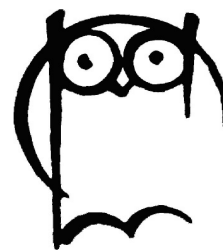




**XXXI. Országos Tudományos
Diákköri Konferencia**

Kémiai és Vegyipari Szekció



**Biofilm kolonizáció vizsgálata
műszál alapú hordozókon**

Szerző:

Dobosy Péter

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Környezettudomány MSc

Témavezetők:

Dr. Barkács Katalin

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Jurecska Laura

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

**Eger
2013. április 4-6**

TARTALOMJEGYZÉK

1. Absztrakt	2
2. Bevezetés	3
3. Szakirodalmi áttekintés	4
3.1. Biofilmek felépítése	4
3.1.1. Biofilmek szerkezete	4
3.1.2. Biofilmek kialakulása	5
3.1.2.1. Megtapadás és kötődés	6
3.1.2.2. Oszródás és szaporodás	6
3.1.2.3. Érés	7
3.1.2.4. Szétesés-újraszuszpendálódás	7
3.2. Biofilmek előfordulása	8
3.2.1. A biofilmek nemkívánatos tulajdonságai	8
3.2.2. A biofilmek hasznos tulajdonságai	8
3.3. Biofilmek alkalmazása a szennyvíztisztításban	9
3.3.1. Biofilm reaktorok	10
3.3.1.1. Forgótárcsás biológiai kontaktor	10
3.3.1.2. Rögzített ágyas reaktorok	10
3.3.1.2.1. Csepegtetőtestes reaktor	11
3.3.1.2.2. Elárasztott rögzített ágyas reaktor	11
3.4. Biofilmek mennyiségi és minőségi meghatározása	13
3.4.1. Fizikai módszerek	13
3.4.2. Kémiai módszerek	14
3.4.3. Biokémiai módszerek	14
3.4.4. Mikrobiológiai módszerek	15
4. Alkalmazott eszközök és módszerek	17
4.1. Az Organica kaszkád	17
4.2. Vizsgált hordozók	18
4.3. Szárazanyag-tartalom meghatározás	20
4.4. Szervesanyag-tartalom meghatározás	20
4.5. Enzimaktivitás meghatározás	21
5. Kísérleti eredmények	22
5.1. Biofilmek szárazanyag-tartalmának alakulása	22
5.2. Biofilmek szervesanyag-tartalmának alakulása	23
5.3. Biofilmek enzimaktivitásának alakulása	25
6. Összefoglalás	29
7. Irodalomjegyzék	31
8. Mellékletek	34
Köszönetnyilvánítás	38

1. Absztrakt

A biofilmeket a szennyvíztisztítás során az utóbbi években egyre szélesebb körben alkalmazzák szerte a világon. Elterjedésük elsősorban azzal magyarázható, hogy rendkívül jól kombinálhatóak más szennyvíztisztítási technikákkal, valamint, hogy segítségével rendkívül jó hatásfokú nitrifikáció, denitrifikáció és szerves anyag degradáció érhető el.

Tudományos diákköri munkám célja volt, hogy megállapítsam a vizsgálatokhoz kiválasztott műszál alapú biofilm hordozó típusok közül melyik segíti a szennyvíztisztítás során a biofilm kialakulását. Vizsgálataimat 4 különböző műszál alapú biofilm hordozóval (3 különböző szövésű polipropilén és 1 poliészter) végeztem. A négyféle hordozót egy kommunális szennyvizet kezelő, 8 kaszkád reaktorból álló félüzemi biológiai tisztító rendszerbe telepítettük az Organica Technológiák Zrt. Telki Ökotechnológiai Fejlesztő Központjában. A 18 napos kísérlet során minden reaktorból 5 alkalommal vettem biofilm mintát.

Kísérleti munkám során a hordozókról kinyert biofilmek szárazanyag- és szervesanyag-tartalmát, valamint dehidrogenáz-enzimaktivitását mértem TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) tesztel, laboratóriumi körülmények között. A mért adatokat összevettem a főbb, rendelkezésemre álló vízminőségi paraméterek értékeinek alakulásával.

Vizsgálataim során kimutattam, hogy a polipropilén hordozókon nagyobb mennyiségű biofilm képződött, mint a poliészteren. A polipropilén hordozók közül az egyik típusú, műszaki polipropilén szál felületén kolonizált a legnagyobb tömegű és egyben az enzimaktivitás mérések alapján a legnagyobb aktivitású biofilm.

2. Bevezetés

A természetes vizekbe kerülő szennyező anyagok növekvő mennyisége korunk egyik legaggasztóbb problémája. Ennek hatására napjainkban a különböző szennyvíztisztítási eljárásokra egyre nagyobb hangsúly helyeződik.

Munkám a biológiai szennyvíztisztítás egyik dinamikusan fejlődő területéhez, a biofilmeket alkalmazó rendszerekhez kapcsolódik.

Tudományos diákköri munkám kísérleti részét az Organica Technológiák Zrt. Telki Ökotechnológiai Fejlesztő Központjában és az ELTE-TTK Analitikai Kémiai Tanszékén végeztem. Az Ökotechnológiai Központ egy félüzemi rendszer, mely Telki kommunális szennyvizét használja. Sajátossága abban rejlik, hogy a tisztítást a különböző növények és mikroorganizmusok együttese végzi, ezáltal a szennyezőanyagok biológiai eltávolítási hatásfoka megnő.

Tudományos diákköri kutatásaim során a Telki kísérleti szennyvíztisztító rendszerbe telepített négy műszál alapú biofilm hordozó vizsgálatát végeztem el. Célom volt, hogy megállapítsam melyik hordozó felületén telepedik meg a legnagyobb mennyiségű és aktivitású biofilm.

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1. Biofilmek felépítése

3.1.1. Biofilmek szerkezete

A biofilmek (más néven élőbevonatok) felületen összetapadt, egybefüggő bevonatot képező mikroorganizmusokból állnak. A sejtek általában egy speciális rendszerben az úgynevezett EPS-mátrixban (extracellular polymeric substance – extracelluláris polimer anyagok) helyezkednek el. A mátrix elsősorban a mikroorganizmusok által termelt poliszacharidokból, fehérjékből és lipidekből áll. Ennek köszönhetően a biofilmek képesek megtapadni a legkülönbözőbb felületeken (pl. fémek, műanyagok, talajrészecskék, kőzetek, növények, stb.). Az EPS a planktonikus sejtek megtapadásán kívül a biofilmet alkotó sejtek osztódása során keletkezett sejteket is rögzíti a biofilm felszínén, így biztosítva annak folytonos megújulását. A mátrix olyan erős, hogy bizonyos feltételek mellett akár fosszilizálódásra is képes.

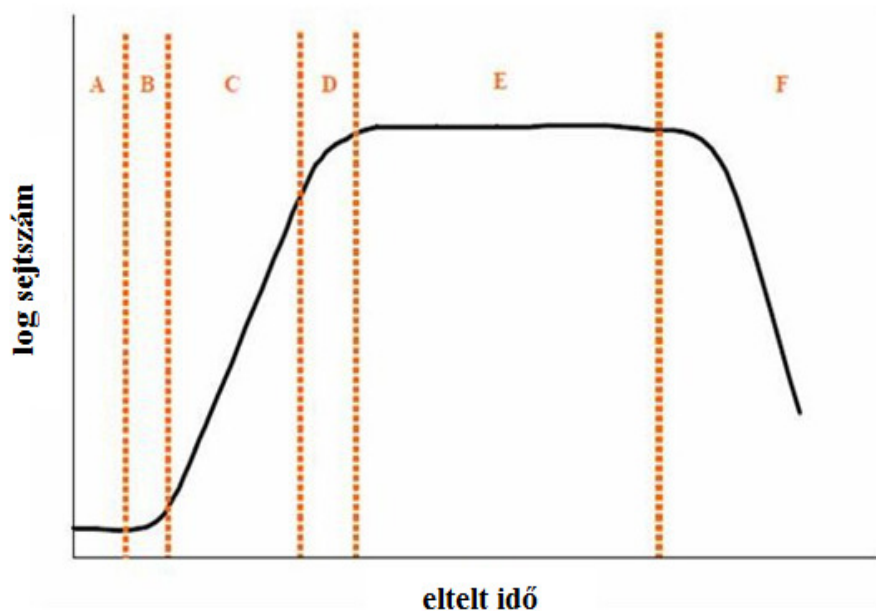
A bevonat vastagsága néhány mikrométertől a fél méterig terjedhet. A biofilm réteg kialakulhat egyetlen baktérium fajból is, azonban sokkal gyakoribb, hogy a kolóniák kialakításában többféle taxon vesz részt. A bevonatban élő baktériumok sejtei bonyolult módon rendeződnek el, másodlagos struktúrákat, mikrokolóniákat hoznak létre, melyek között összefüggő csatornák rendszere biztosítja, hogy a tápanyagok megfelelő módon jussanak el az egyes sejtekhez.

A mikrobák több körülménytől függően alakítanak ki biofilmet. Ilyenek közé tartozik a specifikus vagy nonspecifikus kötődési helyek felismerése, a tápanyagbőség vagy a kis koncentrációjú antibiotikumnak való kitettség. Amikor egy mikroba életformája a biofilmre jellemző növekedési módra vált át, fenotípusos változáson megy át, melynek során génjeinek szabályozása átalakul. A biofilm közösségekben élő mikroorganizmusok nagymértékben különböznek az ugyanazon faj szabadon úszó példányaiktól, mivel a védettebb környezetben megnyílik az interakció és kooperáció lehetősége köztük. (MARSHALL, 1992)

3.1.2. Biofilmek kialakulása

A mikroorganizmusok természetes és mesterséges körülmények között kétféle állapotban fordulhatnak elő: planktonikus (szabadon lebegő), vagy valamilyen szilárd felülethez kötött állapotban. A baktériumok általában a szilárd hordozókat részesítik előnyben, mivel ez nagyobb táplálékmennyiséget és nagyobb védelmet biztosít a külső hatásokkal szemben. A mikroorganizmusok számára számos más előnyt is biztosít a biofilm kolóniákban folytatott életmód. A közösségi lét folytán a mikrobák képesek ellátni olyan speciális funkciókat (például metabolikus terhek megosztása), melyeket önmagukban nem lennének képesek végrehajtani.

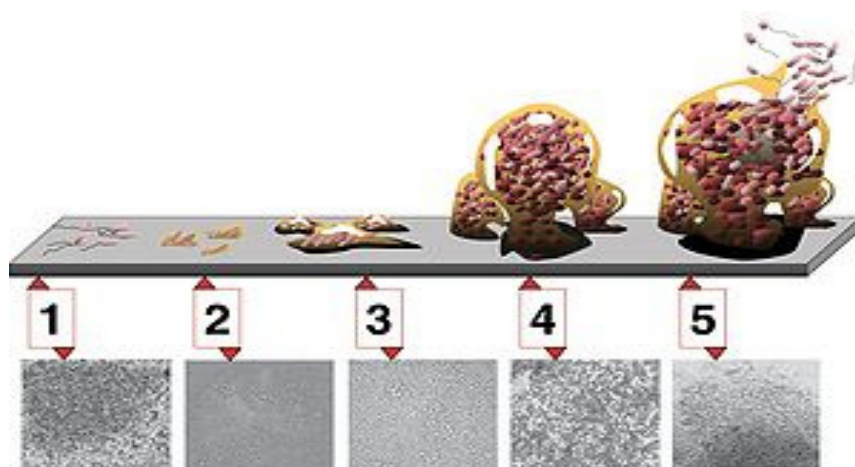
A biofilmek növekedési kinetikája követi a baktériumok hagyományos szaporodási görbáját, melyet a 1. ábra szemléltet.



- A: Lag fázis
- B: Gyorsuló növekedési szakasz
- C: Exponenciális fázis
- D: Lassuló növekedési szakasz
- E: Egyensúlyi szakasz
- F: Hanyatló fázis

1. ábra Baktériumok szaporodási görbéje (BENEDEK, 1990)

A biofilmek fejlődését (2. ábra) a szakirodalom egy többlépcsős fejlődési folyamatként írja le (SAUER, 2007).



- 1-2: Megtapadás és kötődés
- 3: Szaporodás
- 4: Érés
- 5: Szétesés-újraszuszpendálódás

2. ábra A biofilm fejlődésének lépcsői
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm?oldid=447535436>)

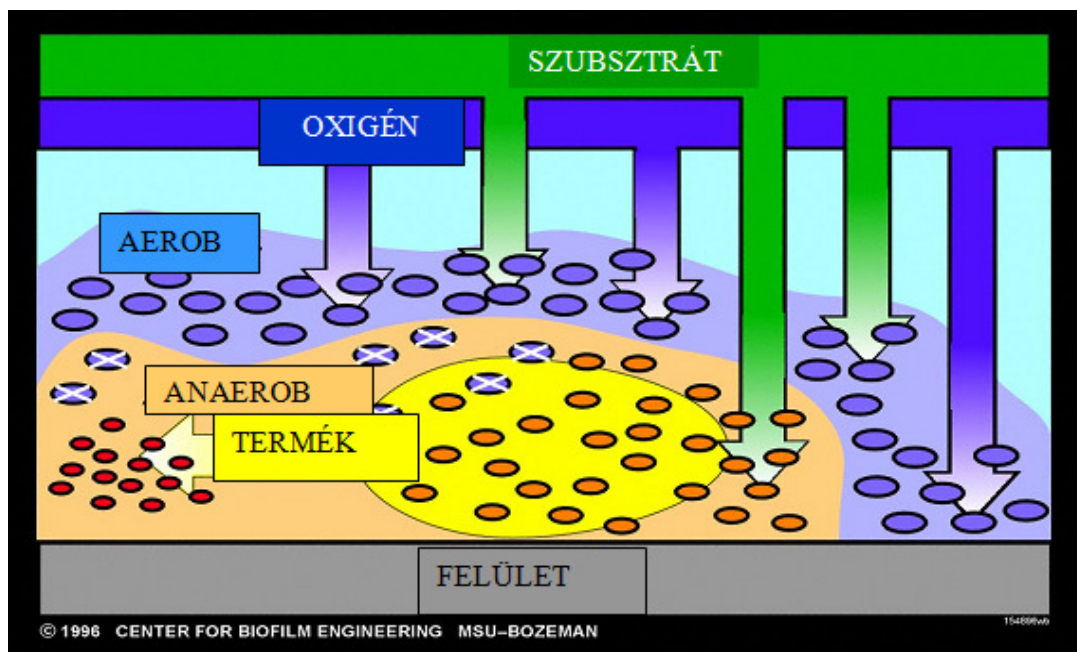
3.1.2.1. Megtapadás és kötődés

A biofilm képződésekor először a szabadon úszó mikroorganizmusok hozzátapadnak valamilyen szilárd felülethez. A megkötődésben elsősorban a szilárd hordozó kedvező fizikai-kémiai tulajdonságai, a kemotaxis valamint a különféle turbulencia viszonyok játszanak fontos szerepet. A kolónia kialakulásakor az első sejtek gyenge, könnyen elszakítható kötésekkel, van der Waals-erőkkel kötődnek a szilárd felülethez. Az első kolonizáló sejtek elősegítik a többi sejt letelepedését az adhézións kötőhelyek kialakításával, és egyre nagyobb mennyiségű EPS-t termelnek létrehozva ezzel egy olyan közeget, amely védelmet nyújt a környezeti behatásokkal szemben. A fajok egy része nem képes önállóan a szilárd felülethez rögzülni, de az EPS-hez vagy a korai kolonista sejtekhez már ige. (SZÉKELY, 2008)

3.1.2.2. Osztódás és szaporodás

A mikrobák felületen való megtapadásuk után szaporodásnak indulnak és úgynevezett mikrokolóniákat hoznak létre. A kolonizáció kezdete után a biofilm növekedését újabb mikroorganizmusok megtapadása és a már letelepedett sejtek osztódása okozza. A szilárd felszínhez tapadt mikrobák egy háromdimenziós mátrixot hoznak létre, amelyet az általuk

termelt EPS tart össze. A réteg vastagsága függ az eltelt időtől, a tápanyag mennyiségtől és a biofilmet alkotó mikrobáktól. Az élőbevonatok felépítésében általában többféle mikroba vesz részt, így összetétele heterogén, benne különböző rétegek alakulnak ki. A szilárd felszínhez közeli rétegben anaerob, míg a vizes fázis felőli részen aerob anyagcserét folytató mikroba közösségek találhatók (3. ábra).



3. ábra A biofilm heterogén felépítése
(<http://www.biofilm.montana.edu/files/CBE/images/154896wb.thumbnail.jpg>)

3.1.2.3. Érés

Az érés folyamán a biofilm mennyisége közelítően állandósult és innentől kezdve elsősorban csak formájában és méretében változik meg. Az élőbevonatban csatornák képződnek, melyek az egész biofilmet behálózzák, elősegítve ezzel a sejtek közötti anyagáramlást. Az érett biofilm 97%-ban vizet tartalmaz (SUTHERLAND, 2001).

3.1.2.4. Szétesés-újraszuszpendálódás

A biofilm növekedése csak egy bizonyos ideig lehetséges, mivel az elérhető tápanyag korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre. A kialakult film felszakadhat, kisebb-nagyobb darabok leválhatnak és egy újabb szilárd felületen megtapadva ismét biofilmet hozhatnak létre. Ilyen hatásokat válthat ki például az áramlás sebességének a megváltozása, turbulens áramlás kialakulása.

A biofilm képződés utolsó állomása, amikor a biofilm szétesik és újra planktonikus formává alakul át. Ez olyan esetekben történik meg, amikor már nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségű tápanyag a mikrobák számára. Ilyen esetben a mikrobák egy ideig még képesek

olyan bontó enzimeket előállítani, melyek segítségével az EPS bizonyos részeit táplálékká tudják alakítani, de ez csak korlátozott ideig lehetséges. Amint elfogy a tápanyag, a mikrobák ismét planktonikussá válnak vagy elpusztulnak.

3.2. Biofilmek előfordulása

A biofilmek a természetben mindenhol előfordulnak, ahol elegendő mennyiségű tápanyag és csapadék áll rendelkezésre. A mikroorganizmusok szinte minden faja képes valamilyen módon a felszínhez vagy egy másik példányhoz rögzülni.

Az esőerdőtől a sivatagig bármilyen nem steril környezetben szinte minden állandó felszínen képződhet biofilm a hévforrások vizeitől a fagyos gleccserekig. A biofilmek káros és hasznos tulajdonságai egyaránt ismeretesek.

3.2.1. A biofilmek nemkívánatos tulajdonságai

A biofilmek elsősorban zárt rendszerekben fordulnak elő (pl. csővezetékek, tartályok). Jellemzően azokon a pontokon találhatók meg, ahol az áramlási sebesség lecsökken, vagy azokon a helyeken, ahol a fertőtlenítés és tisztítás nehezen valósítható meg.

Az emberi lakóköznyezetben a biofilmek leginkább a zuhanyzóban képződnek, ahol a nedves és meleg klíma megfelelő környezetet biztosít számukra. A klímaberendezésekben kialakuló biofilm elsősorban a hőátadás hatékonyságát csökkenti. A biofilmek számtalan problémát okoznak a tengerekben létrehozott mesterséges létesítményekben is. A tengeri gáz- és olajvezetékeken kialakuló élőbevonatok jelentős korróziós problémák előidézői. A hajókhoz és egyéb vízi járművekhez tapadt biofilmek elősegítik más tengeri élőlények, például a kacs lábú rákok megkötődését, amelyek következtében a járművek akár 20%-kal lassulhatnak. A biofilmek számos betegség kialakulásáért is felelősek. Ilyenek például a fogínygyulladás, középfülgyulladás, vagy a fogakon kialakult dentális plakk, ami rendkívüli mértékben teszi ki a fogakat a különböző baktériumok anyagcseretermékeinek. (PAP, 2011)

3.2.2. A biofilmek hasznos tulajdonságai

A biofilmeknek számos hasznos funkciója is ismeretes. A természetben előforduló biofilmek nagy szerepet játszanak a vizek tisztaságának megőrzésében, mivel az itt megtalálható mikrobák képesek a különböző toxikus anyagok degradálására. Számos szennyvíztisztító üzemen a különböző hordozókra növesztett biofilmben a baktériumok kivonják és lebontják

a szerves anyagok nagy részét, valamint az élőbevonatban lévő kerekessférgek a víz lebegőanyag tartalmának csökkentéséért felelősek. A biofilmek nagy szerepet játszanak a vizekben lévő kőolajszennyezés eltávolításában is, mivel az itt előforduló mikrobaközösség jelentős szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkezik (a csoport legismertebb képviselője az *Alcanivorax borkumensis*).

3.3. Biofilmek alkalmazása a szennyvíztisztításban

A biofilmek a szennyvíztisztítás olyan elemei, melyek egyaránt részt vesznek az oldott komponensek biológiai lebontásában és a lebegőanyagok eltávolításában. Az 1980-as évek elején Franciaországban kombinálták először a tisztításnál alkalmazott szűrést a biofilmes szennyvíztisztítási technológiával (biofilter). Ennek során első lépésként levegőztetett homokszűrést alkalmaztak a KOI (a szerves anyag tartalmat jellemző kémiai oxigén igény) eltávolítására. Ezen biofilmes technológiát elsősorban a kommunális szennyvíztisztításban biológiai lépcsőként alkalmazzák, biztosítva ezzel a szennyvíz szinte teljes nitrifikációját.

Az utóbbi években a biofilmes szennyvíztisztítást egyre szélesebb körben alkalmazzák a különböző ipari szennyvíztisztító-üzemek. A biofilmes szennyvíztisztítás során a biofilterekre érkező szennyvizet a legtöbb esetben a lebegőanyagoktól részben meg kell tisztítani. A nyers szennyvizet sok esetben például dobszűrőn keresztül engedik át. A biofilmekkel történő tisztítás hatásfokát számos paraméter befolyásolja. Ezek közül a legfontosabbak a megfelelő működési körülmények biztosítása (levegő ellátottság és áramlási sebesség), a szűrő anyaga és az elegendő mennyiségű tápanyag biztosítása. (TARDY, 2006)

Leginkább az olyan rendszerek bizonyultak hatékonynak, amelyeknél rögzített filmes egységeket építettek be az eleveniszapos medencékbe. Ez a technológia elsősorban toluollal szennyezett talajvíz, halfeldolgozásból, valamint sör- és üdítőgyártásból származó szennyvizek kezelésére alkalmazható.

Ezen rendszerek speciális esete, amikor a biológiailag nehezen bontható, nagy szervesanyag-tartalmú ipari szennyvizek tisztításánál különböző porszerű örleményt adagolnak az eleveniszapos rendszerbe. Ilyen anyagok például az aktív szén és a zeolit, melyek szintén kiváló biofilm hordozók.

Az aktív szénport az előülepített szennyvízhez, a levegőztető előtt adagolják. Az örlemény koncentrációja a befolyó szennyvíz szennyezőanyag tartalmától függően 50-300 mg/L. Ezzel

a technológiával elsősorban a benzol és különböző klór-fenol vegyületek távolíthatók el jó hatásfokkal. (GYULAVÁRI, 2002)

A zeolit adagoláson alapuló technológiák közül az egyik legismertebb az úgynevezett ZeoRap® módszer. Ebben az esetben az adagolt őrlemény természetes zeolitot tartalmaz, melynek szemcsemérete kisebb, mint 110 μm , fajlagos felülete 60 m^2/g . A zeolitot a lebegőanyag koncentrációjára vonatkoztatva 5%-os mennyiségben adagolják a levegőztetőbe. PRINCZ és munkatársai (2005) a szobi szennyvíztisztító elfolyó vizénél kimutatták, hogy az adagolt zeolit hatására az elfolyó víz minősége jelentősen javult, ami elsősorban a nagymértékű KOI és szerves-N tartalom csökkenésében nyilvánult meg. Ennek az a magyarázata, hogy a kutatók olyan kémiai kötéseket alakítottak ki a zeolit nagy fajlagos felületén, amelyek elősegítették a különböző baktériumok megtelepedését.

3.3.1. Biofilm reaktorok

A biofilmes szennyvíztisztításnak több különböző változata ismeretes. A folyamat az úgynevezett biofilm reaktorokban játszódik le. Ezeknek két fő típusát különböztetjük meg: az RBC-t (Rotating Biological Contactor – forgótárcsás biológiai kontaktor) és a rögzített ágyas reaktorokat. Dolgozatomban a rögzített ágyas reaktorral foglalkozom részletesebben.

3.3.1.1. Forgótárcsás biológiai kontaktor

A forgótárcsás kontaktorokban a forgatást egy, a vízfelület fölött áthidaló tengely biztosítja. A tárcsák felületén a forgatás következtében egy állandó biofilm réteg alakul ki. A tárcsák elsősorban polisztirolból készülnek, melyeknek kb. 35%-a érintkezik folyamatosan a vízfázissal. A tengely alatti vizes közeg a film nedvesítését, a forgatás pedig az állandó levegőztetést biztosítja, így a megtelepedett mikroorganizmusok megfelelő oxigén- és tápanyagellátásban részesülnek. Ilyen reaktorokat elsősorban Ausztriában és Svájcban alkalmaznak elsősorban kisebb szennyvíztisztító telepeken. Megépítése és üzemeltetése igen költséges, így hazánkban még nem elterjedt. (DORIAS, 2008)

3.3.1.2. Rögzített ágyas reaktorok

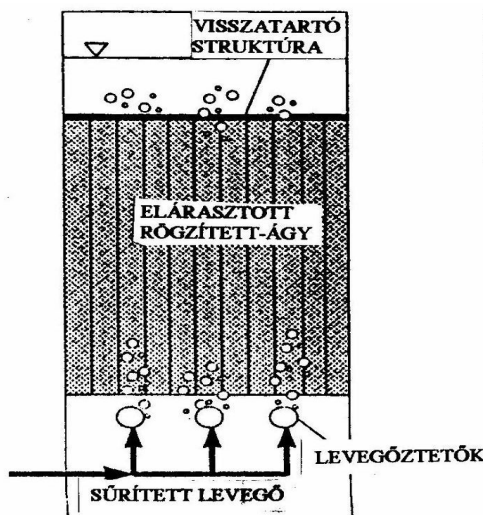
A rögzített ágyas reaktorokat az utóbbi 10-15 évben egyre szélesebb körben alkalmazzák a biofilmes szennyvíztisztítás terén. Ezen műveleti egységeknek két fő típusát különböztetjük meg: a csepegtetőtestes és az elárasztott rögzített ágyas reaktorokat.

3.3.1.2.1. Csepegtetőtestes reaktor

Ezen műveleti egységben a biofilm réteg kialakítására valamilyen porózus közeget alkalmaznak. A szennyvizet felülről csurgatják a töltetre, mely azon átfolyik folyamatosan nedvesítve ezzel a biofilmet, majd a töltet alatt elhelyezkedő vízgyűjtő térbe csurog. A töltetek cserélésével a fajlagos felület rendkívül széles körben változtatható. Zúzott bazalt segítségével $45\text{--}60\text{ m}^2/\text{m}^3$ -es, míg kis fajsúlyú műanyag töltet alkalmazásával $100\text{--}150\text{ m}^2/\text{m}^3$ -es fajlagos felület alakítható ki. (KÁRPÁTI, 2007)

3.3.1.2.2. Elárasztott rögzített ágyas reaktor

Az elárasztott rögzített ágyas reaktorral történő tisztítás a biofilmes technológiák egyik leggyakrabban alkalmazott eleme. Széles körű elterjedése elsősorban az eleveniszapos rendszerrel szembeni számos előnyének köszönhető, mivel kicsi a helyigénye, alacsony az üzemeltetési költsége, valamint nagy terhelésekkel szemben rugalmas technológia. Az elárasztott rögzített ágyas reaktor elvét a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra Elárasztott rögzített ágyas reaktor (KÁRPÁTI, 2007)

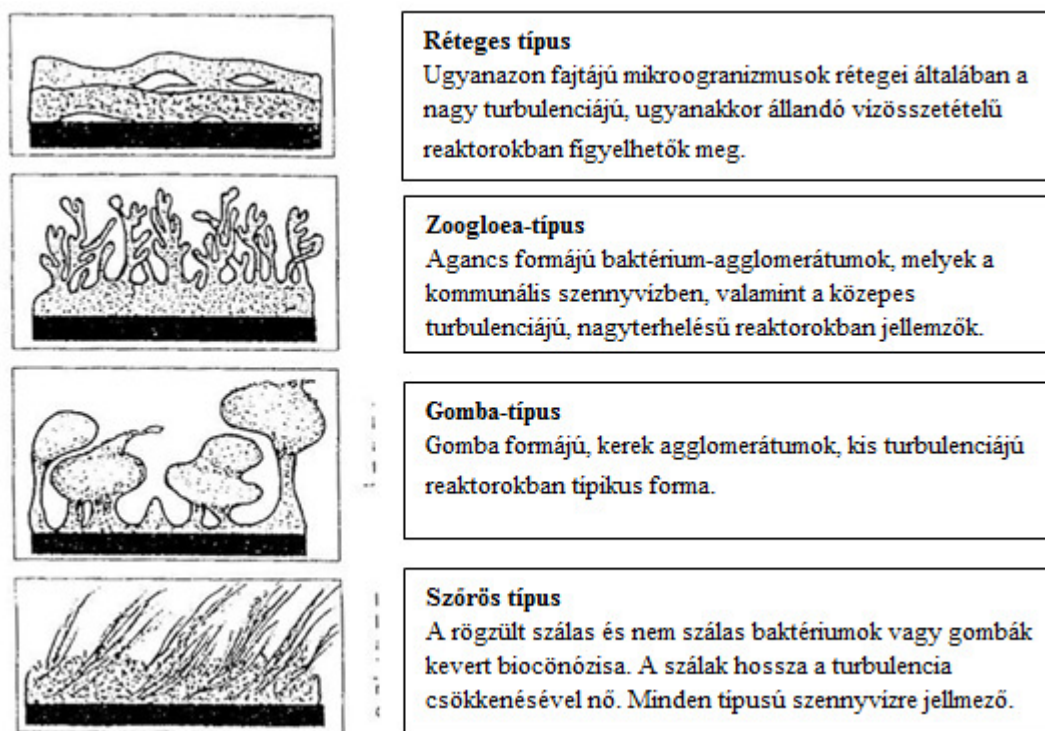
A rendszer három alapvető részből épül fel: reaktor, hordozó és levegőztetők.

A hordozóanyag kiválasztásánál törekedni kell arra, hogy az adott anyag nagy fajlagos felületű, kémiai és biológiai ellenálló legyen és megfelelő adszorpciós képességgel rendelkezzen, továbbá hogy a víz és az anyag között nagy sűrűségbeli különbség ne legyen. Ilyen hordozók lehetnek például az üveg, zeolit, aktív szén valamint a különféle műanyag származékok. Üveg és teflon alapú biofilm hordozók vizsgálatával RINJAARTS és munkatársai (1993) foglalkoztak részletesebben. Kísérleteik során ezen hordozókat dinamikus oszlopokban és statikusan változó rendszerekben vizsgálták 1 illetve 4 órás tartózkodási időt

alkalmazva. Az eredmények azt bizonyították, hogy a rövidebb tartózkodási idő ellenére 1 óra alatt sokkal nagyobb számú mikroorganizmus (elsősorban *Pseudomonas*) tapadt meg a hordozók felületén a dinamikus oszlopokban, mint a statikus rendszerekben 4 óra alatt.

A biofilm hordozót rendszerint mindig a megfelelő műveleti egységekben a levegőztetők fölé helyezik el. Rendkívül fontos, hogy amikor vastagabb filmréteg alakul ki a hordozó felületén a megfelelő folyadék- és levegőáramlás továbbra is biztosítva legyen.

A hordozófelület sima és durva is lehet. A sima felületek hátránya, hogy a kialakult biofilm könnyebben lecsúszik, mint az érdesebb hordozók esetében, mivel nem biztosítanak megfelelő tapadási felületet a megtelepedő mikroorganizmusok számára. Minél simább egy hordozó felülete, annál nagyobb rá az esély, hogy egy erősebb turbulens áramlás egyszerűen lesodorja a biofilmet a szilárd hordozóról. A különböző felületeken kialakuló biofilm típusokat az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra Biofilm típusok (MERÉNYI, 2011)

A biofilm réteg eltérő vastagságban alakul ki az egyes hordozók felületén. Mikroszkóppal végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a vékonyabb biofilm réteg (kb. 100 μm) eredményesebb tisztítási hatásfokot eredményez, mint a vastagabb rétegek (kb. 1500 μm). Ennek az a magyarázata, hogy a vastagabb réteg kialakulása esetén a rögzítő felülethez közeli rétegekben a mikroorganizmusok már csak kis mértékben jutnak kellő mennyiségű tápanyaghoz és

oxigénhez. Ezekben a rétegekben elsősorban az anoxikus, anaerob folyamatok uralkodnak, melyek gyengítik a hordozó és a réteg közötti kötőerőket. Ennek következtében a biofilm könnyen leszakadhat, vagy lemosódhat a felszínről. (KÁRPÁTI, 2007)

A reaktorban a rögzített hordozó alatt helyezkednek el a levegőztetők. Ezek többnyire membrán típusú csöves rendszerek, melyek legfőbb feladata, hogy a hordozókhoz eljuttassák az oxigént, cirkuláltassák a folyadékot és megfelelő tápanyagellátást biztosítsanak. A levegőztetés leggyakrabban finombuborékos membrán levegőztetéssel történik. A levegőztetés költséges eljárás, ezért a folyamatos levegőztetés helyett sok helyen szakaszos üzemmódot használnak. Ezt úgy érik el, hogy a kis terhelési időszakban csökkentik az oxigénbevitelt, ezáltal az energiaigényt is.

3.4. Biofilmek mennyiségi és minőségi meghatározása

A biofilmek mennyiségi és minőségi meghatározására számos kimutatási módszer ismeretes. A biofilmek legfontosabb tulajdonságai: a biofilm réteg nedves és száraz tömege, aktivitása, szervesanyag-, fehérje- és poliszacharid tartalma.

A biofilmek eltávolítása a különböző hordozókról rendkívül összetett feladat, melyekre a kutatók számos eltérő módszert dolgoztak ki. FEN és munkatársai (2006) ultrahang segítségével távolították el a biofilmet a hordozókról. Kísérleteik igazolták, hogy az ultrahang képes az EPS-mátrix megbontására. CHEN és munkatársai (2000) különböző nátrium- és kalcium-kloridot tartalmazó anyagokat adagoltak biofilm rendszereikhez, melyek segítségével szintén nagy hatásfokú eltávolítást értek el.

3.4.1. Fizikai módszerek

A fizikai módszerek elsősorban a biofilmek kvantitatív meghatározására alkalmasak, így tömegük és vastagságuk megállapítására.

A biofilm-mátrixnak egyik legjelentősebb jellemzője száraz-nedves tömegének aránya. Ennek meghatározása komplikált, mivel nehezen lehet a nedves biofilmet teljes mértékben kinyerni a hordozóról.

A biofilm vastagság megállapítására többféle módszer ismeretes. Legegyszerűbb módja a fénymikroszkóppal történő vizsgálat. Ezen eljárás előnye, hogy rendkívül gyors, valamint, hogy a minta mindenfajta előkezelés nélkül vizsgálható. Másik módszer a pásztázó-elektronmikroszkóppal (SEM – Scanning Electron Microscopy) történő vizsgálat. Ezzel a

technikával elsősorban a biofilmek felületét vizsgálhatjuk és a sejtek elhelyezkedéséről nyerhetünk részletesebb információt. A gyakorlatban ezeken kívül elterjedt még az úgynevezett konfokális pásztázó lézer mikroszkópos (CSLM – Confocal Scanning Laser Microscopy) eljárás, mely segítségével háromdimenziós képet kaphatunk a biofilm-mátrixról. Ezen eljárás segítségével a biofilm életciklusa teljes mértékben nyomon követhető. (LAZAROVA, 1995)

3.4.2. Kémiai módszerek

A kémiai módszerek közül a legelterjedtebb a KOI/TOC (kémiai oxigén igény/összes szerves széntartalom), fehérjék valamint lipidek vizsgálata.

A KOI/TOC vizsgálata elsősorban a biofilm szervesanyag-tartalmáról ad felvilágosítást. Ezeket a paramétereket a biofilm szárazanyag-tartalmára vonatkoztatva adják meg. (TARJÁNYINÉ, 2010)

A fehérjék a biofilmek száraz tömegének kb. 10-15 %-t teszik ki. Legismertebb kimutatási módszerei a Biuret- és Bradford- próbák. Az előbbi a peptidkötések kimutatására alkalmas, melynek lényege, hogy a réz (II)-ion lúgos oldatban komplexet képez a fehérjemolekulákkal. A pozitív próbát a lila szín megjelenése jelenti, ami spektrometriásan meghatározható. A Bradford-próba azon alapul, hogy a vizsgálandó rendszerhez savkék 90 nevű festéket adnak. Ez az anyag a fehérjéhez kötődik, minek hatására az abszorpció 470 nm-ről 595 nm-re változik. A fényelnyelés változás mértéke arányos a koncentrációval, így a fehérjetartalom meghatározható. (BARABÁS, 2005)

A lipidek vizsgálatánál a legfőbb előny, hogy ezek a sejtalkotók minden sejtben megtalálhatóak, és hogy koncentrációjuk a sejt állapotától függetlenül állandó. Ezen kívül további kedvező tulajdonságuk, hogy különböző fizikai-kémiai stressz hatására koncentrációjuk csak kis mértékben változik. Meghatározásuk spektrometriás módszerekkel történik.

3.4.3. Biokémiai módszerek

A biofilmek biokémiai vizsgálati módszerei elsősorban az élő mikroorganizmusok mennyiségéről és aktivitásáról adnak felvilágosítást. Ezen módszerek közül a legelterjedtebb az adenzin-trifoszfát (ATP)- és DNS-RNS tartalom meghatározása, valamint a különböző redoxi-reagensek alkalmazása, mint például a TTC (2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid), INT (2-(p-jodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil-tetrazólium-klorid). A reagensek közös tulajdonsága,

hogy színtelenek és a biofilm szuszpenzióhoz adagolva a redukció után erőteljes vörös színű vegyület alakul ki, mely spektrofotometriásan meghatározható. (LAZAROVA, 1995)

Az ATP minden sejtben megtalálható, az anyagcsere folyamatok nélkülözhetetlen résztvevője. Vizsgálata nem egyszerű, mivel az ATP mennyisége nagymértékben függ a sejt fiziológiai állapotától. Meghatározása általában lumineszcens módszerrel történik.

A DNS-RNS vizsgálatánál a sejtekben a DNS mennyisége állandó, míg az RNS mennyisége a sejt fiziológiai állapotától függően változik. Ezen sejtalkotók meghatározása spektrometriásan történik. A módszer hátránya, hogy igen komplikált előkészítést igényel, valamint számos zavaró hatást kell figyelembe venni.

A TTC redukció mérése a dehidrogenáz enzim aktivitásának meghatározására alkalmas eljárás. Ez az enzim szinte minden sejtben megtalálható és elsősorban a sejtlégzés folyamatában vesz részt. A módszer alapja, hogy az O_2 molekula helyére, elektronakceptorként egy indikátorvegyületet jutattunk a rendszerbe, ami így átveszi az O_2 molekula szerepét. Ennél az eljárásnál ez az indikátor vegyület a 2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid, ami színtelen és vízben jól oldódik. A TTC a rendszerben redukálódik és piros színű trifenil-formazánná (TF) alakul. A TF vízben oldhatatlan, ezért mindaddig a sejtekben marad, amíg valamilyen szerves oldószerrel nem extrahálják. A keletkezett piros színű TF mennyisége az extraktumban spektrometriásan meghatározható. (TARJÁNYINÉ, 2010)

3.4.4. Mikrobiológiai módszerek

A klasszikus mikrobiológiai kimutatási módszerek közül legegyszerűbb a sztereomikroszkóppal történő vizsgálat. A biofilmek ily módon történő meghatározása során térbeli képet kaphatunk az egyes sejt kultúrákról. Részletesebb vizsgálatra elektronmikroszkópos módszerekkel nyílik lehetőség. Ezen kívül gyakran alkalmaznak klasszikus tenyésztést, valamint csíraszám meghatározást (MPN – Most Probable Number) is. A molekuláris mikrobiológiai módszerek közül a legszélesebb körben elterjedtek közé tartozik az úgynevezett terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (T-RFLP – Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) és a denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Mindkettő a polimeráz-láncreakción (PCR - Polymerase Chain Reaction) alapul. A PCR egy sokszorozó folyamat, melynek lényege, hogy a mikrobák DNS-ének egy kiválasztott szakasza kerül specifikus felszaporításra. Ennek folyamán a kis mennyiségű DNS-ből olyan mennyiséget lehet előállítani, ami már további módszerekkel könnyen vizsgálható. (SZABÓ, 2011)

A T-RFLP eljárás során a PCR terméket enzimekkel hasítják, amik a DNS adott bázissorrendű, rövid szakaszait ismerik fel. A hasítási helyek a mikrobacsoportokra jellemzőek, így a kapott fragmentumok hossza is. Utóbbiak elválasztása kapilláris gél elektroforézissel történik, melyet a DNS fluoreszens jelölése segít. (CLEMENT, 1998)

A DGGE a kétszálú DNS olvadási hőmérsékletén alapuló eljárás; mely során a PCR-rel előzetesen szaporított DNS egy poliakrilamid denaturáló gélen keresztül halad végig, melyben megolvad. Ennek hatására a DNS széttekeredik és az így keletkező darabok mobilitása a gélben jelentősen lecsökken. A különböző DNS-ek eltérő denaturálódásának következtében mintázatot kapunk, és a mintázat sávjait alkotó taxonok további módszerekkel azonosíthatók. (BELÁK, 2009)

4. Alkalmazott eszközök és módszerek

Tudományos diákköri munkám során az Organica Technológiák Zrt. Telki Ökotechnológiai Fejlesztő Központjában működő félüzemi kísérleti szennyvíztisztítóba telepített műanyag alapú biofilm hordozókat vizsgáltam. Feladatom volt, hogy, a különböző hordozók közül megállapítsam melyeken alakul ki a legnagyobb tömegű és aktivitású biofilm.

4.1. Az Organica kaszkád

Az Organica kaszkád technológia során a biológiai szennyvíztisztítás egymás után kapcsolt reaktorokban valósul meg lebegő biomassza és rögzített biofilmek segítségével. A biofilm a rendszerben elhelyezett hordozókon, valamint a reaktorba telepített növények gyökerein egyaránt kialakulhat. Így ez a technológia ötvözi a biofilmes és a gyökérszénésztítési eljárásokat. A képződő biofilmekben számos szervezet megtalálható például, csillósok, férgek, ízeltlábúak. Ennek köszönhetően egy olyan változatos ökoszisztéma alakul ki, mely a szerves anyagok széles körű biodegradációjára alkalmas.

A kaszkádsorra érkező befolyó víz először egy rácsos szűrőn halad keresztül, mely eltávolítja a durva darabos részeket. A biológiai tisztítás 8 db, egyenként 2 m^3 -es reaktorban történik, melyek között az átfolyás biztosítva van (6. ábra). Az egyes reaktorok hidraulikus terhelése az általam végzett kísérlet ideje alatt $1\text{ m}^3/\text{h}$. Ahogy a beérkező szennyvíz folyamatosan halad előre a reaktorsoron hasznosítható tápanyagtartalma csökken, mivel minden egyes reaktor a sorban előtte lévő tisztított vizét kapja. Ennek következtében minden egyes reaktorban speciális mikroorganizmus közösség alakul ki. Minden egyes kaszkádelem alján finombuborékos levegőztető helyezkedik el, ami biztosítja a megfelelő oxigén ellátást, valamint a víz folyamatos keverését. A magas oldott oxigén koncentráció folyamatos aerob közeget biztosított a rendszerben. (ld. 1. sz. melléklet)

A vizsgált négyféle műszál alapú hordozót mind a nyolc reaktorba elhelyeztük, így egy mintavételezés során 32 minta vizsgálatára került sor. A kísérlet 18 napon keresztül folyt, mely során 5 alkalommal (telepítés utáni 3., 6., 10., 14. és 18. napon) került sor mintavételezésre.



6. ábra Organica kaszkád

4.2. Vizsgált hordozók

Munkám során 4 különböző műszál alapú biofilm hordozót (7-10. ábra) vizsgáltam. A hordozók legfontosabb tulajdonságait az 1. táblázat szemlélteti.

1. táblázat Biofilm hordozók tulajdonságai

Műszál	Alapanyag	Szálvastagság (µm)	Dtex*	Szálszám egy kötegben
PP1	Polipropilén	56	2600	150
PP2	Polipropilén	56	2600	150
PP3	Polipropilén	32	3000	250
PES	Poliészter	21	3000	200

*Decitex: 10000 méter hosszegységre számított tömeg (g)

A PP1 és PP2 úgynevezett BCF (Bulked Continuous Filament – ömlesztett végtelenített fonal) típusú műszál, a PP3 és PES pedig műszaki célra gyártott fonal alapú hordozó. A BCF hordozók elsősorban színükben tértek el egymástól.



7.ábra PP1



8.ábra PP2



9.ábra PP3



10.ábra PES

A hordozók kereteken kifeszítve kerültek a reaktorokba (11. ábra). A 8 reaktor mindegyikében 5-5 keretet helyeztünk el. A 4 féle azonos méretű hordozót minden egyes kereten rögzítettük. Átlagosan 5*30 cm méretű, 6,0 g tömegű hordozó mintákat vizsgáltam. Egy adott mintavételezés alkalmával egy keretet emeltem ki az egyes reaktorokból és a hordozókon megtelepedett biofilmek kolonizációját követtem nyomon. A reaktorból való kiemelés után a hordozókról biofilm mintát vettem az enzimaktivitás vizsgálatához, majd a műszálakat a keretről levéve műanyag zacskóba helyeztem és 4°C-on hűtőszekrényben tároltam a laboratóriumba való elszállításáig



11. ábra Műszálas hordozók kereten kifeszítve

4.3. Szárazanyag-tartalom meghatározás

A különböző hordozókon megtelepedett biofilm mennyiségének nyomon követésére legegyszerűbb módszer a műszálakról kinyert biofilm szárazanyag-tartalmának meghatározása. Ezen paraméter a hordozók reaktorokból való kiemelése után laboratóriumi körülmények között került meghatározásra. A hordozókat a megtelepedett biofilm mennyiségének függvényében 150-250 ml desztillált vízzel alumínium tálcába mostam. Az így nyert biofilm szuszpenziót 24 órán keresztül 105 °C-on szárítottam, majd 15 perig exsikkátorban hűlni hagytam. Ezután a visszamért tömegekből a szárazanyag-tartalmat a táratömeg ismeretében meghatároztam.

4.4. Szervesanyag-tartalom meghatározás

A szervesanyag-tartalom vizsgálata a biofilmek kialakulásának szintén fontos paramétere. A szárazanyag-tartalom meghatározást követően a 105°C-on tömegállandó mintákból kimért mennyiségű biofilmet 600°C-on izzítottam 2 órán keresztül. A szárított és izzítás után visszamaradt tömeg különbségéből határoztam meg a szervesanyag-tartalmat.

4.5. Enzimaktivitás meghatározás

Az enzimaktivitás mérését a 3.4.3. fejezetben már ismertetett TTC-módszerrel végeztem. Mivel a módszert eddig még műszál alapú hordozók esetében nem alkalmazták, ezért az általam vizsgált hordozókról kinyert biofilmek esetében szükség volt a kísérleti körülmények optimálására.

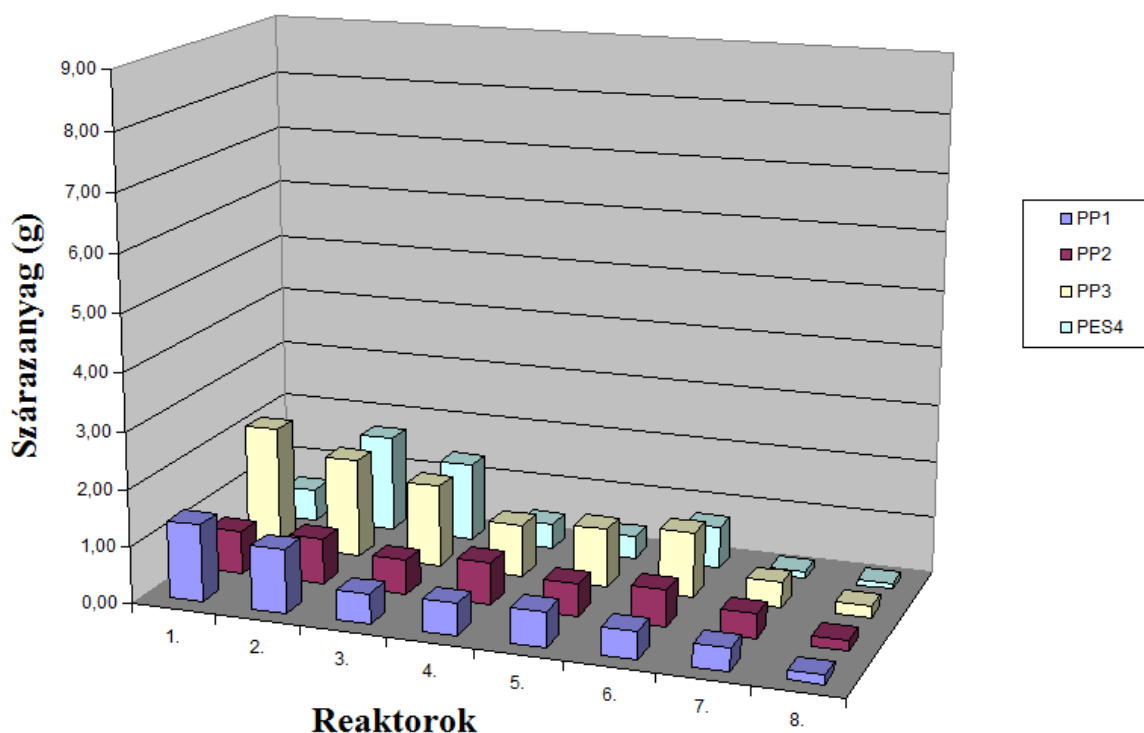
A telephelyen először az adott hordozóról lekapart biofilmből és csapvízből szuszpenziót készítettem. A biofilm szuszpenzió 1,5 ml-éhez 2 ml 0,05 %-os TTC-reagenst (vizes TTC oldat) adtam és 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáltam. Az inkubáció végén a reakció leállításának érdekében 1 csepp tömény kénsavat adtam a mintákhoz. A kialakult trifenil-formazán (TF) piros színyanyagot 6 ml etanol hozzáadásával extraháltam. Majd centrifugálást követően, Hach küvettába töltöttem át a lebegőanyag mentes extraktumot és laboratóriumban fotometriásan, 485 nm-es hullámhosszon megmértem az abszorbanciáját. Az abszorbanciákból a TF koncentrációkat egy előzetesen elkészített kalibráló sor segítségével határoztam meg. A kalibráció során ismert koncentrációjú TF oldatsort használtam, majd meghatároztam a kalibrációs egyenest, melyet a 2. sz. mellékletben tüntettem fel. A TTC-aktivitás mérésekhez készített szuszpenzióból is elvégeztem a szárazanyag-tartalom meghatározását, így a számított fajlagos TF értékek a készített szuszpenziókból meghatározott szárazanyag tartalom alapján 1 g biomassa szárazanyagra vonatkoztattam.

5. Kísérleti eredmények

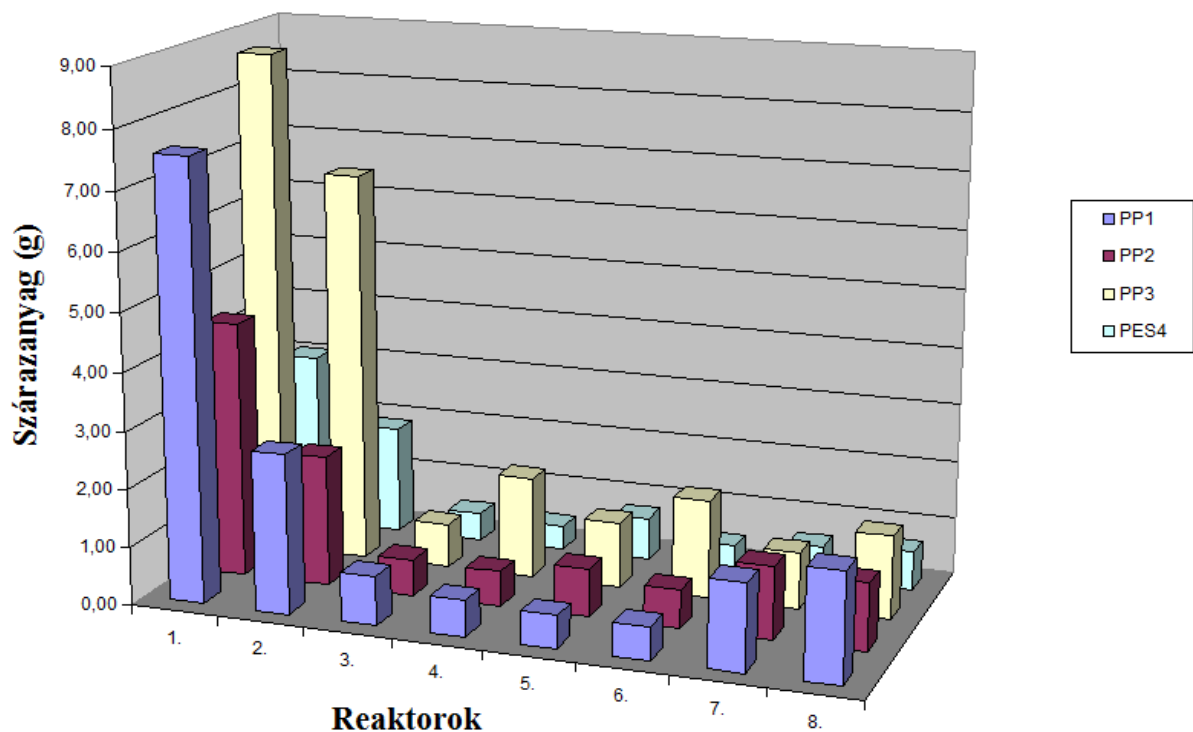
5.1. Biofilmek szárazanyag-tartalmának alakulása

A biofilm tömegének meghatározására leggyakrabban alkalmazott módszer a szárazanyag-tartalom vizsgálata. Ezen paramétert megmértem az összes hordozótípusra, minden egyes reaktorban a 18 napos kísérlet folyamán. Az 5 mintavételi időpontban a különböző műszálas hordozókon megtelepedett biofilmek szárazanyag-tartalmát a nyolc reaktor esetében a 3. sz. *mellékletben* megtalálható táblázatok szemléltetik.

Az egyes hordozók mindegyikén különböző mértékű biofilm megtelepedés volt tapasztalható. Eltérő mennyiségű biomassza szárazanyag-tartalmat mértem az egyes mintavételezések során ugyanazon hordozó esetében, valamint az adott hordozó különböző mintavételezései során az egyes reaktorok esetében. A kialakult biofilm tömegét a hordozók reaktorokban való tartózkodási ideje igen jelentősen befolyásolta. A tartózkodási idő fontosságát két eltérő időpontú mintavételezés (1. és 5. mintavételezés) összehasonlításával szemléltetem a 12. és 13. ábrán. Az ábrák a műszálas hordozókon megtelepedett biofilmek összes szárazanyag-tartalmát ábrázolják e kétféle mintavételi időpontban (kísérlet eleje, ill. vége) az egyes reaktorok esetében.



12. ábra Az 1. mintavétel után mért biofilm szárazanyag-tartalom



13. ábra Az 5. mintavétel után mért biofilm szárazanyag-tartalom

Az ábráról leolvasható, hogy az 1. mintavételezéskor a megtelepedett biofilmek szárazanyag-tartalma az első két reaktorban 0,5-2 g közötti, míg az utolsó mintavételezés alkalmával ugyanitt 3-9 g volt.

Megfigyelhető továbbá minden egyes hordozó esetében, hogy az esetek többségében az első két reaktorban nagyobb mértékű a biofilm megtapadás a többi reaktorhoz képest. Ez elsősorban a kaszkád rendszerrel magyarázható, hiszen a sor elején elhelyezkedő reaktorokban nagyobb a szervesanyag-terhelés (ld. 4. sz. melléklet) és a hasznosítható tápanyag mennyisége, mint a műveti sor végén elhelyezkedő reaktorokban. Összességében a kísérlet során a legnagyobb mennyiségű száraz biofilm tömeget a PP3 hordozón, legkisebbet pedig a PES műszálas hordozón határoztam meg.

5.2. Biofilmek szervesanyag-tartalmának alakulása

A szervesanyag-tartalom nyomon követése szintén fontos paraméter a biofilm vizsgálata során. Ezen tulajdonság meghatározását azonban már nem lehetett minden egyes reaktorban lévő hordozó típusra elvégezni. Ennek elsősorban az volt az oka, hogy ezt a vizsgálatot csak olyan hordozók esetében lehetett végrehajtani, melyeknél a megtelepedett biofilm szárazanyag-tartalma elég nagy volt ahhoz, hogy a 600°C-os izzítást követően a szárított és az izzított tömeg különbsége értékelhető legyen. Így a szervesanyag-tartalom vizsgálata az 1., 2., 4., 6. és 8. reaktorban elhelyezkedő minták esetében történt meg, azonban itt sem az összes hordozó esetében, mivel néhányukon a megtelepedett biofilm szárazanyag-tartalma nem volt

elegendő mennyiségű. A mért értékeket a 2. táblázat szemlélteti. A feltüntetett adatok a biofilmek szárazanyag tartalmára vonatkoztatva százalékban kifejezve mutatják az 5 mintavételezés során a hordozókon megtelepedett biofilmek szervesanyag-tartalmának átlagát az egyes reaktorok esetében. Annak alátámasztására, hogy a kísérlet során adott reaktorban egy-egy hordozón milyen mértékű volt a biofilm szervesanyag-hányadának változása az átlagértékek mellett a táblázatban a szórásadatokat is feltüntettem (SD – standard deviáció). A 4. reaktor esetében a szórás azért nem szerepel a táblázatban, mivel ennél a reaktornál csak az első mintavételezés során volt a méréshez elég mennyiségű biofilm a hordozón.

2. táblázat A műszálas hordozókon megtelepedett biofilmek átlagos szervesanyag- hányada szórás értékei ($\pm$ SD) a kísérlet során

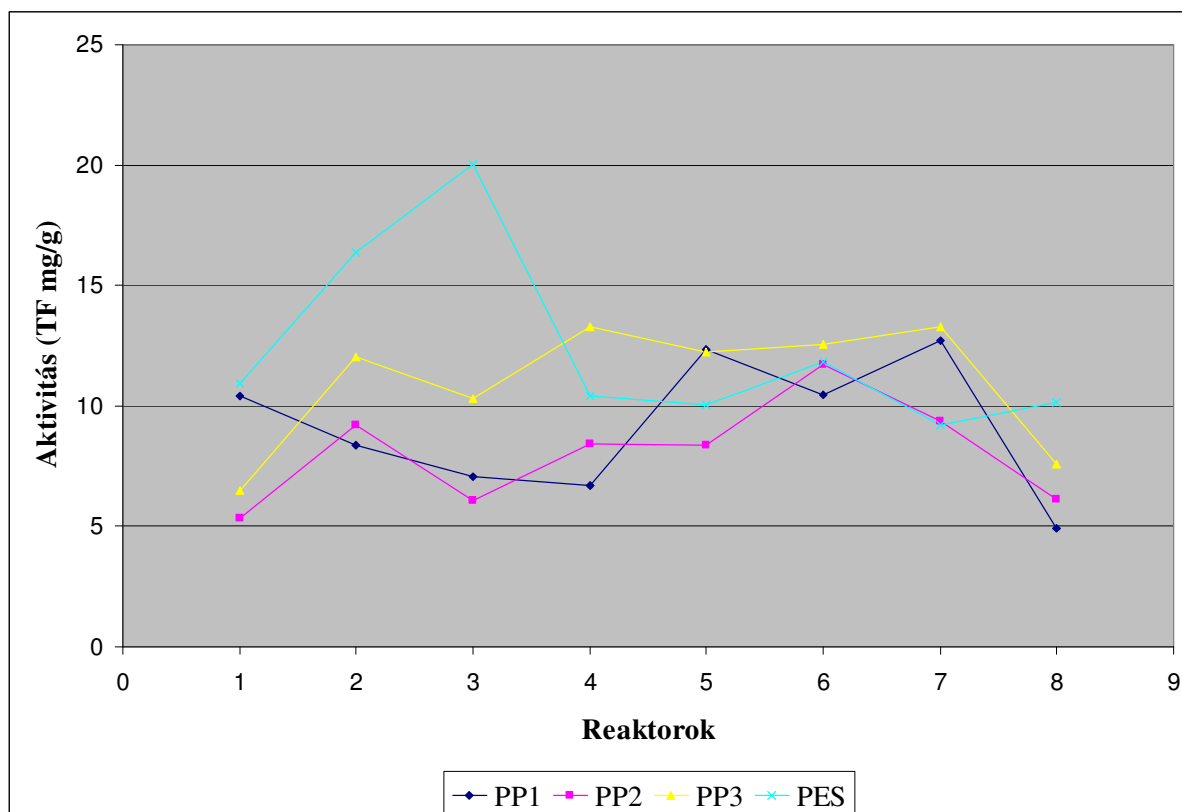
	Szervesanyag-tartalom átlag és szórás értékek (%)				
Műszál	1.reaktor	2.reaktor	4.reaktor	6.reaktor	8.reaktor
PP1	60,9 $\pm$ 5,2	66,0 $\pm$ 2,5	78,6	76,2 $\pm$ 3,0	74,5 $\pm$ 3,5
PP2	59,8 $\pm$ 9,1	64,2 $\pm$ 2,6	78,0	75,2 $\pm$ 0,7	73,3 $\pm$ 4,5
PP3	59,2 $\pm$ 6,0	65,3 $\pm$ 2,2	75,1	74,1 $\pm$ 2,5	74,6 $\pm$ 2,5
PES	53,3 $\pm$ 7,3	63,5 $\pm$ 5,3	72,1	76,5 $\pm$ 3,4	73,7 $\pm$ 3,5

A táblázat adatai azt mutatják, hogy az egyes mintavételezések folyamán nincs nagy eltérés a mért értékek változásában, tehát a hordozók reaktorokban lévő tartózkodási ideje nem befolyásolta jelentősen a biofilmek szerves anyag hányadának alakulását. A táblázat adataiból továbbá az is megállapítható, hogy az első két reaktorban a biofilm szervesanyag-tartalma minden hordozó esetében kb. 10 %-kal kisebb volt, mint a többi reaktorban. Ez elsősorban azzal magyarázható, hogy az első két reaktorban a szennyezőanyag terhelés, lebegőanyag-koncentráció lényegesen nagyobb volt, mint a többi reaktorban. Ennek következtében a lebegőanyag nagy szervesanyag-hányada is megtapad a hordozók felületén, és beépülhet a biofilmbe, ami a biofilm összes szárazanyagán belül a szervesanyag-hányad csökkenését eredményezi. Ezt a feltételezést támasztják alá a kísérlet során a különböző reaktorokban lévő víz lebegőanyag tartalmára mért koncentráció értékek (ld. 5. sz. melléklet).

A szervesanyag-hányadból számított biomassa értékek alapján a hordozókra megállapított kolonizációs sorrend ugyanúgy alakult, mint az 5.1. fejezetben ismertetett szárazanyag vizsgálat esetében, vagyis a PP3 hordozó mutatta a legjobb, a PES műszálas hordozó pedig a legrosszabb értékeket.

5.3. Biofilmek enzimaktivitásának alakulása

A műszálas hordozókon megtelepedett biofilmekben lévő élő mikrokolóniák vizsgálatára elterjedten alkalmazott módszer az enzimaktivitásuk meghatározása. Ezt az aktivitás vizsgálatot a 4.5. fejezetben ismertetett TTC-módszerrel végeztem. Az enzimaktivitást az összes reaktorban elhelyezett hordozón megtelepedett biofilmre meghatároztam mind az 5 mintavételezés folyamán. Az egyes hordozók biomasszájára a biomassa egységnyi száraz tömegére vonatkoztatott, azaz fajlagos aktivitás átlagértékek az egyes reaktorokban eltérőképpen alakultak. A 14. ábra az egyes hordozókon kolonizált biofilmek fajlagos aktivitásainak átlag értékeit szemlélteti a különböző reaktorokban. Az ábrázolt értékek az 5 mintavételezés folyamán mért fajlagos aktivitások átlagai, melyekhez tartozó szórás értékek a 6.sz. mellékletben szerepelnek.



14. ábra Műszálas hordozókon kolonizált biofilmek átlagos fajlagos enzimaktivitása a kísérlet során

Az ábrán szereplő adatok mutatják, hogy az aktivitás értékek hordozónként és reaktoronként is változóak. Jól kivehető, hogy a négy hordozó közül a reaktorsor elején a poliészter műszálnak volt legmagasabb a fajlagos aktivitása, ugyanakkor a 4. reaktor után a PP3 hordozóé emelkedik ki.

A vizsgálatok során kiszámítottam a biofilmekben élő organizmusok össz-aktivitását minden egyes hordozó típus és reaktor esetében az egyes mintavételezések folyamán. Ez a paraméter tulajdonképpen a fajlagos TF koncentráció és az adott műszálas hordozó teljes felületén lévő biomassza szárazanyag-tartalmának a szorzata, amit az alábbi képlet segítségével számoltam ki.

$$A_{\text{össz}} = A_{\text{fajl}} * m$$

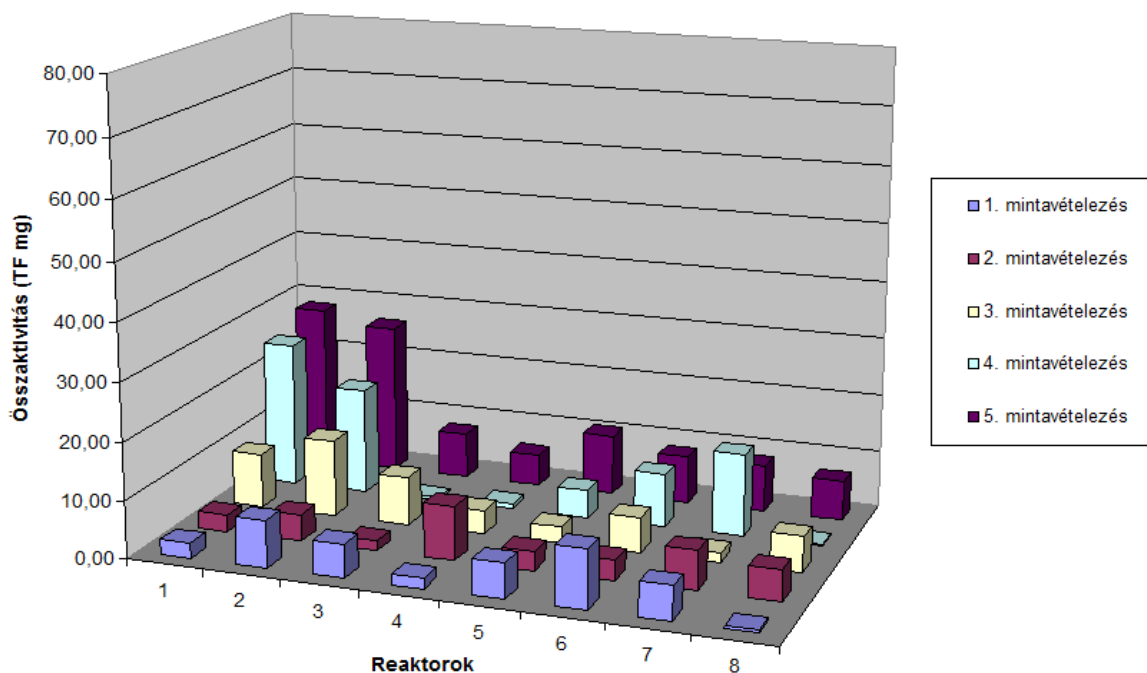
$A_{\text{össz}}$: a hordozón kolonizált biomassza össz enzimaktivitása (TF mg)

A_{fajl} : a hordozó felületén kolonizált biomassza egy grammjára vonatkozó aktivitás (TF mg/g száraz biomassza)

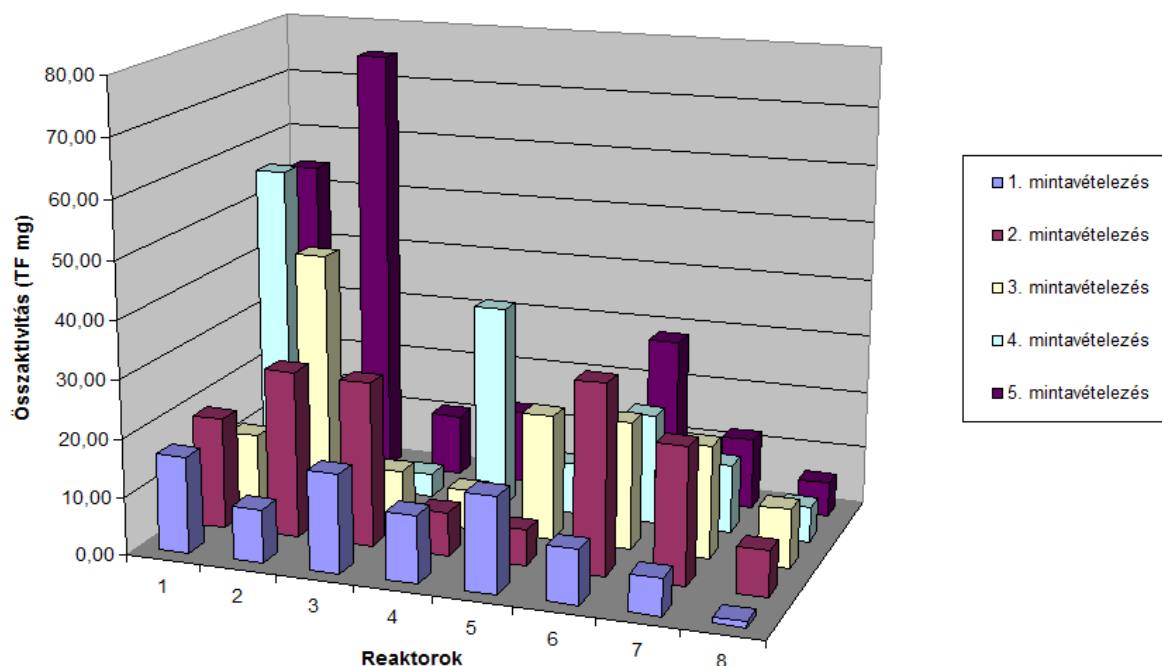
m: a hordozón kolonizált biofilm száraz tömege

Az össz-aktivitás meghatározása azért fontos, mert a hordozókon kolonizált biofilm akkor képes nagy hatásfokú biológiai tisztításra, ha a nagy fajlagos aktivitás mellett jelentős mennyiségben képes megtelepedni az adott hordozó felületén, azaz minél nagyobb össz-aktivitást mutat.

A 15. és 16. ábrán a vizsgált hordozók közül a legjobb és legrosszabb értékeket mutató, PP2 és PP3 hordozókon kialakult biofilmek össz-aktivitás értékeit mutatom be. A másik két hordozó esetében mért értékek a 7. sz. mellékletben szerepelnek. Az ábrák az össz-aktivitás értékeket szemléltetik a kétféle hordozó biofilmjére az 5 mintavételezés folyamán az egyes reaktorokban.



15. ábra PP2 műszálon kolonizált biofilm össz-aktivitás alakulása a kísérlet során



16. ábra PP3 műszálon kolonizált biofilm össz-aktivitás alakulása a kísérlet során

Az egyes reaktorokban az tapasztalható, hogy az össz-aktivitás változása a különböző hordozókon kolonizált biomassza esetében a mintavételezések során eltérő. Ennek magyarázata, hogy a biofilm kolonizációja, kifejlődése és élettartama is igen változó. Ez elsősorban a biofilmek bonyolult kolonizáció sajátosságaival magyarázható (SAUER, 2007).

Az egyes mintavételezések folyamán megfigyelhető, hogy az első két reaktorban, mindig nagyobb össz-aktivitás tapasztalható mindegyik hordozó esetében, mint a műveleti sor további reaktoraiban. Ez összhangban van a vízkémiai paraméterek értékeivel, vagyis azzal, hogy az első két reaktorban nagyobb a szervesanyag-terhelés (ld. 4. sz. melléklet), ezáltal nagyobb mennyiségű biomassza képes kialakulni. Továbbá az első két reaktorban a mikroorganizmusok a szerves anyag lebontását, míg a későbbi reaktorokban lévő mikrobák elsősorban a nitrogénformák átalakítását (nitrifikáció) végzik (ld. 8. sz. melléklet).

A 3. táblázat a különböző műszálas hordozók össz-aktivitás átlag értékeit szemlélteti az 5 mintavételezés során az összes reaktorban, valamint a szennyezőanyag eltávolítási szerepük szerint szétválasztva, az 1-3. és a 4-8. reaktorok esetében.

3. táblázat Hordozókon kolonizált biofilmek átlagos össz-aktivitása a kísérlet során

	Össz-aktivitás átlag és szórás értékek (TF mg)		
Hordozó	Összes reaktor	1-3. reaktor	4-8. reaktor
PP1	9,1 ± 2,6	8,5 ± 1,3	9,1 ± 3,1
PP2	7,7 ± 3,3	10,6 ± 7,5	5,7 ± 1,4
PP3	19,0 ± 5,6	27,0 ± 12,0	12,2 ± 4,5
PES	12,4 ± 1,4	15,8 ± 3,5	10,3 ± 1,3

A táblázat adatai mutatják, hogy az első három reaktor esetében az egyes műszálas hordozókon kolonizált biofilmek nagyobb össz-aktivitás értékeket adnak, majd a 4-8. reaktoroknál ez az érték lecsökken. Kivételt képez a PP1 hordozó, ez esetben ugyanis a kialakult biofilm össz-aktivitása ugyan közepesnek, de az összes reaktorban közel azonosnak adódott.

A PES hordozón ugyan kis mennyiségű biomassza kolonizálódott, de nagy fajlagos aktivitású, és ezért minden reaktor esetében kedvezően nagy össz-aktivitású biofilm megtelepedését tette lehetővé. Ez a biomassza össz-aktivitás azonban a reaktorsor mindegyikében kisebbnek adódott, mint a PP3 jelű poliészter alapú hordozón kialakult biofilmé.

A 18 napos kísérlet során a vizsgált négy hordozó közül a PP3 esetében tapasztaltam a legjelentősebb, a PP2-nél pedig a legcsekélyebb össz-aktivitást. A polipropilén hordozók biofilm kolonizációs tulajdonságai közti eltérés a hordozók eltérő szövési struktúrájával magyarázható. Tapasztalataim szerint a PP3 polipropilén műszaki fonal alapú hordozó felületén kolonizált a legnagyobb mennyiségű és aktivitású biofilm, így leginkább ezt a hordozót érdemes a további kísérletek során alkalmazni.

6. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám során egy biofilm kolonizációt vizsgáló félüzemi kísérletbe kapcsolódtam be, melyre az Organica Zrt. és az ELTE KKKK közös kooperációs projektjének keretén belül került sor.

Dolgozatom szakirodalmi áttekintésében a biofilm legfontosabb tulajdonságaival és szerkezeti felépítésével, valamint a különböző biofilmeket alkalmazó szennyvíztisztítási technológiákkal foglalkoztam.

Kísérleti munkám célja az volt, hogy 4 különböző műszál alapú hordozó közül megállapítsam, melyik felületén telepedett meg a legnagyobb mennyiségű és aktivitású biofilm. A vizsgált hordozók közül három polipropilénből, egy pedig poliészterből készült. A félüzemi, kommunális szennyvizet kezelő kísérleti biológiai rendszer 8 kaszkádszerűen összekapcsolt reaktorból állt, melyek mindegyikébe betelepítettük a 4 különböző hordozót. A kísérlet 18 napon keresztül folyt és ezen időtartam alatt 5 alkalommal került sor mintavételezésre. Munkám során az egyes hordozókon megtelepedett biofilmek szárazanyag- és szervesanyag-tartalmát, valamint enzimaktivitását határoztam meg.

Vizsgálataim során bebizonyítottam, hogy mindegyik hordozó alkalmas volt biofilm kolonizációs célra, azonban a megtelepedett biofilm mennyisége eltérő volt a különböző alapanyagú és szerkezetű műszálas hordozók esetében. A szárazanyag-tartalom vizsgálatok tanúsága szerint a polipropilén hordozók felületén nagyobb mértékű volt a biomassza megtelepedése, mint a poliészter esetében. A polipropilén hordozók közül a PP3 jelű, műszaki célra gyártott műszál alapú hordozó felületén mértem a legnagyobb mennyiségű biofilmet.

A szervesanyag-tartalom vizsgálatok szerint az első két reaktorban lévő hordozók felületén megtelepedett biofilmek szervesanyag-hányada kb. 10 %-kal kisebb a műveleti sor többi reaktorában kialakult biomasszáénál. Ennek magyarázata, hogy az első két reaktorban a víz lebegőanyag-tartalma nagyobb volt, ennek következtében a lebegőanyag nagy szervesetlen hányada tapadhatott meg az egyes hordozókon és épült be a biofilmbe, ami a biofilm szárazanyagán belül a szervesanyag-hányad csökkenéséhez vezetett.

A hordozókon kolonizált biofilmek fajlagos aktivitás és össz-aktivitás értékei eltérően alakultak az egyes mintavételi időpontokban a különböző reaktorok esetében. A legnagyobb fajlagos aktivitást a reaktorsor elején a PES hordozón kolonizált biofilm esetében mértem, a kaszkádrendszer további műveleti egységeiben a PP3 hordozó fajlagos aktivitása bizonyult a

legnagyobbak. Az aktivitás értékek változása az egyes reaktorokban elsősorban a biofilm kolonizáció bonyolult és változatos folyamatával magyarázható.

A biofilmek össz-aktivitásának kiszámításával arra a következtetésre jutottam, hogy bár a PES hordozó kedvező fajlagos aktivitást mutatott, ugyanakkor össz-aktivitás tekintetében a PP3 hordozó volt a legjobb, mivel ezen a hordozón nemcsak fajlagosan aktív, hanem egyben a szárazanyag- és a számított szervesanyag-tartalom értékeket figyelembe véve nagyobb mennyiségű biofilm alakult ki.

Összességében elmondható, hogy a vizsgált műszálas hordozók közül a polipropilén hordozókon nagyobb mennyiségű biofilm megtelepedést lehetett tapasztalni, mint a poliészter esetében. A szárazanyag és aktivitás vizsgálatok szerint pedig a PP3 polipropilén (műszaki fonal alapú) hordozó felületén kolonizált a legnagyobb mennyiségű és aktivitású biofilm, így ezzel érdemes további kutatásokat folytatni.

7. Irodalomjegyzék

BARABÁS O. 2005: Enzimatis foszfátészter hidrolízis mechanizmusának tanulmányozása fehérjekrisztallográfiával, Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, Kémiai Doktori Iskola, Elméleti és Fizikai Kémiai, Anyagszerkezet kutatás Program

BELÁK Á. 2009: Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok kimutatása, PCR-alapú molekuláris azonosítása és tipizálása, Doktori értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

BENEDEK P. 1990: Biotechnológia a környezetvédelemben, Műszaki könyvkiadó, Budapest,

CHEN X. – STEWART S. P. 2000: Biofilm removal caused by chemical treatments, Water Research, Vol. 34, Issue 17, pp. 4229-4233

CLEMENT G. B. – KEHL E. L. – DEBORD L. K. – KITTS L. C. 1998: Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities, Journal of Microbiological Methods, Vol. 31, Issue 3, pp. 135-142

DORIAS B. – HAUBER G. – BAAMANN P. 2008: Design of Nitrification / Denitrification Experience in Fixed Growth Reactors, Biotechnology, Vol. 11a, pp. 337-348

FEN W. – SHAN L. – MIN J. 2006: Components of released liquid from ultrasonic waste activated sludge disintegration, Ultrasonics Sonochemistry, pp. 334-338

GYULAVÁRI I. – OLÁH J. – PRINCZ P. – KUCSÁK M.: Biofilm rendszerek alkalmazása a szennyvíztisztításban, (<http://statex.hu/>).

KÁRPÁTI Á. 2007: A szennyvíztisztítás alapjai, Egyetemi jegyzet, Pannon Egyetem, Környezetmérnöki Intézet, Veszprém

KÁRPÁTI Á. 2007: Szennyvíztisztítási technológiák, a fejlődés tendenciái napjainkban, Egyetemi jegyzet, Pannon Egyetem, Környezetmérnöki Intézet, Veszprém

LAZAROVA V. - MANEM J. 1995: Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment, Water Research, Vol. 29, Issue 10, pp. 2227-2245

MARSHALL K. 1992: Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. Control of biofilm formation awaits the development of a method to prevent bacterial adhesion, ASM American Society for Microbiology News, Vol. 58, No. 4, pp. 202-207

MERÉNYI J. 2008: Biofilterekkel kapcsolatos tapasztalatok a szennyvíztisztításban (REHM. H. J. - REED G.: Biotechnology, Vol. 11a, pp. 366-371) című cikke alapján

MERÉNYI J. 2008: Elárasztott rögzített ágyas szennyvíztisztítók (REHM. H. J. - REED G.: Biotechnology, Vol. 11a, pp. 366-371) című cikke alapján

PAP K. 2011: Az élelmiszer mikrobiológia kiemelt szempontjai palackozott forrás – és ásványvíz gyártása során, Doktori értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

PRINCZ P. – OLÁH J. 2005: A biológiai szennyvíztisztítás módszerei és az eleveniszapos szennyvíztisztítás hatásfokának növelése természetes, valamint felületkezelt zeolitok felhasználásával, Élőbolygó Környezetvédelmi Kutatási Kft

RIJNAARTS M. H. H. – NORDE W. – BOUWER E. J. - LYKLEMA J. - ZEHNDER B. J. A. 1993: Bacterial Adhesion under Static and Dynamic Conditions, Appl Environ Microbiol., Vol.59, No.10, pp. 3255-3265

SAUER K. – RICKARD H. A. – DAVID G. D. 2007: Biofilms and biocomplexity, American Society for Microbiology, Vol. 2, No. 7, pp. 347-353

SUTHERLAND I. W. 2001: The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment, Trends in Microbiology, Vol. 9, No. 5, pp. 222-227

SZABÓ I. 2009: Szénhidrogénekkal szennyezett területek mikroba populációjának jellemzése, Doktori értekezés, Szent István Egyetem, Környezettudományi Doktori Iskola

SZÉKELY A. 2008: Bakteriális diverzitás vizsgáló eljárások alkalmazása a szennyvíztisztítás mikrobiológiai kutatásában, Doktori értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Doktori Iskola, Evolúciógenetika, Evolúciós ökológia, Konzervációs Biológia

TARDY G. 2006: Eleveniszapos Biofilmes szennyvíztisztító rendszerek biológiai nitrogén eltávolításának kombinált optimalizálása, Doktori értekezés, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

TARJÁNYINÉ SZ. SZ. 2010: Bioszűrőkben alkalmazható szemcsés biofilm hordozók vizsgálata, VII. Szennyvízágazati Konferencia, Budapest

Felhasznált internetes források:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm?oldid=447535436> – letöltve 2011. szeptember 28.

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Biofilm> - letöltve 2011. szeptember 28.

<http://vitaminkosar.hu/tudomanyos/cikkek/bakteriumvarosok-a-biofilmek-szerepe.html> -
letöltve 2011. október 15.

<http://www.biofilm.montana.edu/node/2390> - letöltve 2011. október 10.

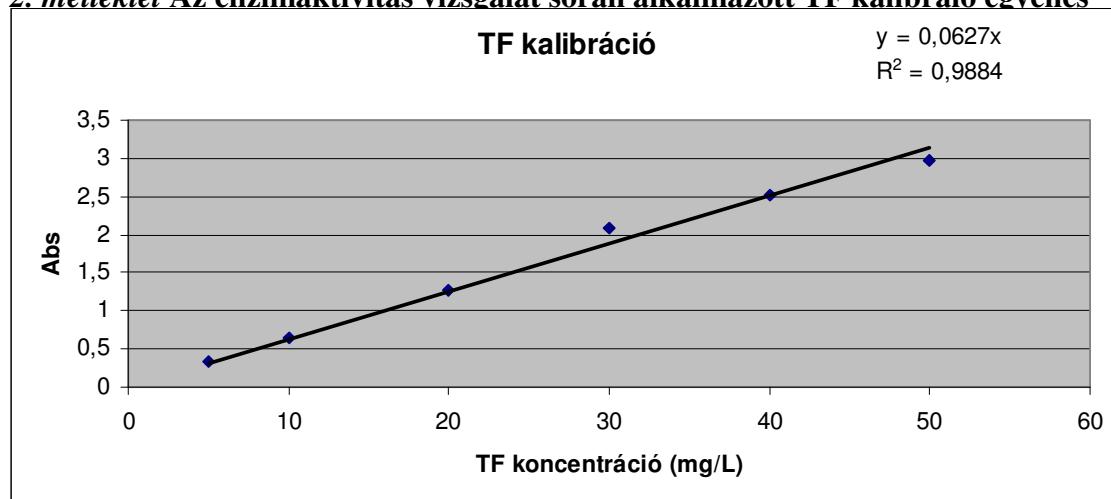
<http://www.opulus.hu/microcontamination/endotoxin/movement/biofilm/biofilm.asp> - letöltve 2011. október 4.

8. Mellékletek

1. melléklet A félüzemi kísérleti rendszerben a szennyvíz oldott oxigén tartalma az egyes reaktorokban

		Reaktorok							
	Mintavételi időpont	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Oldott oxigén (mg/L)	2011. május 30.	0,6	3,2	4,3	4,1	4,4	4,7	5,4	6,7
	2011. június 2.	0,5	1,8	3,2	2,7	3,6	4,4	4,6	5,2
	2011. június 6.	0,1	1,7	2,6	2,7	3,1	3,9	4,4	4,2
	2011. június 14.	2,9	2,2	2,8	2,5	2,8	3,1	3,7	4,9

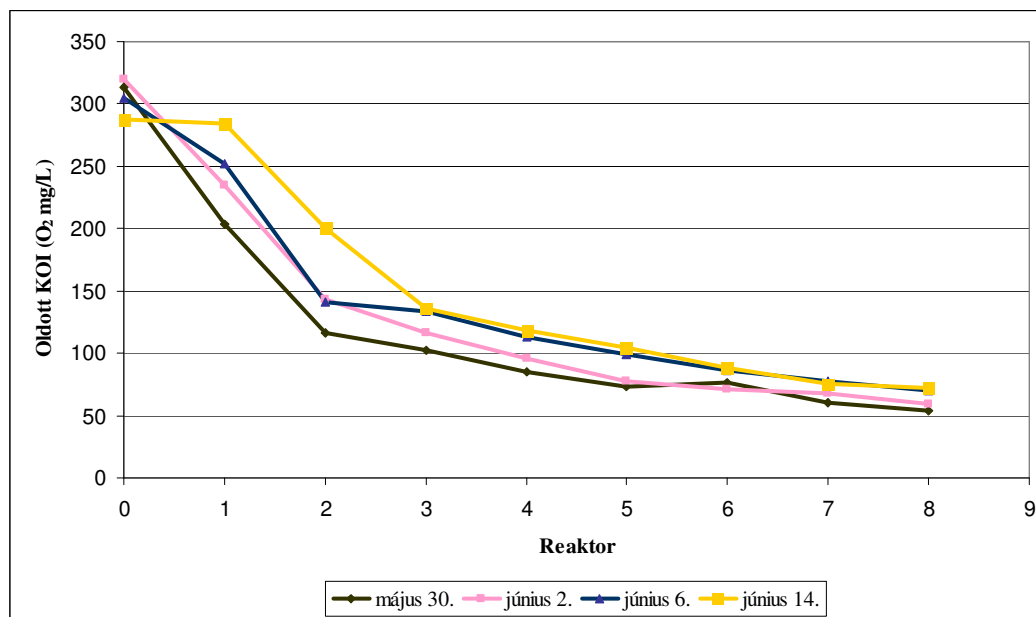
2. melléklet Az enzimaktivitás vizsgálat során alkalmazott TF kalibráló egvényes



3. melléklet Hordozókon megtelepedett biofilmek szárazanyag-tartalma (g)

Hordozók	Reaktorok	Mintavételezések				
		1.	2.	3.	4.	5.
PP1	1	1,36	3,18	5,63	6,56	7,56
	2	1,11	1,09	2,31	1,07	2,75
	3	0,53	0,66	0,97	0,46	0,84
	4	0,55	0,34	0,39	0,66	0,63
	5	0,61	1,05	0,44	0,40	0,56
	6	0,48	1,37	0,61	1,05	0,58
	7	0,40	2,05	0,99	2,18	1,50
	8	0,15	0,64	0,66	0,38	1,88
PP2	1	0,76	1,73	1,58	2,74	4,41
	2	0,80	0,71	1,80	1,76	2,25
	3	0,60	0,99	1,57	0,49	0,62
	4	0,75	0,58	0,32	0,53	0,61
	5	0,57	1,05	0,40	0,60	0,83
	6	0,65	1,01	0,40	0,79	0,67
	7	0,43	0,99	0,52	0,88	1,26
	8	0,17	0,54	0,59	0,37	1,16
PP3	1	2,15	2,32	2,70	9,87	8,72
	2	1,74	1,78	2,80	1,65	6,74
	3	1,45	1,72	1,92	0,82	0,76
	4	0,91	0,95	0,36	1,81	1,75
	5	1,02	1,52	1,41	0,70	1,14
	6	1,13	3,38	1,51	1,38	1,70
	7	0,44	1,85	1,25	1,04	0,97
	8	0,23	0,83	0,84	0,75	1,45
PES	1	0,57	1,51	1,94	2,45	3,05
	2	1,71	2,39	1,31	0,91	1,87
	3	1,38	1,28	1,09	0,31	0,48
	4	0,46	0,39	0,17	0,81	0,43
	5	0,39	0,87	0,98	0,42	0,74
	6	0,74	1,22	0,90	0,88	0,42
	7	0,13	0,76	1,14	0,74	0,59
	8	0,10	0,45	0,30	1,05	0,67

4. melléklet A félüzemi kaszkádrendszer reaktoraiban a szennyvíz átlagos oldott KOI értékei



0. reaktor: a befolyó szennyvíz adata

5. melléklet A szennyvíz átlagos lebegőanyag-tartalma (TSS - Total Suspended Solids – teljes lebegőanyag tartalom) a félüzemi kaszkádrendszerben

		Reaktorok							
	Befolyó	1	2	3	4	5	6	7	8
TSS átlag (mg/L)	196	228	241	209	206	158	175	176	152

6. melléklet A műszálas hordozókon megtelepedett biofilmek – a kísérlet időtartama alatt mutatott – átlagos fajlagos aktivitás és szórás értékei (TF mg/g)

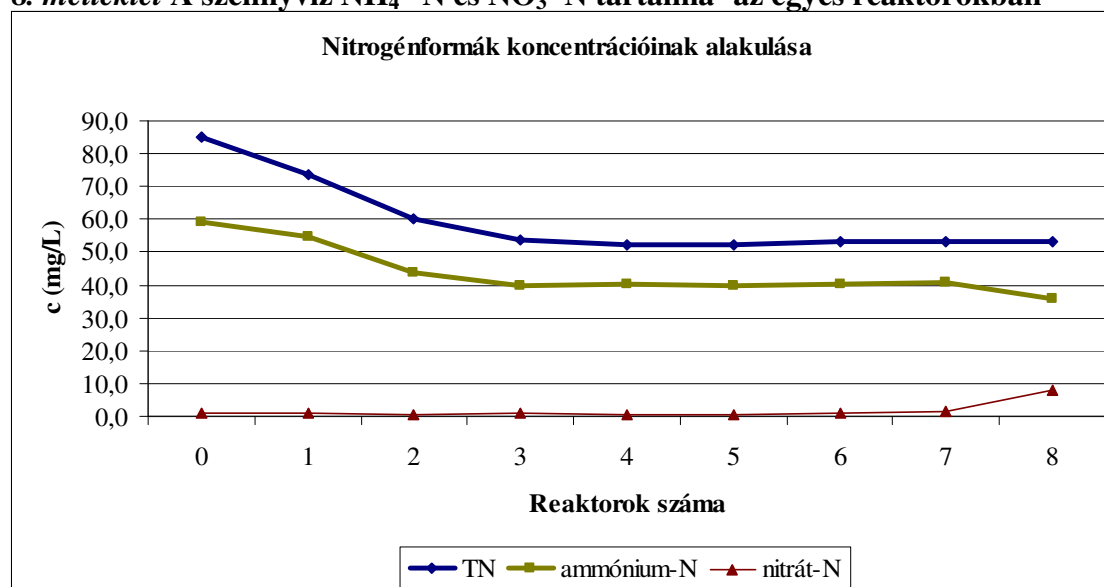
	Reaktorok							
Hor-dozó	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
PP1	10,41 ± 2,78	8,38 ± 3,08	7,04 ± 4,46	6,71 ± 4,58	12,33 ± 6,48	10,45 ± 4,22	12,73 ± 4,64	4,94 ± 4,93
PP2	5,32 ± 2,91	9,22 ± 2,17	6,08 ± 5,13	8,43 ± 6,31	8,39 ± 3,63	11,73 ± 4,88	9,36 ± 5,35	6,13 ± 4,23
PP3	6,52 ± 1,53	12,04 ± 4,48	10,32 ± 5,35	13,26 ± 5,82	12,26 ± 4,78	12,56 ± 3,54	13,29 ± 1,65	7,58 ± 3,37
PES	10,91 ± 5,72	16,39 ± 3,25	20,05 ± 5,73	10,43 ± 5,32	10,07 ± 3,24	11,84 ± 8,01	9,22 ± 4,71	10,15 ± 4,34

7. melléklet PP1 és PES hordozókon kolonizált biofilmek össz-aktivitás értékei

Hordozók	Reaktorok	TF mg				
		Mintavételek				
		1.	2.	3.	4.	5.
PP1	1	nm	31,05	79,38	48,45	78,47
	2	6,23	11,15	10,98	10,04	32,78
	3	6,71	5,95	8,47	1,08	2,12
	4	2,05	4,07	4,40	1,36	2,85
	5	11,35	8,01	8,45	1,88	6,39
	6	7,43	8,62	7,90	6,15	6,76
	7	7,10	13,09	15,83	21,15	20,69
	8	0,16	0,30	8,28	1,44	12,69
PES	1	3,22	27,67	8,91	32,15	39,34
	2	24,54	39,72	15,89	17,13	37,67
	3	29,86	36,64	21,13	4,04	8,34
	4	4,62	5,48	1,49	13,35	1,07
	5	4,47	6,82	6,57	3,99	11,01
	6	14,61	7,95	17,84	1,55	4,78
	7	0,46	6,85	16,42	4,26	7,89
	8	0,63	7,42	3,35	11,43	3,94

nm: nem mért

8. melléklet A szennyvíz NH_4^+ -N és NO_3^- -N tartalma¹ az egyes reaktorokban



0. reaktor: a befolyó szennyvíz adata

¹ A víz fizikai-kémiai adatainak mérését (oldott oxigén, KOI, TSS és nitrogénformák) az Organica Zrt. munkatársai végezték a hatályos szabványok előírásai szerint.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok *Prof. Dr. Záray Gyula* egyetemi tanárnak, amiért lehetővé tette, hogy tudományos diákköri dolgozatomat az ELTE KKKK és az Organica Technológiák Zrt. által közösen folytatott kutatásba bekapcsolódva írhattam meg.

A kutatások anyagi háttérét a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség biztosította a TÉT_09-1-2009-0014 sz. projekt keretében.

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek *Dr. Barkács Katalin* adjunktusnak és *Jurecska Laura* doktorandusznak a kísérleti munkában és az adatok kiértékelésben nyújtott odaadó segítségüket és hasznos tanácsaikat.

Köszönöm tanácsait és segítségét *Dr. Felföldi Tamás* adjunktusnak.

Köszönettel tartozom tovább az Organica Zrt. munkatársainak és az Analitikai Kémiai Tanszék doktoranduszainak és laboránsainak is.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom és barátaim végtelen türelmét és támogatását.