 46(1–2):273–280. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0489>
- Pedrouso A, Val del Río Á, Morales N, Vázquez-Padín JR, Campos JL, Méndez R, Mosquera-Corral A (2017) Nitrite oxidizing bacteria suppression based on in-situ free nitrous acid production at mainstream conditions. *Sep Purif Technol* 186:55–62. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.043>
- Podedworna J, Zubrowska-Sudol M (2012) Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase. *Environ Technol* 33(1–3):237–245. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.563428>
- Regmi P, Thomas W, Schafran G, Bott C, Rutherford B, Waltrip D (2011) Nitrogen removal assessment through nitrification rates and media biofilm accumulation in an IFAS process demonstration study. *Water Res* 45(20):6699–6708. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.009>
- Regulation of the Minister of Marine Economy and Inland Navigation of 12 July 2019 regarding substances particularly harmful to the water environment, and conditions that need to be met in the introduction of sewage to waters or soils, as well as in discharge of precipitation or melt waters to waters or to water facilities [Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żegluga Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych] (in Polish)
- Roots P, Wang Y, Rosenthal AF, Griffin JS, Sabba F, Petrovich M, Yang F, Kozak JA, Zhang H, Wells GF (2019) Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Res* 157:396–405. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.060>
- Sabba F, Terada A, Wells G, Smets BF, Nerenberg R (2018) Nitrous oxide emissions from biofilm processes for wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(22):9815–9829. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9332-7>
- Schreiber F, Wunderlin P, Udert KM, Wells GF (2012) Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Front Microbiol* 3:372. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00372>
- Shao Y, Shi Y, Mohammed A, Liu Y (2017) Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): comparison of suspended flocs and attached biofilm. *Int Biodeterior Biodegrad* 116:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.026>
- Singh NK, Bhatia A, Kazmi AA (2017) Effect of intermittent aeration strategies on treatment performance and microbial community of an IFAS reactor treating municipal waste water. *Environ Technol* 38(22):2866–2876. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1281349>
- Singh NK, Pandey S, Singh RP, Dahiya S, Gautam S, Kazmi AA (2018) Effect of intermittent aeration cycles on EPS production and sludge characteristics in a field scale IFAS reactor. *J Water Process Eng* 23:230–238. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.012>
- Singh NK, Yadav M, Singh RP, Kazmi AA (2019) Efficacy analysis of a field scale IFAS reactor under different aeration strategies applied at high aeration rates: a statistical comparative analysis for practical feasibility. *J Water Process Eng* 27:185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.12.001>
- Su Q, Ma C, Domingo-Félez C, Kiil AS, Thamdrup B, Jensen MM, Smets BF (2017) Low nitrous oxide production through nitrifier-denitrification in intermittent-feed high-rate nitrification reactors. *Water Res* 123:429–438. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.067>
- Sun Y, Wang H, Wu G, Guan Y (2018) Nitrogen removal and nitrous oxide emission from a step-feeding multiple anoxic and aerobic process. *Environ Technol* 39(7):814–823. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1311947>
- Wang H, Guan Y, Pan M, Wu G (2016) Aerobic N₂O emission for activated sludge acclimated under different aeration rates in the multiple anoxic and aerobic process. *J Environ Sci* 43:70–79. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.08.010>
- Yang S, Yang F (2011) Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor. *J Hazard Mater* 195:318–323. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.045>
- Zhang F, Li P, Chen M, Wu J, Zhu N, Wu P, Chiang P, Hu Z (2015) Effect of operational modes on nitrogen removal and nitrous oxide emission in the process of simultaneous nitrification and denitrification. *Chem Eng* 280:549–557. <https://doi.org/10.1016/j.ccej.2015.06.016>
- Zheng M, Zhou N, He S, Chang F, Zhong J, Xu S, Wang Z, Liu T (2021) Nitrous oxide (N₂O) emissions from a pilot-scale oxidation ditch under different COD/N ratios, aeration rates and two shock-load conditions. *J Environ Manage* 280:111657. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111657>



Supplementary material

Nitrification kinetics, N₂O emission and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates.

International Journal of Environmental Science and Technology

Olga Zajac^{a,*} and Monika Zubrowska-Sudol^a

^a Warsaw University of Technology, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Nowowiejska 20, 00 653 Warsaw, Poland

* Corresponding author. E-mail address: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl (O. Zajac)

Supplementary material - - Influent and effluent characteristics of IFAS-MBSBBR

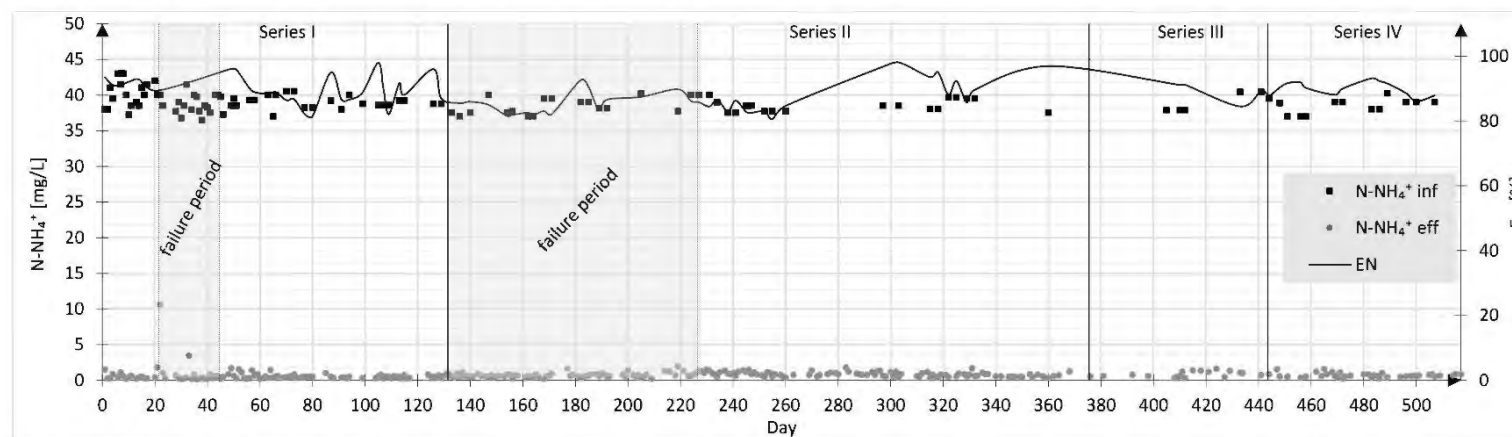


Figure 1. Influent and effluent concentrations and removal efficiencies of ammonia nitrogen

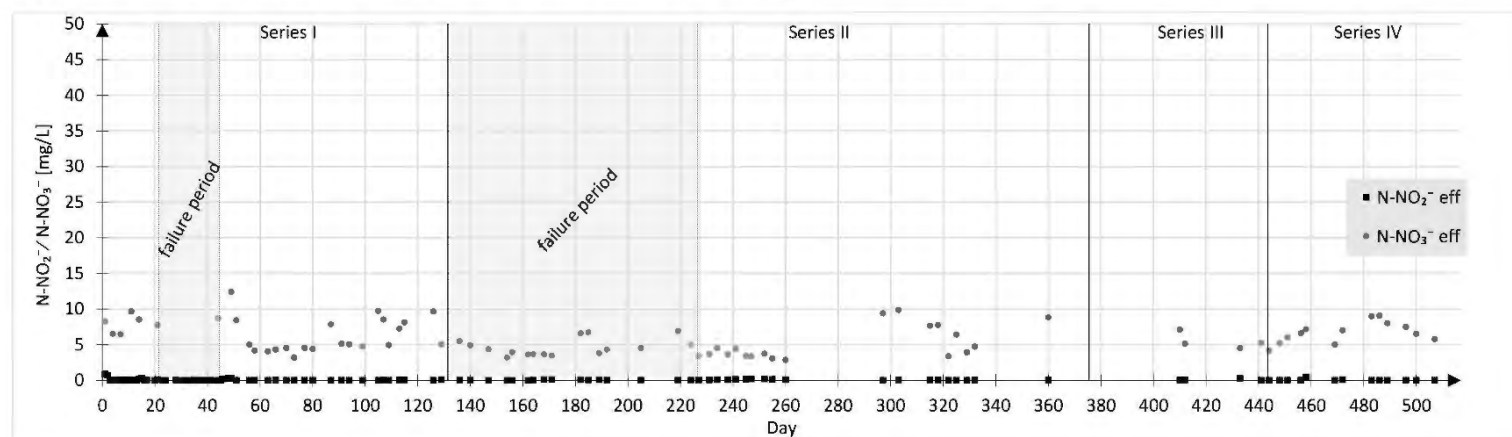


Figure 2. Effluent concentrations of nitrite and nitrate nitrogen

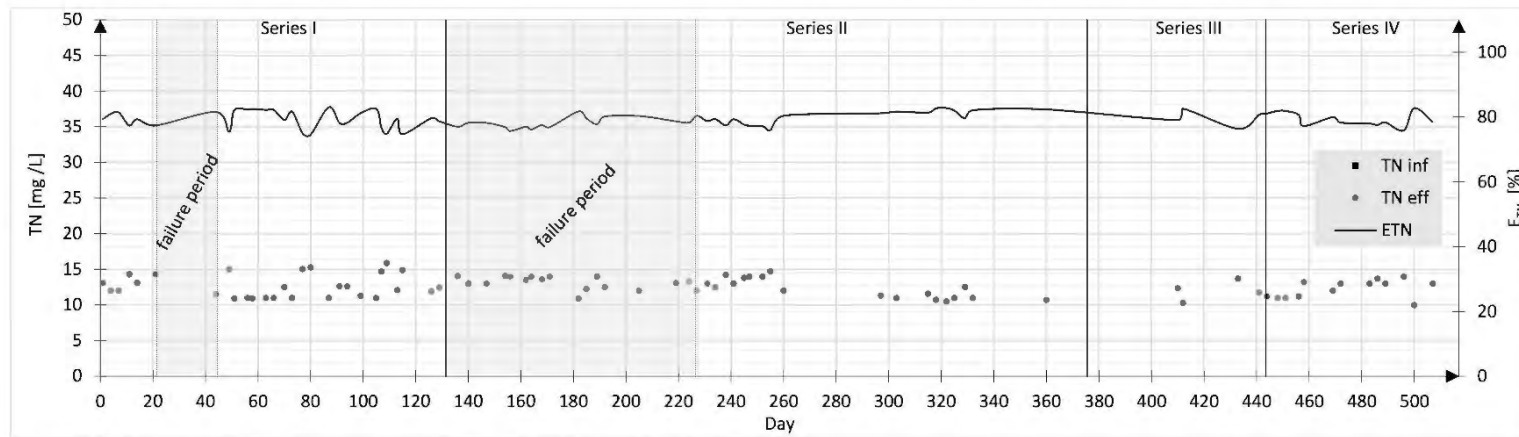


Figure 3. Influent and effluent concentrations and removal efficiencies of total nitrogen

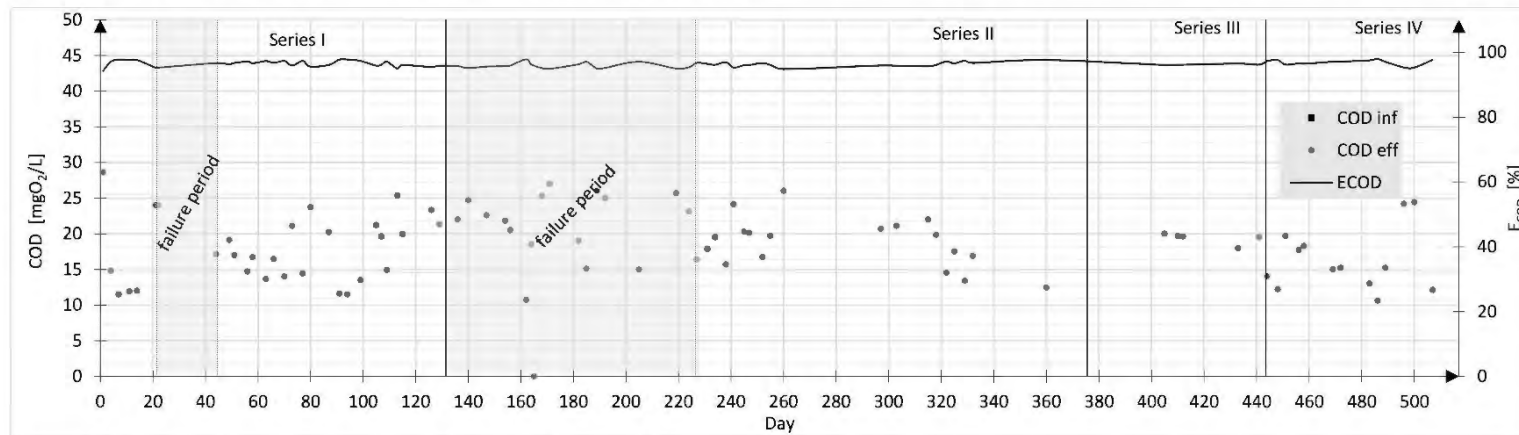


Figure 4. Influent and effluent concentrations and removal efficiencies of COD

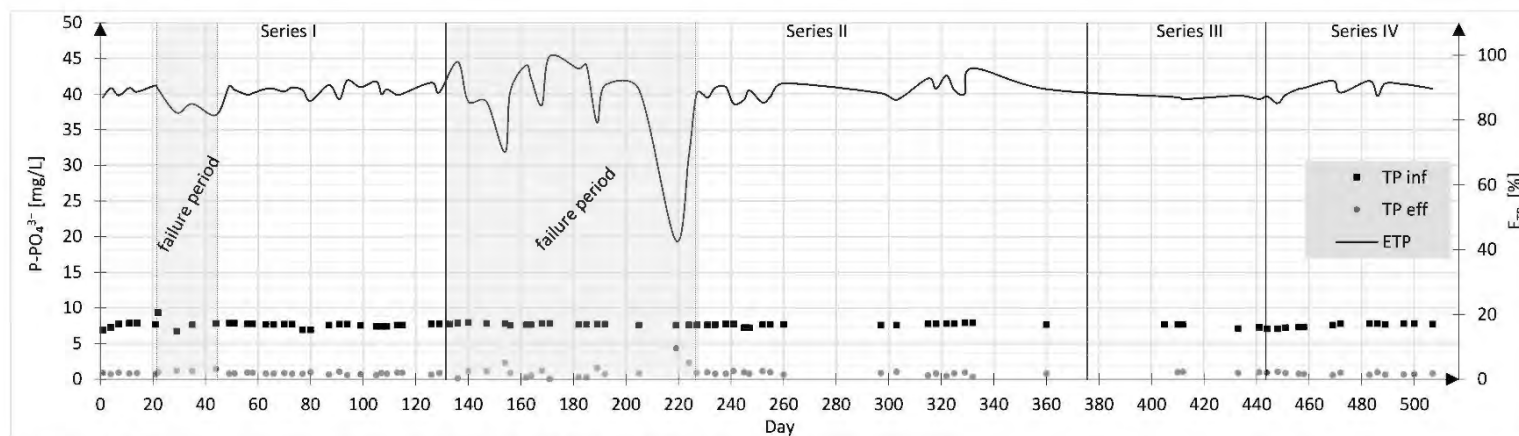


Figure 5. Influent and effluent concentrations and removal efficiencies of phosphorus

Supplementary material -- Results of particular AUR and NitUR tests

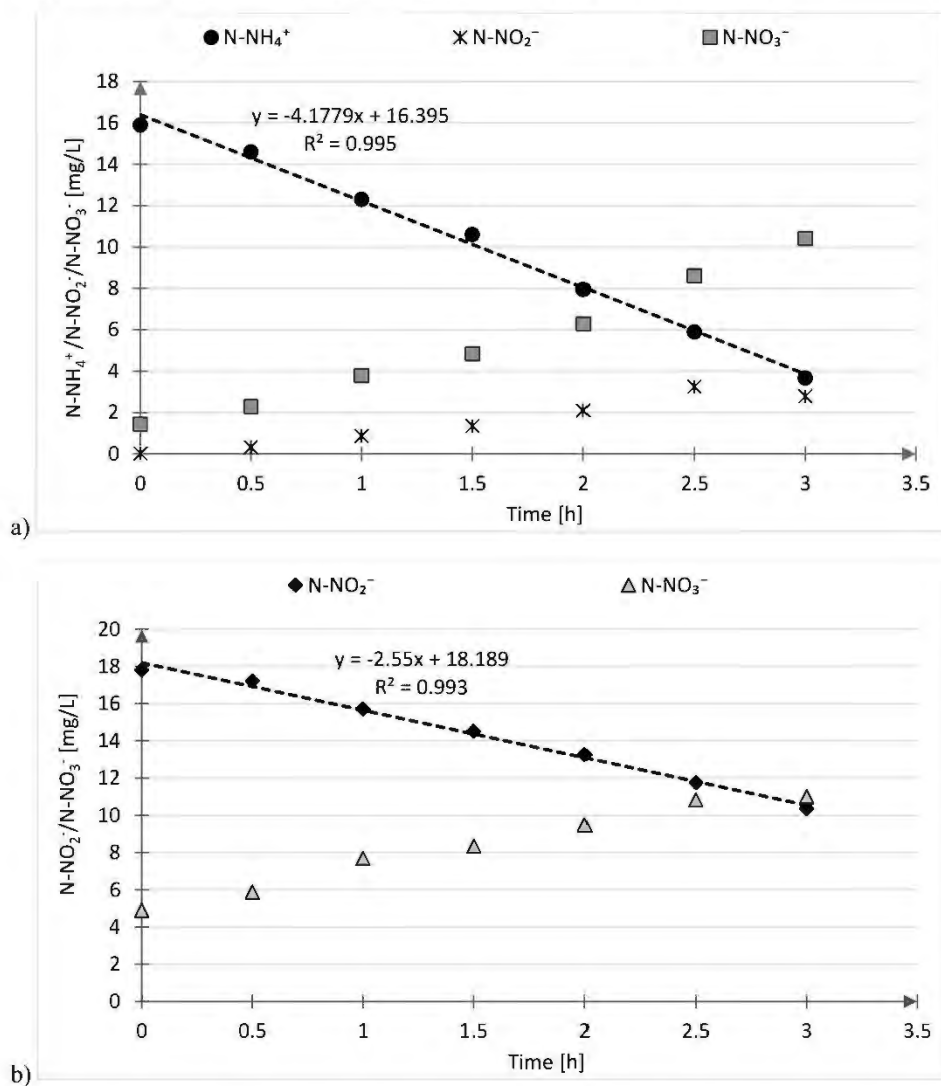


Figure 6. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Series I

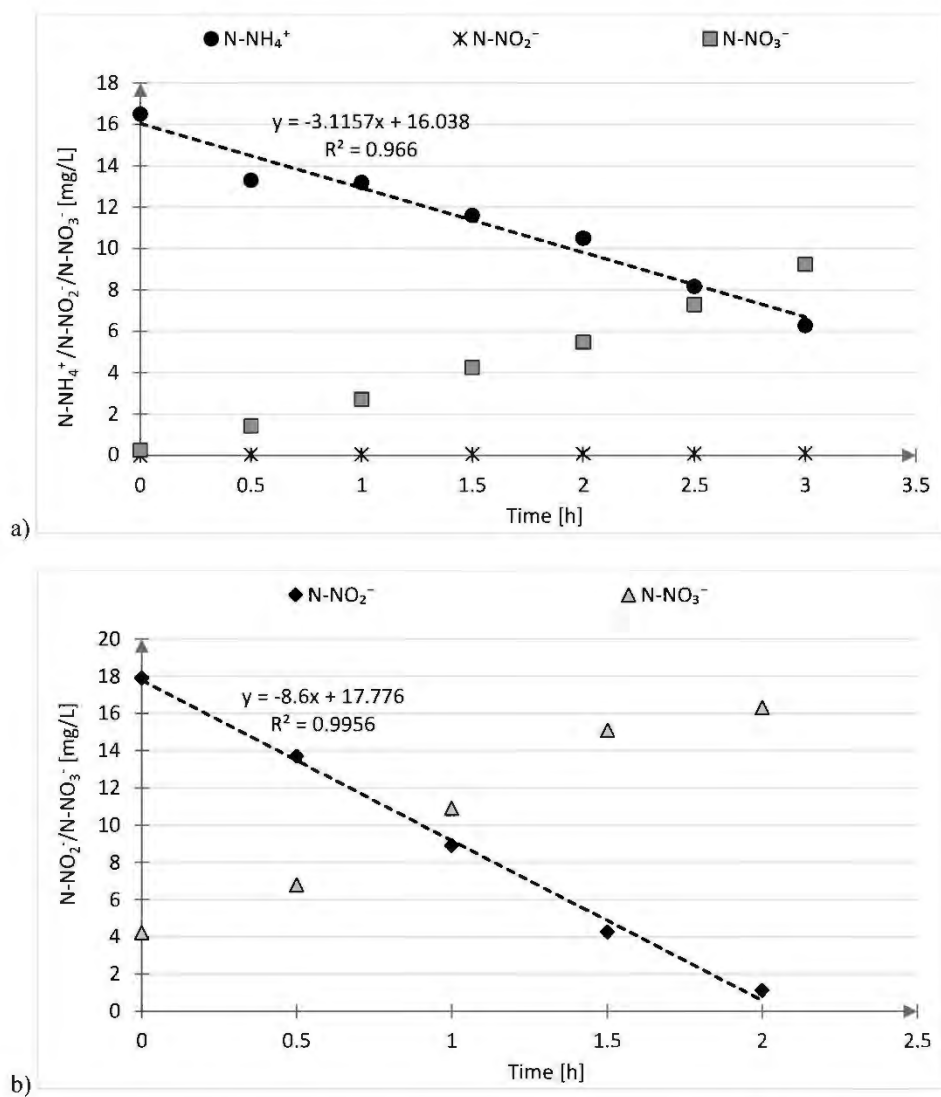


Figure 7. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B, Series I

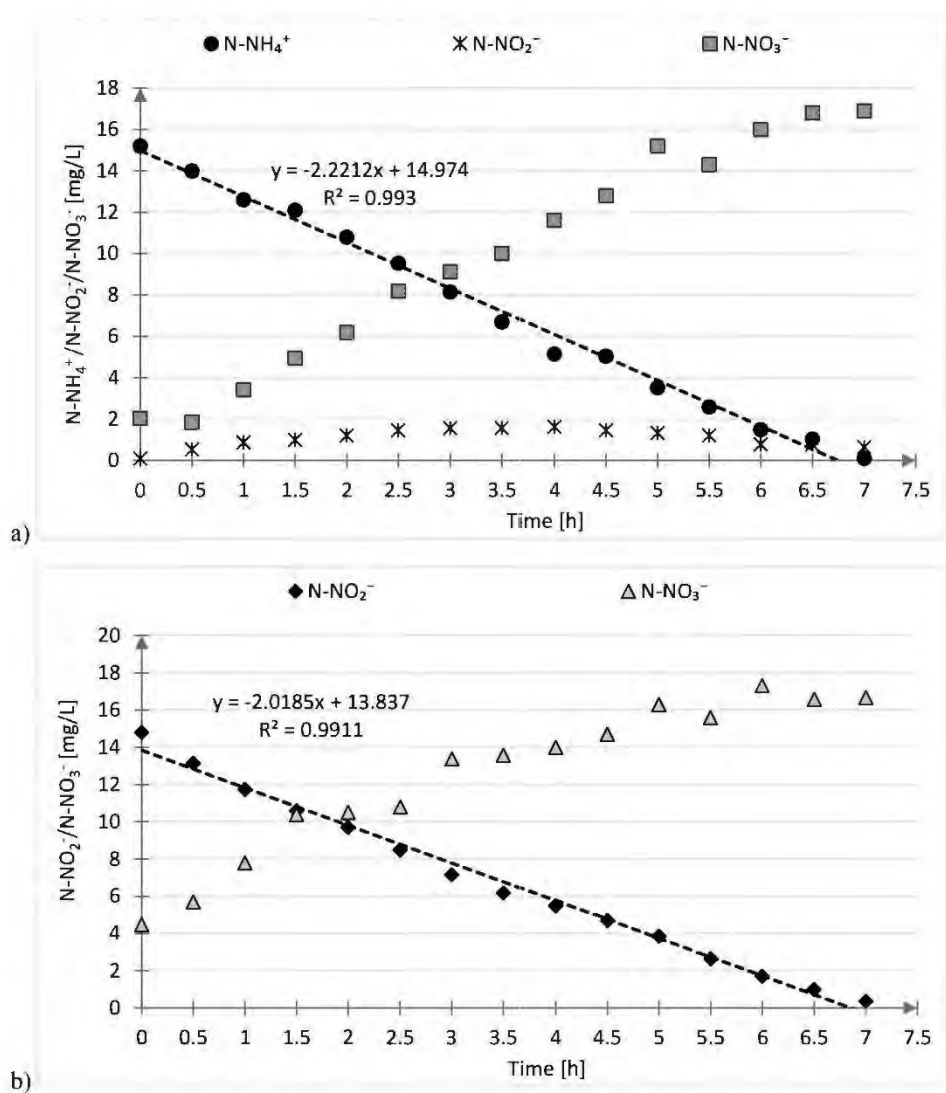


Figure 8. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Series II

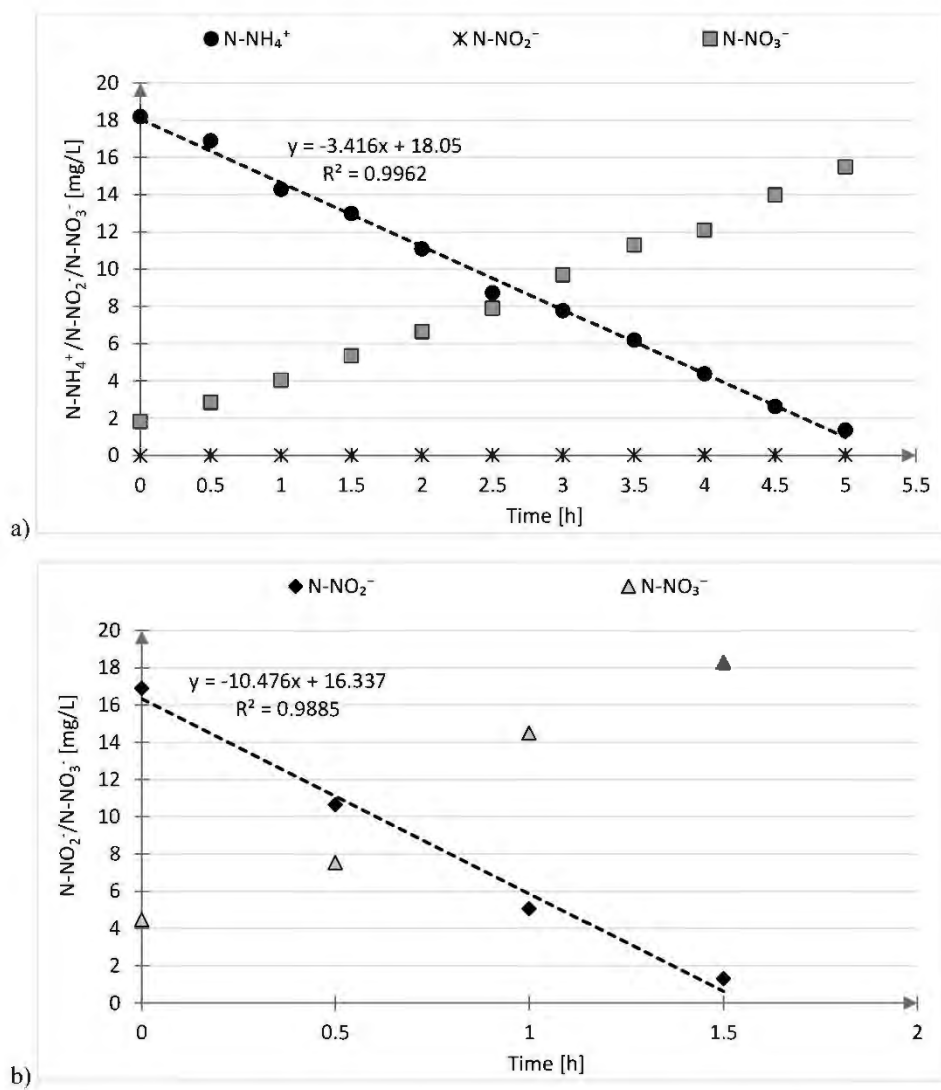


Figure 9. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Series II

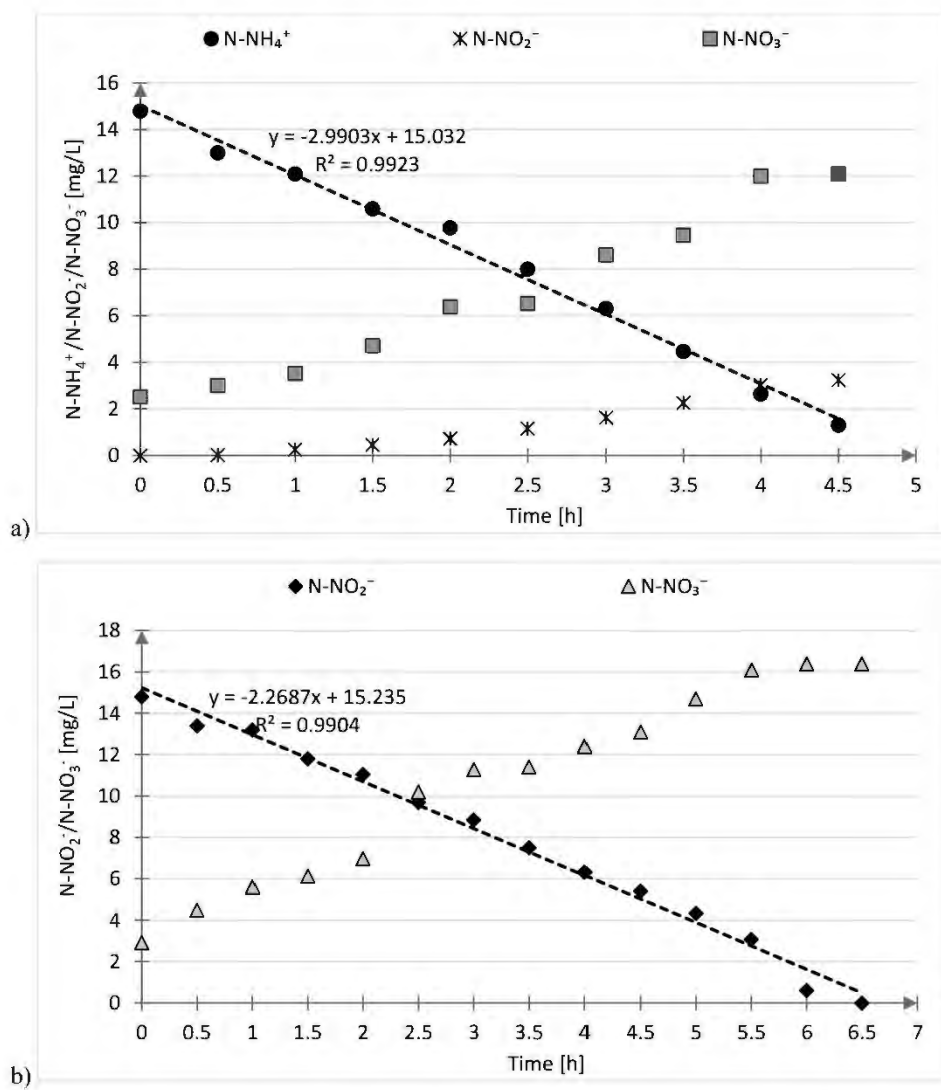


Figure 10. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Series III

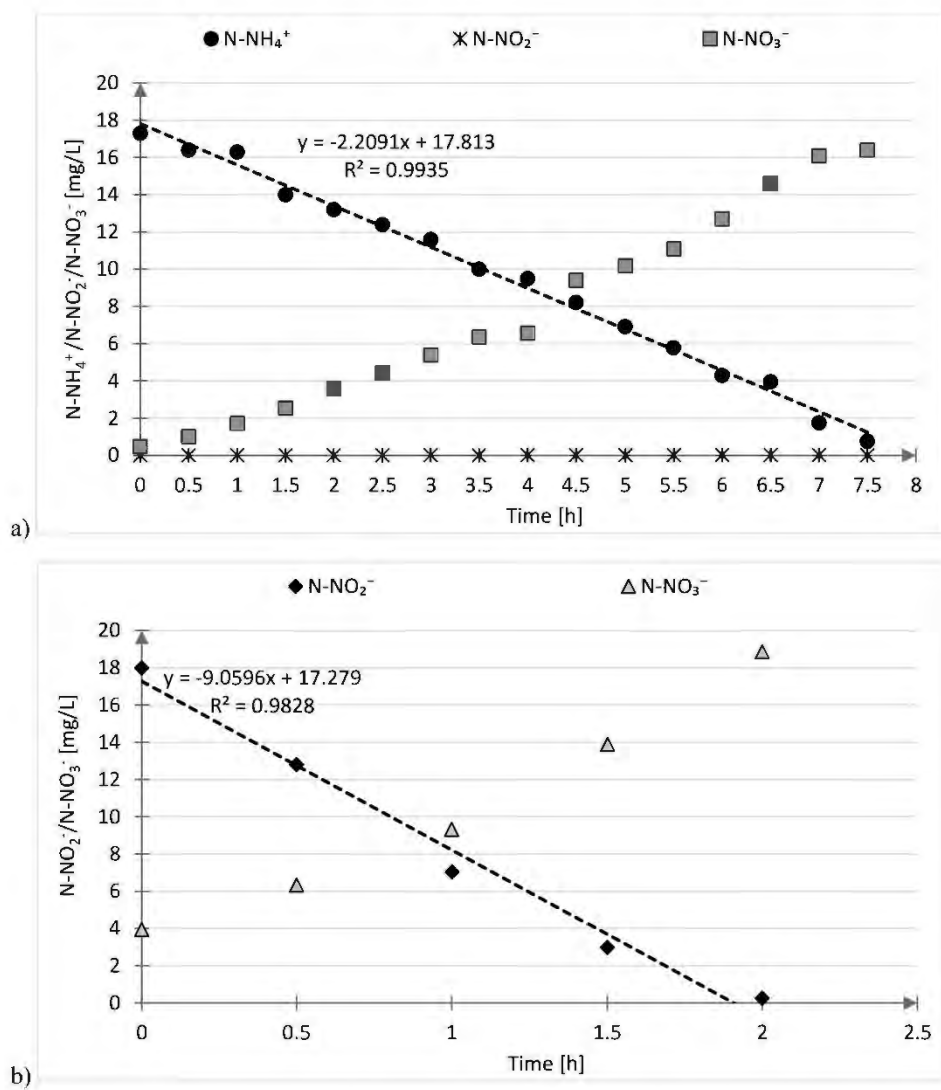


Figure 11. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Series III

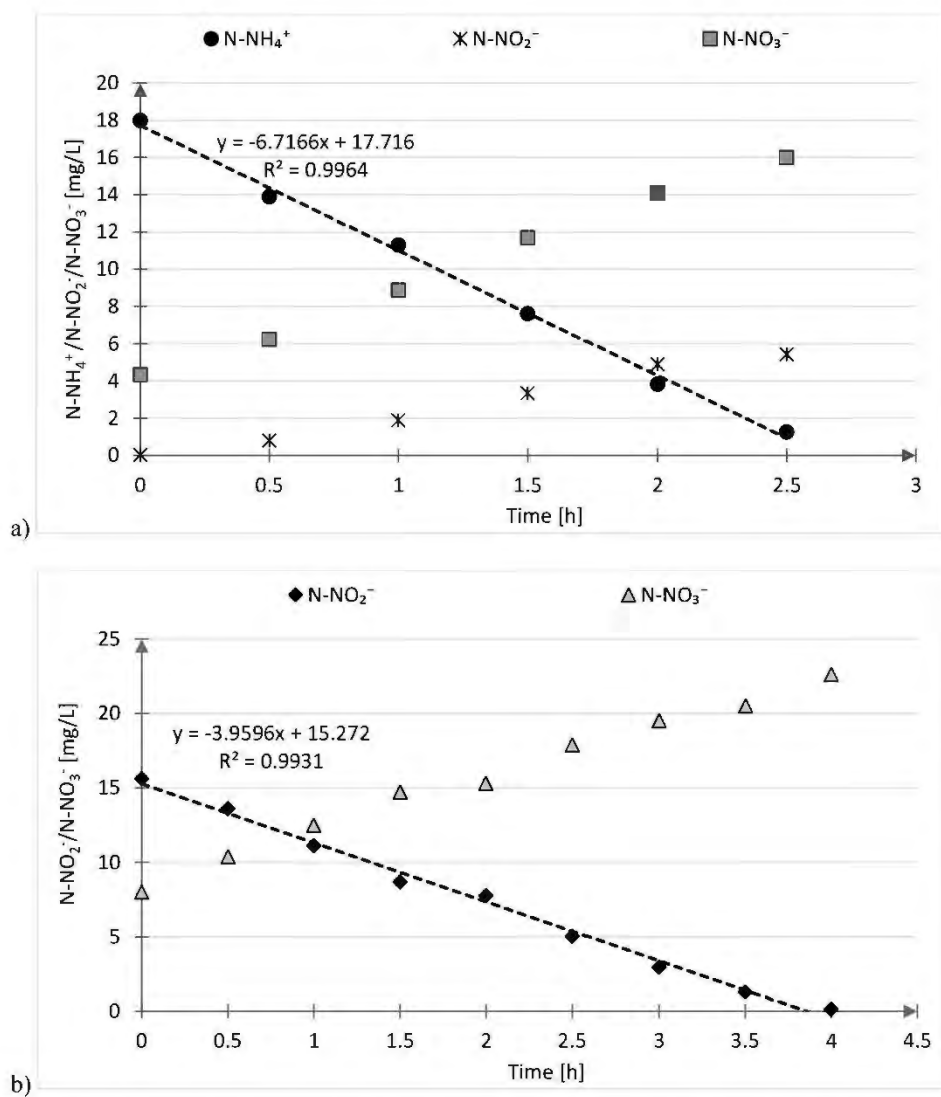


Figure 12. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-SB (b) NitUR-SB. Series IV

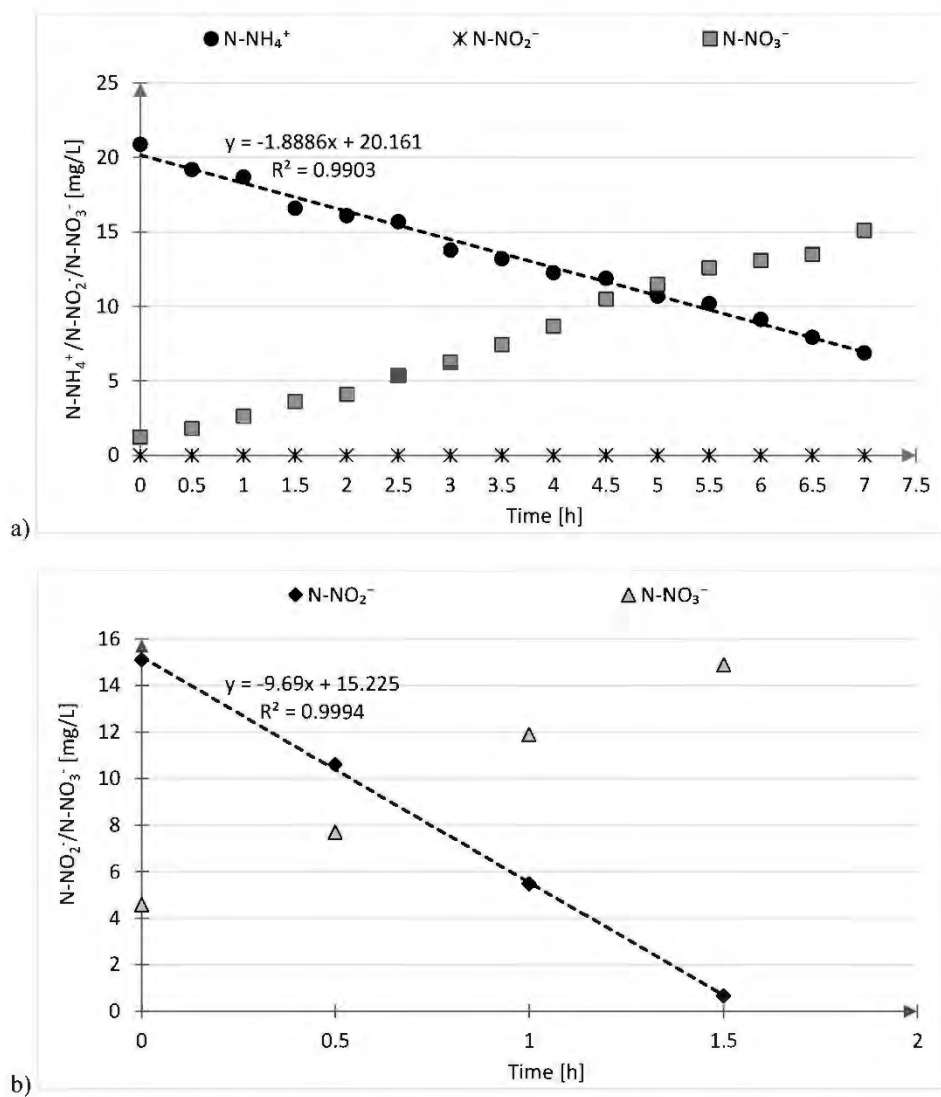


Figure 13. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B (b) NitUR-B. Series IV

**OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW
O UDZIALE W PUBLIKACJI**

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Olga Zając oświadczam, że mój wkład merytoryczny w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 70%.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M. (2023). Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20 (9), 10061–10074, <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04715-6>. IF:3,00; punkty MNiSW: 70.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmował szczegółowy przegląd literatury, który posłużył do identyfikacji problemu badawczego oraz opracowania koncepcji pracy. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie metodyki badawczej, a także za zaplanowanie i wykonanie eksperymentów (sprawowanie kontroli nad układem badawczym i aparaturą pomiarową, przygotowywanie ścieków, przeprowadzanie testów kinetycznych, wykonywanie analizy fizyko-chemicznej jakości ścieków surowych i oczyszczonych, opracowanie wyników pomiaru emisji N₂O i zużycia energii elektrycznej na napowietrzanie). Koordynowałam całym procesem badawczym, monitorując wszystkie etapy badań. Przeprowadziłam analizę statystyczną uzyskanych wyników. Odpowiadałam za interpretację i dyskusję wszystkich uzyskanych wyników badań. Byłam odpowiedzialna za wizualizację danych. Przygotowałam manuskrypt i materiały uzupełniające. Pełniłam również obowiązki autora korespondencyjnego.

20.09.2024r. Olga Zając.....
Data i podpis współautora

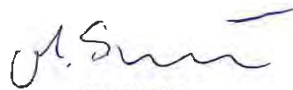
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Monika Żubrowska-Sudoł, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 70% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M. (2023). Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20 (9), 10061–10074, <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04715-6>. IF:3,00; punkty MNiSW: 70.

Mój udział jako współautora pracy wynikał z pełnionej funkcji promotora. Obejmował: 1) nadzór merytoryczny nad przeglądem literatury prowadzonym przez Doktorantkę, 2) korektę merytoryczną koncepcji badawczej, metodyki badań oraz manuskryptu, 3) nadzór nad czynnościami badawczymi prowadzonymi przez Doktorantkę, 4) pozyskanie funduszy.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 30%.

20.09.2024 

.....
Data i podpis współautora

Publikacja nr 4

Zajac, O., Zielińska, M., Żubrowska-Sudoł, M.

(2024)

Enhancing wastewater treatment efficiency:

A hybrid technology perspective with energy-saving strategies

Bioresource Technology, 399, 130593,

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>

IF: 9,70; punkty MNiSW: 140



Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies

Olga Zajac^{a,*}, Magdalena Zielinska^b, Monika Zubrowska-Sudol^a

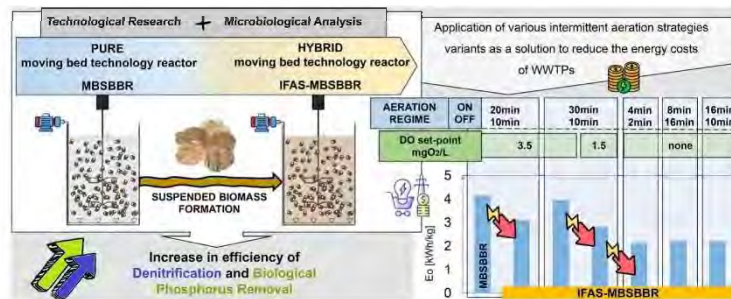
^a Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland

^b Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna St. 45G, 10-709 Olsztyn, Poland

HIGHLIGHTS

- Pure moving bed reactor turned into a hybrid without extra sludge inoculation.
- The effect of various intermittent aeration regimes on energy use was investigated.
- Activated sludge presence improved efficiencies of denitrification and P removal.
- Significant drop in energy consumption for aeration was noted after hybrid formation.
- The high nitrification efficiency could be attributed to heterotrophic nitrifiers.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

C, N, and P removal
Moving bed
Hybrid technology
Intermittent aeration
Energy use for aeration

ABSTRACT

The study aimed to investigate how hybrid technology, combined with various intermittent aeration (IA) strategies, contributes to reducing the energy costs of wastewater treatment while simultaneously ensuring a high treatment efficiency. Even with IA subphases lasting half as long as those without aeration, and oxygen levels reduced from 3.5 to 1.5 mg O₂/L, pollutants removal efficiency remains robust, allowing for a 1.41-fold reduction in energy consumption (E_o). Hybrid technology led to a 1.34-fold decrease in E_o, along with improved denitrification efficiency from 74.05 ± 4.71 to 81.87 ± 2.43 % and enhanced biological phosphorus removal from 35.03 ± 4.25 to 87.32 ± 3.64 %. The high nitrification efficiency may have been attributed to the abundance of *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Rhodococcus*, which outcompeted the genera of autotrophic nitrifying bacteria, suggesting that the hybrid system is favorable for the growth of heterotrophic nitrifiers.

1. Introduction

Clean water and global warming are two crucial and interconnected issues that pose significant challenges on a global scale. In the context of

these challenges, effective wastewater treatment plays a fundamental role, as it is essential for preventing water pollution and maintaining environmental cleanliness. To achieve this, innovative wastewater treatment technologies, well-developed sewage infrastructure, and

* Corresponding author.

E-mail address: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl (O. Zajac).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>

Received 16 December 2023; Received in revised form 13 March 2024; Accepted 14 March 2024

Available online 15 March 2024

0960-8524/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

increased societal awareness are key. Actions undertaken to preserve clean water are not only fundamental to human health and ecosystems, but also have a significant impact on global efforts to address climate change.

The primary task of municipal wastewater treatment plants (WWTPs) is to remove pollutants such as carbon, nitrogen, phosphorus, and suspended solids from wastewater to protect the purity of surface and groundwater and to ensure public health. Many different solutions and technologies are applied globally for biological wastewater treatment. Depending on the type of pollutants, scale, as well as climatic and economic conditions, various treatment methods can be employed, such as wastewater treatment using biofilm-based systems. Among these, hybrid systems based on a combination of biofilm attached to moving or fixed beds and activated sludge have been gaining popularity in recent times (Singh et al., 2017). Integrated fixed-film activated sludge (IFAS) systems combine the benefits of systems based on both activated sludge and biofilm while mitigating their respective drawbacks, potentially improving removal efficiencies and resilience to variable wastewater composition. Their essential features include minimal space requirements, low construction costs, and straightforward operation. Additionally, these systems remove pollutants very efficiently. They are also characterized by minimal sludge production, high biomass concentration, lower head loss, and a lack of clogging problems. The coexistence of biofilm and activated sludge favors the growth of autotrophic and heterotrophic bacteria, leading to increased nitrogen and phosphorus removal, along with efficient dissolved organic carbon elimination (Boltz et al., 2009).

Many researchers highlight the potential for increasing the efficiency of activated sludge-based methods by incorporating moving carriers into the reactor, creating a hybrid system (e.g. Dang et al., 2020). However, there is a lack of in-depth studies on the improvements in biofilm-based systems via development of activated sludge. This paper attempts to fill this gap by precisely addressing this issue. In our study, a sequencing batch reactor based on pure moving bed technology was employed. By introducing a sedimentation phase, the development of activated sludge without the need for any additional external inoculation was facilitated. A seeding phenomenon was observed, in which biofilm detached from the carriers was conveyed to the reactor basin, serving as an inoculation for the formation of activated sludge flocs. Although the seeding phenomenon had been previously documented in studies with IFAS reactors, it had never been observed from its inception, that is, the creation of activated sludge “from scratch” that was directly derived from the biofilm. Previously, detached biofilm fragments were seeded into the existing activated sludge. It is believed that biofilm, detached from the carriers, enriched with nitrifiers, and passed into the activated sludge, has better access to dissolved substances, thereby enhancing the efficiency of biological nitrogen removal (Waqas et al., 2020).

In addition to more efficient removal of pollutants from wastewater, WWTPs have also recently focused on reducing their negative environmental impact and minimizing treatment costs. One of the ways to minimize WWTP costs while positively affecting the environment is to reduce their demand for electricity.

Global electricity consumption has been steadily increasing due to population growth, industrialization, and technological advancements. According to the International Energy Agency, in 2019, the world's total electricity consumption reached 22,848 terawatt-hours (IEA, 2021). The U.S. Energy Information Administration indicates that, by 2021, this value had increased by 11 %, reflecting a high growth rate over 2 years (EIA, 2023). WWTPs are significant consumers of energy, accounting for approximately 4 % of the world's total energy consumption (IEA, 2017). This energy is utilized for various purposes, including powering pumps, blowers, mixers, and other equipment used in treatment processes. Moreover, electricity is used for monitoring and control systems and lighting. From 25 to 60 % of operational costs in conventional WWTPs are related to energy use for all the aforementioned purposes, and aeration accounts for 50–75 % of their total energy use (Luo et al.,

2019). Proper aeration is crucial for nitrification, a key step in the nitrogen cycle. Importantly, energy loss during aeration can reach up to 40 % of total energy consumption for the entire process (Foladori et al., 2015). It is therefore important to carefully select the operational parameters and employ appropriate technologies to achieve both high-quality treatment and reduced electricity use. Among the proposed solutions for minimizing energy consumption for aeration, intermittent aeration (IA) has been highlighted. The relevant papers concern systems based on activated sludge (Sun et al., 2018), those with biomass in the form of a biofilm (Yang and Yang, 2011), and hybrid solutions (Singh et al., 2017), which have recently been gaining more popularity. However, there has been limited research on energy consumption for aeration by the IA variants used in reactors. This study addressed this gap in knowledge, focusing on hybrid technology, which has been less well-studied, and the application of which is becoming increasingly significant. It is particularly relevant that one of the main drawbacks of this technological solution, limiting its application, is higher energy consumption for aeration than other systems. Data on energy consumption by different IA variants will enable assessment of whether a given strategy is practical and economically justified. This, in turn, could lead to technological improvements, process optimization, and more sustainable energy utilization in hybrid systems, further increasing their popularity.

In light of the above, the primary objective of this study was to demonstrate how WWTP efficiency can be improved by applying hybrid technology, achieved through the development of activated sludge from biofilm without any extra sludge inoculation in a reactor operated with pure moving bed technology. Particular emphasis was placed on the nitrification process, given the substantial impact on electrical energy costs incurred by aeration. Significantly, energy use for aeration was also reduced by implementing various IA variants and developing activated sludge within a pure biofilm reactor. So far, there is a lack of in-depth studies addressing this issue in hybrid reactors, and an analysis combining the results of technological and microbiological research will allow for a comprehensive assessment. This approach aimed to reduce overall energy costs in WWTPs while maintaining a high level of wastewater treatment efficiency.

2. Materials and methods

2.1. Description of the sequencing batch reactor

The experiment was conducted in a 28 L laboratory-scale moving bed sequencing batch biofilm reactor (MBSBBR). As a carrier of biofilm, a EvU-Pearl® moving bed was applied, with a specific active area of 600 m²/m³ and the shape of a cylinder with corrugated internal and external surface (EvU-Innovative Umwelttechnik GmbH, Germany). A detailed description of the reactor, as well as its scheme, is presented in the [Supplementary Material \(Fig. A.1.\)](#).

2.2. Operating conditions

The experiment consisted of two stages (A and B), with specific series designated based on introduced changes (see [Supplementary Material – Tab. A.1](#)). Stage A was preceded by the reactor start-up period, aimed at developing a biofilm on moving carriers (see [Supplementary Material – Fig. A.2](#)) and achieving a stable nitrification process (efficiency > 90 %). The reactor was inoculated with activated sludge from the WWTP “Czajka” (Warsaw, Poland, 2,100,000 PE).

Throughout the experiment, certain methodological assumptions of operational parameters remained consistent across all series. The reactor was operated in three 8-hour cycles each day (see [Supplementary Material – Fig. A.3](#)). At the beginning of unaerated phases, synthetic wastewater was dosed into the system – 6 L during the first unaerated phase, and 3.3 L during the second one (10 L per cycle, 30 L per day). Synthetic wastewater was prepared daily, and a detailed list of

compounds and their characteristics was provided in [Supplementary Material \(Tab. A.1 and Tab. A.2\)](#). During the aerobic phases, IA under automatic mode was applied with different regimes (cycles of aerationON + aerationOFF) (see [Supplementary Material – Tab. A.1](#)). In each of the series in stage A, the duration of the subphases with the blower turned on was longer than when it was turned off (the ratio between non-aerated and aerated subphases time – $R = \text{aerationOFF}/\text{aerationON} < 1$). In sA.s1., the reactor was operated as a pure moving bed technology, with only biofilm immobilized on the moving carriers (CB). Subsequently, to facilitate the development of the suspended form of biomass – activated sludge (AcS), without any extra sludge inoculation, a 50-minute sedimentation phase was introduced into the reactor's operating cycle before the decantation phase. This was achieved by reducing the duration of the second aerated phase to 150 min. The sedimentation phase allowed the biomass to settle before the decantation. The development of the activated sludge was permitted until it attained a concentration of 1.75 g TSS/L. This moment was considered as the end of sA.s2. and the beginning of the reactor's operation as a hybrid moving bed technology – IFAS-MBSBBR (sA.s3.). In all the above-described series, the reactor operated with IA in a 20 min + 10 min regime and a DO set-point of 3.5 mg O₂/L. In the next series (sA.s4.), the duration of subphases with the blower turned on was extended to 30 min, and the DO set-point was reduced to 1.5 mg O₂/L in sA.s5. (DO set-point was gradually lowered over several days). The DO set-point was selected based on literature reports and authors' previous studies to ensure that this parameter does not act as a limiting factor for the efficiency of the nitrification process ([Pal et al., 2012; Zojac et al., 2022](#)). The examples of DO concentration profiles for particular series throughout the day are presented in the [Supplementary Material \(Fig. A.4–Fig. A.11\)](#).

In stage B, IA was carried out with the assumption that the duration of subphases with aeration would be 2 times shorter than the duration of those without, and the ratio between them would be constant, and equal to $R = 2$. Additionally, aeration was not limited by the DO set-point. Hence, in sB.s1., IA in IFAS-MBSBBR was conducted in a 2 min + 4 min regime. Then, the duration of subphases with the blower turned on and off increased four-fold (8 min + 16 min), distinguishing sB.s2. In the last series, aeration occurred in a 16 min + 32 min regime (sB.s3.).

Throughout the experiment, N-NH₄⁺ concentration was monitored daily, and a complete analysis of influent and effluent quality was conducted twice a week. The analysis included measurements of COD, total nitrogen (TN), N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, total phosphorus (TP), P-PO₄³⁻, alkalinity, pH, and the concentration of biomass developed in the form of activated sludge. The quantity of biomass in the form of biofilm was checked twice during each series. All chemical analyses were performed in duplicates in accordance with APHA Standard Methods ([APHA, 2012](#)). The statistical analysis of the data related to the quality of treated wastewater and the efficiency of pollutant removal was conducted using Statistica 13.3PL software (detailed methodology in the [Supplementary Material – Appendix B](#)).

At the end of each series, kinetic batch tests, namely the Ammonia Utilization Rate Test (AUR) and Nitrite Utilization Rate Test (NitUR) were performed to monitor the activity of ammonia and nitrite oxidizers, respectively. The tests were conducted for biomass collected from MBSBBR/IFAS-MBSBBR (separately for CB and AcS) in still-mixing 2 L test reactors, under DO concentration near saturation levels at 20 °C, and with the addition of appropriate substrate – NH₄Cl (AUR test) or KNO₂ (NitUR test) (initial concentration of N-NH₄⁺ (AUR test) or N-NO₂⁻ (NitUR test) was 15 mg/L). The detailed batch test methodology was described by [Zojac et al. \(2022\)](#). In the selected series (see [Supplementary Material – Tab. A.1](#)), the day before conducting batch tests, samples of biomass were collected for next-generation sequencing (NGS).

2.3. Microbial community analyses

Biofilm and activated sludge samples were collected at the end of the

selected series (see [Supplementary Material – Tab. A.1](#)), stored at – 25 °C, and used for DNA extraction and NGS. The detailed methodology regarding DNA extraction, V3-V4 amplicons library preparation, as well as NGS of the 16S rRNA gene and bioinformatic analysis can be found in [Supplementary Material – Appendix B](#).

3. Results and discussion

3.1. Analysis of the microbial community structure

To investigate the dynamics of the microbial community that developed in the reactor, NGS was carried out. Nine samples of both the CB and AcS were taken from the system at the end of selected experimental series (see [Supplementary Material – Tab. A.1](#)), and analyzed by Illumina Mi-Seq paired end sequencing of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. The diversity and richness of the collected samples are shown in the [Supplementary Material \(Fig. C.1\)](#). The number of operational taxonomic units (OTUs) varied between 20,506 and 70,245 in CB samples, and 15,209 and 64,299 in AcS samples. The biofilm presented a greater number of identified OTUs than the activated sludge, except in sB.s2., where the AcS had 1.32 times more OTUs.

The Chao1 index provides a measure of the bacterial richness of a community, while the Shannon index indicates diversity within the community. These indices differed between the microbial communities in the various series. The diversity and richness index values of the attached biomass were highest when the system operated with pure moving bed technology (with respective Shannon and Chao1 indices of 5.55 and 213.16), whereas they were highest for the activated sludge in sA.s5. Moreover, Chao1 values corresponded well to Shannon values during whole experiment. For example, in sA.s5., the last one in stage A, the activated sludge exhibited higher microbial diversity and richness. However, this trend was reversed in the next two series, where the biofilm ensured higher diversity and richness of the microorganisms within the reactor. In the final experimental series (sB.s3.), although the OUT count was higher in the CB, the Chao1 and Shannon indices were higher for the AcS. When the values of the Chao1 index and Shannon index for the CB decreased or increased, corresponding increases or decreases for the AcS were also observed. For example, an increase in the Chao1 index from 136.68 to 169.22 and the Shannon index from 4.45 to 5.12 in biofilm after transitioning from aeration conditions in the 30 min + 10 min regime with DO set-point on 1.5 mg O₂/L (sA.s5.) to 2 min + 4 min without DO limitations (sB.s1.) caused a decrease in these indices from 179.43 to 125.65 and from 6.01 to 3.55, respectively, in activated sludge. This suggests that, when the microbial population of one environment was impoverished, that of the other environment was enriched.

The microbial community structure of each environment was characterized at the phylum level. Rarefaction analysis showed that samples sA.s5. from both biofilm and activated sludge, in which the DO set-point was lowered to 1.5 mg/L, had the lowest number of reads (see [Supplementary Material – Fig. C.2](#)); however, the number of sequences obtained was sufficient for reliable assessment of the microbial composition of the biomass. The most prevalent phyla in CB and AcS samples are shown in [Fig. 1b](#). The abundances of various groups of microorganisms changed in both environments. The PCA plot ([Fig. 1b](#)) shows that PC1 clustered the dataset into two groups: sA.s1.-biofilm and the other samples. In addition, the sA.s1.-biofilm sample was negative on PC1, while the remaining samples had a positive score. This arrangement of samples clearly shows that the communities of microorganisms from the reactors operated as a pure moving bed technology differed the most from the reactors operated as a hybrid moving bed technology. It did not affect the efficiency of organics removal and nitrification; however, the efficiencies of denitrification and phosphorus removal were significantly lower in pure moving bed. The combination of biofilm and activated sludge produced the main differences between clusters. Because the close proximity of microbial populations in the PCA plot indicates the

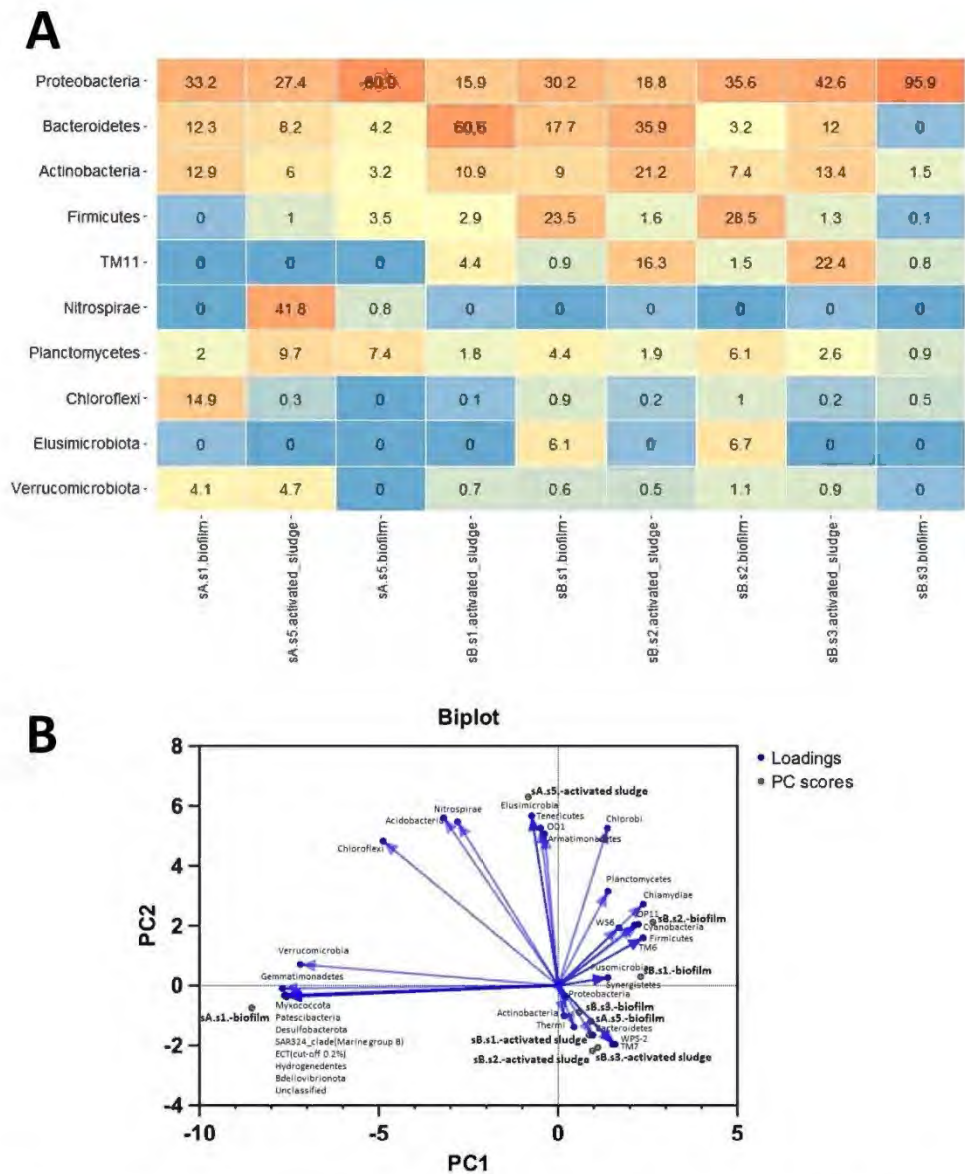


Fig. 1. A. HeatMap of 10 most abundant phyla. Blue color presents the less abundant phylum and orange color presents the most abundant phylum. The values on the Figure are percentage of relative abundance. B. PCA biplot of operational characteristics and microbial populations.

strength of their mutual correlation, it can be concluded that the hybrid biomass provides a better habitat for microorganisms known as putative denitrifiers (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes) or putative phosphate-accumulating organisms (PAOs) (Actinobacteria) or Anammox microorganisms (Planctomycetes). For example, close proximity of microbial populations in sB.s2. and sB.s1., in which aeration regimes were 8 min ON + 16 min OFF and 2 min ON + 4 min OFF, respectively, corresponded to similar efficiencies of pollutant removal. Relative to PC2, the AcS sample sA.s5., in which the DO value was a maximum of 1.5 mg/L, differed the most from the others in terms of microbial populations; however, it did not affect the pollutant removal. The relationship between individual genera in biomass samples is presented as a tree (see [Supplementary Material – Fig. C.3](#)).

The experiment began with a series in which only biomass in the attached form was developed in the reactor (the amount of suspended biomass present in the system at that time was less than 1 % of the total biofilm quantity) (sA.s1.). Proteobacteria was then the most numerous phylum, with respective abundance of 33.2 %. Other major phyla included Chloroflexi (14.9 %), Actinobacteria (12.9 %), Bacteroidetes (12.3 %), Verrucomicrobiota (4.1 %), and Planctomycetes (2.0 %). Proteobacteria are recognized to be associated with ammonia oxidizing bacteria (AOB), nitrite oxidizing bacteria (NOB), and denitrifying bacteria that play a critical role in N-NH_4^+ removal and N-NO_2^- accumulation (Wang et al., 2021b).

At the end of stage A (sA.s5.), the microbiological analysis of the biofilm samples revealed a significant shift in the most abundant phyla.

The relative abundances of Proteobacteria increased 2.44-fold (80.9 %), making it the dominant phylum. The relative abundance of Planctomycetes also increased (7.4 %). Comparing the results obtained in sA.s5. with those at the beginning of the experiment, the relative abundances of Bacteroidetes and Actinobacteria decreased 2.93 and 4.03 times, respectively. Additionally, Firmicutes (3.5 %) and Nitrospirae (0.8 %) were detected in the CB.

From the end of stage A (sA.s5.), in addition to analyzing the organisms that constitute the biofilm, the composition of the microbial communities forming the activated sludge was also examined. In sA.s5., Nitrospirae (41.8 %) and Proteobacteria (27.4 %) represented two main phyla of AcS, followed by Planctomycetes (9.7 %), Bacteroidetes (8.2 %), Actinobacteria (6 %), and Verrucomicrobiota (4.7 %). Smaller quantities of Firmicutes (1.0 %) and Chloroflexi (0.3 %) were also detected.

The transition to intermittent aeration in a 2 min + 4 min regime (sB.s1.), along with the removal of the DO set-point, significantly altered the composition of microbial populations inhabiting both the analyzed environments. In the biofilm, Proteobacteria and Firmicutes became the most numerous phyla, with a relative abundance of 30.3 and 23.5 %, respectively. Notably, the relative abundance of the latter increased almost 7-fold. The boost in the relative abundance of this phylum was correlated with the enhancement of denitrification efficiency. These microorganisms are, in fact, considered main contributors to denitrification and organic matter degradation (Jia et al., 2020). The IA in a 2 min + 4 min regime, coupled with the absence of a specified DO set-point, also led to a 4.21-fold increase in Bacteroidetes (17.7 %), as well as 2.81-fold increase in Actinobacteria abundance (9 %). Elusimicrobiota (6.1 %) also appeared in the CB. The relative abundance of Planctomycetes decreased (4.4 %). Chloroflexi (0.9 %) were also detected at that time.

In activated sludge flocs, the changes in abundance between sA.s5. and sB.s1. were more substantial. Bacteroidetes became the dominant phylum (60.6 %), with their relative abundance increasing nearly 7.5-fold. Such a substantial increase in the quantity of these microorganisms could also contribute to the observed increase in denitrification efficiency. At that time, the AcS also contained other microorganisms associated with denitrification, such as Proteobacteria (15.9 %) and Actinobacteria (10.9 %), whose relative abundances decreased and increased by 1.72 and 1.82-fold, respectively. Small amounts of Firmicutes (2.9 %) and Planctomycetes (1.8 %) were detected as well.

In the subsequent series, where the duration of phases with the blower on and off was extended to 8 min + 16 min, Proteobacteria (35.6 %) and Firmicutes (28.5 %) continued to be the dominant phyla in the biofilm. Other detected phyla were Elusimicrobiota (6.7 %) and Actinobacteria (7.4 %). Furthermore, Planctomycetes (6.1 %) and Bacteroidetes (3.2 %) were also detected in CB. On the other hand, despite their relative abundance decreasing to 35.9 %, Bacteroidetes remained the dominant phylum in AcS. In sludge flocs, significant amounts of Actinobacteria (21.2 %) and Proteobacteria (18.8 %) were also detected. Additionally, small quantities of Planctomycetes (1.9 %) and Firmicutes (1.6 %) were noted in CB.

The last introduced change, doubling aeration and non-aeration phase durations to 16 min + 32 min, led to significant changes in the microbial communities in both the environments. Over time, Proteobacteria became the dominant phylum in both the biofilm immobilized on moving carriers and activated sludge. This included Gammaproteobacteria (with the prevalent genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*), Alphaproteobacteria (with the prevalent genera *Rhodobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylobacter*), and Betaproteobacteria (with the prevalent genera *Dechloromonas*, *Aquabacterium*) (see Supplementary Material – Fig. C.4). In the biofilm, they represented a significant 95.9 % of all detected microorganisms, their relative abundance increasing nearly 2.7 times compared to sB.s2. The remaining part of microorganisms inhabiting the biofilm was primarily made up of Actinobacteria (1.5 %), Planctomycetes (0.90 %), and Chloroflexi (0.5 %).

Meanwhile, in the sludge flocs, Proteobacteria relative abundance showed an almost 2.3-fold increase, accounting for 42.6 % of the total microbial community. The remaining microbial communities consisted of TM11 (22.4 %), Actinobacteria (13.4 %) and Bacteroidetes (12 %). Small amounts of Planctomycetes (2.6 %), Firmicutes (1.3 %), and Verrucomicrobiota (0.9 %) were also detected in AcS.

Based on data obtained from NGS, this study also analyzed the impact of technological modifications introduced in the reactor on the abundance of specific groups such as nitrifiers, putative denitrifiers, Anammox, putative PAOs, and organic compound degraders was also analyzed in this study (see Supplementary Material – Fig. C.4–Fig. C.5 and Tab. C.1). The most abundant group of microorganisms observed in both activated sludge and biofilm, just after the unclassified group, consisted of functional genera responsible for the degradation of organic compounds. Their quantity in both analyzed forms increased throughout the experiment. In all analyzed cases, putative denitrifiers were present in the biomass developing in the reactor, with a notably higher quantity in the biofilm, particularly in stage B. This stage involved a change in the aeration regime, with longer durations of non-aerated subphases compared to those with aeration. The conditions prevailing in the reactor at that time can be considered conducive to the development of functional genera for denitrification. In the last series of experiments, with aeration in the regime of 16 min + 32 min, a significant increase in the quantity of putative PAOs was also observed in biofilm and activated sludge. The relative abundance of nitrifiers' microbial community genera, except for series sA.s1. and sA.s5., was close to zero. In the first series of the research, when the reactor operated as pure moving bed technology, a functional genus of nitrifiers was detected in CB at a level of 2.66 %. During the analysis conducted for biomass samples at the end of stage A, it was demonstrated that nitrifiers constituted 10 % of all detected genera in AcS, while their quantity in the CB was eliminated (sA.s5.).

3.2. Reactor performance

3.2.1. Nutrients removal performance linking to microorganisms population

Concentrations of N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , TN, TKN, COD, TP and P-PO_4^{3-} in the inflow and outflow analyzed during the experiment are shown in Supplementary Material (Tab. A.1 and Tab. C.2). Based on these values, the efficiencies of nitrification (E_{NIT}), denitrification (E_{DENIT}), organic compounds removal (E_{COD}), and enhanced biological phosphorus removal (E_{EBPR}) were calculated (calculation details in the Supplementary Materials – Appendix B). The values of COD/N , BOD_5/N , COD/P , and BOD_5/P ratios (see Supplementary Material – Tab. A.1) did not determine E_{DENIT} and E_{EBPR} .

Regardless of the variant of the moving bed technology in which the system operated (either pure or hybrid), the applied strategy of IA (duration of subphases with and without aeration during aerated phases), and DO concentration, highly efficient stable nitrification (96.32 ± 1.94 %) was maintained at all stages of the experiment ($p = 0.6469$ – 1.0000 , $p > 0.05$). The concentration of N-NH_4^+ in the treated wastewater did not exceed 2.07 mg/L during the 348-day study. The results of NGS were expected to reveal a high diversity and richness of nitrifying genera typical of municipal WWTPs. These microorganisms include *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosomonadaceae*, and *Nitrosolobus*, widely known as AOB, as well as NOB such as *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*, and *Nitrospina* (Zhang et al., 2019). Unfortunately, extremely low amounts (below 1 %, except for series sA.s1. and sA.s5. – AcS) of bacteria from the genera of *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, or uncultured genus of *Nitrosomonadaceae* were detected in the biomass (see Supplementary Material – Fig. C.4). This suggests that the conditions prevailing in the system at the time, and the quality of the supplied wastewater did not create conditions suitable for the development of other nitrifiers. The OTU percentage for the functional nitrifiers (AOB, including only *Nitrosomonas*) was from 0 % to 1.2 % of the community. Similarly, in the study of membrane bioreactors

treating municipal wastewater, the abundance of AOB comprised less than 0.1 % of the total bacteria, although N-NH_4^+ removal reached 85–95 % at DO concentration of 6.5–7.5 mg/L, HRT of 5 h, influent N-NH_4^+ of 35–50 mg/L, and the C/N ratio of about 5 (Bin et al., 2010). Such a high nitrification efficiency at the low abundance of AOB indicated that a gene coding ammonia monooxygenase (the first enzyme in ammonia oxidation) had high expression level indicating strong nitrification activity. In the study of activated sludge, even at a low concentration of N-NH_4^+ (about 2.5 μM), high expression of *amoA* gene was observed, even though the abundance of *Nitrosomonas* and *Nitrospira*, which played dominant roles in nitrification, accounted for as low as 0.11 % and 0.02 %, respectively (Yu and Zhang, 2012). It is also possible that the high efficiency of nitrification was partly determined by microorganisms known as heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria (HNAD). Even though some HNAD bacteria can grow in the organic matter-free environment, the presence of organic carbon significantly increases ammonia removal in heterotrophic nitrification and cell growth. Higher C/N can substantially accelerate the nitrification rate and the electron transfer in the denitrifying respiratory chain; efficiency of the process declines with COD/N decreasing due to the reduction of electron donation and consumption (Song et al., 2021). Heterotrophic nitrification was observed at C/N of even 15 (Ren et al., 2014) but HNAD bacteria prevail at the C/N of 7.5–8.0 (Song et al., 2021). In the present study, the possibility of HNAD growth results from the high COD/N ratio in synthetic wastewater of 8.7 as confirmed by remarkable TN removal efficiency of over 94 % at C/N of 7.5, which declined with C/N decreasing (Jia et al., 2020). Bacteria belonging to *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cuprobacter*, *Halomonas*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Rhodococcus*, *Niabella*, *Diaphorobacter*, *Photobacterium* genera were responsible for HNAD (Jia et al., 2020; Song et al., 2021). These microorganisms can sequentially oxidize N-NH_4^+ to $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NO}_3^-$, and then reduce it into nitrogen gas in the presence of oxygen. This is possible because ammonia monooxygenase and periplasmic nitrate reductase (NAP) coexist within a single organism (Jia et al., 2020). In heterotrophic nitrification, the pathway of ammonia oxidation resembles that of autotrophic nitrification, whereas in aerobic denitrification, oxygen and nitrate are simultaneously used as electron acceptors in co-respiration mechanism. HNAD bacteria, due to their growth rate higher than that of autotrophic nitrifiers, better adapt to low temperatures and pH or high salinity and need lower buffer quantity than bacteria responsible for conventional autotrophic nitrification/anoxic denitrification (Song et al., 2021). HNAD bacteria prevail at the presence of ammonia as a nitrogen source; their activity decreases in the following order of nitrogen source: ammonia nitrogen > nitrous nitrogen > nitrate nitrogen. The impact of DO on aerobic denitrification is lower than that of anaerobic denitrification; optimum DO for different HNAD bacteria varies from 3 to over 6 mg/L (Song et al., 2021). The presence of HNAD representatives such as *Pseudomonas* (0–30 %), *Acinetobacter* (0–53 %), *Rhodococcus* (below 0.1 %), *Niabella* (0–6 %) and *Bacillus* (0–25 %) was demonstrated in the biomass developing in the analyzed system. A significantly higher quantity of all these genera was detected in biofilm samples. The relative abundance of *Pseudomonas* in CB reached levels of 0.01 %, 0.24 %, 0.79 %, and 30 %, respectively in sA.s5., sB.s1., sB.s2., sB.s3. In the sB.s3., the abundance of *Acinetobacter* sp. in the biofilm was 53 % and in the activated sludge it was 19 %, markedly surpassing other series. This microbial genus has been reported to be capable of effective HNAD under aerobic conditions, at a C/N ratio of 8, with no nitrite accumulation (Xia et al., 2020) as well as denitrifying phosphorus removal (Ji et al., 2015). In the present study, the abundance of Proteobacteria that include *Pseudomonas* and *Acinetobacter* correlated with the nitrite oxidation rate (correlation coefficient of 0.70), which indicates the role of these bacteria in nitrite reduction. The COD/N ratio of 8.7 favored the growth of *Acinetobacter* sp. However, oxygen conditions may have been the primary factor determining the abundance of these bacteria in the biomass. This is evident in sB.s3., where the aeration time

was the longest (16 min) among the series in which the DO concentration was not limited. This confirms the results of Xia et al. (2020) who reported that DO concentration strongly affected the growth of *Acinetobacter* sp. as faster rotation and thus higher DO content (6.1 mg/L) accelerated the mass-transfer rates of ammonium and oxygen and promoted the contact between these bacteria and the substrates, stimulating microbial growth and nitrification efficiency, while DO of 3.7 mg/L promoted denitrification. It was indicated that aeration conditions should be strictly regulated to stimulate the growth of *Acinetobacter* sp., which subsequently increases the abundance of functional genes (*nirS*, *nirK* and *norZ*) responsible for denitrification (Chen et al., 2022b). Therefore, the analysis shows that the relative abundance of HNAD bacteria greatly exceeded that detected for the genera of nitrifying bacteria, suggesting that the conditions in the reactor favored the development of these microorganisms, particularly in sB.s3.

In the analyzed system, a decrease in TN concentration in the effluent was observed, indicating the occurrence of the denitrification. The obtained data suggest that its efficiency was positively influenced by two factors. The first one was the development of biomass in the form of activated sludge. An average concentration of TN in treated wastewater in sA.s2. was 1.42 times lower than in sA.s1. During the series in which activated sludge was developed, the $E_{\text{Denit.}}$ increased from 79.43 % (just before the start of sA.s2. – day 12) to 84.35 % at its very end (day 48). The average efficiency was 1.11 times higher compared to the value obtained in the series when only biomass in the form of a biofilm was present in the reactor (sA.s1.). It is believed that the environment of activated sludge fosters the growth of heterotrophic bacteria, including denitrifying bacteria. Heterotrophs are considered more likely to inhabit sludge flocs because they provide them with greater access to organic carbon and oxygen than in biofilm (Shao et al., 2017). Another factor that contributed to the noticeable shift in denitrification efficiency was the change in the strategy of IA from $R = 1/3$ (sA.s5.) to $R = 2$ (sB.s1.). By altering the ratio of the duration of subphases with the blower on and off while concurrently reducing their lengths and abandoning the DO set-point, a significant, 1.67-fold decrease in the average TN concentration in the treated wastewater was observed (from 11.14 ± 0.87 to 6.69 ± 1.45 mg N/L). This decrease resulted in a 1.09-fold increase in the average $E_{\text{Denit.}}$ (from 81.56 ± 1.53 to 89.07 ± 2.43 %). The prevailing reactor conditions at that time positively impacted denitrifiers activity and abundance. The duration of non-aerated subphases for one cycle increased from 70 to 226 min, rising 3.23 times, as the aeration regime changed from 30 min + 10 min to 2 min + 4 min. Simultaneously, there was a significant increase in the abundance of Bacteroidetes phylum in the developing biomass. The proportion of their population relative to the total number of bacteria increased 7.39-fold in the AcS and 4.21-fold in the CB. It is assumed that Bacteroidetes play a key role in the denitrification process (Gao et al., 2020).

The development of biomass in the form of activated sludge also contributed to a significant increase in the efficiency of enhanced biological phosphorus removal. The average E_{EBPR} value increased almost 2.50 times, from 35.03 ± 4.25 (sA.s1.) to 87.32 ± 3.64 % (sA.s2.), indicating the presence of a greater number and activity of microorganisms capable of phosphorus accumulation. The concentration of phosphorus in the effluent decreased from 4.35 ± 0.60 to 0.74 ± 0.32 mg/L. In the subsequent series, until the end of the experiment, the E_{EBPR} remained at a level similar to that in sB.s1. (85.36 ± 6.57 %). This high improvement in biological phosphorus removal was not attributed to the presence of *Accumulibacter* or *Competibacter*. Although they are typically known as core PAOs, they were not detected in the biomass, despite the fact that glycogen accumulating organisms (GAOs), that compete for substrate with PAOs, were also not present in the biomass. It is worth noting that in the analyzed system, both in activated sludge and biofilm, a large number of bacteria belonged to Proteobacteria and Actinobacteria phyla. The former are considered dominant PAOs (Pan et al., 2022). Among them, high relative abundance of the genus *Acinetobacter* (belonging to the Proteobacteria phylum) was detected, often referred to

as microorganisms of “luxury phosphate uptake” and responsible for even 34 % of phosphorus removed (Cloete and Steyn, 1988). On the other hand, numerous research findings suggest that Actinobacteria, being phosphate solubilizing bacteria (PSB), play a significant role in the immobilization of phosphate (Wang et al., 2021a). Furthermore, substantial amounts of Bacteroidetes indicated as the dominant phylum in biological phosphorus and nitrogen removal, were also detected in the activated sludge (Wu et al., 2021). In the present study, the abundance of Actinobacteria (including such genera as *Propionimonomas*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomyces*, *Amycolatopsis*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*), and Bacteroidetes (including *Flavithumibacter*, *Runella*, *Chryseobacterium*, *Niabella*, *Prevotella*, *Sphingobacterium*, *Flavobacterium*, *Lewinella*) reached 21.2 and 60 %, respectively. *Corynebacterium*, *Propionibacterium* and *Dechloromonas* genera, which can store phosphorus as polyphosphates, use the denitrifying phosphorus removal metabolic pathway and are considered putative PAOs (Machnicka et al., 2008; Chen et al., 2022a; Zhao et al., 2022a), were detected in biomass in the present study; however, in low

abundances.

Similarly to the nitrification, regardless of the technological conditions of the reactor operation in particular series, the efficiency of organic compounds removal remained at a similar, high level throughout the experiment (96.96 ± 0.83 %). The average concentration of COD in the effluent over the 348-day experiment was 15.80 ± 4.51 mg/L. Statistical analysis also revealed no significant differences in E_{COD} values or COD in the effluent (for E_{COD} $p = 0.1357$ – 1.0000 , $p > 0.05$, for COD in effluent $p = 0.0575$ – 1.0000 , $p > 0.05$). In the biomass developing in the reactor throughout the experiment the presence of phyla such as Proteobacteria (especially with genus *Pseudomonas*), Firmicutes (especially with genus *Bacillus*), Actinobacteria, and Bacteroidetes was observed. They are considered capable of removing organic compounds (Zhang et al., 2019).

3.2.2. Energy use

Energy consumption for aeration in particular series of the experiment was determined following the Luo et al. (2019) methodology

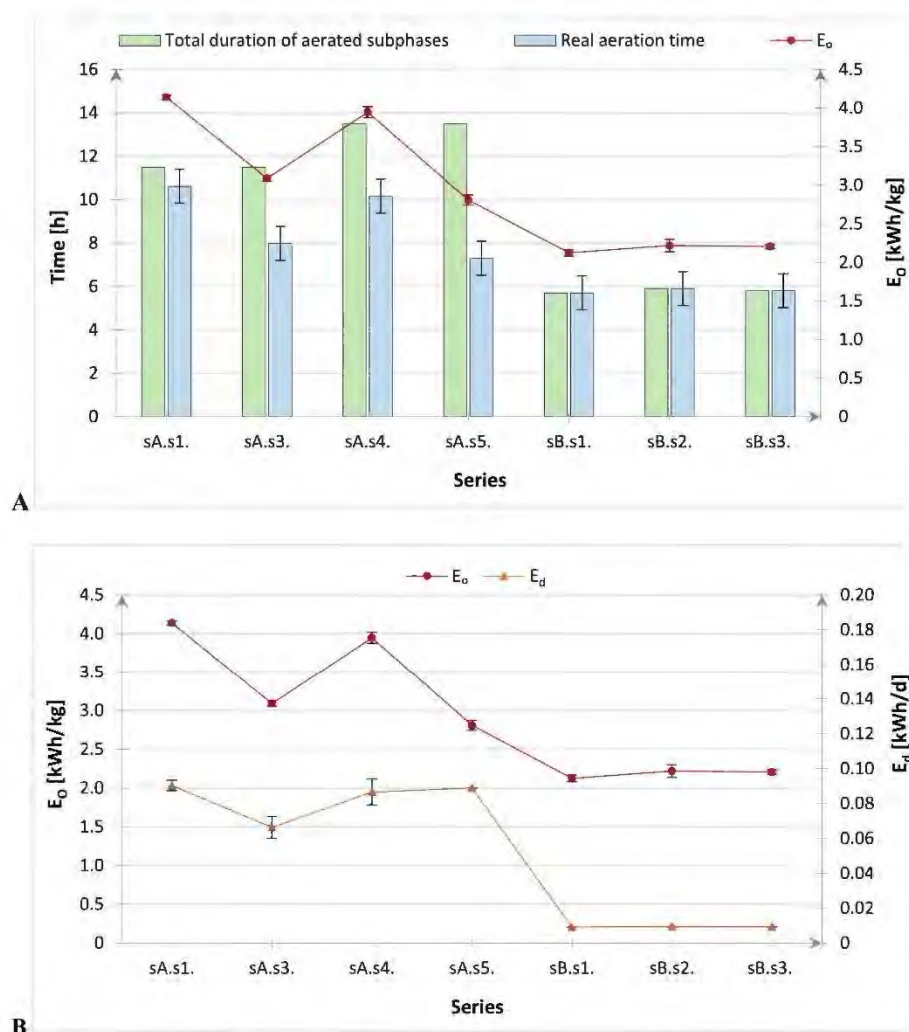


Fig. 2. Average energy consumption used for aeration throughout the experiment: A. Energy consumption associated with aeration for removing 1 kg of pollutants per day (E_o) compared to the blowers operation time. B. Comparison of energy consumption for aeration per 1 kg of removed pollutants (E_o in kWh/kg) and daily electric energy consumption (E_d in kWh/d).

(calculation details in the [Supplementary Material – Appendix B](#)).

The enrichment of the biomass developing in the system with AcS did not contribute to significant changes in the E_{COD} or $E_{\text{Nitr.}}$ values. However, it resulted in a 1.34-fold reduction of the total real aeration time during a day (Fig. 2a). Notably, the reactor exhibited a considerably higher microbial population compared to its operation solely as a pure moving bed technology. Considering the current average price of 1 kWh of energy in Warsaw reaching 0.23€, the costs of aeration for removing 1 kg of pollutants per day decreased from 3.05 €/kg to 2.29 €/kg. Over the year in the analyzed system, this led to a saving of nearly 279 €/kg. Besides the economic factor associated with energy costs, it is noteworthy that higher values of $E_{\text{Denit.}}$ and E_{EBPR} were observed in sA.s3., resulting in an improved quality of the effluent discharged from the reactor, already compliant with legal requirements.

The 2.33-fold reduction in the DO set-point in sA.s5. significantly reduced the actual aeration time per day. Although the total duration of aerated subphases remained unchanged, the blower's operating time decreased almost 1.40-fold, resulting in a cost saving of 0.84 €/kg. Throughout the year, under the analyzed system and conditions, this led to an additional saving of nearly 306 €/kg.

In stage B, it was assumed that the duration of the subphase with the blower off would be twice as long as the one with the blower on. No specific DO set-point was also set, and the blowers operated throughout the aerated subphases. This adjustment had no negative impact on any of the wastewater treatment processes; instead, it even improved $E_{\text{Denit.}}$. As a result, the electricity consumption associated with aeration for removing 1 kg of pollutants per day decreased from $E_{\text{O}} = 2.81 \pm 0.06$ kWh/kg in sA.s5. to $E_{\text{O}} = 2.18 \pm 0.07$ kWh/kg on average in stage B. This change allowed for an additional cost saving of 67 €/kg over a year.

For IFAS-MBSBBR in the series with the highest (sA.s4.) and lowest (sB.s1.) electricity consumption, approximate values of $E_{\text{Nitr.}}$ and E_{COD} were achieved. The difference in aeration costs for removing 1 kg of pollutants per day was 0.53 €/kg, which over a year of system operation with the aeration regime of 2 min + 4 min compared to 30 min + 10 min would result in a saving of almost 193.53 €/kg. Moreover, the conditions introduced in sB.s1. improved $E_{\text{Denit.}}$. It is possible that implementing DO set-point at that time could have further reduced the aeration time and mitigated the existing losses.

In practical applications, the energy consumption for aeration is often converted to daily values, and this approach has been also adopted in this study. It is crucial to emphasize that the energy consumption for aeration at the laboratory scale cannot be directly compared with those from full-scale WWTPs. Such a comparison would be prone to error due to the different efficiency levels of laboratory equipment. Following the formula used, daily electric energy consumption (E_d) in kilowatt-hours per day was calculated (Fig. 2b).

The highest E_d was observed when the system operated as a pure moving bed technology (sA.s1.) and amounted to 0.0903 kWh/d, while the lowest was recorded when aeration was conducted in the regime 2 min + 4 min (sB.s1.) – 0.0091 kWh/d. This trend is analogous to what was observed when electrical energy consumption was presented in terms of 1 kg of pollutants removed per day. However, the difference between the highest and lowest values of E_d was over 5 times greater than in the case of E_{O} .

Modifications introduced in the aeration strategy resulted in similar changes of E_d as observed for E_{O} . The direction and magnitude of these changes were at a comparable level, except for those noted after changing the aeration from 20 min + 10 min (sA.s4.) to 30 min + 10 min (sA.s5.) and those following the transition to aeration in the regime 2 min + 4 min (sB.s1.). In the first case, E_d remained at a comparable level to that before the change, while E_{O} decreased 1.32 times. In the second case, the direction of change was the same, but the magnitude of the change in E_d was greater than in E_{O} (E_d decreased 9.74 times, while E_{O} decreased 1.32 times).

3.3. Batch test results

The results of kinetic batch tests were presented in [Supplementary Material \(Tab. C.2\)](#). Considering that all tests were performed maintaining identical methodology, the results allowed for tracking of the activity of bacteria oxidizing N-NH_4^+ (in AUR test) and those capable of oxidizing N-NO_2^- (in NitUR test) via the rates determined in the tests, ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR), respectively.

Although the efficiency of the nitrification remained at a similar level throughout all series, suggesting no significant changes in the activity of nitrifiers present in the system, batch tests showed that the dynamics of ammonia and nitrite oxidation were diverse.

The analysis of the obtained data does not permit unequivocal determination of the biomass form that constituted an environment with a higher level of activity of bacteria oxidizing N-NH_4^+ . This may be caused by the fact that microorganisms known as HNAD were mainly responsible for nitrogen removal (as shown in section 3.1.2.). In stage A, ammonia oxidizers in the biofilm had higher activity. Apart from sA.s3., tests conducted for this biomass form yielded values of AOR at least 1.22 times higher. In stage B, however, the values obtained for activated sludge were 1.99, 1.18, and 1.53 times higher than in biofilm, respectively. In previous studies describing a similar system, the AOR was always higher in AcS, regardless of the technological conditions of reactor operation (Zhang et al., 2016; Zojac et al., 2022; Zojac and Zubrowska-Sudol, 2023). However, because ammonia and nitrite oxidizing bacteria have higher activity in activated sludge than in biofilm, but higher stability in biofilm than in sludge flocs (Zhang et al., 2016), the development of hybrid biomass technology seems to be a promising direction in exploring the possibility of reducing aeration level.

The highest AOR-CB was observed in the series where the reactor operated as pure moving bed technology, and the lowest was recorded where the aeration was carried out in the 2 min + 4 min regime without DO set-point (sB.s1.). Moreover, the change in the aeration strategy from 30 min + 10 min with DO set-point at 1.5 mg O_2/L (sA.s5.) to the one applied in sB.s1. can be identified as the cause of the greatest difference in AOR-CB between consecutive series. The AOR-CB between sA.s5. and sB.s1. decreased 2.49 times.

In the tests conducted immediately after development of biomass in the form of activated sludge, no significant changes were noted in the AOR carried out by nitrifiers inhabiting the biofilm. AOR-CB changed only when the system was already operating as a hybrid with a constant concentration of activated sludge for 45 days (sA.s3.). In this case, a 1.34 decrease in AOR-CB was observed. Simultaneously, tests conducted for activated sludge at that time demonstrated a 1.40-fold increase in the AOR-AcS. Considering the significant role of substrate and oxygen concentration gradients in the biofilm, it can be assumed that activated sludge flocs was chosen as an environment more favorable for the development of ammonia oxidizers. Similarly, Rajpal et al. (2021) reported that nitrogen removal from municipal wastewater can be improved by using a hybrid system. Hybrid systems enable high efficiency and stability of metabolic processes even at low temperatures and high organic loading. They are used for the simultaneous removal of organic matter, nitrification and denitrification, as the accumulation of biomass on the surface creates the conditions for effective growth of slow-growing microorganism, thus increasing microbial diversity and shortening the start-up time. However, sludge production should also be considered when deciding on the type of biomass selected, i.e. activated sludge or biofilm. The use of the hybrid system resulted in the sludge yield coefficient 10 times or 7–25 % lower than in conventional activated sludge plants and other extended aeration systems, respectively, while removing over 90 and over 80 % ammonia and TN, respectively (Srivastava et al., 2021).

Contrary to expectations, extending the time of subphases with the blower on from 20 to 30 min, and therefore reducing the time during which the biomass was subjected to lower than assumed concentrations

of DO (total duration of subphases without aeration decreased from 110 to 70 min), did not increase the activity of ammonia oxidizers. Connecting this with the fact that in the subsequent series, after reducing the DO from 3.5 to 1.5 mg O₂/L, a 1.29-fold increase in AOR-CB was observed, it can be presumed that such microorganisms capable of oxidizing N-NH₄⁺ that prefer lower concentrations of DO could have thrived in the biofilm at that time. One of the representatives of this type of microorganisms is Comammox. Previous studies have demonstrated that lower DO levels can benefit their growth (Roots et al., 2019). It is, however, worth emphasizing that some studies have reported a lack of significant correlation between DO levels and the occurrence of Comammox. For instance, in a study by Zhao et al., (2022b) conducted in a MBBR, it was found that Comammox was selectively enriched even when DO exceeded 6 mg O₂/L. In the present study, from Comammox-type microorganisms, the genus *Nitrospira* sp. was detected, some strains of which possess genes encoding ammonia monooxygenase, hydroxylamine dehydrogenase and nitrite oxidoreductase, and which perform complete oxidation of ammonia to nitrate via nitrite. The highest abundance (10 %) was observed in the AcS samples, in the series in which DO was reduced to 1.5 mg O₂/L; however, there were no correlations between DO and the level of *Nitrospira* sp. in the biomass. These findings suggest that the relationship between DO and Comammox occurrence may vary depending on the specific system and conditions, and that other factors may also influence the growth and enrichment of Comammox microorganisms.

Significant, almost 2-fold increase in AOR-CB was observed after a 4-fold extension of the duration of subphases with blowers on and off in sB.s2. Due to the absence of a DO set-point in all series of stage B, oxygen concentration during the 8-minute aeration period reached a significantly higher level compared to the 2-minute operation of blowers in sB.s1. The prevailing conditions in the reactor during this period favored ammonia oxidation.

In activated sludge, the highest AOR-AcS was observed in the final series of the experiment, where the system operated with aeration in a 16 min + 32 min regime without a DO set-point (sB.s3.). It should be emphasized, however, that in sA.s3., when the durations of subphases with and without aeration were 20 min and 10 min, respectively, and the DO set-point was 3.5 mg O₂/L, AOR-AcS remained at a similar level. Although the total time of the subphases with the blower off during one cycle in sB.s3. was more than 2 times longer, the lack of DO set-point meant that DO during subphases with aeration was almost 2 times higher than that assumed in sA.s3., creating favorable conditions for ammonia oxidizers. *Nitrosomonas* sp. was the only AOB detected in the biomass. In addition, the AcS sample in sB.s3. was the only sample from IFAS-MBSBBR, in which *Nitrosomonas* sp. was present; however, the abundance was < 1 %. Similarly low abundances of NOB were detected. High efficiencies and rates of ammonia removal at very low abundances of AOB and NOB confirm the role of HNAD bacteria in nitrogen conversion in the studied system, which was widely described in section 3.2.1.

On the other hand, the lowest AOR-AcS was observed in a series where conditions in the reactor were expected to favor the growth and activity of ammonia oxidizers the most. In sA.s4., compared to sA.s3., the duration of aeration was doubled, and the DO set-point was set at 3.5 mg O₂/L. Although the total aeration time was increased by 40 min, the DO profiles were similar (see Supplementary Material Fig. A.6–Fig. A.7) and yet AOR-AcS decreased by 1.68 times, from 6.311 to 3.766 mg N-NH₄⁺/h·gVSS. AOB were not detected in the biomass, suggesting that heterotrophic nitrifiers, which are much less sensitive to DO changes than autotrophic nitrifiers, performed ammonia oxidation. This represented the largest change in AOR-AcS values throughout the experiment. The highest increase in the activity of bacteria capable of ammonia oxidation in AcS was observed between sA.s2. and sA.s3. After over a month of operating as a hybrid system, the nitrifying microorganisms colonizing the flocs had to adapt to the conditions prevailing in the reactor and fully develop. It should be emphasized that the growth

rate of nitrifiers is considerably slower than that of denitrifying bacteria, so their population may have been relatively low during the sludge formation series (Waqas et al., 2020).

The rate of nitrite removal, and consequently the activity of nitrite oxidizers, was consistently higher for the biofilm. This is consistent with previous studies conducted for IFAS-MBSBBR, where regardless of the changes in technological reactor parameters, the biofilm provided an environment more favorable for NOB (Zajac et al., 2022; Zajac and Zubrowska-Sudol, 2023). The significantly higher NOB abundance in the biofilm (4.2–10.9 %) than in the activated sludge (1.7–4.7 %) in the IFAS system for the treatment of municipal wastewater and the faster recovery rate of NOB in the biofilm were attributed to a more resilient nature of biofilm compared to the activated sludge (Shao et al., 2017). Biofilm is considered an ideal environment for the development of nitrifiers, particularly NOB, due to its extremely high solids retention time (Khanongnuch et al., 2019). This is because NOB have lower growth rates than AOB (Ge et al., 2015). NGS revealed that despite the generally very low relative abundance of nitrifying genera, the amount of *Nitrospira*, which was the only NOB detected in both types of biomass, in CB was an order of magnitude higher. The exception was observed in sA.s5., where the relative abundance of genus *Nitrospira* in AcS reached 10 % which was the highest value recorded for these microorganisms in all analyzed biomass samples.

In the case of the biofilm, the highest NitOR-CB was observed in the series where aeration was carried out in a 30 min + 10 min regime, with a DO set-point of 1.5 mg O₂/L (sA.s5.). The lowest activity of NOB inhabiting biofilm was recorded when aeration occurred in a 2 min + 4 min regime without a DO set-point. It is believed that a short duration of aeration phases favors the suppression of NOB. Yang and Yang (2011), conducting research in an MBBR under the same aeration regime, reported lower NOB activity compared to aeration in a 2 min + 2 min regime. In the subsequent series of stage B, NitOR-CB gradually increased, suggesting that the conditions created in the system at that time favored NOB.

In the case of activated sludge, the highest NitOR-AcS was observed in the test conducted immediately after reaching its stable level, suggesting that NOB growth rates may not necessarily be lower than AOB, which was also confirmed by Kornaros et al. (2010). The lowest activity of NOB bacteria developing in the flocs of activated sludge was observed during aeration in the 8 min + 16 min regime (sB.s2.).

The most significant changes in the NitOR were associated with aeration regime changes. In biofilm, there was a 1.48-fold reduction in NitOR-CB after transitioning from aeration in the 30 min + 10 min regime with DO set-point on 1.5 mg O₂/L (sA.s5.) to 2 min + 4 min without DO limitations (sB.s1.). In the activated sludge, the 4-fold extension of the duration of phases with and without aeration from 2 min + 4 min (sB.s1.) to 8 min + 16 min (sB.s2.) can be considered the cause of the nearly 2.5-fold reduction in the activity of NOB. Interestingly, between the series when the most significant decrease in NitOR-CB was observed, the activated sludge concurrently experienced the highest increase in AOR-AcS (1.57-fold). Similarly, observations made after changing the aeration regime from 2 min + 4 min to 8 min + 16 min revealed that the most substantial reduction in the activity of NOB in the AcS coincided with the highest increase in NitOR-CB (nearly twofold).

An interesting observation is the comparison of AOR and NitOR obtained in this study with the values reported for analogous conditions (aeration in 30 min + 10 min regime, DO 1.5 mg O₂/L) and type of reactor from our earlier research (Zajac and Zubrowska-Sudol, 2023). Under identical conditions, AOR-CB and NitOR-CB from this study were respectively 1.76 and 1.43 times higher than those from the cited paper. Meanwhile, the activities of ammonia and nitrite oxidizers in the activated sludge was 1.64 and 2.29 times lower compared to the results of the study by Zajac and Zubrowska-Sudol (2023), respectively. The observed discrepancies could result from the fact that the system analyzed in this study initially operated as pure moving bed technology

for over a year, in contrast to the reactor described in the cited work, where two forms of biomass developed from the very beginning. This could have led to the development of entirely different microorganisms responsible for the nitrification in each form of biomass. Additionally, the technological parameters under which the systems operated in the series preceding the analyzed study may also play a role in these differences. Despite identical operating parameters, the microbial composition of the present biomass was different, ultimately determining the observed reaction rates.

All the above findings underscore the importance of the uniqueness of each wastewater treatment system and the impact of specific operating conditions and influent characteristics on microbiological processes occurring in the treatment process. Therefore, continuous monitoring and microbiological analysis are crucial for adapting treatment strategies to achieve optimal performance.

The lack of changes in the efficiency of nitrification based on pollutant concentrations in the effluent and influent does not necessarily indicate high canonical nitrifier activity. Employing batch tests such as AUR and NiTUR can quickly and inexpensively help determine which microorganisms may be responsible for the oxidation of ammonia. If the activity of ammonia and nitrite oxidizers is found to be low through such tests, it may suggest that microorganisms other than AOB or NOB could be responsible for the nitrification in the analyzed system. It can be followed by more comprehensive, but also more expensive microbiological analyses to confirm such relationships.

Once the presence of HNAD bacteria is confirmed, the treatment system can be optimized to promote their growth. HNAD bacteria prefer environments with low oxygen levels which can significantly reduce the energy consumed for aeration, thereby reducing the electricity costs incurred by the WWTPs. By understanding the microbial community responsible for nitrification, and tailoring the treatment conditions accordingly, WWTPs can potentially enhance the efficiency of pollutants removal while optimizing energy consumption. Continuous monitoring and microbial analysis are essential to adapt the treatment strategies for optimal performance.

4. Conclusions

The application of IA, even with aerated subphases lasting half as long as those without, and reduced oxygen levels from 3.5 to 1.5 mg O₂/L, did not negatively affect pollutants removal efficiency, enabling a 1.41-fold reduction in E_O. The shift from pure to hybrid moving bed technology resulted in a 1.34-fold reduction in E_O, along with a 1.10-fold improvement in E_{Denit.} and a 2.5-fold enhancement in E_{EBPR}. The high E_{Nit.} may have been attributed to the abundance of heterotrophic nitrifiers (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Rhodococcus*), whose growth was favored in the hybrid system and exceeded the growth of autotrophic nitrifying bacteria.

CRediT authorship contribution statement

Olga Zajac: Writing – original draft, Visualization, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Magdalena Zielińska:** Writing – review & editing, Visualization, Formal analysis. **Monika Zubrowska-Sudol:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was co-financed under the research grant of the Warsaw University of Technology supporting the scientific activity in the discipline of Scientific Council for Environmental Engineering, Mining and Power Engineering no. 20/2022 and a Dean's grant obtained at the Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, no. 504/04613.

Appendix A, B and C. Supplementary Data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>.

References

- [illegible]

- Rajpal, A., Srivastava, G., Bhatia, A., Singh, J., Ukai, Y., Kazmi, A.A., 2021. Optimization to maximize nitrogen removal and microbial diversity in PVA-gel based process for treatment of municipal wastewater. *Environ. Technol. Innov.* 21, 101314.
- Ren, Y., Yang, L., Liang, X., 2014. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresour. Technol.* 171, 1–9.
- Roots, P., Wang, Y., Rosenthal, A.F., Griffin, J.S., Sabba, F., Petrovich, M., Yang, F., Kozak, J.A., Zhang, H., Wells, G.F., 2019. Comammox nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. *Water Res.* 157, 396–405.
- Shao, Y., Shi, Y., Mohammed, A., Liu, Y., 2017. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 116, 38–47.
- Singh, N.K., Bhatia, A., Kazmi, A.A., 2017. Effect of intermittent aeration strategies on treatment performance and microbial community of an IFAS reactor treating municipal waste water. *Environ. Technol.* 38 (22), 2866–2876.
- Song, T., Zhang, X., Li, J., Wu, X., Peng, H., Dong, W., 2021. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs). *Sci. Total Environ.* 801, 149319.
- Srivastava, G., Gani, K.M., Rajpal, A., Singh, J., Bux, F., Kazmi, A.A., 2021. Reduced sludge production in a polyvinyl alcohol gel-based oxic-anoxic-oxic configured pilot-scale plant. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 4, 100136.
- Sun, Y., Wang, H., Wn, G., Guan, Y., 2018. Nitrogen removal and nitrous oxide emission from a step-feeding multiple anoxic and aerobic process. *Environ. Technol.* 39 (7), 814–823.
- Wang, Q., Ding, J., Xie, H., Hao, D., Du, Y., Zhao, C., Xu, F., Kong, Q., Wang, B., 2021a. Phosphorus removal performance of microbial-enhanced constructed wetlands that treat saline wastewater. *J. Clean. Prod.* 288, 125119.
- Wang, F., Xu, S., Liu, L., Wang, S., Ji, M., 2021b. One-stage partial nitrification and anammox process in a sequencing batch biofilm reactor: Start-up, nitrogen removal performance and bacterial community dynamics in response to temperature. *Sci. Total Environ.* 772, 145529.
- Waqas, S., Bilal, M.R., Man, Z., Wibisono, Y., Jaafar, J., Mahlia, T.M.I., Khan, A.L., Aslam, M., 2020. Recent progress in integrated fixed-film activated sludge process for wastewater treatment: a review. *J. Environ. Manage.* 268, 110718.
- Wu, P., Zhang, X., Wang, Y., Wang, C., Ma, L., Jenario, F.W.V., Liu, W., Xu, L., 2021. Development of a novel denitrifying phosphorus removal and partial denitrification anammox (DPR+ PDA) process for advanced nitrogen and phosphorus removal from domestic and nitrate wastewaters. *Bioresour. Technol.* 307, 124795.
- Xia, L., Li, X., Fan, W., Wang, J., 2020. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel acinetobacter sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. *Bioresour. Technol.* 301, 122749.
- Yang, S., Yang, F., 2011. Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor. *J. Hazard. Mater.* 195, 318–323.
- Yn, K., Zhang, T., 2012. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge. *PLOS ONE* 7, e38183.
- Zajac, O., Zubrowska-Sudol, M., Ciesielski, S., Godzieba, M., 2022. Effect of the aeration strategy on NOB suppression in activated sludge and biofilm in a hybrid reactor with nitrification/denitrification. *Water* 14 (1), 72.
- Zajac, O., Zubrowska-Sudol, M., 2023. Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 20, 10061–10074.
- Zhang, X., Liang, Y., Ma, Y., Du, J., Pang, L., Zhang, H., 2016. Ammonia removal and microbial characteristics of partial nitrification in biofilm and activated sludge treating low strength sewage at low temperature. *Ecol. Eng.* 93, 104–111.
- Zhang, L., Shen, Z., Fang, W., Gao, G., 2019. Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 689, 1181–1191.
- Zhao, W., Bi, X., Peng, Y., Bai, M., 2022a. Research advances of the phosphorus-accumulating organisms of *Candidatus accumulibacter*, *dechloromonas* and *tetrasphaera*: metabolic mechanisms, applications and influencing factors. *Chemosphere* 307, 135675.
- Zhao, J., Zheng, M., Su, Z., Liu, T., Li, J., Guo, J., Yuan, Z., Hu, S., 2022b. Selective enrichment of comammox nitrospira in a moving bed biofilm reactor with sufficient oxygen supply. *Environ. Sci. Technol.* 56 (18), 13338–13346.

APPENDIX A –Supplementary Material – Reactor operating conditions

Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies

Olga Zajac^{a,*}, Magdalena Zielinska^b, Monika Zubrowska-Sudol^a

^a Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland;

^b Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna St. 45G, 10-709 Olsztyn, Poland

* Corresponding author: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

APPENDIX A –Supplementary Material – Reactor operating conditions

Tab. A.1 Reactor operating conditions

Series		Duration [d]	Reactor configuration						Biomass concentration			Sampling of biomass for NGS	
			Synthetic wastewater characteristic	HRT [h]	SRT [d]	Reactor operation cycle	DO set-point	Aeration regime (R)	Activated sludge (AcS)	Biofilm* (CB)	Hybrid (CB+AcS)		
Stage A	series 1 (sA.s1.)	1-14	TN=59.89±1.53 mg N/L; TKN=58.93±1.48 mg N/L; N-NH ₄ ⁺ =39.01±1.10 mg N-NH ₄ ⁺ /L; N-NO ₃ ⁻ =0.95±0.71 mg N-NO ₃ ⁻ /L; COD=520.20±17.56 mg O ₂ /L; BOD ₅ =389.67±8.80 mg O ₂ /L; TP=6.47±0.64 mg P/L; P-PO ₄ ³⁻ =6.25±0.63 mg P-PO ₄ ³⁻ /L; pH=7.6-7.9; alkalinity=350-400 mg CaCO ₃ /L;	0.93	20	8h	50 min – I Unaerated phase; 190 min – I Aerated phase; 30 min – II Unaerated phase; 200 min – II Aerated phase; 10 min – Decantation.	3.5 mg O ₂ /L	20 minON+ 10 minOFF R=1/2	0.0147±0.0050 g TSS/L 0.0120±0.0012 g VSS/L	1.9940±0.0070 g TSS/L 0.8837±0.0013 g VSS/L	2.0012±0.0109 g TSS/L 0.8893±0.0066 g VSS/L	CB
	series 2 (sA.s2.)	15-50				8h				0.9956±0.5841 g TSS/L 0.6299±0.4157 g VSS/L 1.8525±0.4174 g TSS/L 1.1382±0.3075 g VSS/L	1.6012±0.4990 g TSS/L 0.6760±0.1846 g VSS/L 1.0955±0.0064 g TSS/L 0.7867±0.0298 g VSS/L	2.7342±0.3888 g TSS/L 1.4427±0.4495 g VSS/L 3.1967±0.6850 g TSS/L 2.0528±0.4949 g VSS/L	
	series 4 (sA.s4.)	97-145				8h	50 min – I Unaerated phase; 190 min – I Aerated phase; 30 min – II Unaerated phase; 150 min – II Aerated phase; 50 min – Sedimentation; 10 min – Decantation.			1.5 mg O ₂ /L	30 minON+ 10 minOFF R=1/3	2.0758±0.1919 g TSS/L 1.4850±0.1436 g VSS/L	
series 5 (sA.s5.)	146-209	1.8058±0.0831 g TSS/L 1.1603±0.068 g VSS/L	1.1148±0.0288 g TSS/L 0.8114±0.0363 g VSS/L	2.8753±0.0729 g TSS/L 1.9109±0.0657 g VSS/L									
Stage B	series 1 (sB.s1.)	210-261	COD/N=8.7 BOD ₅ /N=6.2 COD/P= 81.1 BOD ₅ /P=61.1					non limited DO	2 minON+ 4 minOFF R=2	2.0388±0.2870 g TSS/L 1.3610±0.1381 g VSS/L	1.3362±0.1131 g TSS/L 0.8663±0.0211 g VSS/L	3.1039±0.0260 g TSS/L 2.0811±0.0724 g VSS/L	CB+AcS
	series 2 (sB.s2.)	262-305					8 minON+ 16 minOFF R=2		2.0707±0.1220 g TSS/L 1.4257±0.1346 g VSS/L	1.6066±0.0127 g TSS/L 0.7641±0.0508 g VSS/L	3.7204±0.2110 g TSS/L 2.2334±0.1931 g VSS/L	CB+AcS	
	series 3 (sB.s3.)	306-348					16 minON+ 32 minOFF R=2		1.8855±0.1522 g TSS/L 1.3380±0.1338 g VSS/L	1.4861±0.0988 g TSS/L 0.8169±0.0316 g VSS/L	3.4771±0.2162 g TSS/L 2.1999±0.2162 g VSS/L	CB+AcS	

* The amount of biofilm immobilised on moving carriers was measured using gravimetric methods by calculation of weight loss. Five carriers were randomly collected from the reactor. They were rinsed with demineralised water to remove loosely attached biomass. Then, biofilm was mechanically removed from the carriers. Total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were determined in biofilm in accordance with the Polish Standard. At this point, reference values of TSS and VSS for five carriers were obtained. The subsequent step involved recalculating TSS and VSS for all carriers in the system (approximately 12.900 carriers in a reactor (7 L – 25% of active volume of reactor). Subsequently, this value was divided by the active reactor volume, resulting in the concentration of the entire biofilm developing in the system expressed in g/L

APPENDIX A –Supplementary Material – Reactor operating conditions

Tab. A.2 Compounds of the synthetic wastewater

Synthetic wastewater*	
Compound	Concentration
Ammonium acetate	225 mg/L
Peptone	135 mg/L
Starch	45 mg/L
Glucose	45 mg/L
Glycerine	0.049 ml/L
NaHCO ₃	125 mg/L
Na ₂ HPO ₄	15 mg/L
KH ₂ PO ₄	4.5 mg/L

* prepared based on Podedworna and Zubrowska-Sudol (2012) with a modification involving the addition of NaHCO₃ solution to increase alkalinity

Podedworna, J., Żubrowska-Sudol, M. (2012). Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase. *Environmental Technology*, 33(2), 237–245.

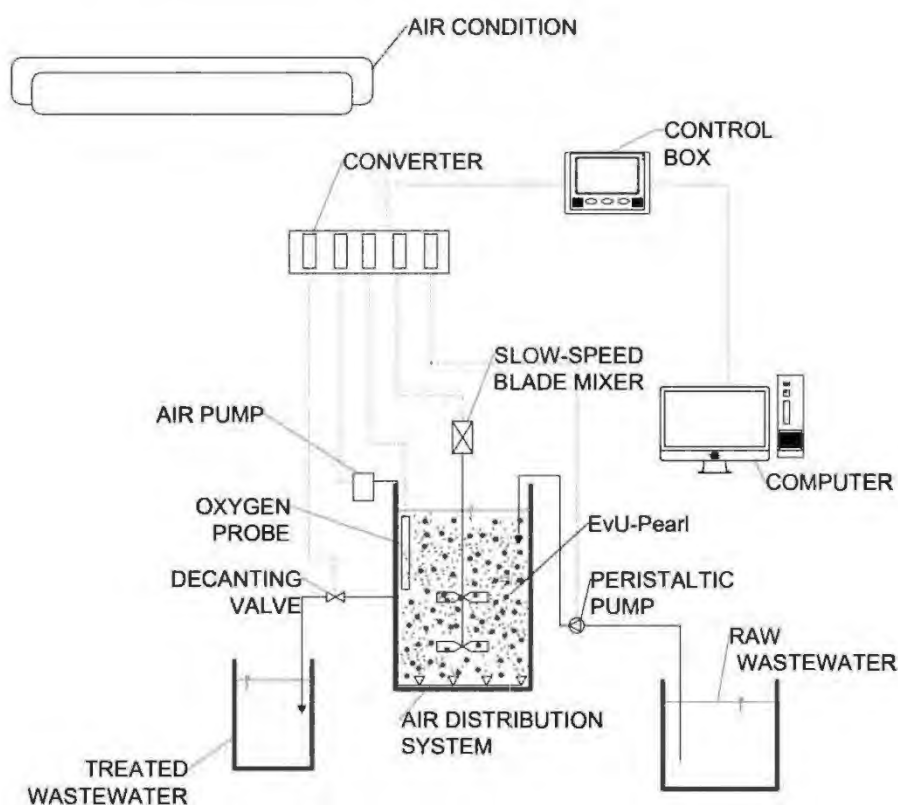


Fig. A.1 Schematic diagram of the experimental reactor

APPENDIX A –Supplementary Material – Reactor operating conditions

The 28 L laboratory-scale moving bed sequencing batch biofilm reactor (MBSBBR) was made of plexiglass (Fig. A1.). The reactor was filled with EvU-Pearl® moving carriers made from recirculated PVA with the shape of a cylinder ($\Phi=5$ mm, $h=8$ mm, a specific active area of $600\text{ m}^2/\text{m}^3$, a density of 1.1 kg/L) (EvU-Innovative Umwelttechnik GmbH, Germany). The filling ratio was 25% (value adopted based on prior research by the authors (Sytek-Szmeichel et al., 2016; Zajac et al., 2022)). The system was controlled using an automated control system (SCADA Wonderware InTouch) that was integrated with an oxygen probe (DO and temperature measurement, maintaining the assumed DO set-point - Oxymax COS61D (Endress + Hauser, Weil am Rhein, Germany)), a peristaltic pump (synthetic sewage dosing - Masterflex® Ismatec® Ecoline (Masterflex Ismatec, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA)), mechanical stirrer (R-50D (CAT, Ballrechten-Dottingen, Germany)), and decanting valve. Oxygen was supplied to the system using blowers Tetrattec® APS ($2 \times 2\text{ W} - 100\text{ L/h} + 1 \times 4.5\text{ W} - 300\text{ L/h}$) (Tetra GmbH, Melle, Germany) and diffusers (Marina-Hagen, MA, USA) placed at the bottom of the tank. A constant temperature of 20°C was maintained in the reactor using an external air conditioner. The pH was monitored several times throughout the day using a portable CP-401 pH meter (Elmetron, Zabrze, Poland).

Sytek-Szmeichel, K., Podedworna, J., Zubrowska-Sudol, M. (2016). Efficiency of wastewater treatment in SBR and IFAS-MBSBBR systems in specified technological conditions. *Water Science and Technology*, 73(6), 1349–1356

Zajac, O., Zubrowska-Sudol, M., Ciesielski, S., Godzieba, M. (2022). Effect of the aeration strategy on NOB suppression in activated sludge and biofilm in a hybrid reactor with nitrification/denitrification. *Water*, 14(1), 72.

APPENDIX A –Supplementary Material – Reactor operating conditions

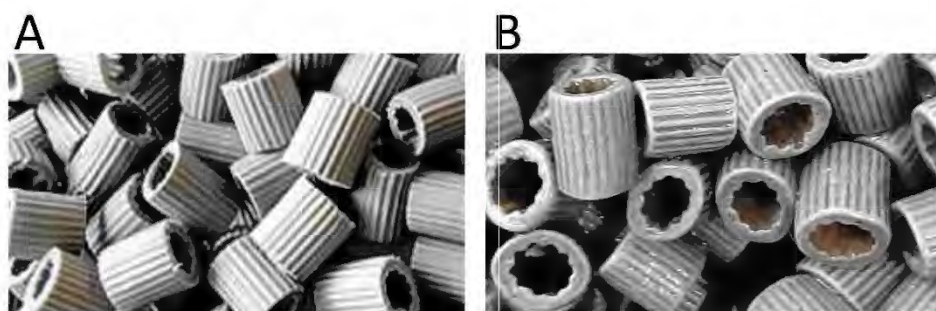


Fig. A.2 Photographs of the EvU-Pearl moving carriers **A.** before, and **B.** after biofilm formation

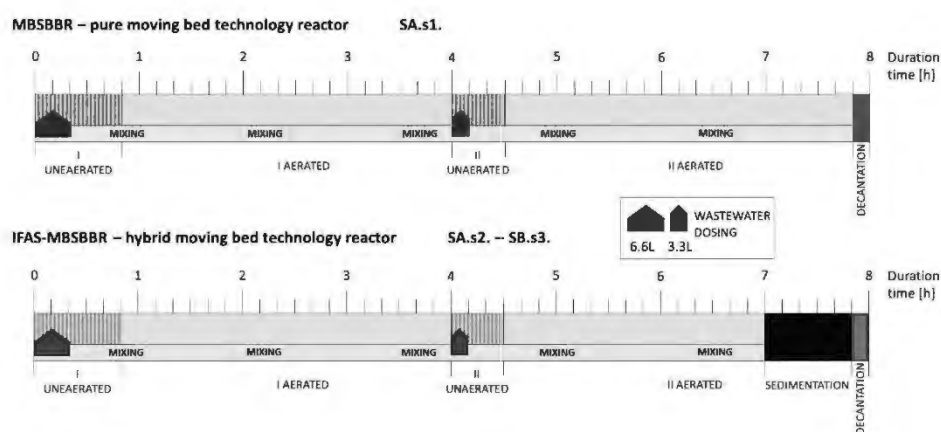


Fig. A.3 Schedules of the reactor operation cycle

The examples of DO concentration profiles for particular series throughout the day

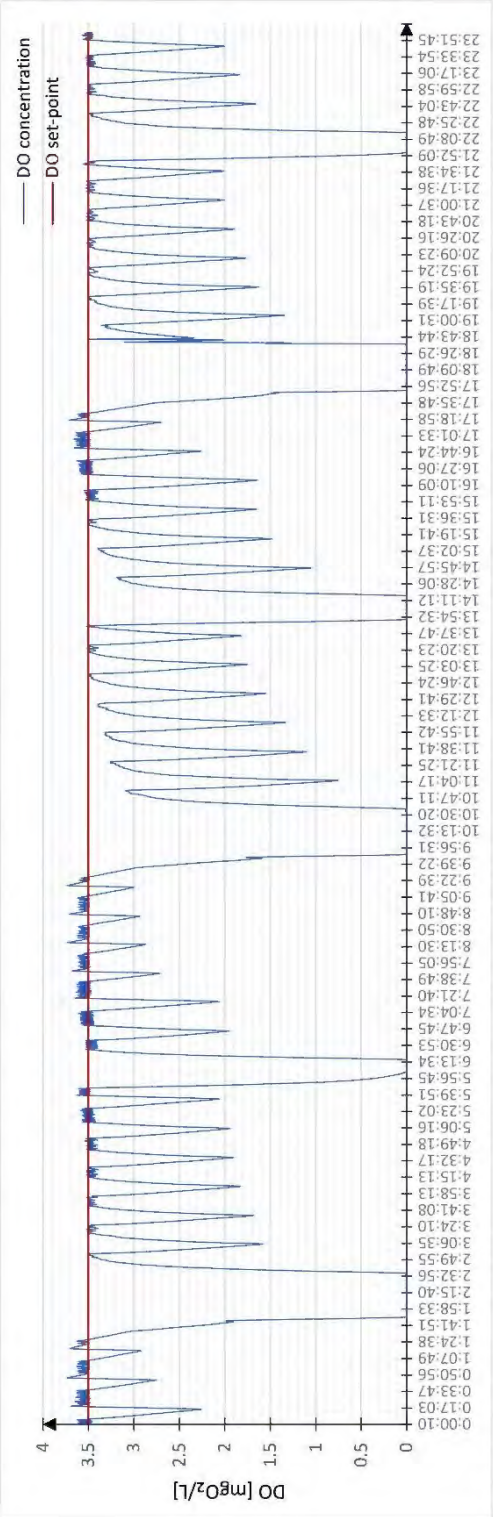


Fig. A.4 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sA.s1.

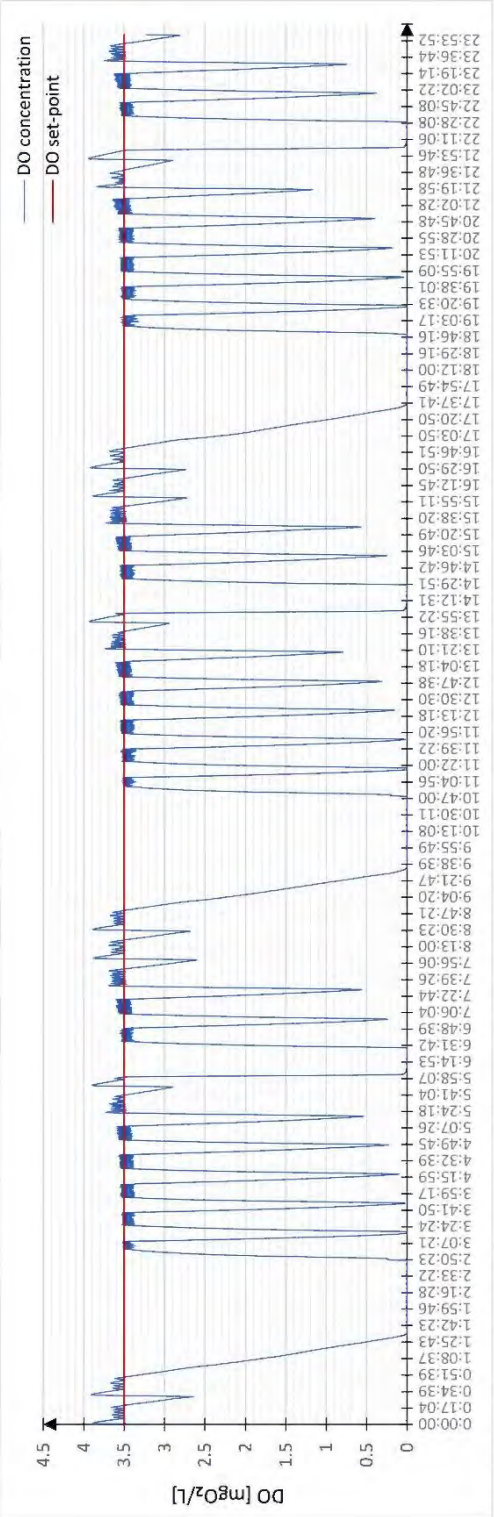


Fig. A.5 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sA.s2.

The examples of DO concentration profiles for particular series throughout the day

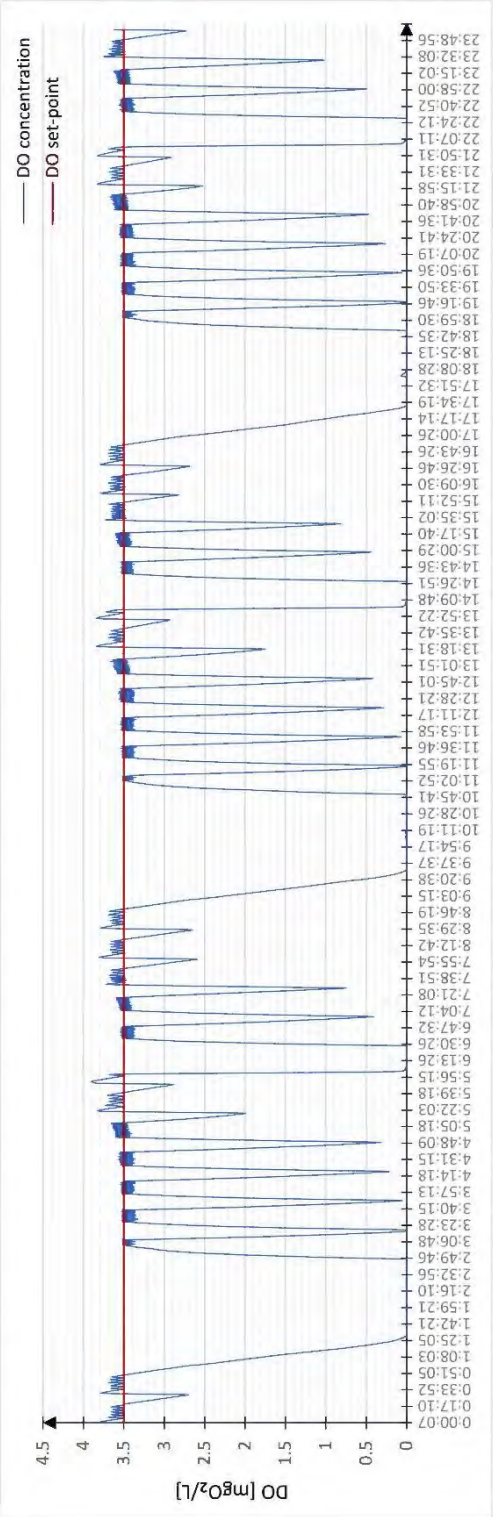


Fig. A.6 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sA.s3.

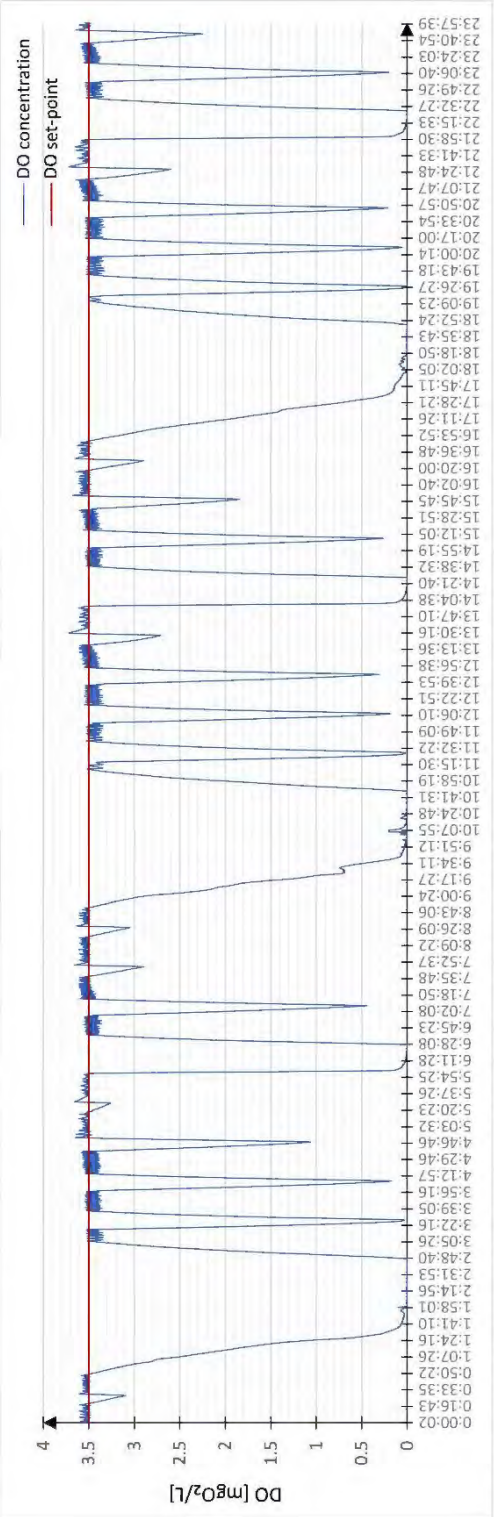


Fig. A.7 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sA.s4.

The examples of DO concentration profiles for particular series throughout the day

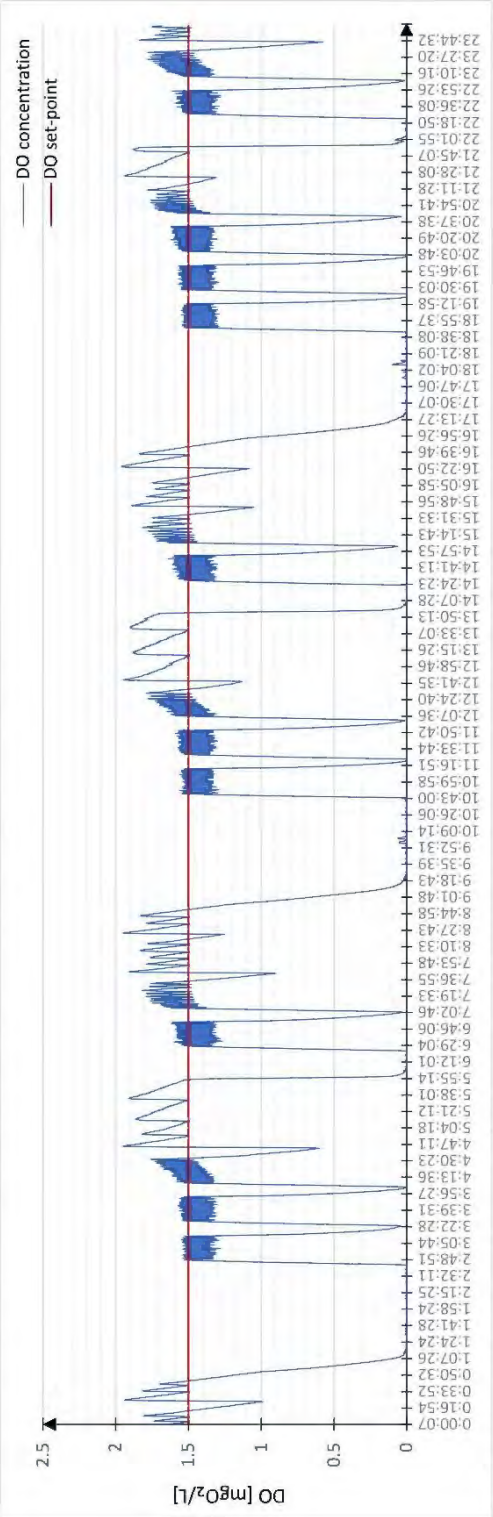


Fig. A.8 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sA.s5.

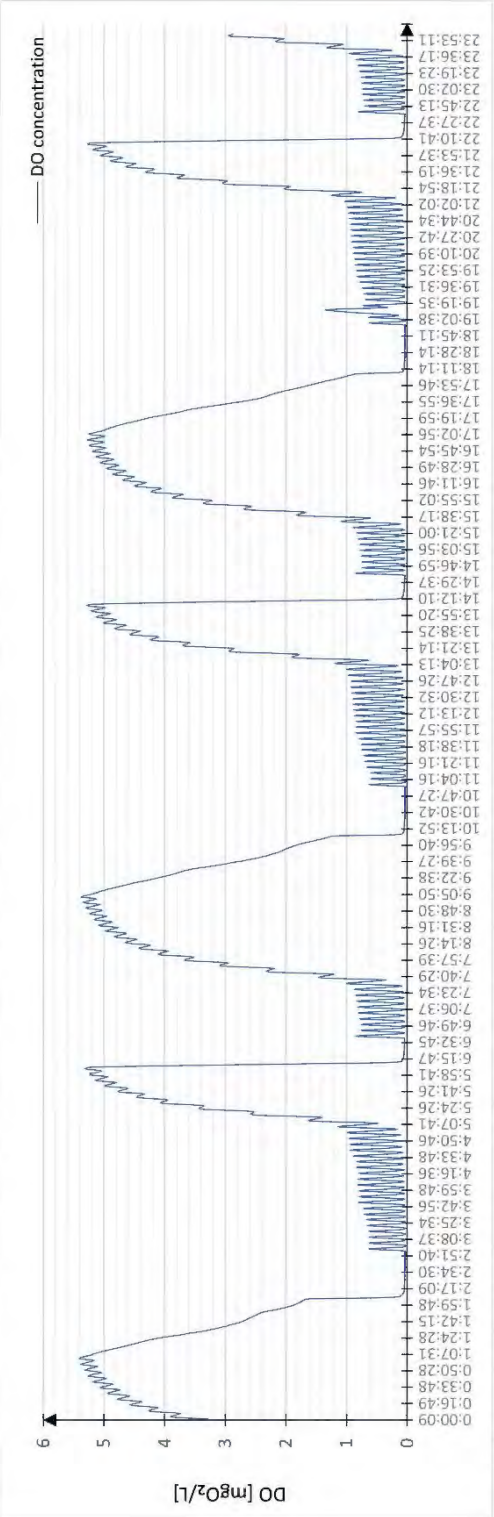


Fig. A.9 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sB.s1.

The examples of DO concentration profiles for particular series throughout the day

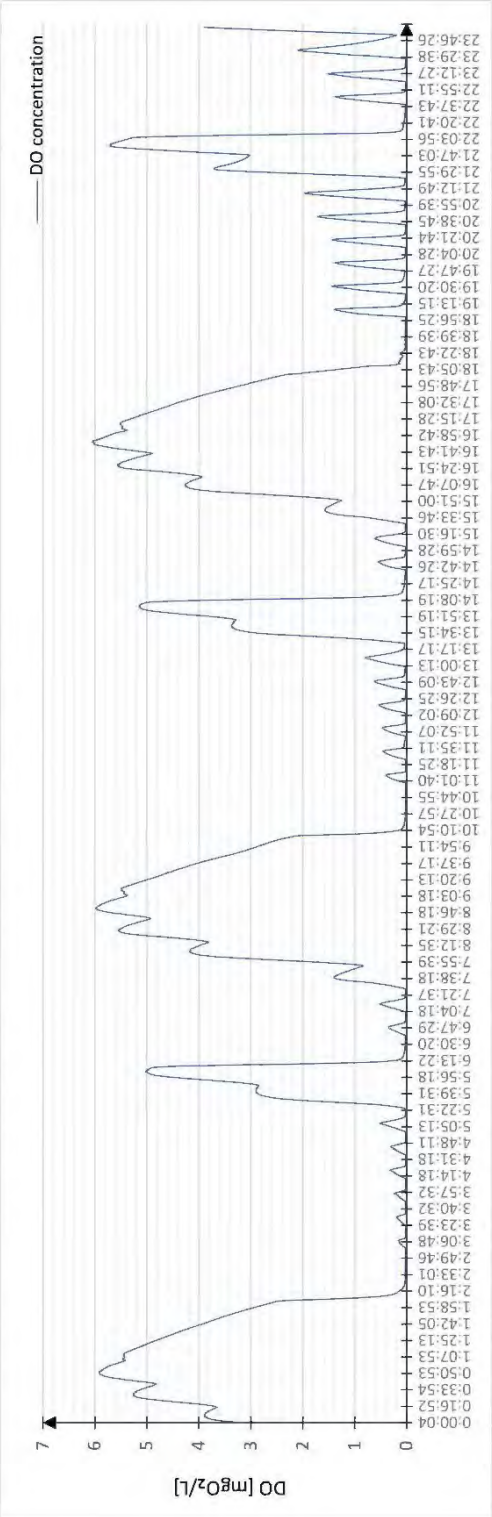


Fig. A.10 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sB.s2.

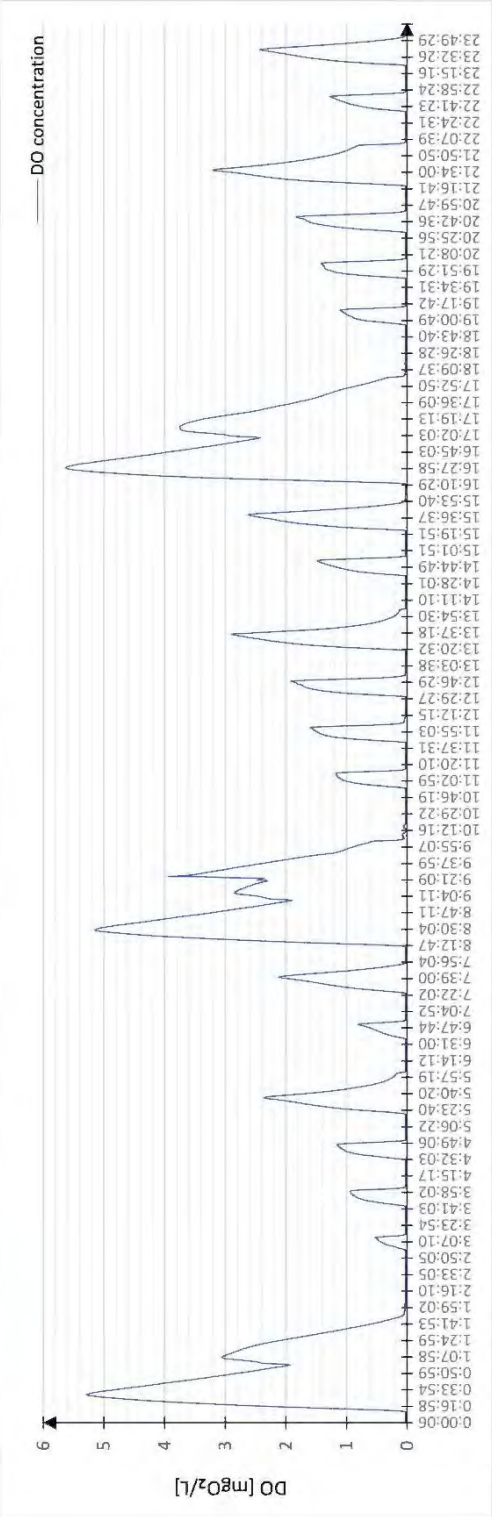


Fig. A.11 Typical dissolved oxygen (DO) concentration profile in the reactor throughout the day - sB.s3.

APPENDIX B – Supplementary Material – Detailed Methodology and Calculation Details

Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies

Olga Zajac^{a,*}, Magdalena Zielinska^b, Monika Zubrowska-Sudol^a

^a Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland;

^b Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna St. 45G, 10-709 Olsztyn, Poland

* Corresponding author: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

1. DETAILED METHODOLOGY

1.1. Statistical analysis

The statistical analysis of the data related to the quality of treated wastewater and the efficiency of pollutant removal was conducted using Statistica 13.3PL software. The hypothesis regarding the distribution of each examined variable was verified based on the Shapiro-Wilk test. To assess the significance of differences between the analysed variables, a one-way analysis of variance (ANOVA) was conducted. The homogeneity of variances across groups was assessed using Levene's test. The significance of differences between the analyzed variables was determined using RiR Tukey test. A significance level of $p=0.05$ was adopted for the tests. A p -value smaller than 0.05 indicated a statistically significant difference between the variables under consideration.

1.2. Microbial community analyses

1.2.1. DNA extraction

Genomic DNA was isolated using a modified method based on the Genomic Mini AX Bacteria + kit (A&A Biotechnology). Real-Time PCR employed universal primers (5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3' and 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGG CCGCCGCCCCCGCCCCACGGGCGGTGTGTAC-3') targeting a fragment of the bacterial 16S rRNA gene (Ferris et al., 1996).

APPENDIX B – Supplementary Material – Detailed Methodology and Calculation Details

1.2.2. V3-V4 amplicons library preparation

Prior to preparing the V3-V4 amplicon libraries, DNA eluates were checked for quantity and quality by a fluorescence-based method (Victor 3 fluorometry) and gel electrophoresis, respectively. The libraries were prepared following the guidelines of the 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Part #15044223 Rev. B, using a two-stage PCR with the Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2. Library quality was assessed following the Illumina qPCR Quantification Protocol Guide.

1.2.3. Next-generation sequencing of the 16S rRNA gene and bioinformatic analysis

Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform with 2x300 bp read configuration by the company Macrogen. The bioinformatic analysis was conducted using CLC Genomic Workbench v. 12 (Qiagen) with the Microbial Genomics Module Plugin v. 4.1 (Qiagen). The sequences of the bacterial communities were analyzed using the DADA2, a native R pipeline². Filtering was done using the parameters `maxN=0`, `maxEE=c(2, 5)`, `truncQ=2`, and `rm.phix=TRUE`. The sequences after dereplication were merged with minimal overlap 12 and chimeras were filtered out using the native consensus method. Taxonomic classification was performed up to the class level by implementing the RDP naïve Bayesian classifier and the SILVA database V138.1 provided by the DADA2 developers [<https://benjjneb.github.io/dada2/training.html>]. The Shannon and Chao1 indices were used to estimate alpha diversity. The Principal Components Analysis (PCA) was used to estimate beta diversity; the selected PCs described 56.62% of the variance. Rarefaction curves and a heatmap of the 10 most abundant phyla were generated in `ampvis2` library (GitHub package). Tree of relativity of the ten most abundant genera in the system was plotted in the `ape` library (`ape` package). In general, GraphPad Prism version 9.0 software (GraphPad Software, USA) and R programming were used for statistical analysis and generation of the graphs.

Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 340–346.

APPENDIX B – Supplementary Material – Detailed Methodology and Calculation Details

2. CALCULATION DETAILS

2.1. Efficiencies of individual wastewater treatment processes

All calculations were made according to the methodology presented in the work of Podedworna and Zubrowska-Sudol (2012).

2.1.1. Efficiency of nitrification process ($E_{Nit.}$) – Eq.(A.1)

$$E_{Nit.} = \frac{C_{TKN}^{inf.} - C_{TKN}^{eff.}}{C_{TKN}^{inf.}} \cdot 100 [\%] \quad \text{Eq.(A.1)}$$

where:

$C_{TKN}^{inf.}$ – concentration of total Kjeldahl nitrogen in influent $\left[\frac{mg}{L}\right]$,

$C_{TKN}^{eff.}$ – concentration of total Kjeldahl nitrogen in effluent $\left[\frac{mg}{L}\right]$.

2.1.2. Efficiency of denitrification process ($E_{Denit.}$) – Eq.(A.2)

$$E_{Denit.} = \frac{C_{TN}^{inf.} - C_{TN}^{eff.}}{C_{TN}^{inf.}} \cdot 100 [\%] \quad \text{Eq.(A.2)}$$

where:

$C_{TN}^{inf.}$ – concentration of total nitrogen in influent $\left[\frac{mg}{L}\right]$,

$C_{TN}^{eff.}$ – concentration of total nitrogen in effluent $\left[\frac{mg}{L}\right]$.

2.1.3. Efficiency of organic compounds removal (E_{COD}) – Eq.(A.3)

$$E_{COD} = \frac{C_{COD}^{inf.} - C_{COD}^{eff.}}{C_{COD}^{inf.}} \cdot 100 [\%] \quad \text{Eq.(A.3)}$$

where:

$C_{COD}^{inf.}$ – concentration of chemical oxygen demand in influent $\left[\frac{mg}{L}\right]$,

$C_{COD}^{eff.}$ – concentration of chemical oxygen demand in effluent $\left[\frac{mg}{L}\right]$.

APPENDIX B – Supplementary Material – Detailed Methodology and Calculation Details

2.1.4. Efficiency of enhanced biological phosphorus removal (E_{EBPR}) – Eq.(A.4)

$$E_{TP} = \frac{C_{TP}^{inf.} - C_{TP}^{eff.}}{C_{TP}^{inf.}} \cdot 100 [\%] \quad \text{Eq.(A.4)}$$

where:

$C_{TP}^{inf.}$ – concentration of total phosphorus in influent $\left[\frac{mg}{L}\right]$,

$C_{TP}^{eff.}$ – concentration of total phosphorus in effluent $\left[\frac{mg}{L}\right]$.

Podedworna, J., Żubrowska-Sudoł, M. (2012). Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase. *Environmental Technology*, 33(2), 237–245.

2.2. Energy consumption for aeration

Energy consumption for aeration in particular series of the experiment was determined according to the methodology described by Luo et al. (2019) – Eq.(A.5), Eq.(A.6)

$$E_O = \frac{E_d}{\Delta m} \left[\frac{kWh}{kg} \right] \quad \text{Eq.(A.5)}$$

$$\Delta m = \frac{Q \cdot \Delta C_{COD} + 4.18 \cdot Q \cdot \Delta C_{N-NH_4^+}}{1000} \left[\frac{kg}{d} \right] \quad \text{Eq.(A.6)}$$

where:

E_O – daily electricity consumption associated with aeration for removing 1 kg of pollutants per day $\left[\frac{kWh}{kg}\right]$,

E_d – daily electric energy consumption in kilowatt-hours per day was calculated based on the power of the aerating pumps multiplied by the duration of their operation within a day $\left[\frac{kWh}{d}\right]$,

Δm – amount of oxidized pollutants (as COD and $N-NH_4^+$) per day $\left[\frac{kg}{d}\right]$,

Q – volume of wastewater flow $\left[\frac{m^3}{d}\right]$,

ΔC_{COD} – differences in COD concentrations in influent and effluent $\left[\frac{g}{m^3}\right]$,

$\Delta C_{N-NH_4^+}$ – differences in $N-NH_4^+$ concentrations in influent and effluent with consideration of $N-NH_4^+$ released in the ammonification process $\left[\frac{g}{m^3}\right]$,

4.18 – oxygen consumption for 1 g of $N-NH_4^+$ oxidation.

Luo, L., Dzakpasu, M., Yang, B., Zhang, W., Yang, Y., Wang, X.C. (2019). A novel index of total oxygen demand for the comprehensive evaluation of energy consumption for urban wastewater treatment. *Applied Energy*, 236, 253–261

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies

Olga Zajac^{a,*}, Magdalena Zielinska^b, Monika Zubrowska-Sudol^a

^a Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland;

^b Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna St. 45G, 10-709 Olsztyn, Poland

* Corresponding author: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl

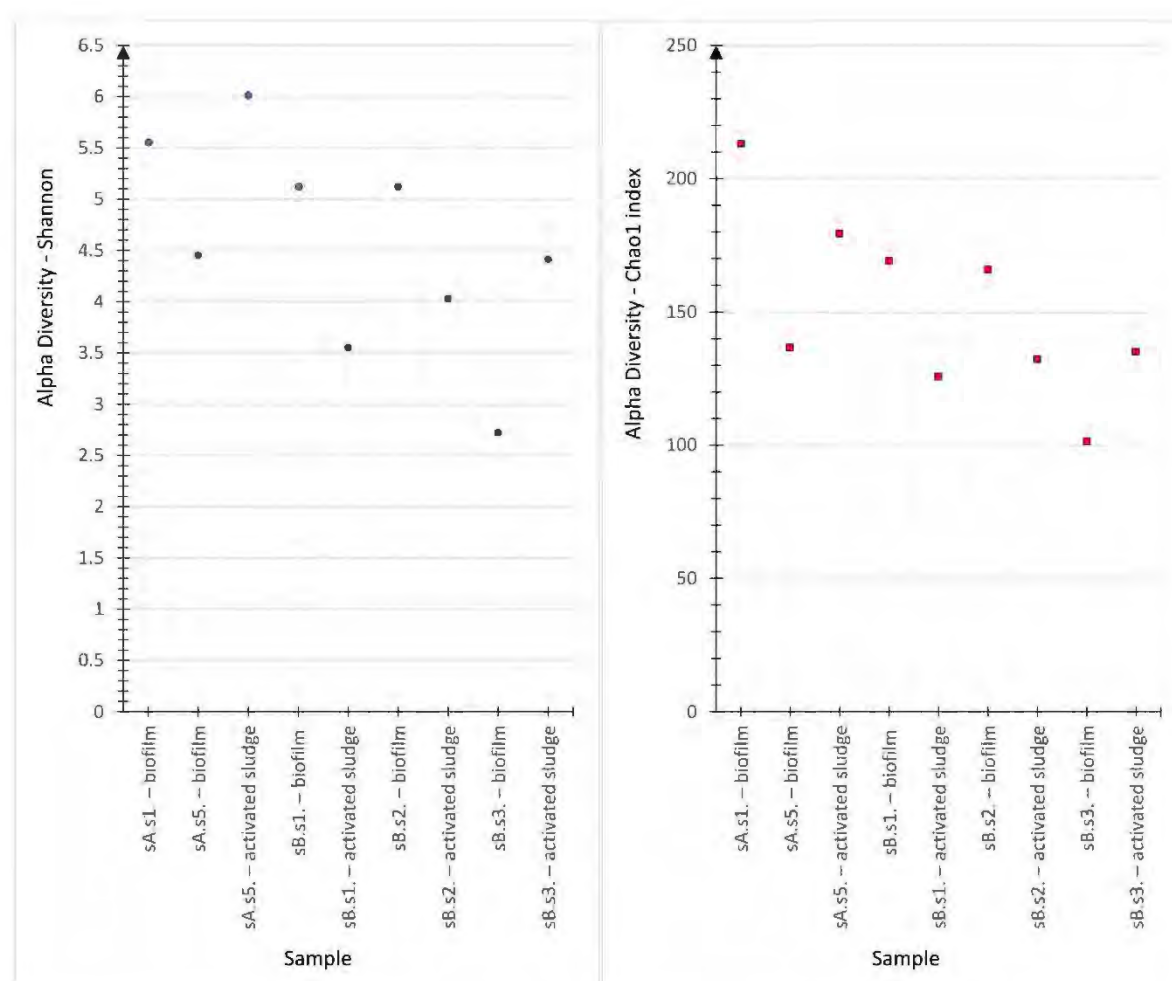


Fig. C.1 Richness and diversity of the microbial communities in biofilm and activated sludge samples

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

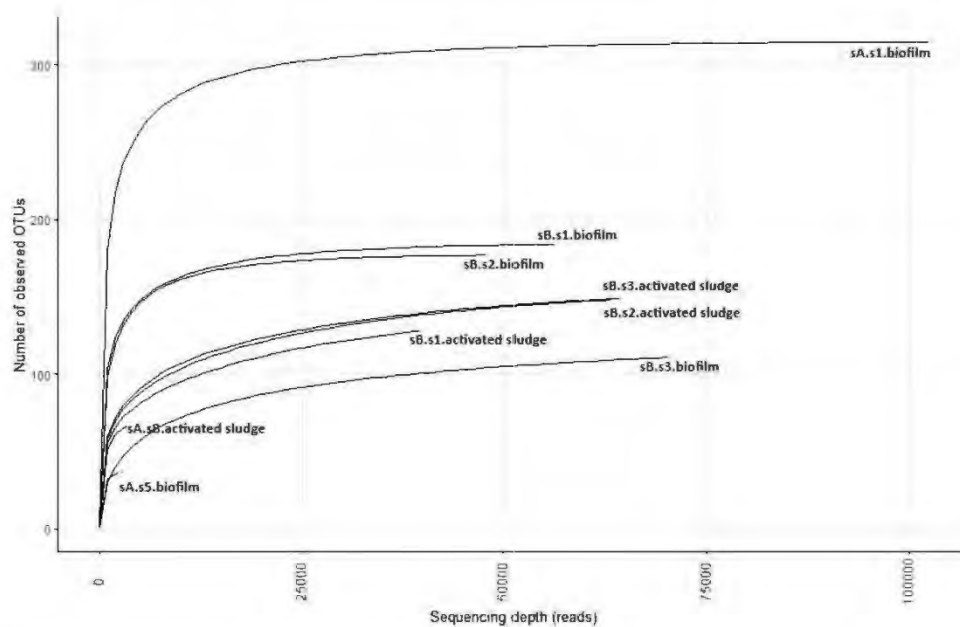


Fig. C.2 Rarefaction curves of the samples of activated sludge and biofilm

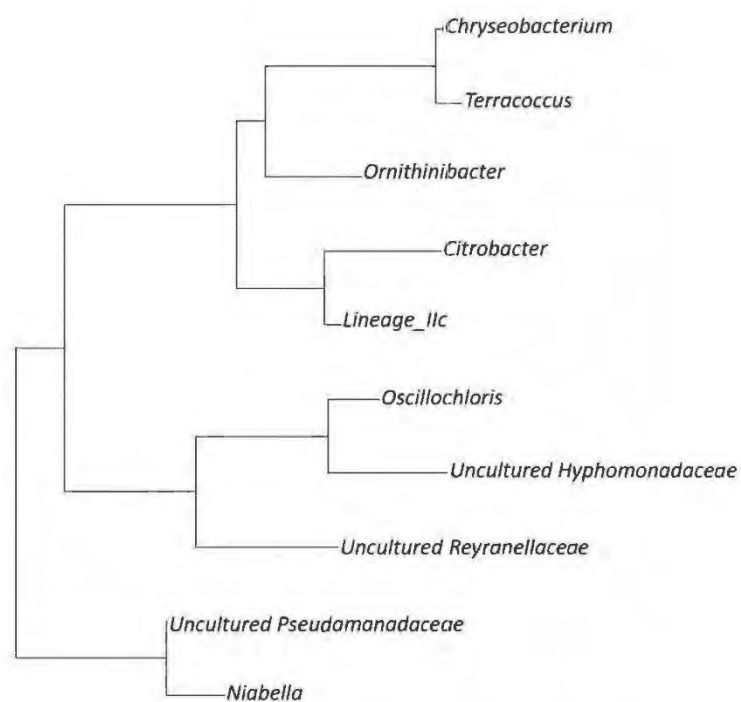


Fig. C.3 Tree presenting the relationships of the presence of genera in the samples

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

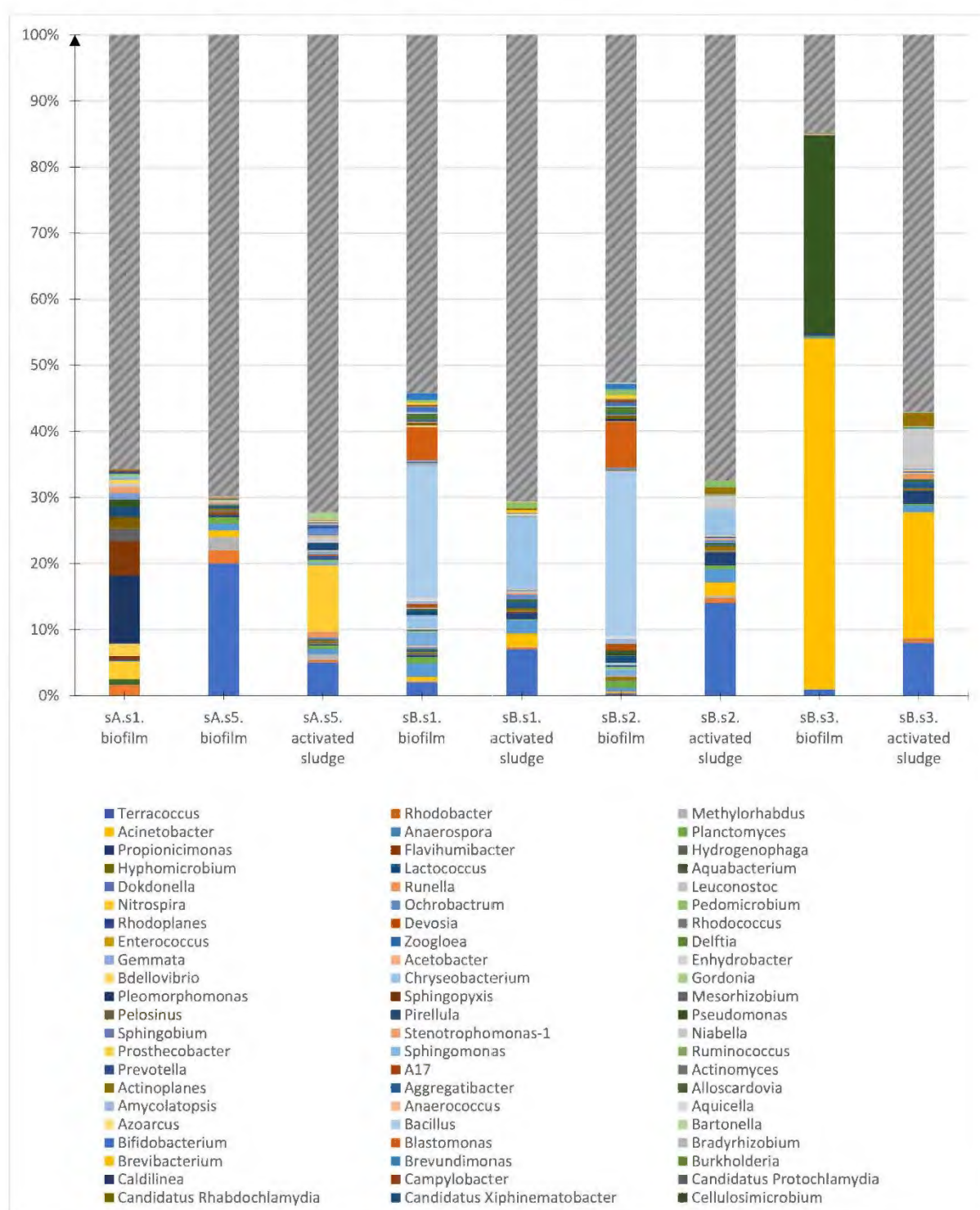


Fig. C.4 Relative abundance (%) of the most prevalent genus in the biofilm and activated sludge samples

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

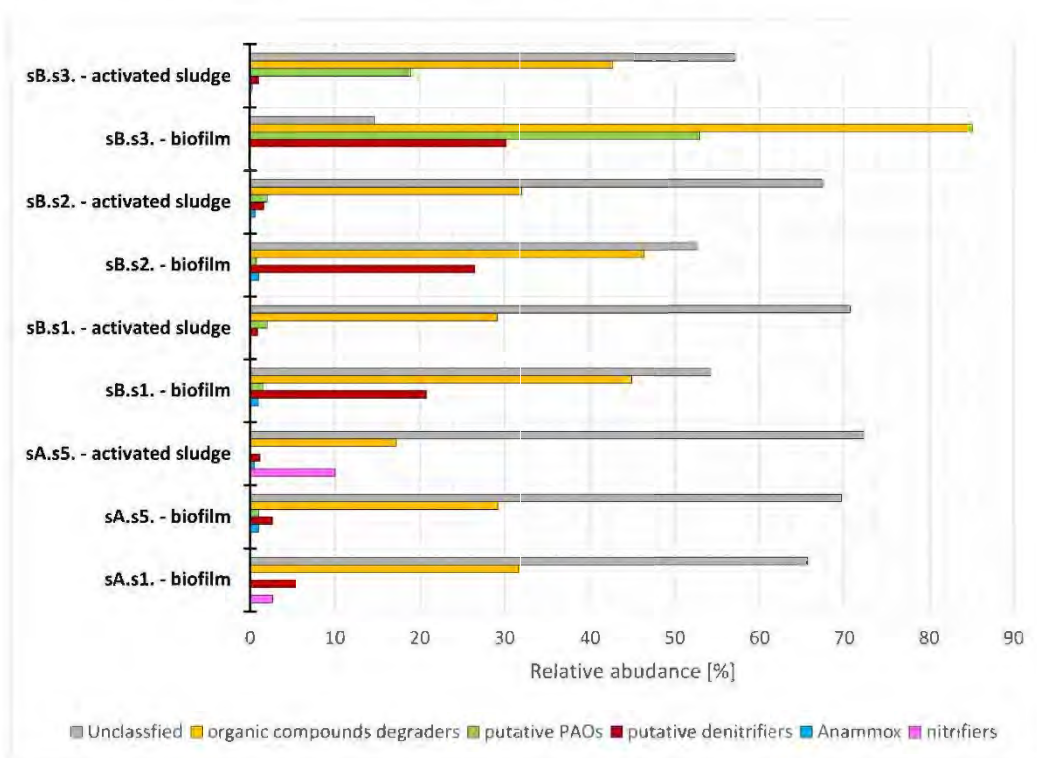


Fig. C.5 Relative abundance of specific groups – nitrifiers, putative denitrifiers, putative PAOs, organic compounds degraders, and Anammox in the biomass developing in the reactor throughout the experiment

Tab. C.1 Functional genera of specific groups of microorganisms

Group of microorganisms	Functional genera
nitrifiers	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrospira</i>
putative denitrifiers	<i>Rhodobacter</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Thermomonas</i> , <i>Denitratisoma</i> , <i>Thauera</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Defluviimonas</i>
Anammox	<i>Planctomyces</i>
putative PAOs	<i>Acinetobacter</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Propionibacterium</i>
organic compounds degraders	<i>Terracoccus</i> , <i>Methylothermobacter</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Thermomonas</i> , <i>Denitratisoma</i> , <i>Thauera</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Defluviimonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Dechloromonas</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Propionimonas</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Ferruginibacter</i>

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

Tab. C.2 Effluent characteristics, efficiencies of nitrification, denitrification, organic and phosphorus compounds removal, and batch test results

			Stage A					Stage B		
Parameter			series 1 (sA.s1.)	series 2 (sA.s2.)	series 3 (sA.s3.)	series 4 (sA.s4.)	series 5 (sA.s5.)	series 1 (sB.s1.)	series 2 (sB.s2.)	series 3 (sB.s3.)
Effluent characteristics ^b	COD	mg O ₂ /L	18.18±2.88	15.18±3.89	17.37±5.43	13.26±3.14	14.23±2.78	14.83±4.96	17.02±3.23	18.78±6.14
	TN	mg N/L	15.43±2.93	10.89±1.36	10.96±1.45	10.63±0.82	11.14±0.87	6.69±1.45	5.78±0.99	5.83±1.63
	TKN	mg N/L	2.22±1.76	2.04±0.73	1.82±0.98	2.28±1.04	2.14±1.07	1.94±1.00	2.34±1.35	2.70±1.53
	N-NH₄⁺	mg N-NH ₄ ⁺ /L	1.03±0.52	0.70±0.32	0.62±0.21	0.73±0.21	0.86±0.34	0.84±0.31	1.05±0.46	1.11±0.45
	N-NO₂⁻	mg N-NO ₂ ⁻ /L	0.22±0.24	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.02	0.02±0.02	0.01±0.00	0.01±0.02	0.03±0.06
	N-NO₃⁻	mg N-NO ₃ ⁻ /L	13.00±2.36	8.85±1.77	9.14±1.62	8.34±1.18	8.98±0.98	4.47±1.50	3.44±1.55	3.10±1.45
	TP	mg P/L	4.35±0.60	0.74±0.21	0.93±0.54	0.77±0.43	1.12±0.56	0.86±0.35	1.14±0.28	0.96±0.31
	P-PO₄³⁻	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	4.21±0.61	0.72±0.21	0.90±0.52	0.75±0.42	1.08±0.54	0.79±0.32	1.11±0.27	0.94±0.30
Efficiencies	E_{COD}	%	96.32±0.57	97.08±0.75	96.61±1.03	97.39±0.61	97.21±0.55	97.19±0.97	96.83±0.67	96.45±0.86
	E_{Nit.}	%	96.25±2.90	96.58±1.20	96.90±1.69	96.12±1.77	96.43±1.78	97.02±1.46	95.92±2.49	95.43±2.54
	E_{Denit.}	%	74.05±4.71	81.87±2.43	81.46±2.44	81.98±1.56	81.56±1.53	89.07±2.43	90.25±1.59	90.37±2.52
	E_{EBPR}	%	35.03±4.25	87.32±3.64	84.96±8.47	87.83±6.59	81.59±8.45	87.17±5.07	83.56±4.52	86.86±4.52
	E_{P-PO₄³⁻}	%	34.95±6.14	87.32±3.80	85.00±8.45	87.79±6.62	81.63±8.38	86.87±5.05	83.49±3.30	86.75±4.61
Kinetic batch test results ^a	AOR	CB	6.944	6.558	4.893	4.608	5.940	2.301	4.473	4.477
	[mg N-NH ₄ ⁺ /h·gVSS]	AcS	-	4.500	6.311	3.766	4.183	4.580	5.283	6.806
	NitOR	CB	10.063	21.829	9.968	12.437	13.185	9.228	10.836	12.887
	[mg N-NO ₂ ⁻ /h·gVSS]	AcS	-	4.164	2.554	2.618	1.841	2.883	1.161	1.262

^a charts with results of particular batch tests providing the basis for the determination of ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR) are presented in Fig. C.6–Fig. C.20

^b Profiles of influent and effluent concentrations of particular pollutants and removal efficiencies are presented in Fig. C.21–Fig.C.27

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

Results of particular Ammonia Utilisation Rate (AUR) and Nitrite Utilisation Rate (NitUR) tests (Fig. C.6 – Fig. C.20)

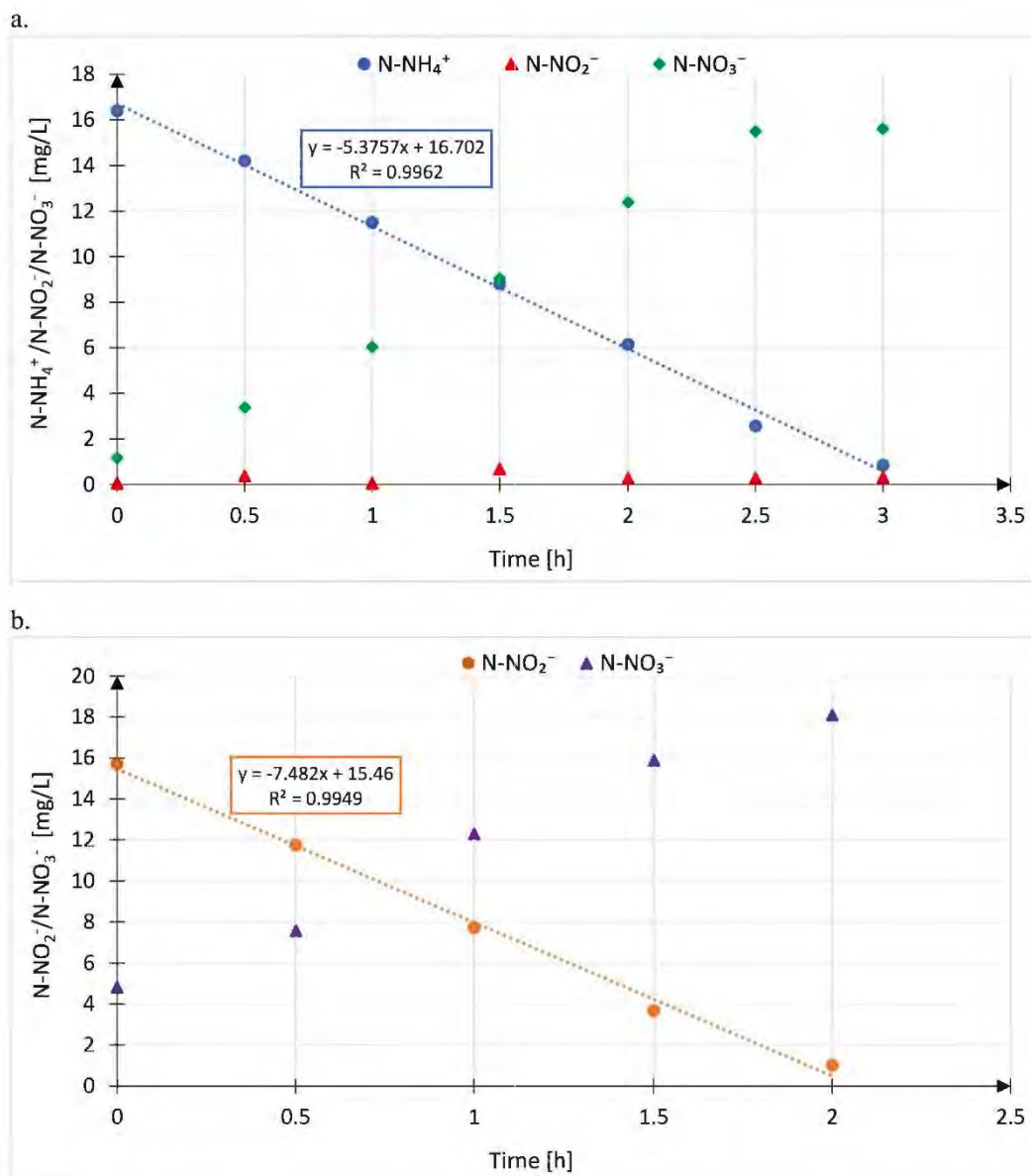


Fig. C.6 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s1. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

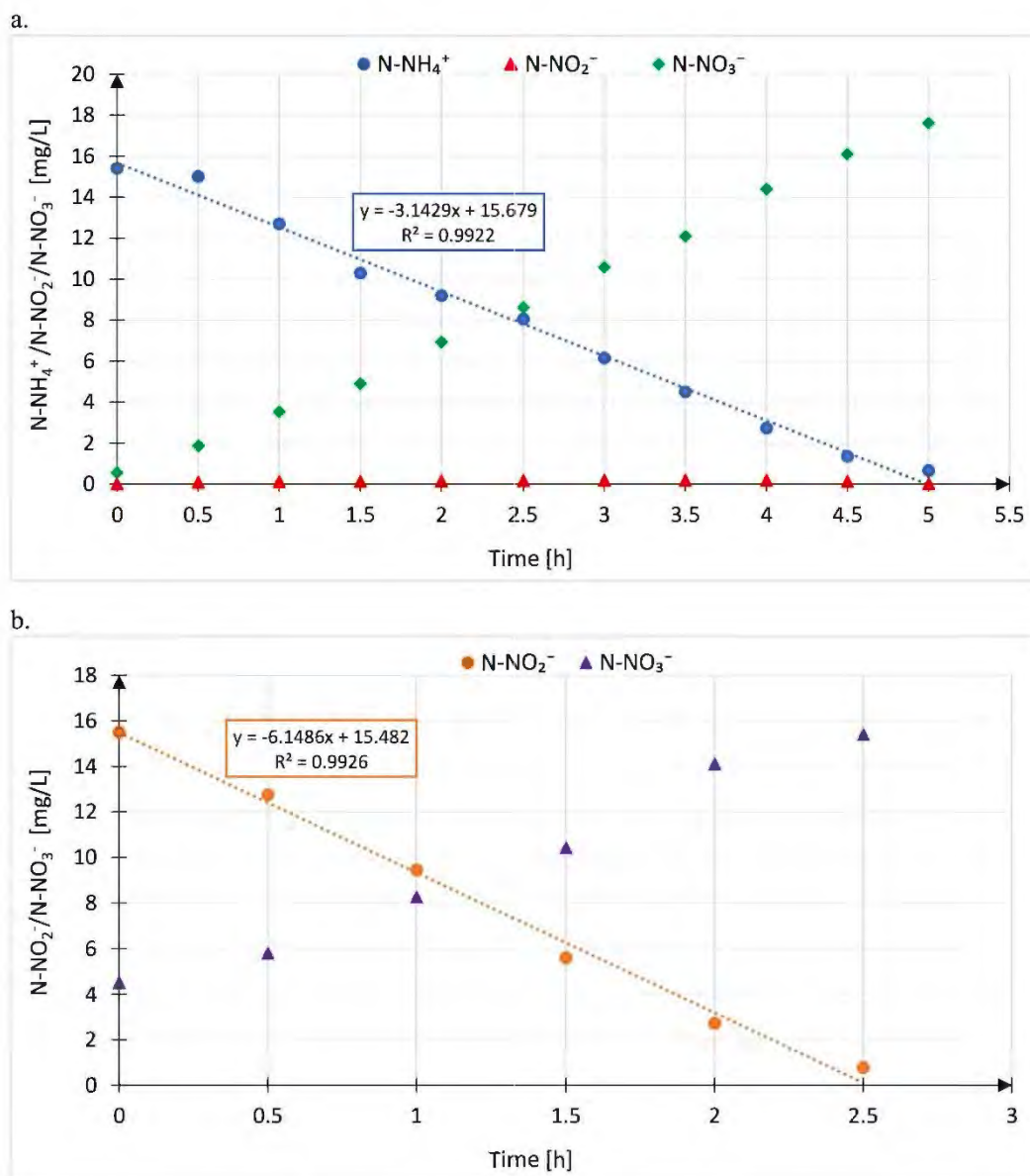


Fig. C.7 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s2. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

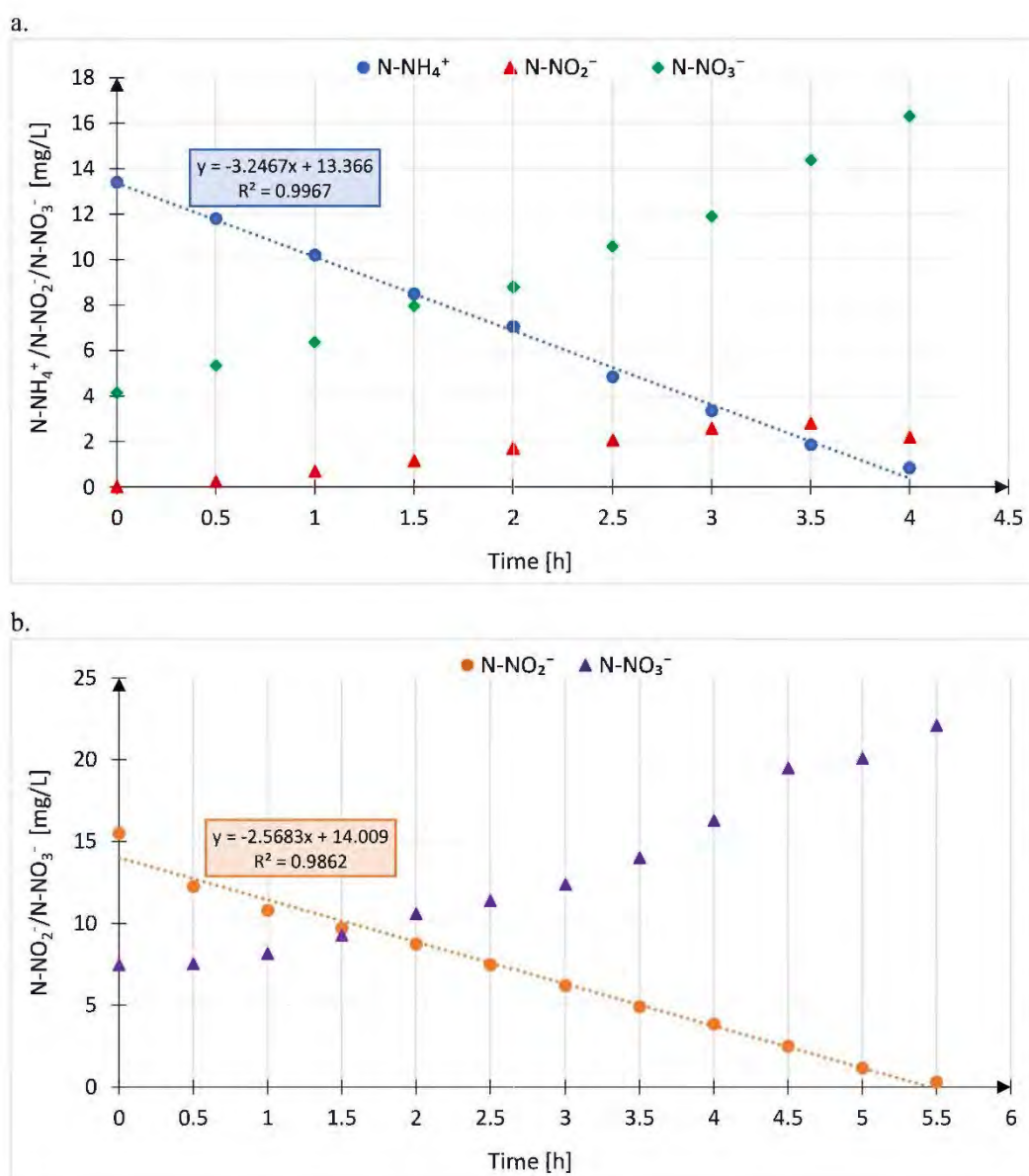


Fig. C.8 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s2. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

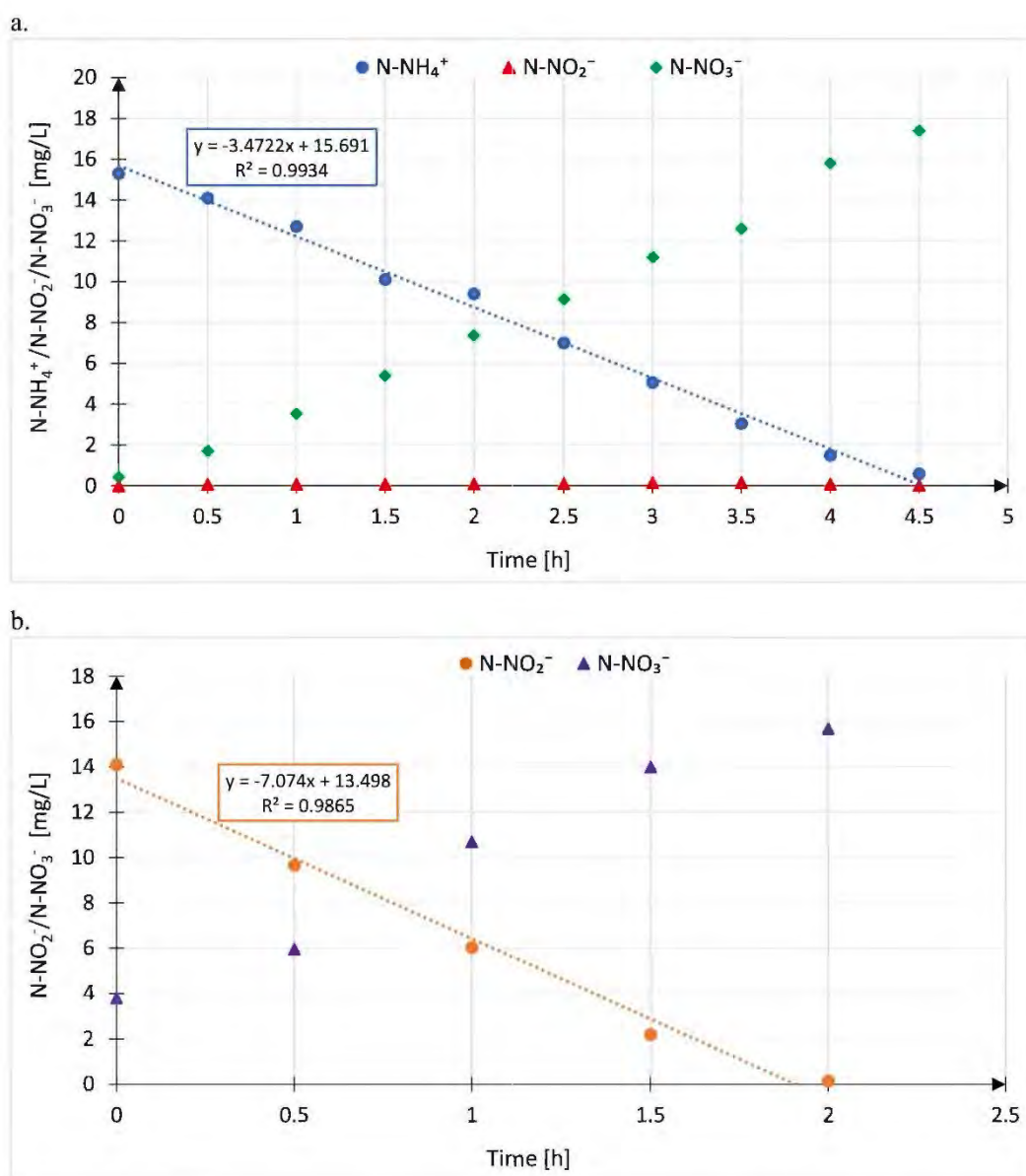


Fig. C.9 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s3. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

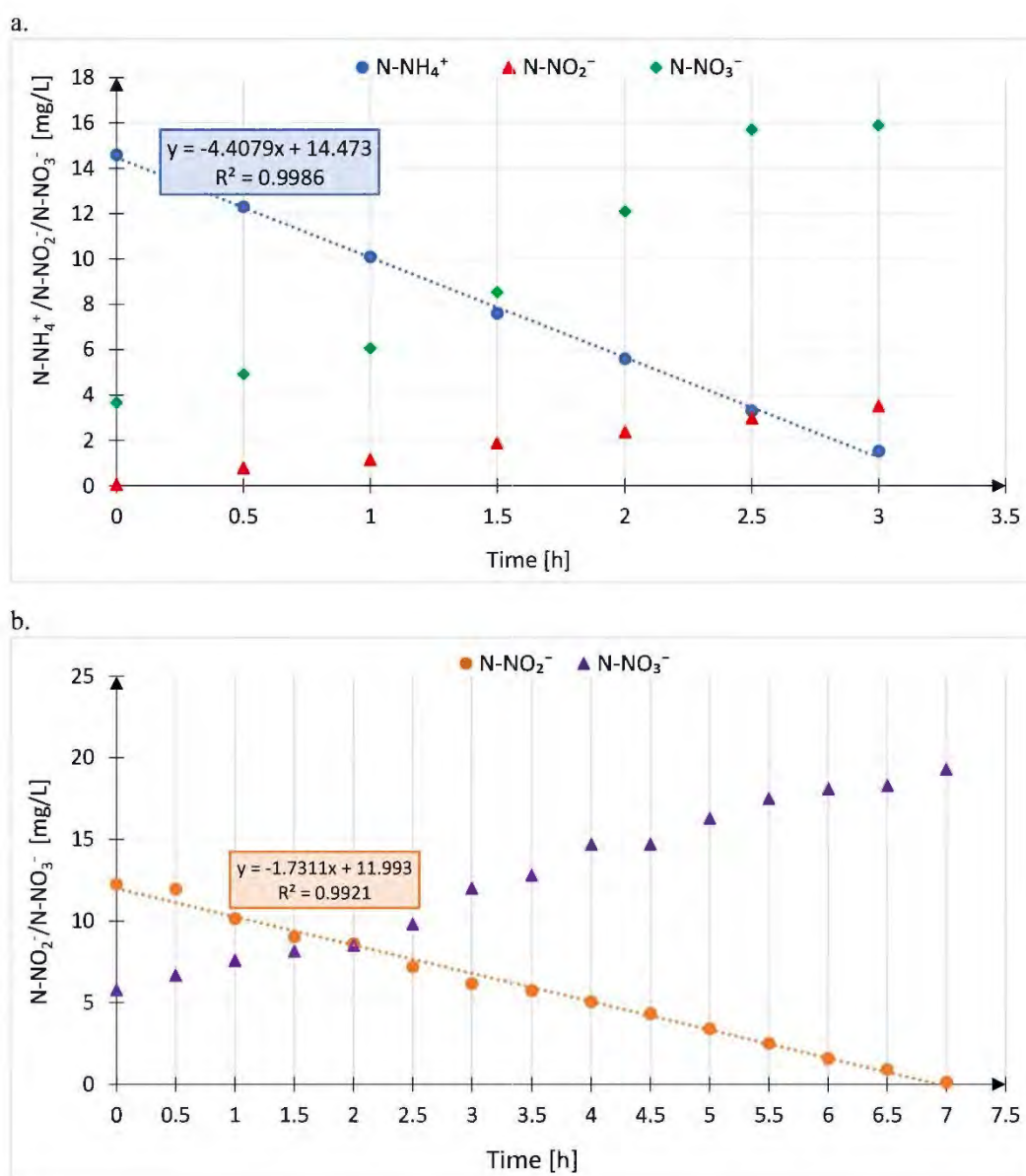


Fig. C.10 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s3. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

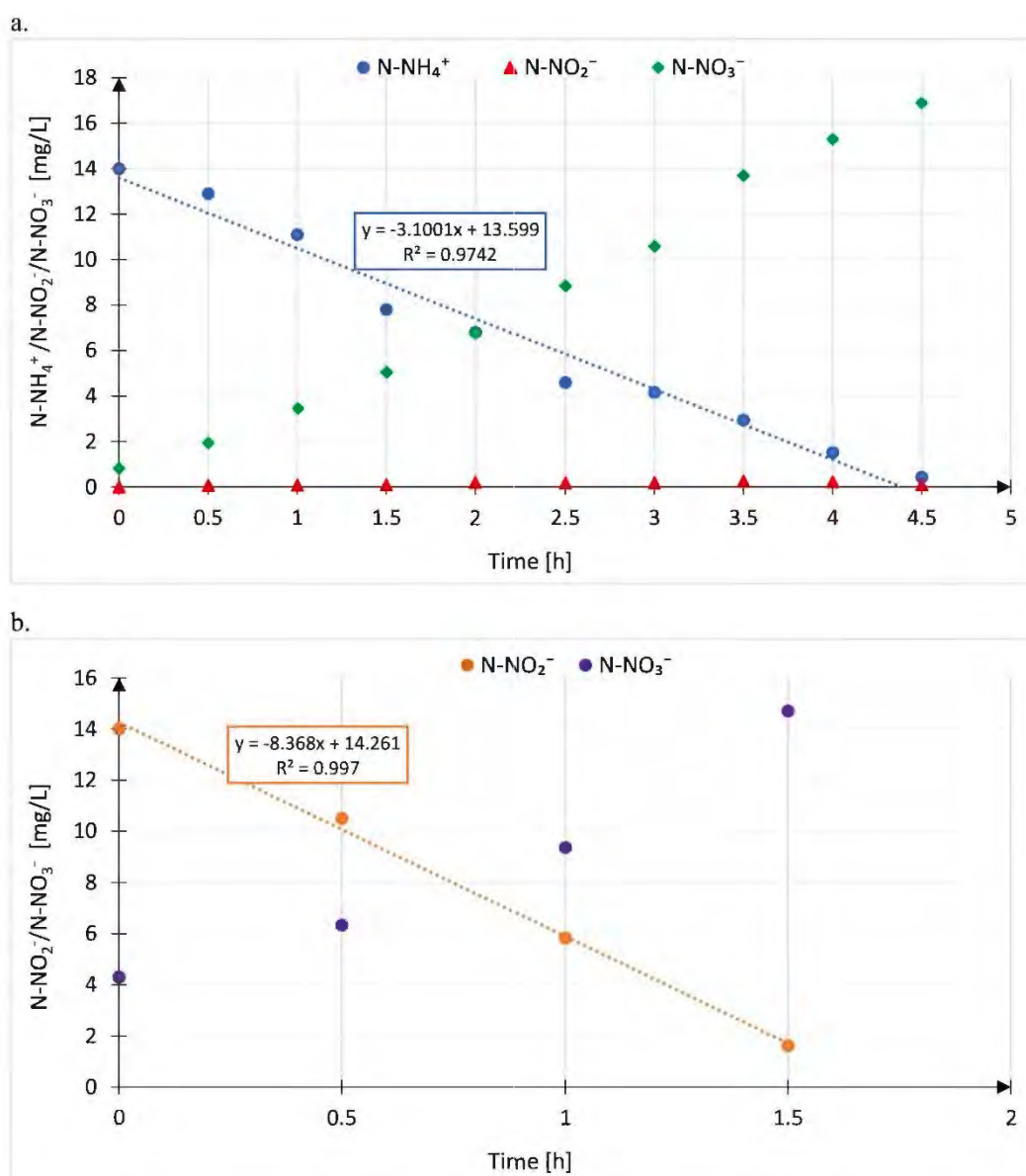


Fig. C.11 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s4. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

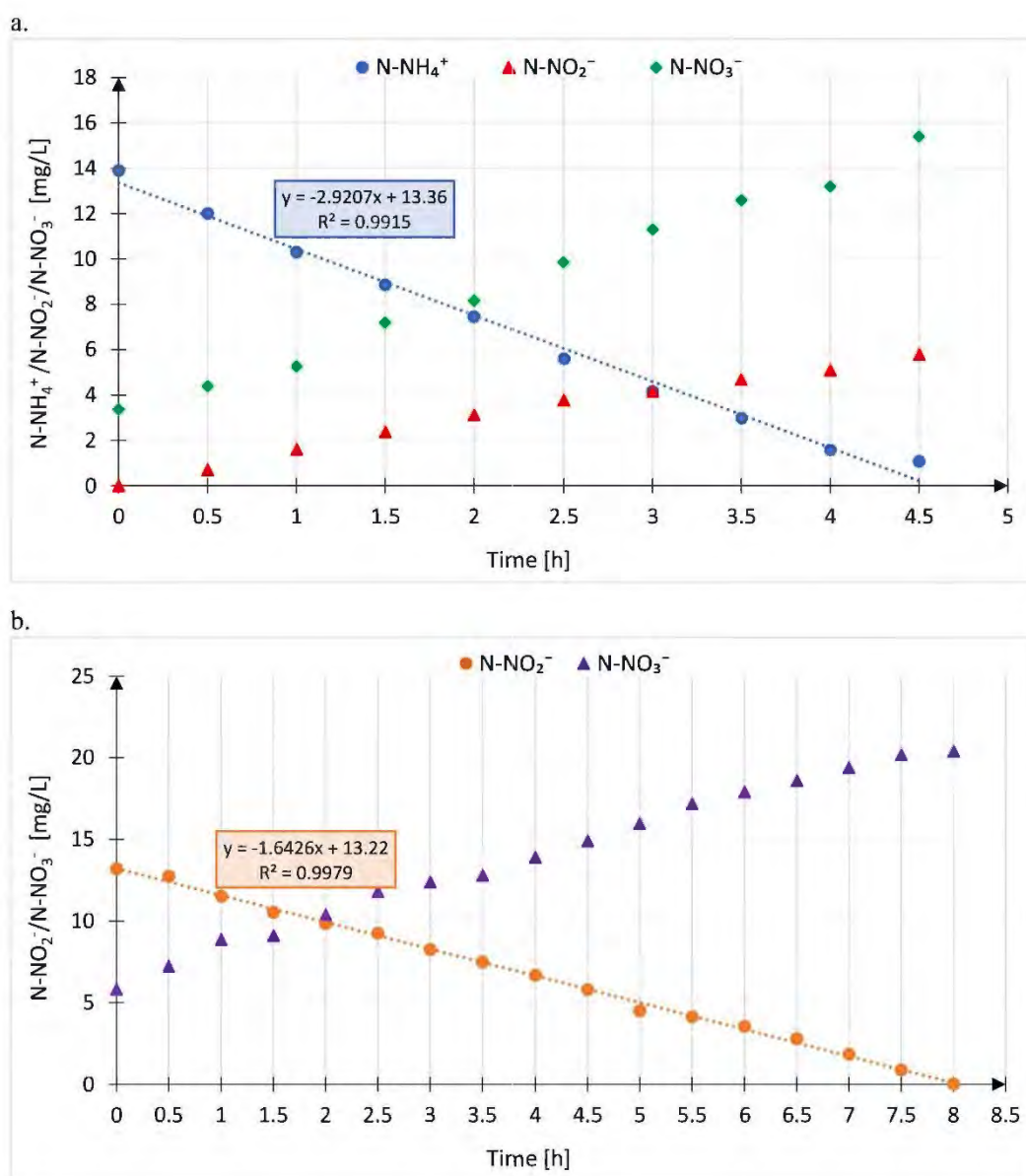


Fig. C.12 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s4. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

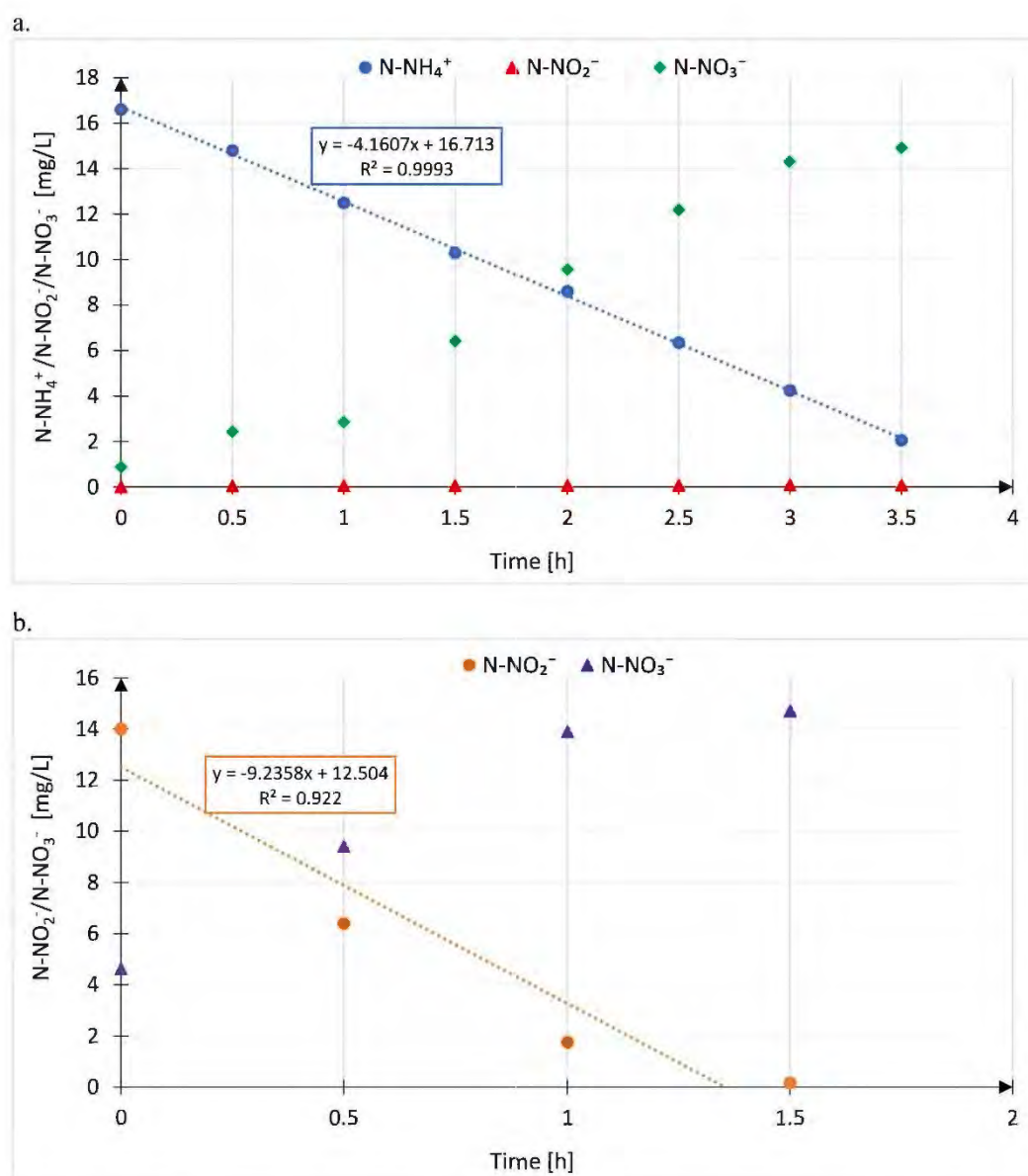


Fig. C.13 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s5. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

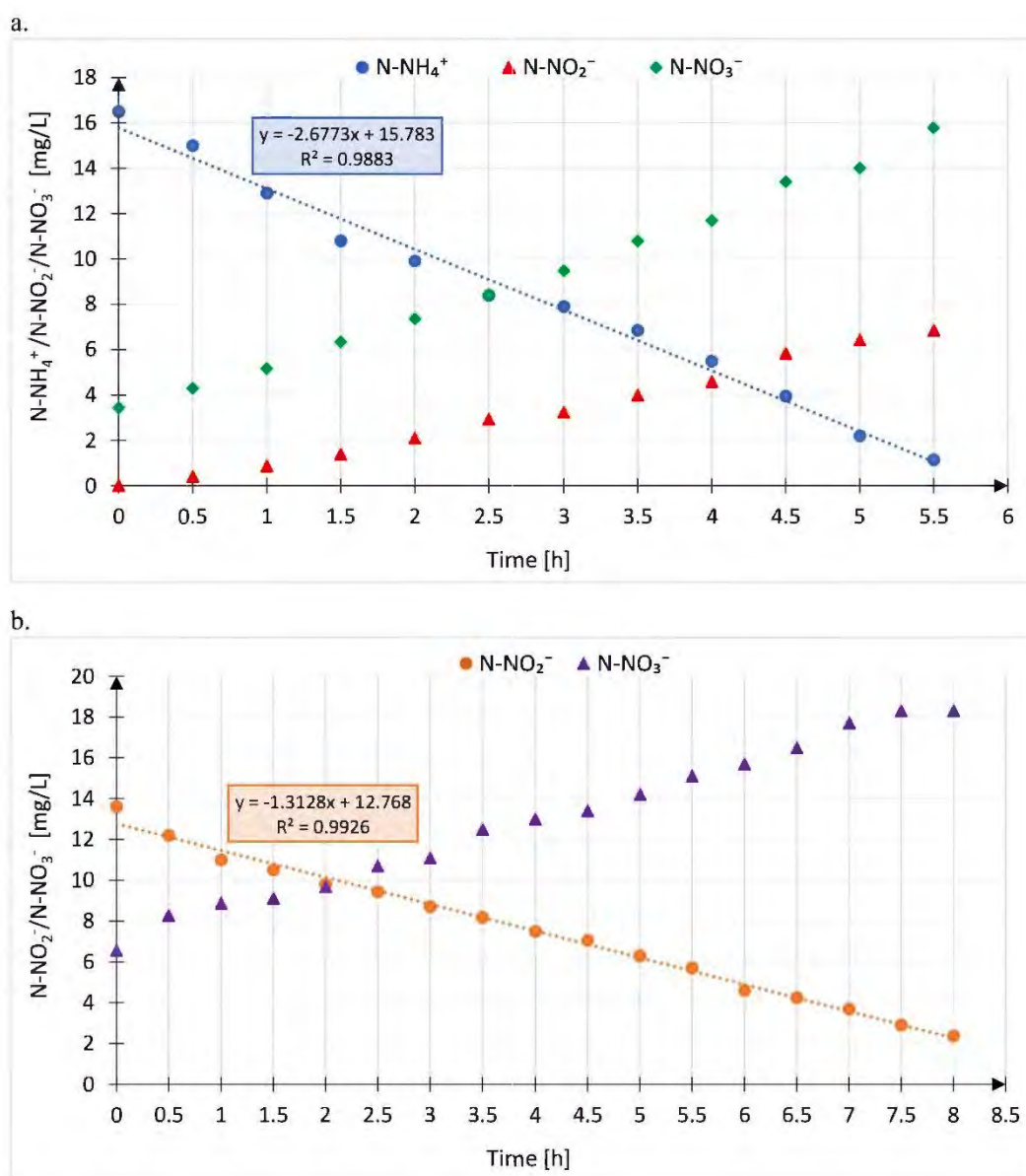


Fig. C.14 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sA.s5. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

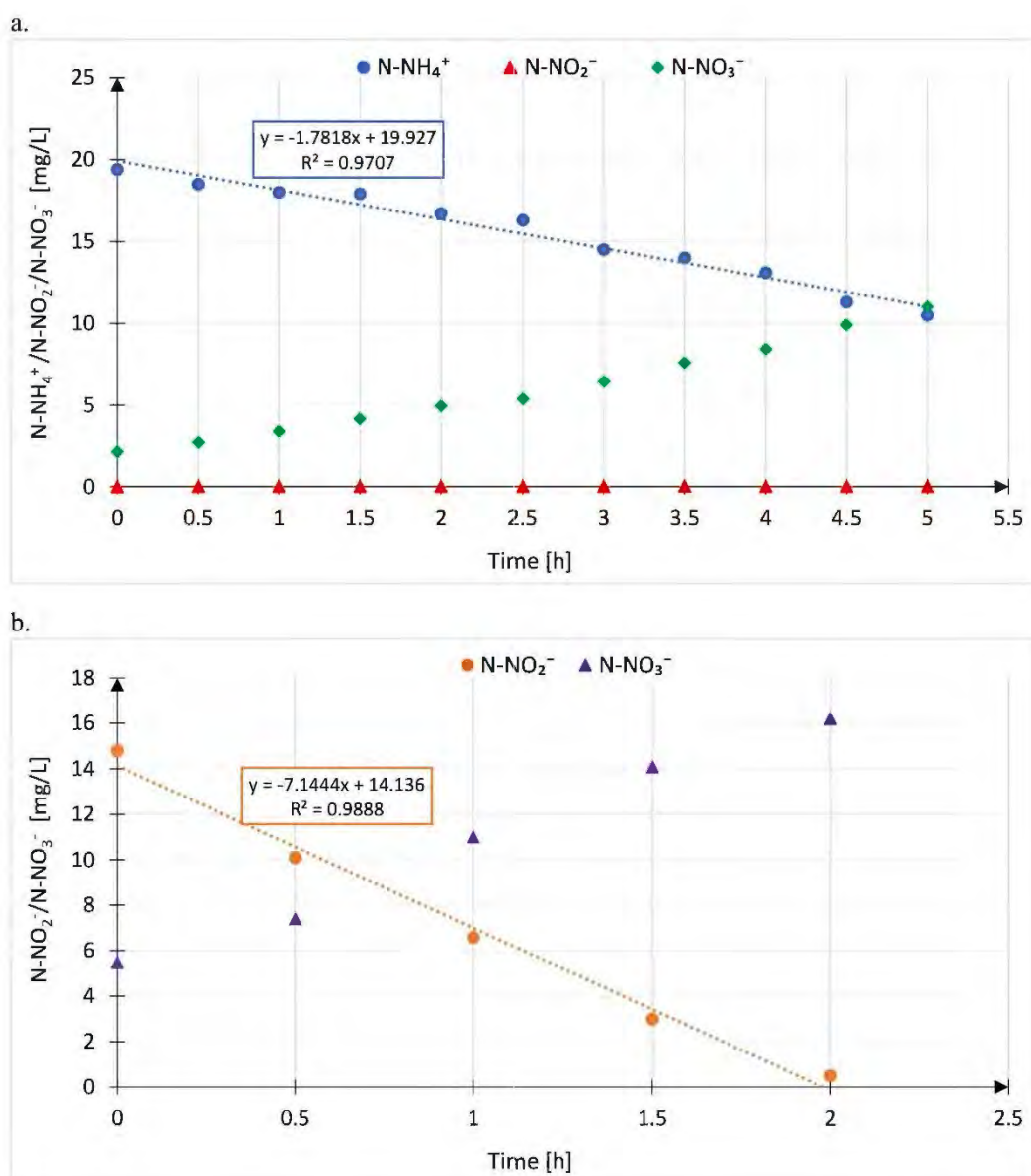


Fig. C.15 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sB.s1. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

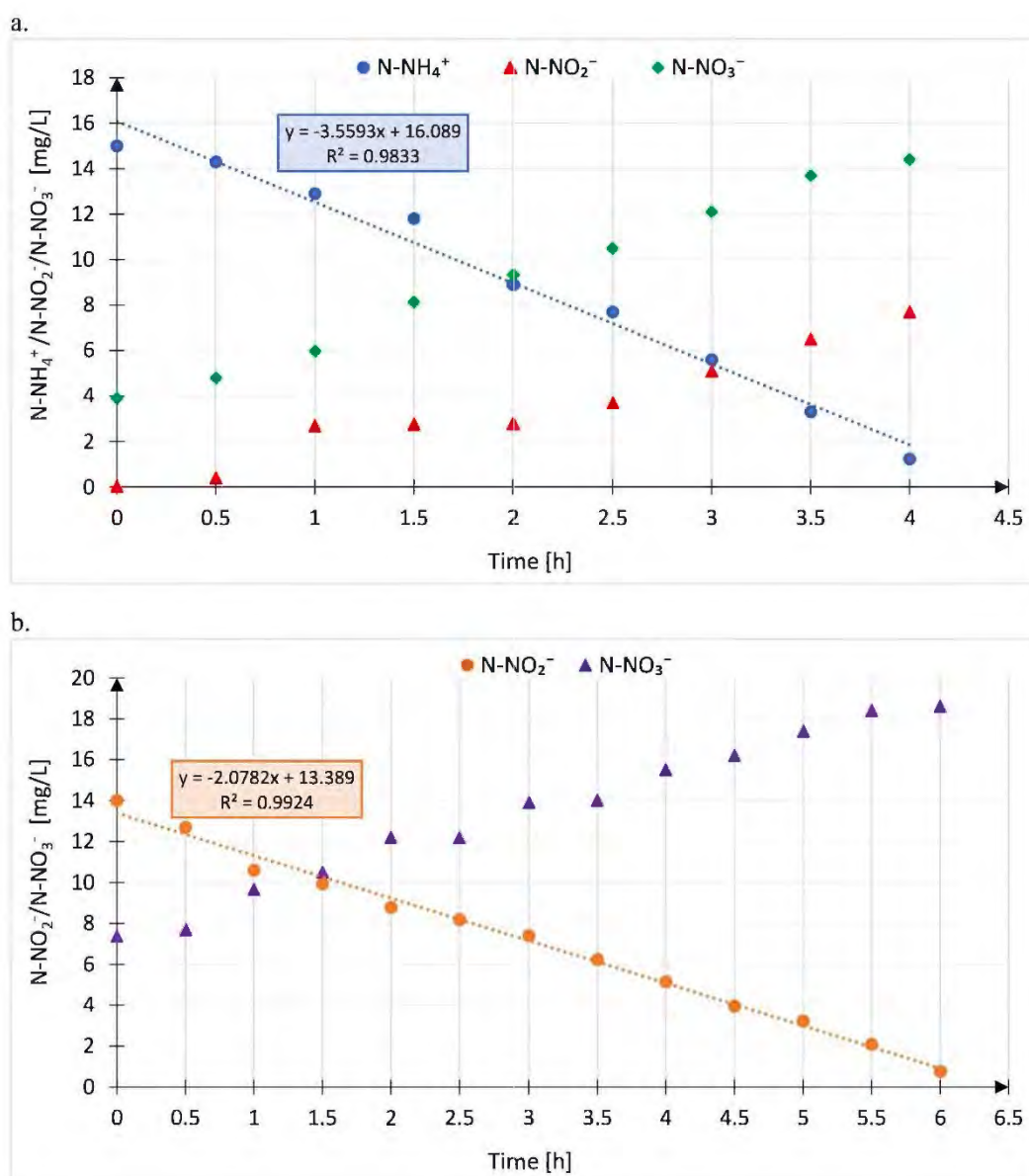


Fig. C.16 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sB.s1. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

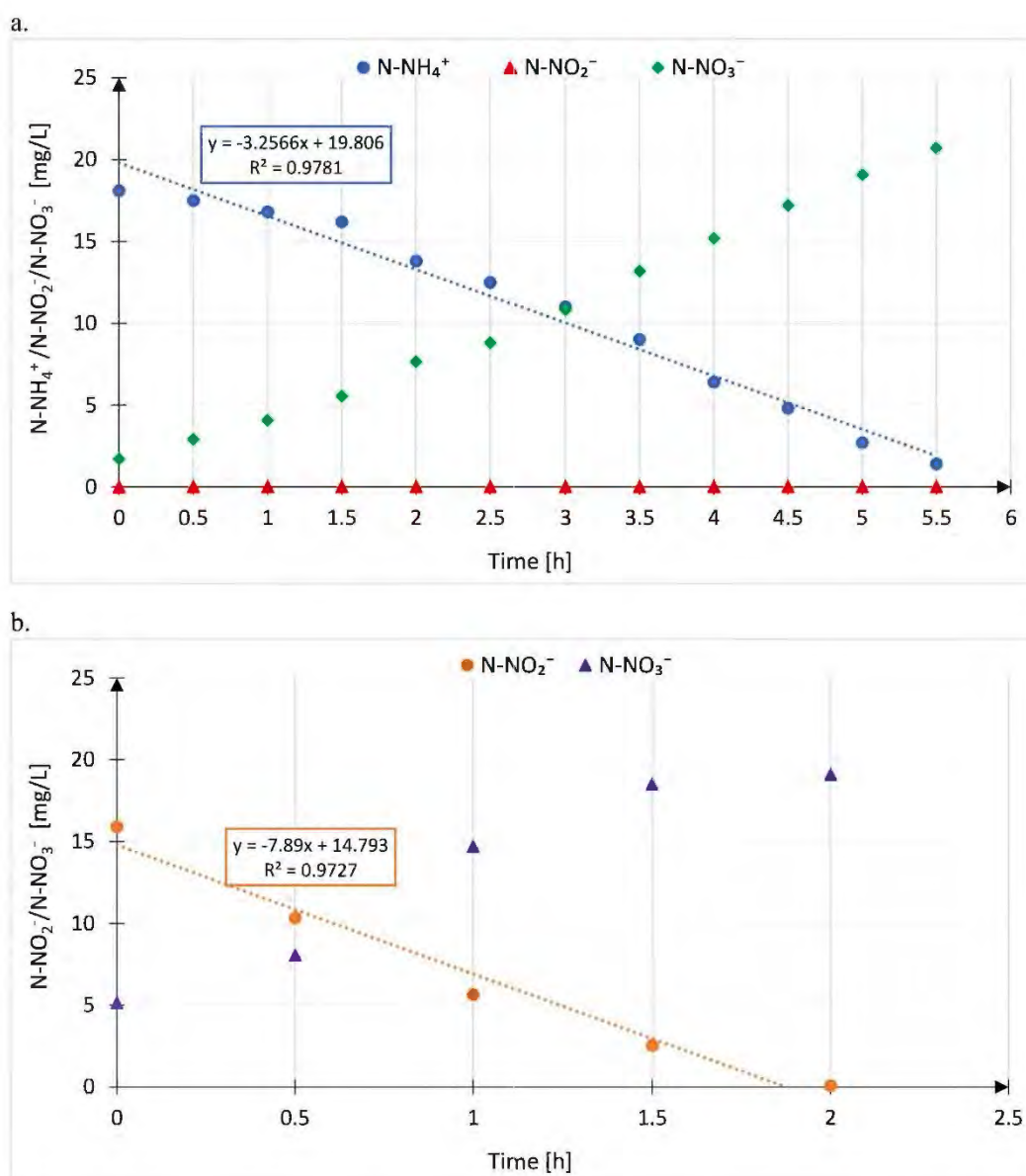


Fig. C.17 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sB.s2. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

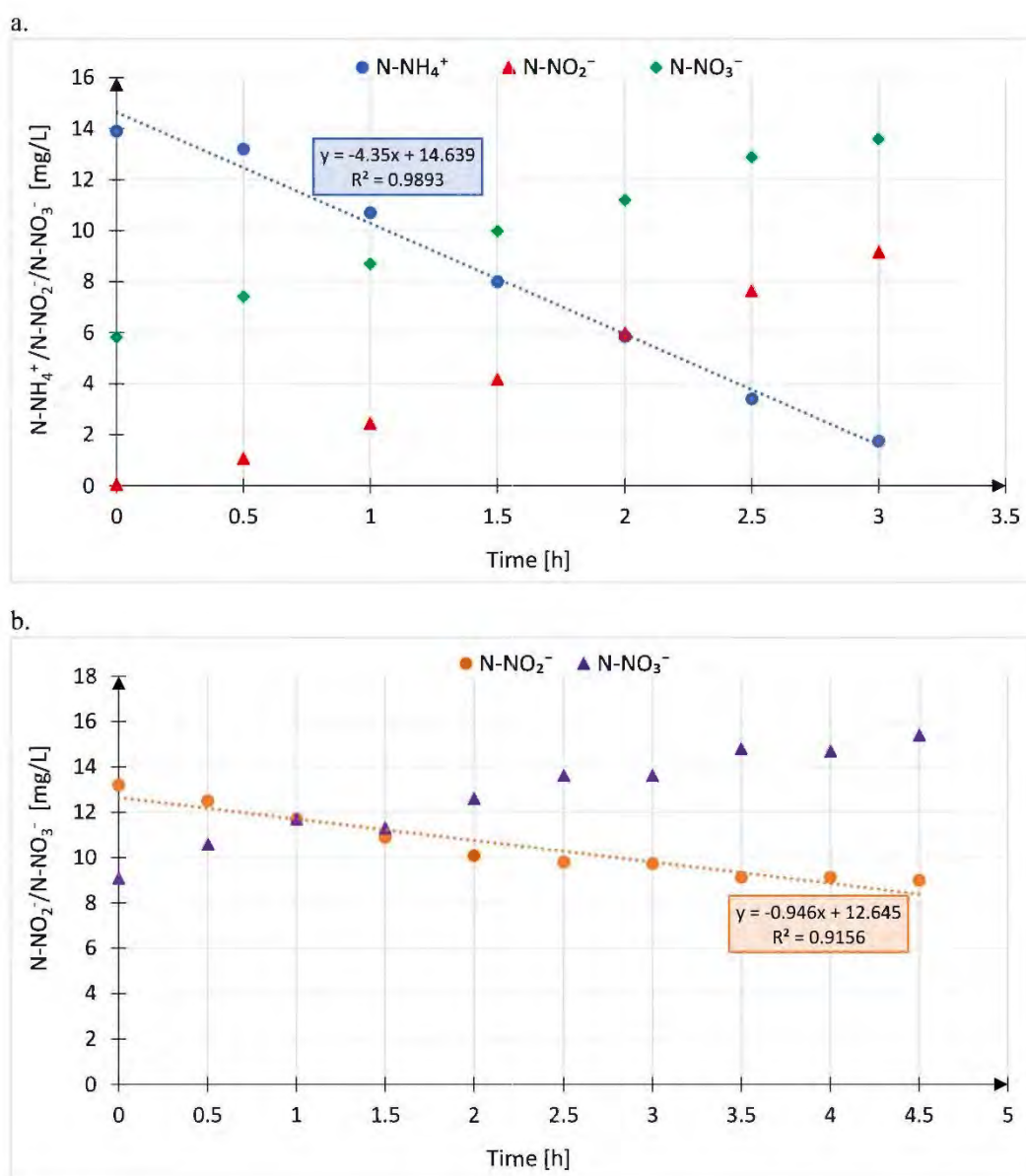


Fig. C.18 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sB.s2. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

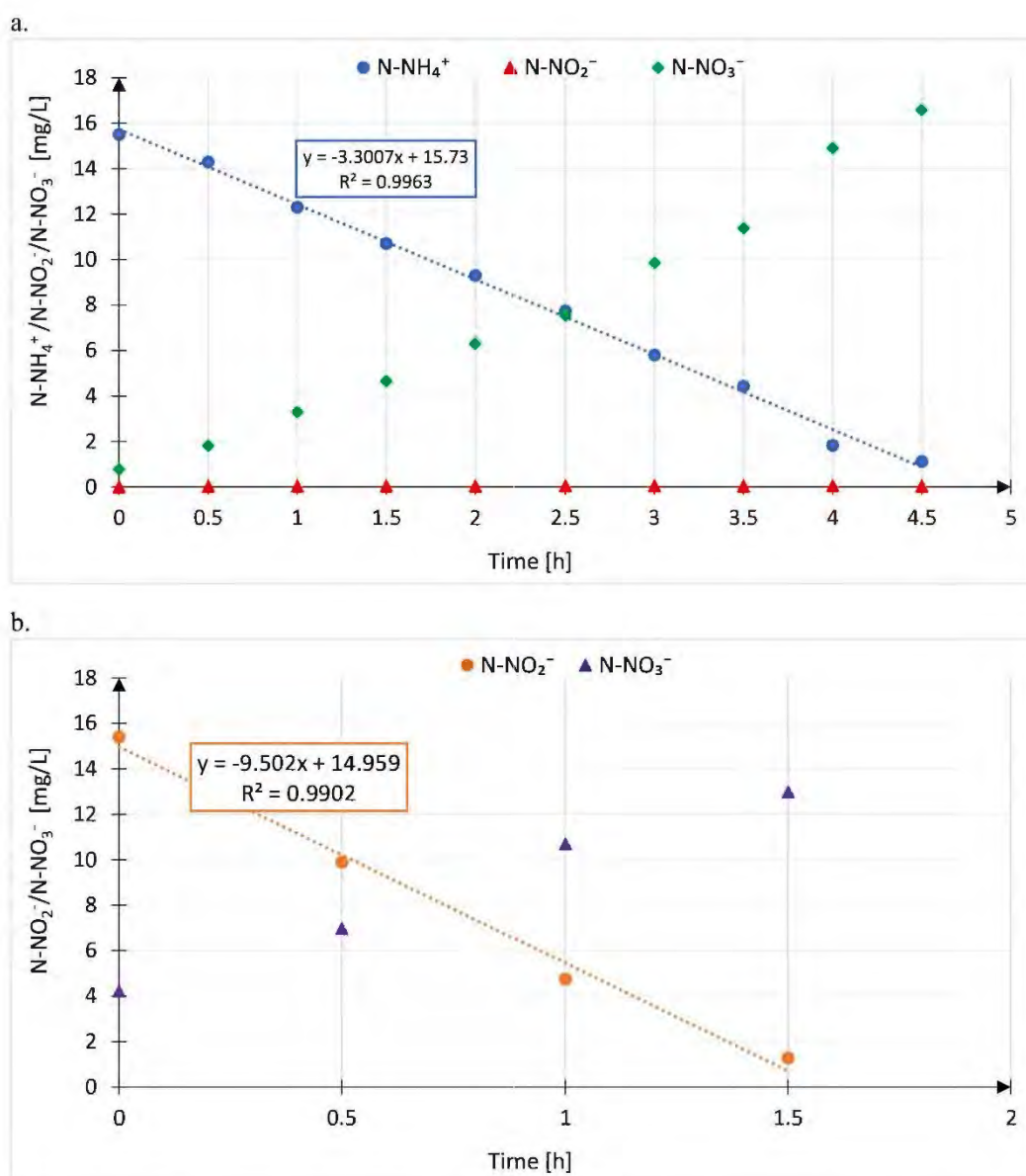


Fig. C.19 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sB.s3. for biofilm

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

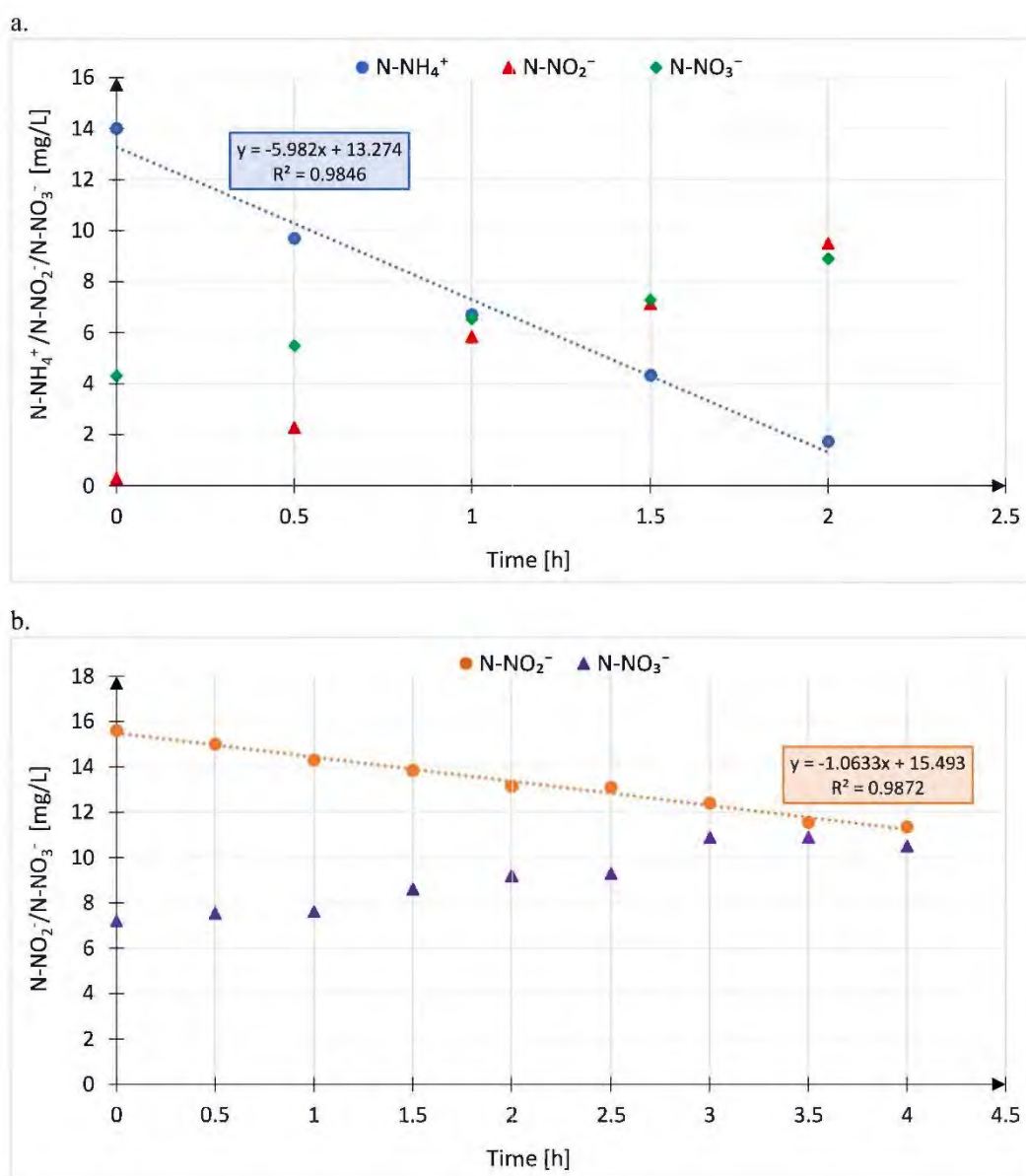


Fig. C.20 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during batch test (a) AUR (b) NitUR – sB.s3. for activated sludge

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

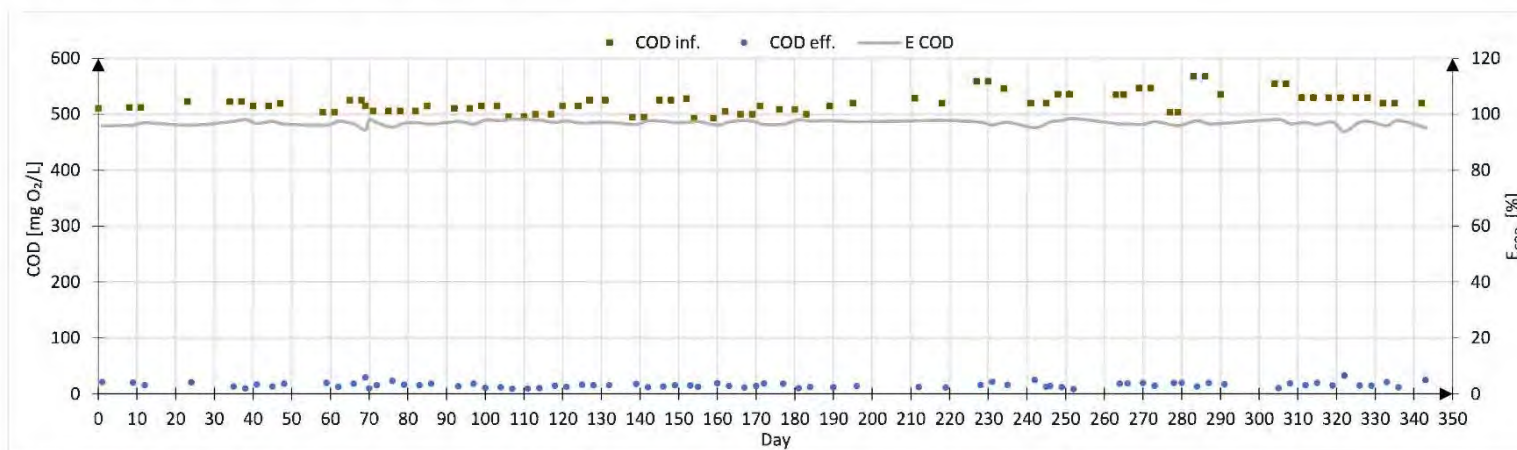


Fig. C.21 Influent and effluent concentrations COD and organic compounds removal efficiency (E_{COD})

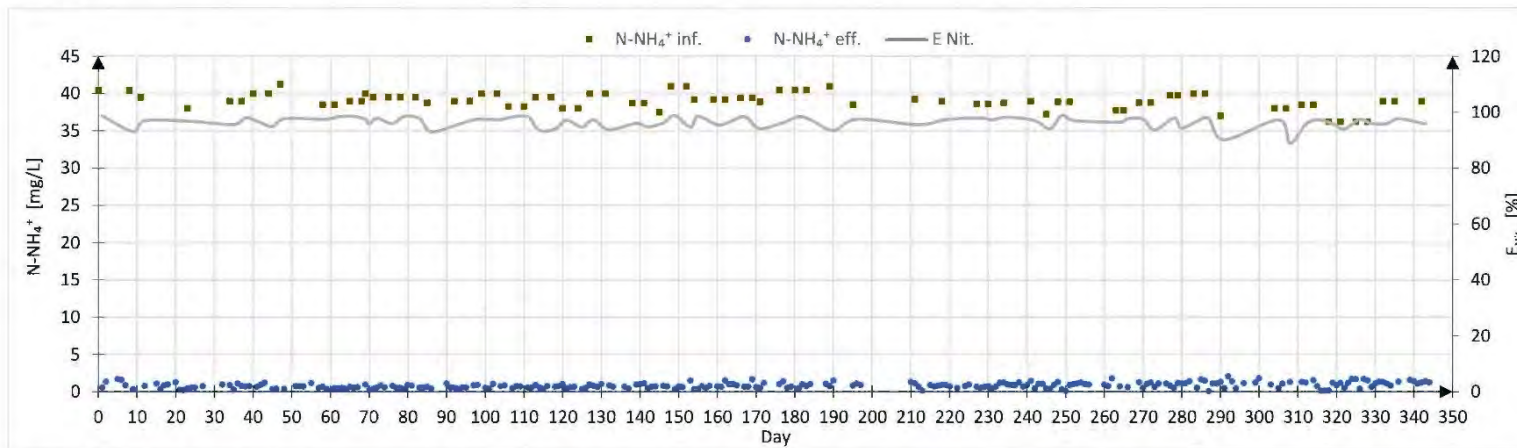


Fig. C.22 Influent and effluent concentrations of ammonia nitrogen and nitrification process efficiency (E_{Nit})

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

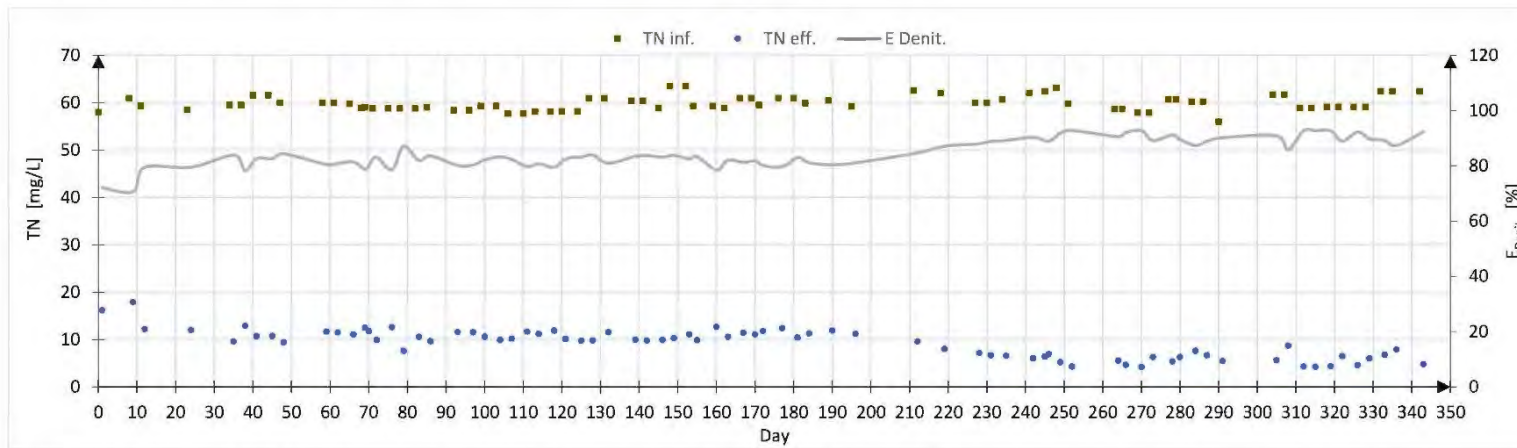


Fig. C.23 Influent and effluent concentrations of total nitrogen and denitrification process efficiency ($E_{Denit.}$)

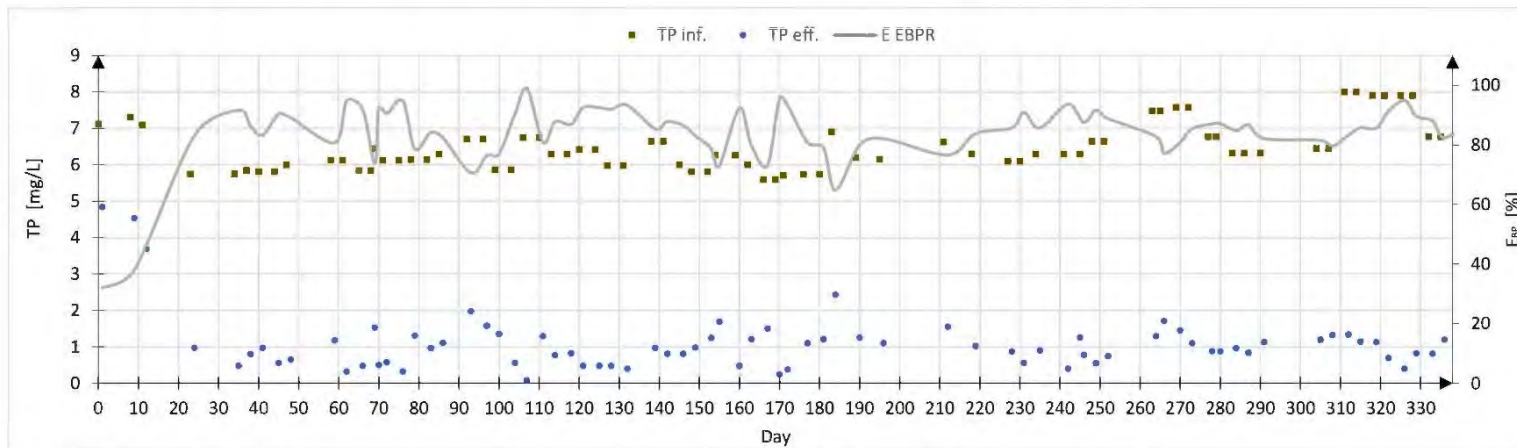


Fig. C.24 Influent and effluent concentrations total phosphorus and enhanced biological phosphorus removal (E_{EBPR})

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

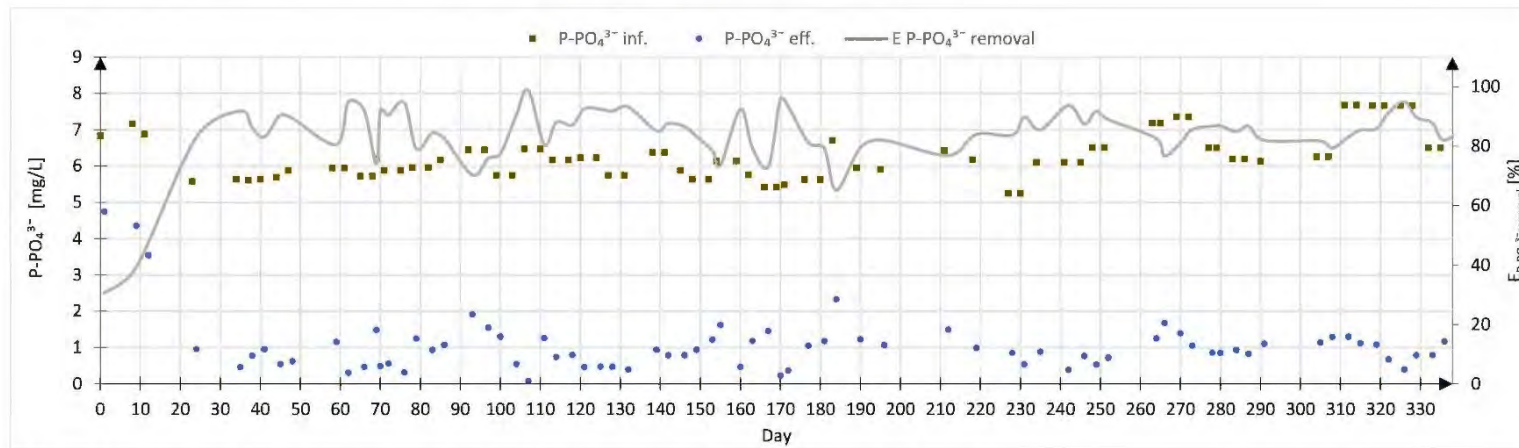


Fig. C.25 Influent and effluent concentrations $P-PO_4^{3-}$ and orthophosphates removal ($E_{P-PO_4^{3-}}$)

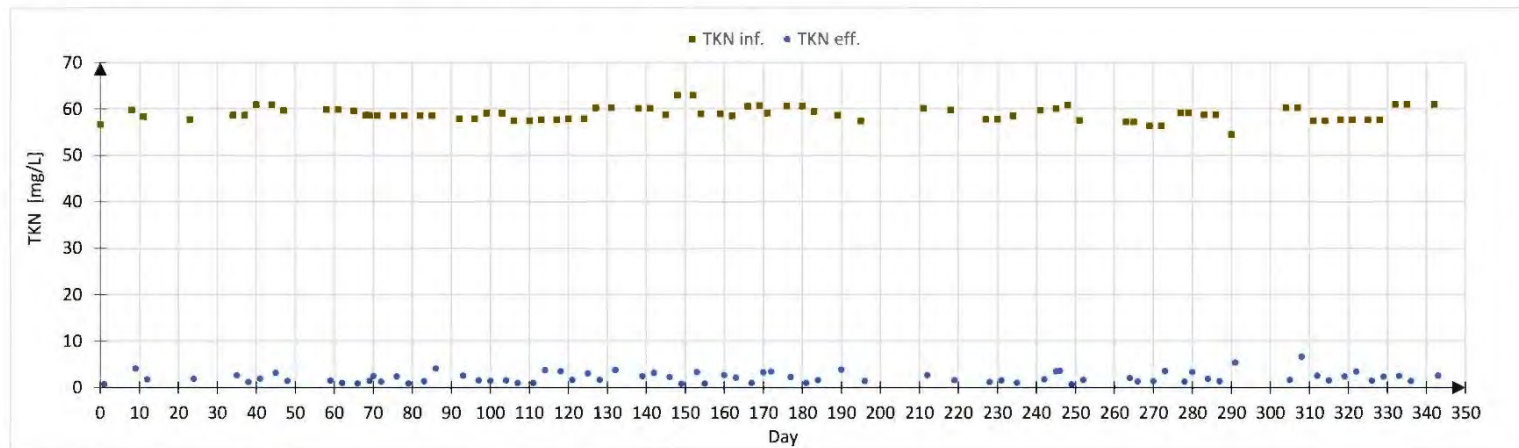


Fig. C.26 Influent and effluent concentrations of Total Kjeldahl nitrogen (TKN)

APPENDIX C – Supplementary Material – Obtained results

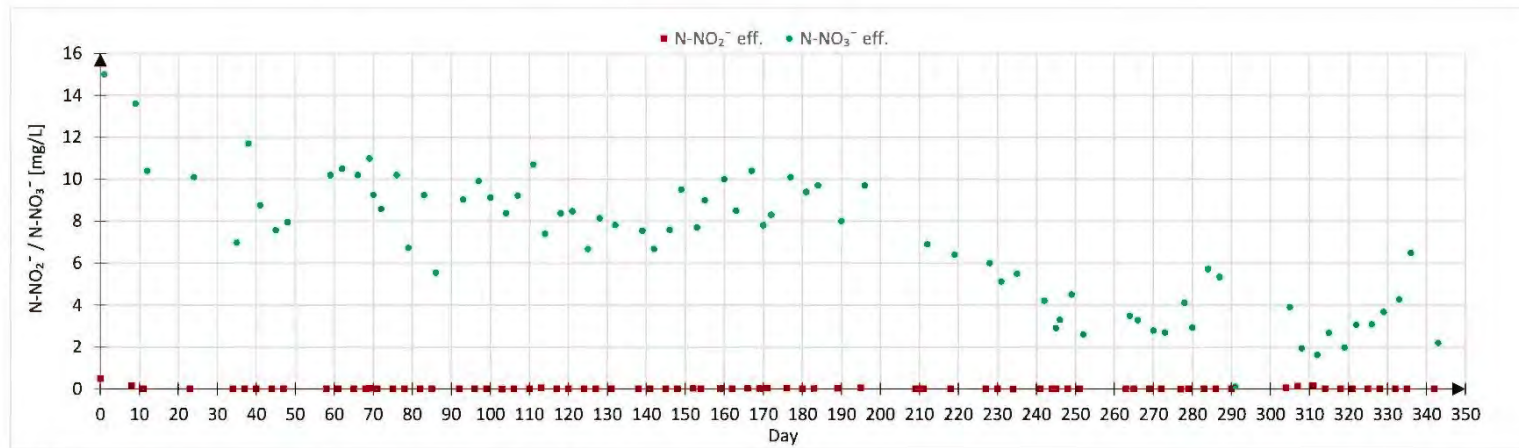


Fig. C.27 Effluent concentrations nitrite and nitrate nitrogen

**OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW
O UDZIALE W PUBLIKACJI**

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Olga Zając oświadczam, że mój wkład merytoryczny w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 65%.

Zając, O., Zielińska, M., Żubrowska-Sudoł, M. (2024). Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies. *Bioresource Technology*, 399, 130593, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>. IF:9,70; punkty MNiSW: 140.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmował szczegółowy przegląd literatury, który posłużył do identyfikacji problemu badawczego oraz opracowania koncepcji pracy. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie metodyki badawczej, a także za zaplanowanie i wykonanie eksperymentów (sprawowanie kontroli nad układem badawczym i aparaturą pomiarową, przygotowywanie ścieków, przeprowadzanie testów kinetycznych, wykonywanie analizy fizyko-chemicznej jakości ścieków surowych i oczyszczonych, opracowanie wyników pomiaru zużycia energii elektrycznej na napowietrzanie) oraz pobór prób biomasy do badań mikrobiologicznych (wykonanie badań zostało zlecone firmie zewnętrznej ze względu na konieczność posiadania specjalistycznej aparatury). Koordynowałam całym procesem badawczym, monitorując wszystkie etapy badań. Przeprowadziłam analizę statystyczną uzyskanych wyników badań technologicznych. Odpowiadałam za interpretację i dyskusję wyników badań, w zakresie jakości ścieków, wyników zużycia energii elektrycznej na napowietrzanie, wyników efektywności jednostkowych procesów oczyszczania, wyników testów kinetycznych AUR i NitUR oraz za analizę zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych. Przeprowadziłam również wstępną analizę wyników badań mikrobiologicznych, która w następnym kroku była dopracowywana wspólnie ze współautorami, przy istotnym udziale Pani Magdaleny Zielińskiej. Przygotowałam znaczącą część manuskryptu (100% – rozdział: 1., 2., 3.2.2., 4.; 95% – rozdział: 3.3.; 70% – rozdział: 3.2.1.). Byłam odpowiedzialna za wizualizację danych, opracowując rysunek 2. Przygotowałam materiały uzupełniające (100% załącznik A; 100% załącznik B; załącznik C: Tab. C.1 – C.2, Rys. C.1, Rys. C.4 – C.27). Mój udział polegał również na współudziale w pozyskaniu funduszy i pełnieniu obowiązków autora korespondencyjnego.

20.09.2024r. Olga Zając
Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Magdalena Zielińska, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 65% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Zielińska, M., Żubrowska-Sudol, M. (2024). Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies. *Bioresource Technology*, 399, 130593, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>. IF:9,70; punkty MNiSW: 140.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników badań mikrobiologicznych, 2) wykonanie analizy statystycznej uzyskanych wyników badań mikrobiologicznych, 3) współudział w przygotowaniu następujących fragmentów manuskryptu: rozdział: 3.2.1. (30%), rozdział: 3.3. (5%), 4) wizualizację danych w zakresie: rysunek 1, rysunek C.2, rysunek C.3, 5) współudział w korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji szacuję na 15%.

19.09.2024 Magdalena Zielińska

Data i podpis współautora

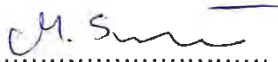
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Monika Żubrowska-Sudoł, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 65% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Zielińska, M., Żubrowska-Sudoł, M. (2024). Enhancing wastewater treatment efficiency: A hybrid technology perspective with energy-saving strategies. *Bioresource Technology*, 399, 130593, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130593>. IF:9,70; punkty MNiSW: 140.

Mój udział jako współautora pracy wynikał z pełnionej funkcji promotora. Obejmował: 1) nadzór merytoryczny nad przeglądem literatury prowadzonym przez Doktorantkę, 2) korektę merytoryczną koncepcji badawczej, metodyki badań oraz manuskryptu, 3) nadzór nad czynnościami badawczymi prowadzonymi przez Doktorantkę, 4) współudział w pozyskaniu funduszy.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji szacuję na 20%.

20.09.2024 

Data i podpis współautora

Publikacja nr 5

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S.

(2023)

Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature
on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor

Desalination and Water Treatment, 288, 165–177,

<https://doi.org/10.5004/dwt.2023.29304>

IF: 1,00; punkty MNiSW: 100

Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor

Olga Zajac^{a,*}, Monika Zubrowska-Sudol^a, Martyna Godzieba^b, Sławomir Ciesielski^b

^aDepartment of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland, emails: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl (O. Zajac), monika.sudol@pw.edu.pl (M. Zubrowska-Sudol)

^bDepartment of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland, emails: martyna.godzieba@uwm.edu.pl (M. Godzieba), slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S. Ciesielski)

Received 4 October 2022; Accepted 15 January 2023

ABSTRACT

Nitrification is considered one of the most temperature-sensitive biological steps in wastewater treatment. Nitrifying bacteria are highly sensitive to temperature drops, resulting in a rapid decrease in their activity. This study compares the effect of a rapid temperature decrease on the ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR), with consideration of the form in which biomass develops in the IFAS-MBSBBR. Ammonia Utilisation Rate Tests and Nitrite Utilisation Rate Tests were conducted for two temperatures, namely 20°C and 12°C, for the following forms of biomass: activated sludge (AS), biofilm (B), and combination of both – hybrid (H). The tests showed that nitrite oxidising bacteria inhabiting biofilm were more sensitive to a rapid temperature change than those in activated sludge. A sudden drop of temperature caused a 15% higher than predicted decrease in AOR for AS. At 12°C, AOR changed more considerably than NitOR in tests carried out for H. A temperature correction coefficient of 1.107–1.087 was proposed, applicable in hybrid wastewater treatment systems. Microbiological analysis shows that nitrifiers occurred more abundantly in biofilm than in activated sludge.

Keywords: Temperature correction coefficient; Ammonia oxidation rate; Nitrite oxidation rate; IFAS; Activated sludge; Biofilm

1. Introduction

The nitrification process is one of the primary links of the nitrogen cycle in the environment. It has been long known as one of the most temperature-sensitive steps of biological wastewater treatment. Low temperature particularly strongly affects the microbial metabolic rate, generally expressed as the rate of growth or absorption, resulting in a decrease in the efficiency and rate of the nitrification process [1]. Research has shown that a rapid change in temperature may prevent proper functioning of bacterial proteins by damaging the cell's outer membrane and/or turning it gel-like [2], leading to a decrease in the rate of transfer of

substrate, including oxygen. According to Beagles et al. [3], the magnitude of the effect of cold shock depends on the temperature gradient, cooling rate, state of the culture medium, and strain of microorganisms. According to the cited authors, a decrease in temperature is accompanied by an extended lag phase before growth, a decrease in the growth rate, and a potential decrease in the final abundance of cells.

In many countries around the globe, seasonal conditions related to seasons of the year affect the temperature of wastewater. It varies from below 10°C in winter to more than 20°C in summer [4]. It is therefore important that the processes used for wastewater treatment are effective in the context of seasonal temperature fluctuations. The design and

* Corresponding author.

operation of objects responsible for wastewater treatment should therefore consider temperature variability, particularly affecting the lifespan of nitrification bacteria. Nitrifying bacteria are microorganisms extremely sensitive to temperature decreases, contributing to a rapid reduction of their activity. Many papers published to date focus on the general rate of the nitrification process, although ammonia oxidising bacteria (AOB) and nitrite oxidising bacteria (NOB) have different growth and temperature correction coefficients [5].

Published studies show that the effect of a rapid decrease in temperature may depend on the form in which biomass develops in the reactor [5–8]. The nitrification rate at the moment of a rapid temperature decrease from 20°C to 10°C determined by Hwang and Oleszkiewicz [5] was 20% lower than predicted by the suggested temperature correction coefficient for a system operating in the active sludge technology. Ahmed et al. [6] investigated the effect of a rapid temperature decrease from 10°C to 1°C in a moving bed biofilm reactor (MBBR). The nitrification rates measured by the authors were on average 21% higher than those obtained with the application of Arrhenius correction coefficients of 1.09 and 1.086. The cited authors focused on the effect of temperature on particular forms of biomass developing in wastewater treatment systems. It is interesting, whether a given form of biomass will react to changes in temperature the same way when it cooperates with another in a single reactor. It should be emphasised that hybrid systems with two cooperating forms of biomass are gaining popularity in wastewater treatment plants.

Information regarding a rapid temperature decrease in hybrid systems, however, is hardly available. The issue was addressed in own research by comparing the effect of a rapid temperature decrease on the rate of particular stages of the nitrification process in an integrated fixed-film activated sludge – moving bed sequencing batch biofilm reactor (IFAS-MBSBBR). It permitted the determination of the dependency of the activity of particular groups of nitrifying microorganisms in a hybrid system on sudden short-term temperature

fluctuations, as well as on the form of developing biomass. Moreover, next generation sequencing was used to identify the nitrifiers in activated sludge and biofilm, and to monitor changes in their abundance. Knowledge regarding the nitrifiers offers better understanding of the impact of a rapid temperature decrease on the nitrification process.

2. Methodology

Batch tests for the determination of the effect of temperature on the activity of particular groups of nitrifying microorganisms were conducted for biomass from the laboratory model of IFAS-MBSBBR with an active volume of 28 L for integrated carbon, nitrogen, and phosphorus removal by means of classic nitrification/denitrification (N/D) (Fig. 1). Moving bed EvU-Pearl with cylindrical shape with corrugated external and internal surface with dimensions of $\Phi = 5$ mm, $h = 8$ mm was used as a biomass carrier with an active surface of 600 m²/m³. The moving bed constituted 25% of the active volume of the reactor (amount of biofilm – approximately 0.28–0.29 gTSS/m²). The concentration of activated sludge was maintained at a level of 1.2–1.4 gMLSS/L. The hydraulic retention time (HRT) and sludge retention time (SRT) were 0.93 h and 20 d, respectively.

Constant temperature at a level of 20°C was maintained in the reactor by means of an external air conditioning system. The system operated in three 8-h cycles/d, involving the following subsequent phases: I phase without aeration – 50 min, I aerobic phase (with intermittent aeration – 20 min with aeration (t_1); 10 min without aeration (t_2); $R = t_2/t_1 = 1/2$) – 190 min, II phase without aeration – 30 min, II aerobic phase (with intermittent aeration – 20 min with aeration; 10 min without aeration; $R = 1/2$) – 150 min, sedimentation – 50 min, decantation – 10 min. During the aerated phases, the oxygen concentration was maintained at a level of 1.5 mgO₂/L.

At the beginning of each phase without aeration, raw wastewater was dosed to simulate the composition of municipal sewage, prepared based on dechlorinated tap

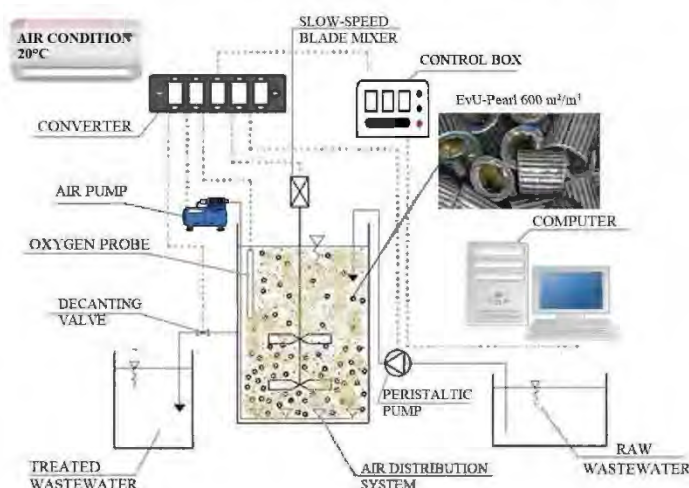


Fig. 1. Schematic of reactor with accessories.

water and a mixture of: ammonium acetate 225 mg/L; peptone 135 mg/L; starch 45 mg/L; glucose 45 mg/L; glycerine 0.049 ml/L; NaHCO_3 125 mg/L; Na_2HPO_4 15 mg/L; KH_2PO_4 4.5 mg/L in a volume of 10 L per cycle.

The experiment determining the effect of temperature on the nitrification process in a hybrid reactor involved conducting the tests in two repetitions. The first one (1st rep.) was carried out after 14 d of stable operation of the system under the conditions described above. The second one was preceded by a period of introduction of changes in the methodology of operation of the reactor due to the outbreak of the global Covid-19 pandemic. The changes included reduction of the reactor's organic (L_{COD}) and nitrogen (L_N) loading rate (from $L_{\text{COD}} = 536 \text{ gCOD/m}^3\cdot\text{d}$, $L_N = 64 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ to $L_{\text{COD}} = 402 \text{ gCOD/m}^3\cdot\text{d}$, $L_N = 48 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$) through a decrease in the volume of raw wastewater supplied to the system. No experiments were conducted during that time – stable operation of the system was only maintained. With the removal of restrictions, the assumptions arranged at the beginning of the experiment were restored, and after 14 d of stable work of the reactor, a second repetition (2nd rep.) was implemented.

The tools applied for the determination of the activity of particular groups of nitrifying microorganisms were Ammonia Utilisation Rate Tests (AUR) and Nitrite Utilisation Rate Tests (NitUR). The tests were conducted for two temperatures, namely 20°C and 12°C, for the following forms of biomass: activated sludge (AS), biofilm (B), and combination of both – hybrid (H). During the tests, oxygen concentration was maintained at a level of 1.5 mgO_2/L .

Before launching the tests, biomass sampled from IFAS-MBSBBR was washed with dechlorinated tap water to remove N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , and then placed in a test reactor with a volume of 14 L, keeping the proportions of biomass the same as those in the main reactor. The reactor was filled to 13.9 L with dechlorinated tap water, previously heated or cooled to 20°C or 12°C, respectively, and deoxygenated to a level of 1.5 mgO_2/L . Using thermostatic water bath (F32-ME Refrigerated/Heating Circulator, JULABO GmbH), the set temperature was maintained during particular tests. The DO concentration and temperature was controlled using a Memosens Optical Oxygen Sensor COS81D (Endress + Hauser, Germany) cooperating with the automatic system.

The test began with dosing 4% solution of NH_4Cl (AUR) or 5% solution of KNO_2 (NitUR) to the test reactor, to an amount ensuring obtaining the assumed concentration of N-NH_4^+ or N-NO_2^- of 15 mg/L. An important methodological assumption in the experiment was introducing the appropriate amount of 5% solution of KHCO_3 to avoid alkalinity being a factor limiting the course of the nitrification process. Considering the theoretical comment, for the value required for alkalinity for nitrification of 7.14 $\text{mgCaCO}_3/\text{mgN-NH}_4$ [9], the initial alkalinity value was adopted at a level of 200 mgCaCO_3/L .

Throughout the experiment, the reactor was aerated by means of an aeration system consisting to a blower and aquarium filters mounted on the bottom of the reactor. The content of the reactor was stirred by means of a slow-speed blade mixer R-50D by CAT with a rotation speed of approximately 110 rpm. Every 60 or 30 min, samples with a volume of 30 mL were collected from the reactor and

immediately filtered through 0.45 μm mesh. Concentration of the following was determined in the filtrate: N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- (AUR test), N-NO_2^- , and N-NO_3^- (NitUR test). The test lasted until concentration of N-NH_4^+ (AUR test) or N-NO_2^- (NitUR test) decreased to a value approximate to 0 mg/L, or until the concentration of the indicator was maintained at a comparable level for subsequent 60 min. In the case of a test performed for activated sludge and hybrid, mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) concentrations were also determined. In the case of tests with the application of carriers, the biomass amount (as volatile suspended solids) developed on the carriers was also determined. Concentrations of N-NH_4^+ , N-NO_2^- , and N-NO_3^- were analysed spectrometrically according to APHA Standard Methods [10] using cuvette tests (Hach Lange GmbH) and a DR 3900 spectrophotometer (Hach Lange GmbH, Berlin, Germany). Mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) were determined using gravimetric methods in accordance with the Polish standard PN-EN 872:2007. Volatile suspended solids (VSS) in biofilm were also measured in accordance with Polish standard by calculation of weight loss. The biofilm was mechanically removed from the carriers. All analyses were performed in duplicates.

The determination of the ammonia oxidation rate (AOR) or nitrite oxidation rate (NitOR) employed a straight-line fragment of the function of change in ammonia/nitrite concentration in time characterised by the coefficient $R^2 \geq 0.97$. The rate was expressed in mgN-NH_4^+ per (gVSS·h) (AUR test) or in mgN-NO_2^- per (gVSS·h).

On the date of conducting batch tests at a temperature of 20°C, samples of activated sludge and biofilm were collected for microbiological analyses.

DNA was isolated from the activated sludge and biofilm samples using a FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). The isolation followed the instructions attached to the kit. The Qubit fluorometer (Invitrogen, USA) was used to quantify the isolated DNA. The isolated DNA was stored at -18°C until further analysis. The determination of the taxonomic composition of the analysed biomass samples involved sequencing of the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. High-throughput Illumina sequencing was performed with S-d-Bact-0341-b-S-17 and S-d-Bact-0785-a-A-21 primers [11] and NEBNext® High-Fidelity 2X PCR Master Mix (Bio Labs inc., USA) following the manufacturer's manual. Paired-end sequencing was performed on a Miseq sequencer with a MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, USA). The read length was 250 base pairs.

QIIMEII [12] package was used for the analysis of raw sequencing data. Pairs of sequences were merged using the fast-join algorithm. Unmerged sequences were excluded from further analysis. The Cutadapt algorithm was used to filter out low quality sequences (under 20) [13]. Chimeric sequences were detected and excluded from analyses using USEARCH [14]. 16S rRNA OTUs were picked from the Illumina reads using a closed-reference OTU picking protocol against the SILVA_V_138 database [15]. Sequences were clustered at 97% identity and trimmed to span only the 16S rRNA V4 region flanked by the sequencing primers. Taxonomy assignments were associated with OTUs based on the taxonomy associated with the SILVA_V_138 reference sequence defining each OTU.

3. Results and discussion

3.1. Identification of nitrifying bacteria

In both repetitions, batch tests for the determination of the effect of a rapid temperature decrease on the rate of particular stages of the nitrification process were preceded by the identification of nitrification microorganisms developed in the activated sludge and biofilm from IFAS-MBSBBR, and nitrification efficiency in this reactor were identified.

The results of 16S rRNA gene sequencing indicated the presence of ammonia oxidising bacteria (AOB) and nitrite oxidising bacteria (NOB) in both forms of biomass from IFAS-MBSBBR. Among AOB bacteria, *Nitrosomonas* was the most abundant genus. Several unidentified genera of the *Nitrosomanadaceae* family were also found. The most abundant genus in the NOB community was *Nitrospira*. Less abundant *Nitrolancea* and *Candidatus Nitrotoga* were also identified.

Changes in the abundance of biofilm and activated sludge nitrifiers in samples from the first and second repetition are presented in Fig. 2. Nitrifiers were generally more abundant in biofilm than in activated sludge, both in the samples from the first and second repetition. The only genus that was more abundant in activated sludge than in biofilm was *Candidatus Nitrotoga*. In general, in all tested samples, the abundance of NOB bacteria was significantly higher than that of AOB. Between the first and second repetition, significant changes in the nitrifier community were observed, probably caused by the reduction of the organic and nitrogen loading rate prior to the second repetition. The change in the amount of incoming wastewater had a stronger impact on the nitrifying community developing in the biofilm, resulting in an increase in AOB abundance from 0.5% to 1.1%, and a decrease in NOB abundance from 5.7% to 2.5%.

NOB were much more abundant than AOB in the studied samples, unlike in the theoretical, thermodynamic model, assuming that AOB should be the dominant group the vast majority of NOB in the studied samples, however, were *Nitrospira*. *Nitrospira* is traditionally classified as NOB, although bacteria of the genus have been proven to also be capable of complete nitrification (comammox). Growth of comammox bacteria could disrupt the theoretical AOB/NOB ratio. Unfortunately, based on sequencing of the 16S

rRNA gene, it is not possible to determine which fraction of the *Nitrospira* population in the tested samples is canonical *Nitrospira* and which is comammox. Another explanation for this disproportion may be the nitrate loop [16]. In this case, nitrite for NOB is supplied not only by AOB but also by denitrifiers detected in the analysed samples (*Denitratisoma* sp., *Dokdonella* sp., *Thauera* sp., *Rhodobacter* sp., *Zoogloea* sp.).

In both repetitions, in the period of sample collection (used for the batch tests – chapter 3.2.), the efficiency of the nitrification process carried out at 20°C in IFAS-MBSBBR was comparable – 88.93% ± 4.54%. The concentration of ammonia nitrogen in the effluent was below 1.75 mg N-NH₄⁺/L.

3.2. Effect of temperature on ammonia oxidation rate and nitrite oxidation rate

Batch tests for the determination of the ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR) for each of the analysed forms of biomass were conducted at two temperatures, namely 20°C and then 12°C, to show how a short-term temperature shock affects the activity of particular groups of nitrifying microorganisms depending on the form in which they develop in the reactor (Fig. 3). Results of particular batch tests are presented in the supplementary material.

As already observed earlier [5–7], a rapid decrease in temperature largely affects the kinetics of nitrification for suspended and attached biomass. Also in this study, for each of the designated forms of biomass, both in the case of AOR and NitOR values, at least 22% (1st rep.) and 27% (2nd rep.) differences were respectively recorded, compared to the analysed indices for 20°C and 12°C. Due to a rapid decrease in temperature, the ammonia oxidation rate decreased by 22% (1st rep.) and 57% (2nd rep.) for activated sludge, and by 57% (1st rep.) and 38% (2nd rep.) for biofilm, respectively. Batch tests for activated sludge from an industrial wastewater treatment plant by Gnida et al. [17] showed that the temperature can cause a significant decrease in the ammonia oxidation rate. According to the cited authors, the efficiency of the analysed process at 13°C decreased by up to 75% compared to that at 22°C. This is more than 3.41 (1st rep.) and 1.32 (2nd rep) times more than in our study for activated sludge, even though the temperature difference was only 1°C higher.

The obtained results also suggest that although the reactor operated in identical conditions, in the period preceding the values recorded for the second repetition, changes in the population of ammonia oxidising microorganisms could have occurred in IFAS-MBSBBR biomass, affecting their abundance or activity, and resulting in a different response of biomass to temperature changes. The results of the microbiological analysis, however, showed an increase in the amount of AOB bacteria, suggesting that the changes observed in AOR resulted from a much lower activity of microorganisms inhabiting the activated sludge flocs and biofilm at that time.

After a rapid temperature change, a greater difference in NitOR values was recorded each time for biofilm. In comparison to the recorded NitOR-AS, they were 1.32 (1st rep.) and 1.16 (2nd rep.) times higher, providing the basis for the

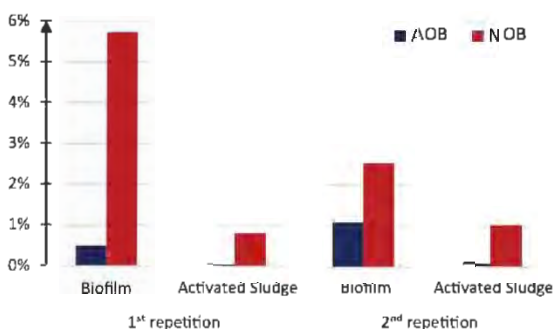


Fig. 2. Changes in the abundance of biofilm and activated sludge nitrifiers. Samples for new generation sequencing were taken from the main reactor working in 20°C. Graphs show the percentage contribution of AOB and NOB among all identified taxa.

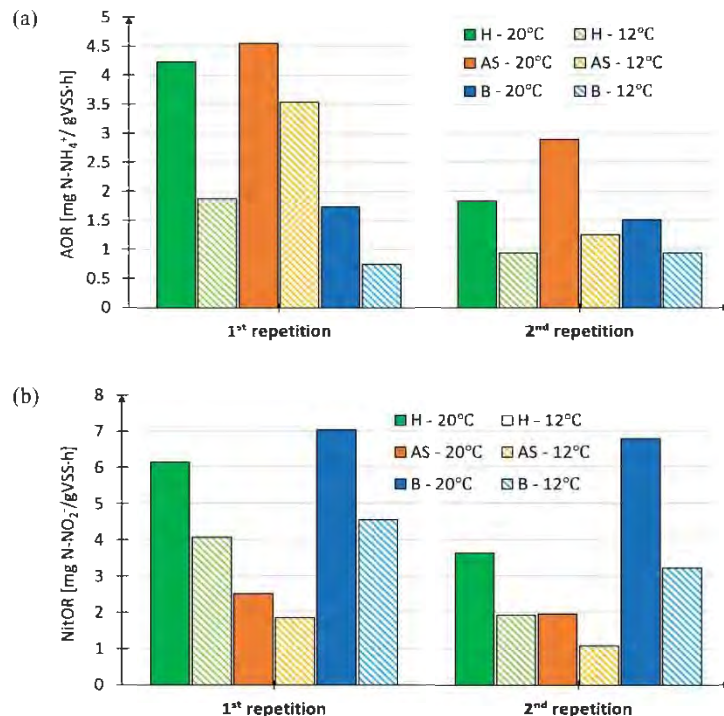


Fig. 3. Ammonia oxidation rate (AOR) (a) and nitrite oxidation rate (NitOR) (b) for hybrid (H), activated sludge (AS), and biofilm (B) at 20°C and 12°C.

conclusion that greater sensitivity to a decrease in temperature was shown for NOB developing in the hybrid reactor in the form of biofilm growing on moving carriers. According to Barria et al. [18] and Phadtare et al. [19], rapid temperature decreases caused disturbances in the basic cell functions, because they disturbed the mechanisms of transcription and translation, and resulted in greater membrane stiffness, and therefore lower substrate absorption and limitations of the function of transport through the membrane.

During tests conducted for both forms of biomass simultaneously cooperating at 12°C, greater differences were recorded in ammonia oxidation rates. They were 56% (1st rep.) and 49% (2nd rep.) lower than those conducted before a decrease in temperature. During the first repetition, differences in AOR and NitOR values between 20°C and 12°C slightly differed from those calculated for biofilm, whereas in the second repetition, they were approximate to those for sludge. It is also worth emphasising that the values of ammonia oxidation rate at 12°C for hybrid and biofilm in the second repetition were comparable, and approximately 1.33 times lower than AOR for activated sludge. A similar dependency was observed for NitOR values during the first repetition.

3.3. Temperature correction coefficients for IFAS-MBSBBR

The literature has already analysed the accuracy of application of the temperature correction coefficient in

the nitrification process for systems based on activated sludge and biofilm [5,6,20,21]. No studies have been found, however, that would suggest how to refer the effect of temperature correction coefficients to the hybrid system.

Fig. 4 presents values of ammonia oxidation rate for activated sludge (AS) and biofilm (B) operating separately at 12°C, and values expected in calculations based on values of the discussed coefficients already provided in earlier studies in accordance with the Arrhenius equation (eq 1). The expected AOR values were calculated for the lower and upper range of the temperature correction coefficient provided by Hwang and Oleszkiewicz [5] ($\theta = 1.072$ – 1.127) and Salvetti et al. [22] ($\theta = 1.023$ – 1.081), respectively in the case of activated sludge and biofilm.

$$AOR_{T_2} = AOR_{T_1} \cdot \theta^{(T_2 - T_1)} \quad (1)$$

where AOR_{T_1} and AOR_{T_2} represent ammonia oxidation rate (mgN-NH₄⁺/gVSS·h) at $T_1 = 20^\circ\text{C}$ and $T_2 = 12^\circ\text{C}$, and θ the temperature correction coefficient.

In accordance with the Arrhenius equation, adopting values of 1.072 or 1.127 as the temperature correction coefficient for activated sludge in the nitrification process should decrease the rate of ammonia oxidation by 2.612 mgN-NH₄⁺/gVSS·h (1st rep.), 1.655 mgN-NH₄⁺/gVSS·h (2nd rep.), or 1.750 mgN-NH₄⁺/gVSS·h (1st rep.), 1.109 mgN-NH₄⁺/

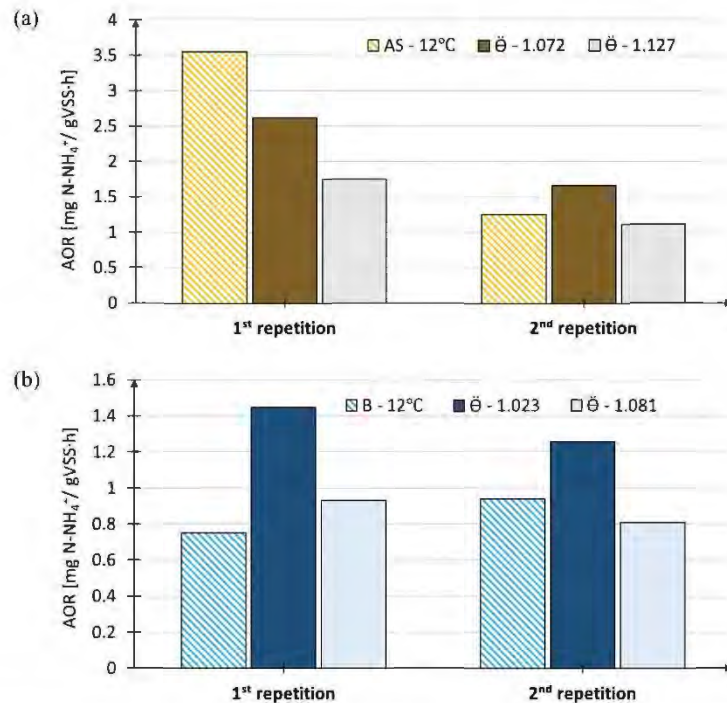


Fig. 4. Temperature correction coefficients for (a) activated sludge (AS) and (b) biofilm (B) in comparison to literature data.

gVSS·h (2nd rep.), respectively. In this study, the AOR values for activated sludge at 12°C during the first repetition were respectively 1.36 and 2.02 times higher than those proposed by Hwang and Oleszkiewicz [5]. The resulting temperature correction coefficient was 1.032. It was lower than values presented by Hwang and Oleszkiewicz [5]. The research of the cited authors, however, only covered a system with activated sludge. In this study, activated sludge was collected from a hybrid reactor where next to suspended biomass, nitrifying bacteria also develop on the biofilm. It is important, however, that in the second repetition, the AOR value observed in the study for 12°C was 0.75 times lower than that predicted after the application of the coefficient most frequently applied when designing a wastewater treatment plant. The ammonia oxidation rate is assumed to decrease by almost 43% with a decrease in temperature by approximately 8°C. This example, however, it does not concern a rapid change in temperature for sludge from a hybrid reactor in the case of which the shock related to low temperature caused a decrease in the AOR value by as much as 57%. Similar conclusions were drawn by Hwang and Oleszkiewicz [5], who obtained a decrease in specific nitrification rate 20% higher than predicted when using the current default correction factor, during a rapid change in temperature from 20°C to 10°C.

In the case of reactors operating in the moving bed technology, the temperature correction coefficient for biofilm under oxygen limiting conditions ranged from 1.023

to 1.081 (average value = 1.058) [22]. In the first repetition, the AOR value at 12°C was 32% lower than predicted after the application of the average value of the correction coefficient proposed by Salvetti et al. [22], and in the second repetition they were almost identical. The temperature correction coefficient calculated based on data obtained in the first repetition is 1.110 which is slightly higher than the upper range proposed by the cited group of researchers.

Over the recent years, an increasingly popular solution applied in wastewater treatment plants has been a technology based on the combination of activated sludge and biofilm on moving or fixed carriers. It allows for a considerable increase in the amount of biomass in the reactor in comparison to systems operating only with activated sludge, therefore permitting obtaining high efficiency of wastewater treatment at a substantially lower volume of the biological reactor [23]. Biofilm carriers also provide for longer biomass retention time (SRT), favouring the development of slow-growing nitrifiers, therefore increasing the efficiency of the nitrification process [24]. Based on results obtained in this study, and equation proposed by Arrhenius, it was attempted to determine the temperature correction coefficient for the hybrid system IFAS-MBSBBR. In the first repetition it was 1.107, and in the second one 1.087. The obtained values differ from the values proposed by Hwang and Oleszkiewicz [5] for activated sludge only in 1.4% and 1.8%. This suggests that nitrifiers overgrowing activated sludge flocs are of greater importance than those in biofilm

in the hybrid system. The values of temperature correction coefficient for biofilm were from 2.3% to 5.9% lower than those calculated for hybrid.

The direction of further research will be to determine the long-term impact of temperature changes on the nitrification process in a hybrid reactor.

4. Conclusions

- Nitrifiers were more abundant in biofilm than in activated sludge.
- NOB were much more abundant than AOB in the studied samples of activated sludge and biofilm.
- NOB inhabiting biofilm from IFAS-MBSBBR were more sensitive to a rapid temperature change than those in activated sludge.
- A sudden drop of temperature caused a 15% higher than predicted decrease in the ammonia oxidation rate for activated sludge.
- A sudden drop in temperature resulted in a greater change in ammonia oxidation rate values than those of nitrite oxidation rate in tests carried out for hybrid.
- The experiment provided the basis for proposing a temperature correction coefficient of 1.107–1.087, applicable in hybrid wastewater treatment systems.

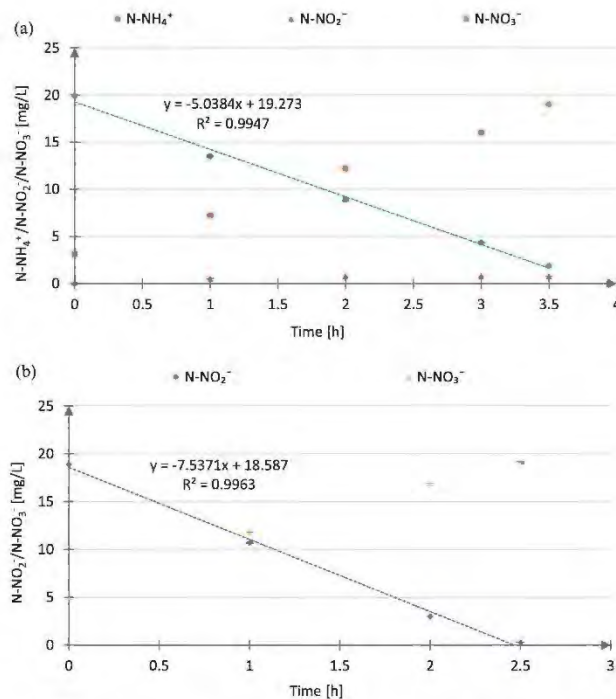
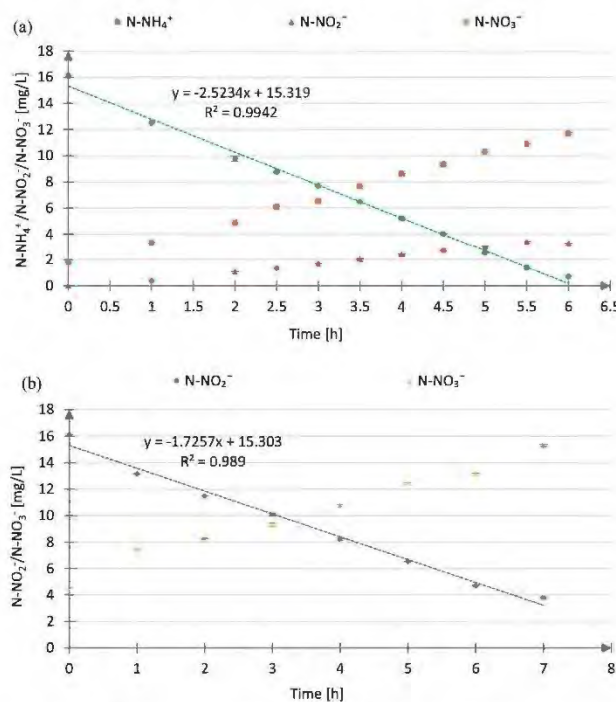
Acknowledgments

This research was funded by the Polish National Science Centre under project No. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

References

- [1] T. Hülsen, E.M. Barry, Y. Lu, D. Puyol, D.J. Batstone, Low temperature treatment of domestic wastewater by purple phototrophic bacteria: performance, activity, and community, *Water Res.*, 100 (2016) 537–545.
- [2] R.A. MacLeod, P.H. Calcott, Cold Shock and Freezing Damage to Microbes, In *The Survival of Vegetative Microbes*, The 26th Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1976.
- [3] N. Beales, Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 3 (2004) 1–20.
- [4] M. Henze, *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*, Springer Science & Business Media, 2002.
- [5] J.H. Hwang, J.A. Oleszkiewicz, Effect of cold-temperature shock on nitrification, *Water Environ. Res.*, 79 (2007) 964–968.
- [6] W. Ahmed, X. Tian, R. Delatolla, Nitrifying moving bed biofilm reactor: performance at low temperatures and response to cold-shock, *Chemosphere*, 229 (2019) 295–302.
- [7] B. Young, R. Delatolla, K. Kennedy, E. Laflamme, A. Stintzi, Low temperature MBBR nitrification: microbiome analysis, *Water Res.*, 111 (2017) 224–233.
- [8] W. Ahmed, R. Delatolla, Microbial response of nitrifying biofilms to cold-shock, *Environ. Sci. Water Res.*, 6 (2020) 3428–3439.
- [9] C. Wu, Z. Chen, X. Liu, Y. Peng, Nitrification–denitrification via nitrite in SBR using real-time control strategy when treating domestic wastewater, *Biochem. Eng. J.*, 36 (2007) 87–92.
- [10] W.E. Federation, APH Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed., American Public Health Association (APHA), Washington, D.C., USA, 2005.
- [11] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F.O. Glöckner, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Res.*, 41 (2013) e1, doi: 10.1093/nar/gks808.
- [12] E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J.E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C.J. Brislawn, C. Titus Brown, B.J. Callahan, A.M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E.K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P.C. Dorrestein, G.M. Douglas, D.M. Durall, C. Duvallet, C.F. Edwards, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J.M. Gauglitz, S.M. Gibbons, D.L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G.A. Huttley, S. Janssen, A.K. Jarnusch, L. Jiang, B.D. Kaehler, K.B. Kang, C.R. Keefe, P. Keim, S.T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciulek, J. Kreps, M.G.I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B.D. Martin, D. McDonald, L.J. McIver, A.V. Melnik, J.L. Metcalf, S.C. Morgan, J.T. Morton, A.T. Naimey, J.A. Navas-Molina, L.F. Nothias, S.B. Orchanian, T. Pearson, S.L. Peoples, D. Petras, M.L. Preuss, E. Pruesse, L.B. Rasmussen, A. Rivers, M.S. Robeson II, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S.J. Song, J.R. Spear, A.D. Swafford, L.R. Thompson, P.J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P.J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J.J.J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K.C. Weber, C.H.D. Williamson, A.D. Willis, Z.Z. Xu, J.R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, J. Gregory Caporaso, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nat. Biotechnol.*, 37 (2019) 852–857.
- [13] M. Martin, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, *EMBnet. J.*, 17 (2011) 10–12.
- [14] R.C. Edgar, Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26 (2010) 2460–2461.
- [15] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glöckner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucl. Acids Res.*, 41 (2013) D590–D596.
- [16] M.K.H. Winkler, J.P. Bassin, R. Kleerebezem, D.Y. Sorokin, M. van Loosdrecht, Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94 (2012) 1657–1666.
- [17] A. Gnida, J. Wiszniowski, E. Felis, J. Sikora, J. Surmacz-Górska, J.K. Misch, The effect of temperature on the efficiency of industrial wastewater nitrification and its (geno)toxicity, *Arch. Environ. Prot.*, 42 (2016) 27–34.
- [18] C. Barria, M. Malecki, C.M. Arraiano, Bacterial adaptation to cold, *Microbiology*, 159 (2013) 2437–2443.
- [19] S. Phadtare, K. Severinov, RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins, *RNA Biol.*, 7 (2010) 788–795.
- [20] M. Chen, Y. Chen, Sh. Dong, S. Lan, H. Zhou, Z. Tan, X. Li, Mixed nitrifying bacteria culture under different temperature dropping strategies: nitrification performance, activity, and community, *Chemosphere*, 195 (2018) 800–809.
- [21] S. Zhu, S. Chen, The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters, *Aquacult. Eng.*, 26 (2002) 221–237.
- [22] R. Salvetti, A. Azzellino, R. Canziani, L. Bonomo, Effects of temperature on tertiary nitrification in moving-bed biofilm reactors, *Water Res.*, 40 (2006) 2981–2993.
- [23] M. Żubrowska-Sudoł, Moving bed technology as an alternative solution for reducing bioreactor volume, *Environ. Prot. Eng.*, 38 (2012) 5–22.
- [24] Y. Shao, Y. Shi, A. Mohammed, Y. Liu, Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): comparison of suspended flocs and attached biofilm, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 116 (2017) 38–47.

Supplementary information

Fig. S1. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-H and (b) NitUR-H. 1st repetition – 20°C.Fig. S2. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-AS and (b) NitUR-AS. 1st repetition – 20°C.

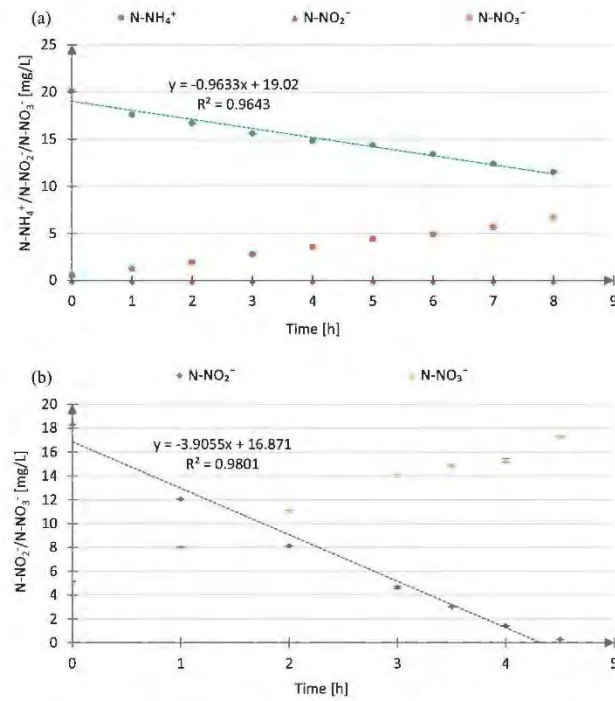


Fig. S3. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B and (b) NitUR-B. 1st repetition – 20°C.

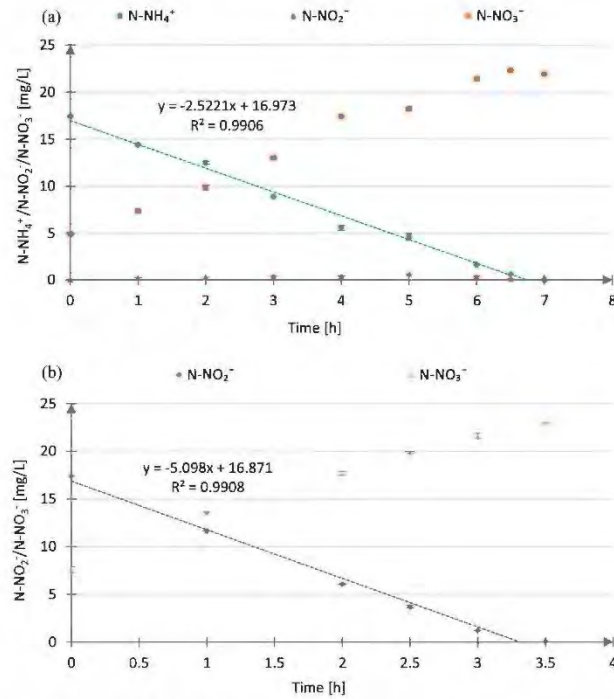


Fig. S4. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-H and (b) NitUR-H. 2nd repetition – 20°C.

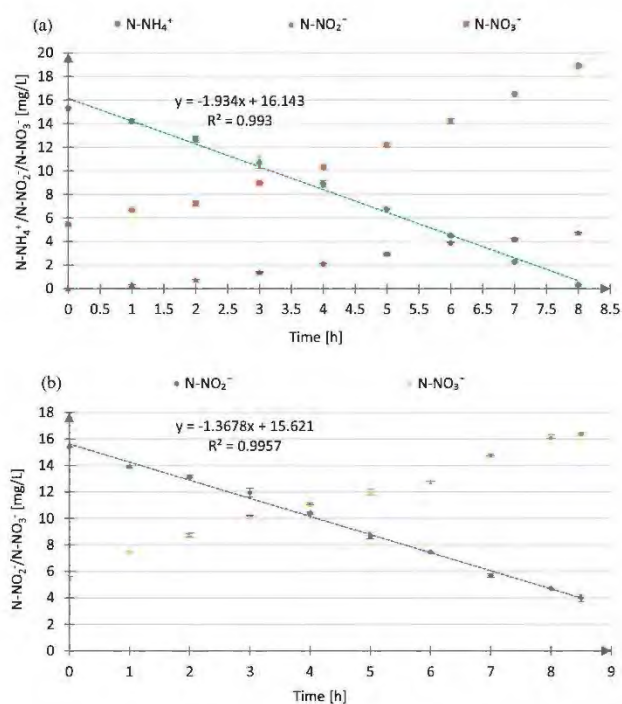


Fig. S5. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-AS and (b) NitUR-AS. 2nd repetition – 20°C.

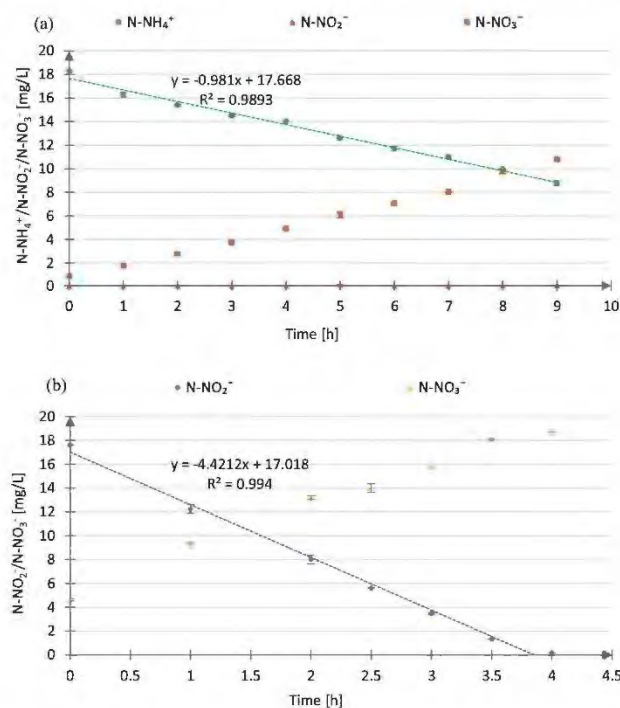


Fig. S6. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B and (b) NitUR-B. 2nd repetition – 20°C.

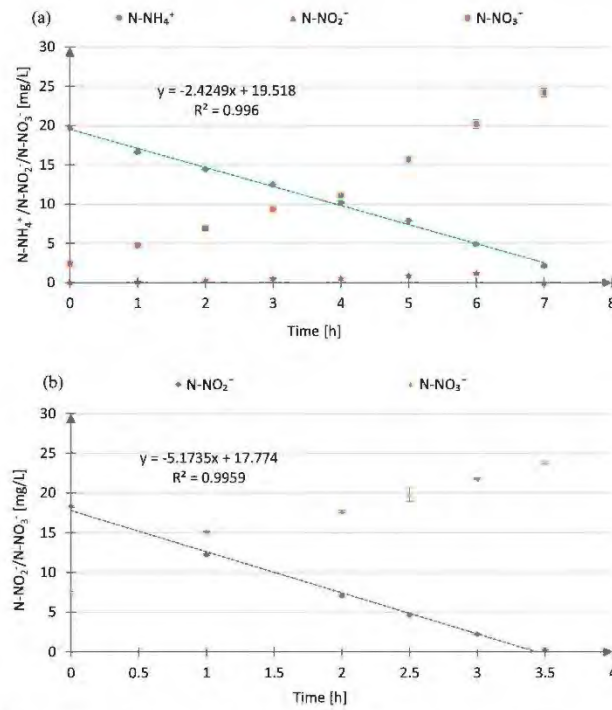


Fig. S7. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-H and (b) NitUR-H. 1st repetition – 12°C.

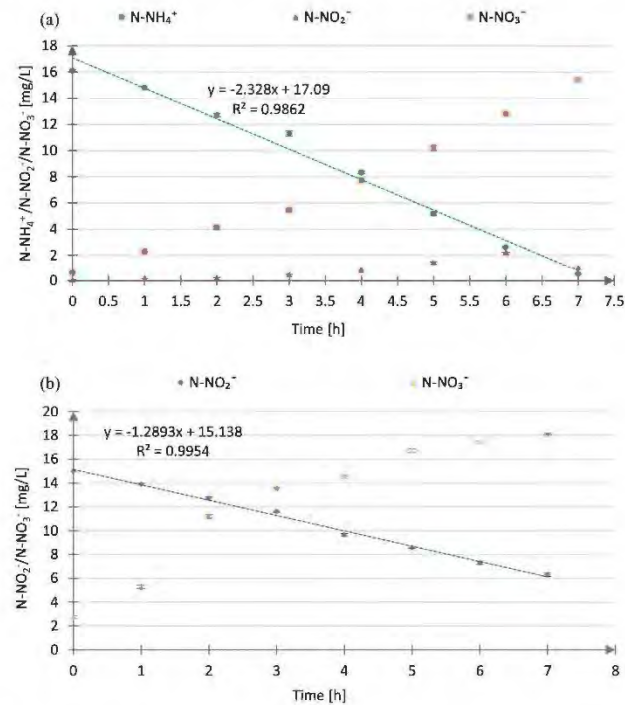
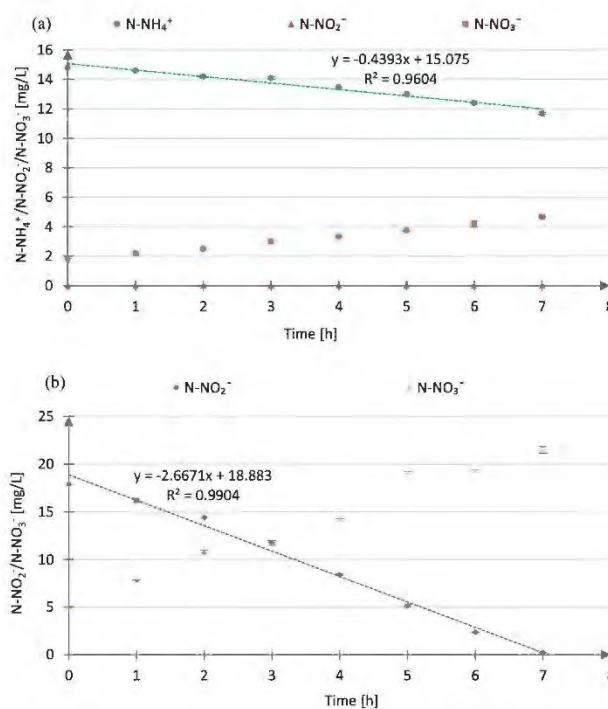
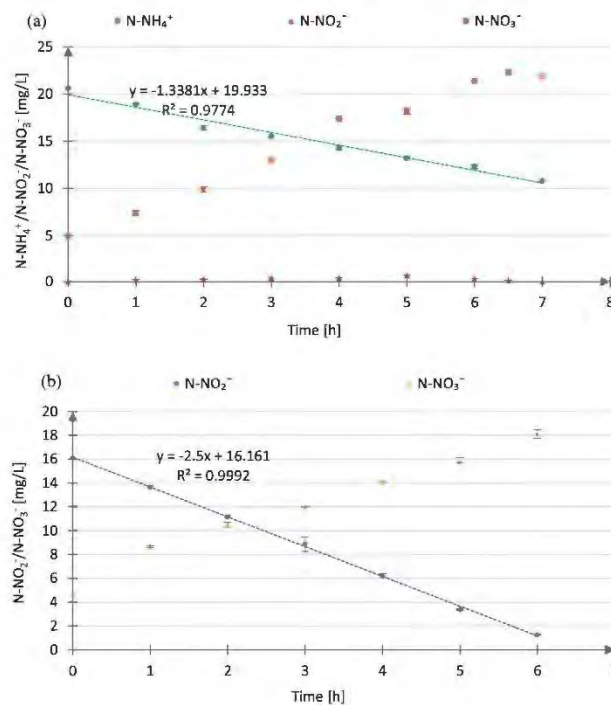
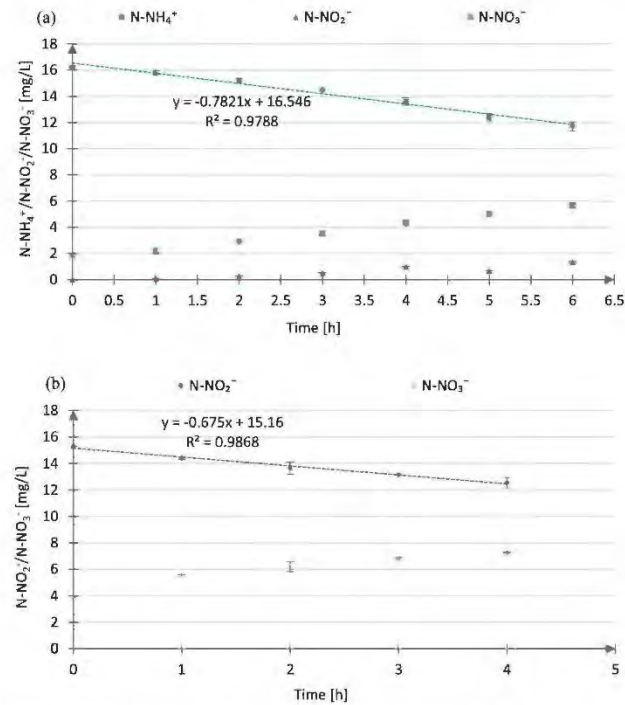
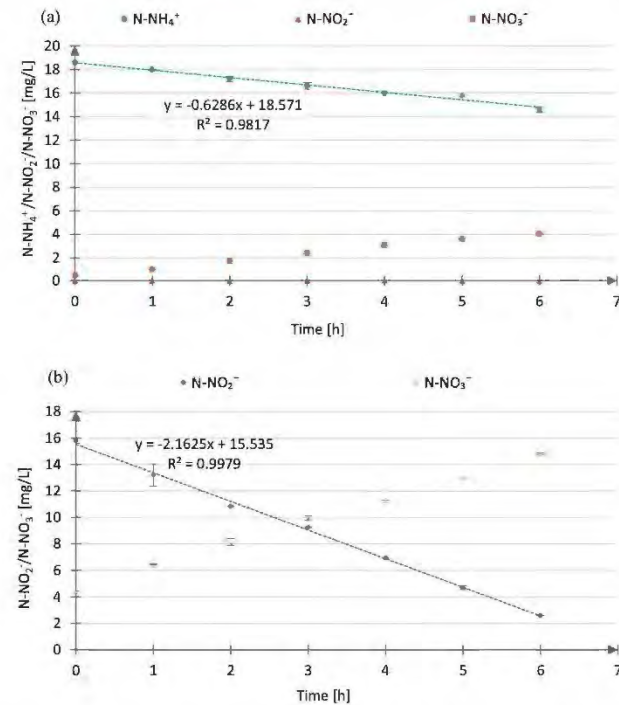


Fig. S8. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-AS and (b) NitUR-AS. 1st repetition – 12°C.

Fig. S9. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B and (b) NitUR-B. 1st repetition – 12°C.Fig. S10. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-H and (b) NitUR-H. 2nd repetition – 12°C.

Fig. S11. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-AS and (b) NitUR-AS. 2nd repetition – 12°C.Fig. S12. N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR-B and (b) NitUR-B. 2nd repetition – 12°C.

**OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW
O UDZIALE W PUBLIKACJI**

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Olga Zając oświadczam, że mój wkład merytoryczny w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 70%.

Zając, O., Żubrowska-Sudol, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2023). Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor. *Desalination and Water Treatment*, 288, 165–177, <https://doi.org/10.5004/dwt.2023.29304>. IF:1,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmował szczegółowy przegląd literatury, który posłużył do identyfikacji problemu badawczego oraz opracowania koncepcji pracy. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie metodyki badań technologicznych, a także za zaplanowanie i wykonanie eksperymentów technologicznych (sprawowanie kontroli nad układem badawczym i aparaturą pomiarową, przygotowywanie ścieków, przeprowadzanie testów kinetycznych, wykonywanie analizy fizyko-chemicznej jakości ścieków surowych i oczyszczonych) oraz pobór prób biomasy do badań mikrobiologicznych. Koordynowałam całym procesem badawczym, monitorując wszystkie etapy badań. Odpowiadałam za interpretację i dyskusję wyników badań, w zakresie wyników testów kinetycznych AUR i NitUR. Przygotowałam znaczącą część manuskryptu (100% – rozdział: 1., 3.2., 3.3, 4.; 80% – rozdział: 2.). Byłam odpowiedzialna za wizualizację danych. Przygotowałam materiały uzupełniające oraz pełniłam obowiązki autora korespondencyjnego.

20.09.2024r. Olga Zając
Data i podpis współautora

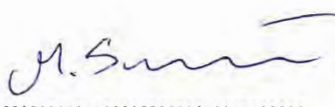
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Monika Żubrowska-Sudoł, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 70% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2023). Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor. *Desalination and Water Treatment*, 288, 165–177, <https://doi.org/10.5004/dwt.2023.29304>. IF:1,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy wynikał z pełnionej funkcji promotora. Obejmował:
1) nadzór merytoryczny nad przeglądem literatury prowadzonym przez Doktorantkę, 2) korektę merytoryczną koncepcji badawczej, metodyki badań technologicznych oraz manuskryptu, 3) nadzór nad czynnościami badawczymi prowadzonymi przez Doktorantkę, 4) pozyskanie funduszy.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 10%.

20.08.2024 

Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Martyna Godzieba, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 70% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudol, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2023). Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor. *Desalination and Water Treatment*, 288, 165–177, <https://doi.org/10.5004/dwt.2023.29304>. IF:1,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w opracowaniu metodyki badań mikrobiologicznych, 2) wykonanie eksperymentów mikrobiologicznych, 3) interpretację i dyskusję wyników badań mikrobiologicznych, 4) przygotowanie rozdziału 3.1., 5) współudział w przygotowaniu rozdziału 2. (20%).

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 10%.

18.08.2024 Martyna Godzieba
Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Sławomir Ciesielski, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 70% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2023). Activated sludge vs. biofilm – effect of temperature on ammonia and nitrite oxidation rate in the hybrid reactor. *Desalination and Water Treatment*, 288, 165–177, <https://doi.org/10.5004/dwt.2023.29304>. IF:1,00; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w opracowaniu metodyki badań mikrobiologicznych, 2) współudział w korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 10%.

10.05.2024 Sławomir Ciesielski.

.....
Data i podpis współautora

Publikacja nr 6

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S.

(2024)

Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor

Journal of Water Process Engineering, 57, 104655, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>

IF: 6,30; punkty MNiSW: 100



Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor

Olga Zajac^{a,*}, Monika Zubrowska-Sudol^a, Martyna Godzieba^b, Sławomir Ciesielski^b

^a Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services, Hydra and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland

^b Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Comammox
Nitrification kinetics
Ammonia oxidation rate
Nitrite oxidation rate
Mainstream-sidestream switching

ABSTRACT

This study investigated how mainstream-sidestream switching affected the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria. The experiment started in a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal with biomass in the form of activated sludge and biofilm. A highly effective nitrification sidestream reactor with pure moving bed technology was then obtained through gradual reduction of the reactor's organic loading rate (OLR), increase in the temperature (20–30 °C), and increase in the reactor's nitrogen loading rate (NLR). qPCR and kinetic batch test results suggest that Comammox bacteria could play an important role in nitrification in both the mainstream hybrid reactor and sidestream biofilm reactor, dominating even the canonical AOB. Biofilm provided a better environment for Comammox bacteria development, except when the system was transformed into a hybrid nitrifying reactor. In that case, the occurrence of Comammox bacteria in activated sludge was greater. Simultaneously with reduction of OLR an increase in ammonia oxidation rate was reported in both activated sludge and biofilm. An increase in NLR had a greater effect on the activity of NOB.

1. Introduction

Traditionally, in the course of biological nitrogen removal (BNR), nitrogen contained in wastewater is transformed into nitrogen gas by means of nitrification and denitrification (N/D). The nitrification process is therefore one of the key links in the nitrogen cycle in nature. More than 130 years ago, Winogradsky [1] discovered that nitrification consists of two-steps, whereas each of them is conducted by a separate group of microorganisms, i.e. microorganisms oxidising ammonia to nitrite nitrogen – Ammonia Oxidising Bacteria (AOB) and microorganisms oxidising nitrites to nitrates – Nitrite Oxidising Bacteria (NOB).

Over many decades, the attention of researchers has been particularly focused on the first step designated by the Russian microbiologist – nitrification. It was considered limiting for the entire process [2]. Lack of papers concerning NOB was undoubtedly caused by problems with culturing these microorganisms. As explained by Daims et al. [3], the bacteria of the second step of nitrification were also considered to be

chemolithoautotrophs with strongly limited physiological possibilities, and therefore with a low potential in discovering new physiologies. As a consequence, the progress of research related to NOB remained behind the expansion of knowledge regarding the bacteria of the first step of nitrification.

With development of science, with increasingly better tools at their disposal, researchers have revealed vast diversity of uncultivated bacteria of the second step of nitrification. According to the Gruber-Döringer et al. [4], bacteria from genus *Nitrospira* sp. constitute the most diverse and abundant group of NOB in municipal wastewater treatment plants (WWTPs). *Nitrospira* sp. was initially considered canonical NOB with limited metabolism that involved oxidising nitrites to nitrates. The identification of microorganisms performing complete ammonia oxidation – Comammox from genus *Nitrospira* sp., conducted in 2015, questioned the strict two-step division of nitrification known to date, also initiating another change in the general understanding of the process [5]. This ground-breaking discovery proved that these bacteria

* Corresponding author.

E-mail address: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl (O. Zajac).

<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>

Received 30 September 2023; Received in revised form 27 November 2023; Accepted 1 December 2023

Available online 12 December 2023

2214-7144/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

can show greater activity, and their metabolism is not only limited to the oxidation of NO_2^- to NO_3^- , but also to complete nitrification. Their genome includes ammonia monooxygenase (amo), hydroxylamine dehydrogenase (hao), and nitrite oxidoreductase (nxr), allowing them for direct oxidation of ammonia nitrogen to nitrates [5]. This suggests that they may compete with canonical nitrifiers – AOB and NOB. It is therefore important to investigate and expand knowledge on the conditions of development of these microorganisms. The crucial element of effective biological wastewater treatment is therefore the understanding of the microorganisms involved and their response to different operating conditions.

One of the milestones that could transform the current knowledge on nitrification is the determination of the conditions for the occurrence of Comammox bacteria in different forms of biomass. Based on this note, many studies have already been presented in the literature confirming the presence of Comammox bacteria in various full-scale WWTPs and laboratory reactors in different forms of biomass, i.e. suspended biomass, attached biomass, and granulated aggregates [6–8]. Some researchers have shown that biofilm provides a favourable environment for the growth of these microorganisms [9,10], while others have indicated in their studies high success of Comammox bacteria development in activated sludge flocs [10,11]. However, none of them has clearly identified the environment in which these microorganisms can develop best. The hybrid system analysed in this paper therefore constitutes an excellent example that may indicate which form of biomass provides a better environment for the development of Comammox bacteria. It is also worth emphasizing that this technological solution combining two forms of biomass, namely activated sludge and biofilm, recently gaining increasing popularity [12–14]. The paper by Zajac et al. [15] already addressed the issue of occurrence of Comammox bacteria in biofilm and activated sludge, analysing how the size of their population is affected by a change in aeration strategy (reduction of duration of subphases with aeration – increase in R value) and dissolved oxygen (DO) concentration. It was discovered that depending on the form in which biomass develops, Comammox bacteria responded differently to changes introduced in the system operation, and the size of their population was considerably larger in biofilm. These interesting findings suggest a need for a broader understanding of the effect of the operating parameters of the wastewater treatment systems on the occurrence of these microorganisms. Although nitrification has been studied for over 100 years, not only the aspects related to Comammox bacteria require further research, because the relationship between AOB and NOB is still being sought, especially in hybrid systems.

In the light of this background, this study presents results of a long-term experiment (338 days) aiming at the determination of how mainstream-sidestream switching obtained through a change in reactor's organic loading rate (OLR) (decrease) and reactor's nitrogen loading rate (NLR) (increase) and through an increase in temperature affected the activity and frequency of occurrence of individual groups of nitrifying microorganisms with particular consideration of Comammox bacteria. The determination of how selected parameters affect the activity and abundance of nitrifying microorganisms (AOB, NOB, and

Comammox bacteria) employed kinetic batch tests and microbiological analysis with the application of qPCR tests and DNA sequencing.

2. Materials and methods

2.1. Laboratory sequencing batch reactor set-up

The experiment was conducted in a laboratory scale sequencing batch reactor (SBR) with an active volume of 28 L. As a carrier of biofilm, a EvU-Pearl® moving bed was applied, with an active surface of $600 \text{ m}^2/\text{m}^3$ and a shape of a cylinder with corrugated internal and external surface. A detailed description of the reactor, as well as its diagram, can be found in the Supplementary Material (Fig. S1).

SBR was fed with synthetic wastewater the characteristics of which with average values in each series of the experiment are shown in Table 1. Detailed composition of influent is presented in Supplementary Material (Table S1).

Regardless of the stage of the experiment, a single 8-hour reactor operation cycle consisted of the following phases: unaerated, aerobic, sedimentation, and decantation (Fig. 1). At stages I and II, during the two aerobic phases, intermittent aeration was used (the duration of the subphases with (t_1) and without (t_2) aeration was 20 min and 10 min, respectively). Stage III involved four aerobic phases during which the system operated with continuous aeration. Another difference in the reactor operation cycle was shortening the time of unaerated phases and increasing their number – at stage I and II there were two phases lasting 50 min (I unaerated) and 30 min (II unaerated). At stage III their number was increased to four, with a duration of 5 min each. Along with the changes in the duration and number of unaerated phases, the raw sewage dosing schedule also changed. Initially (stages I and II), wastewater flowed into the system twice during the cycle, at the beginning of each of the unaerated phases, while at stage III the system was fed four times.

2.2. Reactor operating conditions

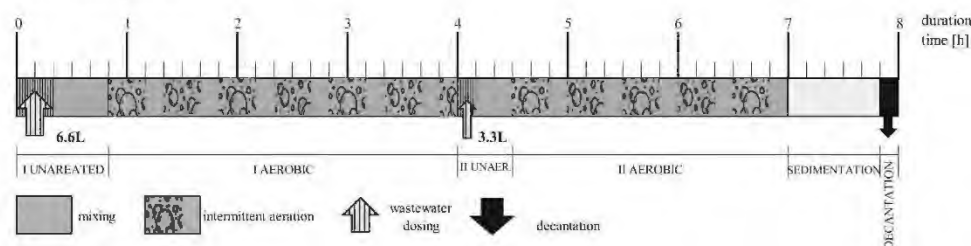
Prior to the commencement of the research the results of which are presented in this article, the reactor operated continuously for 617 days, and the findings from that period were published in works [15,16]. As already mentioned in Introduction, the promising results encouraged the authors to further search for the relationship between the operating parameters of wastewater treatment systems and the activity and frequency of occurrence of individual groups of nitrifying microorganisms with particular consideration of Comammox bacteria. For this purpose, a long-term experiment (338 days) was designed. It was divided into three research stages (I–III) during which the assumed changes were successively introduced (Table 2).

At stage I (S.I.), 4 research series were designated (S.I.1.–S.I.4.), differing in reactor's organic loading rate. This stage was commenced on an operating mainstream hybrid reactor (IFAS-MBSBBR – integrated fixed-film activated sludge – moving-bed sequencing batch biofilm reactor) with intermittent aeration ($R = 1/2$) for integrated removal of

Table 1
Average composition of influent.

Indicator		COD	TN	TKN	N-NH ₄	TP
Unit		[mgO ₂ /L]	[mgN/L]	[mgTKN/L]	[mgN-NH ₄ /L]	[mgP/L]
Stage I	Series I.1.	517.00 ± 4.38	71.05 ± 1.26	70.18 ± 1.23	39.32 ± 1.25	7.55 ± 0.29
	Series I.2.	358.56 ± 7.88	71.30 ± 1.15	70.87 ± 1.27	52.17 ± 1.87	4.59 ± 0.19
	Series I.3.	199.00 ± 8.72	71.78 ± 1.10	70.43 ± 1.14	63.70 ± 1.48	2.54 ± 0.16
	Series I.4.	0	71.00 ± 0.71	68.93 ± 0.71	68.70 ± 0.56	2.37 ± 0.12
Stage II		0	70.72 ± 1.03	68.50 ± 1.07	68.08 ± 1.18	2.27 ± 0.21
Stage III	Series III.1.	0	71.64 ± 1.75	69.20 ± 1.59	67.23 ± 1.84	2.42 ± 0.17
	Series III.2.	0	99.33 ± 2.89	96.64 ± 2.89	93.50 ± 2.60	2.55 ± 0.15
	Series III.3.	0	121.87 ± 1.15	119.16 ± 1.11	118.17 ± 1.53	2.64 ± 0.12
	Series III.4.	0	160.44 ± 3.17	158.76 ± 3.25	154.69 ± 4.40	2.40 ± 0.18

a. S.I.1.-S.I.4. and S.II.



b. S.III.1.-S.III.4.

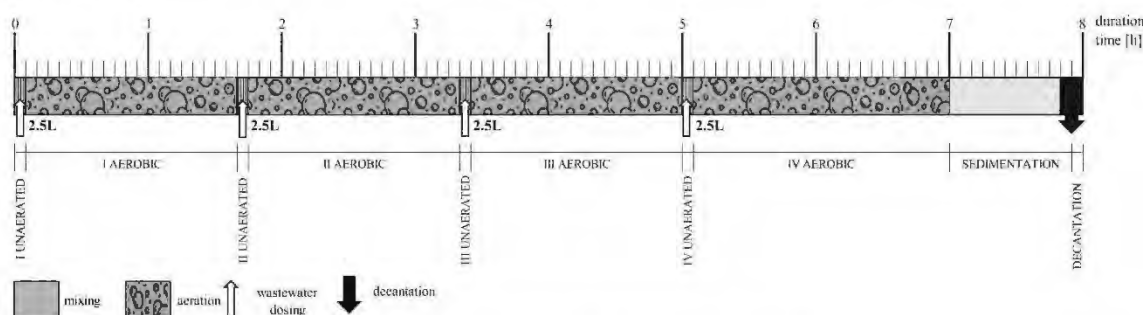


Fig. 1. Schedule of the operation cycle of the reactor: a) stage I and II, b) stage III.

C, N, and P compounds, with biomass developed in the form of biofilm on moving carriers, and in the form of activated sludge, and ended with a series with a treatment goal of the nitrification process (hybrid nitrification reactor). Throughout this stage, a temperature of 20 °C was maintained in the system, stimulating the mainstream wastewater treatment. Through a change in the composition of raw wastewater supplied to IFAS-MBSBBR, in each series, OLR was gradually reduced until eliminating organic compounds from the supplied wastewater, resulting in obtaining a nitrification reactor. In series S.I.4., a rapid decrease in biomass in the form of activated sludge was observed from 1.4286 gMLSS/L (day 165) to 0.043 gMLSS/L (day 190). As a consequence, IFAS-MBSBBR was transformed into MBSBBR (moving bed sequencing batch biofilm reactor) with pure moving bed technology (detailed description in Section 3.1).

At stage II (S.II.), temperature of MBSBBR operation was gradually increased from 20 °C to 30 °C, to obtain a shift from nitrification MBSBBR simulating the mainstream wastewater treatment to nitrification sidestream MBSBBR.

Because the next stage (S.III.) assumed an increase in NLR (from $76.76 \pm 1.87 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ at S.III.1. to $171.90 \pm 3.40 \text{ gN/m}^3 \cdot \text{d}$ at S.III.4.), the aeration strategy was changed from intermittent with $R = 1/2$ (S.I., S.II.) to continuous ($R = 0$).

In each series, twice a week, the quality of influent and effluent was analysed in the following scope: COD, TN, N-NH_4 , N-NO_2 , N-NO_3 , TP, alkalinity, pH, and concentration of biomass developed in the form of activated sludge and biofilm.

Batch tests, as well as quantitative PCR analysis were conducted for biomass sampled from the reactor at the end of each research series. DNA sequencing was conducted for samples of activated sludge and biofilm collected at the end of stage I and III.

2.3. Quantity of biomass in the form of activated sludge and biofilm

The measurement of changes in the quantity of biomass developing in the reactor in the form of activated sludge was performed twice a week, and involved the determination of the concentration of mixed

liquor suspended solids (MLSS) and mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) using gravimetric methods in line with Polish Standard PN-EN 872:2007.

The quantity of biofilm immobilised on moving carriers was measured at the end of each series using gravimetric methods by calculation of weight loss. Five carriers were randomly collected from the reactor, and gently rinsed with demineralised water for the purpose of removing loosely attached biomass. Then, the biofilm was mechanically removed from the carriers. Total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) of the biofilm were determined in accordance with Polish Standard PN-EN 872:2007.

2.4. Batch tests

After each series, Ammonia Utilisation Rate (AUR) and Nitrite Utilisation Rate (NitUR) batch tests were conducted, permitting the determination of the ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR), respectively. The tests were conducted in accordance with the methodology described in the paper by Zajac et al. [15], with the following modifications:

- temperature corresponding with that maintained in the reactor in a given series: Stage I – 20 °C, Stage II and Stage III – 30 °C;
- initial concentration of ammonia nitrogen (AUR test) and nitrite nitrogen (NitUR test) at a level of 15 mg/L (Stage I) and 30 mg/L (Stage II and Stage III).

2.5. Microbiological analysis

2.5.1. DNA extraction

DNA was extracted from the activated sludge and biofilm samples using a FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), according to the manufacturer's instructions. A Qubit fluorometer (Invitrogen, USA) was used to quantify the isolated DNA. The isolated DNA was stored at –18 °C until further analysis.

Table 2
Operation conditions and quantity of biomass in the form of activated sludge and biofilm during experimental series.

Parameter	Unit	Duration [d]	DO set-point [mgO ₂ /L]	R [-]	Temperature [°C]	OLR [gCOD/m ³ ·d]	NLR [gN/m ³ ·d]	Suspended biomass [gMLSS]	Attached biomass [gTSS]	% of total biomass	% of total biomass
Stage I	Series 1 (S.I.1.)	1–73	1.5	1/2	20	553.93 ± 4.69	76.12 ± 1.35	46.3914 ± 2.2819	30.0305 ± 0.1305	16.2877 ± 0.3479	42
	Series 2 (S.I.2.)	74–115	1.5	1/2	20	384.17 ± 8.44	76.39 ± 1.24	47.7887 ± 1.6940	30.1559 ± 0.8471	16.6591 ± 0.5253	42
	Series 3 (S.I.3.)	116–164	1.5	1/2	20	213.21 ± 9.34	76.91 ± 1.18	52.5782 ± 2.1430	30.6459 ± 1.5505	16.2679 ± 0.3513	40
	Series 4 (S.I.4.)	165–190	1.5	1/2	20	0	76.07 ± 0.76	13.1689 ± 14.9558	25.0362 ± 3.2900	15.1556 ± 0.6304	68
Stage II	Series 1 (S.II.1.)	191–246	3.0	1/2	20–30	0	76.01 ± 1.00	nd	32.2647 ± 3.6214	16.0316 ± 0.4503	100
Stage III	Series 2 (S.III.2.)	247–270	3.0	0	30	0	76.76 ± 1.87	nd	33.0212 ± 1.4759	16.0316 ± 0.4503	100
	Series 3 (S.III.3.)	271–281	3.0	0	30	0	106.43 ± 3.09	nd	49.2083 ± 0.4815	19.9154 ± 1.0322	100
	Series 4 (S.III.4.)	282–291	3.0	0	30	0	130.57 ± 1.24	nd	52.1528 ± 0.6969	19.5383 ± 0.1057	100
	Series 4 (S.III.4.)	292–338	3.0	0	30	0	171.90 ± 3.40	nd	42.2024 ± 1.6719	20.2645 ± 1.2978	100

nd – not detected.

2.5.2. qPCR

The PCR reaction was performed in an ABI 7500 real-time PCR thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), in MicroAmp™ Optical 96-well reaction plates, using Mix SYBR® A RT PCR reagents (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). Each sample was analysed in a triplicate. The primers used for the detection of AOB, NOB and Comammox bacteria are included in the Supplementary Material (Table S2). The results of qPCR experiments were calculated using absolute quantification and the standard curve method. The copy numbers of the studied genes were calculated by ABI 7500 real-time PCR System software.

2.5.3. 16S rRNA gene sequencing

The taxonomic composition of the analysed samples was determined by sequencing the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. High-throughput Illumina sequencing was performed with S-d-Bact-0341-b-S-17 and S-d-Bact-0785-a-A-21 primers [17] and NEBNext®High-Fidelity 2× PCR Master Mix (Bio Labs Inc., USA) following the manufacturer's manual. The sequencing reaction was performed on a Miseq sequencer with a MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, USA), applying pair-end technology with read length of 250 base pairs.

Raw sequencing data were analysed using a QIIME2 package [18]. Pairs of sequences were merged using the fast-join algorithm. Unmerged sequences were excluded from further analysis. Low quality sequences (under 20) were filtered by the Cutadapt algorithm [19]. Chimeric sequences were detected and excluded from analyses using USEARCH [20]. 16S rRNA OTUs were picked from the Illumina reads using a closed-reference OTU picking protocol against the SILVA_V_138 database [21]. Sequences were clustered at 97 % identity and trimmed to span only the 16S rRNA V4 region flanked by the sequencing primers. Taxonomy assignments were associated with OTUs based on the taxonomy associated with the SILVA_V_138 reference sequence defining each OTU.

2.6. Analytical methods

Concentrations of COD, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, TN, and TP were analysed spectrometrically using cuvette tests (Hach Lange, GmBH) according to APHA Standard Methods [22]. All chemical analyses were performed in duplicates.

Free ammonia (FA) were calculated based on Eq. (1) [23].

$$FA = \frac{17}{14} \times \frac{\text{total ammonia as N} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 10^{\text{pH}}}{e^{(6144)/(273+T\text{ }^{\circ}\text{C})} + 10^{\text{pH}}} [\text{mg FA/L}] \quad (1)$$

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis of the obtained results of quality of treated wastewater, efficiency of removal of particular pollutants, and concentration of activated sludge was conducted in programme Statistica 13. Tukey RiR test was used for the determination of the significance of differences between the analysed variables (*p*-value smaller than 0.05 shows that the difference was statistically significant).

3. Results

3.1. Biomass concentration

The experiment was started in a system where biomass developed in the suspended (activated sludge – AS) and attached (biofilm – B) form of biomass (mainstream hybrid reactor for C, N, P removal – stage I). In series S.I.1., S.I.2., and S.I.3., suspended form accounted for the majority of biomass developing in IFAS-MBSBBR (Table 2). Its concentration was maintained at an approximate level despite a decrease in the concentration of organic compounds supplied with raw wastewater (*p* >

0.304820). Significant loss of activated sludge was recorded in the last series of stage I (S.I.4.) ($p = 0.000164$). The concentration of this form of biomass decreased with duration of the series in which no more organic compounds were supplied with raw wastewater (Fig. 2).

In S.I.4., the proportions between the quantity of particular forms of biomass were reversed, and most biomass in IFAS-MBSBBR was this in attached form. The quantity of biofilm on moving carriers during the first three series was also maintained at an approximate level ($p > 0.999999$), whereas in S.I.4. its decrease by 18 % was recorded.

At subsequent stages of the experiment, biomass in the reactor developed only in the form of biofilm overgrowing moving carriers – nitrifying MBSBBR. At stage II, a 29 % increase in the quantity of biofilm was recorded in comparison with S.I.4.

After the introduction of continuous aeration and change in the MBSBBR operation schedule (S.III.1.), the quantity of biomass in the form of biofilm was at a level comparable to that obtained at Stage II. Due to an increase in the NLR from $76.76 \pm 1.87 \text{ gN/m}^3\text{d}$ (S.III.1.) to $108.43 \pm 3.09 \text{ gN/m}^3\text{d}$ (S.III.2.), the quantity of biofilm increased almost by 50 %. In the following series, the quantity of biofilm varied in a range from 39.7423 to 52.6456 gTSS/L.

3.2. Nitrification efficiency

Fig. 3 shows the course of concentrations of individual forms of nitrogen in the influent and effluent of the reactor, as well as the efficiency of nitrification process (E_{Nit}) obtained in the subsequent days of the experiment.

In series S.I.1. and S.I.2. nitrification efficiency was maintained at a comparable level ($95.94 \pm 1.92 \%$ and $95.76 \pm 2.49 \%$) and no statistically significant differences were found ($p = 1.0$). An average N-NH_4^+ concentrations in effluent were that time $0.68 \pm 0.31 \text{ mg/L}$ and $0.73 \pm 0.37 \text{ mg/L}$, respectively ($p = 1.0$). A certain decrease in the efficiency of the nitrification process occurred in S.I.3. and S.I.4. Then E_{Nit} decreased from $95.76 \pm 2.49 \%$ (S.I.2.) to $90.90 \pm 3.54 \%$ (S.I.3.) and to $85.61 \pm 8.60 \%$ (S.I.4.), although a Tukey RIR test showed that the differences were not statistically significant (S.I.2. and S.I.3. $p = 0.822807$; S.I.3. and S.I.4. $p = 0.938297$). Mean concentration of N-NH_4^+ in effluent did not exceed $1.80 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{L}$ in any of the analysed series. It is also worth emphasizing that in stage I, no statistically significant differences were detected between any of the series with regard to N-NH_4^+ concentrations or nitrification efficiencies. No accumulation of N-NO_2 in treated wastewater was also recorded in stage I.

At stage II with an increase in temperature from 20°C to 30°C , a slight increase in the efficiency of the nitrification was recorded in comparison to that from S.I.4. Mean E_{Nit} increased from $85.61 \pm 8.60 \%$ (S.I.4.) to $91.32 \pm 10.81 \%$ (S.II.), and based on a Tukey RIR test, no statistically significant difference was recorded ($p = 0.906334$). Average

value of N-NH_4^+ concentration in treated wastewater was almost 2.50 times higher than that in S.I.4. Such a divergence primarily results from high concentrations of ammonia nitrogen in treated wastewater right after the beginning of the increase in temperature at S.II., when a failure of the system operating the stirrer occurred, causing a disturbance in proper mixing of the volume of the reactor. Despite these obstacles, right after removing the failure, N-NH_4^+ concentration in effluent considerably decreased, and at S.II. it did not exceed 1.29 mg/L .

During the first three series of stage III, the efficiency of the nitrification was maintained at an approximate level ($p > 0.989644$), and its average value was $E_{\text{Nit}} = 94.76 \pm 2.79 \%$. After increasing the NLR to $171.90 \pm 3.40 \text{ gN/m}^3\text{d}$, the E_{Nit} value decreased to $82.91 \pm 11.47 \%$ (S.III.4.). The concentration of N-NH_4^+ in treated wastewater averaged $20.36 \pm 16.82 \text{ mg/L}$. The statistical analysis revealed significant differences between the values of N-NH_4^+ in effluent in S.III.4. and the remaining series at stage III ($p < 0.05$).

With an increase in ammonia nitrogen concentration in effluent, a considerable increase in the accumulation of N-NO_2 was also recorded, suggesting the occurrence of the process of partial nitrification. In S.III.4., the accumulation of nitrites at a level of $20.39 \pm 9.70 \text{ mgN-NO}_2/\text{L}$ was observed until 318 day of research. On the following days of the experiment, a decrease in the concentration of N-NH_4^+ in treated wastewater was accompanied by the accumulation of N-NO_2 , and from day 319 until the end of S.III.4., it averaged $6.61 \pm 4.55 \text{ mgN-NO}_2/\text{L}$. The observed phenomenon could be related to the occurrence of high free ammonia (FA) concentration in the system. In S.III.4. it averaged $3.64 \pm 0.10 \text{ mgFA/L}$. Initially, due to the stress caused by an increase in the concentration of this inhibitor, NOB decreased their activity, resulting in high accumulation of nitrites in effluent. Presumably, in the course of the series, they got accustomed to the occurring conditions, and through a change in their metabolic paths they were able to reduce the effect of FA on their activity.

3.3. Batch test results

After each of the series, Ammonia Utilisation Rate (AUR) and Nitrite Utilisation Rate (NitUR) batch tests were conducted for the determination of how changes introduced at particular stages and series of the experiment affected the activity of ammonia oxidising bacteria and those oxidising nitrite. Because the adopted methodology stipulated conducting all tests at identical conditions, it was assumed that changes in the ammonia oxidation rate (AOR) and nitrite oxidation rate (NitOR) would point to changes in the activity of particular groups of nitrifying microorganisms. Results of the AUR and NitUR batch tests are presented in Fig. 4 (results of the particular batch tests providing the basis for the determination of AOR and NitOR values are presented in the Supplementary Material – Fig. S10–S23).

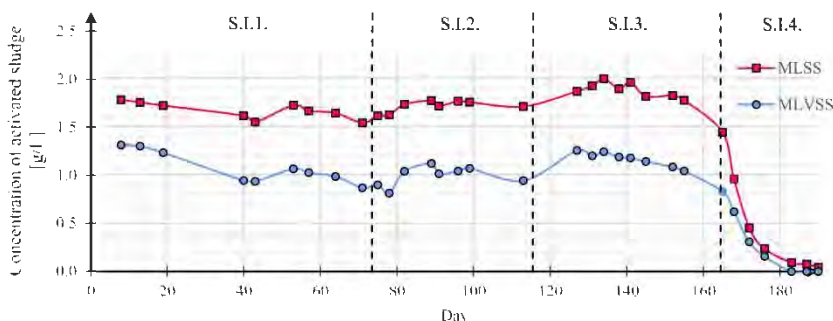


Fig. 2. Changes in the concentration of activated sludge during stage I.

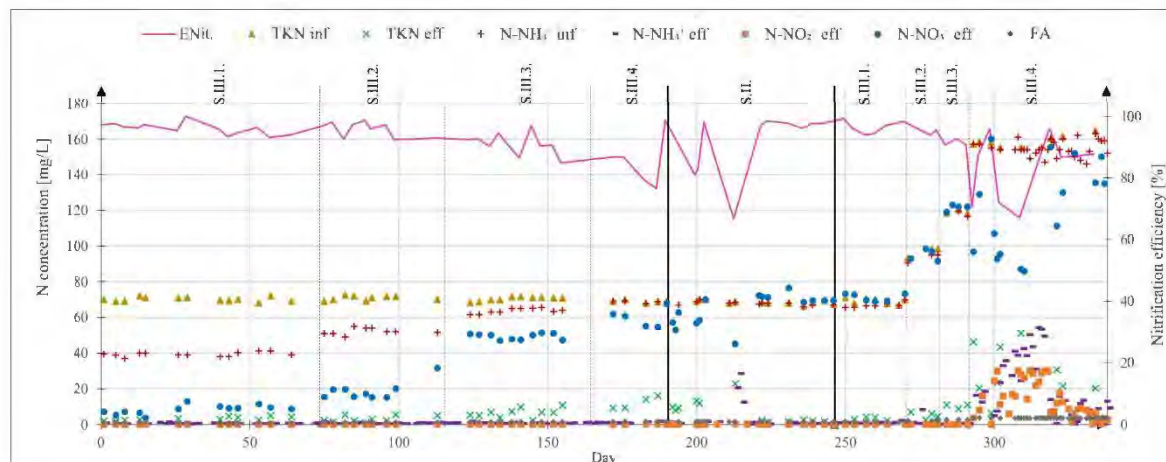


Fig. 3. Profiles of ammonia, nitrite, nitrate, free ammonia (FA), and Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) concentrations in the influent and effluent. Nitrification efficiency (E_{Nit}) was calculated in accordance with the methodology provided by Podedworna et al. [24].

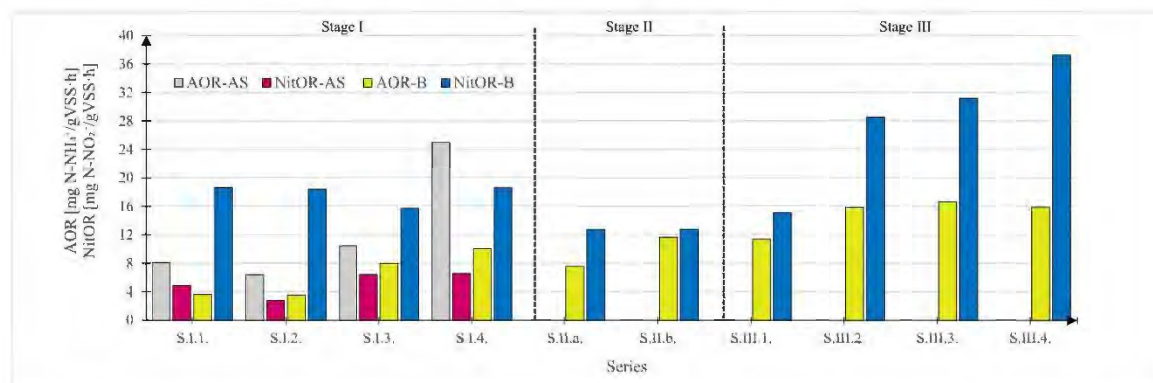


Fig. 4. Ammonia Oxidation Rate (AOR) and Nitrite Oxidation Rate (NitOR) for activated sludge (AS) and biofilm (B) determined in AUR and NitUR batch tests.

3.3.1. Stage I. A gradual decrease in reactor's organic loading rate vs. the activity of particular groups of nitrifying bacteria in biomass in IFAS-MBSBBR.

The analysis of data presented in Fig. 4 shows that in each series, the ammonia oxidation rate was higher for activated sludge (AS), whereas the nitrite oxidation rate was higher for biofilm (B). The highest difference between AOR values for AS and B were observed in S.I.4. The activity of ammonia oxidising bacteria inhabiting activated sludge was then 2.50 times higher than those developing in the form of biofilm. Regarding to the NitOR values, the greatest difference was recorded in S. I.2., when biofilm was characterised by a 6.59 times higher NitOR in comparison to activated sludge.

Contrary to expectations, in S.I.2., a certain decrease in the analysed rates was observed. The greatest differences were determined between NitOR-AS and AOR-AS that in comparison to S.I.1. were 1.75 times and 1.26 times lower, respectively. In the following series, a decrease in the OLR was accompanied by an increase in the ammonia oxidation rate both in the case of activated sludge and biofilm. The highest AOR-AS and AOR-B values were recorded in the series where organic compounds supplied to the system with raw sewage were eliminated from the system (S.I.4.). The analysed values were then 2.41 times and 1.26 times higher than in S.I.3., and 3.10 times and 2.76 times higher than at the beginning of the experiment (S.I.1.).

The comparison of NitOR-B values obtained in subsequent study series shows that their certain decrease only occurred after a decrease in OLR to $213.21 \pm 9.34 \text{ gCOD/m}^3\text{d}$ (S.I.3.). In the case of activated sludge, an almost 2.25-fold increase in nitrite oxidation rate was recorded.

3.3.2. Stage II. From mainstream to sidestream – how ammonia and nitrite oxidation rate changed?

Stage II involved conducting two series of AUR and NitUR batch tests, respectively after 7 (II.a.) and 14 (II.b.) days from obtaining a temperature of 30°C in the reactor, allowing for the determination of how the transition from the conditions of a mainstream nitrification reactor to sidestream nitrification reactor affected the activity of ammonia oxidising bacteria and nitrite oxidising bacteria developing in the biomass of biofilm overgrowing the moving carriers.

From that stage, batch tests were conducted at a temperature of 30°C , and the initial ammonia (AUR test) and nitrite (NitUR test) concentration was increased to 30 mg/L . Other methodological assumptions remained unchanged.

The analysis of results obtained after 7 days of operation of the reactor at 30°C shows that an increase in temperature caused a decrease in the activity of both the analysed groups of nitrifying microorganisms – 1.33 times for ammonia oxidising bacteria, and 1.46 times for nitrite

oxidising bacteria, respectively, in reference to values recorded in S.I.4. After another week of operation of the system as a sidestream nitrification MBSBBR, a 1.54-fold increase in the AOR value was recorded, whereas NitOR was at a comparable level, pointing to high stability of NOB bacteria inhabiting the biofilm.

3.3.3. Stage III. Reactor's nitrogen loading rate vs. changes in the activity of ammonia oxidising bacteria and nitrite oxidising bacteria

During 4 series designated at stage III, the MBSBBR's nitrogen loading rate was increased for the determination of the effect of that parameter on the activity of particular groups of nitrifying bacteria.

The analysis of data presented in Fig. 4 shows that in each series of stage III, NOB were characterised by higher activity. NitOR values were 1.32 (S.III.1.), 1.80 (S.III.2.), 1.88 (S.III.3.), and 2.35 (S.III.4.) times higher than AOR, respectively.

The greatest difference, both between AOR and NitOR values, was recorded after an increase in NLR from $76.76 \pm 1.87 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.1.) to $108.43 \pm 3.09 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.2.). They increased almost 1.40 and 1.90-fold, respectively, pointing to a spike in the activity of both groups of the analysed microorganisms.

After an increase in NLR to $130.57 \pm 1.24 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.3.), AOR and NitOR values were comparable to those recorded in S.III.2. In the following series (S.III.4.), only a significant change in the NitOR was recorded, pointing to a 1.19-fold increase in the activity of nitrite oxidising bacteria.

The analysis of the obtained data also shows that a change in NLR affected NitOR values more than AOR values. From S.III.1. to S.III.4., a 2.48-fold increase in the value occurred, whereas an increase in AOR was only recorded between S.III.1. and S.III.2., and it was additionally lower than that characteristic of NitOR.

3.4. Microbial population analysis

3.4.1. AOB, NOB, and Comammox bacteria quantification

The microbiological analysis showed that the NOB dominated over the other groups tested in all stages of the experiment. In general, all groups of nitrifiers were more abundant in the biofilm than in the activated sludge, with exception of the series S.I.4. (Fig. 5). A gradual reduction of the organic loading rate in the first stage had a significant effect on the nitrifiers population. In the first stage, the AOB population in the biofilm showed greater variability than in the activated sludge. Initially, their abundance increased, but in the following series it gradually decreased, while in the activated sludge it remained at a similar level. In the biofilm, the population of NOB and Comammox bacteria gradually increased, but decreased in the last series. In the activated sludge, these two groups of bacteria reacted differently – initially their numbers decreased, but then gradually increased, reaching the highest values in the last sample.

In the second stage, the operating temperature of the reactor was increased from 20 °C to 30 °C. From this series on, the biomass in the reactor developed only in the form of biofilm. The increase in temperature led to a twofold increase in the number of AOB, but to a decrease in the number of NOB (by half) and Comammox bacteria (by one-third). Over the next 7 days, the abundance of AOB decreased significantly, while the abundance of NOB increased. The abundance of Comammox bacteria remained at a similar level.

The increase in nitrogen loading rate initially resulted in an increase in the population size of AOB and NOB but a decrease in the abundance of Comammox bacteria. Further increasing the NLR had no significant effect on the abundance of Comammox bacteria. The AOB population also remained stable; only the highest NLR values in the last series of the experiment caused a rapid (nine fold) increase in their abundance. At this stage of the experiment, the number of NOB changed most dynamically. At medium NLR values, their abundance remained high, however, the high NLR value in the last series had an inhibitory effect.

3.4.2. Microbial community composition

Based on diversity indices (number of OTUs, CHAO index, Shannon index), the bacterial community of the biofilm was richer and more diverse than that of the activated sludge (see Supplementary Material – Table S3). However, the increase in the nitrogen loading rate in the reactor had a negative effect on the alpha diversity of the biofilm community, which was reflected in the decreasing values of the indices tested. The PCoA analysis (see Supplementary Material – Fig. S6) showed that there were significant differences in the composition of the bacterial community between activated sludge and biofilm samples. The change of operating conditions in the reactor affected the communities of both types of biomass, but the distance between the activated sludge samples indicate its greater susceptibility to environmental factors.

In the control sample of activated sludge, taken before the start of the experiment, the most abundant phyla were *Proteobacteria* (36.3 %), *Bacteroidota* (25.8 %) and *Armatimonadota* (13.6 %) (see Supplementary Material – Fig. S7). A reduction of COD resulted in a large increase in the abundance of *Proteobacteria*, which became the dominant phylum (61 %). The abundance of *Planctomycetota*, *Acidobacteriota* and *Nitrospirata* also increased (to 5.9 %, 5.6 % and 5.1 %, respectively). *Chloroflexi* (27.6 %) were originally the dominant phylum in the biofilm, but changes in reactor operating parameters led to a gradual decrease in its abundance. On the other hand, a gradual increase in the abundance of *Proteobacteria*, *Bacteroidota* and *Nitrospirata* was observed (to 33.3 %, 22.1 % and 10.4 % in the last sample, respectively).

At the genus level, a large percentage of the bacterial population, both in the biofilm and in the activated sludge, consisted of less abundant and unidentified taxa. Originally, the most abundant genus in activated sludge was *Fimbriimonadaceae* (see Supplementary Material – Fig. S8). However, its abundance as well as that of all other highly abundant genera (relative abundance > 1 %) decreased to below 1 % in sample S.I.4. The only exception was *Dokdonella*, which increased from 4.9 % to 12.3 %. Sample S.I.4. was also characterised by a significantly higher abundance of *Ferruginibacter* (10.2 %), *Candidatus_Berkiella* (6.6 %) and *Nitrospira* (5.1 %) compared to S.0. The most abundant genus in the biofilm was *Koileothrix*. In the following samples, *Nitrospira*, *Ferruginibacter* and *Nitrosomonas* took over the dominant role (with a relative abundance of 10.4 %, 9.4 % and 6.8 % in sample S.III.4., respectively). The high abundance of AOB bacteria (*Nitrosomonas*) and NOB bacteria (*Nitrospira*) in sample S.III.4. is consistent with the increases in AOR and NitOR values observed at this stage.

4. Discussion

4.1. Activated sludge vs. biofilm in reference to Comammox bacteria abundance

In this study, the comparison of occurrence of Comammox bacteria in activated sludge and biofilm was based on results from stage I, because only then two forms of biomass developed in the reactor.

Depending on whether organic compounds were supplied to the system with raw wastewater (S.I.1.–S.I.3.) or were completely eliminated (S.I.4.), the environment in which the Comammox bacteria population was higher changed between biofilm and activated sludge flocs.

When the reactor operated as a mainstream hybrid reactor for integrated C, N, and P removal (S.I.1.–S.I.3.), the size of the Comammox bacteria population in biofilm exceeded that in activated sludge. The abundance of Comammox bacteria progressively increased with gradual reduction of the ORL. This insight suggests that biofilm constituted a better environment for the development of complete nitrifiers. Comammox bacteria are considered to be characterised by high growth yields which might be an asset in slow growth favouring systems – i.e. biofilm – with low cell washout rates [25]. This finding is also confirmed by several previous studies. For example, Tsuchiya et al. [26], conducting research for activated sludge and biofilm samples collected from a full-scale N/D mainstream WWTP showed that Comammox bacteria

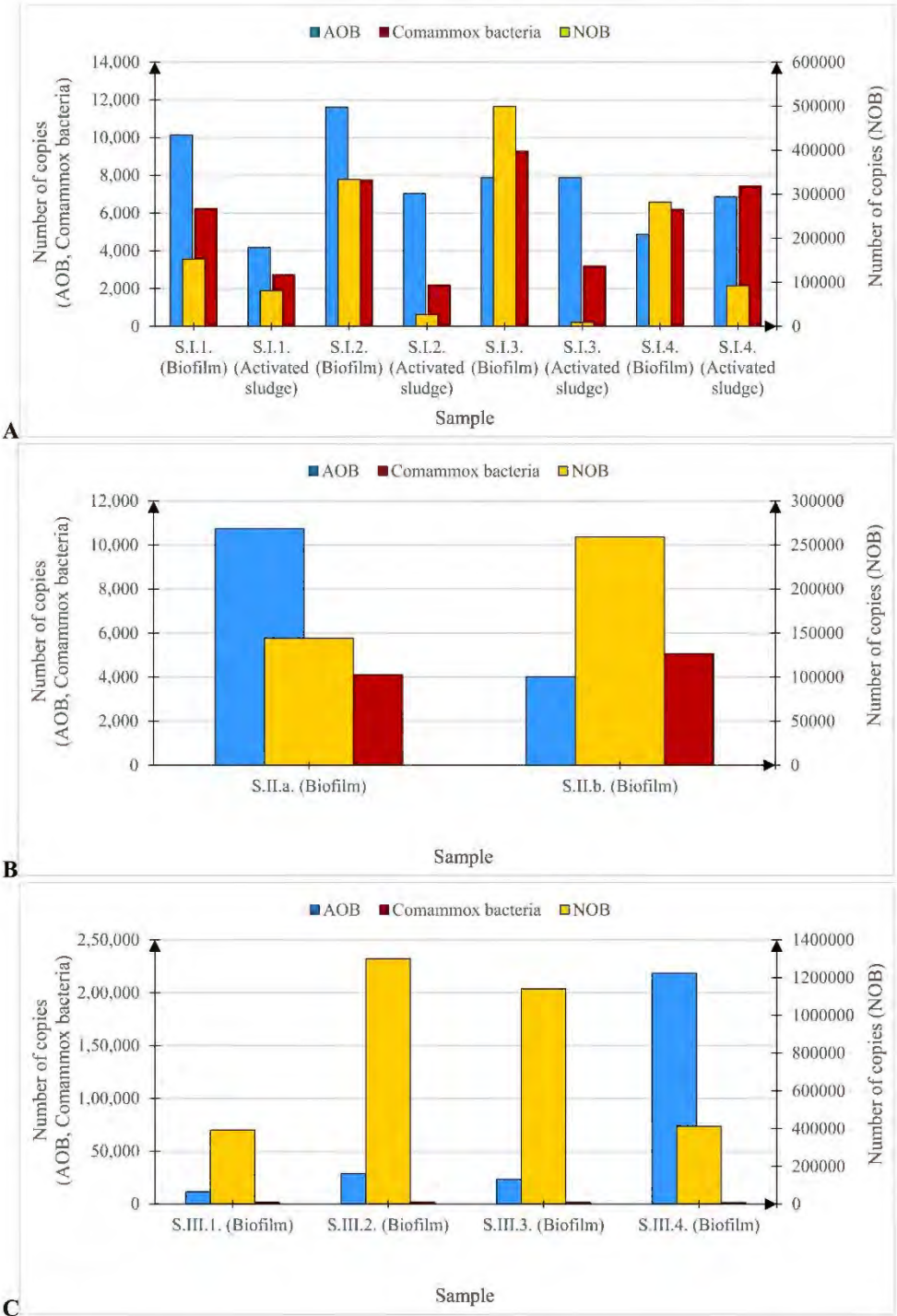


Fig. 5. Absolute quantification of the AOB, NOB and Comammox bacteria during: (A) first; (B) second; (C) third stage of the experiment.

were only detected in biofilm. They correlated this with the fact that biofilm developed on moving carriers provided oligotrophic conditions conducive to the development of Comammox bacteria, i.e. low concentrations of DO and ammonia nitrogen. Biofilm is an environment in which concentration gradients of oxygen and nutrients play an important role, because due to its stratified structure, different conditions will occur on its surface, and different ones inside it – providing an environment favourable for the development of particular microorganisms used in wastewater treatment [27]. According to some studies, Comammox bacteria inhabit deeper parts of biofilm, and therefore choose conditions with lower DO and lower ammonia concentration [28].

A change between the frequency of occurrence of Comammox bacteria in activated sludge and biofilm was observed when the system was transformed into a hybrid nitrifying reactor (S.I.4.). Relative abundance of Comammox bacteria in biofilm decreased, whereas the size of their population in activated sludge flocs increased, resulting in the abundance of these bacteria in activated sludge becoming higher than that in biofilm. This is an interesting observation, because for a hybrid reactor for integrated removal of C, N, and P compounds, irrespective of the introduced changes (reduction of duration of subphases with aeration – increase in R value, decrease in DO concentration, decrease in OLR), the Comammox bacteria population was each time greater in biofilm (earlier studies by Zajac et al. [15] and this study). To the best of our knowledge, a nitrification hybrid system in which more Comammox bacteria developed in activated sludge than in biofilm has not yet been described. Elimination of organic compounds from wastewater supplied to the reactor can be therefore considered a factor affecting the shift of Comammox bacteria from biofilm to activated sludge flocs. Presumably, this was favoured by the occurrence of heterotrophic bacteria the abundance of which considerably decreased. Heterotrophs could potentially occur in deeper layers of sludge flocs (they were therefore responsible for the occurrence of simultaneous nitrification-denitrification (SND) in aerobic conditions), and at the moment of their elimination from the system, conditions favourable for Comammox bacteria were created. As described above, lower DO and substrate conditions can benefit Comammox bacteria growth. Another explanation could be the fact that high DO concentrations did not necessarily negatively affect Comammox bacteria, and then microorganisms preferring higher DO concentrations could develop in activated sludge flocs, or through the choice of relevant metabolic paths adapted to the conditions occurring in activated sludge flocs. Some studies have shown lack of significance of the relationship between DO and the occurrence of Comammox bacteria [9,10,29]. For example, Zhao et al. [29], conducting research in a moving bed biofilm reactor (MBBR), observed selective enrichment of Comammox bacteria while the system operated at a DO concentration above 6 mgO₂/L. Another study showed high abundance of Comammox bacteria in full-scale activated sludge WWTPs (N/D, SND) with DO concentration higher than 3.5 mgO₂/L [10].

One of the topics discussed in the latest literature is the dominance of Comammox bacteria over canonical ammonia oxidisers both in full-scale WWTPs and laboratory models [7,30]. Our study also showed that under certain conditions, the abundance of Comammox bacteria in biofilm and activated sludge flocs can be higher than that of AOB.

In the case of biofilm, the frequency of occurrence of Comammox bacteria exceeds that of canonical ammonia oxidisers when OLR is lowered to 213.21 ± 9.34 gCOD/m³·d (S.I.3.), and when organic compounds supplied to the system with raw sewage are eliminated (S.I.4.). The dominance of Comammox bacteria over canonical ammonia oxidisers in the biofilm samples was also reported by some previous studies [7,31]. Huang et al. [7], conducting research in a mainstream nitrifying sponge moving bed biofilm reactors, evidenced high abundance of Comammox bacteria, and determined that under certain conditions (residual ammonium concentrations at the level of 0.01–15 mgN/L and solid retention time > 1000 days) Comammox bacteria can even dominate biofilm nitrification. While, Spasov et al. [31] demonstrated

that Comammox bacteria strongly dominate biofilm samples from rotating biological conductor.

In reference to the results for activated sludge, it was found that when the system was transformed into a hybrid nitrification reactor (S.I.4.), Comammox bacteria outnumbered canonical ammonia oxidisers. Large abundance and dominance of Comammox bacteria over AOB in activated sludge flocs was also found by Roots et al. [11] in a nitrification reactor fed with real municipal wastewater. After >400 days of research, Comammox bacteria constituted >94 % of ammonia oxidising microorganisms, and it was those microorganisms that were responsible for high efficiency of the nitrification process. It is also worth mentioning that Liu et al. [30] in SND SBR additionally evidenced that the dominance of Comammox bacteria towards AOB is favoured by intermittent aeration – although in the analysed system, COD concentration in raw wastewater was 300 mg/L. In the mainstream systems in which organic compounds flowed into with raw wastewater, the significant dominance of Comammox bacteria in relation to AOB in activated sludge samples was also demonstrated by Yang et al. [32], Wang et al. [16] and Daims et al. [7].

In the case of activated sludge, another interesting phenomenon was also observed. After the reduction of OLR from 384.17 ± 8.44 gCOD/m³·d to 213.21 ± 9.34 gCOD/m³·d, an increase in nitrite oxidation rate as noted, although the microbiological analysis indicated a significant decrease in the number of copies of NOB. In parallel, there was a significant increase in the number of Comammox bacteria. The compilation of this information allows for concluding that Comammox bacteria could be responsible for nitrite oxidation in batch tests. The genome of these microorganisms shows enzymes responsible for oxidation of both NH₄ and NO₂, also permitting oxidising nitrites to nitrates [33].

As evidenced in this study, the abundance of Comammox bacteria in different wastewater treatment systems – hybrid reactor for C, N, P removal vs. hybrid nitrification reactor, can provide the basis for the determination of an environment in which complete nitrifiers will develop more intensively. This study will undoubtedly contribute to a better understanding of these newly discovered microorganisms, and help technologists, scientists, and designers gain more comprehensive understanding of the process design parameters and the occurrence of these incredible microorganisms.

4.2. Mainstream-sidestream switching

An increase in the temperature of operation of the reactor, and therefore mainstream-sidestream switching, caused a decrease in the activity of ammonia oxidising bacteria. It was therefore expected to observe a decrease in their abundance. qPCR results showed only a decrease in the size of the population of Comammox bacteria, whereas the frequency of occurrence of AOB increased 2.20-fold. This provided the basis for the conclusion that nitrifiers able to conduct full nitrification could be to a greater degree responsible for oxidising ammonia nitrogen in the analysed system, and a decrease in the size of their population significantly contributed to a decrease in the AOR values recorded in AUR tests. This thesis is also supported by observations conducted after 14 days from an increase in temperature to 30 °C, when an increase in AOR was observed with a simultaneous decrease in the frequency of occurrence of AOB and an increase in the size of the Comammox bacteria population.

Simultaneously with a decrease in the ammonia oxidation rate, after 7 days from an increase in temperature, a decline in the activity of NOB was determined. The NitOR value was reduced 1.47 times, and qPCR tests showed that the frequency of occurrence of NOB decreased almost 2 times. After 14 days of the system operation at 30 °C, no considerable changes were observed in NitOR values, although the frequency of occurrence of NOB increased. PCR primers applied for the determination of the frequency of NOB also detect Comammox bacteria. The population of the latter increased, and the recorded increase could have been caused by the occurrence of these microorganisms.

4.3. Effect of an increase in ammonia nitrogen loading rate on nitrification in sidestream reactor

After the introduction of continuous aeration at stage III, despite an almost 2.90-fold increase in the frequency of occurrence of AOB, no increase in the ammonia oxidation rate was recorded. It was also observed, however, that the change in aeration strategy caused a 3-fold decrease in the frequency of occurrence of Comammox bacteria, which could have substantially contributed to the lack of changes in the ammonia oxidation rate. The size of the population of Comammox bacteria remained small until the end of the experiment. Pursuant to literature reports, Comammox bacteria prefer an environment with lower DO concentrations. [11,30]. Despite the lack of changes in DO set-point, due to the introduction of continuous aeration, the biomass developing in the reactor was no longer subject to periodical decreases in DO concentration, which could have contributed to a decrease in the abundance of these microorganisms in the system. Similar conclusions were drawn by Liu et al. [36], who compared two SBR systems operating with different aeration systems, intermittently aerated SBR1 and continuously aerated SBR2, and evidenced significantly lower abundance of Comammox bacteria in the reactor with continuous aeration. On the other hand, according to Cotto et al. [9], there is no relationship between oxygen concentrations and the occurrence of Comammox bacteria. Zhao et al. [29] evidenced they are able to develop even at high DO concentrations ($6 \text{ mgO}_2/\text{L}$). In addition to the oxygen levels, the rising amount of ammonia nitrogen might have had an impact on Comammox low abundance. Cotto et al. [9] found that Comammox bacteria were not prevalent in sidestream PNA (partial nitrification-anammox) systems, including single-stage systems that incorporate attached growth and suspended phase. They associated this with the high ambient ammonia concentrations in PNA systems.

An increase in the concentration of ammonia nitrogen in wastewater supplied to the system in subsequent series of stage III had a stronger effect on the activity of nitrite oxidising bacteria. The activity of ammonia oxidising bacteria only changed after an increase in NLR from $76.76 \pm 1.87 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.1.) to $108.43 \pm 3.09 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.2.). Parallel to an increase in the AOR value, an increase in the AOB and Comammox bacteria population was recorded. Results of qPCR tests showed that in the last series of the experiment (S.III.4.), the frequency of occurrence of AOB rapidly raised. No simultaneous changes in the ammonia oxidation rate were observed, however, suggesting low activity of the developing nitrifiers. Different conclusions were reached in research by Bassin et al. [34], comparing the effect of an increase in the SBR reactor's loading of ammonium nitrogen. The cited authors evidenced that with an increase in the amount of ammonium nitrogen supplied to the system with raw wastewater, the specific nitrification rate decreased. The observed differences may result from differences in concentrations of ammonium nitrogen in wastewater supplied to the reactors: in this study $67\text{--}165 \text{ mg/L}$, in the study by Bassin et al. [34] $150\text{--}1300 \text{ mg/L}$.

As mentioned earlier, an increase in the concentration of ammonia nitrogen in wastewater supplied to the system had a greater impact on the activity of microorganisms capable of nitrite nitrogen oxidation. During Series III, a gradual increase in the NitOR was observed in response to the rise in the ammonia levels in the influent. The most significant difference in the analysed values was noted after an increase in NLR from $76.76 \pm 1.87 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.1.) to $108.43 \pm 3.09 \text{ gN/m}^3\cdot\text{d}$ (S.III.2.), when the NitOR boosted by 1.90 times. qPCR results showed then a substantial, over 3.3-fold growth in the frequency of occurrence of NOB, corresponding to the results of the NitUR test. However, in subsequent series, despite the increase in the activity of nitrite oxidisers, their abundance decreased, suggesting that the remaining in the system NOB were much more active than in the previous series. It is also important to note, that 2.76-fold drop in the abundance of NOB between S.III.3. and S.III.4., can serve as an explanation for the observed accumulation of N-NO_2^- in the effluent from the reactor in S.III.4. It is

interesting due to the fact that DNA sequencing revealed a high abundance of AOB bacteria (*Nitrosomonas*) and NOB bacteria (*Nitrospira*) at that time. Despite the increased activity of nitrite oxidising bacteria, the conditions prevailing then in the system must have been a factor inhibiting their further development.

5. Conclusion

The obtained results suggest that Comammox bacteria could play an important role in the nitrification in both the mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal and in the nitrification sidestream biofilm reactor, dominating even the canonical AOB. Biofilm provided a better environment for Comammox bacteria grow, except when the system was transformed into a hybrid nitrifying reactor. In that case, the phenomenon of higher occurrence of Comammox bacteria in activated sludge was detected. Ammonia oxidation rate increased in activated sludge and biofilm as the reactor's organic loading rate decreased. An increase in the reactor's nitrogen loading rate had a stronger effect on the activity of NOB.

CRedit authorship contribution statement

Olga Zajac: Writing – original draft (1.; 2.1.; 2.2.; 2.3.; 2.4.; 2.6.; 2.7.; 3.1.; 3.2.; 3.3.; 4.; 5.), Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Monika Zubrowska-Sudol:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Conceptualization. **Martyna Godzieba:** Writing – original draft (2.5.; 3.4.), Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Slawomir Ciesielski:** Writing – review & editing, Methodology.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was supported by the Polish National Science Center under the project no. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>.

References

- [1] S. Winogradsky, Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification vol 1, 1892, pp. 88–137. Arch. Sci. Biol., St. Petersburg.
- [2] Y. Li, K. Ding, X. Wen, B. Zhang, R. Shen, Y. Yang, A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: its characteristics, physiological and genomic characteristics, Sci. Rep. 6 (2016) 23747, <https://doi.org/10.1038/srep23747>.
- [3] H. Daims, S. Lücker, M. Wagner, A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria, Trends Microbiol. 24 (9) (2016) 699–712, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>.
- [4] C. Gruber-Dorninger, M. Pester, J. Kitzinger, D. Savio, A. Loy, T. Rattai, M. Wagner, H. Daims, Functionally relevant diversity of closely related nitrospira in activated sludge, ISME J. 9 (2015) 643–655, <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.156>.
- [5] H. Daims, F.V. Lebedeva, P. Pjevac, P. Han, C. Herbold, M. Albertsen, N. Jehmlich, M. Palatinszky, J. Vierheilig, A. Bulaev, R.H. Kirkegaard, M. von Bergen, T. Rattai, B. Bending, P.H. Nielsen, M. Wagner, Complete nitrification by Nitrospira

- bacteria, *Nature* 528 (7583) (2015) 504–509, <https://doi.org/10.1038/nature16461>.
- [6] M.K. Annavajhala, V. Kapoor, J. Santo-Domingo, K. Chandran, Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5 (2) (2018) 110–116, <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00577>.
 - [7] T. Huang, J. Xia, T. Liu, Z. Su, Y. Guan, J. Guo, C. Wang, M. Zheng, Comammox Nitrospira bacteria are dominant ammonia oxidizers in mainstream nitrification bioreactors emended with sponge carriers, *Environ. Sci. Technol.* 56 (17) (2022) 12584–12591, <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03641>.
 - [8] M.J. Mehrani, D. Sobotka, P. Kowal, S. Ciesielski, J. Makinia, The occurrence and role of Nitrospira in nitrogen removal systems, *Bioresour. Technol.* 303 (2020), 122936, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122936>.
 - [9] I. Cotto, Z. Dai, L. Hno, C.L. Anderson, K.J. Vilardi, U. Ijaz, W. Khunjar, C. Wilson, H. De Clippeleir, K. Gilmore, E. Bailey, A.J. Pinto, Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of comammox bacteria in nitrogen removal systems, *Water Res.* 169 (2020), 115268, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115268>.
 - [10] M. Wang, G. Huang, Z. Zhao, C. Dang, W. Liu, M. Zheng, Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants, *Bioresour. Technol.* 270 (2018) 580–587, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.089>.
 - [11] P. Roots, Y. Wang, A.F. Rosenthal, J.S. Griffin, F. Sabba, M. Petrovich, F. Yang, J. A. Kozak, H. Zhang, G.F. Wells, Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor, *Water Res.* 157 (2019) 396–405, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.060>.
 - [12] N.K. Singh, M. Yadav, R.P. Singh, A.A. Kazmi, Efficacy analysis of a field scale IFAS reactor under different aeration strategies applied at high aeration rates: a statistical comparative analysis for practical feasibility, *J. Water Process Eng.* 27 (2019) 185–192, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.12.001>.
 - [13] N.P. Wu, Q. Zhang, B. Tan, M. Li, B. Lin, J. He, J. Su, H.N. Shen, Integrated fixed-film activated sludge systems in continuous-flow and batch mode acclimated from low to high aniline concentrations: performance, mechanism and metabolic pathways, *Bioresour. Technol.* 279 (2023), 129043, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129043>.
 - [14] M.J. Mehrani, M. Azari, B. Teichgraber, P. Jagemann, J. Schoth, M. Denecke, J. Makinia, Performance evaluation and model-based optimization of the mainstream deammonification in an integrated fixed-film activated sludge reactor, *Bioresour. Technol.* 351 (2022), 126942, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126942>.
 - [15] O. Zajac, M. Zubrowska-Sudol, S. Ciesielski, M. Godzieba, Effect of the aeration strategy on NOB suppression in activated sludge and biofilm in a hybrid reactor with nitrification/denitrification, *Water* 14 (1) (2022) 72, <https://doi.org/10.3390/w14010072>.
 - [16] O. Zajac, M. Zubrowska-Sudol, Nitrification kinetics, N₂O emission, and energy use in intermittently aerated hybrid reactor under different organic loading rates, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 20 (9) (2023) 10061–10074, <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04715-6>.
 - [17] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F.O. Glöckner, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Res.* 41 (1) (2013), e1, <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
 - [18] E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon, et al., Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nat. Biotechnol.* 37 (8) (2019) 852–857, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
 - [19] M. Martin, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, *EMBnet J.* 17 (1) (2011) 10–12, <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
 - [20] R.C. Edgar, Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics* 26 (19) (2010) 2460–2461, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.
 - [21] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glöckner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res.* 41 (D1) D590–D596, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
 - [22] American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22 ed., APHA, Washington, DC, USA, 2012.
 - [23] A.C. Anthonisen, R.C. Loehr, T.B.S. Prakasani, E.G. Srinath, Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *J. Water Pollut. Control. Fed.* 48 (5) (1976) 835–852.
 - [24] J. Podedworna, M. Znbrowska-Sudol, Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase, *Environ. Technol.* 33 (2) (2012) 237–245, <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.563428>, 2012.
 - [25] H. Koch, M.A.H.J. van Kessel, S. Lückner, Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox Nitrospira, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 177–189, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>.
 - [26] Y. Tsuchiya, T. Nakagawa, R. Takahashi, Quantification and phylogenetic analysis of ammonia oxidizers on biofilm carriers in a full-scale wastewater treatment plant, *Microbes. Environ.* 35 (2) (2020), <https://doi.org/10.1264/jsm2.ME19140>.
 - [27] C.E. Lawson, S. Lückner, Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Curr. Opin. Biotechnol.* 50 (2018) 158–165, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.015>.
 - [28] C. Suarez, M. Piculell, O. Modin, S. Langenheder, F. Persson, M. Hermansson, Thickness determines microbial community structure and function in nitrifying biofilms via deterministic assembly, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5110, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41542-1>.
 - [29] J. Zhao, M. Zheng, Z. Su, T. Liu, J. Li, J. Guo, Z. Yuan, S. Hu, Selective enrichment of comammox Nitrospira in a moving bed biofilm reactor with sufficient oxygen supply, *Environ. Sci. Technol.* 56 (18) (2022) 13338–13346, <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03299>.
 - [30] T. Liu, S. Liu, S. He, Z. Tian, M. Zheng, Minimization of N₂O emission through intermittent aeration in a sequencing batch reactor (SBR): main behavior and mechanism, *Water* 13 (2) (2021) 210, <https://doi.org/10.3390/w13020210>.
 - [31] E. Spasov, J.M. Tsuji, L.A. Hug, A.C. Doxey, L.A. Sauder, W.J. Parker, J.D. Neufeld, High functional diversity among Nitrospira populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant, *ISME J.* 14 (2020) 1857–1872, <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0650-2>.
 - [32] Y. Yang, J. Pan, Z. Zhou, J. Wu, Y. Liu, J.G. Lin, Y. Hong, X. Li, M. Li, J.D. Gu, Complex microbial nitrogen-cycling networks in three distinct anammox-inoculated wastewater treatment systems, *Water Res.* 168, 115142, doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115142>.
 - [33] M.J. Mehrani, P. Kowal, D. Sobotka, M. Godzieba, S. Ciesielski, J. Guo, J. Makinia, The coexistence and competition of canonical and comammox nitrite oxidizing bacteria in a nitrifying activated sludge system - experimental observations and simulation studies, *Sci. Total Environ.* 864 (2023), 161084, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161084>.
 - [34] J.P. Bassin, R. Kleerebezem, A.S. Rosado, M.C. van Loosdrecht, M. Dezotti, Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors, *Environ. Sci. Technol.* 46 (3) (2012) 1546–1555, <https://doi.org/10.1021/es203356z>.

Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor

Olga Zajac^{a,*}, Monika Zubrowska-Sudol^a, Martyna Godzieba^b and Slawomir Ciesielski^b

^a Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland;

^b Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland;

* Corresponding author: olga.zajac.dokt@pw.edu.pl;

1) Reactor description

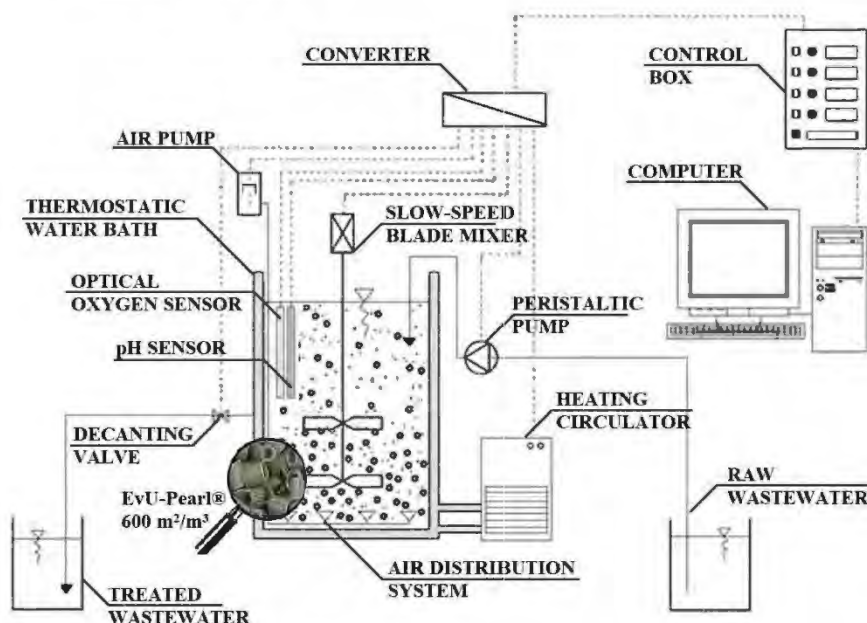


Figure S1 Schematic of reactor with accessories

The laboratory scale sequencing batch reactor (SBR) was made of plexiglass. The volume of the reactor was mixed by means of a slow-speed blade mixer R-50D by CAT. The aeration system was made of aquarium air filters installed on the bottom of the container and a blower. DO, pH, and temperature in SBR were continuously measured and recorded. In the reactor, temperature assumed at a given stage was maintained with the application of a thermostatic

water bath (F32-ME Refrigerated/Heating Circulator, JULABO GmbH). The pH was controlled using digital non-glass pH sensor CPS471D (Hach Lange, Germany). The DO concentration in the aerated phases and temperature were controlled using Memosens Optical Oxygen Sensor COS81D (Hach, Germany).

An important element of the research stand was the automatic control system cooperating with the oxygen probe and pH sensor, responsible for the maintenance of the assumed DO concentration level and conducting the remaining technological operations through switching on the pump dosing raw wastewater (peristaltic pump Masterflex (USA)) as well as the mixer and decanting valve.

2) Composition and characteristics of raw synthetic wastewater

Table S1 Compounds of the synthetic wastewater.

Synthetic wastewater		Trace solution	
Compound	Concentration, mg/L	Compound	Concentration, g/L
Peptone	0-135*	EDTA	15.0
Starch	0-45*	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.43
Glucose	0-45*	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.24
Glycerine	0-0.045* ml/L	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.99
Ammonium acetate	0-225*	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
NaHCO ₃	125-750*	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.22
NH ₄ Cl	0-153*	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.20
NH ₄ HCO ₃	0-790*	NaSeO ₄ ·10H ₂ O	0.20
CaCl ₂	1.41	H ₃ BO ₃	0.014
KH ₂ PO ₄	50.0	NaWO ₄ ·2H ₂ O	0.05
MgSO ₄	60		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10		
EDTA	60		
Trace solution	1.0 ml/L		

* the amount was changed in particular series to obtain the assumed levels of the organic loading rate (OLR) and nitrogen loading rate (NRL)

3) Primer sequences used for the detection of AOB, NOB and Comammox bacteria

Table S2 Primer sequences used for the detection of AOB, NOB and Comammox bacteria

	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
AOB	A189	GGHGACTGGGAYTTCTGG	[1]
	amoA2R	CCTCKGSAAAGCCTTCTTC	[2]
NOB	NSR1113F	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	[3]
	NSR1264R	GTTTGCAGCGCTTTGTAC CG	[3]
Comammox bacteria	NTSP-amoA 162F	GGATTCTGGNTSGATTGGA	[4]
	NTSP-amoA 359R	WAGTTNGACCACCASTACCA	[4]

4) Standard curve preparation

Standard curve preparation (Fig S2): AOB, NOB, and Comammox bacteria genes were amplified with the aforementioned primers. The amplification products were ligated into pTZ57R/T vector and transformed into competent *E. coli* cells using an InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Transformed *E. coli* were seed on an LB plate, supplemented with ampicillin, X-Gal and IPTG. The plates were incubated overnight at 37°C. Several white colonies were picked from each plate, transferred to liquid LB medium with ampicillin, and incubated overnight at 37°C. The combined plasmids were extracted using a Plasmid mini kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), and sequenced to confirm the presence of the correct DNA insert. Standard curves for every primer pair were constructed using ten-fold serial dilutions of the recombinant plasmids that were used as standard templates for qPCR amplifications.

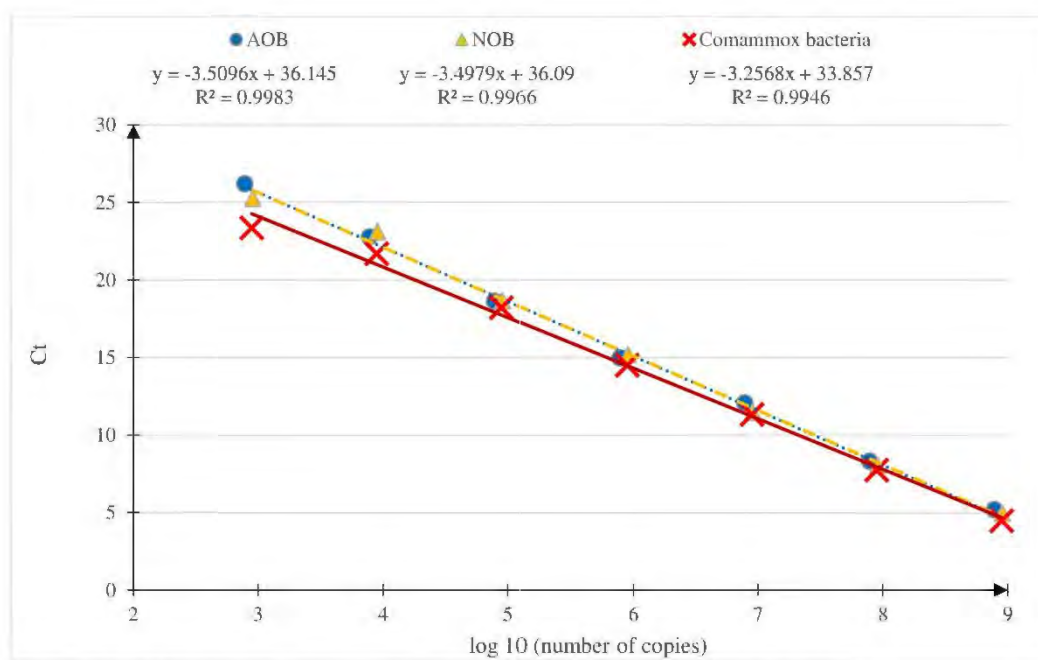


Figure S2 qPCR standard curves for AOB, NOB and Comammox bacteria.

5) Results of influent and effluent analysis and efficiencies of nitrification, denitrification and organic compounds and phosphorus removal

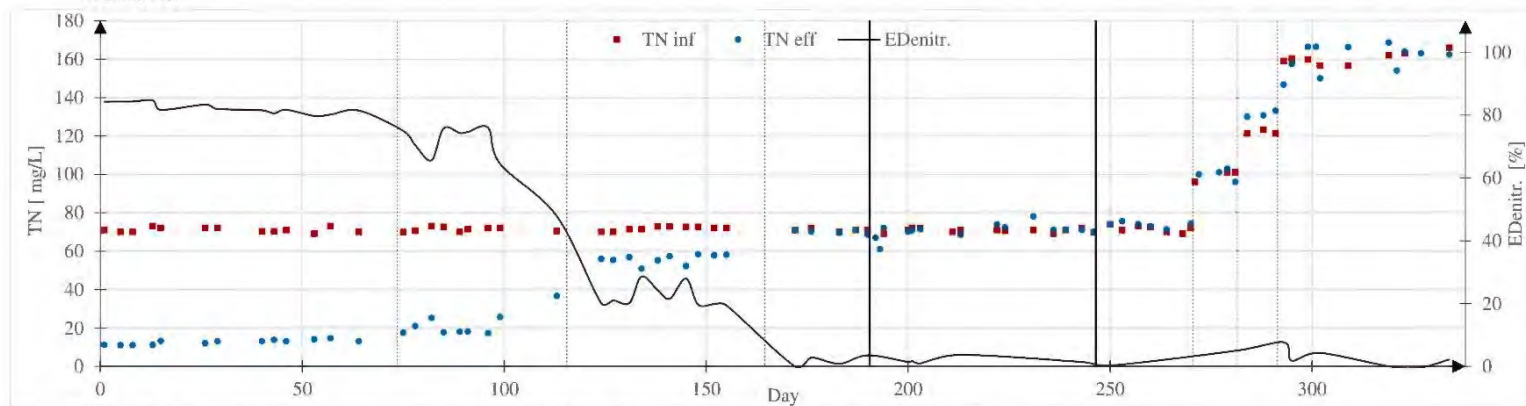


Figure S3 Influent and effluent concentrations of TN and denitrification process efficiency ($E_{\text{Denitr.}}$)*.

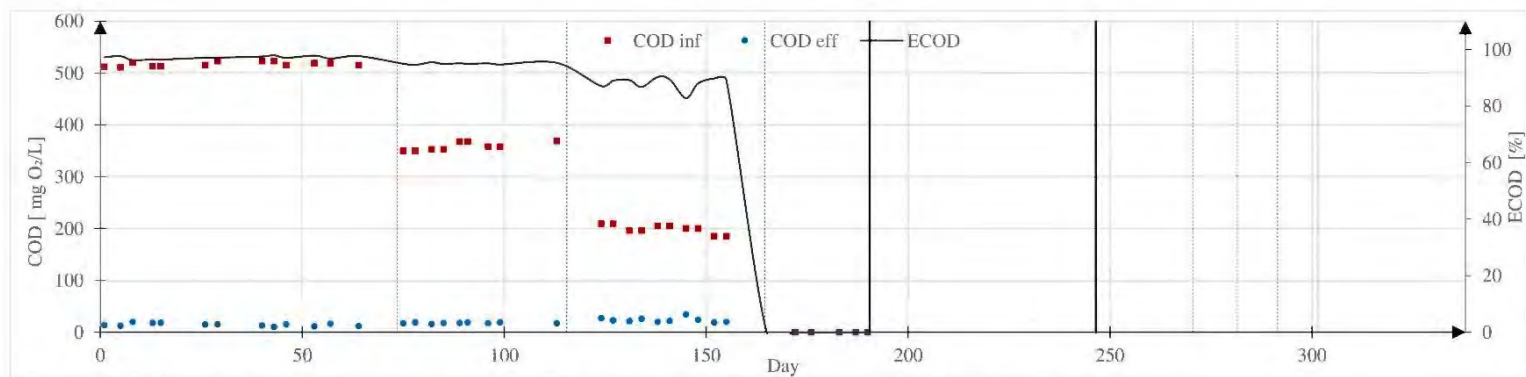


Figure S4 Influent and effluent concentrations COD and organic compounds removal efficiency (E_{COD})*.

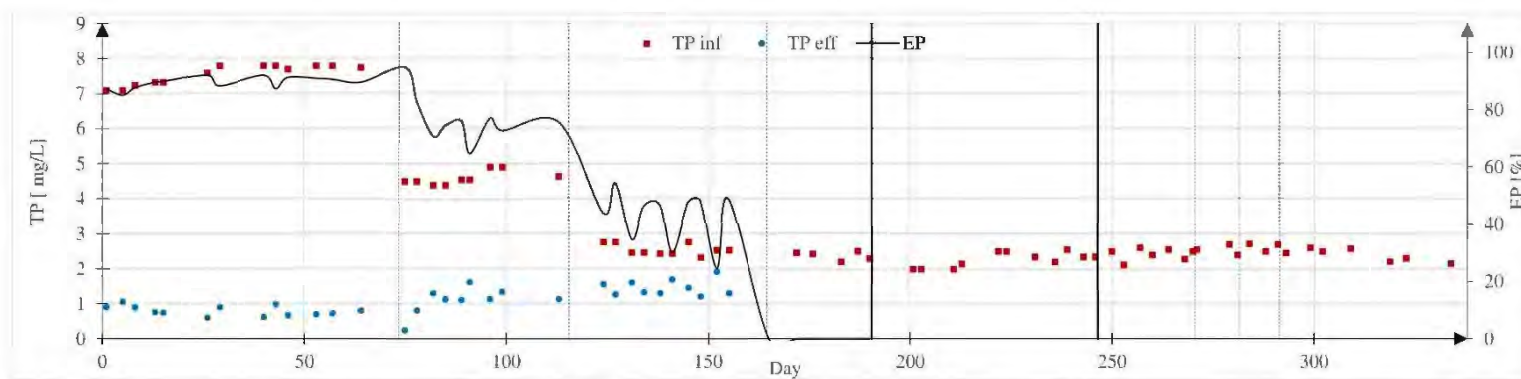


Figure S5 Influent and effluent concentrations TP and phosphorus compounds removal efficiency (E_p)*.

*Calculated in accordance with the methodology provided by Podedworna et al. [5]

6) Alpha diversity of biofilm and activated sludge

Table S3 Alpha diversity of biofilm and activated sludge samples.

Sample name	OTUs	CHAO	Shannon
S.0. (activated sludge)	254	607.91	4.44
S.0. (biofilm)	380	933.00	5.30
S.I.4. (activated sludge)	225	550.11	4.31
S.I.4. (biofilm)	334	713.25	5.06
S.III.4. (biofilm)	203	320.50	4.32

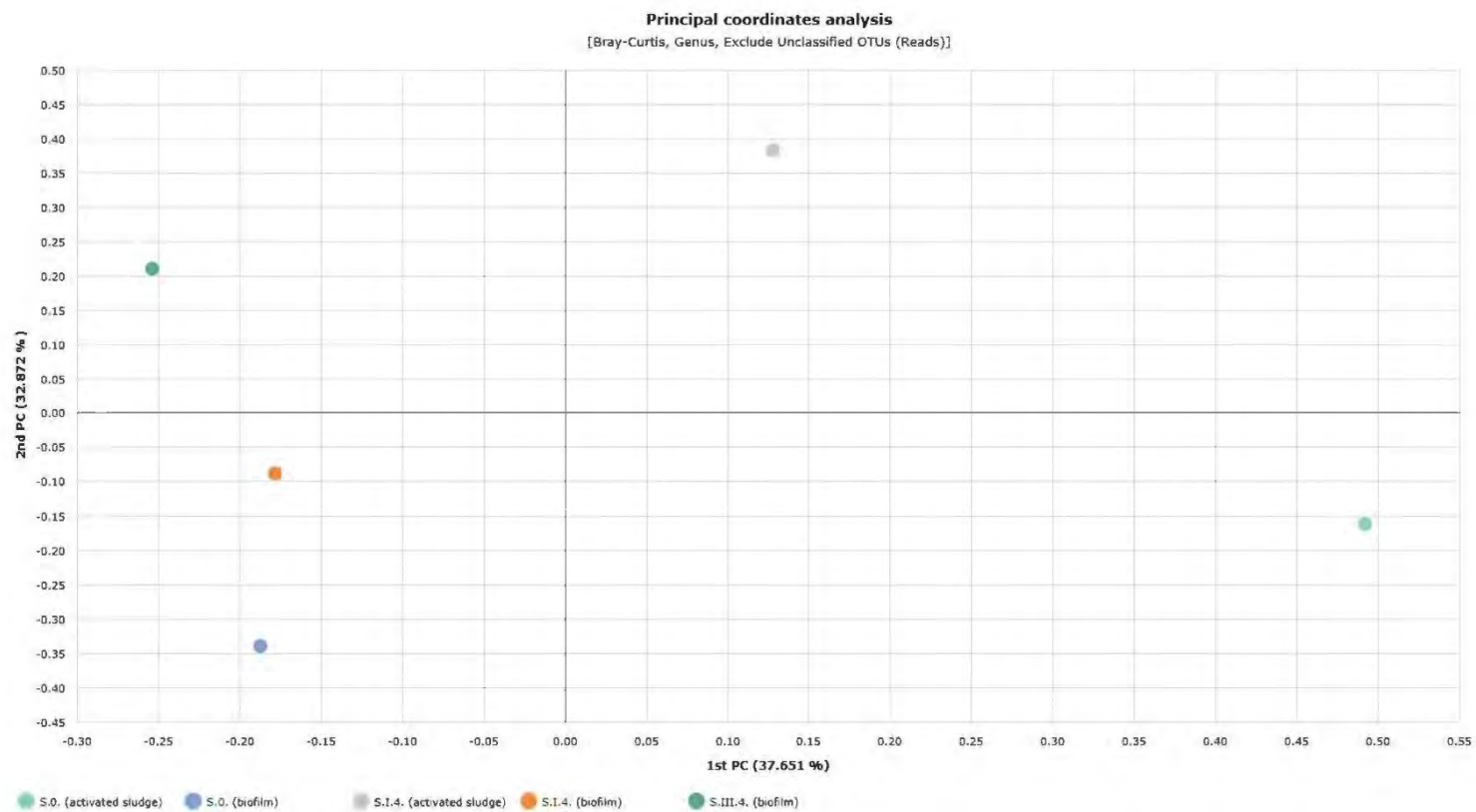


Figure S6 Principal Coordinates Analysis plot of biofilm and activated sludge samples

7) Relative abundance (%) of the most prevalent phyla and genera and nitrifying guilds

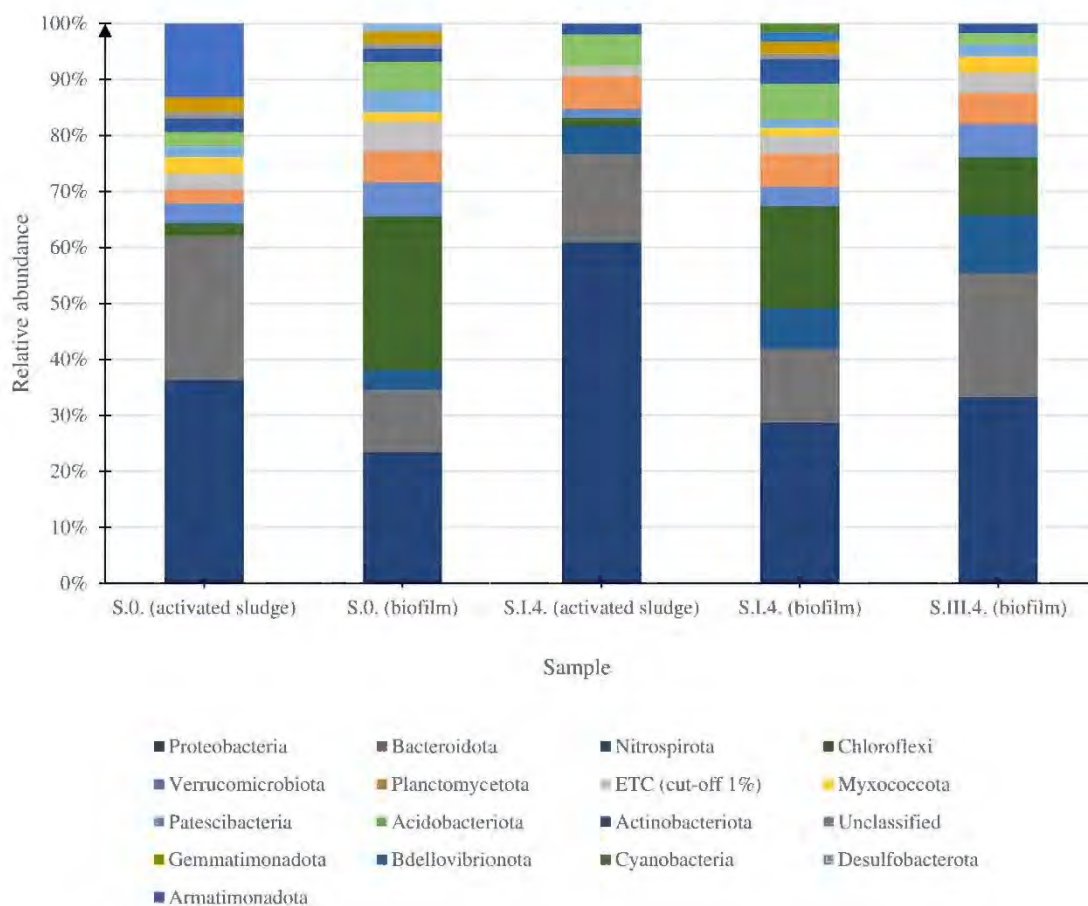


Figure S7 Relative abundance (%) of the most prevalent phyla in the biofilm and activated sludge samples. The graph shows only taxa which contributed more than 1.0% to the total bacterial community. The abundance of the remaining taxa was summed and labelled as "ETC".

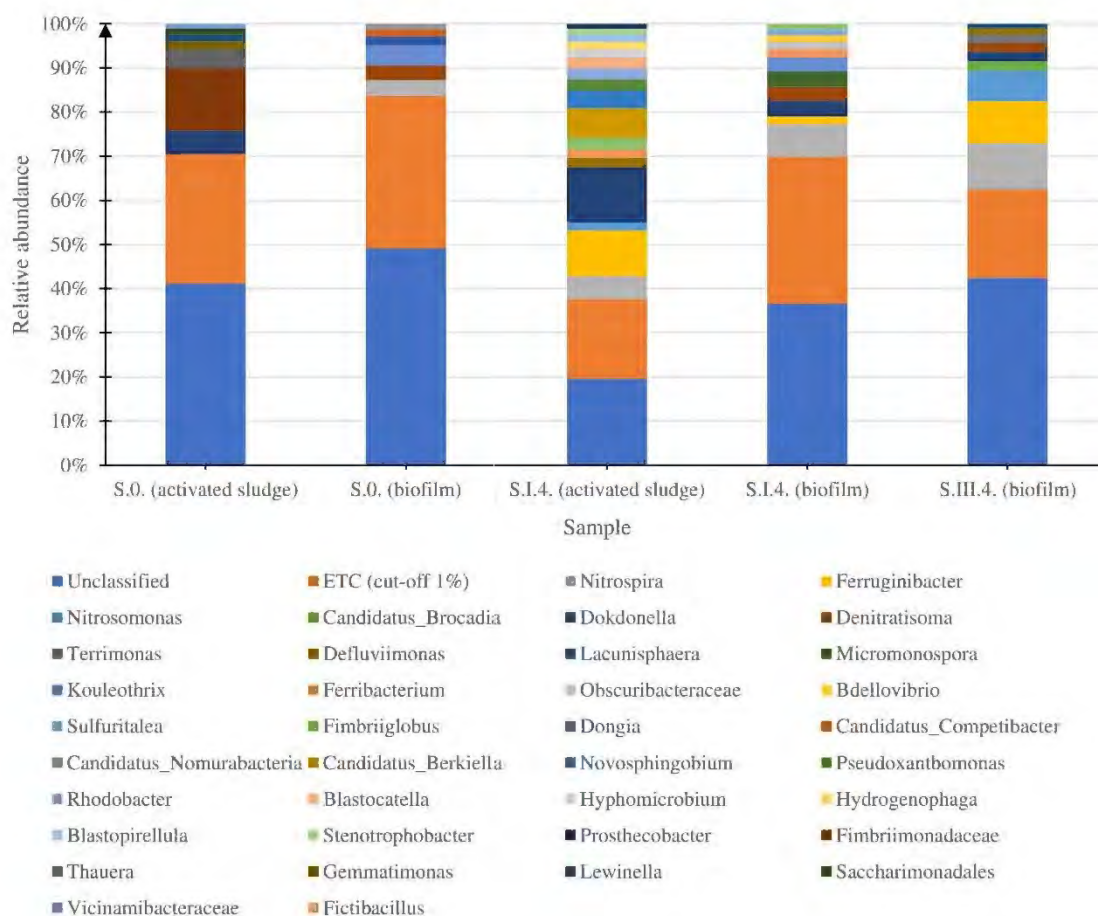


Figure S8 Relative abundance (%) of the most prevalent genera in the biofilm and activated sludge samples. The graph shows only taxa which contributed more than 1.0% to the total bacterial community. The abundance of the remaining taxa was summed and labelled as "ETC".

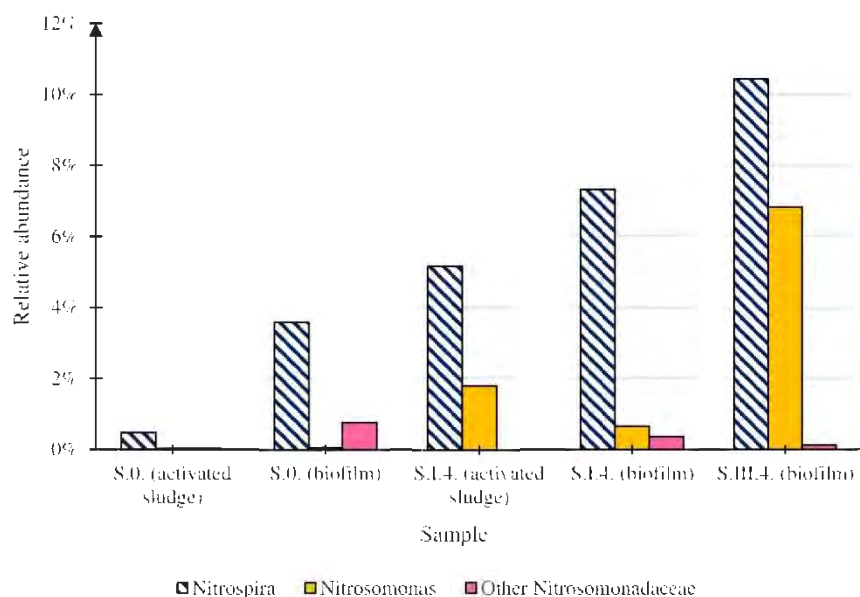


Figure S9 Relative abundance of the nitrifying guilds.

Supplementary Material References:

- [1] A.J. Holmes, A. Costello, M.E. Lidstrom, J.C. Murrell, Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related, *FEMS Microbiol. Lett.* 132 (3) (1995) 203–208, [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00311-r](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00311-r).
- [2] J.H. Rotthauwe, K.P. Witzel, W. Liesack, The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (12) (1997) 4704–4712, <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>.
- [3] H.M. Dionisi, A.C. Layton, G. Harms, I.R. Gregory, K.G. Robinson, G.S. Sayler, Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (1), (2002) 245–253, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.245-253.2002>.
- [4] S.J. Fowler, A. Palomo, A. Dechesne, P.D. Mines, B.F. Smets, Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities, *Environ. Microbiol.* 20 (3) (2018) 1002–1015, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14033>.
- [5] J. Podedworna, M. Zubrowska-Sudoł, M., 2012. Nitrogen and phosphorus removal in a denitrifying phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with a forced anoxic phase, *Environ. Technol.* 33 (2) (2012) 237–245, <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.563428>.

8) Results of particular Ammonia Utilisation Rate (AUR) and Nitrite Utilisation Rate (NitUR) tests

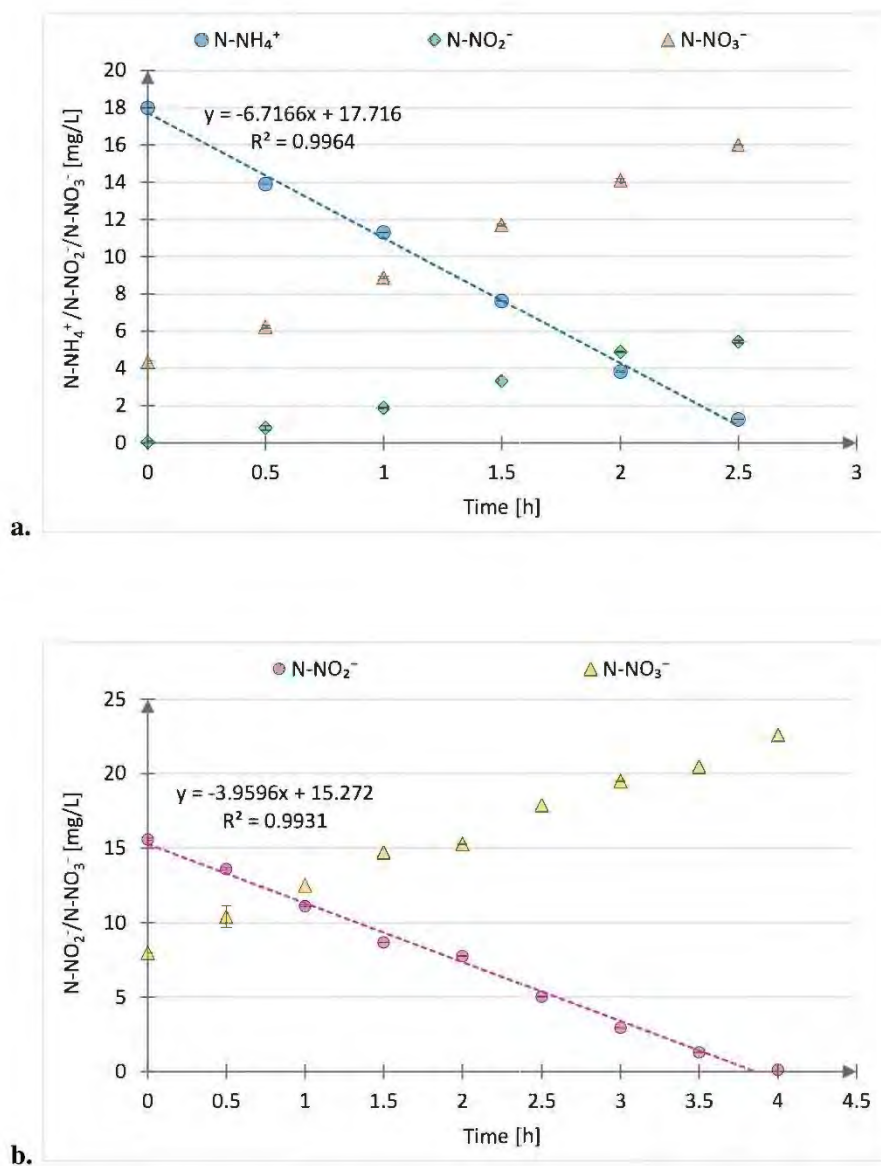


Fig S10 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.1. for activated sludge

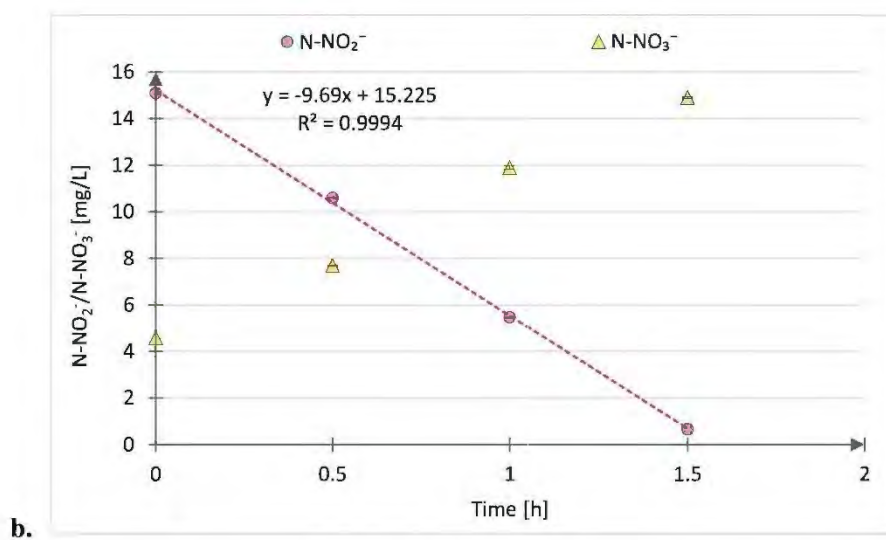
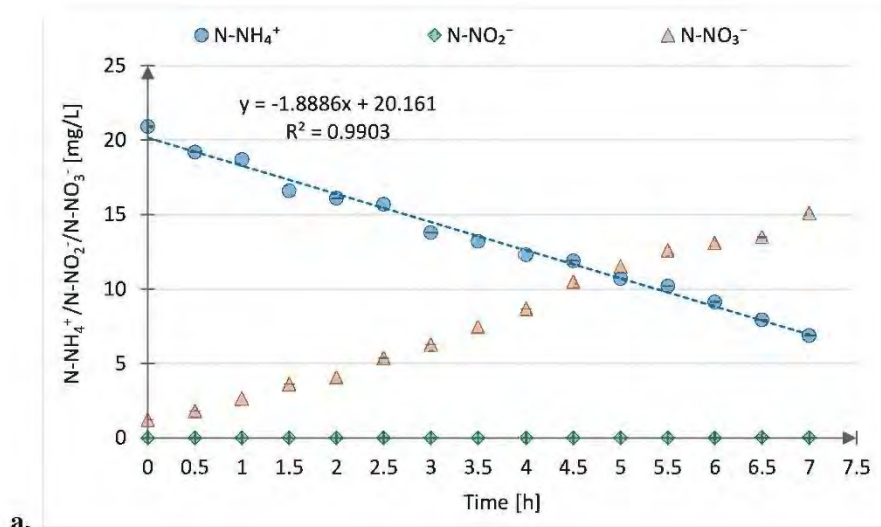


Fig S11 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.1. for biofilm

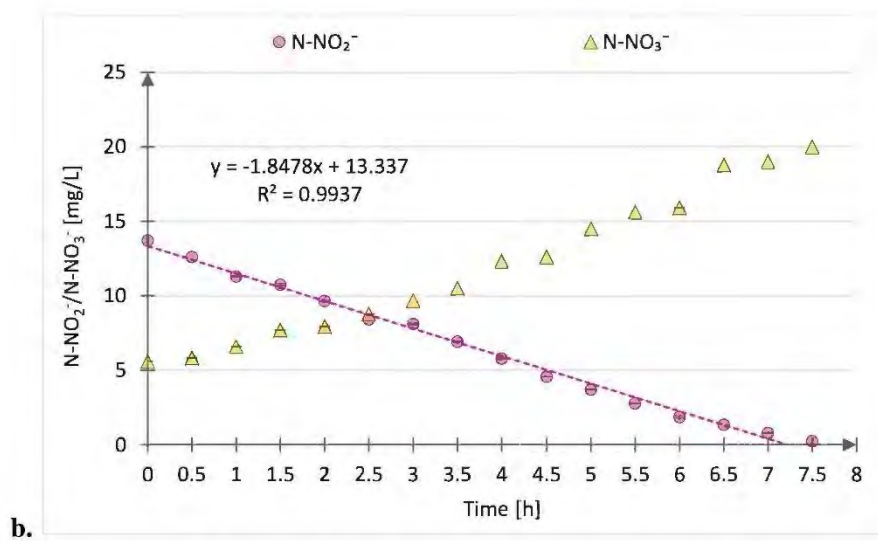
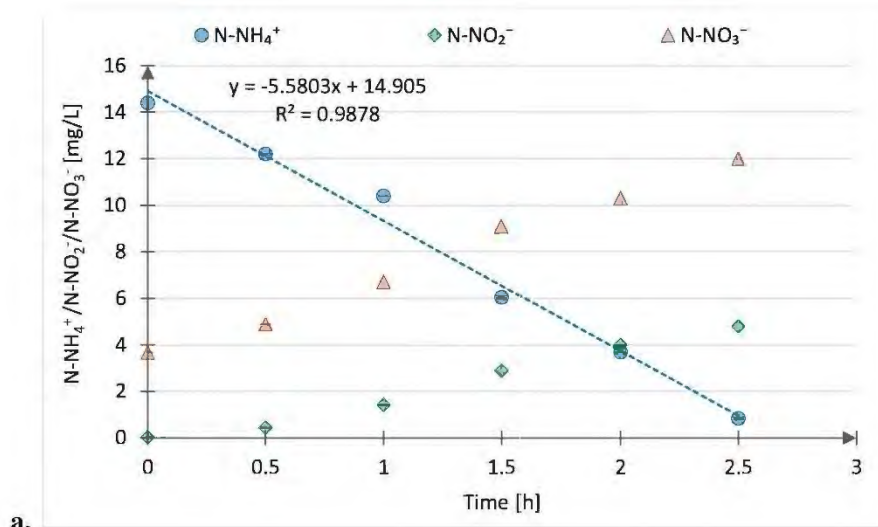


Fig S12 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.2. for activated sludge

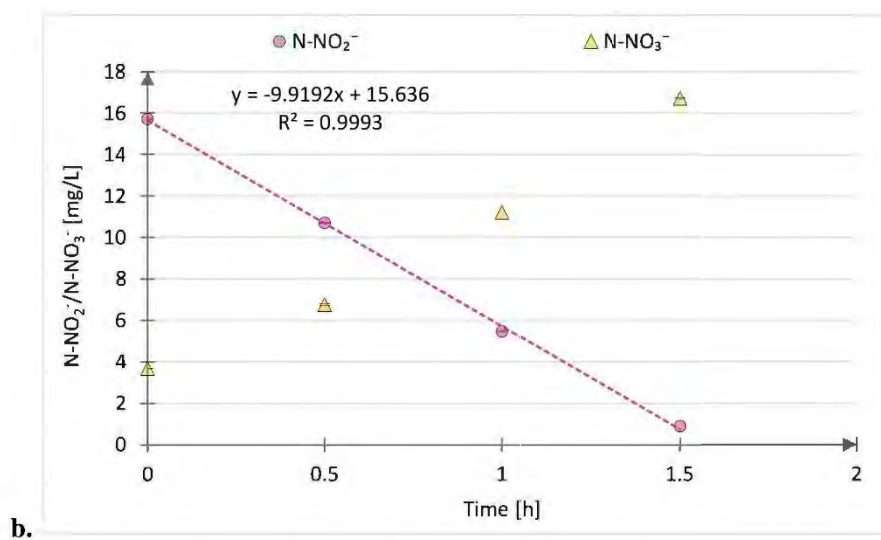
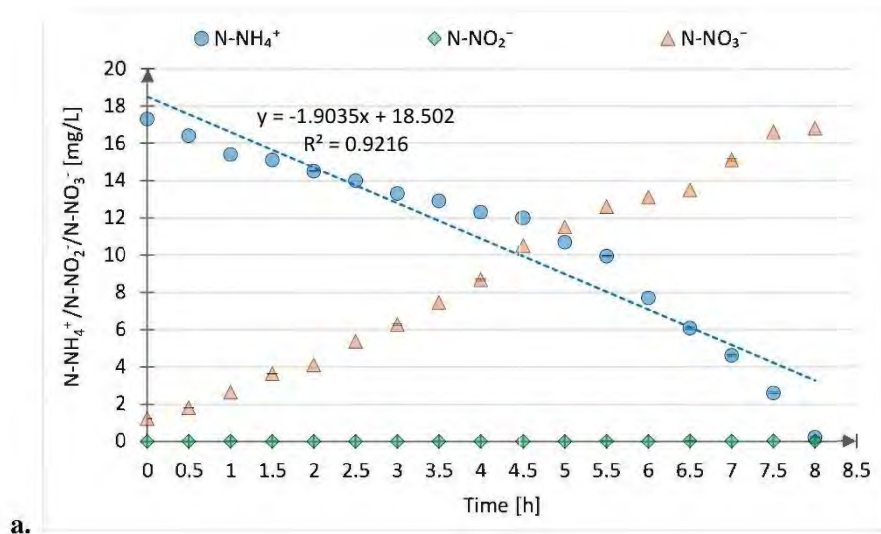


Fig S13 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.2. for biofilm

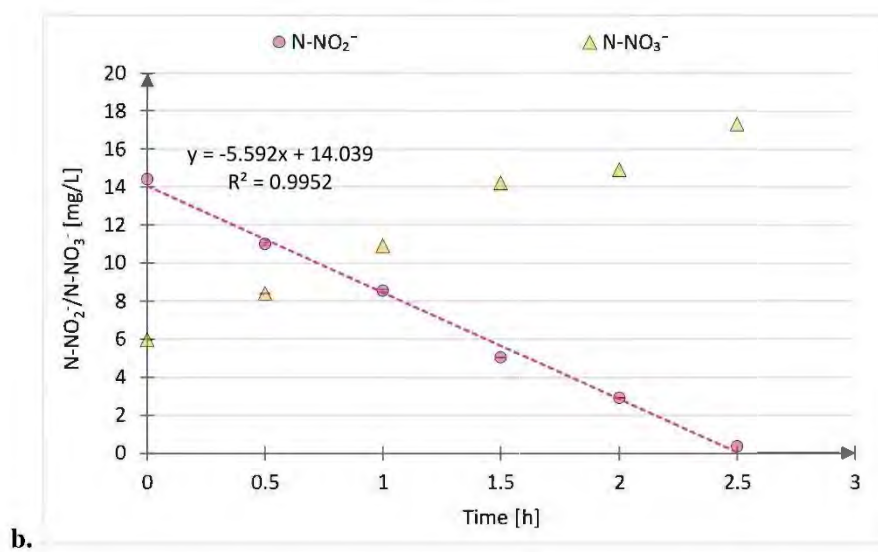
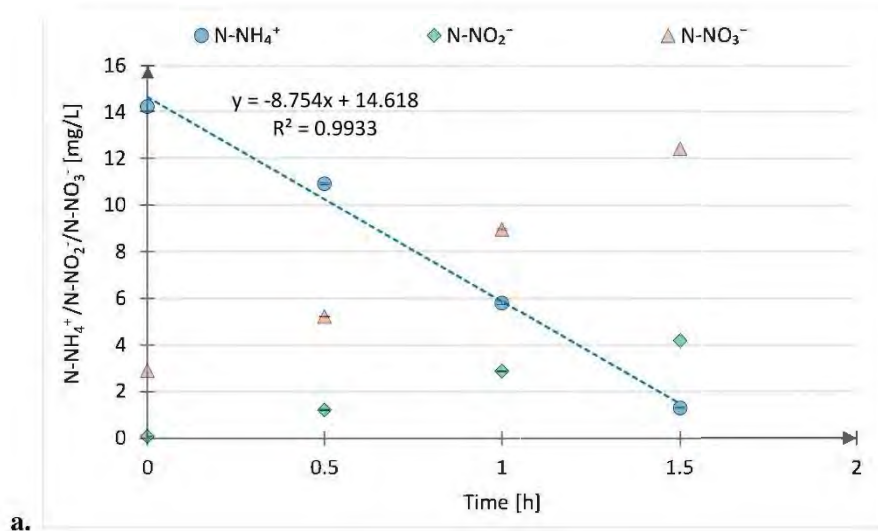


Fig S14 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.3. for activated sludge

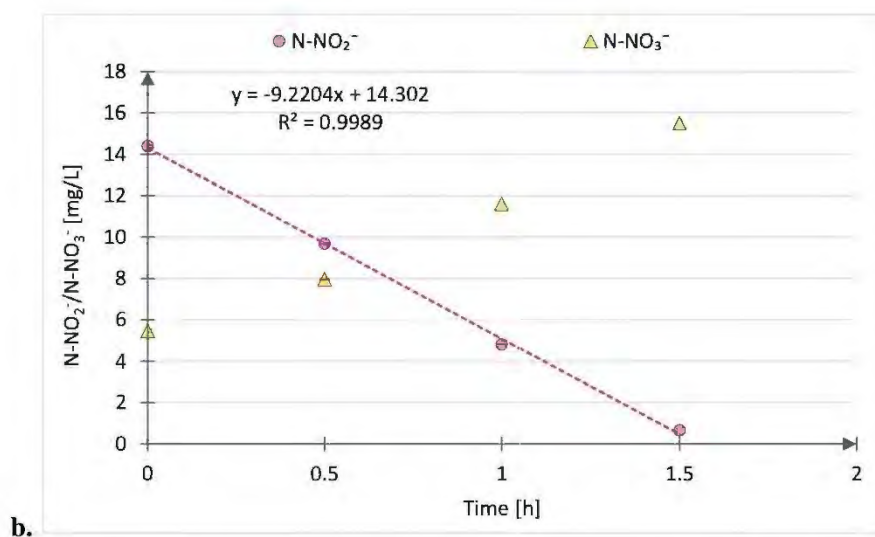
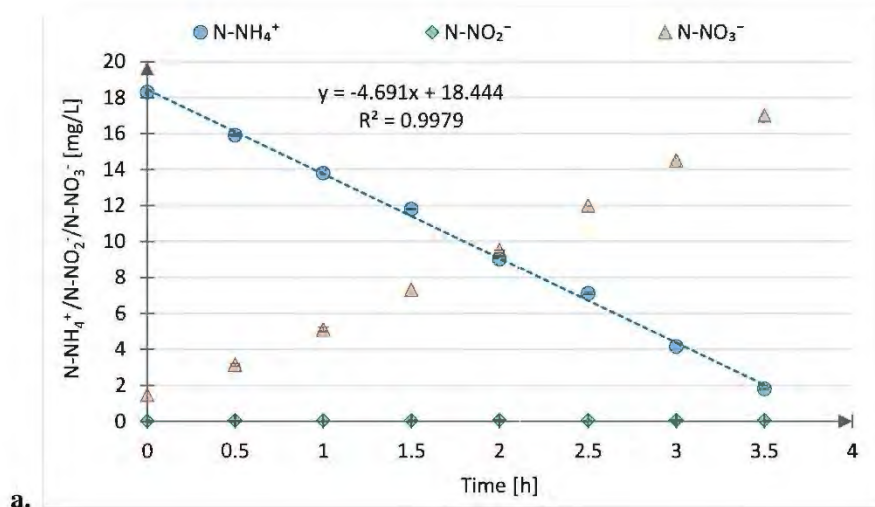


Fig S15 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.3. for biofilm

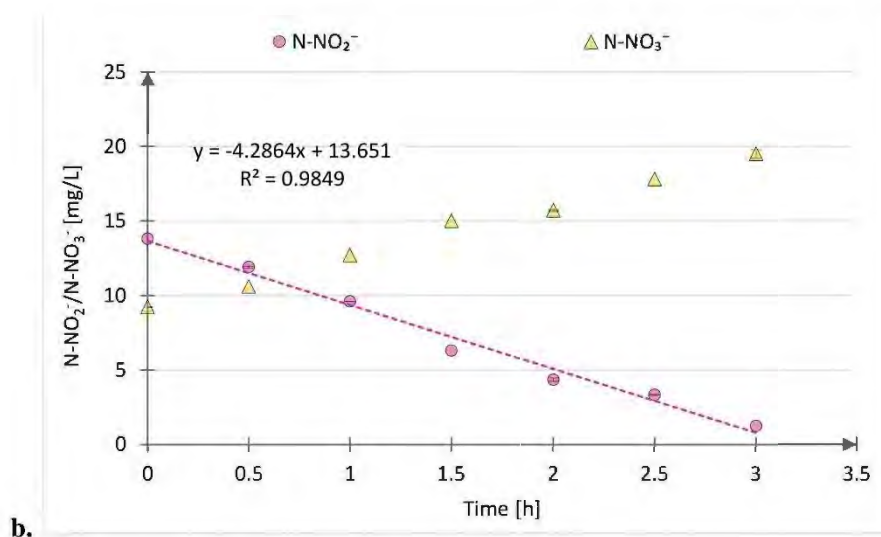
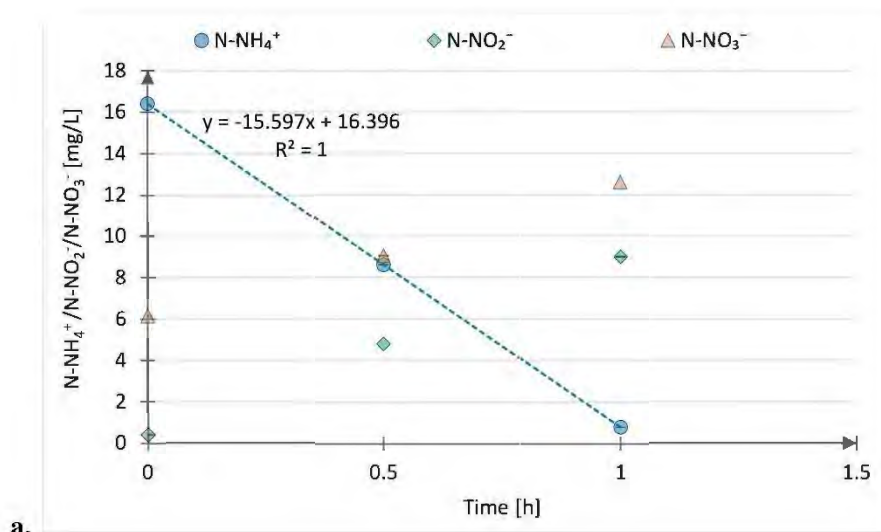


Fig S16 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.4. for activated sludge

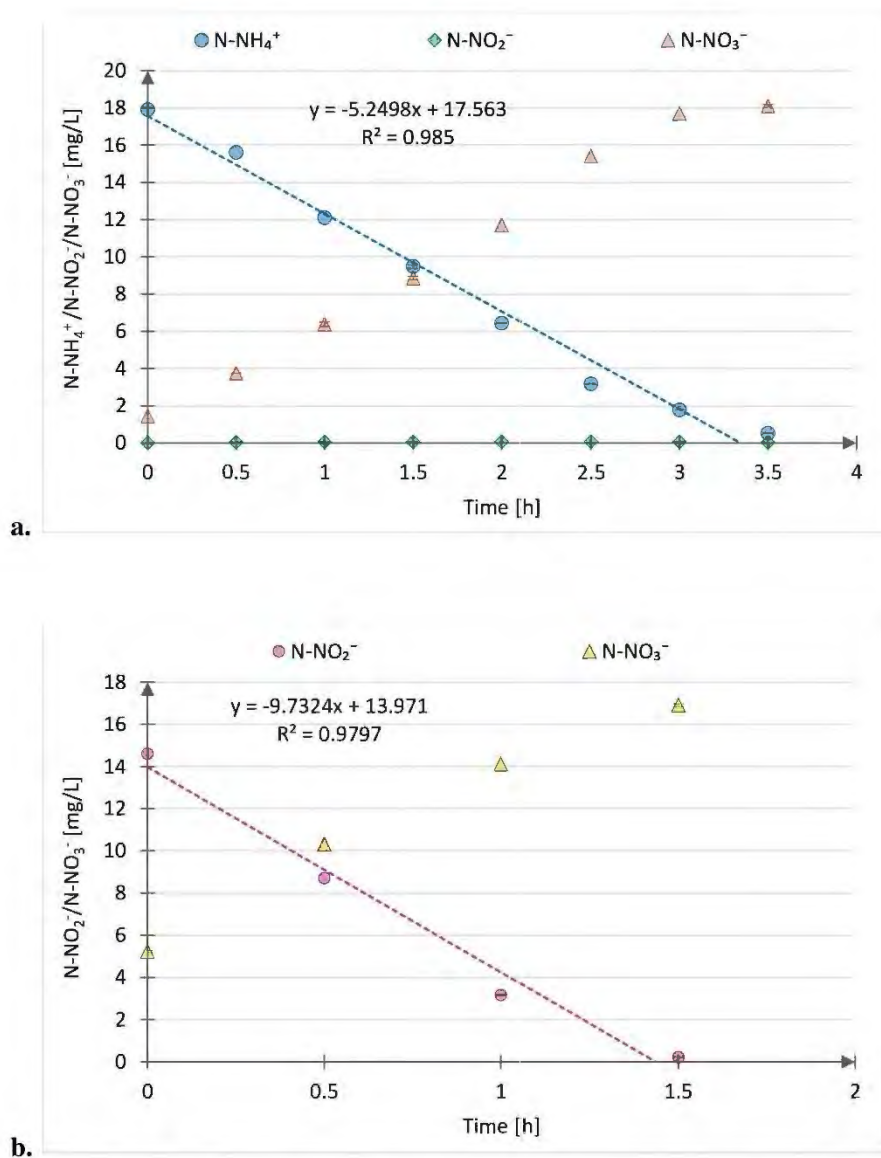


Fig S17 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.I.4. for biofilm

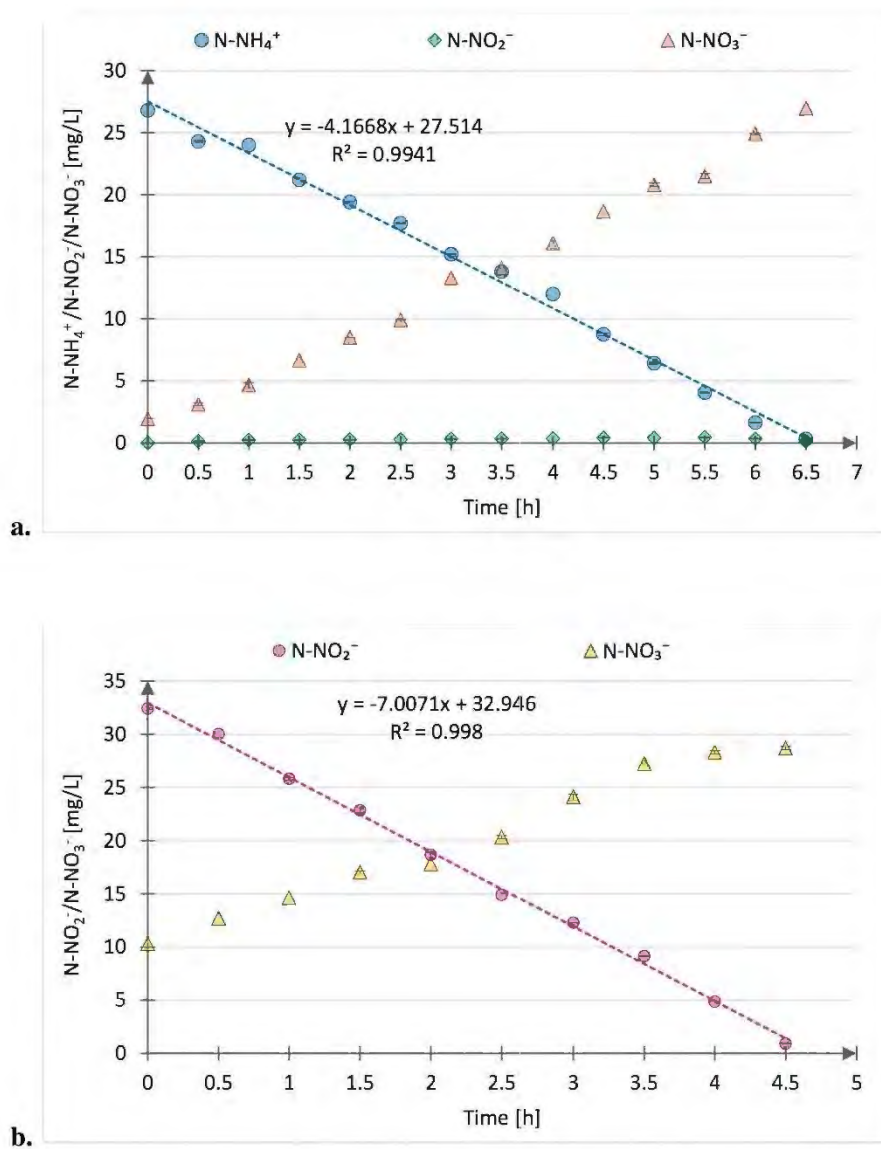


Fig S18 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.II.a. for biofilm

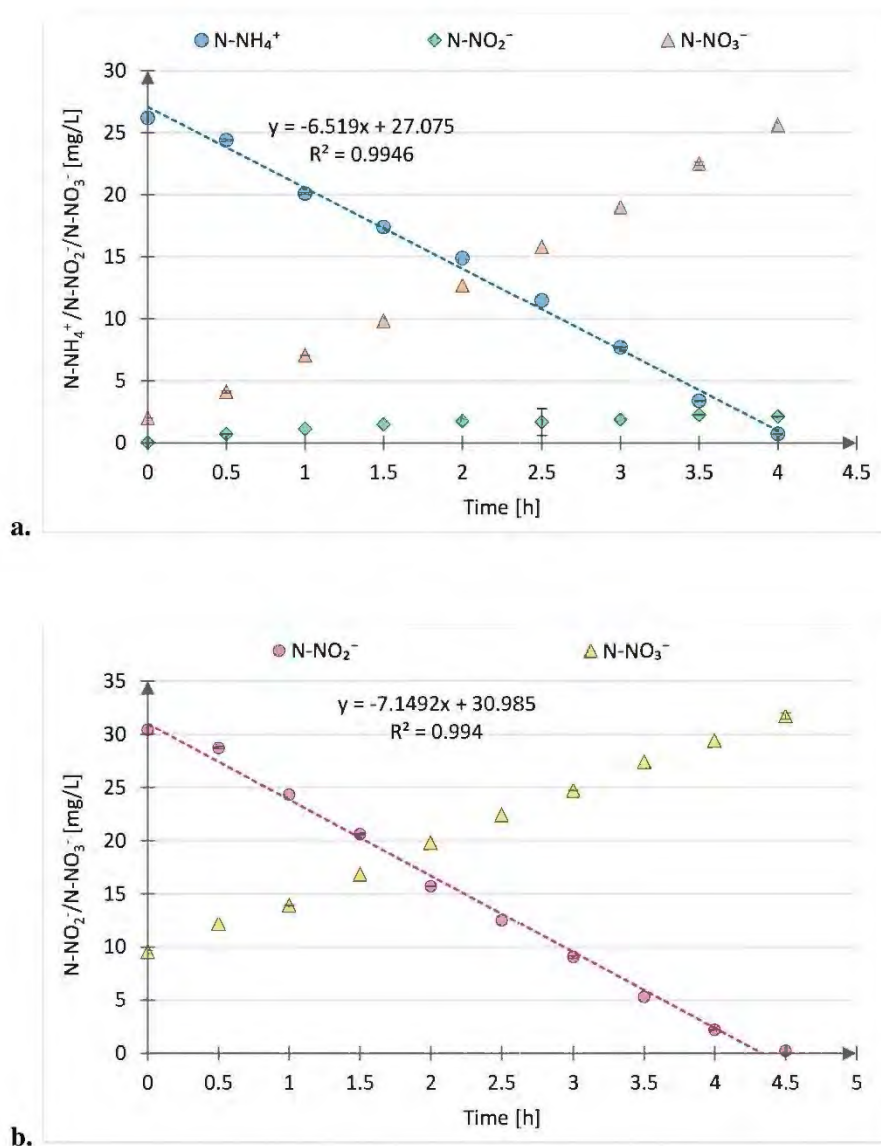
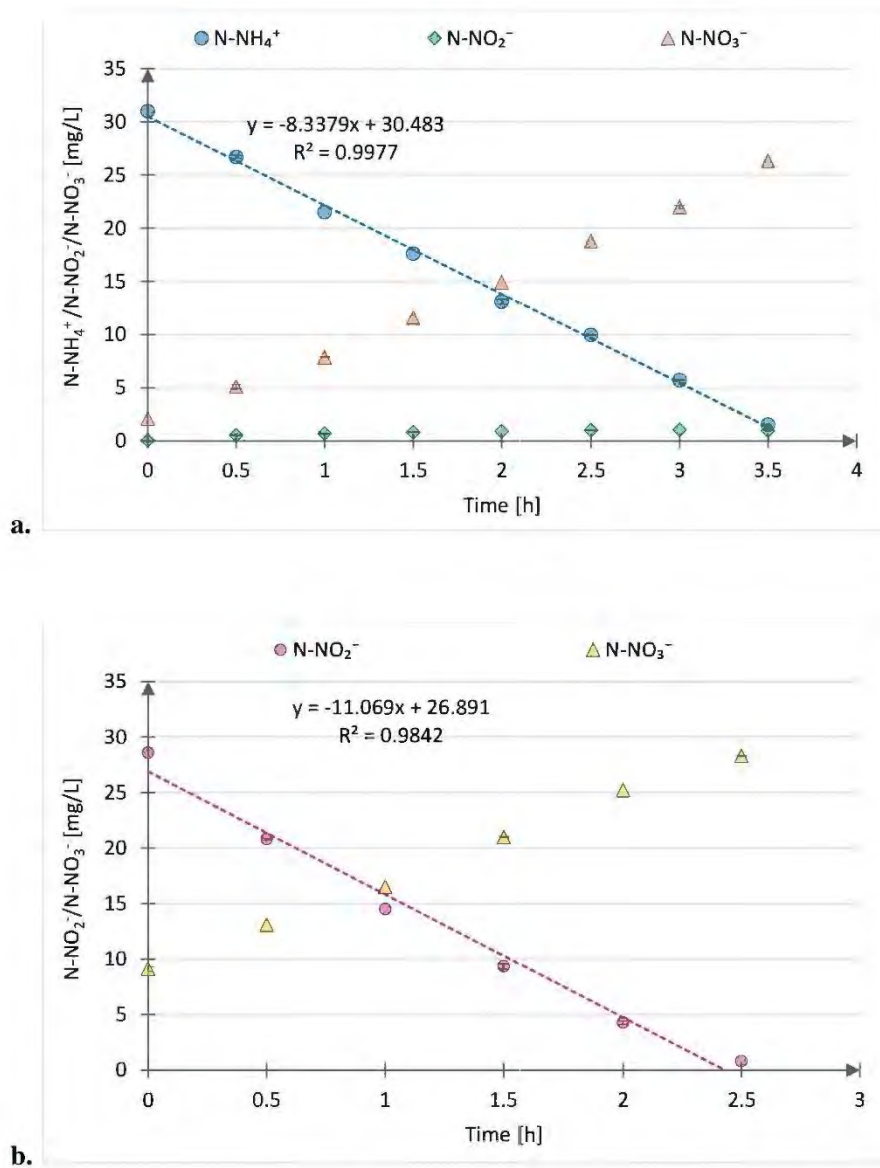


Fig S19 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.II.b. for biofilm



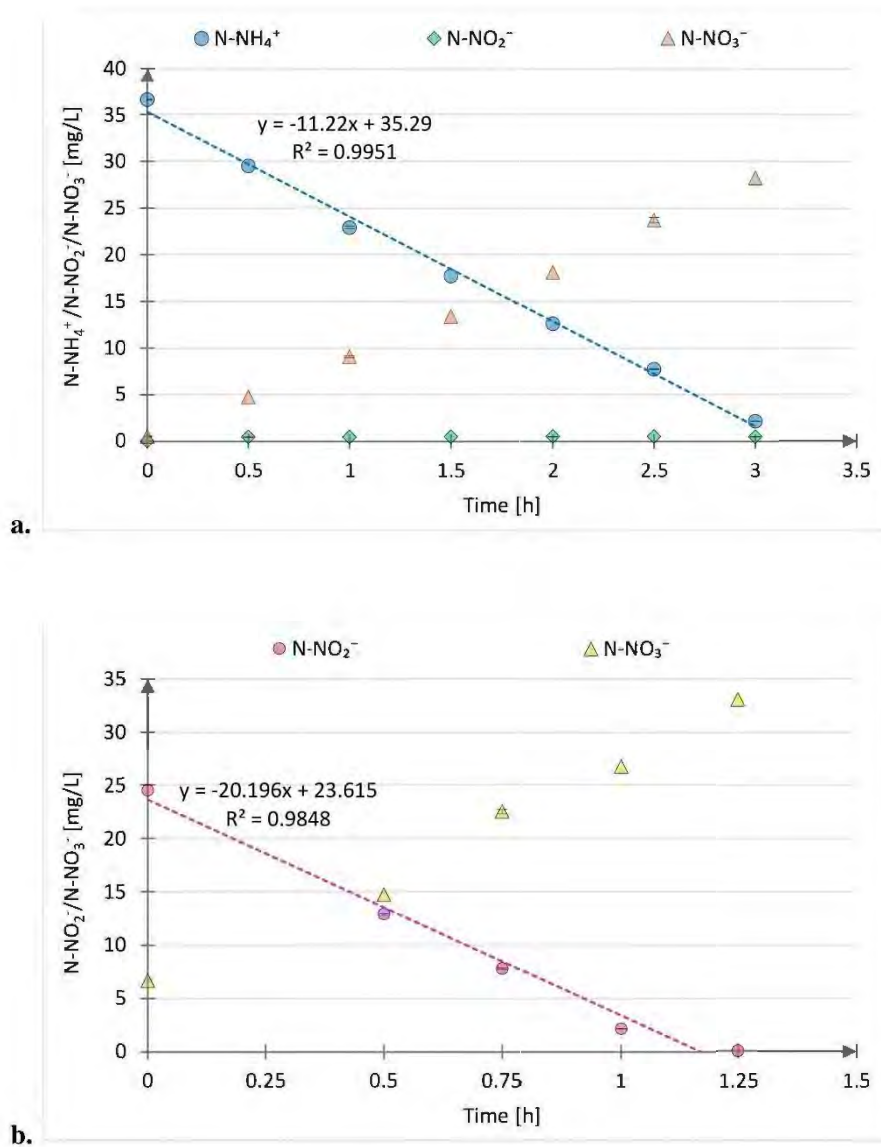


Fig S21 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.III.2. for biofilm

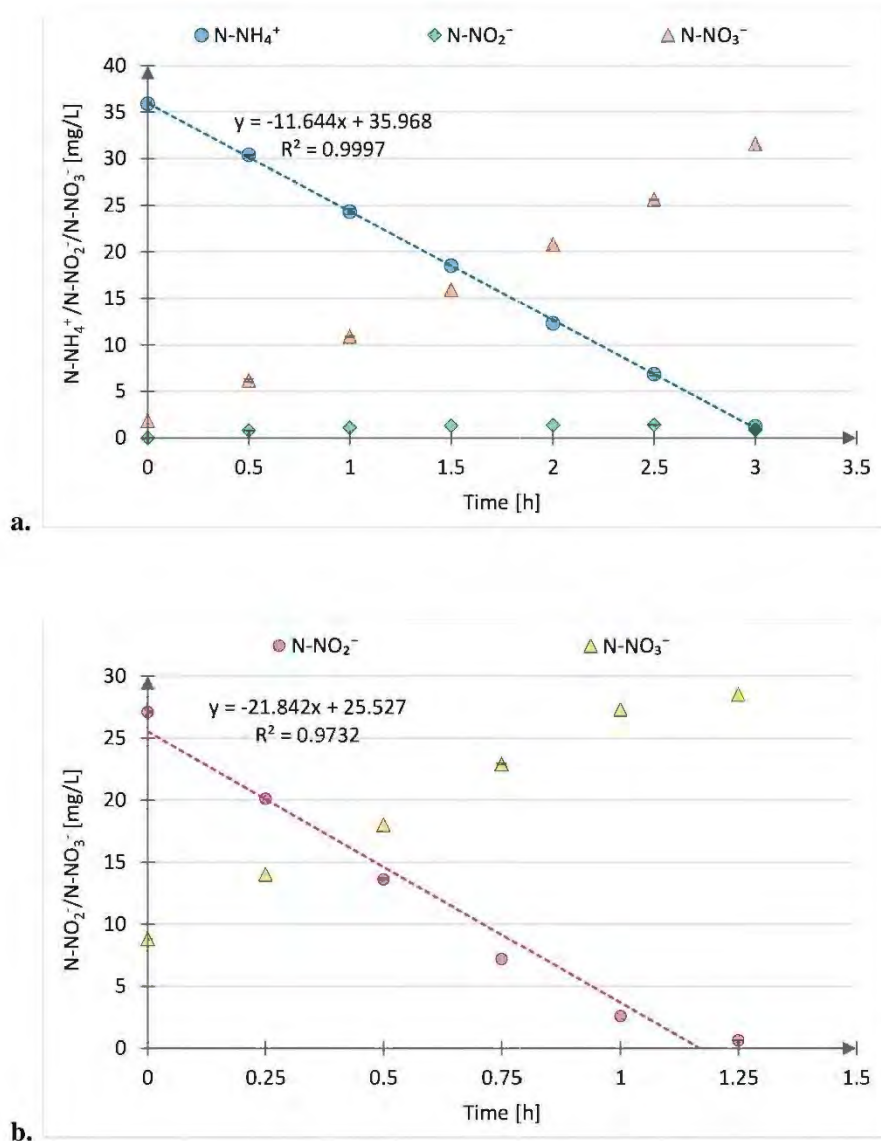


Fig S22 N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.III.3. for biofilm

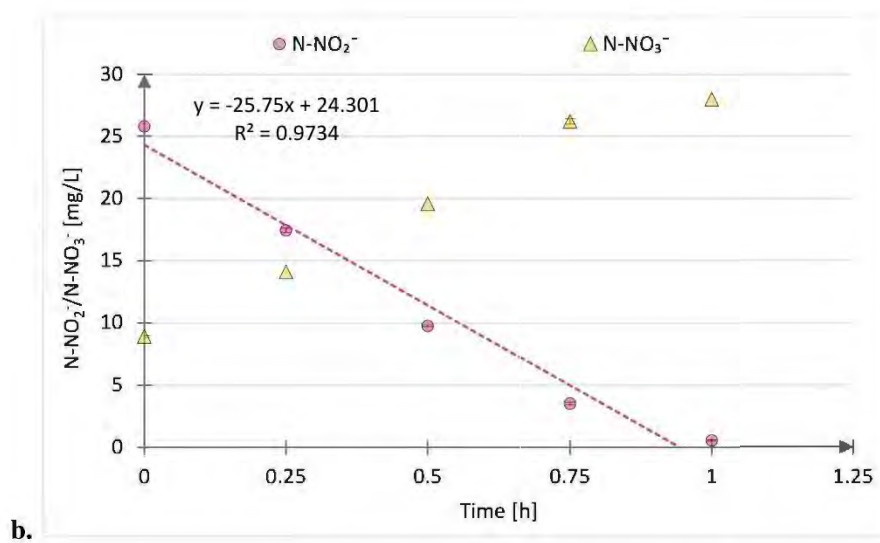
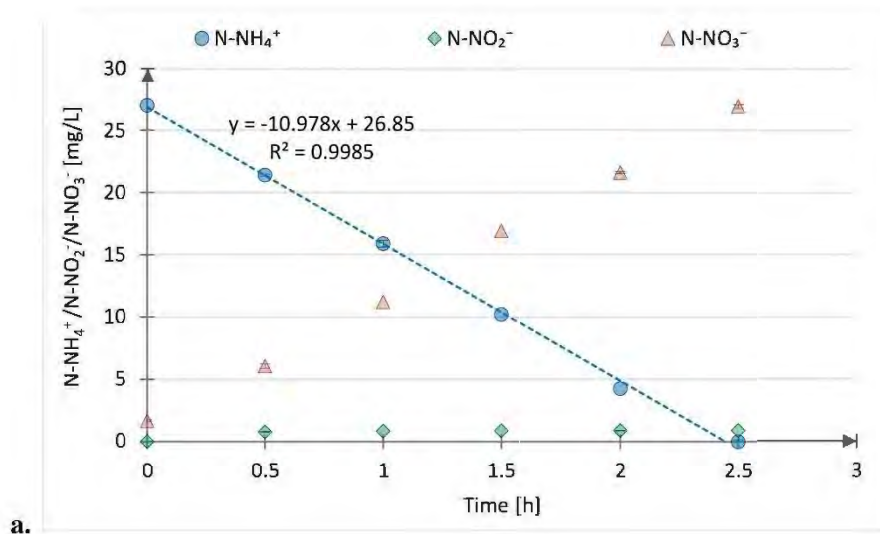


Fig S23 N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ profiles during test (a) AUR (b) NitUR – S.III.4. for biofilm

9) Tukey's RiR test results

Table S4 Efficiency of nitrification process (E_{Nit})

Series	E_{Nit} Marked differences are significant with $p < 0,05000$								
	S.I.1. av.=95,942	S.I.2. av.=95,762	S.I.3. av.=90,897	S.I.4. av.=85,612	S.II. av.=91,329	S.III.1. av.=96,464	S.III.2. av.=94,718	S.III.3. av.=91,386	S.III.4. av.=82,909
S.I.1.		1,000000	0,742348	0,270644	0,823313	1,000000	1,000000	0,994985	0,006676
S.I.2.	1,000000		0,822807	0,292216	0,885598	1,000000	1,000000	0,996193	0,007865
S.I.3.	0,742348	0,822807		0,938297	1,000000	0,870793	0,999679	1,000000	0,297897
S.I.4.	0,270644	0,292216	0,938297		0,906334	0,213845	0,902708	0,976657	0,999271
S.II.	0,823313	0,885598	1,000000	0,906334		0,913840	0,999869	1,000000	0,234640
S.III.1.	1,000000	1,000000	0,870793	0,213845	0,913840		0,999999	0,989644	0,021053
S.III.2.	1,000000	1,000000	0,999679	0,902708	0,999869	0,999999		0,999885	0,693027
S.III.3.	0,994985	0,996193	1,000000	0,976657	1,000000	0,989644	0,999885		0,818104
S.III.4.	0,006676	0,007865	0,297897	0,999271	0,234640	0,021053	0,693027	0,818104	

Table S5 N-NH_4^+ concentration in effluent

Series	N-NH_4^+ Marked differences are significant with $p < 0,05000$								
	S.I.1. av.=0,68338	S.I.2. av.=0,73438	S.I.3. av.=0,75467	S.I.4. av.=1,0479	S.II. av.=2,5532	S.III.1. av.=0,89421	S.III.2. av.=1,4373	S.III.3. av.=0,55000	S.III.4. av.=20,360
S.I.1.		1,000000	1,000000	1,000000	0,983931	1,000000	1,000000	1,000000	0,000010
S.I.2.	1,000000		1,000000	1,000000	0,988973	1,000000	1,000000	1,000000	0,000010
S.I.3.	1,000000	1,000000		1,000000	0,991736	1,000000	1,000000	1,000000	0,000010
S.I.4.	1,000000	1,000000	1,000000		0,999852	1,000000	1,000000	1,000000	0,000010
S.II.	0,983931	0,988973	0,991736	0,999852		0,999053	0,999994	0,999845	0,000010
S.III.1.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,999053		1,000000	1,000000	0,000010
S.III.2.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,999994	1,000000		1,000000	0,000010
S.III.3.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,999845	1,000000	1,000000		0,000015
S.III.4.	0,000010	0,000010	0,000010	0,000010	0,000010	0,000010	0,000010	0,000015	

Table S6 TKN concentration in effluent

Series	TKN Marked differences are significant with $p < 0,05000$								
	S.I.1. av.=2,8481	S.I.2. av.=3,0163	S.I.3. av.=6,4245	S.I.4. av.=9,9056	S.II. av.=6,2120	S.III.1. av.=2,4588	S.III.2. av.=4,9500	S.III.3. av.=10,256	S.III.4. av.=25,112
S.I.1.		1,000000	0,957860	0,641136	0,950862	1,000000	0,999875	0,798077	0,000139
S.I.2.	1,000000		0,981512	0,735109	0,980526	1,000000	0,999954	0,847814	0,000139
S.I.3.	0,957860	0,981512		0,993231	1,000000	0,977065	0,999994	0,996288	0,000141
S.I.4.	0,641136	0,735109	0,993231		0,986112	0,739606	0,981983	1,000000	0,006403
S.II.	0,950862	0,980526	1,000000	0,986112		0,976840	0,999997	0,993225	0,000139
S.III.1.	1,000000	1,000000	0,977065	0,739606	0,976840		0,999819	0,836676	0,000140
S.III.2.	0,999875	0,999954	0,999994	0,981983	0,999997	0,999819		0,987808	0,000427
S.III.3.	0,798077	0,847814	0,996288	1,000000	0,993225	0,836676	0,987808		0,055504
S.III.4.	0,000139	0,000139	0,000141	0,006403	0,000139	0,000140	0,000427	0,055504	

Table S7 N-NO_2^- concentration in effluent

Series	N-NO_2^- Marked differences are significant with $p < 0,05000$								
	S.I.1. av.=0,01923	S.I.2. av.=0,01367	S.I.3. av.=0,01050	S.I.4. av.=0,10440	S.II. av.=0,07616	S.III.1. av.=0,03283	S.III.2. av.=0,02500	S.III.3. av.=0,01025	S.III.4. av.=13,996
S.I.1.		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000132
S.I.2.	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000133
S.I.3.	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000132
S.I.4.	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000528
S.II.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000132
S.III.1.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000204
S.III.2.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,002095
S.III.3.	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,002064
S.III.4.	0,000132	0,000133	0,000132	0,000528	0,000132	0,000204	0,002095	0,002064	

Table S8 N-NO₃⁻ concentration in effluent

Series	N-NO ₃ ⁻								
	Marked differences are significant with p < 0,05000								
	S.I.1. av.=8,4177	S.I.2. av.=18,837	S.I.3. av.=49,355	S.I.4. av.=59,990	S.II. av.=64,810	S.III.1. av.=71,208	S.III.2. av.=95,025	S.III.3. av.=121,50	S.III.4. av.=121,56
S.I.1.		0,606153	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136
S.I.2.	0,606153		0,000171	0,000139	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136
S.I.3.	0,000136	0,000171		0,829164	0,079830	0,031102	0,000137	0,000136	0,000136
S.I.4.	0,000136	0,000139	0,829164		0,997961	0,862731	0,002739	0,000136	0,000136
S.II.	0,000136	0,000136	0,079830	0,997961		0,978631	0,001878	0,000136	0,000136
S.III.1.	0,000136	0,000136	0,031102	0,862731	0,978631		0,096296	0,000137	0,000136
S.III.2.	0,000136	0,000136	0,000137	0,002739	0,001878	0,096296		0,086673	0,009963
S.III.3.	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000137	0,086673		1,000000
S.III.4.	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,000136	0,009963	1,000000	

Table S9 Free ammonia (FA) concentration in influent

Series	FA								
	Marked differences are significant with p < 0,05000								
	S.I.1. av.=0,92394	S.I.2. av.=1,2287	S.I.3. av.=1,4936	S.I.4. av.=1,6135	S.II. av.=1,5913	S.III.1. av.=1,5507	S.III.2. av.=2,1739	S.III.3. av.=2,7395	S.III.4. av.=3,6375
S.I.1.		0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131
S.I.2.	0,000131		0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131
S.I.3.	0,000131	0,000131		0,039002	0,018619	0,725928	0,000131	0,000131	0,000131
S.I.4.	0,000131	0,000131	0,039002		0,999378	0,800224	0,000131	0,000131	0,000131
S.II.	0,000131	0,000131	0,018619	0,999378		0,925303	0,000131	0,000131	0,000131
S.III.1.	0,000131	0,000131	0,725928	0,800224	0,925303		0,000131	0,000131	0,000131
S.III.2.	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131		0,000131	0,000131
S.III.3.	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131		0,000131
S.III.4.	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	0,000131	

Quantity of biomass in the form of activated sludge:**Table S10** Mixed liquor suspended solids (MLSS)

Series	MLSS			
	Marked differences are significant with p < 0,05000			
	S.I.1. av.=46,391	S.I.2. av.=47,789	S.I.3. av.=52,578	S.I.4. av.=13,169
S.I.1.		0,977730	0,304820	0,000164
S.I.2.	0,977730		0,547659	0,000164
S.I.3.	0,304820	0,547659		0,000164
S.I.4.	0,000164	0,000164	0,000164	

Table S11 Mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS)

Series	MLVSS			
	Marked differences are significant with p < 0,05000			
	S.I.1. av.=29,893	S.I.2. av.=27,695	S.I.3. av.=32,558	S.I.4. av.=7,6318
S.I.1.		0,823892	0,724447	0,000164
S.I.2.	0,823892		0,270181	0,000165
S.I.3.	0,724447	0,270181		0,000164
S.I.4.	0,000164	0,000165	0,000164	

Quantity of biomass in the form of biofilm

Table S12 Total suspended solids (TSS)

Series	TSS Marked differences are significant with $p < 0,05000$								
	S.I.1. av.=30,030	S.I.2. av.=30,156	S.I.3. av.=30,646	S.I.4. av.=25,036	S.II. av.=32,365	S.III.1. av.=33,021	S.III.2. av.=49,208	S.III.3. av.=52,153	S.III.4. av.=42,202
S.I.1.		1,00000C	0,99999C	0,547634	0,95324E	0,94060E	0,00020E	0,00018E	0,00113E
S.I.2.	1,00000C		1,00000C	0,51818E	0,96549E	0,95267E	0,000207	0,00018E	0,00124E
S.I.3.	0,99999E	1,00000C		0,408831	0,99242E	0,98387E	0,00021E	0,00019C	0,001811
S.I.4.	0,547634	0,51818E	0,408831		0,04510E	0,09234E	0,00018E	0,00018E	0,00019E
S.II.	0,95324E	0,96549E	0,99242E	0,04510E		0,99999C	0,00019C	0,00018E	0,00057E
S.III.1.	0,94060E	0,95267E	0,98387E	0,09234E	0,99999C		0,00038C	0,00020E	0,01336E
S.III.2.	0,00020E	0,000207	0,00021E	0,00018E	0,00019E	0,00038C		0,945277	0,08575C
S.III.3.	0,00018E	0,00018E	0,00019C	0,00018E	0,00018E	0,00020E	0,945277		0,00687E
S.III.4.	0,00113E	0,00124E	0,001811	0,00019E	0,00057E	0,01336E	0,08575C	0,00687E	

Table S13 Volatile suspended solids (VSS)

Series	VSS Marked differences are significant with $p < 0,05000$								
	S.I.1. av.=16,288	S.I.2. av.=16,659	S.I.3. M=16,268	S.I.4. av.=15,156	S.II. av.=16,032	S.III.1. av.=19,915	S.III.2. av.=19,380	S.III.3. av.=19,538	S.III.4. av.=20,265
S.I.1.		0,999844	1,00000C	0,83945E	0,99995E	0,005357	0,01978E	0,013407	0,000661
S.I.2.	0,999844		0,999772	0,56955E	0,97780E	0,013221	0,04878E	0,033251	0,00155E
S.I.3.	1,00000C	0,999772		0,851081	0,99997E	0,005107	0,01885E	0,012774	0,00063E
S.I.4.	0,83945E	0,56955E	0,851081		0,87291E	0,00050E	0,00136E	0,00098C	0,000204
S.II.	0,99995E	0,97780E	0,99997E	0,87291E		0,00050E	0,00178E	0,00117E	0,00019C
S.III.1.	0,005357	0,013221	0,005107	0,00050E	0,00050E		0,99782E	0,99982E	0,99971E
S.III.2.	0,01978E	0,04878E	0,01885E	0,00136E	0,00178E	0,99782E		1,00000C	0,89845E
S.III.3.	0,013407	0,033251	0,012774	0,00098C	0,00117E	0,99982E	1,00000C		0,96338E
S.III.4.	0,000661	0,00155E	0,00063E	0,000204	0,00019C	0,99971E	0,89845E	0,96338E	

**OŚWIADCZENIA
WSPÓŁAUTORÓW
O UDZIALE W PUBLIKACJI**

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Olga Zając oświadczam, że mój wkład merytoryczny w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60%.

Zając, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 57, 104655, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>. IF:6,30; punkty MNiSW: 100.

Mój udział w niniejszej publikacji obejmował szczegółowy przegląd literatury, który posłużył do identyfikacji problemu badawczego oraz opracowania koncepcji pracy. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie metodyki badań technologicznych, a także za zaplanowanie i wykonanie eksperymentów technologicznych (sprawowanie kontroli nad układem badawczym i aparaturą pomiarową, przygotowywanie ścieków, przeprowadzanie testów kinetycznych, wykonywanie analizy fizyko-chemicznej jakości ścieków surowych i oczyszczonych) oraz pobór prób biomasy do badań mikrobiologicznych. Koordynowałam całym procesem badawczym, monitorując wszystkie etapy badań. Przeprowadziłam analizę statystyczną uzyskanych wyników badań technologicznych. Odpowiadałam za interpretację i dyskusję wyników badań, w zakresie jakości ścieków, efektywności jednostkowych procesów oczyszczania, wyników testów kinetycznych AUR i NitUR oraz za analizę zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych. Przygotowałam znaczącą część manuskryptu (100% – rozdział: 1.; 2.1.; 2.2.; 2.3.; 2.4.; 2.6.; 2.7.; 3.1.; 3.2.; 3.3.; 4.; 5.). Byłam odpowiedzialna za wizualizację danych, opracowując tabele (Tab. 1., Tab. 2.) oraz rysunki (Rys. 1., Rys. 2., Rys. 3., Rys. 4.). Przygotowałam materiały uzupełniające, w tym tabele (Tab. S1.; Tab. S4. – S13.) oraz rysunki (Rys. S1.; Rys. S3. – S5.; Rys. S10. – S23.). Pełniłam również obowiązki autora korespondencyjnego.

20.09.2024r. Olga Zając

Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Monika Żubrowska-Sudoł, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 57, 104655, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>. IF:6,30; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy wynikał z pełnionej funkcji promotora. Obejmował: 1) nadzór merytoryczny nad przeglądem literatury prowadzonym przez Doktorantkę, 2) korektę merytoryczną koncepcji badawczej, metodyki badań technologicznych oraz manuskryptu, 3) nadzór nad czynnościami badawczymi prowadzonymi przez Doktorantkę, 4) pozyskanie funduszy.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 20%.

20.08.2024 M. Sudoł

Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Martyna Godzieba, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Żubrowska-Sudol, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 57, 104655, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>. IF:6,30; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w opracowaniu metodyki badań mikrobiologicznych, 2) wykonanie eksperymentów mikrobiologicznych, 3) interpretację i dyskusję wyników badań mikrobiologicznych, 4) przygotowanie manuskryptu (rozdział: 2.5.; 3.4.), 5) wizualizację danych w zakresie: rysunek 5, rysunek S2., rysunek S6., rysunek S7., rysunek S8., rysunek S9., tabela S2., tabela S3.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 15%.

18.08.2024 Martyna Godzieba
Data i podpis współautora

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O UDZIALE W PUBLIKACJI

Ja, Sławomir Ciesielski, potwierdzam, że wkład merytoryczny mgr inż. Olgi Zając w ostateczną wersję poniższej publikacji naukowej wyniósł 60% i polegał na czynnościach wymienionych w oświadczeniu Autorki.

Zajac, O., Żubrowska-Sudoł, M., Godzieba, M., Ciesielski, S. (2024). Changes in the activity and abundance of canonical nitrifiers and Comammox bacteria during stream switching: Shifting from a mainstream hybrid reactor for C, N, and P removal to a sidestream biofilm nitrification reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 57, 104655, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104655>. IF:6,30; punkty MNiSW: 100.

Mój udział jako współautora pracy obejmował: 1) współudział w opracowaniu metodyki badań mikrobiologicznych, 2) współudział w korekcie merytorycznej manuskryptu.

Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 5%.

19.09.2024 Sławomir Ciesielski

.....
Data i podpis współautora

