

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DE STUDII UNIVERSITARE DOCTORALE ÎN
DOMENIUL ECOLOGIE

TEZĂ DE DOCTORAT

- REZUMAT -

SOLUȚIE ALTERNATIVĂ DE EPURARE A APELOR UZATE
FOLOSIND SISTEMUL MIXT MICROALGE – BACTERII

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC,

Prof. Univ. Dr. POSTOLACHE Carmen

DOCTORAND,

CS TRICOLICI A. Olga (TIRON)

BUCUREȘTI

2016

CUPRINS

Legendă figuri
Legendă tabele
Legendă ecuații
Abrevieri

Introducere

CAPITOLUL I. ANALIZA CRITICĂ A CUNOAȘTERII

- I.1.** Epurarea apelor uzate: concept, tendințe, limite
- I.2.** Bioindicatori ai proceselor de epurare a apelor uzate cu nămol activ
- I.3.** Biomasa microalgelor în contextul dezvoltării sistemelor socio-economice
 - I.3.1. Istoric
 - I.3.2. Producția biomasei microalgelor
 - I.3.3. Procesul de selecție a speciilor de microalge
 - I.3.4. Clasificarea taxonilor microalgali
 - I.3.5. Amprenta microalgelor în sisteme socio – ecologice
- I.4.** Biotehnologie alternativă de epurare a apelor uzate utilizând microalge
 - I.4.1. Istoric
 - I.4.2. Relația microalge – bacterii
 - I.4.3. Avantaje
 - I.4.4. Parametri operaționali de interes în biotehnologia bazată pe microalge
 - A. Intensitatea luminoasă
 - B. Concentrația de dioxid de carbon din mediul de reacție
 - C. Temperatura
 - D. pH
 - E. Fotoperiodicitatea
 - F. Raportul dintre concentrația biomasei microalgelor și cea a bacteriilor
 - G. Încărcarea în nutrienți și materie organică a influentului
- I.5.** Limita majoră a biotehnologiei bazată pe microalge
 - I.5.1. Tehnici de recuperare a celulelor microalgale

Concluzii

CAPITOLUL II. PROIECTUL DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ – CONTRIBUȚII ORIGINALE

- II.1.** Organizarea programului de cercetare
 - Scopul proiectului de cercetare
 - Obiectivele proiectului de cercetare
 - II.1.1.** Organizarea secțiunii experimentale
 - II.1.2.** Metode de analiză

II.2. ETAPA EXPERIMENTALĂ I

- II.2.1.** Obținerea și cultivarea biomasei microalge - bacterii
- II.2.2.** Testarea biomasei microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate industriale – experimente preliminare
 - A. Alegerea sursei de apă uzată
 - B. Organizarea experimentelor
 - C. Rezultate și discuții

- C.1. Variația concentrației oxigenului dizolvat
- C.2. pH
- C.3. Materia organică
- C.4. Nutrienții. NO_3^-
 NO_2^-
 NH_4^+
 PO_4^{3-}
- C.5. Conținutul în lipide al biomasei
- C.6. Capacitatea de sedimentare a flocoanelor microalge - bacterii
- C.7. Analiza microscopică a biomasei

Concluzii

II.3. ETAPA EXPERIMENTALĂ II

Influența intensității luminoase asupra performanței de epurare a apelor uzate industriale utilizând sistemul microalge – bacterii

II.3.1. Organizarea experimentelor

II.3.2. Rezultate și discuții

- A. Activitatea fotosintetică și rata de creștere a microalgelor
- B. Concentrația biomasei
- C. Eficiența de recuperare a biomasei microalgelor
- D. Eficiența de îndepărtare a materiei organice și a nutrienților
- E. Dinamica structurii comunității protozoarelor

Concluzii

II.4. ETAPA EXPERIMENTALĂ III

Optimizarea treptei biologice de epurare a apelor uzate din industria laptelui utilizând sistemul microalge – bacterii

II.4.1. Organizarea experimentelor

II.4.2. Biomasa microalge – bacterii

II.4.3. Rezultate și discuții

- A. Variația saturației în oxigen molecular
- B. pH
- C. Performanța de epurare
- D. Eficiența de îndepărtare a biomasei microalgelor
- E. Diversitatea structurii comunității bioindicatorilor

Concluzii

II.5. ETAPA EXPERIMENTALĂ IV

Granularea sistemului microalge - bacterii

II.5.1. Principii generale

II.5.2. Sistem alternativ microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate

II.5.3. Organizarea experimentelor

II.5.4. Rezultate și discuții

- A. Evoluția dimensiunii flocoanelor / granulelor microalge – bacterii
- B. Particularitățile granulelor microalge - bacterii
- C. Capacitatea de sedimentare a granulelor
- D. Eficiența de recuperare a biomasei microalgelor

Concluzii

II.6. ETAPA EXPERIMENTALĂ V

Experimente de epurare a apelor uzate utilizând sistemul granular microalge - nămol activ

II.6.1. Organizarea experimentelor

II.6.2. Rezultate și discuții

A. Variația saturației în oxigen molecular

B. Variația valorii pH-ului

C. Materia organică (CCO_{Cr})

D. NH₄⁺

E. NO₃⁻, NO₂⁻

F. Denitrificarea

G. PO₄³⁻

H. Eficiența de recuperare a celulelor microalgale din efluent

Concluzii

CONCLUZII FINALE

BIBLIOGRAFIE

Lucrări publicate / comunicate

INTRODUCERE

Tendențele societății secolului al XXI-lea se concretizează prin creșterea calității vieții, diversificarea și creșterea volumului produselor, precum și creșterea nivelului de consum al acestora. În acest context se conturează amprenta dezvoltării sistemelor socio - economice asupra celorlalte componente ale ecosferei, una dintre acestea reflectându-se asupra resurselor de apă. Gradul de diversitate a practicilor comerciale și productivitatea se află în relație directă cu volumul de apă uzată rezultat din procesele de producție. Caracterul limitativ al resurselor de apă impune însă reintroducerea acestora în circuitul hidrologic, obiectiv realizat în urma aducerii lor la o calitate corespunzătoare prin intermediul stațiilor de epurare. În scopul îndepărtării poluanților din apele uzate, stațiile de epurare cuprind un flux tehnologic complex constituit dintr-o serie de procese de natură fizică, chimică și biologică. Calitatea efluenților rezultați din fluxul de epurare trebuie să fie în acord cu prevederile legislative în vigoare. În treapta biologică convențională de epurare a apelor uzate se utilizează o gamă largă de populații de microorganisme care formează biomasa – „nămolului activ”. Sistemul convențional de epurare cu nămol activ este proiectat astfel încât să asigure calitatea efluenților, însă, prin analiza integrată a procedeele implicate, s-a stabilit că acesta nu răspunde principiului sustenabilității, fiind identificate următoarele limitări / dezavantaje: consum ridicat de energie, emisii de gaze cu efect de seră, dificultăți în gestionarea reziduurilor generate din fluxul de epurare. Prin urmare, în condițiile actuale ale dezvoltării sistemelor socio – economice, este subliniată necesitatea integrării conceptului de epurare a apelor uzate într-un sistem cu funcționare durabilă, cu impact minim al proceselor tehnologice asupra componentelor ecosferei, fără a compromite obiectivul stațiilor de epurare.

Una dintre soluțiile propuse constă în integrarea biomasei microalgelor în treapta biologică de epurare. Soluția este recunoscută la nivel global, iar cercetările în domeniu sunt susținute prin prisma conceptului dezvoltării sustenabile, a conceptului epurării convenționale a apelor uzate și a aplicațiilor biomasei microalgelor. Pe plan mondial, biotehnologia alternativă bazată pe microalge este în curs de dezvoltare, însă, în vederea extinderii acesteia, este necesară depășirea anumitor bariere. Una dintre acestea constă în creșterea considerabilă a investițiilor (procurarea de reactivi, membrane filtrante, input-uri mari de energie etc.) în treapta de recuperare a biomasei microalgelor din mediul apos raportate la costurile totale de cultivare. La nivel național nu au fost identificate cercetări anterioare destinate utilizării microalgelor în procese de epurare a apelor uzate.

Pornind de la aceste considerente teza de doctorat prezentată a fost realizată ca un proiect de cercetare științifică, structurat astfel: **Capitolul I – Analiza critică a cunoașterii și Capitolul II – Proiectul de cercetare științifică – contribuții originale**. Primul capitol se adresează analizei literaturii de specialitate, inclusiv date experimentale, urmărindu-se identificarea tendințelor în

domeniul epurării apelor uzate și evidențierea etapelor de integrare a biotehnologiei bazate pe microalge în treapta biologică de epurare. De asemenea, prin procesul de evaluare critică, s-a propus să se stabilească limitele cu care se confruntă biotehnologia convențională de epurare a apelor uzate, precum și cele ale biotehnologiei alternative, bazată pe microalge, cu evidențierea avantajelor care pot fi obținute prin utilizarea biomasei mixte nămol activ (bacterii) - microalge.

Informațiile din primul capitolul sunt utilizate în cel de-al doilea capitol al tezei la identificarea obiectivelor, organizarea etapelor experimentale ale programului de cercetare și identificarea metodelor de lucru corespunzătoare, prin care să se asigure obținerea de rezultate științifice cu grad ridicat de acuratețe și precizie. Cel de-al doilea capitol a fost structurat în cinci etape experimentale, fiecare dintre acestea fiind inițiată printr-o abordare justificată. Unele etape reprezintă continuări ale celor precedente, necesare în vederea abordării limitărilor identificate pe parcursul derulării experimentelor. Pentru a evidenția importanța și necesitatea conducerii anumitor studii, sunt incluse modalitatea de organizare a experimentelor în cadrul fiecărei etape experimentale, rezultatele obținute și discuțiile aferente acestora, perspective și concluzii care evidențiază importanța rezultatelor științifice. O parte din experimentele de cercetare prezentate în cadrul tezei au constituit obiectul unui proiect național de cercetare (PN 09 - 13 03 12) finanțat prin Programul Nucleu și derulat în perioada 2013 – 2015. Realizarea etapelor experimentale a fost posibilă prin utilizarea unei infrastructuri de cercetare modernă, de nivel european, aflată în dotarea Institutului Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Ecologie Industrială – ECOIND (București).

Prin experimentele efectuate în cadrul tezei de doctorat s-a urmărit aducerea unor contribuții originale semnificative la dezvoltarea bazelor de date și cunoștințe asupra biotehnologiei bazate pe microalge pentru epurarea apelor uzate, la nivel național și internațional. Rezultatele științifice contribuie la extinderea biotehnologiei în domeniul științific vizat, fapt susținut de impactul acestora la nivel internațional prin publicare / comunicare de lucrări științifice, propunerea unei cereri de brevet de invenție și obținerea de premii / medalii.

Direcțiile programului de cercetare au urmărit pe de-o parte dezvoltarea biotehnologiei bazate pe sistemul simbiotic indus microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate și pe de altă parte abordarea limitărilor acesteia.

I. ANALIZA CRITICĂ A CUNOAȘTERII

Primul capitol al tezei prezintă sintetic conceptul de epurare a apelor uzate și etapa de integrare a biotehnologiei bazate pe microalge în domeniul epurării apelor uzate, cu evidențierea limitelor proceselor convenționale, cât și a celor rezultate din aplicarea biotehnologiei alternative propuse. De asemenea, în cadrul capitolului a fost descris principiul de funcționare a unui proces combinat de epurare utilizând sistemul biologic microalge - bacterii, precum și avantajele care ar rezulta din aplicarea acestuia. Din analiza datelor științifice s-a evidențiat faptul că proprietățile metabolice ale celulelor microalgale, precum și compoziția celulară a acestora, au contribuit la diversificarea căilor de valorificare a biomasei microalgelor, precum și la susținerea aplicării biotehnologiei bazate pe microalge pe fluxul de epurare a apelor uzate. Scăderea costurilor de operare a proceselor de epurare a apelor uzate, creșterea performanței de epurare, îmbunătățirea programului de management al deșeurilor și diminuarea gazelor cu efect de seră sunt avantajele care susțin creșterea interesului adresat implementării biotehnologiei bazată pe microalge. De asemenea, simultan cu identificarea atât a avantajelor, cât și a dezavantajelor biotehnologiei alternative, au fost evidențiate și variantele de soluționare a limitelor acesteia în vederea promovării conceptului de la nivel de laborator la nivel industrial.

Analiza cercetărilor experimentale realizate a permis identificarea obiectivelor majore care trebuie luate în considerare în vederea susținerii dezvoltării biotehnologiei bazată pe microalge la nivel global, acestea constând în: analiza efectului cuplării între biomasa microalgelor și cea a bacteriilor (nămol activ) asupra eficienței de absorbție a fotonilor, creșterea numărului studiilor experimentale privind identificarea comportamentului sistemului microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate și dezvoltarea soluțiilor alternative de îndepărtare a celulelor microalgale din mediul de reacție, care să fie eficiente din punct de vedere economic și care să asigure un standard ecologic ridicat.

De asemenea, prin analiza literaturii de specialitate s-a punctat faptul că eficiența proceselor biologice (care includ sistemul microalge – bacterii), distribuite pe fluxul de epurare a apelor uzate, este dependentă de rezultanta factorilor fizico - chimici și biologici implicați. Astfel, deși influența globală pe care o poate avea un anumit factor este strict dependentă de fluctuațiile parametrilor aflați în asocieră, ceea ce presupune necesitatea studiului integrat al acestora, pentru a clarifica presiunea generată de un anumit parametru sau contribuția acestuia într-un proces de epurare este important să se analizeze în primă fază influența individuală a acestuia.

Analiza critică a cunoașterii în domeniul vizat a stat la baza proiectării programului de cercetare, cu stabilirea unor obiective de interes care să răspundă limitelor prezentate și să contribuie la avansarea cercetărilor în domeniu, cu obținerea de rezultate cu impact științific

semnificativ exprimat prin elaborarea de lucrări științifice de valoare și diseminarea lor în comunitatea științifică.

I.1. Epurarea apelor uzate – concept, tendințe, limite

Fluxul tehnologic al epurării apelor uzate constă într-o serie de procese fizice, chimice și biologice succesive cu scopul asigurării calității acestora, rezultate din diverse activități antropice, înaintea evacuării în emisari naturali. Conceptul de epurare a apelor uzate implică însă o abordare mult mai vastă, care vizează conservarea resurselor de apă și a altor resurse ale ecosferei, inclusiv și sănătatea ființei umane. Importanța stațiilor de epurare este evidențiată prin tematicile abordate de Parteneriatul European de Inovare în Domeniul Apei (EIP Water), unul dintre obiectivele consorțiului fiind dezvoltarea de soluții inovative care să răspundă la nivel mondial, schimbărilor survenite în sectorul resurselor de apă (Stroe *et al.*, 2014). Simultan cu progresul industrial s-a înregistrat o tendință accentuată de creștere a cerințelor de resurse de apă la nivel global (Bagatin *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016). Această presiune s-a produs în condițiile în care resursele de apă disponibile activităților economice și cerințelor vitale ale populației sunt limitate și reprezintă doar aproximativ 1 % din cantitatea totală de resurse de apă exploatabile. În plus, conform datelor statistice furnizate de Uniunea Europeană, se preconizează că până în anul 2025 o treime din populația de pe glob se va confrunta cu problema insuficienței resurselor de apă (Ranade & Bhandari, 2014). În contextul caracterului limitativ al resurselor de apă se susține necesitatea implementării unor sisteme sustenabile de epurare a apelor uzate care să conducă la reintroducerea în circuitul hidrologic a resurselor de apă exploatare, în condiții de siguranță, conservând astfel starea sistemelor acvatice și asigurând necesarul continuu pentru nevoile populației.

O secvență biologică aplicată pentru epurarea apelor uzate, care a pus bazele dezvoltării tehnologiei convenționale de epurare, a fost descrisă în anul 1914 într-un raport științific efectuat de către cercetătorii britanici Arden E. și Lockett W. T. (Arden & Lockett, 1914a; 1914b; 1915). Secvența constă din aerarea unui influent (apă uzată municipală) în mai multe etape în scopul îndepărtării materiei organice și a ionilor amoniu (NH_4^+), aceștia din urmă fiind eliminați din mediul apos prin procese de nitrificare biologică. În acea perioadă, prima stație de epurare din Marea Britanie a funcționat în regim „fill and draw”, implicând cel puțin două trepte ale procesului de epurare: (1) etapa de umplere a reactorului (alimentare) și (2) etapa de evacuare a efluentului (Orhon, 2015). După câteva decenii, acest mod de operare a pus bazele implementării reactoarelor secvențiale de epurare a apelor uzate (Henze *et al.*, 2008).

Utilizarea acestui procedeu a condus la evidențierea dezvoltării unei biomase identificată cu termenul de „nămol activ” în cadrul proceselor de epurare. Un an mai târziu, experimente similare de epurare a apelor uzate au fost realizate în SUA (Universitatea Illinois) de către Edward Bartow

(Mohlman, 1916). Deși fluxul de epurare propus inițial prevedea îndepărtarea poluanților prin operarea sistemului în regim secvențial, cercetările ulterioare în această direcție s-au axat pe implementarea stațiilor de epurare operate în regim continuu (Orhon *et al.*, 2009).

În secolul al XX-lea, anii '60 s-au caracterizat prin evoluția cercetărilor asupra microbiologiei și bioenergeticii epurării apelor uzate, materializate prin obținerea de rezultate valoroase care au contribuit la creșterea performanței de epurare (Downing *et al.*, 1964). Simultan cu descoperirea bacteriilor denitrificatoare a fost realizat în Elveția primul sistem de epurare în două trepte: aerobă – anaerobă (Wuhrmann, 1964a; 1964b; Wuhrmann & Mechsner, 1965). În aceeași perioadă încep să fie utilizate reactoarele operate în regim secvențial „*sequencing batch reactor (SBR)*”, în prezent acestea reprezentând o alternativă pentru reactoarele operate în regim continuu (Orhon *et al.*, 2009).

Dezvoltarea accelerată a sectorului industrial a influențat semnificativ caracteristicile apelor uzate influente în stațiile de epurare și, implicit, componența fluxului tehnologic al acestora. Începând cu anul 1980 au fost raportate experimente cu nămol activ anaerob (Lettinga *et al.*, 1980) care au inclus utilizarea reactoarelor cu flux ascendent. În aceeași perioadă s-a obținut *nămolul activ granular*, acesta fiind inițial testat sub formă de umplutură în procese anaerobe de epurare. Primele rezultate experimentale asupra ciclului de dezvoltare și utilizare a nămolului granular în condiții aerobe au fost înregistrate în anii '90 (Mishima *et al.*, 1991). Interesul deosebit acordat utilizării nămolului aerob granular comparativ cu nămolul activ convențional s-a datorat caracteristicilor biologice ale agregatelor, particularităților fizice ale acestora, precum și avantajelor utilizării acestuia din punct de vedere al costurilor de epurare, gradului de dificultate al operării proceselor și impactului asupra reziduurilor generate. Astfel, nămolul granular se caracterizează printr-o viteză ridicată de sedimentare, cuprinsă uzual între 18 și 32 m/h (Adav *et al.*, 2008), cu valori de până la 50 – 90 m/h (Gao *et al.*, 2011). Spre deosebire de granule, nămolul activ convențional sedimentează cu o viteză cuprinsă între 7 și 11 m/h (Zheng *et al.*, 2005). De asemenea, particularitățile structurale ale granulelor permit realizarea simultană a proceselor aerobe și anaerobe (de Kreuk *et al.*, 2005) și contribuie la scăderea cantității nămolului rezidual. În plus, prin operarea proceselor de epurare utilizând nămol granular se reduce gradul de complexitate al infrastructurii stațiilor de epurare prin eliminarea decantorului și simplificarea treptei biologice de epurare, contribuind astfel la scăderea costurilor de implementare, menținere și de operare a stației (Kreuk *et al.*, 2007; Palmeiro-Sanchez *et al.*, 2013).

Cu toate acestea, în comparație cu nămolul granular, procesele cu nămol activ convențional sunt predominante în stațiile de epurare în momentul actual (Zhang *et al.*, 2014).

Planul de gestionare a reziduurilor de nămol activ. Îndeplinirea obiectivului stațiilor de epurare trebuie să fie în acord cu principiul sustenabilității sistemelor socio - ecologice.

Configurația convențională a fluxului de epurare a apelor uzate (utilizând nămol activ) nu răspunde criteriilor abordării sustenabile prin efectele negative distribuite în mod direct / indirect asupra componentelor ecosferei. Una din cele mai mari dificultăți este cea a nămolului activ în exces (Ionescu & Ionescu, 2014), aceasta fiind o problemă globală „deschisă”. Intensificarea activităților socio – economice, precum și diversificarea sistemelor de producție, stimulează creșterea volumului apelor uzate evacuate și, implicit, a cantității nămolului rezidual. De asemenea, modernizarea infrastructurii stațiilor de epurare și extinderea sistemelor de canalizare, simultan cu implementarea cerințelor Directivei 91/271/CEE privind epurarea apelor uzate urbane, conduce la creșterea numărului stațiilor de epurare, dar și a cantității deșeurilor de nămol rezidual.

Nămolul activ rezultat din procese de epurare reprezintă un deșeu generat continuu, a cărui producție medie este de 0,4 – 0,5 kg_{s.u.v.}/kg CCO (Khursheed & Kazmi, 2011) sau 218 kg_{s.u.}/10⁶ L apă uzată (Velaquez-Orta & Graham, 2012). Raportul capătă semnificație precizând faptul că la nivel național, în anul 2009, a fost înregistrată evacuarea a 1,4 mlrd m³ apă uzată (ANAR, 2012). La nivel european, în anul 2005, cantitatea de nămol rezidual s-a ridicat la aproximativ 9,4 mln tone_{s.u.} (Kalderis *et al.*, 2010), la momentul actual atingându-se un prag de producție de 10 mln tone_{s.u.}/an. În anul 2012, cea mai mare producție de nămol din Europa a fost cea a Spaniei, Germaniei și Marii Britanii de 2,57 mln tone_{s.u.}, 1,84 mln tone_{s.u.} și respectiv 1,08 mln tone_{s.u.} (Burducea *et al.*, 2016). În România, producția de nămol raportată în anul 2005 a fost de aproximativ 68 000 tone_{s.u.} (Kelessidis & Stasinakis, 2012), crescând până în anul 2010 la 126 200 tone_{s.u.}, nivelul înregistrat în anul 2013 fiind de 172 400 tone_{s.u.} (Eurostat, 2016). Conform analizelor statistice efectuate de Administrația Națională „Apele Române”, se preconizează că în anul 2018, reziduurile de nămol vor atinge o cotă de producție de aproximativ 521 000 t_{s.u.} (ANAR, 2012). Această creștere substanțială a cantității de nămol activ este justificată de evoluția numărului de stații de epurare de la 751 în 2006 la 1 172 stații în prezent (Schumacher & Feodorov, 2016).

Conform Hotărârii de Guvern nr. 856/2002 privind evidența gestiunii deșeurilor și pentru aprobarea listei cuprinzând deșeurile, inclusiv deșeurile periculoase, modificată și completată prin Ordonanța de Urgență nr. 68/2016 în corespondență cu Decizia Comisiei 2014/955/UE, nămolul rezultat din procese de epurare a apelor uzate reprezintă un deșeu a cărui potențial de valorificare este limitat de:

1. costurile ridicate alocate proceselor de tratare și eliminare (Racovițeanu & Predescu, 2016), care pot atinge chiar și 50 % din costurile totale de operare (AM POS Mediu, 2012),
2. riscul contaminării biologice și chimice a ecosistemelor terestre și acvatice (Perez-Elvira *et al.*, 2006) și
3. restricțiile de aplicare impuse printr-o serie de acte legislative: Ordinul 344/2004 pentru aprobarea Normelor tehnice privind protecția mediului și în special a solurilor, atunci când se

utilizează nămolurile de epurare în agricultură (ordin modificat și completat prin Ordinul 27/2007 și care transpune Directiva Consiliului 86/278/CEE); Ordonanța de Urgență a Guvernului nr. 195/2005 privind protecția mediului, aprobată prin Legea nr. 265/2006; Directiva 91/271/CEE privind epurarea apelor uzate urbane; Directiva Consiliului 99/31/CE privind depozitele de deșeurii; Directiva 2008/98/CE privind deșeurile și de abrogare a anumitor directive; Directiva 91/676/CEE privind protecția apelor împotriva poluării cu nitrați proveniți din surse agricole; Directiva 2000/76/CE privind incinerarea deșeurilor; Hotărârea de Guvern nr. 349/2005 privind depozitarea deșeurilor; Hotărârea de Guvern nr. 1403/2007 privind refacerea zonelor în care solul, subsolul și ecosistemele terestre au fost afectate etc.

Elaborarea normelor legislative și implementarea politicilor naționale în acord cu legislația internațională în vigoare este obligatorie având în vedere producția nămolului rezidual, conceptul actual de epurare, necesitatea asigurării calității resurselor de apă, conservarea acestora, protejarea sănătății umane și prevenirii poluării ecosistemelor. În România, importanța asigurării unui control al modului de gestionare a deșeurilor, inclusiv nămol, concomitent cu necesitatea creșterii potențialului de valorificare a acestora în regim securizat, este subliniată de lista principalilor factori decizionali implicați: Ministerul Mediului, Apelor și Pădurilor; Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale; Ministerul Sănătății; Ministerul Administrației și Internelor; operatorii stațiilor de epurare a apelor uzate; industria alimentară; publicul etc. (AM POS Mediu, 2012).

În Europa nu este delimitată o soluție standard de valorificare a nămolului rezidual. Cerințele prevăzute în cadrul Directivelor Europene și-au pus amprenta asupra practicilor de gestionare ale fiecărui stat, înregistrându-se în prezent o tendință de reducere a cantității de nămol rezidual depozitat și îndreptarea către opțiuni de gestionare durabile. De exemplu, din anul 1998 și până în anul 2005, cantitatea de nămol depozitată la nivel european a scăzut de la 25 % la 17 % din totalul cantității de nămol produse (Kelessidis & Stasinakis, 2012).

În 2012 în România 90,7 % din cantitatea totală de nămol rezidual înregistrată a fost depozitată în incinta stațiilor de epurare, 9,1 % fiind eliminată la depozitele de deșeurii și doar aproximativ 0,2 % a fost utilizată în agricultură (AM POS Mediu, 2012) - procent care a crescut la 4,65 % până în anul 2013 (Eurostat, 2016). Acesta este însă semnificativ mai mic decât media de 41% înregistrată la nivel european în anul 2005 (Kelessidis & Stasinakis, 2012). Depozitarea in-situ a nămolului reprezintă însă o soluție temporară, fiind limitată de suprafețele disponibile în stațiile de epurare. Având în vedere prevederile Directivei 99/31/CE, referitoare la obligația statelor membre ale Uniunii Europene de a reduce cantitatea de deșeurii depozitate cu 65 % până în anul 2020, în România se preconizează o creștere, până la aceeași dată, a fracției de utilizare a nămolului rezidual în agricultură de aproximativ 50 % simultan cu eliminarea opțiunii de depozitare a acestuia (AM POS Mediu, 2012).

Alte modalități de valorificare a nămolului rezidual sunt: co-incinerarea cu alte deșeuri solide, caz în care nămolul rezidual reprezintă o sursă de energie pentru procesele de fabricare a cimentului sau termocentrale, în România fiind cunoscute fabrici de ciment autorizate pentru arderea deșeurilor utilizând nămol rezidual (AM POS Mediu, 2012); compostarea; digestia anaerobă, cu obținerea de metan utilizat pentru reducerea costurilor energiei din stațiile de epurare; utilizarea în silvicultură; această practică prezintă viabilitate doar la nivel local, aplicarea nămolului rezidual pe suprafețe forestiere fiind restricționată sau chiar interzisă în unele țări, precum ar fi: Austria, Belgia, Germania etc. (Kelessidis & Stasinakis, 2012); reabilitarea solurilor degradate prin practici industriale etc. (Iancu *et al.*, 2014).

I.2. Bioindicatori ai proceselor de epurare a apelor uzate cu nămol activ

Nămolul activ utilizat în epurarea apelor uzate este compus din *flocoane* (Fig. I-2a), fiecare entitate fiind alcătuită din două componente: (1) componenta de natură biologică, reprezentată de *comunități de bacterii* și (2) componenta de natură chimică, constituită din *substanțe polimerice extracelulare* și *compuși chimici* adsorbiți la nivelul entităților. Substanțele polimerice extracelulare (SPE) (proteine, acizi nucleici, lipide, glucide, substanțe humice etc.) se acumulează în structura flocoanelor ca urmare a dezvoltării populațiilor de bacterii (Wilen *et al.*, 2008), iar concentrația acestora este direct corelată cu vârsta nămolului (timpul de retenție a solidelor). Acumularea substanțelor polimerice extracelulare imprimă flocoanelor o culoare maronie, intensitatea culorii fiind, de asemenea, direct corelată cu timpul de retenție a solidelor. Creșterea producției SPE este favorizată și de procesele de liză celulară (Sutherland, 2001). Din punct de vedere al integrității flocoanelor, substanțele polimerice extracelulare prezintă un interes deosebit deoarece constituie una dintre componentele structurale de bază ale flocoanelor nămolului activ (Lin *et al.*, 2013) contribuind la agregarea populațiilor de bacterii.

În structura flocoanelor pot fi întâlnite populații de bacterii filamentoase, ce reprezintă „coloana vertebrală” a entităților (Jenkins *et al.*, 2004) deoarece guvernează particularitățile morfologice și structurale ale flocoanelor, favorizează creșterea gradului de compactare a agregatelor și cresc stabilitatea acestora. O dezvoltare pronunțată a populațiilor (sau a unei populații) de bacterii filamentoase în cadrul flocoanelor va imprima entităților o formă neregulată (Gerardi, 2006).

Dezvoltarea comunității bacteriilor favorizează dezvoltarea populațiilor consumatorilor, reprezentați de *protozoare* și *metazoare*, ambele grupuri taxonomice fiind, de asemenea, componente ale biomasei nămolului activ. Protozoarele și metazoarele contribuie la menținerea unui control asupra biomasei bacteriene (inclusiv asupra bacteriilor coliforme) și la reducerea gradului de încărcare a efluentului în suspensii de natură biologică (Madoni, 2003).

Performanța de epurare a apelor uzate, precum și variația parametrilor fizici, chimici și biologici asociați sunt evaluate prin aplicarea unor procedee standard. În cazul utilizării nămolului activ, eficiența de îndepărtare a poluanților și condițiile de operare aplicate sau instalate pe fluxul de epurare pot fi exprimate în mod indirect analizând structura comunității bioindicatorilor (Perez-Uz *et al.*, 2010), reprezentați de populații de protozoare și metazoare dezvoltate în biomasa nămolului activ.

Atunci când se analizează calitatea nămolului activ, se face apel la una din trei clase: nămol de calitate bună, nămol de calitate moderată și nămol de calitate slabă. În general, o calitate bună a nămolului activ este indicată de o biodiversitate ridicată a comunității bioindicatorilor (numărul indivizilor depășind 10^6 unități/mL), completată de existența unui echilibru între efectivul populației diferiților taxoni (Madoni, 2003). Atunci când, în cadrul biocenozei predomină o anumită specie, prezența acesteia ne poate indica: calitatea influentului (încărcarea organică, aportul de nutrienți, prezența unor substanțe toxice etc.), procese specifice de epurare (nitrificare, denitrificare, degradarea materiei organice etc.), condiții de operare (timpul de retenție hidraulică, timpul de retenție a solidelor, capacitatea de oxigenare a mediului de reacție etc.), performanța de epurare și / sau faza de dezvoltare în care se află sistemul biologic.

Investigațiile derulate în domeniu au evidențiat complexitatea caracterului de bioindicator în procese de epurare a apelor uzate. Astfel, o frecvență ridicată a speciilor de flagelate poate fi și un indicator al unei eficiențe ridicate de îndepărtare a azotului (Perez-Uz *et al.*, 2010). Prin urmare, investigațiile care includ studiul bioindicatorilor necesită și o analiză amănunțită a particularităților fluxului de epurare și implicit a variației parametrilor fizico-chimici de interes.

În cazul aplicării biotehnologiei bazate pe microalge pentru epurarea apelor uzate, nu au fost identificate studii realizate asupra bioindicatorilor în vederea stabilirii impactului generat de integrarea biomasei microalgelor pe fluxul de epurare asupra acestora.

I.3. Biomasa microalgelor în contextul dezvoltării sistemelor socio-economice

. Începând cu a doua jumătate a secolului al XX-lea, a fost demarată utilizarea biomasei microalgelor în mai multe sectoare industriale, precum: industria farmaceutică și cea cosmetică (Mata *et al.*, 2010). De asemenea, conștientizarea caracterului limitativ al resurselor de combustibili fosili a condus la creșterea numărului studiilor destinate obținerii de energie din biomasa microalgelor, un progres deosebit în acest domeniu fiind obținut în anii '70 ai secolului al XX-lea (Spolaore *et al.*, 2006).

Perioada următoare a fost caracterizată de diversificarea sistemelor de cultivare a microalgelor, acestea fiind clasificate în: (1) sisteme de cultivare închise, reprezentate de fotobioreactoare (tubulare, verticale, orizontale etc.) și (2) sisteme de cultivare deschise (bazine de

cultivare), acestea din urmă fiind bazine cu adâncimea maximă de 0,5 – 0,6 m și cu o suprafață mare, atingând chiar și câteva hectare (Lam & Lee, 2013). În literatura de specialitate, bazinele sunt cunoscute sub termenul de „*High Rate Algal Ponds - HRAP*” (*Bazine de cultivare intensivă a microalgelor*).

Dezvoltarea și perfecționarea tehnologiilor industriale au contribuit la susținerea producției biomasei microalgelor, precum și la diversificarea căilor de valorificare a acesteia. Interesul adresat acestei categorii de resurse regenerabile a fost evidențiat prin volumul ridicat de producție înregistrat la nivel global (McHugh, 2003). De exemplu, la scară globală, producția medie anuală obținută prin cultivarea microalgelor *Chlorella* se ridică la 2 000 tone_{s.u.}, iar cea asociată biomasei speciilor *Spirulina* sp. este mai mare de 40 000 tone_{s.u.} (Ahsan *et al.*, 2008).

În primul deceniu al secolului al XXI-lea s-a înregistrat o creștere remarcabilă a numărului articolelor științifice destinate procedeelelor de obținere a diferitor produși utili din biomasa microalgelor, căilor de valorificare a biomasei și serviciilor obținute simultan cu implementarea sistemelor de cultivare (Rodolfi *et al.*, 2009; Brennan & Owende, 2010; Mata *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Acest aspect s-a datorat în principal particularităților biochimice ale taxonilor microalgali care, prin analiză și valorificare, pot determina un impact cu efecte economice, sociale și ecologice pozitive materializate prin:

- Reducerea suprafeței de cultivare raportată la cea alocată culturilor agricole utilizate în același scop (Rodolfi *et al.*, 2009).
- Gama largă de produși valoroși care pot fi obținuți prin procesarea biomasei microalgelor, dintre aceștia menționându-se: acizii grași polinesaturați; pigmentii (Garcia-Perez *et al.*, 2011); uleiuri și antioxidanți.
- Diversitatea ridicată a aplicațiilor biomasei microalgelor:
 - utilizarea biomasei microalgelor în sisteme agricole sub formă de fertilizator și în acvacultură, cu rol de supliment nutritiv pentru susținerea creșterii producției piscicole, a gradului de toleranță a speciilor la factori de stres și scăderea costurilor de operare (Brennan & Owende, 2010; Mata *et al.*, 2010);
 - utilizarea biomasei microalgelor pentru obținerea de biocombustibili. Această tematică a beneficiat de interes deosebit în contextul micșorării resurselor de combustibili fosili și conștientizării caracterului limitativ al acestora - aspecte care au încurajat identificarea și exploatarea unor resurse regenerabile alternative de energie. Ca rezultat al studiilor efectuate, *biomasa microalgelor* a fost recunoscută *a treia sursă de energie regenerabilă* după culturile agricole și reziduurile lignocelulozolitice furnizate de sistemele agricole și forestiere (Rosch *et al.*, 2009; Brennan & Owende, 2010; Gupta *et al.*, 2014). Astfel, prin valorificarea biomasei microalgelor se poate obține: biohidrogen (Ghirardi *et al.*, 2000), metan, etanol (Harun *et al.*, 2010;

John *et al.*, 2011), butanol și biodiesel (Craggs *et al.*, 2011; Ghasemi *et al.*, 2012). Cultivarea microalgelor pentru obținerea biocombustibililor în detrimentul utilizării culturilor agricole este motivată în principal de:

- productivitatea ridicată a culturilor microalgelor raportat la unitatea de suprafață;
 - toleranța ridicată a microalgelor la condițiile habitatului, taxonii putând fi cultivați în sisteme acvatice caracterizate prin diverse stări ecologice;
 - nu este necesară aplicarea ierbicidelor / pesticidelor în sistemele de cultivare;
 - posibilitatea de valorificare a biomasei reziduale în diferite sectoare comerciale etc.
- (Rodolfi *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2015).

Conform rezultatelor analizelor statistice se estimează că prin valorificarea energetică a biomasei microalgelor s-ar putea susține până la 25 % din necesarul de energie la nivel mondial (Barros *et al.*, 2015). Un avantaj important oferit de biomasa microalgelor constă în posibilitatea obținerii consecutive, din același stoc de biomasă, a mai multor tipuri de resurse energetice. De exemplu, poate fi parcursă următoarea secvență de valorificare: (1) obținerea metanului prin digestie anaerobă urmată de: (2) extracția de lipide în vederea generării de biodiesel, (3) obținerea de etanol și butanol prin fermentarea carbohidraților și (4) conversia termochimică a biomasei rezultate, cu producere de cărbuni (Heubeck *et al.*, 2007), aceștia din urmă putând fi utilizați în agricultură sub formă de îngrășământ, dar și ca adsorbant al compușilor cu azot și fosfor, asigurând prevenirea / diminuarea pierderilor nutrienților în sisteme acvatice (Lehmann *et al.*, 2006).

- Serviciile furnizate prin cultivarea microalgelor:
 - diminuarea emisiilor de gaze cu efect de seră, în principal dioxidul de carbon (CO₂) - compusul fiind asimilat din troposferă sau direct din emisii industriale de microalgele fotoautotrofe și mixotrofe (Borkenstein *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2014). Astfel se reduce cu aproximativ 40 % cantitatea de gaz ce trebuie captat la nivel global (Hannon *et al.*, 2010). Impactul poate fi susținut și prin utilizarea biodiesel-ului obținut din microalge, exploatarea acestuia asigurând, în comparație cu biodiesel-ul convențional, reducerea emisiilor de monoxid de carbon (CO), oxizi de azot (NO_x) (Li *et al.*, 2008), oxizi de sulf (SO_x) și hidrocarburi (Delucchi, 2003);
 - reținerea azotului molecular (N₂) de cianobacterii, proces realizat cu succes în sisteme agricole în scopul creșterii productivității culturilor (Roger, 2004);
 - creșterea eficienței de îndepărtare a nutrienților și a metalelor grele din apele uzate (Wang *et al.*, 2010), prevenindu-se astfel apariția fenomenului de eutrofizare sau contaminarea ecosistemelor acvatice;
 - bioremedierea solurilor poluate (Kantachote *et al.*, 2004), unele specii de microalge evidențiindu-se prin capacitatea de a degrada o gamă largă de poluanți organici (Ghasemi *et al.*, 2011).

I.4. Biotehnologie alternativă de epurare a apelor uzate utilizând microalge

Primele studii asupra utilizării microalgelor în procese de epurare a apelor uzate au fost raportate în perioada anilor '50 ai secolului al XX-lea (Oswald *et al.*, 1955). Luând în considerare rolul primar al microalgelor în generarea fenomenului de eutrofizare, conceptul a fost propus în scopul creșterii eficienței de îndepărtare a formelor anorganice ai azotului și fosforului din efluenți înainte de deversarea acestora în receptorii naturali (Arbib *et al.*, 2014). Aproximativ un deceniu mai târziu, biomasa utilizată în treapta avansată de epurare propusă a fost denumită „*biomasa algelor active*” (McGriff & McKinney, 1972), aceasta fiind constituită din microalge, dar și populații de bacterii adaptate condițiilor treptei de epurare. Termenul a fost definit luând în considerare denumirea biomasei convențional utilizate în epurarea apelor uzate – „*nămol activ*”, iar prezența microalgelor, precum și rolul major al acestora în treapta de epurare implementată au susținut înlocuirea termenului „*nămol*” cu „*alge*”. În plan internațional, sistemul biologic mixt alcătuit din microalge și bacterii, utilizat pentru epurarea apelor uzate, se identifică sub termenul de „*activated algae*”.

Abilitatea taxonilor microalgali de a asimila cantități importante de nutrienți (în principal, azot și fosfor) a susținut utilizarea biomasei microalgelor exclusiv în treapta terțiară de epurare pentru o perioadă îndelungată de timp (Zamani *et al.*, 2012). Simultan cu evoluția studiilor în această direcție, s-a realizat extinderea conceptului propunându-se integrarea microalgelor în treapta secundară de epurare și evitarea utilizării taxonilor în treapta terțiară, justificarea fiind riscul creșterii încărcării organice a efluentului ca rezultat al realizării procesului de fotosinteză (Tam & Wong, 1989; Wang *et al.*, 2010).

Includerea speciilor microalgale în treapta secundară de epurare a apelor uzate utilizând nămol activ conduce la realizarea unor fluxuri metabolice bidirecționale între componentele biologice majore implicate (microalge / bacterii) (*Fig. 1*), relațiile dezvoltate (în principal *relații de simbioză*) fiind descrise încă de la începutul implementării conceptului biotehnologiei (Kouzuma & Watanabe, 2015; Ramanan *et al.*, 2016). Sintetic, *microalgele fotoautotrofe / mixotrofe utilizează lumina pentru realizarea procesului de fotosinteză, în urma căruia rezultă oxigenul (eliberat în perioada derulării ciclului de lumină) care este utilizat de comunitatea bacteriilor heterotrofe aerobe pentru obținerea de energie prin degradarea materiei organice* (Duka & Cullaj, 2009; Subashchandrabose *et al.*, 2011). *Produșii de reacție finali rezultați din reacțiile de degradare (în principal: CO_2 , NH_4^+ , PO_4^{3-}) sunt asimilați de microalge pentru susținerea dezvoltării celulare și implicit pentru realizarea proceselor de fotosinteză. CO_2 este captat în perioada desfășurării ciclului de întuneric* (Masojidek *et al.*, 2013).

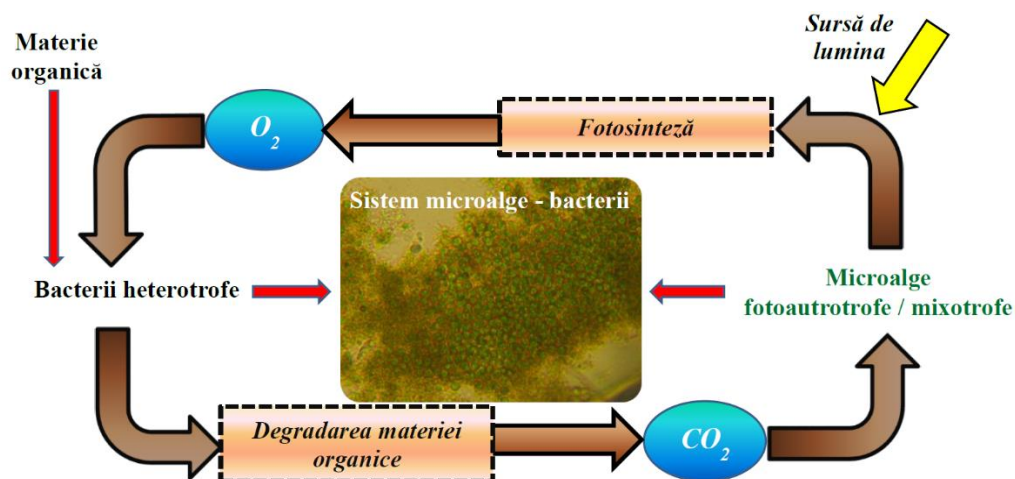


Figura 1.

Relația de simbioză stabilită pe parcursul epurării apelor uzate între taxoni microalgali și populații de bacterii specifice.

Relația metabolică stabilită între populațiile de microalge și comunitatea bacteriilor este exploatată în domeniul epurării apelor uzate datorită avantajelor identificate și validate pe parcursul testării biotehnologiei alternative propuse (Lee & Han, 2016; Pittman *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Deși biotehnologia bazată pe microalge este cunoscută de aproximativ șase decenii, o creștere considerabilă a numărului de studii în domeniu a fost observată în ultimul deceniu, aceasta fiind guvernată de sectorul investițiilor, importanța acordată strategiei de prevenire / diminuare a impactului activităților antropice și necesitatea identificării unor resurse alternative de energie. Conform rezultatelor științifice publicate, în ultimii ani au fost conduse experimente care s-au axat pe testarea speciilor de microalge în procese de epurare a diferitor categorii de ape uzate (menajere, industriale) și obținere de bioenergie, prin acestea evidențiindu-se faptul că în cazul integrării microalgelor în treapta biologică de epurare pot fi îndeplinite simultan două strategii.

În primul caz se realizează înlocuirea fertilizatorilor comerciali cu nutrienți asigurați de apele uzate (Aravantinou *et al.*, 2013). Acest avantaj oferă posibilitatea (1) **reducerii costurilor de producție a biomasei microalgelor cu aproximativ 10 – 20 %** (Bhatnagar *et al.*, 2011), fertilizatorii deținând ponderea cea mai mare din cheltuieli, aceștia fiind necesari în cantități ridicate în vederea obținerii unei producții maxime

În al doilea caz, se evidențiază beneficiile pe care le pot obține operatorii stațiilor de epurare, acestea constând în:

(2) **creșterea eficienței de îndepărtare a poluanților din ape uzate** (în principal a azotului, fosforului și a metalelor) (Chaneva *et al.*, 2008). Majoritatea studiilor conduse în cadrul domeniului biotehnologiei bazate pe microalge au constatat în **testarea individuală a componentei**

microalgale în procese de epurare a apelor uzate (în lipsa bacteriilor), în vederea evaluării eficienței de utilizare a diferitor taxoni (Hongyang *et al.*, 2011). Prin analiza rezultatelor științifice raportate, s-a ajuns la următoarea concluzie: pentru a obține o performanță ridicată de epurare, este necesară **aplicarea unui timp ridicat de retenție hidraulică**, care poate varia între 2 și chiar 14 zile, depășindu-se astfel valoarea parametrului aplicată în cazul epurării aerobe a apelor uzate utilizând nămol activ, aceasta fiind cuprinsă, în mod frecvent, între 6 și 24 ore (Noyes, 1994).

Analiza literaturii de specialitate adresate direcției științifice a epurării apelor uzate utilizând microalge a evidențiat faptul că **majoritatea experimentelor au fost efectuate utilizând medii sintetice**, a căror compoziție a reflectat caracteristicile apelor uzate de interes. În alte cazuri, cercetătorii au recurs la **autoclavarea surselor de apă uzată**, procesele de epurare având loc cu **utilizarea de culturi pure de microalge și în lipsa bacteriilor (nămolului activ)** (Min *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2013). Aceste categorii de studii sunt foarte importante deoarece reflectă eficiența de utilizare a diferitor taxoni în procesul epurării apelor uzate; de altfel, cercetările efectuate pe culturi pure de microalge ocupă tematica dominantă a studiilor conduse în această direcție. În cazul câtorva teste efectuate utilizând atât biomasă bacteriană, cât și cea microalgală, **inoculul a fost obținut prin combinarea populațiilor de microalge cu nămol activ provenit din stații de epurare. Nu au fost identificate studii experimentale în care sistemul mixt să prezinte caracteristici native, fiind dezvoltat pe parcursul derulării proceselor de epurare, în lipsa inoculării cu nămol activ.**

(3) Realizarea obiectivului major al operatorilor stațiilor de epurare constând în **asigurarea calității efluenților**, fiind astfel susținut și obiectivul global adresat conservării resurselor de apă.

(4) **Diminuarea emisiilor gazelor cu efect de seră** rezultate din procesul convențional de epurare, precum și a celor provenite din troposferă, în special fiind vizat dioxidul de carbon (CO₂) (Razzaka *et al.*, 2013).

(5) Introducerea biotehnologiei bazată pe microalge în procesul epurării apelor uzate nu influențează pozitiv doar costurile de cultivare a biomasei, dar și cele atribuite operării stațiilor de epurare. Cel din urmă avantaj constă în **eliminarea costurilor asociate aerării mecanice** a treptei aerobe de epurare, deoarece sursa de oxigen necesară desfășurării proceselor aerobe poate fi asigurată prin fotosinteză de microalgele fotoautotrofe / mixotrofe implicate (Park *et al.*, 2011). Studiile experimentale au arătat că taxonii microalgali au capacitatea de a suprasatura mediul de reacție în oxigen, valoarea concentrației parametrului putând atinge chiar și 20 mg O₂/L (Craggs *et al.*, 2012). Costurile alocate proceselor de aerare mecanică a treptei aerobe de epurare constituie aproximativ 50 % din totalul costurilor de operare. Importanța acestui avantaj derivă și din sintaxa conform căreia scăderea costurilor de operare reprezintă una dintre strategiile majore ale operatorilor stațiilor de epurare, precum și obiectiv de cercetare în domeniu (Leu *et al.*, 2009).

Eliminarea costurilor de aerare și capacitatea microalgelor de a reduce concentrația anumitor poluanți reprezintă suportul utilizării biomasei microalgelor în procese de epurare a apelor uzate.

(6) Integrarea microalgelor în procese cu nămol activ oferă **posibilitatea îmbunătățirii practicilor de gestionare a biomasei reziduale.**

(7) Un alt beneficiu care poate fi obținut prin utilizarea biomasei microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate constă în **scăderea efectivului populațiilor bacteriilor coliforme** din mediul de reacție, efectul fiind facilitat de: creșterea temperaturii mediului de reacție, creșterea valorii pH-ului peste 9 și suprasaturarea mediului de reacție în oxigen (Munoz & Guiesse, 2006).

Conform datelor prezentate, s-a evidențiat faptul că **integrarea biotehnologiei bazată pe microalge în procese convenționale de epurare a apelor uzate poate reprezenta o soluție alternativă sustenabilă, adresată în vederea rezolvării limitelor biotehnologiei convenționale**, afirmația fiind susținută prin cumularea rezultatelor studiilor identificate, acestea contribuind la crearea unei imagini integrate a fluxului de epurare alternativ, identificându-se avantaje ale proceselor pornind din treapta biologică de epurare până la cea de gestionare a biomasei reziduale prin căi de valorificare propuse (ilustrate schematic în *Figura 2*), acestea din urmă fiind cerute în cadrul sistemelor socio - economice prin creșterea cerințelor pieței, creșterea consumului de resurse, precum și de caracterul limitativ al stocurilor de combustibili fosili.

Pentru a obține o performanță ridicată de epurare a apelor uzate, trebuie să se asigure condiții optime de operare, care vor menține tendința de dezvoltare a sistemului microalge – bacterii (nămol activ). Deoarece microalgele reprezintă o componentă integrată în cadrul proceselor de epurare, care, în lipsa aerării mecanice, trebuie să asigure realizarea proceselor aerobe, discuțiile din cadrul lucrării curente au vizat prezentarea influenței diferitor parametri de proces asupra activității celulelor microalgale. Intensitatea luminoasă și concentrația dioxidului de carbon reprezintă parametrii operaționali principali ai proceselor de epurare a apelor uzate bazate pe utilizarea taxonilor microalgali fotoautotrofi / mixotrofi (Bouterfas *et al.*, 2002; Rusten & Sahu, 2011). În cadrul literaturii științifice au fost identificate studii adresate investigării efectului diferitor valori ale intensității luminoase asupra activității fotosintetice a microalgelor și / sau asupra performanței de epurare a apelor uzate utilizând microalge. Însă, prin analiza organizării experimentelor, s-a observat că acestea au fost conduse utilizând culturi pure de microalge, în lipsa bacteriilor, în medii de cultură sintetice sau ape uzate autoclavate (Min *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2013). Astfel, **în cazul utilizării sistemului mixt microalge - bacterii pentru epurarea apelor uzate, este subliniată necesitatea identificării efectului generat de prezența biomasei bacteriene asupra activității fotosintetice a microalgelor și implicit asupra intervalului optim al intensității luminoase asociat sistemului biologic de interes.**

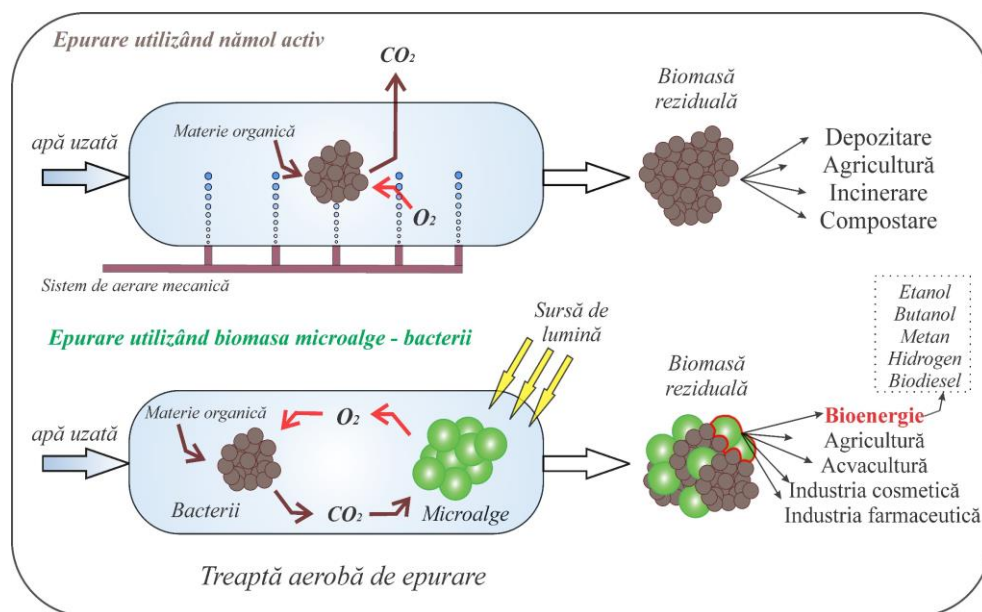


Figura 2.

Avantajele care pot fi obținute prin implementarea fluxului de epurare care include biotehnologia bazată pe microalge în comparație cu biotehnologia convențională bazată pe procese cu nămol activ.

pH-ul reprezintă un alt parametru de operare important. În cazul sistemelor de epurare biologică a apelor uzate care includ microalge, consumul dioxidului de carbon și a bicarbonaților de către taxoni determină creșterea valorii pH-ului mediului de reacție prin eliberarea radicalilor hidroxid (HO^-) (de Godos *et al.*, 2009; Markou & Georgakakis, 2011). O creștere a valorii indicatorului peste 9 contribuie la (1) creșterea eficienței de îndepărtare a azotului, prin procese de volatilizare a amoniacului, (2) precum și a fosforului, ca rezultat al precipitării ortofosfaților sub formă de săruri de calciu și magneziu (Park *et al.*, 2011). Însă, pentru a asigura viabilitatea sistemului mixt microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate, valoarea pH-ului trebuie menținută sub pragul de 8,5 pentru a evita riscul de a compromite performanța de epurare (Azov *et al.*, 1982) ca rezultat al expunerii biomasei la valori necorespunzătoare ale parametrului și contaminării mediului de reacție cu amoniac (de Godos *et al.*, 2010). Alți parametri de operare importanți sunt: fotoperiodicitatea, raportul între concentrația biomasei microalgelor și cea a bacteriilor și încărcarea în nutrienți și materie organică a influentului.

I.5. Limita majoră a biotehnologiei bazate pe microalge

Deși numărul studiilor de cercetare derulate în cadrul direcției vizate a crescut semnificativ în ultimii ani, majoritatea investigațiilor au fost efectuate la nivel de laborator. Limitarea extinderii biotehnologiei bazată pe microalge pentru epurarea apelor uzate este susținută de o problemă majoră cu care se confruntă aceasta la momentul actual. Bariera dezvoltării biotehnologiei la scară

industrială este reprezentată de costurile ridicate asociate treptei de recuperare a biomasei microalgelor din efluent / mediul de cultură (Batten *et al.*, 2013), acestea situându-se între 20 și 30 % din costurile alocate producției biomasei în sisteme de cultivare specifice (Grima Molina *et al.*, 2003). Problema este cu atât mai importantă, cu cât caracterul nefezabil din punct de vedere economic al treptei de recuperare a taxonilor compromite: (1) utilizarea microalgelor în sectorul epurării apelor uzate, (2) dezvoltarea sectorului producției biomasei microalgelor (Coward *et al.*, 2013), dar și (3) extinderea sectorului de producție a energiei regenerabile utilizând microalge (Gonzalez-Fernandez & Ballesteros, 2013).

Factorii care stau la baza creșterii costurilor asociate treptei de recuperare a biomasei microalgelor din efluent / mediul de cultură sunt: (1) dimensiunea celulelor microalgale, majoritatea speciilor frecvent testate în procese de epurare a apelor uzate și utilizate în sectorul de producție a biomasei microalgelor (printre care se enumeră specii ale genurilor: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, etc.) (Rawat *et al.*, 2011) având diametrul celular mai mic de 30 μm (Rashid *et al.*, 2013), caracteristică ce este responsabilă pentru (2) capacitatea scăzută de sedimentare a celulelor microalgale, viteza de sedimentare a taxonilor fiind mai mică de 10^{-6} m/h (Granados *et al.*, 2012), și pentru (3) similaritatea densității celulelor microalgale cu cea a apei (Craggs *et al.*, 2011), ceea ce îngreunează separarea acestora din mediul apos.

Avantajele care pot fi obținute prin valorificarea biomasei microalgelor susțin avansarea cercetărilor adresate treptei de recuperare a taxonilor din mediul de cultură / efluent cu scopul identificării unei soluții eficiente din punct de vedere economic. În prezent sunt cunoscute câteva metode de recuperare a biomasei microalgelor din mediul de reacție, majoritatea acestora bazându-se pe principii fizico-chimice. Din categoria tehnicilor de recuperare aplicate frecvent în domeniul biotehnologiei bazate pe microalge se identifică: centrifugarea, coagularea / flocularea chimică, filtrarea (micro- și ultrafiltrarea) și sedimentarea (Craggs *et al.*, 2011). Aplicarea acestor tehnici nu asigură însă îndepărtarea completă a biomasei microalgelor, eficiența maximă atinsă în majoritatea cazurilor fiind situată în jurul valorii de 95 %. În vederea creșterii acestei eficiențe, se recurge la combinarea a cel puțin două metode de recuperare, în acest caz, valoarea parametrului putând atinge o performanță de 99 %.

Centrifugarea reprezintă metoda cel mai frecvent întâlnită în treapta de recuperare a celulelor microalgale asigurând concentrarea rapidă a biomasei, însă metoda se diferențiază printr-un consum ridicat de energie - aproximativ 3000 kWh/t biomasă (Schenk *et al.*, 2008), iar eficiența de îndepărtare a celulelor microalgale din mediul de cultură / efluent este dependentă de dimensiunea celulelor speciei.

Coagularea / flocularea chimică se aplică, în majoritatea cazurilor, combinat cu alte metode de recuperare, urmărindu-se creșterea gradului de agregare a celulelor microalgale. Metoda

prezintă însă numeroase dezavantaje, precum ar fi: contaminarea biomasei cu săruri metalice (Grima Molina *et al.*, 2003), costurile ridicate necesare achiziției reactivilor (Coward *et al.*, 2013), riscul de provocare a lizei celulare de anumiți reactivi (Olguin, 2012), sensibilitatea metodei la variațiile valorii pH-ului (Chen *et al.*, 2011), etc.

Tehnica **filtrării** mediului de cultură / efluentului este susținută în cazul în care speciile de microalge au diametrul celular mai mare de 70 μm (Schenk *et al.*, 2008) și reprezintă, în general, o etapă suplimentară aplicată pentru creșterea eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor, metoda fiind frecvent cuplată cu cea a coagulării / floculării chimice. Similar filtrării, **tehnica sedimentării** este deseori cuplată cu alte tehnici de recuperare. Aceasta este frecvent utilizată pentru recuperarea nămolului activ din stațiile de epurare și nu implică input-uri de energie sau costuri. În cazul în care reprezintă singura tehnică aplicată în treapta de recuperare a biomasei microalgelor, aceasta asigură eficiențe ridicate de îndepărtare doar în cazul utilizării speciilor cu diametrul celular mai mare de 40 μm , în celelalte cazuri fiind necesară creșterea timpului de aplicare a procedurii (zeci de ore / zile) (Zhang & Hu, 2012). În ultimii ani au fost obținute flocoane microalge - bacterii care ating o viteză de sedimentare cuprinsă între 0,28 și 0,42 m/h - performanță care a asigurat o eficiență de îndepărtare a biomasei microalgelor mai mare de 96 % (de Godos *et al.*, 2014).

Printre alte tehnici de recuperare a celulelor microalgale din medii apoase se identifică: recuperarea microalgelor prin ajustarea valorii pH-ului, imobilizarea celulelor microalgale, bioflocularea, peletizarea, etc.

Din totalitatea metodelor identificate și aplicate sau aflate în curs de testare la nivel internațional nu a fost delimitat un procedeu standard de îndepărtare a biomasei microalgelor, fapt susținut și de alți cercetători în domeniu (Coward *et al.*, 2013). Astfel, având în vedere caracteristicile identificate pentru fiecare tehnică de recuperare, este subliniată necesitatea optimizării acestora sau propunerii unor tehnici noi, care să răspundă cerințelor strategiei majore a biotehnologiei bazate pe microalge – aplicarea unei trepte de recuperare eficientă din punct de vedere al costurilor (Pragya *et al.*, 2013), care să asigure o performanță ridicată și care să se caracterizeze printr-o amprentă ecologică minimă.

În vederea susținerii acestui obiectiv, în ultimii ani numărul experimentelor de cercetare, adresate direcției de interes, a crescut semnificativ (Das *et al.*, 2016; Lananan *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Rezultatele experimentale evidențiază propunerea de soluții noi de recuperare a biomasei, printre care se numără utilizarea ionilor de magneziu (Mg^{2+}), asigurați direct prin influent, care, la o valoare specifică a pH-ului, pot favoriza creșterea vitezei de sedimentare a agregatelor celulelor microalgale (Smith *et al.*, 2012).

II. PROIECTUL DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ - CONTRIBUȚII ORIGINALE

II.1. Organizarea programului de cercetare

Epurarea apelor uzate reprezintă una dintre prioritățile strategiei privind conservarea resurselor naturale. În contextul dezvoltării actuale a societății și aplicării principiilor conceptului de sustenabilitate a complexelor socio-ecologice, biotehnologiile aplicate în epurarea apelor uzate trebuie să asigure calitatea efluenților cu un impact minim asupra ecosistemelor cu care interacționează. Prin analiza proceselor integrate pe fluxul de epurare a apelor uzate s-a evidențiat faptul că biotehnologia convențională, deși poate asigura reintroducerea resurselor de apă exploatate în circuitul hidrologic, nu este conformă principiilor actuale ale dezvoltării sustenabile. Prin urmare, efectele negative generate de emisia gazelor cu efect de seră, consumul ridicat de energie și programul deficitar de gestionare a reziduurilor de nămol activ evidențiază necesitatea realizării unui progres în cadrul sectorului epurării apelor uzate în vederea diminuării presiunilor și îmbunătățirii programelor specifice. În acest context, s-a produs dezvoltarea biotehnologiei bazate pe microalge în procese de epurare a apelor uzate, prin aplicarea acestora putându-se obține: reducerea costurilor alocate consumului de energie, diminuarea emisiilor gazelor cu efect de seră și îmbunătățirea programului de management al deșeurilor cu posibilitatea obținerii de resurse regenerabile de energie.

La nivel internațional, domeniul biotehnologiei bazate pe microalge se află în curs de dezvoltare. Simultan cu creșterea numărului rapoartelor științifice din acest domeniu, au fost evidențiate câteva limite care blochează extinderea biotehnologiei dincolo de granița de laborator. În acest sens, proiectul de cercetare care stă la baza prezentei teze s-a axat pe dezvoltarea biotehnologiei bazate pe microalge în procese de epurare a apelor uzate, în cadrul acestuia fiind prevăzute studii cu caracter inovativ și cu un nivel ridicat de interes și importanță, care, în același timp, vor contribui la plasarea domeniului biotehnologiei alternative propuse în sfera cercetărilor naționale. Modelul conceptual al proiectului de cercetare, prezentat succint în Fig. 3, reflectă principalele etape stabilite în cadrul programului de cercetare, cu evidențierea rezultatelor prognozate, precum și a căilor de valorificare a acestora.

Scopul proiectului de cercetare a constat în dezvoltarea biotehnologiei alternative de epurare a apelor uzate utilizând biomasa microalge – bacterii, prin activități de cercetare fundamentală și dezvoltare experimentală, cu obținerea de rezultate originale, cu impact asupra cunoașterii internaționale în domeniul științific investigat.

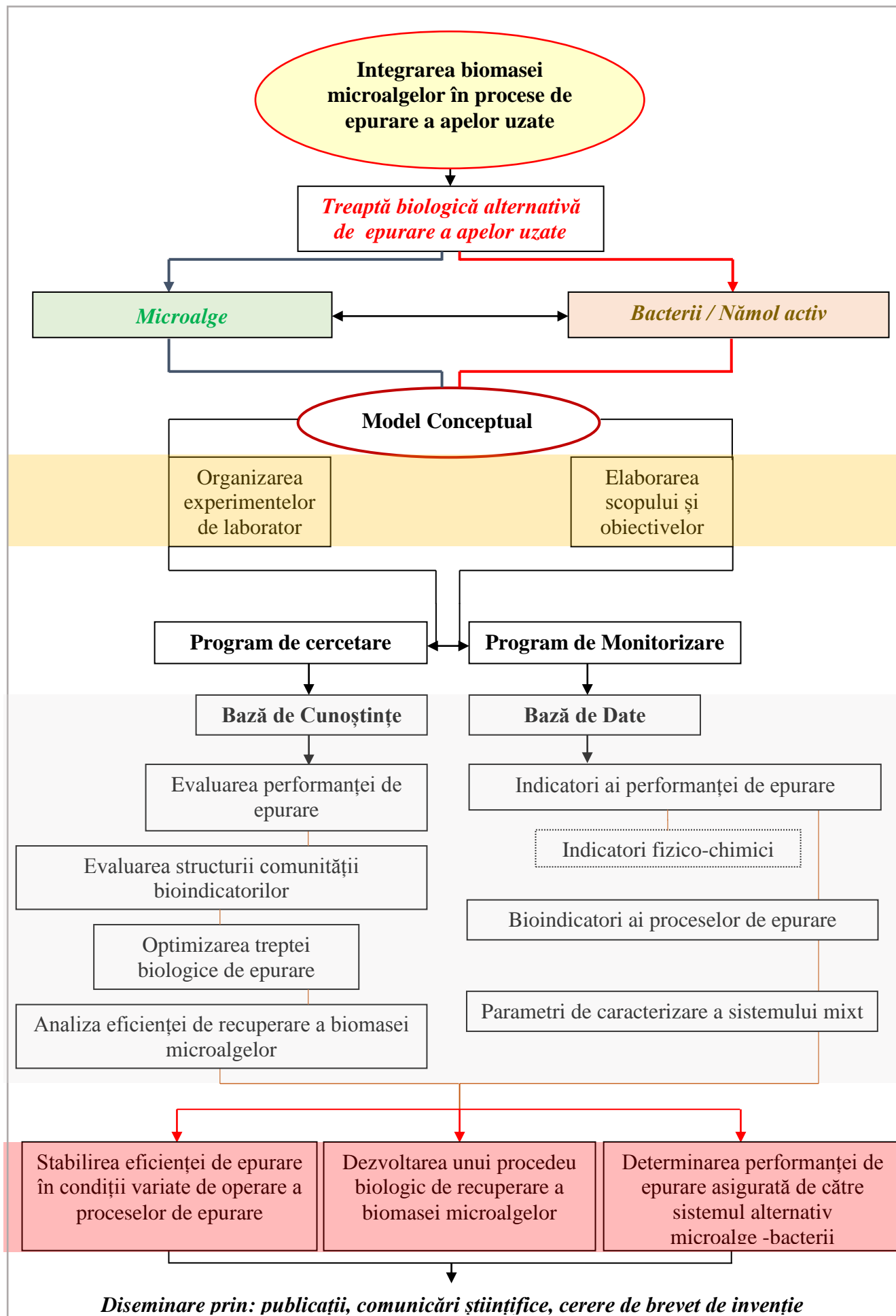


Figura 3. Modelul conceptual al proiectului de cercetare.

Obiectivele proiectului de cercetare au fost următoarele:

Obiectivul 1. Evaluarea performanței de epurare a apelor uzate cu încărcări ridicate de materie organică și nutrienți utilizând sistemul biologic mixt constituit din microalge și bacterii (nămol activ).

Obiectivul 2. Evaluarea influenței intensității luminoase asupra performanței de epurare a apelor uzate, caracterizate printr-un aport ridicat în materie organică și nutrienți, utilizând sistemul microalge – bacterii.

Obiectivul 3. Optimizarea treptei biologice de epurare a apelor uzate, caracterizate prin concentrații ridicate de materie organică și nutrienți utilizând sistemul biologic microalge - bacterii.

Obiectivul 4. Identificarea unui procedeu biologic alternativ pentru recuperarea biomasei microalgelor din mediul apos.

Obiectivul 5. Evaluarea eficienței de utilizare a sistemului granular microalge – bacterii în procese de epurare a apelor uzate caracterizate printr-un aport scăzut în materie organică.

Programul de cercetare a constat din derularea unei game variate de activități științifice, acestea constând într-o secțiune experimentală și una dedicată analizei rezultatelor obținute, interpretării și diseminării rezultatelor. Secțiunea experimentală a fost efectuată la nivel de laborator utilizând echipamente și instalații corespunzătoare care au permis obținerea de rezultate cu grad ridicat de precizie.

II.1.1. Organizarea secțiunii experimentale

Obiectiv 1.

Etapa experimentală I a fost divizată în două secțiuni. În prima secțiune s-a urmărit obținerea și cultivarea biomasei microalgelor în vederea pregătirii inoculului necesar în cadrul experimentelor prevăzute în proiectul de cercetare. Cea de-a doua secțiune a constat din cercetări experimentale preliminare de epurare a apelor uzate - efluent din industria laptelui, utilizând (1) biomasa microalge – bacterii sau (2) biomasa microalge – bacterii cu un inocul de nămolul activ convențional. În cadrul experimentelor s-a urmărit determinarea eficienței de utilizare a sistemului microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate care conțin concentrații ridicate ale materiei organice și nutrienților (în principal ioni amoniu și ioni ortofosfat). Astfel, prima etapă experimentală a fost realizată în vederea validării capacității sistemului microalge – bacterii (implicat a taxonilor implicați) de a îndepărta poluanți specifici ai apelor uzate, capacitate proiectată prin intermediul fluxurilor metabolice bidirecționale stabilite între biomasa microalgelor și cea a bacteriilor. Odată cu determinarea experimentală a eficienței de utilizare a sistemului mixt în procese de epurare a apelor uzate, s-a dat curs celorlalte etape experimentale.

Obiectiv 2.

Etapa experimentală II a constat din experimente de laborator prin care s-a evaluat influența variației intensității luminoase asupra (1) performanței de epurare a apelor uzate utilizând sistemul microalge – bacterii și implicit asupra (2) integrității sistemului biologic mixt investigat. Experimentele au fost derulate datorită necesității evidențiate în literatura de specialitate, nefiind identificate date care să susțină obiectivul alocat acestei etape experimentale.

Obiectiv 3.

Etapa experimentală III a inclus experimente de laborator prin care s-a urmărit optimizarea treptei biologice de epurare a apelor uzate, caracterizate prin concentrații ridicate în materie organică și nutrienți, utilizând biomasa microalge - bacterii, modul de organizare a experimentelor fiind dependent de rezultatele obținute prin programul de monitorizare aplicat celei de-a II-a etape experimentale. A III-a etapă experimentală a fost proiectată ca rezultat al identificării anumitor limite pe parcursul testării sistemului microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate la diferite valori ale intensității luminoase. Scopul ajustărilor operaționale a constat în creșterea performanței de epurare simultan cu reducerea timpului de retenție hidraulică, precum și a eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor din mediul apos.

Obiectiv 4.

Etapa experimentală IV a constat în experimente de laborator prin care s-a urmărit dezvoltarea unui procedeu biologic care să permită creșterea eficienței de recuperare a biomasei microalgelor din efluent. Necesitatea derulării acestei etape experimentale a rezultat din studiul bibliografiei de specialitate. Având în vedere impactul determinat de eficiența treptei de recuperare a celulelor microalgale din mediul apos asupra viabilității biotehnologiei bazate pe microalge, s-a acordat o importanță deosebită experimentelor din această etapă rezultată din necesitatea aplicării unui procedeu alternativ de recuperare a celulelor microalgale care să răspundă strategiei actuale a biotehnologiei alternative propuse. Astfel în cadrul celei de-a IV-a etape s-a urmărit soluționarea unei probleme abordate intens pe plan internațional.

Obiectiv 5.

Etapa experimentală V a cuprins experimente de epurare a apelor uzate cu un conținut scăzut în materie organică utilizând un sistem alternativ microalge - bacterii, constituit din entități granulare. Prin cercetarea unei soluții pentru rezolvarea problemei aferente treptei de îndepărtare a biomasei microalgelor în efluent s-a obținut, în cadrul celei de-a IV-a etape experimentale, un sistem granular microalge - bacterii. Simultan cu dezvoltarea sistemului granular și evidențierea avantajelor obținute comparativ cu sistemul convențional microalge - bacterii (constituit din flocoane), a fost evaluată experimental eficiența de utilizare a biomasei

granulare în procese de epurare a apelor uzate, în vederea susținerii și validării sistemului alternativ obținut.

II.2. Etapa experimentală I

În cadrul primei etape experimentale au fost vizate două obiective majore. În prima parte s-a urmărit obținerea inoculului microalge – bacterii necesar pentru derularea etapelor experimentale prevăzute în cadrul programului de cercetare. Având în vedere scopul proiectului, s-au asigurat condiții pentru obținerea unei biomase microalge – bacterii reprezentative pentru utilizarea în procese de epurare. Astfel, în cadrul experimentelor au fost utilizați taxoni care aparțin genului *Chlorella*. Conform rapoartelor științifice internaționale, speciile genului *Chlorella* se află pe lista celor mai utilizate specii în procese de epurare a apelor uzate, precum și în experimente de degradare a substanțelor prioritar periculoase, taxonii fiind caracterizați printr-un potențial ridicat de adaptare la caracteristicile mediului de reacție și condițiile operaționale (Rawat *et al.*, 2011). Simultan cu îndeplinirea primului obiectiv, în cea de-a doua parte a etapei experimentale au fost conduse studii de cercetare pentru evaluarea eficienței de utilizare a inoculului în procese de epurare a apelor uzate caracterizate prin concentrații ridicate în materie organică și nutrienți. Pentru derularea experimentelor, au fost realizate cinci variante experimentale, acestea fiind diferențiate în funcție de concentrația biomasei microalge – bacterii, concentrația nămolului activ inoculat, precum și tipul inoculului utilizat (biomasă microalge – bacterii / biomasă microalge – bacterii - nămol activ). Inoculul microalge - bacterii a fost reprezentat de o biomasă nativă adaptată proceselor de epurare a apelor uzate provenite din industria laptelui. Diametrul celulelor microalgale *Chlorella* sp. utilizate în cadrul experimentului a fost cuprins între $1,6 \pm 0,05$ și $6,6 \pm 0,08$ μm , majoritatea celulelor (aproximativ 85 % dintre acestea) având diametrul situat între $2,2 \pm 0,1$ și $3,8 \pm 0,1$ μm .

Rezultatele experimentale obținute au demonstrat faptul că **integrarea microalgelor în procese de epurare a apelor uzate poate susține desfășurarea proceselor aerobe** (degradarea materiei organice, procese de nitrificare biologică) **în lipsa aerării mecanice**. Astfel, nivelul minim atins de valoarea concentrației oxigenului molecular din mediul de reacție, la sfârșitul secvenței de epurare, a fost de $7,21 \pm 0,10$ mg/L, rezultat înregistrat pentru varianta experimentală inoculată cu 1 g/L biomasă_{s.u.} microalge - bacterii. Concentrația maximă a indicatorului a fost de $10,3 \pm 0,09$ mg/L, performanță observată în cazul variantei experimentale inoculate cu 250 mg/L biomasă_{s.u.} microalge-bacterii și 50 mg/L nămol activ_{s.u.}. Rezultatele obținute au evidențiat prezența unei relații de simbioză stabilită între componentele sistemului biologic: microalge și bacterii. Având în vedere dinamica valorilor concentrației oxigenului molecular din mediile de reacție înregistrate în cazul variantelor experimentale investigate, precum și concentrația inițială a materiei organice (din influent), s-a dedus faptul că, într-un proces de epurare a apelor uzate, nu este important doar

raportul stabilit între concentrația biomasei microalgelor și cea a bacteriilor, precum și concentrația componentelor biologice implicate.

De asemenea, s-a evidențiat **influența generată de prezența proceselor de fotosinteză asupra variației valorii pH-ului**, fiind subliniată necesitatea monitorizării parametrului pentru a evita compromiterea performanței de epurare. În cazul variantelor experimentale care au conținut atât biomasa microalge – bacterii, cât și nămol activ, valoarea maximă a pH-ului s-a încadrat între $7,75 \pm 0,02$ și $9,3 \pm 0,08$, intervalul de variație a valorii indicatorului fiind aproximativ similar pentru cele două variante experimentale investigate. În comparație cu variantele experimentale care nu au inclus inoculul de nămol activ, variantele experimentale care au inclus doar biomasa microalge - bacterii au prezentat valori ale pH-ului mai mari cu 0,1 - 0,5 unități. Aceste rezultate ar putea evidenția influența generată de activitatea populațiilor de bacterii asupra intervalului de variație a parametrului, precum ar fi activitatea nitrifcatorilor, existența procesele de nitrificare fiind demonstrată, în principal, în cazul variantelor inoculate cu nămol activ, acesta provenind dintr-o stație de epurare a apelor uzate municipale prevăzută cu treaptă aerobă. Prezența proceselor de nitrificare nu a putut fi determinată prin analiza variației valorilor indicatorului datorită menținerii tendinței de creștere a valorii pH-ului în cazul tuturor variantelor experimentale. Intensitatea proceselor de nitrificare (analizată în funcție de concentrația produșilor de reacție) a variat în funcție de concentrația biomasei și tipul inoculului utilizat.

Eficiența de îndepărtare a materiei organice, înregistrată după 24 ore de epurare în cazul variantelor experimentale testate, s-a situat între $69,1 \pm 3,45$ și $76,5 \pm 4,12$ %, prin analiza rezultatelor obținute observându-se influența pozitivă determinată de prezența inoculului de nămol activ asupra eficienței de îndepărtare a materiei organice. La sfârșitul secvenței de epurare (după 96 ore) s-a obținut o eficiență de îndepărtare a materiei organice de peste 90 %, în cazul tuturor variantelor experimentale. Referitor la ionii azotit, concentrația acestora, înregistrată la finalul secvenței de epurare, s-a situat sub pragul de 1 mg/L. După 24 ore de epurare, în cazul variantelor experimentale inoculate doar cu biomasă microalge - bacterii, eficiența de îndepărtare a ionilor amoniu a scăzut de la $86,3 \pm 0,2$ la $72,1 \pm 0,8$ % simultan cu creșterea concentrației biomasei inoculate. Având în vedere fluctuațiile valorilor pH-ului și ale concentrației oxigenului, raportate la aceste trei variante experimentale, s-a preconizat faptul că tendința de variație a eficienței de îndepărtare a ionilor amoniu a fost dependentă de intensitatea reacțiilor de degradare a materiei organice. Eficiența maximă de îndepărtare a ionilor amoniu a fost obținută după 72 ore de epurare, aceasta fiind situată între $87,3 \pm 0,2$ și $94,2 \pm 0,4$ % (exceptând varianta experimentală inoculată cu 500 mg/L biomasă_{s.u.} microalge-bacterii și 100 mg/L nămol activ_{s.u.}). Exceptând variantele experimentale inoculate cu nămol activ, în cazul celorlalte variante experimentale testate nu a fost definită o tendință clară de variație a eficienței de îndepărtare a ionilor ortofosfat din mediul apos,

aceasta alternând pe parcursul secvenței de epurare. Astfel, în primele 24 ore de epurare, eficiența de îndepărtare a indicatorului s-a situat între $45,3 \pm 1,5$ și $92,1 \pm 3,2$ %, iar după 72 ore de epurare, aceasta a scăzut la $42,1 \pm 0,5$ - $54,8 \pm 3$ % ca rezultat al creșterii concentrației ionilor ortofosfat în mediul de reacție. Intrarea în faza de declin a populațiilor biomasei, susținută de un timp ridicat de retenție hidraulică, ar putea fi considerată un factor responsabil pentru scăderea eficienței de îndepărtare a nutrientului, valoarea căreia a atins, la sfârșitul secvenței de epurare, un maxim de $62,5 \pm 1,7$ %.

O contribuție importantă a experimentelor conduse a constat în rezultatele investigațiilor microscopice realizate asupra comunității bioindicatorilor. Raportat la condițiile experimentale date, s-a dedus faptul că, **pe termen scurt, structura comunității bioindicatorilor a fost similară celei prezentate în procese convenționale de epurare aerobă cu nămol activ**. De asemenea, s-a remarcat influența generată de variația anumitor indicatori (pH, concentrația oxigenului dizolvat) asupra structurii comunității bioindicatorilor. O biodiversitate bogată a comunității bioindicatorilor a fost observată în cazul variantei experimentale care a conținut concentrația maximă de nămol activ inoculat, evidențiindu-se astfel influența generată de acesta asupra particularităților biocenozelor, dar și asupra performanței de epurare. Astfel, creșterea concentrației biomasei nămolului activ nu a favorizat doar îmbunătățirea performanței de epurare, dar și creșterea eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor, **agregatele bacteriene susținând reducerea gradului de încărcare a mediului de reacție în celulele microalgale aflate în suspensie prin biofloculare**. Eficiența maximă de îndepărtare a biomasei microalgelor a fost observată în cazul variantei experimentale inoculată cu 500 mg/L biomasă_{s.u.} microalge-bacterii și 100 mg/L nămol activ_{s.u.}, valoarea acesteia fiind de 90 ± 2 % - performanță obținută după 2³⁰ min de decantare a biomasei. Pentru celelalte variante experimentale, eficiența de îndepărtare a microalgelor s-a situat sub pragul de 30 %, rezultate care au fost obținute după 30 min de sedimentare a biomasei. Deși în cazul celor două variante inoculate cu nămol activ raportul inițial între concentrația nămolului activ și cea a biomasei microalge - bacterii (mg_{s.u.}/L) a fost de 5 : 1, capacitatea de sedimentare între cele două variante a fost semnificativ diferită ceea ce susține importanța ce trebuie acordată concentrației componentelor taxonomice implicate.

Rezultatele științifice obținute au susținut implementarea celorlalte etape experimentale prevăzute în cadrul programului de cercetare și implicit avansarea în cadrul domeniului biotehnologiei bazate pe microalge pentru epurarea apelor uzate. De asemenea, prin rezultatele obținute au fost evidențiate particularitățile biomasei și a fost demonstrată viabilitatea acesteia în procese de epurare a apelor uzate conform obiectivului definit. O parte din rezultatele obținute în cadrul acestei etape experimentale au constituit subiectul unui articol științific (Tricolici et al., 2014b).

II.3. Etapa experimentală II

În cea de-a doua etapă experimentală s-a urmărit influența intensității luminoase asupra performanței de epurare a apelor uzate, caracterizate printr-o concentrație ridicată în materie organică și nutrienți, utilizând sistemul microalge – bacterii. În completare, studiile demarate în cadrul etapei au inclus și evaluarea influenței variației intensității luminoase asupra: activității fotosintetice a microalgelor, ratei de creștere a microalgelor și eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor din efluent. Originalitatea etapei experimentale este exprimată, în special, prin: (1) tipul biomasei testate, aceasta fiind constituită din populații de microalge și populații de bacterii adaptate proceselor de epurare; (2) sursa apei uzate, fiind utilizat un efluent industrial, rezultat din procesarea laptelui, fără a interveni asupra particularităților fizice, chimice și biologice ale acestuia; (3) interesul adresat comunității bioindicatorilor în procese de epurare a apelor uzate utilizând biomasa microalge – bacterii.

Experimentele au fost realizate în două faze prin expunerea consecutivă a sistemului biologic la două valori ale intensității luminoase: 360 și 820 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Rezultatele științifice obținute au evidențiat faptul că, în cazul utilizării unui influent bogat în materie organică, se poate obține, într-o perioadă scurtă de timp, o creștere semnificativă a concentrației biomasei bacteriilor. În aceste condiții, este influențată eficiența de absorbție a luminii de microalge. Astfel, în condițiile experimentale date, intensitatea luminoasă de 360 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a fost insuficientă pentru a susține dezvoltarea, pe termen lung, a sistemului biologic mixt, fiind astfel compromisă performanța de epurare. Prin urmare, simultan cu parcurgerea secvențelor de epurare, derulate la 360 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, s-a observat scăderea progresivă a saturației în oxigen molecular a mediului de reacție de la aproximativ 189 % (valoarea maximă înregistrată pentru prima secvență de epurare) la aproximativ 12 % (valoarea maximă înregistrată pentru a patra secvență de epurare). O presiune a fost nuanțată și asupra ratei de creștere a microalgelor, rezultatele obținute prezentând scăderea continuă a valorii indicatorului de la $0,42 \pm 0,026 \text{ zi}^{-1}$ (valoare înregistrată pentru prima secvență de epurare) la $0,06 \pm 0,005 \text{ zi}^{-1}$ (valoare înregistrată pentru ultima secvență de epurare). În completare, analiza microscopică efectuată asupra biomasei microalge - bacterii a evidențiat, pe parcursul derulării secvențelor de epurare și în comparație cu inoculul utilizat, creșterea încărcării flocoanelor în biomasă bacteriană. Scăderea activității fotosintetice a influențat eficiența de îndepărtare a materiei organice, care s-a situat între $78,2 \pm 2,3$ și $96,2 \pm 2,9$ %, cu remarcă că, în primele 24 ore ale etapei de reacție, asociate fiecărei secvențe de epurare, eficiența de îndepărtare a materiei organice a scăzut progresiv de la $74 \pm 2,2$ % (eficiență obținută în prima secvență de epurare) la $39,8 \pm 2,4$ % (eficiență obținută pentru ultima secvență de epurare). O tendință de scădere accentuată a eficienței de îndepărtare a fost conturată și în cazul ionilor amoniu: de la $94,6 \pm 1,5$ % (valoare înregistrată pentru prima secvență de epurare) la $40,7 \pm 3,1$ % (valoare înregistrată pentru ultima secvență de

epurare). Eficiența de îndepărtare a ortofosfaților a fost cuprinsă într-un domeniu larg ($15,7 \pm 1,5 - 90,8 \pm 1,3$ %) fără a fi evidențiată o tendință clară de variație a concentrației parametrului.

Cea de-a doua valoare testată a intensității luminoase ($820 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) a fost considerată corespunzătoare pentru a asigura revenirea în faza de dezvoltare a sistemului microalge – bacterii, obținându-se atât creșterea nivelului saturației în oxigen a mediului de reacție de la aproximativ 4 % (valoarea maximă înregistrată în cadrul primei secvențe de epurare) la aproximativ 179 % (valoarea maximă înregistrată pentru a șasea secvență de epurare), precum și cea a ratei de creștere a taxonilor microalgali: de la $0,09 \pm 0,004 \text{ zi}^{-1}$ (valoarea maximă înregistrată în cadrul primei secvențe de epurare) la $0,33 \pm 0,023 \text{ zi}^{-1}$ (valoarea maximă înregistrată în cadrul ultimei secvențe de epurare), simultan cu creșterea numărului secvențelor de epurare și implicit a timpului de retenție a solidelor. Prin urmare, deși în comunități individuale (culturi pure) microalgele pot susține realizarea proceselor de fotosinteză la valori mici ale intensității luminoase, **în cazul utilizării sistemului mixt microalge – bacterii în procese de epurare a apelor uzate este necesară ajustarea acestui parametru către valori mai mari. În vederea asigurării echilibrului între componentele sistemului biologic este punctată necesitatea monitorizării activității fotoautotrofe, pentru a asigura eficiența de absorbție a fotonilor minim necesară susținerii unei performanțe ridicate de epurare, precum și trebuie să se considere tipul apei uzate utilizate.**

Prin asigurarea unei intensități luminoase de $820 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, eficiența de îndepărtare a materiei organice a fost cuprinsă între $85,8 \pm 2,6$ și $97,4 \pm 1,9$ %, fără a fi evidențiată o tendință de scădere a valorii acesteia pe parcursul monitorizării secvențelor de epurare. Eficiența de îndepărtare a materiei organice, obținută la finalul fiecărei secvențe de epurare, a fost comparabilă cu cea înregistrată după un timp de retenție hidraulică de 48 ore ($85,7 \pm 2,6 - 93,7 \pm 3,7$ %) - timp alocat proceselor de epurare a apelor uzate de stația de epurare furnizoare a influentului. Prin urmare, creșterea încărcării bacteriene și aplicarea unei intensități luminoase corespunzătoare, care să asigure, în mod indirect, aportul de oxigen necesar bacteriilor heterotrofe, reprezintă condiții de operare care pot fi considerate în vederea scăderii timpului de retenție hidraulică, cu obținerea simultană a unei performanțe ridicate de îndepărtare a materiei organice.

În comparație cu materia organică, eficiența de îndepărtare a ionilor amoniu s-a situat într-un interval larg de variație, aceasta fiind cuprinsă între $46 \pm 3,9$ și $86,7 \pm 2,9$ %. Eficiența de îndepărtare a ortofosfaților a variat între $67,5 \pm 4,8$ și $98,8 \pm 0,9$ %.

Conform rezultatelor obținute, au fost identificate două limite ale procesului de epurare, în condițiile de operare stabilite, acestea fiind: **timpul ridicat de retenție hidraulică și dezechilibrul creat între eficiența de îndepărtare a materiei organice și cea a ionilor amoniu.**

Referitor la eficiența de îndepărtare a celulelor microalgale din efluent, aceasta a variat între $79,5 \pm 3,2$ și $87,8 \pm 3,5$ %, fiind astfel subliniată necesitatea aplicării unei metode suplimentare de recuperare în vederea creșterii valorii indicatorului.

În adăugare la rezultatele obținute în cadrul primei etape experimentale, în cea de-a doua etapă s-au obținut date cu privire la dinamica structurii comunității bioindicatorilor în procese de epurare a apelor uzate, fiind delimitate două faze de dezvoltare. Prima fază s-a caracterizat printr-o instabilitate a compoziției structurale și o diversitate taxonomică ridicată - caracteristici similare celor identificate într-un sistem de epurare aerobă cu nămol activ. Cea de-a doua fază a fost asociată cu reducerea bogăției de specii de protozoare și s-a diferențiat de particularitățile raportate în cazul epurării convenționale (utilizând nămol activ) delimitând astfel, după acest criteriu, biotehnologiile vizate.

Rezultatele au arătat că utilizarea biomasei microalge - bacterii este eficientă în procese de epurare a apelor uzate atunci când sunt asigurate valori optime ale intensității luminoase. Însă, în vederea asigurării unei performanțe ridicate de epurare, simultan cu reducerea timpului de retenție hidraulică și eliminarea completă a celulelor microalgale din efluent, sunt necesare studii avansate în domeniu, studii care au fost abordate în cadrul următoarei etape experimentale.

Rezultatele obținute în cadrul celei de-a doua etape experimentale au fost publicate în Jurnalul Water Science & Technology (Tricolici *et al.*, 2014a).

II.4. Etapa experimentală III

A III-a etapă experimentală a proiectului de cercetare: „*Optimizarea treptei biologice de epurare a apelor uzate din industria laptelui utilizând sistemul microalge – bacterii*”, s-a axat pe soluționarea problemelor identificate pe parcursul evaluării performanței de epurare a apelor uzate utilizând sistemul microalge – bacterii la diferite valori ale intensității luminoase. Acestea au constat în: timpul ridicat de retenție hidraulică, eficiența scăzută de îndepărtare a ionilor amoniu și eficiența scăzută de îndepărtare a biomasei microalgelor.

Conform limitelor identificate, s-a decis optimizarea treptei biologice de epurare a apei uzate, provenită din industria laptelui, utilizând sistemul microalge - bacterii, prin fracționarea fluxului de epurare în două trepte. Ajustarea operațională propusă a fost realizată prin utilizarea a două bioreactoare de laborator. În cazul primei trepte de epurare s-a urmărit epurarea apei uzate din industria laptelui utilizând sistemul microalge - bacterii adaptat la caracteristicile fizico-chimice ale acesteia. A doua treaptă de epurare a avut rolul de treaptă adițională de epurare, prin care să se asigure îndepărtarea, cu o eficiență ridicată, a materiei organice și a nutrienților rezultați din prima treaptă de epurare. Astfel, principiul care a stat la baza ajustării operaționale a constat în utilizarea a două sisteme biologice microalge – bacterii, adaptate la caracteristici diferite ale influentului și a

căror funcții vor conduce, cumulat, la soluționarea problemelor prezentate. Treptele de epurare au funcționat simultan, epurarea apei uzate realizându-se în regim secvențial de operare, timpul alocat fiecărei secvențe fiind de 24 ore.

Rezultatele obținute pe parcursul derulării experimentelor au confirmat impactul determinat de optimizarea treptei biologice asupra performanței de epurare, fiind înregistrată atât creșterea eficienței de îndepărtare a ionilor amoniu (prin favorizarea proceselor de nitrificare), cât și cea a eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor. Astfel, eficiența de îndepărtare globală a materiei organice a variat între $98,6 \pm 0,4$ - $99,6 \pm 0,2$ % fiind similară celei asociată ionilor amoniu, care a fost cuprinsă între $97,5 \pm 0,4$ și $99,8 \pm 0,1$ %. Prezența proceselor de nitrificare a fost semnalată în cazul celei de-a doua trepte de epurare unde s-a înregistrat prezența ionilor azotat, concentrația cărora a variat între $18,3 \pm 1,8$ și $45,4 \pm 2,3$ mg/L. Concentrația ionilor azotit din efluentul final s-a situat sub limita de detecție ($< 0,1$ mg/L). Concentrația ionilor fosfat din efluentul final a variat între $0,7 \pm 0,1$ și $5,7 \pm 0,3$ mg/L, astfel eficiența globală de îndepărtare a nutrientului situându-se în intervalul: $79,1 \pm 2,3$ - $94,1 \pm 1,8$ %.

Conform celor menționate, ajustarea condițiilor de operare a condus la creșterea eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor din efluentul final, obținându-se o performanță de $94,4 \pm 1,8$ %. În comparație cu prima treaptă de epurare, s-a obținut creșterea eficienței de îndepărtare a microalgelor cu aproximativ 60 – 90 %. În completare, optimizarea fluxului biologic de epurare a permis îndepărtarea completă a biomasei microalgelor prin centrifugare – performanță care nu a putut fi realizată în cazul condițiilor anterioare de operare (Etapa experimentală II).

Realizând o comparație între rezultatele obținute și cele identificate raportat la dinamica structurii comunității bioindicatorilor pentru cea de-a doua etapă experimentală a proiectului de cercetare, s-a observat influența caracteristicilor fizico-chimice ale influentului asupra dinamicii structurii comunității microalgelor. De asemenea, analizând rezultatele investigațiilor microscopice, s-a observat că dezvoltarea microalgelor filamentoase a influențat pozitiv eficiența de recuperare a biomasei microalgelor prin creșterea stabilității flocoanelor, precum și a dimensiunii acestora. Se consideră că o creștere a dimensiunii flocoanelor în prezența microalgelor filamentoase a fost susținută printr-un proces de agregare a flocoanelor prin împletirea rețelei de filamente, precum și prin favorizarea dezvoltării populațiilor de bacterii, în acest caz, microalgele filamentoase având rol similar bacteriilor filamentoase în procese de epurare a apelor uzate cu nămol activ (Wagner *et al.*, 2015). În completare, prezența microalgelor filamentoase a împiedicat creșterea gradului de încărcare a efluentului final cu microalge provenite din prima treaptă de epurare.

Alte rezultate importante obținute prin derularea experimentelor au constat în stabilirea unui model de variație a valorii saturației în oxigen molecular și a pH-ului mediilor de reacție, prin care

se poate stabili, în mod indirect, prezența anumitor procese în cadrul secvenței de epurare sau se poate aproxima eficiența de îndepărtare a materiei organice, precum și cea a ionilor amoniu.

Raportat la diversitatea comunității bioindicatorilor, s-a susținut concluzia raportată în cazul celei de-a doua etape experimentale potrivit căreia integrarea biomasei microalgelor în procese de epurare a apelor uzate influențează semnificativ biodiversitatea comunității protozoarelor. Principalele particularități identificate în acest caz (pentru cea de-a doua treaptă de epurare) au fost: creșterea bogăției speciilor de microalge, dispariția protozoarelor și diversificarea grupului metazoarelor, acestea din urmă fiind reprezentate de populații de rotiferi. De asemenea, având în vedere condițiile de operare, cât și performanța de epurare obținută, s-a dedus faptul că biodiversitatea descrisă în cadrul sistemului optimizat diferă față de cea corespunzătoare proceselor de epurare a apelor uzate cu nămol activ.

O parte din rezultatele obținute au fost comunicate la cea de-a 8-a Conferință Internațională “Ingineria și Managementul Mediului” (9-12 septembrie, 2015, Iași) (Tiron *et al.*, 2015b) și în cadrul Congresului European de Biotehnologie (Tiron *et al.*, 2016).

II.5. Etapa experimentală IV

Etapa experimentală curentă a proiectului de cercetare a descris un procedeu de granulare a sistemului microalge - bacterii și a evidențiat principalele particularități morfologice, structurale și biologice ale agregatelor astfel obținute. Tranziția propusă de la sistemul biologic convențional, tip flocoane microalge – bacterii, la cel superior acestuia, tip granule, s-a realizat cu scopul îndepărtării eficiente a celulelor microalgale utilizate în procese de epurare a apelor uzate, fără a implica costuri sau input-uri de energie în treapta de recoltare a biomasei. Studiul s-a desfășurat utilizând specii ale genului *Chlorella* cu rol de celule microalgale țintă, însă particularitățile evidențiate pe parcursul studiului (în special cele identificate în baza investigațiilor microscopice) oferă posibilitatea aplicării sistemului granular pentru diferite tipuri de celule microalgale convenționale utilizate în procese de epurare. Principiul procedurii de granulare a constat în utilizarea microalgelor filamentoase pentru a obține rețele dense și dezordonate de filamente, care asigură, sub acțiunea forței dată de omogenizarea mediului de reacție, captarea și blocarea celulelor microalgale țintă. În *Figura 4* este reprezentat schematic principiul obținerii granulelor microalge - bacterii utilizând microalge filamentoase.

Experimentele efectuate au punctat rolul deținut de microalgele filamentoase în procesul de granulare, acestora fiindu-le atribuite proprietățile de ‘filtru biologic’ și ‘coloană vertebrală’ a structurii granulare. Deși diametrul celular al microalgelor țintă (*Chlorella* sp.) a variat doar între 1,25 și 7,63 μm , valoarea medie fiind de $3,51 \pm 0,18 \mu\text{m}$, prin utilizarea granulelor, a fost obținută o eficiență de îndepărtare a biomasei microalgelor din efluent, prin sedimentare, mai mare de 99 %,

concentrația reziduală a clorofilei *a* din efluent fiind situată între $2,65 \pm 0,41$ și $54,13 \pm 6,9$ $\mu\text{g/L}$. De asemenea, dezvoltarea sistemului granular a condus la creșterea semnificativă a vitezei de decantare a agregatelor sistemului biologic fiind obținută o performanță echivalentă celei raportate în cazul utilizării nămolului aerob granular. Astfel, viteza de decantare a celulelor microalgale țintă *Chlorella* sp. a fost mai mică de $0,54 \cdot 10^{-2}$ m/h; în comparație cu microalgele țintă, viteza de sedimentare a microalgelor filamentoase poate atinge pragul de 12 m/h (Pouliot *et al.*, 1989), performanță determinată de capacitatea de auto-agregare a speciilor, morfologia și dimensiunea acestora (2 - 10 μm lățime, 100 - 200 μm lungime) (Bui & Han, 2015); simultan cu creșterea numărului sevențelor de cultivare s-a înregistrat creșterea vitezei de decantare a entităților microalge-bacterii de la $6,6 \pm 1,8$ m/h (secvența de epurare nr. 59) la $21,6 \pm 0,9$ m/h (secvența nr. 237). De altfel, la sfârșitul secvenței de epurare nr. 59 entitățile microalge - bacterii prezentau un diametru mediu de $730,62 \pm 11,28$ μm , iar la sfârșitul secvenței nr. 237, diametrul agregatelor a fost de $1343 \pm 13,2$ μm .

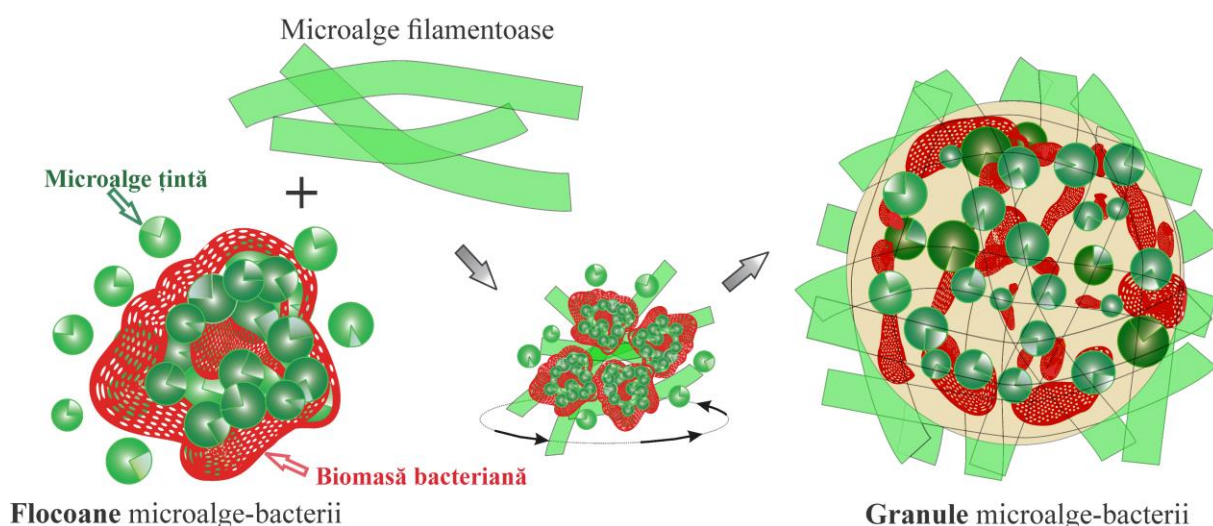


Figura 4.

Principiul schematic al procedurii de granulare a sistemului microalge - bacterii utilizând microalge filamentoase.

Atât eficiența de recuperare a biomasei microalgelor obținută prin sedimentarea granulelor, cât și proprietățile fizice, structurale și biologice ale granulelor (viteza de sedimentare, mecanismele de biofloculare și agregare fizică care stau la baza dezvoltării structurii granulare, dimensiunea granulelor, structura comunității agregatelor) au demonstrat viabilitatea procedurii și au evidențiat importanța acestuia în susținerea dezvoltării biotehnologiei bazate pe microalge prin eliminarea barierei impuse de factorul economic al treptei de recoltare a biomasei microalgelor.

În baza rezultatelor obținute în cadrul celei de-a IV-a etape experimentale a fost elaborată cererea de brevet de invenție nr. A/00111/12-02-2014, RO 130247-A0 intitulată: "Procedeu de obținere granule mixte microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate".

II.6. Etapa experimentală V

Una dintre particularitățile importante ale granulelor microalge-bacterii, menținută pe parcursul derulării experimentelor de cercetare, a fost reprezentată de adaptabilitatea biomasei la caracteristicile apei uzate. În cadrul cele de-a IV-a etape experimentale s-a evidențiat eficiența de utilizare a structurilor granulare microalge-bacterii în treapta de recuperare a biomasei microalgelor, precum și au fost prezentate particularitățile morfologice și structurale ale acestora. Simultan cu demonstrarea viabilității granulelor în treapta de recoltare a biomasei microalgelor, s-a subliniat necesitatea evaluării eficienței de utilizare a acestora în procese de epurare a apelor uzate. Avansarea experimentelor de cercetare utilizând granule a reprezentat o strategie esențială în vederea demonstrării eficienței de utilizare a acestora în domeniul epurării apelor uzate și susținerii dezvoltării biotehnologiei alternative propuse.

Deoarece variația concentrației compușilor anorganici cu azot (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) și fosfor (PO_4^{3-}), precum și a concentrației materiei organice, este influențată de activitatea fotosintetică a microalgelor utilizate, în cazul biotehnologiei alternative prezentate, a fost esențial să se analizeze dinamica saturației în oxigen molecular a mediului de reacție pe parcursul derulării secvențelor de epurare. Conform rezultatelor obținute s-a observat că variația valorii indicatorului înregistrată pe parcursul derulării proceselor de epurare a reprezentat rezultanta următorilor factori: activitatea fotosintetică a microalgelor, încărcarea în materie organică și nutrienți a influentului și activitatea bacteriilor (autotrofe și heterotrofe). Astfel, în condițiile de operare setate au fost înregistrate două tipuri de modele ale variației saturației în oxigen molecular a mediului de reacție, în cazul fiecăruia fiind delimitate câteva etape de variație parcurse de valoarea indicatorului în timpul epurării apelor uzate. Este important de menționat faptul că rezultatele științifice obținute în ceea ce privește variația saturației în oxigen molecular a mediului de reacție, în perioada derulării secvențelor de epurare, deschid oportunitatea valorificării simultane a biomasei microalgelor pentru (1) epurarea apelor uzate, (2) obținerea de biomasă, dar și (3) obținerea de biohidrogen.

În ceea ce privește variație valorilor pH-ului, aceasta a fost guvernată în principal de doi factori: procesele de fotosinteză și procesele de nitrificare. În cazul proceselor de fotosinteză, consumul de CO_2 și HCO_3^- de microalgele fotoautotrofe determină creșterea valorii pH-ului ca rezultat al creșterii concentrațiilor de OH^- în mediul de reacție (Markou & Georgakakis, 2011). Referitor la procesele de nitrificare, influența asupra tendinței de variație a valorii pH-ului s-a explicat prin efectul generat de acumularea de H^+ rezultați prin procesele de nitrificare. Ca rezultat,

pH-ul mediului de reacție înregistrat pe durata celor două cicluri lumină-întuneric s-a situat într-un domeniu larg de variație: 5 - 8,5. Conform rezultatelor obținute, s-a demonstrat faptul că variația valorilor pH-ului în intervalul 5 - 8,5 în perioada derulării unei secvențe de epurare, utilizând granule microalge-bacterii, nu determină pentru o perioadă scurtă de timp (24 ore) efecte negative semnificative asupra integrității structurii granulare. Valoarea indicatorului a urmat două modele de variație, interpretarea acestora realizându-se în corelare cu variația saturației în oxigen.

Concentrația materiei organice din efluent a variat între 4,4 și 26,4 mg O₂/L. Raportat la concentrația inițială a indicatorului, s-a obținut o eficiență de îndepărtare a materiei organice cuprinsă între 86,4 și 97,9 %. Este important de menționat faptul că această performanță a fost atinsă în primele ore de epurare și a fost indicată (în mod indirect) de creșterea saturației în oxigen molecular a mediului de reacție.

Referitor la ionul amoniu, între 53 și 74% din concentrația inițială a acestuia a fost îndepărtată în primele ore de epurare, simultan cu degradarea intensivă a materiei organice. Simultan cu creșterea saturației în oxigen molecular a mediului de reacție, cantitatea remanentă de ioni amoniu (rămasă după consumul aproape integral al materiei organice) a fost îndepărtată prin procese de nitrificare, conducând la scăderea concentrației indicatorului în efluent sub 0,1 mg NH₄⁺/L.

Ca rezultat al desfășurării proceselor de nitrificare, în efluent a fost înregistrată prezența ionilor azotat, concentrația cărora a variat într-un domeniu larg (între 18,9 și 63,2 mg/L) în funcție de concentrația inițială a ionilor amoniu. Prin monitorizarea variației concentrației ionilor amoniu pe parcursul derulării secvenței de epurare a apelor uzate, s-a observat că un proces complet de nitrificare s-a realizat, în general, în primele 8 ore de epurare (din 24 ore ale secvenței de epurare).

O caracteristică importantă identificată pe parcursul derulării etapelor experimentale a fost prezența activității denitrificatorilor. Densitatea biologică ridicată a structurilor granulare, precum și diametrul granulelor pot fi considerați factori promotori ai proceselor de denitrificare. Acești factori contribuie la limitarea gradului de difuzie a oxigenului în interiorul structurilor granulare, creându-se un nucleu al granulei care conferă condiții optime pentru dezvoltarea bacteriilor denitrificatoare (*Figura 5*).

Eficiența de îndepărtare a ortofosfaților s-a situat într-un domeniu larg de variație (11,2 - 84,9 %). În cazul unor secvențe de epurare, a fost înregistrată o creștere a concentrației ionilor fosfat în mediul de reacție fără a fi definită o tendință clară de variație a concentrației indicatorului, o caracteristică similară fiind identificată în studiile anterioare (Etapa experimentală II). Acest fenomen a fost observat după consumul aproape integral al materiei organice, perioadă în care intensitatea reacțiilor catabolice a scăzut semnificativ ca rezultat al limitării substratului. Prin

urmare, o cauză posibilă a creșterii concentrației nutrientului în mediul de reacție ar fi eliberarea ortofosfatului intracelular pentru obținerea de energie necesară desfășurării proceselor de sinteză.

Raportat la concentrația de clorofilă *a* a întregului sistem biologic, s-a înregistrat o eficiență de recuperare a biomasei microalgale din efluent cuprinsă între 99,85 și 99,99%, performanță obținută exclusiv prin decantarea biomasei. Concentrația reziduală de clorofilă *a* din efluent a fost situată în intervalul 5,9 - 23 μg/L. Densitatea biologică ridicată a granulelor, precum și dimensiunea acestora au contribuit la sedimentarea rapidă

a biomasei, înregistrându-se o viteză de decantare de $19 \pm 3,6$ m/h. În timpul derulării experimentelor, diametrul granulelor a variat între 600 și 1900 μm, diametrul mediu fiind situat între 1300 și 1400 μm.

Sistemul granular microalge - bacterii reprezintă un sistem microalgal alternativ și soluție alternativă de epurare a apelor uzate, care permite: realizarea proceselor convenționale care au loc în cadrul treptei biologice de epurare, eliminarea sistemelor de aerare și eliminarea costurilor alocate treptei de recuperare a biomasei microalgale, granulele decantând cu o viteză mai ridicată decât cea a flocoanelor nămolului activ și similară celei raportate în cazul nămolului aerob granular. Astfel, granulele pot reprezenta o soluție sustenabilă de promovare a biotehnologiei microalgale și o provocare pentru abordarea curentă a procesului de epurare în vederea reducerii costurilor de operare (obiectiv major al operatorilor stațiilor de epurare), prin eliminarea costurilor de aerare și posibilitatea valorificării biomasei reziduale.

O parte din rezultatele obținute au fost diseminate prin publicare în Jurnalul Water Science & Technology (Tiron *et al.*, 2015a) și Journal of Biotechnology (Tiron *et al.*, 2015c).

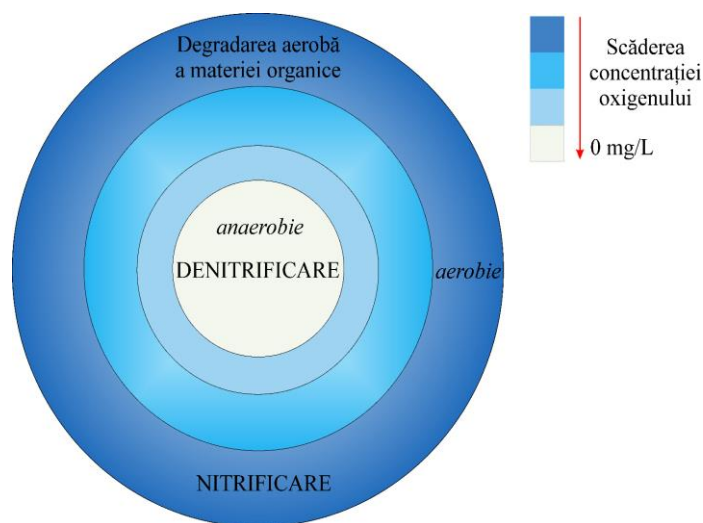


Figura 5.

Reprezentarea schematică a structurii posibile a unei granulei microalge-bacterii raportată la gradientul de difuzie a oxigenului.

CONCLUZII

Prezenta teză de doctorat s-a adresat domeniului epurării apelor uzate, propunând o biotehnologie alternativă de epurare prin integrarea biomasei microalgelor în treapta biologică. Teza conține două capitole prin care s-a prezentat motivul conducerii programului de cercetare vizat (Capitolul I - Analiza critică a cunoașterii) și contribuția originală în cadrul domeniului de interes (Capitolul II - Proiectul de cercetare). Proiectul de cercetare științifică a fost împărțit în cinci etape experimentale, efectuate în vederea îndeplinirii a cinci obiective definite.

În lipsa identificării altor studii adresate biotehnologiei alternative propuse, la nivel național, în prima etapă experimentală a tezei s-a prezentat viabilitatea sistemului microalge – bacterii în procese de epurare a apelor uzate, rezultatele obținute susținând extinderea studiilor de cercetare definite în cadrul proiectului (etapele experimentale II – V). Originalitatea primei etape experimentale constă din obținerea de rezultate științifice adresate (1) utilizării sistemului mixt microalge - bacterii pentru epurarea apelor uzate cu un conținut ridicat în materie organică și nutrienți și (2) investigării pe termen scurt a structurii comunității bioindicatorilor.

Celelalte etape experimentale urmate s-au caracterizat, de asemenea, prin originalitate, obținându-se rezultate importante în domeniu care au fost diseminate prin publicații, comunicări științifice naționale și internaționale și prin realizarea unei cereri de brevet de invenție (RO130247-A0). În cadrul fiecărei etape experimentale s-a enunțat un obiectiv specific care fie a fost dedus prin analiza critică a literaturii de specialitate (etapa experimentală II, IV), fie prin analiza rezultatelor etapelor anterioare (etapa experimentală III, V). Astfel, cel de-al doilea capitol al tezei, în care se prezintă programul de cercetare, se adresează lacunelor identificate în cazul altor studii internaționale sau studiilor experimentale proprii.

Sumar, în cadrul tezei au fost abordate următoarele subiecte: (1) răspunsul sistemului mixt microalge – bacterii, analizat din punct de vedere al performanței de epurare, la anumite valori ale intensității luminoase la care este expus, cu obținerea de date experimentale importante adresate modului în care tipul apei uzate poate influența acest răspuns (etapa experimentală II), (2) adaptarea strategiei de operare a treptei biologice de epurare în scopul creșterii performanței de epurare, scăderii timpului de retenție hidraulică și creșterii eficienței de îndepărtare a biomasei microalgelor (etapa experimentală III), (3) studiul unei metode biologice alternative de îndepărtare a biomasei microalgelor din efluent (etapa experimentală IV) și (4) evaluarea eficienței de utilizare a sistemului alternativ dezvoltat (granule microalge – bacterii) în procese de epurare a apelor uzate (etapa experimentală V). Fiecare etapă experimentală include un subcapitol de concluzii în care sunt prezentate principalele rezultate obținute.

Contribuțiile originale ale fiecărei etape experimentale derulate în cadrul proiectului de cercetare sunt:

- testarea unui sistem mixt microalge-bacterii în procese de epurare a apelor uzate, cu utilizarea de specii native, adaptate condițiilor de epurare selectate / dobândite;
- analiza influenței intensității luminoase asupra întregului sistem microalge - bacterii în procese de epurare a apelor uzate;
- dobândirea de informații cu privire la dinamica structurii comunității bioindicatorilor în procese de epurare a apelor uzate utilizând sistemul microalge - bacterii;
- propunerea unei trepte biologice alternative de epurare a apelor uzate cu un conținut ridicat în materie organică și nutrienți utilizând sistemul mixt microalge - bacterii;
- tranziția realizată de la sistemul convențional microalge – bacterii, reprezentat de flocoane, la cel constituit din entități granulare;
- obținerea de rezultate cu privire la viabilitatea sistemului granular mixt microalge - bacterii în procese de îndepărtare a apelor uzate;
- identificarea unor modele de variație a saturației în oxigen molecular și a valorii pH-ului mediului de reacție prin care se poate preconiza realizarea anumitor procese de epurare (degradarea aerobă a materiei organice, nitrificare);
- obținerea performanței de a îndepărta rapid biomasa microalgelor din mediul de reacție prin sedimentare, fără consum de energie și reactivi.

Datele experimentale prezentate în cadrul proiectului de cercetare pot avea un impact semnificativ asupra:

(1) Căilor de valorificare energetică a biomasei (începând de la producția de biohidrogen în procese de epurare). Rezultatele cercetărilor experimentale au arătat că activitatea bacteriilor aerobe din sistemul biologic conduce la scăderea saturației în oxigen a mediului de reacție fără a compromite desfășurarea proceselor aerobe, oxigenul fiind asigurat continuu de microalge prin procesul de fotosinteză. În astfel de condiții, se poate urmări obținerea de biohidrogen fără a fi necesară ajustarea parametrilor / condițiilor de operare. Biomasa microalgelor rezultată din procese de epurare poate fi utilizată pentru obținerea și a altor tipuri de biocombutibili (biodiesel, etanol, metan).

(2) Programului de gestionare a deșeurilor rezultate din procesele de epurare, biomasa microalgelor fiind utilizată în diverse ramuri industriale.

(3) Costurilor de producție a biomasei microalgelor, nutrienții necesari dezvoltării celulare fiind preluați direct din apele uzate.

(4) Costurilor aferente consumului de energie pentru aerarea bioreactoarelor. Rezultatele programului de cercetare au demonstrat că microalgele pot susține desfășurarea proceselor aerobe prin procesul de fotosinteză.

Biotehnologia bazată pe sistemul simbiotic indus microalge-bacterii pentru epurarea apelor uzate cuprinde un domeniu complex transdisciplinar care, la momentul actual, reprezintă o soluție promițătoare pentru re tehnologizarea stațiilor de epurare în vederea eliminării limitelor și care oferă o nouă perspectivă asupra producției biomasei microalgelor. Biotehnologia alternativă propusă este în curs de dezvoltare și rezultatele obținute pe parcursul programului de cercetare pot contribui la extinderea biotehnologiei vizate fiind necesară aprofundarea studiilor în domeniu. O parte din acestea se adresează particularităților funcționale caracteristice sistemului simbiotic indus microalge – bacterii cu vizarea relațiilor intertrofice cuantificate până la scară moleculară. Obținerea unor astfel de informații va permite identificarea parametrilor optimi care influențează fluxurile metabolice stabilite între comunitatea populațiilor de bacterii și cea a microalgelor. Îndeplinirea acestui obiectiv va avea un impact semnificativ asupra dezvoltării biotehnologiei alternative propuse. Pentru realizarea acestui obiectiv a fost depus un proiect de cercetare (PN-III-P4-ID-PCE-2016-0865) aflat în stadiu de evaluare, acesta fiind propus în cadrul *Planului Național de Cercetare – Dezvoltare și Inovare 2014-2020*, Program 4 - “*Cercetare fundamentală și de frontieră*”, subprogram 4.1 – “*Proiecte de Cercetare Exploratorie*”. Titlul proiectului: “*Cercetări avansate asupra relațiilor intercelulare și metabolice microalge – bacterii din sistemul inovativ granular pentru epurarea apelor uzate*”; acronim: *ALBAREL*.

Bibliografie selectivă

- Adav S. S.**, Lee D.-J., Show K.-Y., Tay J.-H. (2008) Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnology Advances*, 26(5), 411-423.
- Ahsan B.**, Habib B., Parvin M., Huntington T. (2008) A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and Agriculture Organization of the United States, Rome.
- AM POS Mediu** (Autoritatea de Management pentru Programul Operațional Sectorial Mediu) (2012) Elaborarea politicii naționale de gestionare a nămolurilor de epurare. Strategia națională de gestionare a nămolurilor de epurare. Partea a III-a, Mott MacDonald.
- ANAR** (Administrația Națională „Apele Române”) (2012) Situația în România a apelor uzate urbane și a nămolului provenit din stațiile de epurare. ANAR, Ministerul Mediului și Pădurilor.
- Aravantinou A. A.**, Theodorokopoulos A. M., Manariotis D. I. (2013) Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. *Bioresource Technology*, 147, 130-134.
- Arbib Z.**, Ruiz J., Alvarez-Diaz P., Garrido-Perez C., Perales J. A. (2014) Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, 49, 465-474.
- Ardern E.**, Lockett W. T. (1914a) Experiments on the Oxidation of Sewage without the Aid of Filters. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 33(10), 523-539.
- Ardern E.**, Lockett W. T. (1914b) Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters, Part II. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 33, 1122-1124.
- Ardern E.**, Lockett W. T. (1915) Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters, Part III. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 34, 937-943.
- Azov Y.**, Shelef G., Moraine R. (1982) Carbon limitation of biomass production in high-rate oxidation ponds. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 579-594.
- Bagatin R.**, Klemes J. J., Reverberi A. P., Huisingh D. (2014) Conservation and improvements in water resource management: a global challenge. *Journal of Cleaner Production*, 77, 1–9.
- Batten D.**, Beer T., Freischmidt G., Grant T., Liffman K., Paterson D., Priestly T., Rye L., Threlfall G. (2013) Using wastewater and high-rate algal ponds for nutrient removal and the production of bioenergy and biofuels. *Water Science and Technology*, 67(4), 915-924.
- Bhatnagar A.**, Chinnasamy S., Singh M., Das S. K. (2011) Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10), 3425-3431.
- Borkenstein C. G.**, Knoblauchner J., Fruhwirth H., Schagerl M. (2011) Cultivation of *Chlorella emirsonii* with flue gas derived from a cement plant. *Journal of Applied Phycology*, 23, 131-135.
- Bouterfas R.**, Belkoura M., Dauta A. (2002) Light and temperature effects on the growth rate of freshwater algae isolated from an eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 489, 207-217.
- Brennan L.**, Owende P. (2010) Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577.
- Bui T. T.**, Han M. (2015) Removal of *Phormidium* sp. by positively charged bubble flotation. *Minerals Engineering*, 72, 108–114.
- Burducea M.**, Lobiuc A., Jigau Gh., Pintilie C., Virgolici M., Burducea I., Trofin O., Zamfirache M.-M. (2016) Municipal sludge amendments effects on growth and physiological parameters of *Ocimum basilicum* L. plants. *Scientific and Technical Conference Sludge Management*, ARA Publishing, Bucharest, pp. 291 – 299.
- Chaneva G. T.**, Uzunova A. N., Kapchina-Toteva V. M., Chankova S. G. (2008) Heavy metal stress in coincubation system *Chlamydomonas reinhardtii* / *Pisum sativum*. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 9(2), 291-300.
- Chen C.-Y.**, Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J., Chang Jo-Shu (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology*, 102, 71-81.

- Coward T.**, Lee G. M. J., Caldwell S. G. (2013) Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass. *Algal Research*, 2, 135-144.
- Craggs R. J.**, Heubeck S., Lundquits T. J., Benemann J. R. (2011) Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Science and Technology*, 63(4), 660-665.
- Craggs R.**, Sutherland D., Campbell H. (2012) Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, 24, 329-337.
- Das P.**, Thaher M. I., Hakim M. A. Q. M. A., Al-Jabri H. M. S. J., Alghasal G. S. H. S. (2016) Microalgae harvesting by pH adjusted coagulation-flocculation, recycling of the coagulant and the growth media. *Bioresource Technology*, 216, 824-829.
- de Godos I.**, Blanco S., Garcia-Encina A. P., Becares E., Munoz R. (2009) Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, 100, 4332-4339.
- de Godos I.**, Vargas V. A., Blanco s., Gonzalez M. C. G., Soto R., Garcia-Encina P. A., Becares E., Munoz R. (2010) A comparative evaluation of microalgae for the biodegradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*, 101, 5150-5158.
- de Godos I.**, Vargas V. A., Guzman H. O., Soto R., Garcia B., Garcia P. A., Munoz R. (2014) Assessing carbon and nitrogen removal in a novel anoxic-aerobic cyanobacterial-bacterial photobioreactor configuration with enhanced biomass sedimentation. *Water Research*, 61, 77-85.
- de Kreuk M. K.**, Heijnen J. J., van Loosdrecht M. C. (2005) Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), 761-769.
- Downing A. L.**, Painter H. A., Knowles G. (1964) Nitrification in the activated sludge process. *J. Proc. Inst. Sewage Purification*, 64, 130-158.
- Duka S.**, Cullaj A. (2009) Evaluation of chlorophyll as the primary index for trophic state classification. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 10(2), 401-410.
- Eurostat (2016) Sewage sludge production and disposal. http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/env_ww_spd.
- Gao D.**, Liu L., Liang H., Wu W.-M. (2011) Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(2), 137-52.
- Garcia-Perez O.**, Escalante M. E. F., de-Bashan E. L., Bashan Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45, 11-36.
- Gerardi M. H.** (2006) Wastewater bacteria. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ghasemi Y.**, Rasou-Aminia S., Fotooh-Abadi E. (2011) The biotransformation, biodegradation, and bioremediation of organic compounds by microalgae. *Journal of Phycology*, 47, 969-980.
- Ghasemi Y.**, Rasou-Aminia S., Naserib A. T., Montazeri-Najafabadya N., Mobashera M. A., Dabbagha F. (2012) Microalgae biofuel potentials. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 126-144.
- Ghirardi M. L.**, Zhang L., Lee W. J., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. (2000) Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18, 506-511.
- Gonzalez-Fernandez C.**, Ballesteros M. (2013) Microalgae auto-flocculation: an alternative to high energy consuming harvesting methods. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 991-999.
- Granados M. R.**, Acien F. G., Gomez C., Fernandez-Sevilla J. M., Grima Molina E. (2012) Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 118, 102-110.
- Grima Molina E.**, Belarbi E.-H., Fernandez F. G. A., Medina A. R., Chisti Y. (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8), 491-515.
- Gupta K. V.**, Potumarthi R., O'Donovan A., Kubicek P. C., Sharma D. G., Tuohy G. M. (2014) Bioenergy research: an overview on technological developments and bioresources. In: *Bioenergy Research: advances and applications*. Gupta K. V., Tuohy G. M., Kubicek P. C., Saddler J., Xu F. (Eds.), Elsevier, New York, pp. 23-47.

- Hannon M.**, Gimpel J., Tran M., Rsala B., Mayfield S. (2010) Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763-784.
- Harun R.**, Danquah M. K., Forde G. M. (2010) Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 199-203.
- Henze M.**, van Loosdrecht C. M. M., Ekama A. G., Brdjanovic D. (2008) Biological wastewater treatment. Principles, Modelling and Design. IWA Publishing, London.
- Hongyang S.**, Yaley Z., Chunmin Z., Xuefei Z., Jinpeng L. (2011) Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresource Technology*, 102, 9884-9890.
- Ionescu G. C.**, Ionescu I. L. (2014) Exploatarea judicioasă a stațiilor de epurare a apelor uzate. În: *Tehnologii de tratare a apei potabile, epurarea apelor uzate, gestionarea nămolului, echipamente*. Conferința „Tehnico-Științifică Performanță în Serviciile de Apă-Canal”, Editura ARA, București, pag. 3-7.
- Jenkins D.**, Richard G.M., Daigger T. G. (2004) Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. Third Edition, IWA Publishing, London.
- John P. R.**, Anisha G. S., Nampoothiri K. M., Pandey A. (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186-193.
- Kalderis D.**, Aivalioti M., Gidarakos E. (2010) Options for sustainable sewage management in small wastewater treatment plants on islands: The case of Crete. *Desalination*, 260, 211-217.
- Kantachote D.**, Naidu R., Williams B., McClure N., Megharaj M., Singleton I. (2004) Bioremediation of DDT - contaminated soil: enhancement by seaweed addition. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 632-638.
- Kelessidis A.**, Stasinakis A. S. (2012) Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management*, 32, 1186-1195.
- Khurshed A.**, Kazmi A. A. (2011) Retrospective of ecological approaches to excess sludge reduction. *Water Research*, 45, 4287-4310.
- Kouzuma A.**, Watanabe K. (2015) Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 125-129.
- Kreuk M. K.**, Kishida N., van Loosdrecht M. C. M. (2007) Aerobic granular sludge - state of the art. *Water Science and Technology*, 55(8-9), 75-81.
- Lam K. M.**, Lee T. K. (2013) Biohydrogen production from algae. In: *Biohydrogen*, Pandey A., Chang Jo-Shu, Hallenbeck C. P., Larroche C. (Eds.), Elsevier, London, pag. 161-184.
- Lananan F.**, Yunos F. H. M., Nasir N. M., Bakar N. S. A., Lam Su S., Jusoh A. (2016) Optimization of biomass harvesting of microalgae, *Chlorella* sp. utilizing auto-flocculating microalgae, *Ankistrodesmus* sp. as bio-flocculant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113, 391-396.
- Lee Y.**, Han G.-B. (2016) Complete reduction of highly concentrated contaminants in piggery waste by a novel process scheme with an algal-bacterial symbiotic photobioreactor. *Journal of Environmental Management*, 177, 202-212.
- Lettinga G.**, Van Velsen A. F. M., Hobma S. W., De Zeuw W., Klapwijk A. (1980) Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 699-734.
- Leu S. Y.**, Rosso D. D., Larson L. E., Stenstrom M. K. (2009) Real-time aeration efficiency monitoring in the activated sludge process and methods to reduce energy consumption and operating costs. *Water Environment Research*, 81, 2471-2481.
- Lin Y. M.**, Sharma P. K., van Loosdrecht M. C. M. (2013) The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. *Water Research*, 47(1), 57-65.
- Madoni P.** (2003) Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Mara D. & Horan N. (Eds.), Academic Press, pag. 361-371.
- Markou G.**, Georgakakis D. (2011) Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88, 3389-3401.

- Masojidek J.**, Torzillo G., Koblizek M. (2013) Photosynthesis in microalgae. In: *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, Richmond A. & Hu Q. (Eds.), Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 21-36.
- Mata M. T.**, Martins A. A., Caetano S. N. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- McGriff C. E.**, McKinney E. R. (1972) The removal of nutrients and organics by activated algae. *Water Research*, 6(10), 1155-1164.
- McHugh D. J.** (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No. 441, Rome.
- Min M.**, B. Hu, W. Zhou, Y. Li, P. Chen, R. Ruan (2012) Mutual influence of light and CO₂ on carbon sequestration via cultivating mixotrophic alga *Auxenochlorella protothecoides* UMN280 in an organic carbon-rich wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1099–1105.
- Mishima K.**, Nakamura M. (1991) Self-immobilization of aerobic activated sludge - A pilot study of the Aerobic Upflow Sludge Blanket Process in municipal sewage treatment. *Water Science and Technology*, 23(4-6), 981–990.
- Munoz R.**, Guiesse B. (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, 40, 2799-2815.
- Noyes R.** (1994) Unit operations in environmental engineering. William Andrew Publishing, New Jersey.
- Olguin E. J.** (2012) Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30, 1031-1046.
- Orhon D.** (2015) Evolution of the activated sludge process: the first 50 years. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(4), 608-640.
- Orhon D.**, Babuna F. G., Karahan O. (2009) Industrial wastewater treatment by activated sludge. IWA Publishing, London.
- Oswald W. J.**, Asce A. M., Gotaas B. Harold, Asce M. (1955) Photosynthesis in sewage treatment. *American Society of Civil Engineers*, 2849, 73-105.
- Palmeiro-Sanchez T.**, Val del Rio A., Mosquera-Corral A., Campos J. L., Mendez R. (2013) Comparison of the anaerobic digestion of activated and aerobic granular sludges under brackish conditions. *Chemical Engineering Journal*, 231, 449-454.
- Park J. B. K.**, Craggs J. R., Shilton N. A. (2011) Wastewater treatment high-rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102, 35-42.
- Perez-Elvira S. I.**, Diez P. N., Polanco F. F. (2006) Sludge minimisation technologies. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5, 375-398.
- Perez-Uz B.**, Arregui L., Calvo P., Salvado H., Fernandez N., Rodriguez E., Zornoza A., Serrano S. (2010) Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems. *Water Research*, 44(17), 5059–5069.
- Pittman K. J.**, Dean P. A., Osundeko O. (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17-25.
- Pouliot Y.**, Buelna G., C. Racine, J. de la Noüe (1989) Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production, *Biological Wastes*, 29, 81–91.
- Racoviteanu G.**, Predescu D. (2016) Innovative Technologies for Sludge Treatment. *Scientific and Technical Conference Sludge Management*, ARA Publishing, Bucharest, pp. 8-20.
- Ramanan R.**, Kim B.-H., Cho D.-H., Oh H.-M., Kim H.-S. (2016) Algae-bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, 34, 14-29.
- Ranade V. V.**, Bhandari V. M. (2014) Industrial wastewater treatment, recycling, and reuse: an overview. In: *Industrial wastewater treatment, recycling, and reuse*, Ranade V. V. & Bhandari V. M. (Eds.), Vol. I, Elsevier, Ltd., pag. 1-80.
- Rashid N.**, Rehman Ur S., Han J.-In (2013) Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochemistry*, 48, 1107-1110.

- Rawat I., Kumar R. R., Mutanda T., Bux F.** (2011) Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biomass production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424.
- Razzaka A. S., Hossaina M. M., Lucky A. R., Bassi S. A., de Lasa H.** (2013) Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622-653.
- Rodolfi L., Zittelli G. C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Niccolo B., Tredici M. M.** (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112.
- Roger P.** (2004) N₂ fixing cyanobacteria as biofertilizers in rice fields. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (Ed.), Blackwell Science, pag. 392-402.
- Rosch C., Skarka J., Patyk A.** (2009) Microalgae - opportunities and challenges of an innovative energy source. 17th European Biomass Conference and Exhibition, Hamburg.
- Rusten B., Sahu A. K.** (2011) Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy. *Water Science and Technology*, 64, 1195-1201.
- Schenk M. P., Thomas-Hall R. S., Stephens E., Marx C. U., Mussgnug H. J., Posten C., Kruse O., Hankamer B.** (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1(1), 20-43.
- Schumacher O., Feodorov V.**, 2016. The Baumgarte sewage sludge treatment concept; thermal processes for sewage sludge treatment and phosphorous recycling! Scientific and Technical Conference Sludge Management, ARA Publishing, Bucharest, 227 – 231.
- Smith B. T., Davis R. H.** (2012) Sedimentation of algae flocculated using naturally-available magnesium-based flocculants. *Algal Research*, 1, 32-39.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A.** (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stroe F., Demetrescu E., Bica I.** (2014) Tehnologii de tratare a apei potabile, epurarea apei uzate, gestionarea nămolului, echipamente. Conferința Tehnico-Științifică "Performanță în Serviciile de Apă-Canal", Editura ARA, București.
- Subashchandrabose R. S., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R.** (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 26(9), 896-907.
- Sun Y., Chen Z., Wu G., Wu Q., Zhang F., Niu Z., Hu H.-Y.** (2016) Characteristics of water quality of municipal wastewater treatment plants in China: implications for resources utilization and management. *Journal of Cleaner Production*, 131, 1-9.
- Sutherland I. W.** (2001) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology*, 43, 77-86.
- Tam N. F. Y., Wong Y. S.** (1989) Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*, 58, 19-34.
- Tiron O., Bumbac C.** (2016) Bioindicators of community structure in microalgae-bacteria processes. *Journal of Biotechnology*, 231, S89, Congresul European de Biotehnologie, 05-07 Mai 2016, Riga, Letonia.
- Tiron O., Bumbac C., Bădescu V. R., Pătroescu V., Postolache C.** (2015a) Granular activated algae for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 71(6), 832-839.
- Tiron O., Bumbac C., Pătroescu V., Cristea I., Postolache C.** (2015b) Optimization of dairy wastewater treatment using microalgae-activated sludge system. A 8-a Conferință Internațională "Ingineria și Managementul Mediului", 9-12 septembrie, 2015, Iași.
- Tiron O., Bumbac C., Pătroescu I. V., Ștefănescu M.** (2015c) Activated algae granulation: a biological solution for efficient microalgae harvesting. *Journal of Biotechnology*, Vol. 208, pag. S19, Congresul European de Biotehnologie, 07-09 Mai, 2015, București.

- Tricolici O.**, Bumbac C., Pătroescu V., Postolache C. (2014a) Dairy wastewater treatment using activated sludge-microalgae system at different light intensities. *Water Science and Technology*, 69(8), 1598-1605.
- Tricolici O.**, Bumbac C., Postolache C. (2014b) Microalgae-bacteria system for biological wastewater treatment. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15(1), 268-276.
- Velaquez-Orta S. B.**, Graham D. (2012) Integration of waste emissions and energy use in sustainable urban infrastructure models. Planet under Pressure, London.
- Wagner D. S.**, Ramin E., Szabo P., Dechesne A., Plosz B. G. (2015) *Microthrix parvicella* abundance associates with activated sludge settling velocity and rheology - Quantifying and modelling filamentous bulking. *Water Research*, 78, 121–132.
- Wang L.**, Liu J., Zhao Q., Wei W., Sun Y. (2016) Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems. *Bioresource Technology*, 211, 1-5.
- Wang L.**, Min M., Li Y., P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Wang Y., Ruan R. (2010) Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174–1186.
- Wilen B.-M.**, Lumley D., Mattson A., Mino T. (2008) Relationship between floc composition and flocculation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. *Water Research*, 42, 4404-4418.
- Wilson M. H. H.**, Groppo J., Placido A., Graham S., Morton S.A., Santillan-Jimenez E., Shea A., Crocker M., Crofcheck F., Andrews R. (2014) CO₂ recycling using microalgae for the production of fuels. *Applied Petrochemical Research*, 4, 41–53.
- Wuhrmann K.** (1964a) Nitrogen removal in sewage treatment processes. *Vorh. Int. Ver. Limnol.*, 580-596.
- Wuhrmann K.** (1964b) The removal of nitrogen and phosphorus compounds from domestic sewage. Results of experiments on a technical scale. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 26, 520 – 558.
- Wuhrmann K.**, Mechsner K. (1965) The influence of oxygen tension and hydrogen ion concentration on microbiological denitrification. *Pathol. Microbiol.* 28, 99 – 106.
- Yan C.**, L. Zhang, X. Luo, Z. Zheng (2013) Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. *Ecological Engineering*, 51, 24–32.
- Zamani N.**, Noshadi M., Amin S., Niazi A., Ghasemi Y. (2012) Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 649-656.
- Zhang J.**, Hu Bo (2012) A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresource Technology*, 114, 529-535.
- Zhang X.**, Li X., Zhang Q., Peng Q., Zhang W., Gao F. (2014) New insight into the biological treatment by activated sludge: the role of adsorption process. *Bioresource Technology*, 153, 160-164.
- Zhao F.**, Chu H., Tan X., Yang L., Su Y., Zhou X., Zhao J., Zhang Y. (2016) Using axial vibration process to mitigate membrane fouling and reject extracellular organic matter in microalgae harvesting. *Journal of Membrane Science*, 517, 30-38.
- Zheng Y.-M.**, Yu H.-Q., Sheng G.-P. (2005) Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry*, 40, 645-650.

LUCRĂRI PUBLICATE / COMUNICATE

I. Lucrări publicate

Tricolici O., Bumbac C., Bădescu V. R., Postolache C. (2013) Evaluation of combined activated sludge – microalgae system for wastewater treatment. Volumul de Lucrări al celui de-al 17-lea Simpozion Internațional "Mediul și Industria" - SIMI 2013, pag. 53-61, 29-30 octombrie, 2013, București.

Tricolici O., Bumbac C., Pătroescu V., Postolache C. (2014) Dairy wastewater treatment using activated sludge-microalgae system at different light intensities. *Water Science and Technology*, Vol. 69(8), pag. 1598-1605.

Tricolici O., Bumbac C., Postolache C. (2014) Microalgae-bacteria system for biological wastewater treatment. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Vol. 15(1), pag. 268-276.

Bumbac C., Ionescu I., **Tricolici O.** (2014) Aerobic granular sludge vs. conventional wastewater treatment technology. *RomAqua*, Vol. 91, nr. 1, pag. 21-24.

Tiron O., Bumbac C., Bădescu V. R., Pătroescu V., Postolache C. (2015) Granular activated algae for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, Vol. 71(6), pag. 832-839.

Bumbac C., Ionescu I. A., **Tiron O.**, Bădescu V. R. (2015) Continuous flow aerobic granular sludge reactor for dairy wastewater treatment. *Water Science and Technology*, Vol. 71(3), pag. 830-835.

Ionescu I., **Tiron O.**, Bumbac C., Bădescu V., Cosma C. (2015) Impact of heavy metals on the viability of activated sludge. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Vol. 16(4), pag. 1515-1524.

Tiron O., Bumbac C., Pătroescu I. V., Ștefănescu M. (2015) Activated algae granulation: a biological solution for efficient microalgae harvesting. *Journal of Biotechnology*, Vol. 208, pag. S19, Congresul European de Biotehnologie, 07-09 mai, 2015, București.

Bumbac C., Ionescu A. I., **Tiron O.**, Pătroescu I. V. (2015) A comparative analysis of phenol inhibitory effect on activated sludge: conventional versus granular. Volumul de Lucrări al celei de-a 15-a GeoConferințe Internaționale Științifice Multidisciplinare SGEM, Vol. II, pag. 3-10, 18-24 Iunie, 2015, Albena, Bulgaria.

Ionescu I. A., **Tiron O.**, Bumbac C., Bădescu V. R. (2015) The impact of lead and cadmium on the viability of activated sludge. Volumul de Lucrări al celei de-a 15-a GeoConferințe Internaționale Științifice Multidisciplinare SGEM, Vol. II, pag. 499-506, 18-24 Iunie, 2015, Albena, Bulgaria.

Tiron O., Bumbac C. (2016) Bioindicators of community structure in microalgae-bacteria processes. *Journal of Biotechnology*, 231, S89, Congresul European de Biotehnologie, 05-07 mai, 2016, Riga, Letonia.

II. Lucrări comunicate

Bumbac C., Ionescu I., **Tricolici O.** (2013) Aerobic granular sludge vs. conventional wastewater treatment technologies. *Workshop-ul Young Water Professionals (YWP) Romanian Chapter "Tehnologii Inovatoare"*, 29-30 octombrie, 2013, București.

Tiron O., Bumbac C., Pătroescu I. V., Bădescu V. R., Cristea I. (2014) Soluție alternativă de epurare ape uzate utilizând sistemul microalge-bacterii. *Salonul Cercetării Românești*, 15 – 18 octombrie, 2014, București.

Tricolici O., Bumbac C., Pătroescu V., Bădescu V. R. (2014) Procedeu de obținere granule mixte microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate. *Salonul de Invenții și Inovații INVENTIKA*, 15-18 octombrie, 2014, București (prezentarea cererii de brevet de invenție RO 130247-A0).

- Tricolici O.**, Bumbac C., Pătroescu V., Bădescu V. R. (2015) Procedeu de obținere granule mixte microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate. *Salonul Internațional al Cercetării, Inovării și Inventicii PRO INVENT*, Ediția a XII-a, 25-27 martie 2015, Cluj-Napoca (prezentarea cererii de brevet de invenție RO 130247-A0).
- Tiron O.**, Bumbac C., Pătroescu V., Cristea I., Postolache C. (2015) Optimization of dairy wastewater treatment using microalgae-activated sludge system. *A 8-a Conferință Internațională "Ingineria și Managementul Mediului"*, 9-12 septembrie, 2015, Iași.
- Tiron O.**, Bumbac C., Cristea I. N., Pătroescu V. (2015) Continuous-flow wastewater treatment using activated algae granules. *A 7-a Conferință Internațională Est-Europeană IWA (International Water Association) YWP (Young Water Professionals)*, 17-19 septembrie, 2015, Belgrad, Serbia.
- Bumbac C., **Tiron O.**, Ionescu I., Pătroescu V., Bădescu V. (2015) Evaluation of different feeding strategies and reaction conditions for phenol degradation in aerobic granular sludge SBR. *A 7-a Conferință Internațională Est-Europeană IWA (International Water Association) YWP (Young Water Professionals)*, 17-19 septembrie, 2015, Belgrad, Serbia.
- Bumbac C., Ionescu I., **Tiron O.** (2016) Aerobic granular sludge reactor start-up: focusing on microbial diversity and granule morphology. *A 8-a Conferință Internațională Est-Europeană IWA (International Water Association) YWP (Young Water Professionals)*, 12-14 mai, 2016, Gdansk, Polonia.
- Tricolici O.**, Bumbac C., Pătroescu V., Bădescu V. R. (2016) Procedure for obtaining mixed microalgae – bacteria granules for wastewater treatment. *A 8-a Ediție a Expoziției Europene de Creativitate și Inovare*, 19 – 21 mai, 2016, Iași (prezentarea cererii de brevet de invenție RO 130247-A0).
- Cosma C., **Tiron O.**, Pătroescu I. V., Ștefănescu M. (2016) Identification of some microalgae species which can develop tastes and odours in drinking water treatment plants. *A 19-a Ediție a Simpozionului Internațional "Mediul și Industria"*, 13-14 octombrie, 2016, București.

III. Cerere de Brevet de Invenție

Cerere de brevet de invenție nr. A/00111/12-02-2014, **RO 130247-A0**:

Procedeu de obținere granule mixte microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate.

Tricolici Olga, Bumbac Costel, Pătroescu Ion Viorel, Bădescu Valeriu Robert

III. Premii / Medalii

Premiul pentru cea mai bună prezentare orală obținut de către Tiron Olga în cadrul celei de-a 6-a Conferințe Internaționale Est-Europene IWA (International Water Association) YWP (Young Water Professionals) "East meets West", 28-30 mai, 2014, Istanbul, Turcia.

Medalia de Bronz pentru cererea de brevet de invenție RO 130247-A0: "Procedeu de obținere granule mixte microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate", **Tricolici O.**, Bumbac C., Pătroescu V., Bădescu V. R., obținută la *Salonul de Invenții și Inovații INVENTIKA*, 15-18 octombrie, 2014, București.

Medalia de Aur și Diploma de Excelență obținute pentru cererea de brevet de invenție RO 130247-A0: "Procedeu de obținere granule mixte microalge – bacterii pentru epurarea apelor uzate", **Tricolici O.**, Bumbac C., Pătroescu V., Bădescu V. R., în cadrul *Salonului Internațional al Cercetării, Inovării și Inventicii PRO INVENT*, Ediția a XII-a, 25-27 martie, 2015, Cluj-Napoca.

Premiul Prof. Mariapia Viola Magni EBTNA (European Biotechnology Thematic Network Association) obținut de către Tiron Olga pentru cea mai bună prezentare orală susținută în cadrul *Congresului European de Biotehnologie*, 07-09 mai, 2015, București.

Premiu pentru cea mai elocventă și originală prezentare obținut de către Tiron Olga în cadrul celei de-a 18-a Ediții a Simpozionului Internațional “Mediul și Industria”, 29-30 octombrie, 2015, București.

Medalia de Aur obținută pentru cererea de brevet de invenție RO 130247-A0: ”Procedure for obtaining mixed microalgae – bacteria granules for wastewater treatment”, **Tricoli O., Bumbac C., Pătroescu I. V., Bădescu R. V., obținută în cadrul celei de-a 8-a Ediții a Expoziției Europene a Creativității și Inovării, 19 – 21 mai, 2016, Iași.**