



**XXXII. Országos
Tudományos Diákköri
Konferencia**

2014



Mikrobiológiai kén-hidrogén mentesítés szakaszos rendszerben

Készítette:

Salekovics Alexandra

Biomérnöki B. Sc., 1. évfolyam

Témavezető:

Dr. Nemestóthy Nándor

Egyetemi docens

Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet
Mérnöki Kar

**Pannon Egyetem
Veszprém**

Tartalmi összefoglaló

A kén-hidrogén technológiai szempontból gondot okoz, mivel korrozív és mérgező tulajdonságairól ismert. Jelen van különböző gázáramokban, még ha csak kis koncentrációban is, de például megtalálható a biogáz komponensei között, melyből a további felhasználás előtt káros hatásai miatt el kell távolítani. Számos eljárást dolgoztak ki ennek megvalósítására, de a legelterjedtebben fizikai-kémiai módszereket alkalmaznak. Viszont biológiai úton is történhet az eliminálása, különböző autotróf és heterotróf baktérium törzsek felhasználásával. Ez a módszer, előnyei miatt egyre jobban előtérbe került, mivel alacsonyak a megvalósítási költségek, könnyű a működtetés, nincs speciális vegyszer és berendezés igény. A minél kedvezőbb ipari alkalmazhatóság és nagyobb eltávolítási hatások elérése érdekében folytak és folynak kutatások ezen a területen, különböző mikroorganizmusok és technológiai megoldások felhasználásával.

A TDK munka során a kiválasztott nem patogén, aerob, kemoautotróf baktériumok alkalmazhatóságának igazolása volt a cél a kén-hidrogén eliminálására laboratóriumi körülmények között. *Thiobacillus thioparus* és *Thiomonas intermedia* baktériumokat választottuk kedvező tulajdonságaik miatt. Először a baktériumok felnevelését, majd inokulum készítését kellett megvalósítani a tápközegek elkészítésével. A kísérleti berendezés összeállításnál a legfontosabb szempont az volt, hogy minél pontosabban igazolhatóvá váljon a baktériumok szulfid oxidálása révén bekövetkező kén-hidrogén csökkenés. Ezért a megfelelő analitikai módszer kidolgozása után, elvégeztük a kalibrációkat, végül a szuszpendált szakaszos rendszerű kísérleti berendezés működtetése során a folyadék fázis és a gáz fázis koncentráció változásainak nyomon követésével összesítettük a mért adatokat.

Kulcsszavak: kén-hidrogén eltávolítás, biogáz, biotechnológia, *Thiobacillus thioparus*, *Thiomonas intermedia*, szuszpendált szakaszos rendszer.

Abstract

Hydrogen sulfide removal from a technological point of view is problematic because of its corrosive and toxic properties. While present in various gas streams, although albeit in small concentrations for example, they are among the components of biogas, which must be removed due to the deleterious effects prior to use. Several methods have been developed to accomplish this, but the most widely used are the physico-chemical methods. However, the elimination of biological processes can be performed using various autotrophic and heterotrophic bacteria. This method has many advantages because of the low implementation costs, ease of operation, and no special chemicals or equipment is required. In order to obtain better industrial applicability, and to achieve greater removal efficiencies, open research is conducted in this area, and various microorganisms and technological solutions are implemented.

In this work, the selected non-pathogenic, aerobic, chemoautotrophic bacteria's applicability was our goal for the elimination of hydrogen sulfide under laboratory conditions. *Thiobacillus thioparus* and *Thiomonas intermedia* bacteria were chosen because of their favourable properties. First the bacteria growth and inoculum was achieved by preparing the medium. The most important aspect during the setup of this experiment was the bacterial oxidation of sulfide and more precisely hydrogen sulfide reduction. Therefore, after the appropriate analytical method was established, we performed the necessary calibrations and as a result of the suspended operation for the experimental system, the changes in the concentrations for the liquid and gas phase were monitored and summarized in the measured data.

Keywords: hydrogen sulfide removal, biogas, biotechnology, *Thiobacillus thioparus*, *Thiomonas intermedia*, suspended batch system.

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi összefoglaló	1
1.1. A kén-hidrogén.....	1
1.2. Gázáramokból a kén-hidrogén eltávolításának módjai	2
1.2.1. Fizikai-kémiai megoldások	2
1.2.2. Mikrobiológiai megoldások	3
1.2.3. Kombinált megoldások	5
1.3. Mikroorganizmusok felnövesztése	5
1.3.1. <i>Thiobacillus thioparus</i> baktérium	7
1.3.2. <i>Thiomonas intermedia</i> baktérium	8
1.4. Szulfid koncentráció meghatározása	9
1.5. Célkitűzések	11
2. Anyagok és módszerek	12
2.1. Baktériumok.....	12
2.2. Felhasznált anyagok	12
2.3. Felhasznált eszközök.....	12
2.4. Alkalmazott készülékek	13
2.5. Módszerek	15
2.5.1. Baktériumok kiválasztása és felnövesztése.....	15
2.5.2. Folyadékfázis analízise	17
2.5.3. Kalibráció felvétele: oldott szulfid koncentráció	17
2.5.4. Kalibráció felvétele: sejtszárazanyag tartalom.....	20
2.5.5. A szuszpendált szakaszos rendszerű kísérleti berendezés	23
3. Kísérleti eredmények	26
3.1. Vizsgálatok a szuszpendált szakaszos rendszerben	26
3.2. <i>Thiobacillus thioparus</i> baktériummal végzett kísérlet.....	28
3.3. <i>Thiomonas intermedia</i> baktériummal végzett kísérlet	30
4. Összefoglalás.....	34

1. Irodalmi összefoglaló

1.1. A kén-hidrogén

A kén-hidrogén (H_2S) jellegzetes záptojásszagú, mérgező, színtelen, szobahőmérsékleten gáz halmazállapotú gyúlékony vegyület. Természetes és ipari források is hozzájárulnak a kibocsátásához. Megtalálható vulkanikus gázokban, mocsarakban, nyers kőolajban és földgázban, valamint szerves anyagok biológiai lebontása során keletkező termékek között. Az ipari tevékenységek is jelentős mennyiségű H_2S -t bocsátanak ki, mint például a kőolaj-finomítás, a cellulóz- és papírgyártás, a szennyvíztisztítás és a földgáz feldolgozása [1].

A földgázhoz hasonlóan a biogáz komponensei között is megtalálható a H_2S . Ez a biomassa forrásból származó megújuló energiahordozó egyre inkább előtérbe kerül a növekvő energiaigénynek köszönhetően. Termelését biomassa degradációjával anaerob mikroorganizmusok végzik oxigén hiányában, melynek eredményeként az alábbi általános összetételű biogázhoz jutunk (1.1. táblázat):

1.1. táblázat: Biogáz tipikus összetevői

Komponens	Tartalom
metán	50-65%
szén-dioxid	30-45%
vízgőz	telített
kén-hidrogén	100-10000 ppm

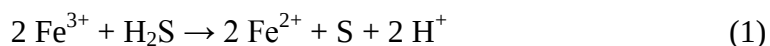
A biogáz szállítható csővezetéken vagy gázpalackba tömöríthető, viszont ez csak akkor lehetséges, ha a CO_2 , H_2S és a vízgőz eltávolítása megtörtént. A minőség szempontjából kulcsfontosságú a gáz tisztasága és CH_4 -tartalma, ami meghatározza energiaértékét, ezért szükséges a CO_2 eltávolítása [2]. A másik leggyakoribb szennyező komponens a H_2S , aminek tulajdonságai között szerepel még, hogy az ipari rendszerek technológiájára is káros korrozív, maró hatása miatt, továbbá égése során savas karakterű SO_2 keletkezik, ami veszélyes a környezetre. Ezért olyan létesítményekben, ahol például földgáz előállítása vagy biogáz termelés folyik, a gázáramot annak hasznosítása előtt tisztítani kell [3].

1.2. Gázáramokból a kén-hidrogén eltávolításának módjai

Számos módszer használatos a H_2S eltávolítására ipari gázáramokból, beleértve az abszorpciót, maszkolást és égetést. De a fizikai-kémiai eljárásoknak magas az energiaigénye, a kémiai és ártalmatlanítási költsége, emellett a termelés során másodlagos szennyező anyagok keletkeznek. Ezzel szemben a biológiai megoldások (például a biofiltráció) gazdaságosabbak és tisztább módszerek, mivel alacsonyabbak az üzemeltetési költségek, nincs másodlagos szennyező anyag és kevesebb környezetszennyező gáz kerül kibocsátásra [4].

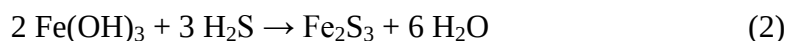
1.2.1. Fizikai-kémiai megoldások

Az eltávolítás kivitelezhető vaskelátot tartalmazó oldatba történő abszorpcióval, amikor is a vas(III)-ion vas(II)-ionná redukálódik és ezzel együtt a szulfid elemi kéné oxidálódik az (1) egyenlet szerint:



A gyakorlati megvalósításnál vas(III)-iont tartalmazó berendezésen keresztül vezetik a biogázt és ezzel egyidejűleg levegő beinjektálása is történik. Így megvalósul a biogáz kénmentesítése, oxigén segítségével pedig a vas(II)-ion regenerálása. Ez térben és időben elválasztva két külön berendezésben is megoldható. A módszer 99,9%-os H_2S eltávolítást tesz lehetővé, abban az esetben, amikor a biogáz szulfid tartalma magas. Viszont a túl sok levegő beinjektálása és a biogáz CO_2 tartalma problémát okozhat a folyamatban.

Adszorpció útján is elvégezhető a mentesítés, méghozzá vas(III)-hidroxid és vas(III)-oxid segítségével. A két száraz eljárás hasonló, viszont biogáz esetében a vas(III)-hidroxid használata az elterjedt. A folyamat során lejátszódó reakció a következő (2):



A vas-hidroxid egymásra rétegzett acélgyapot vagy fapellet rétegekben helyezkedik el. A biogáz a berendezés alján kerül bevezetésre alacsony nyomáson

és hőmérsékleten. Többszöri levegő bevezetéssel a vas-hidroxid regenerálható, de ez az oxidációs folyamat exoterm, ami gondot okozhat.

Aktivált faszén felületére is történhet a H₂S adszorpciója, abban az esetben, ha a biogáz oxigénmentes és közepes vagy magas koncentrációban tartalmazza a H₂S-t.

A biogáz alacsony H₂S koncentrációja esetén cink-oxid töltet is alkalmazható. Ekkor a H₂S kémiai kötést létesít a töltet belsejében a következő (3) egyenlet szerint:



Ha a biogáz kéntartalma magas, akkor a direkt katalitikus oxidáció, vagyis a módosított Claus-eljárás alkalmazható. Itt is adszorpció történik, csak ez esetben speciális fémkatalizátor felületére és emellett szükséges a biogáz-levegő gázkeverék előmelegítése is 100 °C fölé [5].

1.2.2. Mikrobiológiai megoldások

Több mikroorganizmust is használtak már a H₂S eltávolítására, elsősorban *Acidithiobacillus* és *Thiobacillus* törzs fajait. Ezekben a csoportokban találhatók acidofil (*Acidithiobacillus thiooxidans*) és neutrofil (*Thiobacillus novellus*, *Thiobacillus denitrificans* és *Thiobacillus thioparus*) baktériumok.

Hígított gáz kezelésére többféle bioreaktor kialakítás létezik. Ramírez és munkatársai poliuretán habon immobilizált *Thiobacillus thioparus* baktériumot felhasználva 99% feletti eltávolítási hatékonyságot értek el biotrickling filter-ben [1].

Potivichayanon és munkatársai egy új rögzített filmes bioscrubber rendszert dolgoztak ki *Acinetobacter* sp. és *Alcaligenes faecalis* mikroorganizmusokat alkalmazva. A rendszer hatásfoka 100 ppmv belépő gázkoncentráció mellett 91% volt, ami 98%-ra nőtt a két baktériumtörzs keverékének használatakor [6].

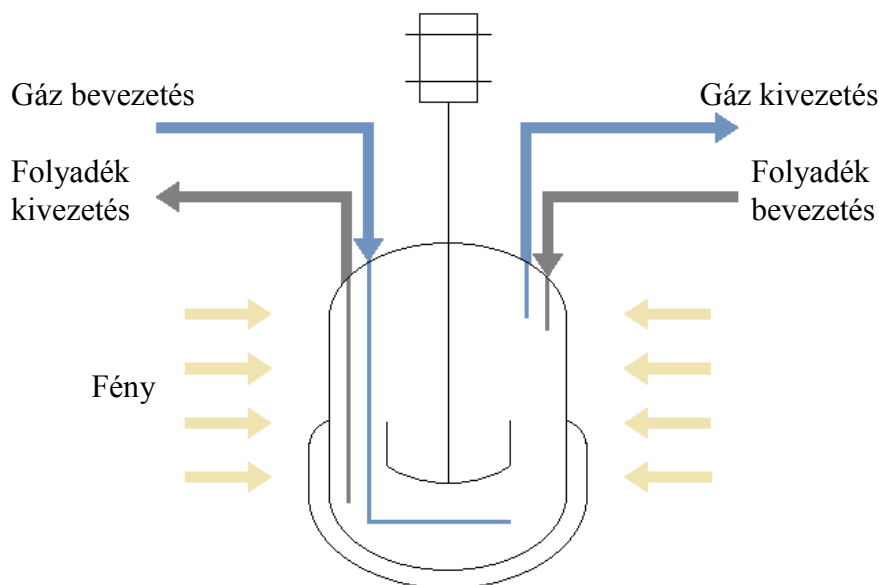
A 1.2. táblázat további példákat tartalmaz a mikroorganizmusok ipari alkalmazására:

1.2. táblázat: Szulfid oxidáló mikroorganizmusok ipari alkalmazása

Méret	Eljárás	Tisztítandó komp.	Baktérium	Hatásfok
Laboratórium	Biofiltráció	5-100 ppm H ₂ S,	<i>T. thioparus</i>	85-99%
Teljes	Adszorpció és aerob oxidáció	2000 ppm földgáz	endemikus	>99.8% (H ₂ S)
Teljes	Biofiltráció	anaerob szennyvíztisztításból származó biogáz	<i>Thiobacteria</i> (<i>Thiobacillus</i> sp.)	>90% (H ₂ S)
Laboratórium	Biofiltráció	30-450 ppm H ₂ S, 35-200 ppm NH ₃ ,	<i>T. thioparus</i> nitrifikáló baktérium	75-99% (H ₂ S) 30-92% (NH ₃)
Laboratórium	Biofiltráció	60-120 ppm H ₂ S, 60-120 ppm NH ₃ ,	<i>Pseudomonas putida</i> (H ₂ S) <i>Arthrobacter oxydans</i> (NH ₃)	>90% (H ₂ S) >95% (NH ₃)

A táblázat alapján is elmondható, hogy akár ipari méreteken is jó eltávolítási hatásfokot lehet elérni baktériumok alkalmazásával.

A biofiltráció mellett az 1.1. ábrán látható gáz rátáplálásos kevert tartály reaktor (fed-batch reaktor) is elterjedt reaktortípus. Gáz fázis szempontjából folyamatosan vagy szakaszosan működtethető, míg a folyadék fázis működtetése ciklikus. A mikroorganizmusok lehetnek szuszpendált állapotban a folyadék fázisban vagy immobilizáltan valamilyen hordozóhoz kötve.



1.1. ábra: Fed-batch reaktor

Maka és Cork a fény mennyiségének és intenzitásának hatását vizsgálta a H_2S metabolizmusra fed-batch reaktort használva [7].

1.2.3. Kombinált megoldások

A szennyező komponens eltávolítása az eljárások kombinálásával is kivitelezhető. Wei-Chih és munkatársai egy kémiai-biológiai kísérleti berendezést állítottak össze biogázból való hatékony H_2S mentesítéshez. Az eltávolítási hatékonyság *Acidithiobacillus ferrooxidans* baktérium alkalmazásával 90-95% volt, 3542 ppm belépő H_2S koncentráció mellett [8].

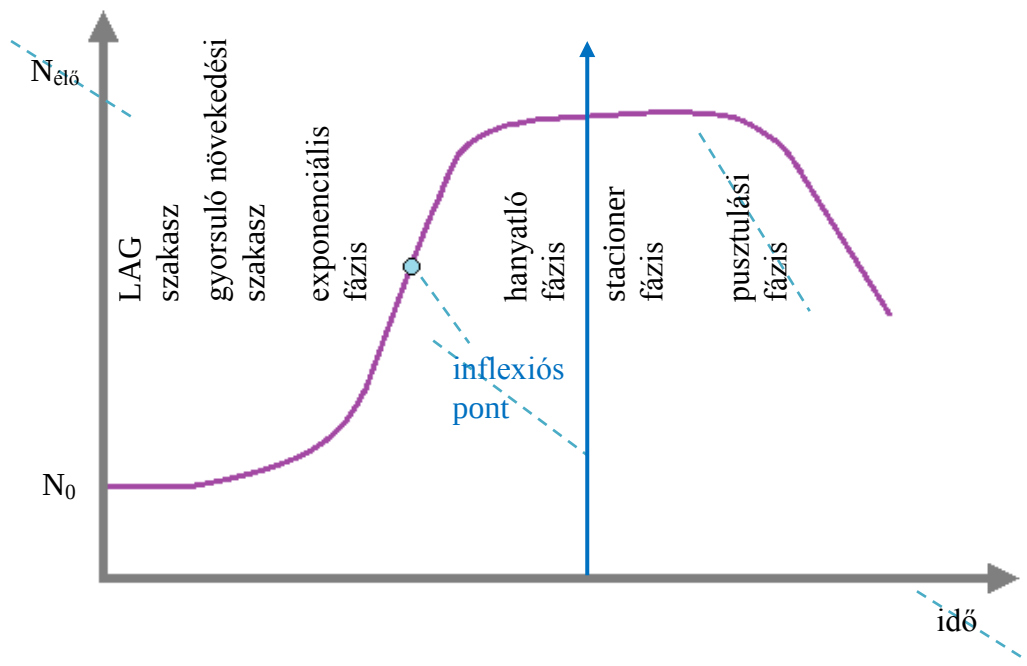
Huiqi és munkatársai adszorpciós és biodegradációs eljárás kombinációját alkalmazták biotrickling filtration rendszerben biológiailag aktivált szénen. Ez esetben az aktív szén felületén kialakult biofilm réteg fokozta a H_2S megkötődését [9].

1.3. Mikroorganizmusok felnevelése

Egy baktériumkultúrát számára megfelelő környezetbe helyezve (ahol a szükséges tápanyagok elegendő koncentrációban vannak jelen és az egyéb körülmények, mint például hőmérséklet, pH is kedvezőek), a sejtek idővel

osztódásnak indulnak. Gyakorlat szempontjából a sejtek növekedése fontos, mintsem a sejtek szám szerinti gyarapodása, ezért a növekedési modell alapján a mikrobakoncentrációt kell kifejezni sejtszárazanyagban mérve. A mikrobanoelkedés követésére kidolgozott direkt módszerek közül általánosan használatos a szárazanyagmérés és a turbidimetriás optikai módszer. Ez utóbbi az optikai denzitás (optikai sűrűség) meghatározása.

Az éppen jelenlévő mikrobakoncentrációt ábrázolva az idő függvényében a növekedési görbét kapjuk, amely szakaszos fermentáció során négy fázisra osztható. Az első a lappangási vagy lag szakasz, ahol a baktériumsejtek még nem növekednek, csak adaptálódnak a környezethez. A második a gyorsuló növekedés szakasza, amit az exponenciális fázis követ. Itt a sejtömeg növekedési intenzitása maximális. A negyedik szakasz a hanyatló fázis, amikor a sejtömeg folyamatosan csökken a jelenlévő limitált szubsztrát mennyiségnek is köszönhetően. Az élő sejtszám változását ábrázolva az időben az 1.2. ábra szerinti görbét kapjuk eredményül:

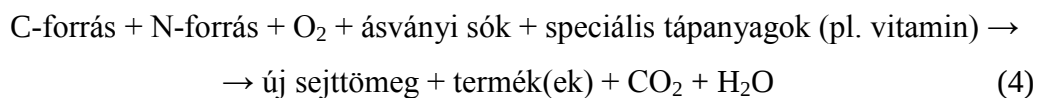


1.2. ábra: Általános növekedési görbe

Ez esetben megjelenik egy stacioner fázis is, amikor az összes sejtszám nem változik, de az ezt követő pusztulási fázisban a sejtek lízise lesz a meghatározó. A

lízis a szubsztrátlimitálás mellett bekövetkezhet a rendelkezésre álló egyre kisebb tér és a baktériumok által termelt gátló hatású metabolitok miatt is.

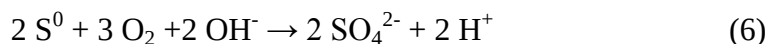
Ahhoz, hogy a sejttömeg növekedésnek induljon, szükség van a megfelelő környezetre, ami magába foglalja a táptalajok összetételét (oldott oxigénszint is ide tartozik) és a környezeti paramétereket. A táptalajoknak hasznosítható formában mindazon kémiai komponenst tartalmaznia kell, amikhez a mikrobának anyagcsere folyamatai során szüksége van. Ezek az elemek az alábbi (4) egyenlet szerint hasznosulnak:



Tehát a tápközegnek tartalmaznia kell C-forrást, N-forrást, sókat, esetleg speciális tápanyagokat és aerob baktérium esetében oxigént is. A felhasznált folyékony tápoldatok vagy szilárd táptalajok lehetnek: szintetikusak, félszintetikusak és természetes alapúak [10].

1.3.1. *Thiobacillus thioparus* baktérium

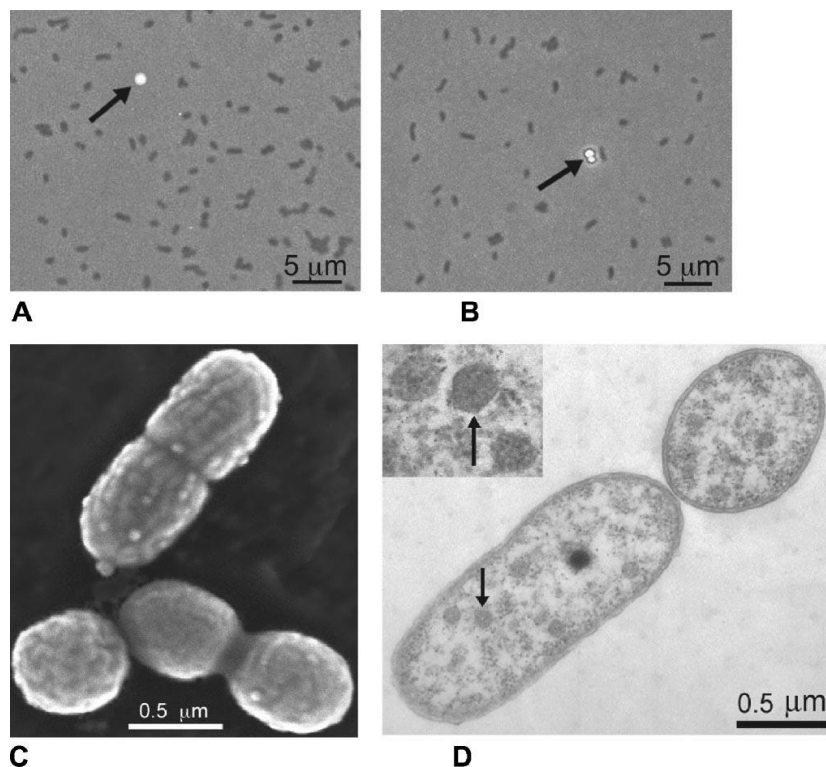
Aerob, obligát kemoautotróf és nem patogén tulajdonságokkal rendelkező Gram-negatív, pálcika alakú, 0,9-1,8 µm-es baktérium. Aerob, tehát anyagcseréjéhez oxigént igényel, továbbá kemoautotróf, vagyis metabolizmusaihoz szerves anyagok lebontását végzi, ami ebben az esetben a redukált kénvegyületek oxidálását [11] jelenti. A reakció mechanizmus a következő (5-7):



Tehát a szerves anyagok jelentős szerepet nem játszanak anyagcseréjében, de még az obligát kemoautotróf baktérium esetében is egyes szerves komponens jelenléte növekedését serkenteni képes [12]. További tulajdonságai: optimális pH tartománya 5-9 között található, optimális hőmérséklete 33-35 °C közötti,

energiaforrása tioszulfát és szulfid, az oxidált ként pedig extracellulárisan bocsátja ki [7].

A baktérium morfológiáját szemléltetik az 1.3. ábrán lévő mikroszkopikus felvételek:

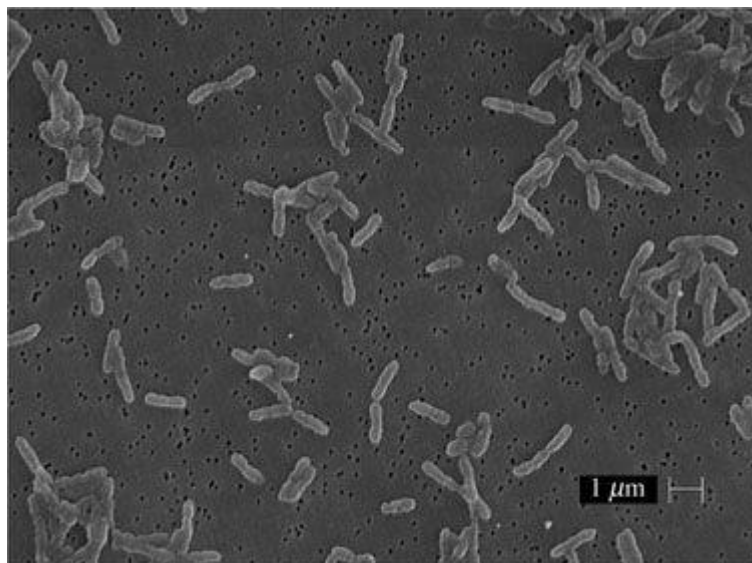


1.3. ábra: Mikroszkopikus felvételek a *Thiobacillus thioparus*-ról [13]

Az A és B képen fáziskontraszt mikroszkópos felvétel látható a baktériumról. A nyilak az elemi kén gömböcskéket jelölik, amik akkumulálódtak a tápközegben, mivel a mikroorganizmus a tioszulfátot eloxidálta. A C pásztázó elektronmikroszkopikus felvétel és a baktérium különböző osztódási szakaszait mutatja. A D transzmissziós elektronmikroszkopikus kép, ami hossz- és keresztmetszeti képet mutat a sejtekről [13].

1.3.2. *Thiomonas intermedia* baktérium

Erről a baktériumról kevés irodalmi adat található, viszont szintén a szulfidoxidálók közé tartozó mikroorganizmusról van szó és tulajdonságai sokban hasonlóak a *Thiobacillus thioparus* baktériuméhoz, amit a következő pásztázó elektronmikroszkopikus felvétel (1.4. ábra) és 1.3. táblázat is szemléltet.



1.4. ábra: Mikroszkopikus felvétel a *Thiomonas* sp.-ről [14]

1.3. táblázat: *Thiobacillus thioparus* és a *Thiomonas intermedia* jellemző tulajdonságai

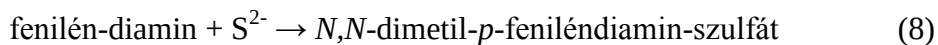
Tulajdonság	<i>Thiobacillus thioparus</i>	<i>Thiomonas intermedia</i>
Opt. hőmérséklet	33-35 °C	mezofil
Sejt típus	Gram-negatív	Gram-negatív
Alak, méret	pálca, 0,9-1,8 μm	pálca
Trofitás	obligát kemoautotróf	fakultatív kemoautotróf
Energia forrás	tioszulfát, szulfid	szulfid, tioszulfát, tetrathionát
Oxigén szükséglet	aerob	aerob

Tehát felnevelésük során hasonló környezeti feltételeket kell biztosítani mindkét baktérium számára [14][15][16].

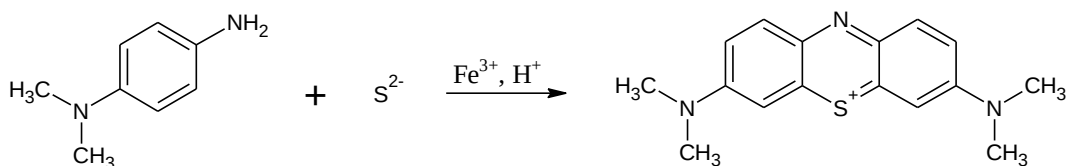
1.4. Szulfid koncentráció meghatározása

A folyadékfázisban lévő szulfid koncentráció meghatározására kidolgozott metilénkék módszer fotometriával összekötve nagyon érzékeny és kis koncentrációk kimutatására is alkalmas. Ügyelni kell a receptúrában megadott pontos mennyiségek bemérésére és a megfelelő koncentrációtartomány kiválasztására. A módszer megbízhatóságát egyes tényezők befolyásolhatják, mint

például az oldatban lévő tioszulfát, ami mérési hibához vezet, mivel a lejátszódó színeképítő reakciót zavarja. A reakció a következő (8):



$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, és HCl mellett



Adott hullámhosszon elvégezve a minták fotometrálsát kalibrációs görbe készíthető, majd a folyadékfázis szulfid koncentráció változása nyomon követhető [17].

Gázfázisok összetétele gáزدetektorok segítségével vizsgálható. Működhetnek infravörös, katalitikus, elektrokémiai, fotoionizációs elven stb. Általános laboratóriumi mérések mellett, mérgező gázok koncentrációjának meghatározására, füstgáz analizálására is alkalmasak. A gázok V/V%-os összetételét mérik és a kritikus koncentráció esetén fény és/vagy hangjelzést adnak, így balesetek megelőzésére is alkalmazhatók.

A német Dräger Safety AG & Co. KGaA által gyártott Dräger X-am[®] 7000 multigáz detektor akár több 100 féle gáz elemzésére, nagyon kicsi koncentrációk kimutatására is alkalmas a készülékbe építhető szenzoroknak köszönhetően. Az elektrokémiai szenzor által regisztrált adatok segítségével a mérési tartományon belül tetszőleges H_2S gázáram koncentráció változása nyomon követhető. [18].

1.5. Célkitűzések

Ezen a területen kevés publikációt lehet számon tartani, így külön kihívást jelentett a megfelelő laboratóriumi rendszer összeállítása. Ezért az irodalmi adatok tanulmányozását követően az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

Elsőként a megfelelő baktérium törzs, és azon belül a mikroorganizmusok kiválasztása volt a feladat. Ezt követően a számukra optimális környezetet nyújtó táptalajt kellett elkészíteni, majd kidolgozni egy olyan analitikai módszert, amivel reprodukálható módon vizsgálható a rendszerben lezajló változás, egyszerűen kivitelezhető és gyors eredményt biztosít. A kísérleti rendszer tekintetében első célként egy szuszpendált szakaszos működésű berendezést állítottunk össze, amiben vizsgáltuk a baktériumok kén-hidrogén lebontását. Ezt több előkísérlet is megelőzte, amik a berendezés minél pontosabb kivitelezésére irányultak. Mivel a *Thiobacillus thioparus* baktérium mellett az általunk választott *Thiomonas intermedia* baktériumról kevés irodalmi adat szerepel, ezért itt különös tekintetet kellett fordítani az optimális paraméterek beállítására.

Miután sikerült összeállítani a kísérleti berendezést, a baktériumok szaporodási ideje alatt üzemeltettük és mértük a folyadék-, illetve gázfázis koncentráció változásait. A kapott eredményekből levontuk a következtetéseket és megfogalmaztuk további célkitűzéseinket, hogy még reprodukálhatóbb és ipari szempontból is kedvezőbb rendszert állíthassunk össze laboratóriumi körülmények között a kísérletek második fázisában.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Baktériumok

Thiomonas intermedia nevű baktérium a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (NCAIM Budapest), míg a *Thiobacillus thioparus* (DSM-505) pedig a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) a német törzsgyűjteményből származik [19].

2.2. Felhasznált anyagok

Táptalaj komponensek

NH_4Cl , KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, élesztő kivonat.

Reagens

N,N-dimetil-*p*-feniléndiamin-szulfát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, HCl

Egyéb vegyszerek

NaOH , etil-alkohol, FeS , KI-os jódooldat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mérőoldat, keményítő indikátoroldat, agar, desztillált víz.

A vegyszereket a Reanal Finomvegyszergyár ZRt.-től szereztük be.

2.3. Felhasznált eszközök

Üvegeszközök

Petri-csésze, Erlenmeyer-lombik, mérőlombik, főzőpohár, kémcső, üveg pipetta, duplafalú üveg reaktor.

Egyéb eszközök

Vegyszeres kanál, steril szűrő, borszeszégő, oltókacs, Eppendorf cső.

Automata büretta, kémcsőállvány, üvegfritt, fecskendő, teflon cső, menzúra.

Autokláv, exsikkátor.

2.4. Alkalmazott készülékek

Lamináris box (DEFI, Laminar Air Flow BA-900)

Centrifuga (B. Braun Biotech International, SIGMA 4K10)

Analitikai mérleg (KERN & Sohn GmbH, KERN ABJ)

Táramérleg (Petit Balance, Chyo MK-500C)

Mágneses keverő (VELP SCIENTIFICA)

pH-mérő, üvegelektród (radelkis, Precision pH Meter OP-205/1)

Automata pipetta 5-10 ml és 1000 µl (BRAND, Transferpette S és BIOHIT PROLINE)

Termosztálható rázóinkubátor (B. Braun Biotech International, CERTOMAT® HK)

Szárítószekrény (Labor Műszeripari Művek, LP-323)

Termosztát (VEB MLW PRÜFGERATE-WERK U15C)

Perisztaltikus pumpa (ProMinent beta/4)

Kompakt fotométer (MACHEREY-NAGEL PF-12)

Gázdetektor

Dräger X-am® 7000 multigáz detektor

Dräger Safety AG & Co. KGaA, Germany



2.1. ábra: Dräger X-am® 7000 multigáz detektor

A készüléket három elektrokémiai szenzorral (XS EC), az infravörös (IR), katalizátoros szenzorok (CatEx) és/vagy fotoionizációs szenzorok (PID)

kombinációja közül bármely kettővel lehet ellátni. Az XS Dräger szenzorok több mint 100 különböző gáz és gőz érzékelésére alkalmasak. A gázfázis H_2S és CO_2 koncentráció változását a következő szenzorokkal mértük: DrägerSensor XS EC H_2S HC típusú elektrokémiai szenzor, melynek mérési tartománya 0-1000 ppm és DrägerSensor Smart IR CO_2 HC típusú infravörös szenzor 0-100 V/V% mérési tartománnyal. A készülékhez tartozó nagy teljesítményű akkumulátortelep akár 50 órás üzemidőt is biztosít a mérési adatok regisztrálásához, amik a mérés végeztével a Dräger Safety szoftver segítségével számítógépre vihetők.



2.2. ábra: DrägerSensor XS EC H_2S HC és DrägerSensor Smart IR CO_2 HC típusú szenzorok

Spektrofotométer

HACH LANGE DR 3900 spektrofotométer

HACH LANGE GmbH, Germany



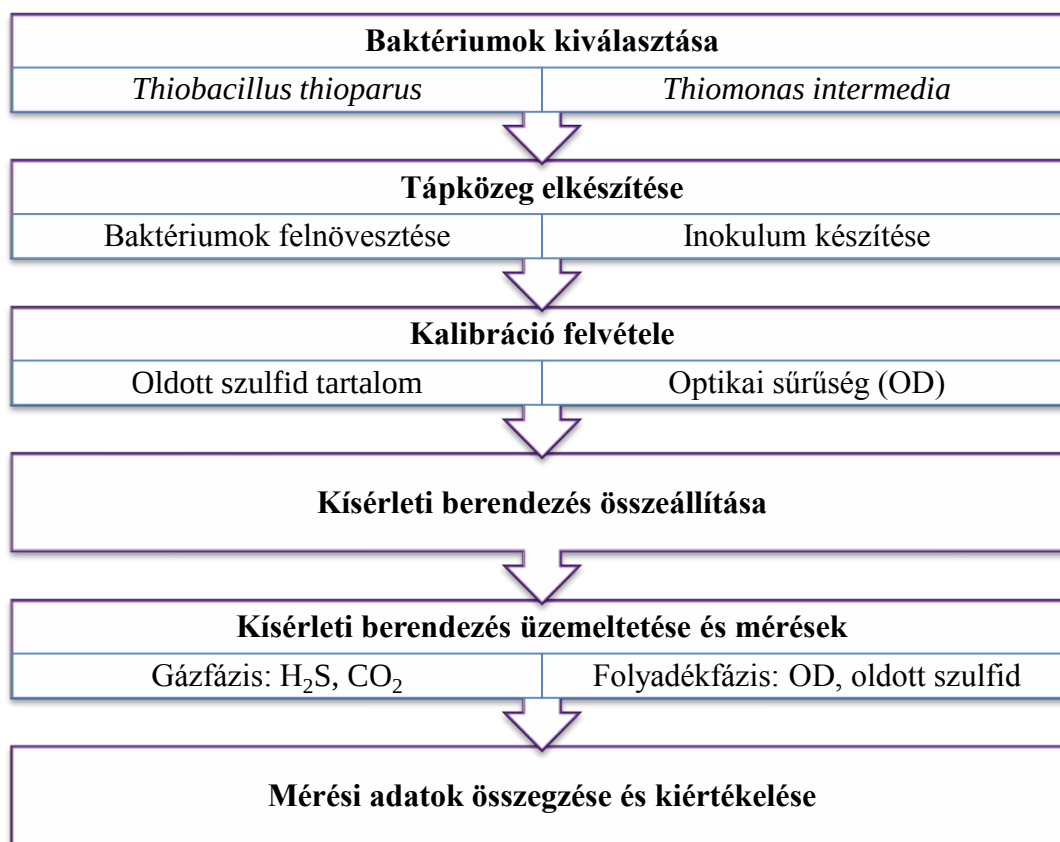
2.3. ábra: HACH LANGE DR 3900 spektrofotométer

VIS spektrofotométer RFID technológiával ellátva. A készülék főbb adatai a következők: volfrám (VIS) fényforrás; 1 %, 0,50-2,0 Abs fotometrikus pontosság;

$\pm 1,5$ nm (hullámhossz tartomány 340-900 nm) hullámhossz pontosság; 320-1100 nm hullámhossz tartomány; többféle küvetta kompatibilitás; transzmittancia (%), abszorbanca és koncentráció, szkennelés működési módok [20].

2.5. Módszerek

A kísérleteket a 2.4. folyamatábrán látható főbb lépések szerint végeztük el. Részletes ismertetésüket a következő fejezetek tartalmazzák.



2.4. ábra: Kísérletek lépései folyamatábrán

2.5.1. Baktériumok kiválasztása és felnevesztése

A baktériumok kiválasztásánál több fontos szempontot is figyelembe kellett venni, mind a kísérleti berendezés, mind pedig felnevesztésük és alkalmazhatóságuk miatt. Ezért az alkalmazott mikroorganizmusok mindegyike aerob, kemoautotróf és nem patogén tulajdonságokkal rendelkezett, így a rendszer szempontjából könnyebb volt biztosítani a baktériumok számára szükséges

optimális környezetet. A kén-hidrogén eltávolításához a *Thiobacillus thioparus* és *Thiomonas intermedia* baktériumokat választottuk, melyek a fent említett tulajdonságokkal rendelkeznek.

Felnövesztésükhöz a DSMZ a német törzsgyűjtemény által kidolgozott tápközeget (DSMZ-35a) használtuk fel, melynek összetételét 1000 ml desztillált vízben elkészítve a következő 2.1. táblázat tartalmazza:

2.1. táblázat: DSMZ által kidolgozott tápközegek komponensei

Komponens	Bemérendő mennyiség [g]
NH ₄ Cl	0,1
KH ₂ PO ₄	3,0
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1
CaCl ₂	0,1
Na ₂ S ₂ O ₃	5,0
Élesztő kivonat	1,0

A sejtfelszaporítás során először analitikai mérlegen kimértük a tápközegek komponenseit a Na₂S₂O₃ kivételével, mivel ez a vegyület sterilizálás során elbomlana. A többi sót és az élesztő kivonatot 100 ml desztillált vízben feloldottuk, majd mágneses keverőn való kevertetés közben a pH-ját 5,9-re állítottuk be NaOH-dal. Az elkészült 100 ml tápoldatból pipettával kimértünk 1-1 ml-t két Erlenmeyer-lombikba és 9-9 ml desztillált vízzel hígítottuk, így a megfelelő komponens koncentrációt értük el. Ezután a tápoldatot és az oltáshoz szükséges eszközöket 45 percig, 120 °C-on gőzzel sterilizáltuk. Az így csíramentesített eszközökkel a továbbiakban végig lamináris box alatt dolgoztunk. A tápközegek kihűlése után 1 g Na₂S₂O₃-ot 5 ml desztillált vízben oldottunk fel, amit fecskendővel steril szűrőn keresztül szintén steril főzőpohárba juttattunk. Eztán 250 µl-t pipettáztunk belőle mindkét sterilizált tápközegekbe és 1-1 ml baktérium szuszpenziót adtunk hozzá. A lombikokat szintén steril dugóval lezártuk, majd 33 °C-on és 120 rpm mellett végeztük az inkubálást termosztálható rázógép segítségével.

A kezdeti kísérleteknél a megfelelő szaporodási idő elteltével folyékony és szilárd, gőzzel sterilizált táptalajokra is elvégeztük az átoltásokat. Ezen tápközegek összetétele megegyezett az előbb leírtakkal, viszont a szilárd táptalaj

még 2-3% agart is tartalmazott. Ez esetben az átoltást a már megszilárdult táptalajra oltókaccsal végeztünk, amit előzőleg etil-alkoholba mártottunk és borszeszegő lángjában sterilizáltunk. Az inokulum, vagyis a megfelelő sejtszámra felszaporított baktérium szuszpenzió elkészítéséhez a későbbiek során érdemesebb és egyszerűbb megoldás volt az átoltást csak folyékony táptalajra megvalósítani. Ehhez a két 10 ml tápközegben lévő baktérium szuszpenzióból 5-5 ml-t oltottunk át az 50-50 ml sterilizált tápoldatba. Később a felnevesztést az előzőekhez hasonlóan 250 ml-re is elvégeztük.

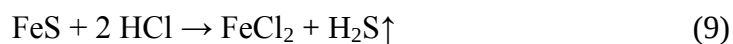
Az inokuláláshoz a 250 ml felszaporított baktérium szuszpenzióból lamináris box alatt dolgozva Eppendorf-csövekbe pipettáztuk a megfelelő mennyiségeket és 10 percig 12000-es fordulatszámon centrifugáltuk, ügyelve a centrifuga kiegyenlítésére. A folyamatot a felülúszó leöntése után még egyszer megismételtük, hogy kellő mennyiségű inokulumhoz jussunk. Végül a csöveket lefagyasztva tároltuk későbbi felhasználás céljából.

2.5.2. Folyadékfázis analízise

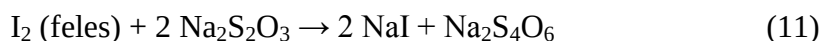
A szuszpendált szakaszos kísérleti berendezésnél a gázfázis analízise mellett a folyadékfázis elemzését is minél pontosabban kellett elvégezni és a benne lévő oldott H_2S koncentráció változását nyomon követni. Ehhez kétféle módszert alkalmaztunk és szükségünk volt a megfelelő kalibrációk elvégzésére. Egyik módszer a jodometria, mely az előkísérletek alatt – amik egyrészt a H_2S folyadékfázisban való oldódására irányultak – és a szulfid kalibráció felvételében került alkalmazásra. A másik módszer az *N,N*-dimetil-*p*-feniléndiamin-szulfátos színreakció, melyet fotometriásan mértünk csakúgy, mint az optikai denzitást.

2.5.3. Kalibráció felvétele: oldott szulfid koncentráció

Az oldott szulfid kalibrációjához először H_2S előállítását valósítottuk meg, mégpedig vas(II)-szulfidra sósavat csepegtettünk és az így keletkező gázt egy üvegfríten keresztül desztillált vízbe vezettük. A lejátszódó reakció egyenlete a következő (9):



Meghatározott idejű (30 perc) buborékoltatás után a kapott kén-hidrogénes vízből kivettünk 1 ml mintát, amit 5 ml, 0,05 M-os kálium-jodidos jóddalad mellett jód feleslegben 0,1 M-os nátrium-tioszulfát mérőoldat segítségével titráltunk. A színátcsapás biztos észleléséhez keményítő indikátort használtunk az egyenérték pont előtt hozzáadva. A mérést háromszor elvégeztük, a kapott fogyásokat átlagoltuk, és a visszatitrálós módszer egyenletéből kiszámítottuk a minta szulfid koncentrációját. A titrálási egyenletek az alábbiak (10-11):



A kapott fogyások átlaga 3,47 ml lett, melyből a szulfid koncentrációra 2448 mg/l adódott. Így jodometriás analízissel kimértük a törzsoldatba kerülő oldott szulfid koncentrációt. Az ebből kivett 10 ml mintát először 100 cm³-es mérőlombikban tízszeresére hígítottuk. Viszont annak érdekében, hogy a spektrofotométer lineáris mérési tartományán belül maradjon a szulfid koncentráció a törzsoldatot körülbelül még kétszázszorosára kellett hígítani. Ezt előzetes mérések előzték meg, amely szerint a maximum szulfid koncentráció 1 mg/l körüli lehet. Ezért az előzőleg elkészített hígított oldatból kivettünk 1 ml-t, amit egy újabb mérőlombikban 200 cm³-re hígítottunk, melynek koncentrációja 1,224 mg/l lett. Az így elkészült oldatból 6 pontból álló hígítási sort készítettünk. A kémcsövekbe rendre belepipettáztuk először a desztillált vizet, majd a kén-hidrogénes vizet, melyek térfogata együttesen 10 ml volt, végül hozzáadtunk 0,8 ml reagenst (*N,N*-dimetil-*p*-feniléndiamin-szulfát), ami a szulfid koncentrációval arányos metilénkékes színreakciót ad. A reagens elkészítése a következőképp történt: 20 ml 50 V/V%-os sósavhoz hozzáadtunk 0,4 g fenilén-diamint, majd szobahőmérsékleten kevertettük, ezután desztillált vízzel 100 ml-re hígítottuk, közben 0,6 g FeCl₃ · 6 H₂O-t 100 ml 50 V/V%-os sósavban feloldottuk, végül az így kapott két oldatot 1:1 arányban összekevertük. A reagens hozzáadásával 20 perc várakozás után megkaptuk a lejátszódó színreakció eredményeként a metilénkék színű mintákat, amiket a 2.5. ábra szemléltet.



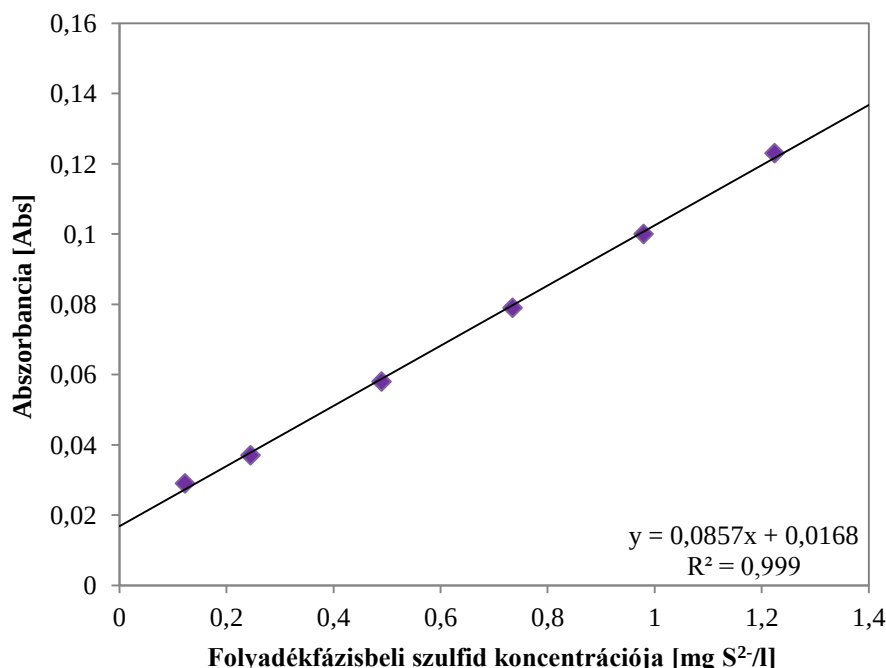
2.5. ábra: A hígítási sor metilénkék színű mintái

A minták fotometriás vizsgálatát 670 nm hullámhosszon végeztük el desztillált vízzel szemben. A hígítási sor adatait, a hozzájuk tartozó koncentráció és abszorbancia értékekkel a 2.2. táblázat tartalmazza (a mérési pontosság $\pm 1,17 \cdot 10^{-2} \text{ mg S}^{2-}/\text{l}$):

2.2. táblázat: A hígítási sorhoz bemért mennyiségek és a kapott eredmények

Minta	H ₂ S víz [ml]	Deszt. víz [ml]	Reagens [ml]	Koncentráció [mg S ²⁻ /l]	Abszorbancia [Abs]
1.	10	-	0,8	1,2240	0,123
2.	8	2	0,8	0,9792	0,100
3.	6	4	0,8	0,7344	0,079
4.	4	6	0,8	0,4896	0,058
5.	2	8	0,8	0,2448	0,037
6.	1	9	0,8	0,1224	0,029

Az így kapott abszorbancia értékeket ábrázolva a koncentráció függvényében a következő diagramot kaptuk eredményül (2.6. ábra):



2.6. ábra: Folyadékfázisbeli szulfid kalibrációs görbéje

2.5.4. Kalibráció felvétele: sejtszárazanyag tartalom

A mikroorganizmusok szaporodásának mennyiségi nyomon követéséhez az optikai denzitás (OD), vagyis optikai sűrűség mérést használtuk, melyhez szintén kalibrációs görbe felvétele volt szükséges. Így az összeállított berendezésben a mérés elvégzése során a folyadékfázisból vett mintákból nemcsak az aktuális oldott szulfid koncentráció, hanem az éppen jelenlévő sejttömeg is megadható.

A sejtszárazanyag tartalom méréséhez először szintén elkészítettük a megfelelő tápoldatot, majd sterilizáltuk. A tápközeg 400-400 ml-ét két Erlenmeyer-lombikba töltöttük, majd mindkettőhöz 100-100 ml baktérium szuszpenziót adtunk. Tehát a mikroorganizmusokat 1 liter tápoldatban növesztettük fel, így biztosítva a vizsgálat végére a tömegmérésekhez szükséges kellő sejtmennyiséget. Az inkubálást 33 °C-on és 137 rpm mellett végeztük. A kapott baktérium szuszpenzióból egy 5 pontos hígítási sort készítettünk, majd homogenizálás után 620 nm hullámhosszon mértük a minták abszorbanciáját desztillált vízzel szemben. Ezután a hígításokat, melyek összterfogata 300 ml volt, előzőleg analitikai mérlegen lemért centrifuga csövekbe töltöttük, majd 5 percig 5000-es fordulatszámra többször centrifugáltuk a baktériumsejtek szeparációja

érdekében. A felülúszó leöntése után a mintákat szárítószekrényes kezelésnek vetettük alá programozott felfűtés mellett: 34 °C-ról indulva, 15 órán keresztül 80 °C-on, utána 33 órán keresztül 105 °C-on végezve. A kapott tömegállandóságig szárított mintákat 15-20 percre exsikkátorba helyeztük, hogy ne vegyék fel a levegő nedvességtartalmát, végül a csövek lemérése után kiszámítottuk a sejtszárazanyag tartalmát.

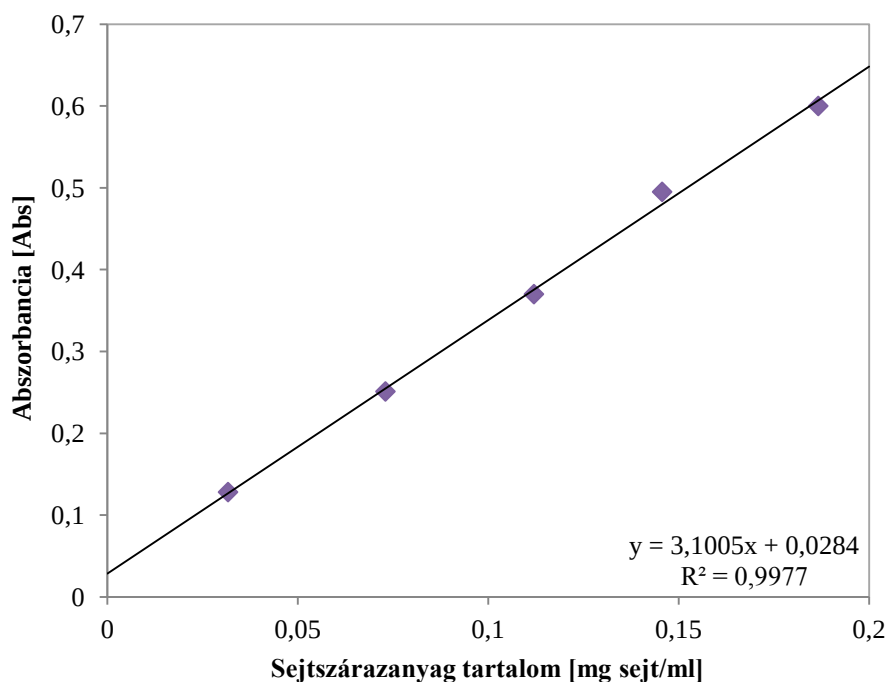
A kalibráció felvételének módszere mindkét baktériumnál megegyezett. A hígítási sor adatait, a hozzájuk tartozó értékekkel a 2.3.-2.6. táblázatok tartalmazzák (a mérési pontosság $\pm 3 \cdot 10^{-4}$ mg sejt/ml). Az abszorbanciát ábrázoltuk a sejtszárazanyag függvényében és az így kapott görbe a *Thiobacillus thioparus* esetében a 2.7. ábrán, míg a *Thiomonas intermedia* a 2.8. ábrán látható.

2.3. táblázat: A hígítási sor adatai a *Thiobacillus thioparus* esetében

Minta	Szuszp. [ml]	Deszt. víz [ml]	C.cső [g]	C.cső és sejt [g]	Sejtszáraz. [g]
1.	300	-	58,0591	58,1151	0,0560
2.	240	60	58,6058	58,6495	0,0437
3.	180	120	58,9865	59,0201	0,0336
4.	120	180	58,7619	58,7838	0,0219
5.	60	240	59,4252	59,4347	0,0095

2.4. táblázat: A diagramon ábrázolt értékek a *Thiobacillus thioparus* esetében

Minta	Sejtszárazanyag tartalom [mg sejt/ml]	Abszorbancia [Abs]
1.	0,1867	0,600
2.	0,1457	0,495
3.	0,1120	0,370
4.	0,0730	0,251
5.	0,0317	0,128



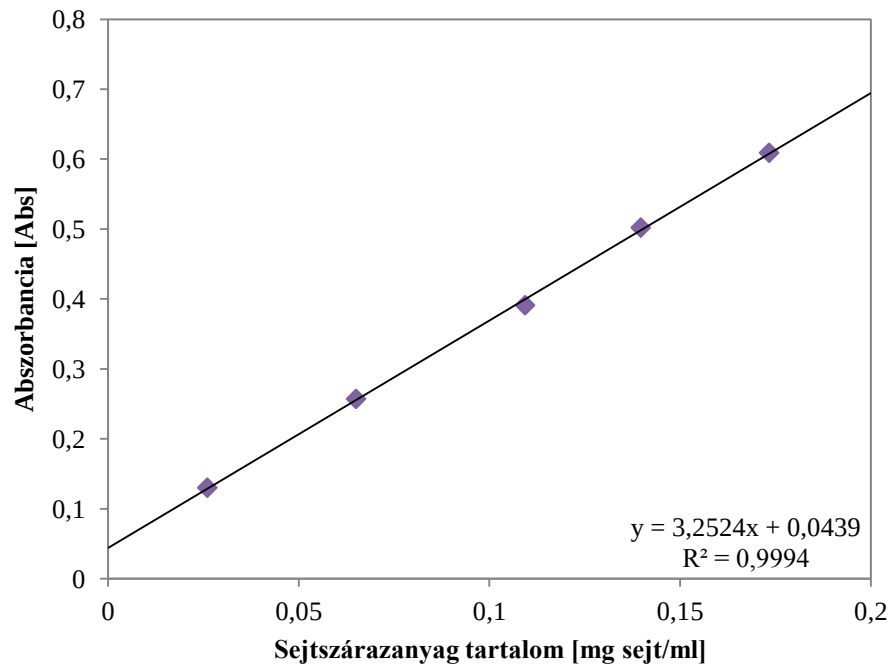
2.7. ábra: *Thiobacillus thioparus* sejtszárazanyag tartalom kalibrációs görbéje

2.5. táblázat: A hígítási sor adatai a *Thiomonas intermedia* esetében

Minta	Szuszp. [ml]	Deszt. víz [ml]	C.cső [g]	C.cső és sejt [g]	Sejtszáraz. [g]
1.	300	-	59,4252	59,4772	0,0520
2.	240	60	58,9866	59,0285	0,0419
3.	180	120	58,7620	58,7948	0,0328
4.	120	180	58,0591	58,0786	0,0195
5.	60	240	58,6055	58,6133	0,0078

2.6. táblázat: A diagramon ábrázolt értékek a *Thiomonas intermedia* esetében

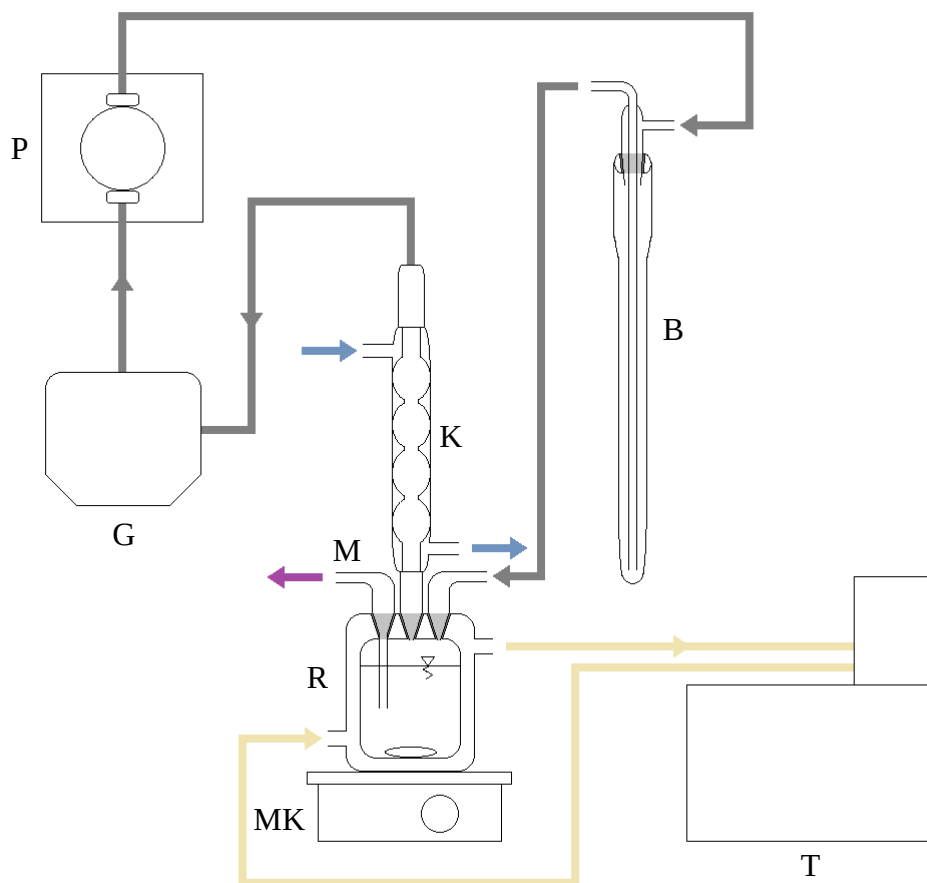
Minta	Sejtszárazanyag tartalom [mg sejt/ml]	Abszorbancia [Abs]
1.	0,1733	0,609
2.	0,1397	0,502
3.	0,1093	0,391
4.	0,0650	0,257
5.	0,0260	0,130



2.8. ábra: *Thiomonas intermedia* sejtszárazanyag tartalom kalibrációs görbéje

2.5.5. A szuszpendált szakaszos rendszerű kísérleti berendezés

Az összeállított szakaszos működésű kén-hidrogén eltávolítást megvalósító berendezés elvi sémája és főbb részei a 2.9. ábrán láthatók.



2.9. ábra: Szuszpendált szakaszos működésű kísérleti berendezés

MK – mágneses keverő, R – bioreaktor, M – mintavételi csomópont, K – kolonna,
G – gázdetektor, P – perisztaltikus pumpa, B – beoltási egység, T – termosztát

A termosztát a duplafalu reaktor köpenyében ellenáramú működtetéssel biztosította a mikroorganizmusok szaporodásához szükséges optimális mezofil hőmérsékletet. A baktérium szuszpenzió reaktorba való bejuttatását szolgálta a beoltási egység. A szuszpenzió kevertetését mágneses keverő látta el és a reaktoron egy mintavételi csomópont helyezkedett el a folyadékfázisbeli mérések elvégzéséhez. A kolonna a távozó gázfázisban lévő esetleges vízgőz kondenzációját oldotta meg, hogy a perisztaltikus pumpa a gáz áramoltatásával és cirkulálásával ne juttassa bele a vízgőzt az érzékeny gázdetektorba. A berendezés egyes elemeinek összekötését teflon csövekkel oldottuk meg, mivel az előkísérletek során bebizonyosodott, hogy a szilikon cső falán keresztül a H_2S

idővel átdiffundál, így ez meghamisíthatja a mérést. Emiatt került alkalmazásra a teflon cső, melynél a gázfázis H_2S csökkenése a reaktorból kilépő ágon mérve, ténylegesen a mikroorganizmusok lebontási folyamatainak eredménye. Az összeállított kísérleti berendezés fényképét a 2.10. ábra mutatja:



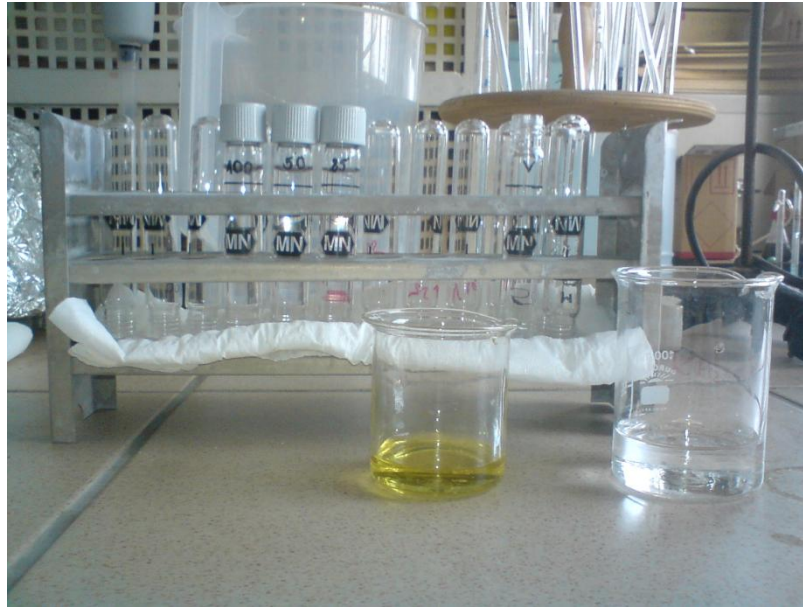
2.10. ábra: A kísérleti berendezés képe

3. Kísérleti eredmények

3.1. Vizsgálatok a szuszpendált szakaszos rendszerben

A kísérleti berendezés működtetése és a mérés menete a következőképpen zajlott. A termosztátot a mikroorganizmusoknak megfelelően 33 °C-ra állítottuk be. Az előzőekben leírtak szerint elvégeztük a H₂S fejlesztését és elnyeletését desztillált vízben. Eztán a kén-hidrogénes vízből 10 ml-t adtunk a 200 ml-es reaktorban lévő 170 ml tiosulfát-só komponens nélküli tápközeghez. A tiosulfátot, mint kénforrást a mérés során a H₂S helyettesített, továbbá ezt a komponenst az oldott szulfid meghatározásához szükséges fotometriás mérési módszerre gyakorolt zavaró hatása miatt sem használhattuk. A 20 ml inokulumot a reaktor mellett elhelyezett üvegcsőbe töltöttük, melyből adott időben, egy digitális időzítő segítségével és így a pumpa elindulásával a beinjektálás megtörtént. Ennek szerepe az volt, hogy így közvetlen felügyelet nélkül megindulhatott a mérés, tehát a gáz áramoltatásával egyidejűleg a baktériumok a reaktorba kerültek. Így mire a mintavételezések elkezdődtek, a baktériumok már növekedésük exponenciális fázisában voltak és elkezdtek a kén-hidrogén oxidálását. Mindezek előtt még megmértük az inokulum kezdeti optikai sűrűség értékét. Minden egyes mintavételezéskor mértük a minták oldott szulfid és optikai denzitás értékeit.

A folyadékfázis aktuális szulfid koncentrációjának meghatározását a következő hígításokban tettük: 100, 50 és 25-szörös. Három kémcsőbe rendre belepipettáztunk 9,9 ml, 9,8 ml és 9,6 ml desztillált vizet, majd ugyanebben a sorrendben fecskendő segítségével a reaktor mintavevő csonkján keresztül vett szuszpenzióból 100 µl, 200 µl és 400 µl-t, végül mindegyikhez 800 µl reagenst adtunk. A kapott minták a 3.1. ábrán láthatók. 20 perc várakozás után a mintákat 670 nm-en fotometráltuk, amit a 3.2. ábra szemléltet. Kompakt fotométerrel 620 nm-en megmértük a fennmaradó szuszpenzió abszorbanciáját, amiből az éppen jelenlévő sejttömeg mennyiségére lehetett következtetni. A baktériumok szaporodásának exponenciális szakaszában fél óránként, ezen kívül pedig óránként végeztük az analíziseket.



3.1. ábra: Folyadékfázisbeli minták és a sárga reagens



3.2. ábra: Oldott szulfid analízise fotometrián

A gázfázis elemzését a mérés végéig Dräger X-am 7000 multigáz detektorral tettük, mely a gázban lévő CO_2 koncentrációt %-ban és 1000 ppm alatt a H_2S mennyiségét percenként regisztrálta.

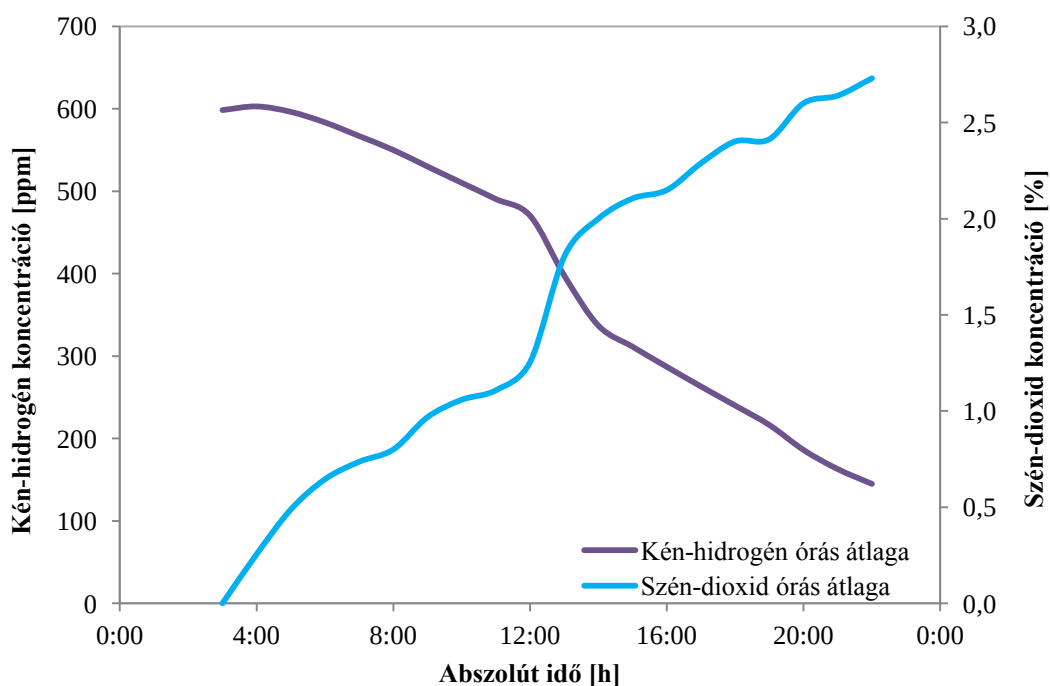
A szuszpendált szakaszos rendszer üzemeltetése mindkét baktérium esetében azonosan történt és szaporodási idejüknek megfelelően 38-40 órán keresztül zajlott. Ez a gáزدetektor szempontjából is megfelelő volt, mivel töltést követően 50 órán keresztül folyamatosan működtethető. A kísérlet végén a detektort

számítógépre csatlakoztattuk és a szükséges program segítségével a szenzorok által érzékelt adatokat lementettük, majd a kapott eredményeket kiértékeljük.

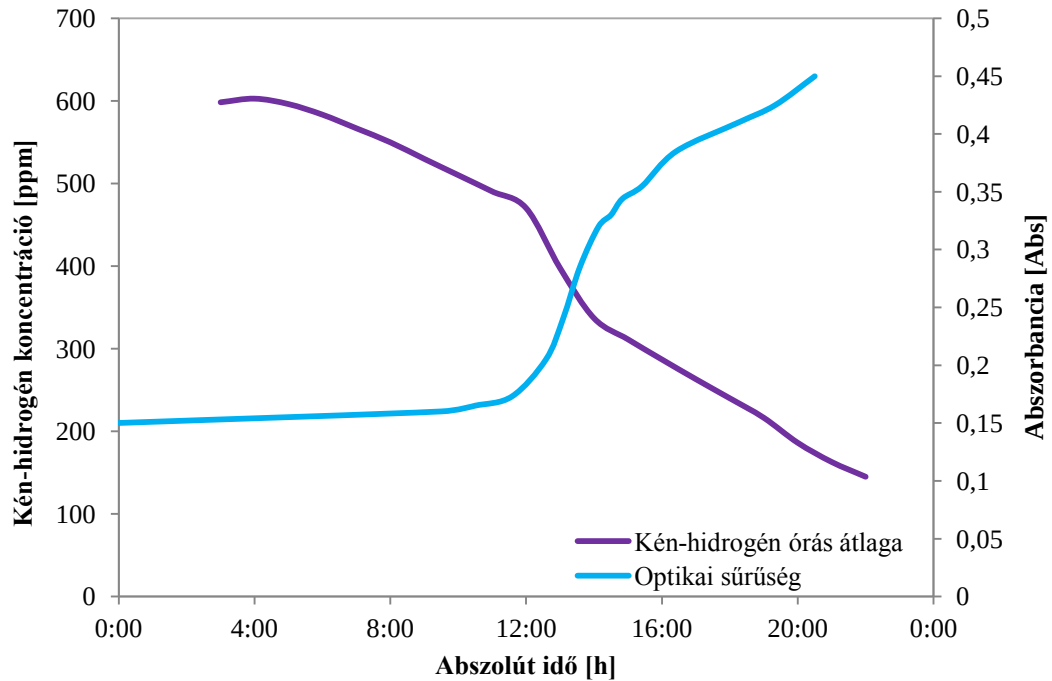
A mérés során, egyértelműen nyomon követhető volt a gázfázisban és a folyadékfázisban a szulfid koncentráció csökkenése, illetve a mikroorganizmusok szaporodása az egyre növekvő abszorbanca értékeknek megfelelően, amit aerob folyamataik révén termelt CO_2 koncentrációnövekedés is jelzett a gázfázisban.

3.2. *Thiobacillus thioparus* baktériummal végzett kísérlet

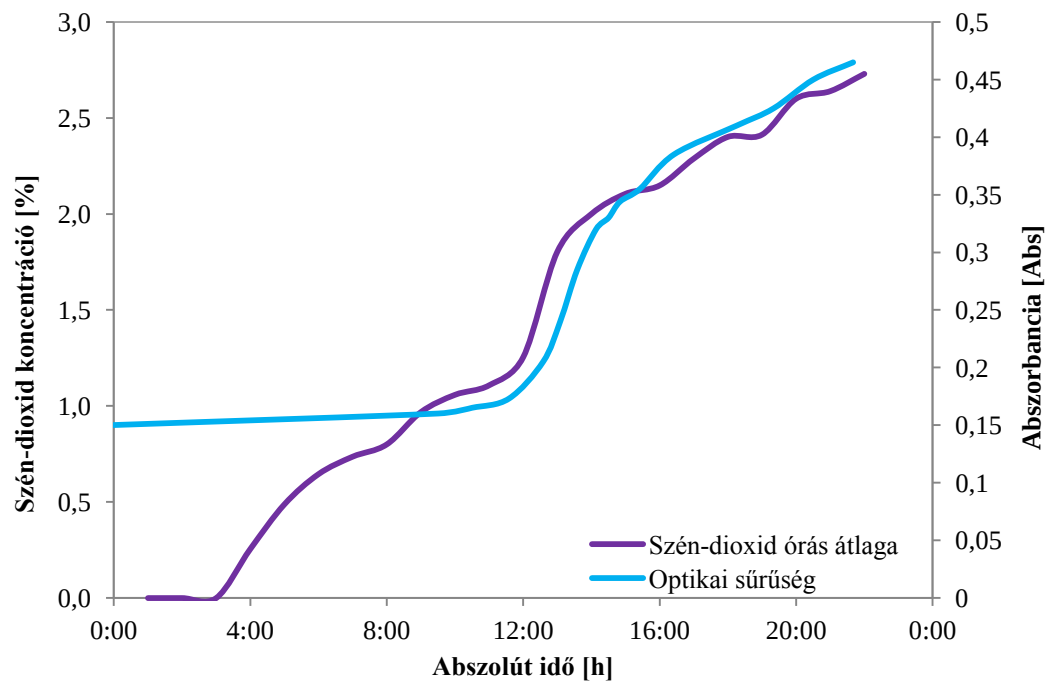
A mért értékekből kalibrációs diagram segítségével az alábbi görbékét vehettük fel a gáz- és folyadékfázisra mérési eredményként *Thiobacillus thioparus* baktérium esetében (3.3.-3.6. ábra):



3.3. ábra: Kén-hidrogén és szén-dioxid koncentráció változása az idő függvényében



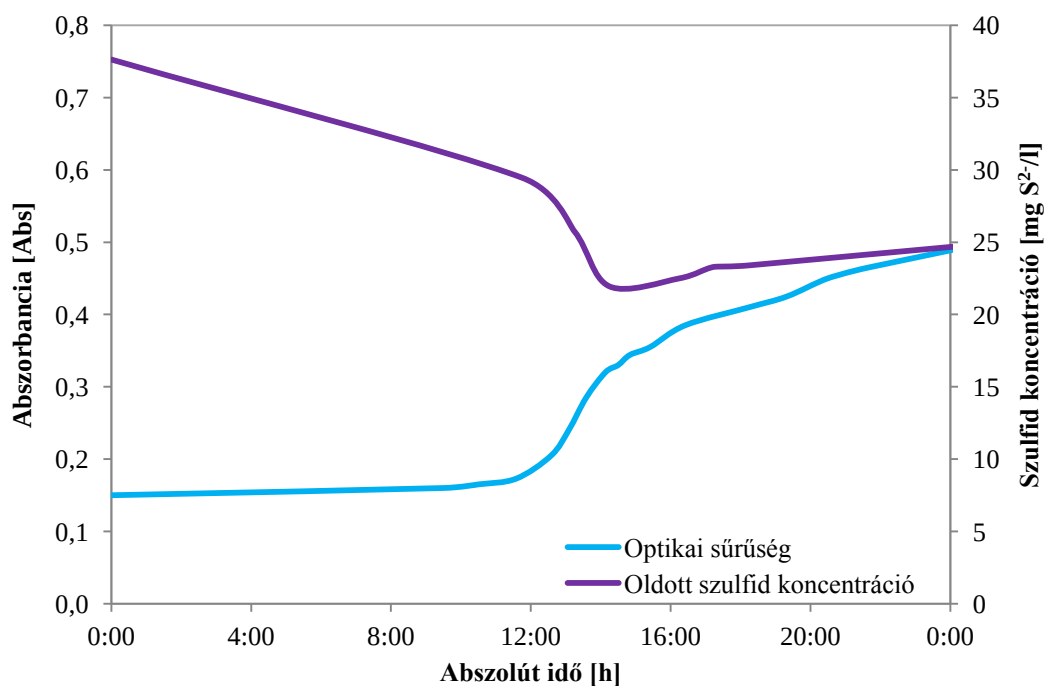
3.4. ábra: Optikai denzitás és kén-hidrogén koncentráció változása az idő függvényében



3.5. ábra: Optikai denzitás és szén-dioxid koncentráció változása az idő függvényében

A görbéken jól látható, hogy a mérés során a baktérium növekedési ütemének megfelelően a CO_2 koncentráció is nőtt, ezzel ellentétesen pedig a H_2S koncentráció az idő előrehaladtával csökkent. A két gáz görbéjének lefutása

ellentétessnek mondható, továbbá a görbék inflexiós pontjának egybeesése miatt is levonható a következtetés, hogy a H_2S mennyiségének csökkenése a mikroorganizmus lebontó folyamatainak a következménye. Az inflexiós ponthoz tartozó érték 14 óra körüli, vagyis ekkor van a baktérium szaporodásának exponenciális fázisa, ahogy azt az optikai denzitás görbe lefutása is szemlélteti.

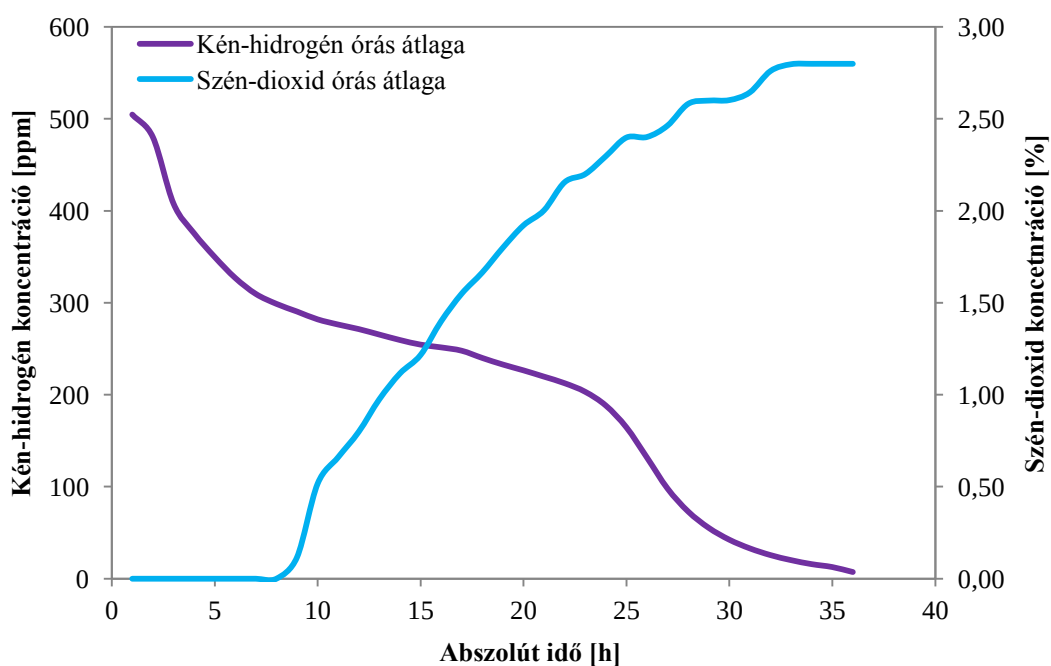


3.6. ábra: Optikai denzitás és az oldott szulfid koncentráció változása az idő függvényében

Ez a diagram is alátámasztja a baktérium H_2S lebontását. Az oldott szulfid koncentrációja a mérés vége felé növekedésnek indult, ami pont az ellenkezőjét sejteti az eddigi tapasztalatoknak. Ennek magyarázata a mikroba egyéb anyagcseretermékei lehetnek, melyek a folyadékfázisbeli színreakciós meghatározást zavarják.

3.3. *Thiomonas intermedia* baktériummal végzett kísérlet

A mért értékekből az alábbi diagramokat vehettük fel *Thiomonas intermedia* baktérium esetében (3.7.-3.10. ábra):

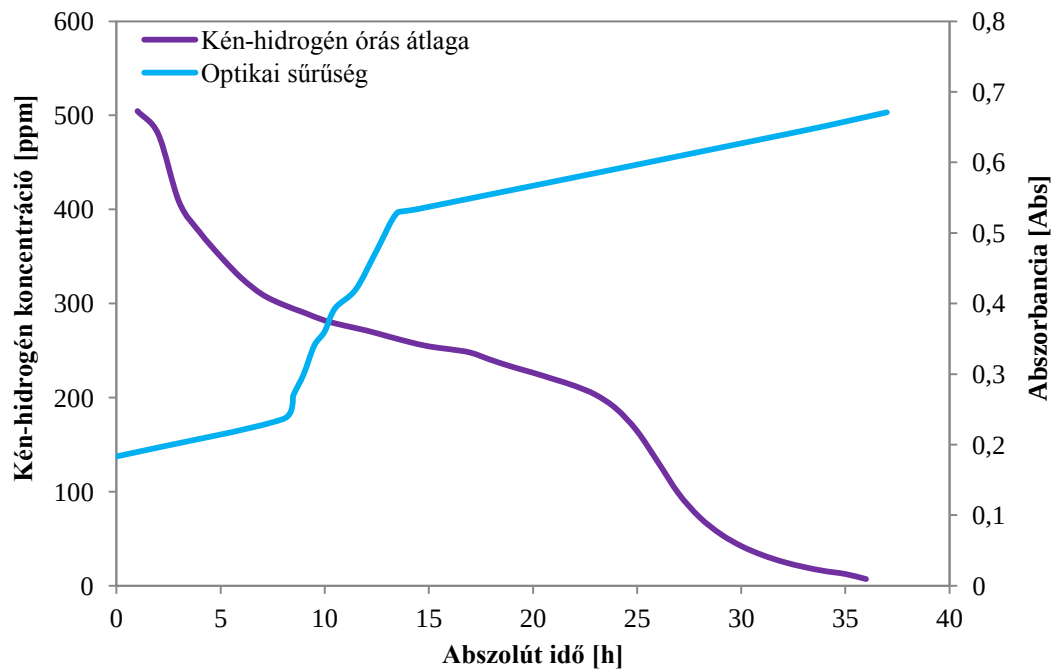


3.7. ábra: Kén-hidrogén és szén-dioxid koncentráció változása az idő függvényében

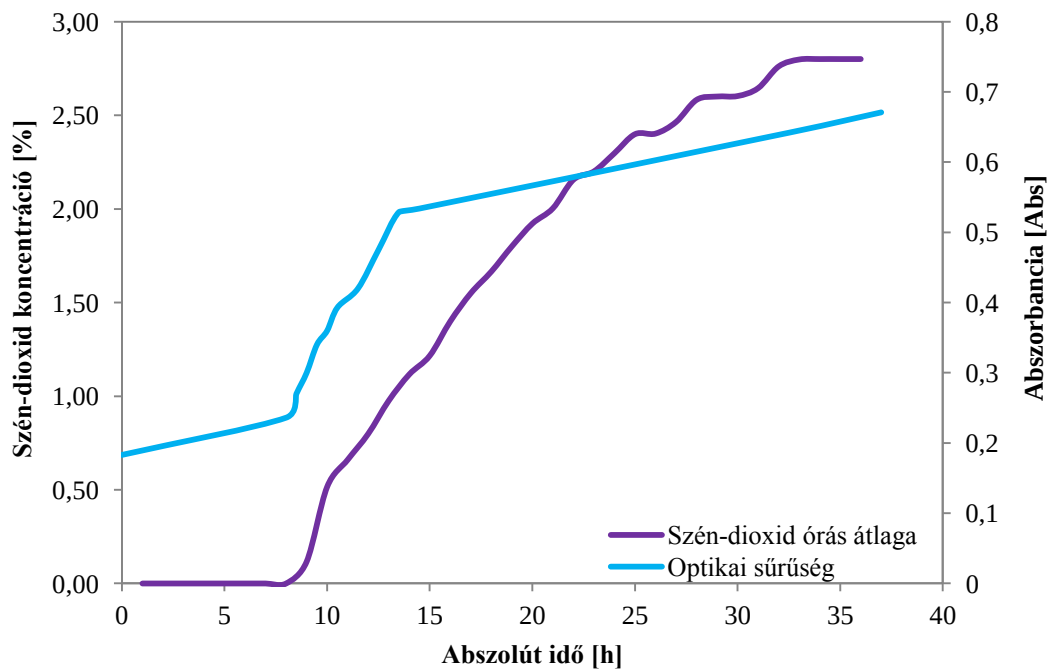
Ebben az esetben a görbék lefutása nem a várt trendet követi, az inflexiós pontok helyei nehezen meghatározhatók, aminek hátterében a H_2S oldódási egyensúlyi folyamatai állhatnak. A hőmérsékleten túl a pH is befolyásolja a H_2S oldhatóságát, ami a hosszú 40 órás mérés alatt változhatott, mert nem pufferelt közegben és pH ellenőrzése nélkül zajlott a kísérleti berendezés üzemeltetése. Továbbá a reaktorban a mikroorganizmusok miatt nem alkalmaztunk intenzív kevertetést, sem buborékolatást, mivel a mikrobák bár aerobok, de metabolizmusaikhoz elegendő kis mennyiségű oxigén is. Így, ahogy az a kén-hidrogén kezdeti koncentráció változásából is következik, a mikrobiológiai lebontás sebességét nem tudta követni a H_2S gázfázisból folyadékfázisba való oldódása, tehát ezen egyensúlyi folyamat lassabbnak bizonyult.

Azért összességében levonható a következtetés, hogy a gázfázisban mért H_2S koncentrációjának csökkenése a baktériumnak tudható, mivel ezzel egyidejűleg a CO_2 koncentrációja növekszik.

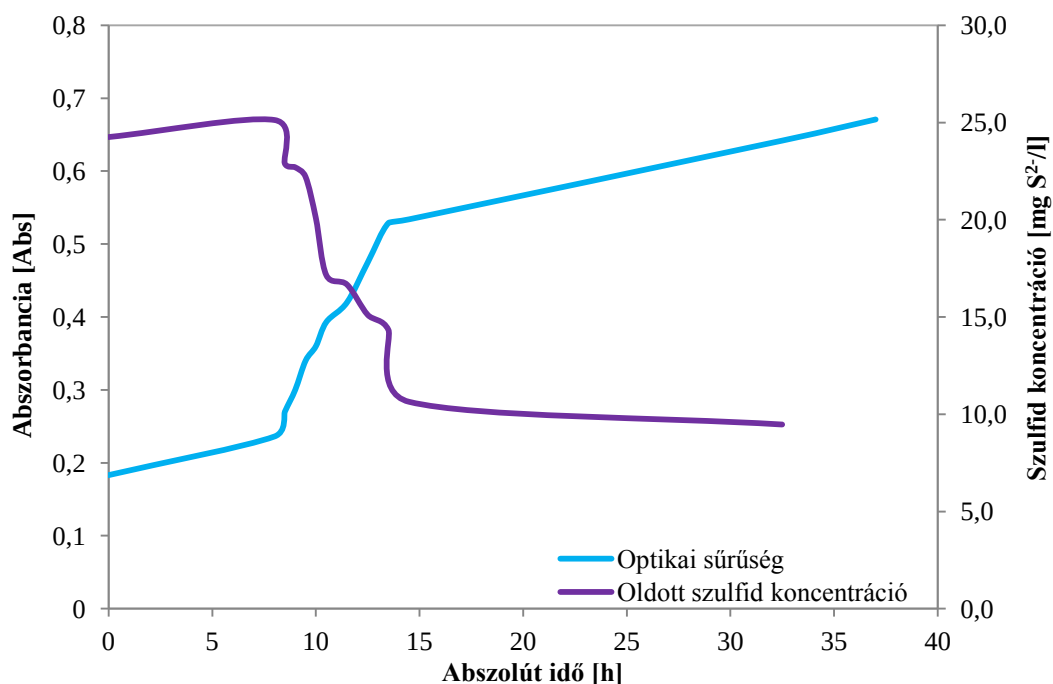
Kísérleti eredmények



3.8. ábra: Optikai denzitás és kén-hidrogén koncentráció változása az idő függvényében



3.9. ábra: Optikai denzitás és szén-dioxid koncentráció változása az idő függvényében



3.10. ábra: Optikai denzitás és az oldott szulfid koncentráció változása az idő függvényében

A görbéken látható, hogy a mikroorganizmus növekedési ütemének megfelelően a CO_2 koncentráció is nőtt, viszont a H_2S koncentráció csökkent. Az inflexiós ponthoz tartozó érték itt is 10-15 óra közötti a baktérium szaporodásának megfelelően, ahogy azt az optikai denzitás görbe is mutatja, mert a mért abszorbanca értékek 10 óra környékén kezdenek hirtelen növekedni, ami egybeesik a CO_2 koncentráció növekedésével. Tehát ebből is következik, hogy a H_2S koncentráció csökkenése a baktérium lebontási folyamatainak eredménye.

Az oldott szulfid koncentráció változása viszont nehezen követhető. Ez is bizonyítja, hogy feltehetően a baktérium metabolizmusai révén olyan anyagcsereterméket juttathat a rendszerbe, ami a fotometráláshoz szükséges színképződési reakciót zavarja és ezzel esetleges mérési hibához vezet. Erre megoldást jelenthet a folyadékfázis elhagyása és áttérés a rendszer egészében gázfázisra, mivel akkor ez a hiba kiküszöbölhető és a mérések is pontosabban, nagyobb biztonsággal elvégezhetők. Mégpedig a baktériumok megfelelő hordozóra immobilizálása után azok oszlopba tölthetők, és a tölteten átvezetett ellenőrzött gázáram mellett mérhető annak H_2S koncentráció csökkenése.

4. Összefoglalás

Manapság egyre inkább előtérbe kerülnek a természetes és biológiai megoldások, ahogy a termékek gyártása során, úgy az egyéb technológiákban is. Bár ezen a területen még mindig a fizikai-kémiai eljárások az elterjedtek, de irodalmi adatok is igazolják, hogy jó hatásfokkal az eliminálás biológiai úton, mikroorganizmusok felhasználásával is működhet. Viszont nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy ez esetben élő, reprodukív rendszerekről van szó, melyek érzékenyek lehetnek a gázáramban lévő egyes komponensekre és a kén-hidrogén maximális koncentrációra, viszont pont emiatt az eljárás enyhe körülményeket igényel.

A munkában – vagyis a kísérletek első fázisában –, a szuszpendált kísérleti berendezés összeállításával sikerült szakaszos üzemben, laboratóriumi méretek mellett, mikroorganizmusok segítségével megvalósítani a kén-hidrogén mentesítést. A folyamatot folyadékfázisban lévő *Thiobacillus thioparus* és *Thiomonas intermedia* szulfid oxidáló baktériumokkal valósítottuk meg a reaktorban lévő adott kén-hidrogén koncentrációjú folyadékból, ezzel egyúttal a gázáramból is. A mérés elvégzését és a berendezés összeállítását több vizsgálat előzte meg a minél pontosabb analízis és reprezentatív eredmények érdekében. Ezután elkészítettük a baktériumok felneveléséhez szükséges és ideális környezetet biztosító táptalajt, majd felvettük a szulfid és optikai denzitás kalibrációkat. Végül megterveztük és kivitelezettük a mérés során alkalmazott kísérleti berendezést. A vizsgálat végeztével elmondható, hogy a kapott eredmény mutatja a mikroorganizmusok alkalmazásának lehetőségét, például biogáz áramokból való kén-hidrogén eltávolításához.

A további célkitűzésekben, tehát a kutatás második fázisában szerepel a gázfázisra való áttérés, mivel a folyadékfázisbeli mérésekből levonható egyértelmű következtetést az oldatba kerülő egyéb melléktermékek zavarják és így a rendszer folyamatos működésüvé is tehető. Ehhez a baktériumok rögzítését kell megvalósítani, majd pontosan kimérhető kén-hidrogén gázáram mellett az adaptálásukat elvégezni. Végző soron pedig az ipari méretek szempontjából is kecsegtető membrán bioreaktor tervezését és kivitelezését valósítanánk meg.

Irodalomjegyzék

- [1] Martín Ramírez, José Manuel Gómez, Germán Aroca, Domingo Cantero, *Removal of hydrogen sulfide by immobilized Thiobacillus thioparus in a biotrickling filter packed with polyurethane foam*, Bioresource Technology 100 (2009) 4989–4995.
- [2] N. Tippayawong, P. Thanompongchart, *Biogas quality upgrade by simultaneous removal of CO₂ and H₂S in a packed column reactor*, Energy 35 (2010) 4531-4535.
- [3] B. T. Nijaguna, *Biogas Technology*, New Age International, (2006)
- [4] N. Abdehagh, M. Taghinejad Namini, S. M. Heydarian, B. Bonakdarpour, D. Zare, *Performance of a biotrickling filter employing Thiobacillus thioparus immobilized on polyurethane foam for hydrogen sulfide removal*, Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., (2011) 245-254.
- [5] Dieter Deublein, Angelika Steinhauser, *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*, John Wiley & Sons, (2011)
- [6] S. Potivichayanon, P. Pokethitiyook, M. Kruatrachue, *Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system*, Process Biochemistry 41 (2006) 708–715.
- [7] M. Syed, G. Soreanu, P. Falletta and M. Béland, *Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review*, Canadian biosystems engineering volume 48 (2006) 2.1-2.14.
- [8] Wei-Chih Lin, Yu-Pei Chen, Ching-Ping Tseng, *Pilot-scale chemical–biological system for efficient H₂S removal from biogas*, Bioresource Technology 135 (2013) 283–291.
- [9] Huiqi Duan, Rong Yan, Lawrence Choon Chiaw Koe, Xiaoling Wang, *Combined effect of adsorption and biodegradation of biological activated carbon on H₂S biotrickling filtration*, Chemosphere 66 (2007) 1684–1691.

- [10] Sevélla Béla, *Biomérnöki műveletek és folyamatok*, Egyetemi tananyag, 2. javított kiadás, Typotex Kiadó (2011) 168.-178., 387.-388.
- [11] Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Martin Dworkin, Erko Stackebrandt, *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Springer (2006) 821.
- [12] Szabó István Mihály, *A bioszféra mikrobiológiája III.*, Akadémiai Kiadó, Budapest (1989) 1635., 1748.-1749.
- [13] W. Matthew Sattley and Michael T. Madigan, *Isolation, Characterization, and Ecology of Cold-Active, Chemolithotrophic, Sulfur-Oxidizing Bacteria from Perennially Ice-Covered Lake Fryxell, Antarctica*, Applied and environmental microbiology Vol. 72 (2006) 5562–5568.
- [14] X.-G. Chen, A.-L. Geng, R. Yan, W.D. Gould, Y.-L. Ng and D.T. Liang, *Isolation and characterization of sulphur-oxidizing Thiomonas sp. and its potential application in biological deodorization*, Letters in Applied Microbiology 39 (2004) 495–503.
- [15] <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/1094#biography> (2014.04.03.)
- [16] <http://hamap.expasy.org/proteomes/THIK1.html> (2014.04.03.)
- [17] Joel D. Cline, *Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters*, Department of Oceanography, University of Washington, Seattle 98105. Vol. 14. (1968) 454-458.
- [18] http://www.draeger.com/sites/en_uk/Pages/Industry/Welcome.aspx (2013.08.15.)
- [19] <http://www.dsmz.de/> (2013.11.03.)
- [20] <http://www.hach-lange.hu/view/content> (2013.10.26.)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik lehetővé tették, hogy ez a TDK dolgozat elkészüljön és segítségemre voltak az olykor nehéznek tűnő munkám során.

Ezért hálával tartozom témavezetőmnek Dr. Nemestóthy Nándornak, Bélafiné Dr. Bakó Katalinnak, Lövitusz Évának és Tóth Gábornak, akik segítségére, tanácsaira és támogatására mindig számíthattam. Köszönet illeti a Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutatóintézet minden munkatársát, akikhez szintén bármikor fordulhattam kérdéseimmel.

Nem utolsó sorban pedig szüleimnek és nagyszüleimnek is hálával tartozom, amiért mindvégig támogattak, mellettem álltak és bíztattak. Továbbá barátaimnak és ismerőseimnek is köszönöm, hogy tőlük is szintén sok hasznos tanácsot és segítséget kaptam.