

SZÉNALAPÚ NANOANYAGOK HATÁSA AZ AEROB GRANULÁRIS
ISZAPOS SZENNYVÍZTISZTÍTÁSI TECHNOLÓGIÁRA

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

KEDVES ALFONZ

TÉMAVEZETŐ:

PROF. DR. KÓNYA ZOLTÁN

KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ALKALMAZOTT ÉS KÖRNYEZETI KÉMIAI TANSZÉK

SZEGED

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezető, a kutatás jelentősége.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. Szénalapú nanoanyagok.....	9
2.1.1. Grafén és grafén-oxid nanorészecskék hatása a mikrobiális közösségre.....	9
2.1.2. Egyfalú- és többfalú szén nanocsövek hatása a mikrobiális közösségre.....	10
2.1.3. Szénalapú nanoanyagok hatásmechanizmusainak összehasonlítása.....	11
2.2. Aerob granuláris iszapos szennyvíztisztítási technológia.....	11
2.2.1. Granulumok kialakulása.....	13
2.2.2. Extracelluláris polimer anyagok.....	14
2.2.3. Az AGS szerves anyag, nitrogén és foszfor eltávolítása.....	14
2.2.4. Az AGS szennyezőanyag eltávolító képessége.....	15
2.2.5. AGS szennyvíztisztítási technológia félüzemi és üzemi alkalmazása.....	17
2.3. Nanorészecskék biológiai szennyvíztisztításra kifejtett hatása.....	19
3. A kutatás célkitűzései.....	23
4. Anyag és módszertan.....	25
4.1. Szén-alapú nanoanyagok előállítása és jellemzése.....	25
4.1.1. GO nanorészecskék előállítása.....	25
4.1.2. MWCNT előállítása.....	25
4.1.3. Szén-alapú nanoanyagok jellemzése.....	25
4.2. A bioreaktorok felépítése és működtetése.....	26
4.3. Analitikai módszerek.....	27
4.4. Granuláris iszap mikrobiális aktivitása.....	29
4.5. DNS kinyerése, polimeráz láncreakció (PCR), denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) és 16S rRNS gén szekvenálás.....	30
4.6. Újgenerációs, 16S riboszómális RNS metagenomikai szekvenálás.....	32
4.7. Statisztikai elemzések.....	32
5. Eredmények és kiértékelésük.....	34
5.1. A grafén-oxid nanorészecskék hatása az aerob granuláris iszapos, szakaszos üzemi szennyvíztisztító rendszerben.....	34
5.1.1. GO nanorészecskék jellemzése.....	34
5.1.2. Granulumok képződése.....	35
5.1.3. GO részecskék hatása a bioreaktorok működésére.....	37

5.1.4. GO részecskék hatása az EPS mennyiségére	43
5.1.5. Mikrobiális közösség elemzése.....	46
5.2. Lépcsőzetes GO nanorészecske koncentráció növelésének hatása az AGS bioreaktor működésére	51
5.2.1. GO részecskék tápanyag eltávolításra gyakorolt hatása.....	51
5.2.2. GO nanorészecskék hatása a granuláris iszap mikrobiális aktivitására.....	55
5.2.3. GO nanorészecskék hatása az AGS EPS mennyiségére	58
5.3. Szén-alapú nanorészecskék toxicitás vizsgálata az aerob granuláris iszapos bioreaktorokban.....	61
5.3.1. Szénalapú nanoanyagok jellemzése.....	61
5.3.2. A granuláris iszapban végbemenő változások.....	63
5.3.3. Szén-alapú nanoanyagok az aerob granuláris iszapos bioreaktorokra gyakorolt hatása	64
5.3.4. Szén-alapú nanoanyagok hatása az EPS mennyiségére.....	69
5.3.5. A nanoanyagok hatása a mikrobiális közösségre.....	71
6. Összefoglalás.....	80
7. Summary	84
Köszönetnyilvánítás	88
Hivatkozások.....	89
Mellékletek.....	101

Rövidítések jegyzéke

CBN (carbon based nanomaterial) – szénalapú nanoanyag

GO NP (graphene-oxide nanoparticle) – grafén-oxid nanorészecske

G NP (graphene nanoparticle) – grafén nanorészecske

SWCNT (single-walled carbon nanotube) – egyfalú szén nanocső

MWCNT (multi-walled carbon nanotube) – többfalú szén nanocső

fMWCNT (functionalized multi-walled carbon nanotube) – funkcionizált többfalú szén nanocső

ZnO NP (zinc oxide nanoparticle) – cink-oxid nanorészecske

CuO NP (copper oxide nanoparticle) – réz-oxid nanorészecske

Ag NP (silver nanoparticle) – ezüst nanorészecske

CeO₂ NP (cerium oxide nanoparticle) – cérium-oxid nanorészecske

CAS (conventional activated sludge) – hagyományos eleveniszap

AGS (aerobic granular sludge) – aerob granuláris iszap

SBR (sequencing batch bioreactor) – szakaszos üzemű bioreaktor

EPS (extracellular polymeric substance) – extracelluláris polimer anyag

PS (polysaccharide) – poliszacharid

PN (protein) – fehérje

SVI (sludge volume index) – iszap térfogati index

MLSS (mixed liquor suspended solid) – kevert szennyvíz szuszpendált lebegőanyaga

MLVSS (mixed liquor volatile suspended solid) – kevert szennyvíz illékony szuszpendált lebegőanyaga

HRT (hydraulic retention time) – hidraulikus tartózkodási idő

SWW (synthetic wastewater) – szintetikus szennyvíz

KOI (chemical oxygen demand) – kémiai oxigén igény

BOI (biological oxygen demand) – biológiai oxigén igény

TP (total phosphorus) – össz-foszfor

PAO (polyphosphate-accumulating organism) – polifoszfát akkumuláló mikroorganizmus

CCVD (catalytic chemical vapor deposition) – katalitikus kémiai gőzleválasztás

TEM (transmission electron microscope) – transzmissziós elektronmikroszkóp

SEM (scanning electron microscope) – pásztázó elektron mikroszkóp

XRD (X-ray diffractometer) – röntgen diffraktométer

SOUR (specific oxygen uptake rate) – specifikus oxigén felhasználási mérték

SAOR (specific ammonia oxidation rate) – specifikus ammónia oxidációs mérték

SNOR (specific nitrite oxidation rate) – specifikus nitrit oxidációs mérték

SNIRR (specific nitrite reduction rate) – specifikus nitrit redukciós mérték

SNRR (specific nitrate reduction rate) – specifikus nitrát redukciós mérték

SPUR (specific phosphorus uptake rate) – specifikus foszfor felvétel mérték

SPRR (specific phosphorus release rate) – a specifikus foszfor leadási mérték

qPCR (quantitative polymerase chain reaction) – kvantitatív polimeráz lánreakció

DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) – denaturáló gradiens gélelektroforézis

NCBI (National Center for Biotechnology Information) – Biotechnológiai Információs Központ

UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) – súlyozás nélküli pár csoport módszer számtani átlag

RDA (redundancy analysis) – redundancia elemzés

PCA (principal component analysis) – főkomponens analízis

ANOVA (analysis of variance) – egytényezős varianciaanalízis

1. Bevezető, a kutatás jelentősége

A szénelapú nanoanyagok, mint például a szén nanocsövek és grafén változatok napjaink egyik legszélesebb körben kutatott nanoszerkezetei. A szénelapú nanoanyagok (Carbon-based nanomaterials–CBNs) globális piaca várhatóan 2023-ra akár 1300 millió dollárra is növekedhet. Előállított mennyiségük folyamatosan növekszik, ezáltal elkerülhetetlenül kijutnak a környezetbe, ún. nano-szennyező anyagokká válva. Már több tanulmány is foglalkozott toxikus hatásuk vizsgálatával, amely során sejtenyészetek esetében antimikrobiális hatást figyeltek meg. Továbbá, a CBN-ek potenciális hatását összetettebb biológiai rendszerekben is tanulmányozták. Többek között megfigyelték, hogy a grafén-oxid nanorészecskék (Graphene-oxide nanoparticles–GO NPs) toxikus hatást fejtettek ki a vizsgált zöldalgákra, valamint a talaj mikrobiális összetételét jelentősen megváltoztatták, ezáltal befolyásolva tápanyag körforgását. Ezzel szemben, a grafén nanorészecskék (Graphene nanoparticles–G NPs) tekintetében nem figyeltek meg jelentős negatív hatást a talaj mikroflórájára. Az egyfalú szén nanocsövek (Single-walled carbon nanotubes–SWCNTs) és többfalú szén nanocsövek (Multi-walled carbon nanotubes–MWCNTs) hasonló hatást fejtettek ki, mint a GO részecskék, csökkentették a talaj biomassza mennyiségét és a mikrobiális aktivitást.

A grafén, grafén-oxid, egy- és többfalú szén nanocsövek széleskörű alkalmazásaik következtében bekerülnek a szennyvízbe, így eljutnak a szennyvíztisztító telepekre, ahol potenciális veszélyt jelenthetnek a biológiai szennyvíztisztítás folyamatára. A hagyományos eleveniszapos (Conventional activated sludge–CAS) szennyvíztisztítás a leggyakrabban alkalmazott technológia a szennyvizek biológiai kezelésére, amely során az alkalmazott specifikus mikrobiális közösség lebontja a szerves anyagokat és eltávolítja az egyéb szerves anyagok (nitrogén és foszfor) egy részét is. Az alkalmazott mikroorganizmusok érzékenyek a környezeti változásokra, ezért gyakran szükséges egyéb kémiai adalékanyagok alkalmazása, hogy a megtisztított szennyvíz minősége megfeleljen a 91/271/EGK európai irányelvnek. Az irányelv szerint az elfolyó szennyvíz kémiai oxigén igénye nem haladhatja meg az 125 mg/L értéket. Ammónia esetén az érték nem haladhatja meg az 5 mg/L-et, nitrit és nitrát esetén ez 1,5 mg/L és 15 mg/L, míg foszfor esetén az 1 mg/L mennyiséget. Azon tanulmányokban, amelyekben a grafén, grafén-oxid, egy- és többfalú szén nanocsövek CAS szennyvíztisztítási technológiára gyakorolt hatását vizsgálták, kimutatták, hogy a tisztítási hatások nagymértékben csökkent,

valamint a biológiai folyamatokban résztvevő mikroorganizmusokra a részecskék negatív hatást fejtettek ki.

Az aerob granuláris iszapos (Aerobic granular sludge–AGS) eljárás egy viszonylag új és ígéretes technológia a szennyvíztisztításban, mivel a granuláris iszap alkalmazásának a hagyományos eleveniszappal szemben több előnye is van. Ilyenek például a nagyfokú ellenállóképesség a toxikus anyagokkal szemben, a kiváló ülepedési képesség, a gazdag mikrobiális összetétel, emellett a szerves- és szervesetlen anyagok eltávolítása térben és időben egyszerre történik, továbbá ipari szennyvizek tisztítására is alkalmas. A granulum képződése során számos mikroorganizmus extracelluláris polimer anyagokból álló mátrixot (Extracellular polymeric substance–EPS) termel, amely főként poliszacharidokból (Polysaccharide–PS) és fehérjékből (Protein–PN) áll. Ebbe az EPS mátrixba mind az aerob és anaerob mikroorganizmusok képesek beágyazódni, továbbá különböző tápanyagok megkötésére is képes. Ezáltal a magas EPS tartalom miatt az AGS ellenállóbb a környezeti változásokkal szemben, mint a CAS. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően ez a rendszer alkalmas lehet különböző ipari xenobiotikum tartalmú -mint például fenol, anilin, festék-, és gyógyszeripari szennyvizek tisztítására is. Az irodalomban két tanulmány foglalkozott eddig a GO NP rövid távú (batch test), akut hatásával. Ezen publikációkban is csak a nitrogén és foszfor eltávolítási hatásfokát követték nyomon 4-5 órán át, 60 mg/L GO NP koncentráció esetében. A szénalapú nanoanyagok AGS technológiára gyakorolt hosszú távú hatását még nem vizsgálták. Így potenciális hatásuk az AGS bioreaktor működésére, EPS termelésére és a mikrobiális közösségre még nem ismert. A G NP, SWCNT és MWCNT hatását még nem vizsgálták az AGS esetében, viszont CAS-ra gyakorolt hatásukkal már több tanulmány is foglalkozott.

Figyelembe véve, hogy a CBN előállításának mennyisége a számos alkalmazási lehetőség miatt a jövőben valószínűleg növekedni fog, továbbá kevés információ áll rendelkezésünkre a hagyományos szennyvíztisztításra gyakorolt hosszú távú hatásokról (főként zárt rendszerű ún. „batch test” kísérletek eredményeiről van tudomásunk), míg granuláris iszap kapcsán kizárólag batch test kísérletek eredményeiről találhatunk adatokat, ennél fogva szükségessé vált a részecskék granuláris iszagra gyakorolt hatásának vizsgálata szakaszosan működő bioreaktorban (Sequencing batch bioreactor–SBR).

Ennél fogva kutatásunknak két fő célja volt. Először egy bioreaktor tervezése, megépítése és a granuláris iszap előállítás, valamint az AGS bioreaktor stabil működtetése, amellyel az irodalom alapján és jelen tudomásunk szerint Magyarországon még nem kísérleteztek. A kutatás második célja pedig a különböző szénalapú nanoanyagok hatásának vizsgálata eltérő koncentrációkban az AGS bioreaktorban, figyelemmel követve a szerves anyag, nitrogén és foszfor eltávolítás hatékonysági fokát, az EPS mennyiségét és a mikrobiális közösségre gyakorolt hatásokat.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Szénalapú nanoanyagok

Napjainkban a szénalapú nanoanyagokat széles körben alkalmazzák, köszönhetően egyedülálló tulajdonságaiknak. A legelterjedtebb és leggyakrabban alkalmazott CBN-ok a fullerének, grafén nanorészecskék, grafén-oxid nanorészecskék és a szén nanocsövek [1]. Ezen anyagok előállított mennyisége növekvő tendenciát mutat, csak a G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT előállított mennyisége 5000 tonna körüli volt 2011-ben, amely körülbelül tízszer annyi, mint az azt megelőző 10 évben összesen [2,3]. Kiváló elektromos vezetőképességüknek köszönhetően gyakran alkalmazzák réz, ezüst és szilícium helyettesítésére az elektromos eszközökben, újabban pedig az orvostudományban is felhasználják hatóanyag hordozóként [4–6]. Továbbá ezen nanoanyagok funkcionálizálása, vagyis a felületükön különböző oxigéntartalmú funkciós csoportok (karboxil, karbonil és hirdoxil) kialakítása további ipari alkalmazások lehetőségét teremti meg. Elterjedt alkalmazásuk számos előnyt teremt az emberek és a társadalom számára, ugyanakkor számolnunk kell lehetséges negatív hatásukkal is, mivel a környezetbe kijutva káros hatást is kiválthatnak. Korábban kimutatták, hogy a CBN-ok nem csak egyes növények, mint a spenót, paradicsom és káposzta növekedését gátolják, hanem az állatok embrionális fejlődésére is negatív hatással lehetnek, mint ahogyan azt bebizonyították csirkék, zebrahalak és egerek esetében is [7,8].

A mikroorganizmusok rendkívül fontos és összetett szerepet töltenek be a környezetben, pl. az ökológiai egyensúly fenntartásában. Több területen is alkalmazzák a mikróbákat, mint például a szennyezett környezet helyreállításában (talaj remediáció) vagy szennyeződések eltávolítására (szennyvíztisztítás), mivel gazdasági és ökológiai szempontból is hatékonyabbak szemben a legtöbb fizikai és kémiai módszerrel [9,10]. A fentiek tekintetében, a szénalapú nanoanyagok mikrobiális közösségekre gyakorolt hatásainak tanulmányozása kiemelkedő jelentőséggel bír.

2.1.1. Grafén és grafén-oxid nanorészecskék hatása a mikrobiális közösségre

Több tanulmány is foglalkozott a G NP és GO NP talajban kifejtett potenciális hatásaival. Ren és mtsai. a G NP talaj mikrobiális közösségére gyakorolt hatását kvantitatív polimeráz láncreakció (Quantitative polymerase chain reaction–qPCR) segítségével elemezte. Kutatásai során kimutatták, hogy a G NP szignifikánsan befolyásolta a talajban lévő mikroorganizmusok számát és a közösség összetételét. Kis mennyiségben (<100 mg/kg) alkalmazva megnövekedett

enzimaktivitást és biomasza mennyiséget tapasztaltak, míg nagyobb mennyiségben (1000 mg/kg) adagolva főként a nitrifikációt végző mikroorganizmusokra fejtett ki negatív hatást [11]. Hao és mtsai. a biomasza mennyiségének csökkenését tapasztalták GO NP adagolást követően, viszont itt már alacsonyabb koncentrációnál (50 mg/kg) is csökkent a talajban kimutatható mikroorganizmusok száma [12]. Begum és mtsai. a GO NP adagolást követően megfigyelték, hogy gátolja a vizsgált növények növekedését (káposzta, paradicsom, saláta és spenót), valamint csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát [13]. A GO részecskék a sejtekre főként az oxidatív stressz által fejtik ki toxikus hatásukat. A GO NP károsítja a sejtfalat, lipideket és fehérjéket, a sejtekben felborítja az oxidációs-redukciós egyensúlyt, amely az enzimek rendellenes szekréciójához vezethet, a sejtek anyagcseréje felborul, sejtkárosodást eredményezve [1].

2.1.2. Egyfalú- és többfalú szén nanocsövek hatása a mikrobiális közösségre

A SWCNT és MWCNT a talajba jutva képes megváltoztatni a talaj mikrobiális összetételét és a mikrobiális biomasza mennyiségét. Jin és mtsai. a SWCNT (30-1000 mg/kg) hatását vizsgálták a talaj felső rétegeiben (0-15 cm), és arra a következtetésre jutottak, hogy a szén nanocsövek koncentrációjának növelésével a mikroorganizmusok száma csökkent. Továbbá azt is megállapították, hogy a Gram-pozitív baktériumok jobban alkalmazkodnak az SWCNT-hez, számuk nem csökkent akkorát, mint a Gram-negatívoké [14]. Zhou és mtsai. is a Gram-negatív baktériumok számának csökkenését tapasztalták, amikor SWCNT-t adagoltak a talajhoz [15]. Ge és mtsai. MWCNT-t adagoltak 1000 mg/kg mennyiségben a talajhoz és egy év után azt tapasztalták, hogy a biomasza mennyisége jelentős mértékben, 35%-al csökkent. A mikrobiális összetételt vizsgálva pedig azt figyelték meg, hogy a MWCNT csak a baktérium közösségre volt negatív hatással, a gombák összetételében és mennyiségében nem tapasztaltak változást [16]. Ge és mtsai. a MWCNT 100 és 1000 mg/kg koncentrációban történő adagolásának hatását vizsgálták mezőgazdasági termőtalajon 39 napon át. Kísérleteik során kimutatták, hogy a nanocsövek közvetett módon a növények növekedését is gátolják, azáltal, hogy a talaj biomaszája és összetétele is megváltozott az adagolás hatására [17]. Ezen eredményekkel szemben, amikor Shrestha és mtsai. a MWCNT-t 10 és 100 mg/kg mennyiségben adagolták a talajhoz, még 90 nap elteltével sem mutattak ki változást a talajlégzésben és a mikrobiális közösségben [18]. Ezen különbség több okból kifolyólag is adódhat, mint például a talaj eltérő mikrobiális közössége, vagy éppen a nanoanyagok eltérő tulajdonságai, melyek a különböző előállítási módszerekből és funkcionálásból eredhetnek. Kerfahi és mtsai. karboxil csoporttal funkcionizált MWCNT

(functionalized MWCNT–fMWCNT) és nem funkcionizált nanocsöveket vizsgáltak a talajban 50, 500 és 5000 mg/kg koncentrációkat alkalmazva, amely során arra jutottak, hogy a baktériumokkal szemben a fMWCNT-k negatív hatása jelentősebb volt mint a nem funkcionizált nanocsöveké, mivel a fMWCNT csökkentette a talaj pH értékét [19].

2.1.3. Szénalapú nanoanyagok hatásmechanizmusainak összehasonlítása

A fentiek alapján elmondható, hogy a CBN-ok eltérő hatást fejtenek ki a mikroorganizmusokra. A GO NP negatív hatása erőteljesebbnek látszik a G NP-vel szemben, míg a SWCNT toxikus hatása erőteljesebb a MWCNT által kiváltott hatáshoz képest. Viszont hatásaiknak mértéke egy adott rendszerben, azonos körülmények között még nem volt vizsgálva. Ezen különbségek feltehetően a nanoanyagok szerkezetbeli különbségeire vezethetőek vissza, mint például az eltérő méret, fajlagos felület és funkcionális csoportok. Viszont a végeredmény ugyanaz: ezen anyagok bizonyos koncentráció fölött károsítják a sejtfalat, emiatt reaktív oxigén intermedierek keletkeznek, ami végül sejthalálhoz vezet [20]. Amint a sejtmembrán megsérül, a mikroorganizmusok elkerülhetetlenül károsodni fognak, ezáltal akár a mezőgazdaságban fontos nitrogén körforgás is sérülhet. Ebből adódóan fokozott figyelmet kell fordítani arra, hogy megakadályozzuk ezen anyagok kijutását a környezetbe.

2.2. Aerob granuláris iszapos szennyvíztisztítási technológia

A biológiai szennyvíztisztítás során a szerves és szervesetlen anyagok eltávolítása kulcsfontosságú, mivel a befogadók (tavak és folyók) védelme napjaink egyik legfontosabb környezetvédelmi feladata. Ezért az Európai Parlament 91/271/EGK irányelve meghatározza a tisztított szennyvízben a szerves anyag, nitrogén és foszfor mennyiségét, amelyek szerves anyag esetében 125 mg/L, összes nitrogén esetében 15 mg/L, míg az összes foszfornál 1 mg/L. A szennyvizekben egyre nagyobb mennyiségben megjelenő szennyezőanyagok elkerülhetetlenül szükségessé teszik a meglévő technológiák, mint például a legelterjedtebb CAS szennyvíztisztítási eljárás és a szennyvíztisztító telepek fejlesztését, vagy éppen új szennyvíztisztítási technológiák alkalmazását. Egy ilyen új tisztítási eljárás az aerob granuláris iszapos technológia, amelyet először a 1990-es években írtak le [21]. Az AGS egy ígéretes módszer lehet a CAS rendszerek kiváltására, mivel több előnye is van (2.1. táblázat) [10]. Az eleveniszapos rendszerek esetében a szerves és szervesetlen anyagok biológiai eltávolítása során

több bioreaktor kialakítása szükséges, mivel az aerob-anaerob fázisok szétválasztása nélkülözhetetlen, valamint az iszap ülepítése is külön reaktorban történik.

2.1. táblázat. Eleveniszap és granuláris iszap közötti különbségek [10]

Paraméter	Eleveniszap	Aerob granuláris iszap (AGS)	Az AGS előnyei
Granulum alak és méret	Szabálytalan, <0,2 mm	Gömb és ovális, >0,2 mm	Nagyobb méretük és alakjuk következtében gyorsan ülepednek
Ülepedési sebesség (m/óra)	<10	>10	Gyors ülepedésük miatt nincs szükség flokkulensek használatára
Iszap index (SVI)	SVI ₅ ≠SVI ₃₀	SVI ₅ =SVI ₃₀	Kiváló ülepedési képességük következtében 5 perc ülepedés elegendő
Aerob, anoxikus és anaerob mikro környezet	Nincsenek elkülönült zónák	Mindhárom mikro környezet megtalálható a granulumok szerkezetében	Egyszerre meglévő mikro környezetek lehetővé teszik az együttes redox folyamatokat
Extracelluláris polimer anyagok (EPS)	Alacsony EPS tartalom	Magas EPS tartalom	Az EPS fontos szerepet játszik a granulumok stabil működésében
Toxikus anyagokkal szembeni tolerancia	Enyhe tolerancia	Magas tolerancia	A granulumok a biofilm-szerű tulajdonságaik miatt az iszapban élő mikroorganizmusok magas ellenálló képességgel rendelkeznek
Működésük változó terhelés hatására	Alacsony eltávolítási hatásfok változó terhelés alatt	Kiváló eltávolítási hatásfok változó terhelés alatt	A granulumok szerkezete megakadályozza a mikroorganizmusok kimosódását a reaktorból, így biztosítva a hatékony szennyezőanyag eltávolítási hatásfokot

Granuláris iszapos rendszer esetében a szennyvíz tisztítása egy bioreaktorban megy végbe, ezen felül az iszap és víz elválasztása is ebben a bioreaktorban történik, így az AGS bioreaktorok kialakítása nem igényel nagy területet. A kisebb alapterületen kívül az AGS rendszerek lehetővé teszik a magas biomassa-koncentrációk visszatartását a bioreaktorban, csökkentve a befektetett

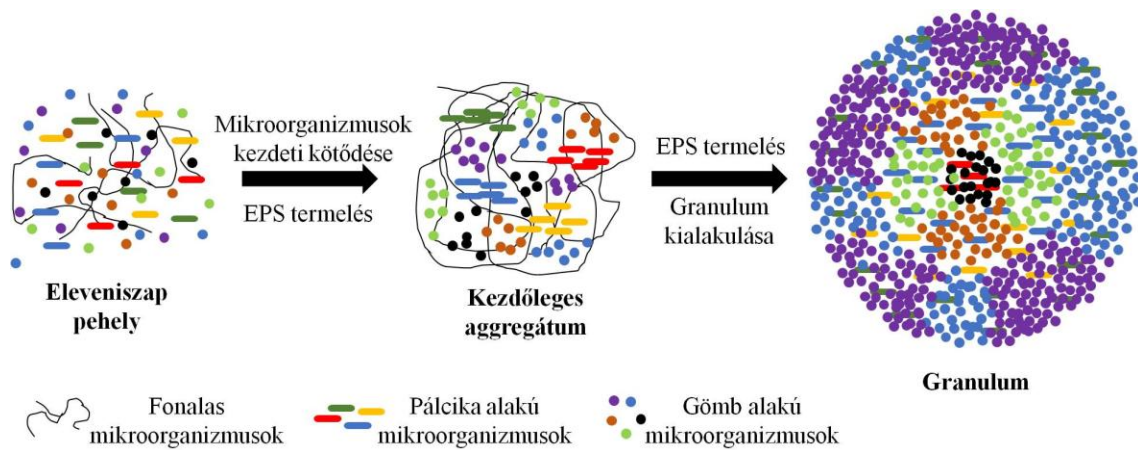
energia mennyiségét és csökkentve a szennyvíztisztítás költségét [22]. Az AGS fő jellemzői, amelyek elősegítik a szennyvíz hatékony kezelését: i) a granulumok víznél nagyobb fajsúlya és makroszintű mérete, ii) a különböző redoxi mikroökoszisztémák fenntartása a granulumokban, iii) magas biomassza visszatartó képesség, iv) az autotróf- és heterotróf mikroorganizmusok közötti kölcsönös metabolikus együttműködés [23]. Dióhéjban összegezve pedig elmondható, hogy minden biológiai átalakulás, azaz a szerves anyag lebomlás, nitrifikáció, denitrifikáció és a foszforeltávolítás egyetlen rendszerben történik.

2.2.1. Granulumok kialakulása

A magas hidrodinamikai nyíróerő és az ülepedési idő csökkentése fontos szerepet játszik a granulumok kialakulása során a szakaszos üzemű reaktorokban. Ennek oka, hogy a rövid ülepedési idő alatt a lassan ülepedő aggregátumok/pelyhek kimosódnak a rendszerből [24]. Az optimális magasság-szélesség (H/D) arány fontos paraméter a bioreaktor kialakításánál, amely biztosítja az iszap és a tápanyagok mozgását a rendszerben. A magas H/D arány, amely általában 3 és 10 között van, egy ovális alakú áramlási pályát eredményez, amely hozzájárul a mikroorganizmusok aggregálódásához [25]. A hidrodinamikai nyíróerő nagymértékben befolyásolja a granulumok szerkezetét, valamint az aggregálódásra képes törzsek szelekcióját. Magas nyíróerő hatására a granulumok sűrűbb szerkezetűvé váltak és az aggregálódásban szerepet játszó mikroorganizmusok nagymértékű szelekciója következett be [26,27]. Ezen tanulmányokban leírták, hogy az elegendő hidrodinamikai nyíróerő biztosításához a levegő áramlási sebessége min. 1,2 cm/perc érték kellett, hogy legyen, amely azt is biztosítja, hogy a rendszerből kimosódjanak az iszap ülepedésére negatív hatást kifejtő fonalas mikroorganizmusok.

Chen és mtsai. 0,8 cm/perc levegő áramlási sebességet alkalmazva már granulum képződést tapasztaltak, viszont ezek a részecskék laza szerkezetűek, ezáltal instabilak voltak [28]. Arról csak a későbbiekben bizonyosodtak meg, hogy a nyíróerő közvetett hatása miatt alakulnak ki a granulumok. Ennek oka pedig a mikroorganizmusok környezeti változásra adott reakciója, mivel a magas áramlási sebesség egyfajta stresszként hat, amely következtében EPS-t termelnek [29]. Verawaty és mtsai. a granulum képződést 4 fő lépésként írták le, mint a i) sejt-sejt kapcsolódás, ii) a mikroorganizmusok kezdeti kötődése képződő aggregátumokhoz, iii) mikroorganizmusok

összetettebb kapcsolódása az EPS termelés következtében, és végül iv) a hidrodinamikai nyíróerő hatására a granulumok formálódása (2.1. ábra) [30].



2.1. ábra. Az aerob granuláris iszap granulum-képződésének folyamata. Az eleveniszap pelyhekből először kezdőleges aggregátumok alakulnak ki a nyíróerő és a termelő extracelluláris polimer anyagoknak (EPS) köszönhetően. Ezt követően pedig az aggregátumok érett granulumokká fejlődnek ki [10].

2.2.2. Extracelluláris polimer anyagok

Az EPS-t a mikroorganizmusok állítják elő mint metabolikus terméket, amely fő összetevője a nagy mennyiségű PS és PN, melyek főként a sejtek felszínén akumulálódnak [31]. Az EPS a sejtek számára védőréteget alkot, mindemellett pedig hozzáférhető tápanyagok hiányában tápanyag forrásként is képesek hasznosulni [32]. A granulumok szerkezetét tekintve a PS főként a granulumok felszínén található meg nagy mennyiségben, míg a PN inkább a belső részben. Ezen kívül az EPS kis mennyiségben humin-, urin- és nukleinsavakat, foszfolipideket is tartalmaz [33]. McSwain és mtsai. a granulumokat vizsgálva azt tapasztalták, hogy a fehérje mennyisége a poliszacharidokhoz képest nagyobb, valamint a granuláris iszap EPS tartalma akár kétszerese is lehet az elveniszapban mérthez képest [34]. Az AGS magas EPS tartalma miatt a granulumok szerkezete összetetté és stabilá válik, továbbá jelentősen hozzájárul a kiváló ülepedési képesség megőrzéséhez [33].

2.2.3. Az AGS szerves anyag, nitrogén és foszfor eltávolítása

Az AGS bioreaktorok képesek a szerves anyagok, nitrogén és foszfor hatékony eltávolítására vagy akár megkötésére is. A szennyvízben lévő nitrogén vegyületek eltávolítása során, az ammónia nitrifikációjához aerob, míg a nitrit-nitrát denitrifikációjához

anoxikus/anaerob körülmények szükségesek. CAS rendszerekben a nitrogén vegyületek hatékony eltávolítása érdekében több bioreaktor telepítése vagy a reaktor több ciklusra osztása, aerob és anaerob fázisok kialakítása szükséges [22]. A több milliméter nagyságú granulumokban az aerob és anaerob mikroörményzetek kialakulnak, ezért a folyamatos levegőztetés során egyidejűleg megtörténik a nitrifikáció és a denitrifikáció is [35,36].

A foszfor eltávolítása a szennyvíztisztítás során nehezebb feladat, mint a nitrogéné, hatékony eltávolítását több tényező is befolyásolja, például a pH, hőmérséklet, a szervesanyag mennyisége és végül a levegőztetési stratégia [37]. A foszfor eltávolítása során a polifoszfát akkumuláló mikroorganizmusok (Polyphosphate-accumulating organism–PAO) aerob körülmények között a foszfort és a szerves anyagot polifoszfáttá alakítják, sejtjeikben és sejtfelületeiken raktározzák. Viszont anaerob körülmények között a mikroorganizmusok a felhalmozott polifoszfátot energiaforrásként hasznosítják, mely során a foszfor egy része foszfátként visszakerül a szennyvízbe [10]. Éppen ezért, a folyamatosan aerob körülmények között működő AGS bioreaktorok a foszfát szennyvízbe visszajutó problémáját áthidalják. Mind a nitrogén, mind pedig a foszfor eltávolításakor a mikroorganizmusok szerves szénvegyületeket is felhasználnak sejtjeik működése során, ezzel is hozzájárulva a szennyvíz kémiai oxigén igényének (chemical oxygen demand–KOI) és biológiai oxigén igényének (biological oxygen demand–BOI) csökkentéséhez. Továbbá az aerob mikroorganizmusok a szerves anyagokat szén-dioxiddá (carbon dioxide–CO₂) alakítják, ezzel is csökkentve az tisztított szennyvíz KOI és BOI értékét. A granulumok hatékony tápanyag eltávolítási képességét a nagy mennyiségű EPS is segíti, már több tanulmányban is megfigyelték, hogy az EPS mátrix szerkezetébe különböző foszfor és nitrogén vegyületek is felhalmozódhatnak [23,38]. Továbbá az a tény sem elhanyagolható, hogy az EPS termelés során a mikroorganizmusok nagy mennyiségű nitrogént és szerves anyagot használnak fel.

2.2.4. Az AGS szennyezőanyag eltávolító képessége

Laboratóriumi körülmények között a granuláris iszapot sikeresen alkalmazták különböző xenobiotikumok, mint a fenol vegyületek, festék- és gyógyszerészarmazékok eltávolítására is [10]. A fenolos vegyületek megtalálhatók az olajfinomítóknban, valamint gyógyszerészeti és növényvédő szereket előállító üzemekben keletkező szennyvizekben is. Adav és mtsai. az AGS fenolbontó képességét vizsgálták [39]. Az eleveniszap beszerzését követően, a granulum képződése alatt a bioreaktort fenol tartalmú szintetikus szennyvízzel táplálták, annak érdekében,

hogy fenol bontására alkalmas granuláris iszap jöjjön létre. A kísérlet során megfigyelték, hogy az így kialakított mikrobiális közösség képes volt fenol tartalmú szennyvíz tisztítására, viszont 1000 mg/L-nél magasabb koncentrációban már gátló hatást fejtett ki a baktériumokra, a reaktor optimális működése romlott. Jiang és mtsai. hasonló rendszerben a mikrobiális diverzitást vizsgálva azt tapasztalták, hogy a fenol bontását végző bioreaktorban a bakteriális diverzitás jelentősen alacsonyabb volt a kezdeti eleven iszapéhoz hasonlítva, viszont jellemzően a fenol bontásáért felelős mikroorganizmusok voltak a domináns fajok [40]. Wosman és mtsai. az eleveniszapból két stratégia szerint alakították ki a fenol bontására képes granuláris iszapot: az egyik bioreaktorban a szénforrás csak fenol volt, míg a másokban fenol és acetát [41]. A kizárólag fenollal táplált bioreaktorban a granulum képződés folyamata és az akklimatizáció gyorsabb, viszont a mikrobiális diverzitás és a rendszer stabilitása alacsonyabb volt. Ezzel szemben, a másik stratégia esetében a hatékony fenol eltávolítási képesség később alakult ki, viszont a granulumok szerkezete összetettebb és a reaktor működése stabilabb volt.

Tay és mtsai. a már kialakult granulumok fenol eltávolító képességét vizsgálták [42]. Három kísérleti bioreaktort, melyek hasznos térfogata 2,4 L és a szennyvíz hidraulikus tartózkodási ideje 8 óra volt, fenol tartalmú (200, 400 és 800 mg/L) szennyvízzel tápláltak egy héten át. A kísérletek végén arra a következtetésre jutottak, hogy e mennyiségeket egy hét elteltével minden rendszer képes volt hatékonyan eltávolítani. Klóranilin vegyületeket gyakran használják herbicidek, peszticidek és gyógyszerek előállításában, ezért ipari szennyvizekben gyakran megtalálhatóak ezek a környezetre veszélyt jelentő vegyületek [43]. Ennélfogva biológiai eltávolításukkal már 2003-ban kísérleteztek membrán bioreaktorokat alkalmazva. Viszont ezen szennyvíztisztítási eljárás az ingadozó terhelésekre érzékeny volt és hosszú távú működtetése sikertelennek bizonyult [44]. Az AGS bioreaktorok térhódítása nyomán, Zhu és mtsai. klóranilin eltávolításával kísérleteztek, amelyben a szennyezőanyag mennyiségét lépcsőzetesen emelve végül az 5 L hasznos térfogatú bioreaktor képes volt a 140 mg/L klóranilin tartalmú szennyvízből 99,9%-os hatékonysággal eltávolítani a klóranilint [45].

Az azoszínezékeket leggyakrabban a textiliparban alkalmazzák, ezért ezen anyagok a textilipari szennyvizekben jelentős mennyiségben megtalálhatóak, eltávolításuk főként kémiai technológián alapul. Az azoszínezékek granuláris iszapos bioreaktorokban (térfogata 3 L) történő hatékony eltávolítását először Sarvajith és mtsai. érték el, ahol mikroaerofil

körülményeket kialakítva a granuláris iszap 50 mg/L azofesték tartalmú szennyvízből a festékanyagot 99%-os hatékonysággal távolította el [46].

A granuláris iszap kiváló ülepedési tulajdonságának köszönhető, vízből való könnyű eltávolíthatóságának kiaknázására, fémmegkötő képességét is megvizsgálták. A különböző fémek habár csak $\mu\text{g/L}$ mennyiségben mutathatók ki a háztartási szennyvízben, így is negatív hatást fejtenek ki egyes biológiai folyamatokra, mint például a nitrogén és foszfor eltávolítása [47]. Liu és mtsai. az AGS ólom [Pb(II)], kadmium [Cd(II)] és cink [Zn(II)] eltávolítási képességét vizsgálták [48]. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a granuláris iszap magas EPS tartalma fontos szerepet játszik a fémek eltávolításában, mivel a kinyert EPS (főként az EPS-t alkotó fehérje) nagy mennyiségű, 1587, 1470 és 1123 mg/g ólmot, kadmiumot és cinket kötött meg, ami jóval nagyobb mennyiség volt, mint más hasonló bioszorbenseknél leírtak. Egy másik tanulmányban az AGS-ban nagy mennyiségben megtalálható EPS uránium [U(VI)] 220 mg/g bioszorpció kapacitását figyelték meg [47].

2.2.5. AGS szennyvíztisztítási technológia félüzemi és üzemi alkalmazása

Az első félüzemi granuláris iszapos SBR-t 2003-ban építették meg Hollandiában [49]. Két párhuzamos bioreaktort telepítettek, melyek magassága 6 méter és szélessége pedig 0,6 méter volt, inokulumként pedig eleveniszapot használtak. Egy év elteltével az AGS naponta a bemenő 5 m³ és 270-400 mg/L KOI tartalmú szennyvízből a szerves anyagot 96%-os hatékonysággal eltávolította, mialatt az iszap mennyisége 10 g/L körül volt, a kialakult iszap granulumok átlagos átmérője pedig 0,2 mm. Ni és mtsai. hasonló paraméterekkel, 1 m³ hasznos térfogatú bioreaktort telepítettek Kínában, amelyet 90-200 mg/L KOI és 10-40 mg/L ammónium-nitrogén (NH₄-N) koncentrációjú települési szennyvízzel működtettek [50]. 300 nap elteltével a bioreaktor iszap mennyisége 9,5 g/L, a granulumok átmérője 0,8 mm és ülepedési sebessége 18-40 m/h volt. Mindemellett kiváló KOI és NH₄-N eltávolítási tulajdonságokkal rendelkezett, a KOI és NH₄-N átlagos eltávolítási hatásfoka 90% és 95% körüli volt. További kísérletekben is sikeres granulum kialakulásról számoltak be 0,1 m³ hasznos térfogatú bioreaktorokban, ahol a sertéslepről származó szennyvíz, szerves anyag és nitrogén hatékony eltávolítását figyelték meg [51,52].

Yang és mtsai. félüzemi és üzemi kísérleteik során eltérő eredményeket tapasztaltak [53]. A félüzemi bioreaktor (31,4 m³ hasznos térfogat, H/D=2,5) napi 120 m³ kommunális szennyvíz tisztítására volt alkalmas. A bioreaktor stabil működése 85 nap elteltével alakult ki, ekkor a KOI

és $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfoka 85% és 96% volt, biomassza mennyisége 8,5 g/L-re növekedett. Ezzel szemben az üzemi kísérlet során (közel 12 000 m³ hasznos térfogat, H/D=0,1) a napi szennyvíztisztítási kapacitás 50 000 m³ volt. A stabil működés kialakulásához 340 nap volt szükséges, amikor a KOI és $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfoka 89% és 99%, a biomassza mennyisége az előzőhöz képest alacsonyabb, 4 g/L volt. Az alacsonyabb biomassza mennyiség a magasabb iszap térfogati indexnek (sludge volume index–SVI₅) tulajdonítható, míg a félüzemi bioreaktorban 43 mL/g volt, addig az üzemi bioreaktorban 47 mL/g volt, vagyis az ülepedési sebesség nagyobb értéket mutatott.

Li és mtsai. összesen négy darab, egyenként 12 540 m³ térfogatú AGS SBR-t telepítettek, amely napi 50 000 m³ szennyvíz tisztítására volt alkalmas. A bemenő szennyvíz összetételét tekintve 30% kommunális szennyvíz és 70% ipari szennyvíz volt. Az ipari szennyvíz főként nyomda-, festék- és textilipari, valamint italgyártásból származó víz volt. A kevert szennyvíz vízkémiai paraméterei a következők voltak: KOI 200-600 mg/L, ammónia 28-40 mg/L és össz-foszfor (total phosphorus–TP) 2-4 mg/L. A granulom képződés 300 nap elteltével ment végbe, ekkor az iszap térfogati index 75,5 mL/g-ról 48 mL/g-ra csökkent, a biomassza mennyisége pedig a kezdeti 2 g/L-ről 4 g/L-re növekedett. A bioreaktorok hatékonysági mutatói pedig igen kedvezőek, a KOI, $\text{NH}_4\text{-N}$ és TP eltávolítási hatásfoka 94,8%, 82,2% és 59,6% volt, így a tisztított szennyvízben a szennyező anyagok határértéke nem haladta meg az Európai Parlament 91/271/EGK irányelvében szereplő értékeket [54].

Pronk és mtsai. egy 9 600 m³ térfogatú AGS SBR-t telepítettek Hollandia Garmerwolde nevű településén, ahol a jelenlegi hagyományos eleveniszapos rendszer évi 27 millió m³ szennyvizet fogad be. Tizenhét hónapon keresztül monitorozták a granulomok kialakulását, valamint az AGS víztisztítási képességét. Az SVI₅ folyamatos csökkenő tendenciát mutatott, 120 mL/g kezdeti értékről egészen 50 mL/g-ra csökkent. A biomassza mennyisége is hasonló, ígéretes mértékben változott (3 g/L-ről egészen 10 g/L-re növekedett). A szerves anyag, nitrogén és foszfor vegyületek eltávolítása pedig 88,76%, 90,84% és 88,25%-os hatékonysággal történt, amely értékek eléréséhez az eleveniszapos rendszerek esetében csak kémiai vegyületek adagolását követően volt lehetőség. Tanulmányukban még további két fontos szempontot is kiemelték előnyként az AGS alkalmazása mellett. Számításaik alapján kizárólag AGS SBR technológiát alkalmazva a szennyvíz tisztítása során szükséges működési hasznos térfogat 33%-

kal csökkenthető, ezáltal és a bioreaktorok kialakításából adódóan a szennyvíztisztító telep mérete is jelentősen csökkenthető. Környezetvédelmi szempontból egy másik fontos érv a technológia alkalmazása mellett az, hogy azonos mennyiségű szennyvíz tisztításához szükséges befektetett energia az AGS esetében 58-63%-val kevesebb, mint a CAS alkalmazása során. Mindemellett az általuk kialakított szennyvíztisztító telep több díjat is elnyert, mint például az Év szennyvíztisztítási technológia projektje címet [22].

Az AGS szennyvíztisztítási technológia üzemi szintű alkalmazásával már több fejlett állam is kísérletezik. Ennek egyik fő oka az lehet, hogy egyre összetettebb, többféle és különböző arányú vegyszert és toxikus anyagot tartalmazó szennyvíz keletkezik, a növekvő népesség és az emberiség növekvő igényeinek kielégítése következtében. Másrészt egy ilyen ígéretes, környezetbarát eljárás közvetve csökkentheti az emberiség ökológiai lábnyomát. Ennélfogva fontos az eljárás átfogóbb, szélesebb körű megismerése, esetleges gyengeségeinek meghatározása és azok kiküszöbölése. A módszer elterjedését nagyban segítheti az, hogy információkat szerzünk a rendszer különböző szennyezőanyagokkal szembeni ellenálló képességéről (amelybe az egyre szélesebb körben alkalmazott nanoanyagok is beletartoznak), összehasonlítva az elterjedtebb szennyvízipari technológiákkal (pl. eleveniszapos szennyvíztisztítás).

2.3. Nanorészecskék biológiai szennyvíztisztításra kifejtett hatása

Az egyre nagyobb mennyiségben előállított nanoanyagok (évente több 100 tonna) potenciális környezetre gyakorolt hatása az utóbbi idők egyik meghatározó kutatási témájává vált. Mivel nagy hányaduk a felhasználás után bejut a biológiai szennyvíztisztító telepekre, a mikrobiális folyamatokra gyakorolt hatásuk tanulmányozása egyre aktuálisabb. Keller és Lazareva több szennyvíztisztító telepen is végeztek kutatást, mely során a nanorészecskék mennyiségét határozták meg. Azt tapasztalták, hogy a szennyvíztisztító telepeken a nanorészecskék mennyisége akár 150 mg/kg eleveniszap is lehet [55]. Figyelembe véve, hogy a szén-alapú nanoanyagok egy jelentős részét képezik az előállított nanoanyagok mennyiségének, a szennyvízbe bejutó mennyiségük akár több milligramm is lehet, ezért hatásuk vizsgálata időszerű.

Ezen problémára több kutató is felfigyelt és különféle hatásvizsgálatokat végeztek. Az átláthatóság érdekében táblázatokban foglaltuk össze az elérhető releváns irodalmi adatokat. A 2.2. táblázatban a G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT akut és krónikus hatásait foglaltuk össze

eleveniszapos szennyvíztisztítók esetében. Mivel az AGS-re vonatkozóan a szén-alapú vegyületek esetében csak kevés irodalmi adat érhető el, eddig csak két akut hatásvizsgálatot végeztek, ezért egyéb, nem szén-alapú nanoanyagok granuláris iszapra gyakorolt hatására is kitértünk, amelyek vizsgálataink során összehasonlítási alapot is képeztek eredményeinkkel (2.3. táblázat).

2.2. táblázat. Szénalapú nanoanyagok eleveniszapra gyakorolt hatása

Vizsgált anyag (mg/L)	Időtartam	Tapasztalat	Hivatkozás
G NP (0,5)	3 óra	NH ₄ -N eltávolítási határfok csökkent (87%→68%). Ammónia- és nitrit oxidáló baktériumok abundanciája csökkent.	[56]
G NP (10 és 300)	10 óra	10 mg/L G NP adagolást követően a KOI (96%→93%), NH ₄ -N (91%→84%) és PO ₄ -P (90%→80%) eltávolításának mértéke csökkent. Viszont 300 mg/L G adagolása nyomán a KOI, NH ₄ -N és PO ₄ -P eltávolítási határfok 96%, 91% és 90%-ról 88%, 64% és 76%-ra csökkent. A mikrobiális diverzitás is csökkent.	[57]
GO NP (10, 50, 100, 200 és 300)	5 óra	KOI eltávolítás minden esetben javult. 100 mg/L GO NP mennyiség fölött a nitrogén és a foszfor eltávolítás csökkent.	[58]
G- és GO NP (5 és 100)	45 nap (24 óra/ciklus)	100 mg/L GO NP esetében a KOI eltávolítás 10%-kal csökkent, az elő sejtszám is csökkent.	[59]
G- és GO NP (1 és 5)	10 nap (12 óra/ciklus)	A KOI, NH ₄ -N és PO ₄ -P eltávolítás minden esetben csökkent. A G NP és GO NP eltérő mikrobiális közösségre fejtették ki negatív hatásukat.	[60]
SWCNT (100, 300 és 500)	3 óra	A bakteriális respirációs képesség csökkent.	[61]
SWCNT (3500)	24 óra	A hat különböző helyről származó eleven iszap mikrobiális összetétele megváltozott. A SWCNT hatásának mértéke közösség függő.	[62]

Vizsgált anyag (mg/L)	Időtartam	Tapasztalat	Hivatkozás
SWCNT (219)	5 óra	A mikrobiális összetétel megváltozott.	[63]
MWCNT (640, 1440, 2160 és 3240)	3 óra	A mikrobiális respiráció csökkent a MWCNT mennyiségének növelésével. Az iszap kevertetése során a MWCNT toxikusabb volt.	[64]
MWCNT (1 és 20)	24 óra (8 óra/ciklus)	A tápanyag eltávolításra nem volt negatív hatással.	[65]
MWCNT (1 és 20)	180 nap (8 óra/ciklus)	A foszfor eltávolítás jelentősen csökkent. 20 mg/L esetben a nitrogén eltávolítás, valamint a mikrobiális diverzitás csökkent.	[65]
SWCNT, MWCNT és G NP	1 óra	A nanoanyagokkal bevont szűrőpapíron átszűrt mintákban a SWCNT okozta a legnagyobb mértékű sejthalált, majd ezt követte a G és a MWCNT.	[66]
SWCNT és MWCNT (10 és 100)	4,5 óra	A nitrogén és foszfor eltávolítási hatásfokára nem fejtettek ki hatást.	[67]
SWCNT és MWCNT (0,01 és 1)	180 nap (folyamatos üzemű)	A szerves anyag, nitrit, nitrát foszfor eltávolítás nem változott. Az ammónia eltávolítási hatásfoka 1 mg/L SWCNT és MWCNT hatására 51% és 41%-ra csökkent. A nitrogén eltávolítását végző mikroorganizmusok mennyisége jelentősen csökkent a MWCNT hatására.	[68]

2.3. táblázat. Szén- és fém-alapú nanoanyagok aerob granuláris iszapra gyakorolt hatása

Vizsgált anyag (mg/L)	Időtartam	Tapasztalat	Hivatkozás
Cink-oxid (ZnO) NP (10, 50 és 100)	6 óra	A KOI és foszfor eltávolítás változatlan maradt. A nitrogén eltávolításában enyhe hatásfokcsökkenést tapasztaltak. A PN mennyisége a kezdeti érték ötszörösére növekedett.	[69]
ZnO NP (5, 10 és 20)	180 nap (6 óra/ciklus)	A KOI eltávolításának hatásfoka növekedett. A ZnO NP 20 mg/L mennyiségben a foszfor és ammónia eltávolítását 80% és 75%-ra csökkentette. Az EPS mennyisége 5 mg/L ZnO esetében volt a legnagyobb, ezt követően csökkent. A mikrobiális diverzitás jelentős mértékben csökkent.	[70]
Réz-oxid (CuO) NP (5, 20 és 50)	90 nap (6 óra/ciklus)	A 20 és 50 mg/L CuO NP csökkentette a biológiai nitrogén és foszfor eltávolítás hatásfokát, valamint a biomassza mennyisége is csökkent. Az EPS mennyisége 40%-kal csökkent 50 mg/L CuO hatására.	[71]
Ezüst (Ag) NP (5 és 50)	69 (4 óra/ciklus)	A bioreaktorok víztisztítási hatásfoka nem változott, viszont az iszaptulajdonságok romlottak.	[72]
GO NP (60)	4 óra	A foszfor eltávolítása és az EPS mennyisége is csökkent.	[73]
GO NP (60)	4 óra	Negatív hatása nem volt a nitrifikációra és denitrifikációra. Az EPS mennyisége nem változott.	[74]

A fenti két táblázatban (2.2. és 2.3. táblázat) összesítettük a szén- és fém- alapú nanoanyagok eleven- és granuláris iszapra gyakorolt hatását. Összehasonlításuk során jól látható, hogy a nanoanyagok mennyisége és azok expozíciós ideje jelentősen eltér, ezért messzemenő következtetések levonása nehézkes. Azonban láthatjuk, hogy az eleveniszap esetében jól kivehető különbségek alakultak ki az akut és a krónikus vizsgálatok között, míg pár óra elteltével nem tapasztaltak jelentős változást, addig hosszabb kitettséget követően (akár már egy hét elteltével) jelentkeztek a nanoanyagok negatív hatásai. Akut kitettségek esetében jelentős mértékű tápanyag eltávolítási hatékonyság csökkenést csak igen magas, 100 mg/L részecskemennyiséget meghaladva tapasztaltak. Ezzel szemben, a krónikus hatásvizsgálatok már 1 mg/L nanoanyag

adagolást követően is tapasztalták a bioreaktorok tápanyag eltávolítás hatásfokának csökkenését. Jellemzően az ammónia és foszfor eltávolításában figyeltek meg jelentős csökkenést. Az AGS esetében is hasonló a tapasztalat, miszerint a cink-oxid nanorészecskék (Zinc oxide nanoparticles–ZnO NPs) 6 óra után sem fejtettek ki érdemi hatást, addig hosszabb távon a szerves és szervetlen anyagok eltávolítási hatásfoka, valamint a mikrobiális diverzitás is lecsökkent. Szén-alapú nanoanyagok esetében pedig eddig csak a GO nanorészecskék akut vizsgálatát végezték el.

3. A kutatás célkitűzései

A nanotechnológia megjelenése és elterjedése számos probléma megoldására hivatott, ezért alkalmazási területük egyre elterjedtebb. Ennélfogva kijutnak a környezetünkbe, és mint nanoszennyező anyagok különböző biológiai folyamatok optimális működését gátolhatják. A szénalapú nanoanyagok, mint a grafén, grafén-oxid, egy- és többfalú szén nanocsövek előállításának mennyisége folyamatosan növekvő tendenciát mutat, a természetbe kijutó mennyiségük kimutatható, ezért a környezetre gyakorolt hatásuk vizsgálata egyre hangsúlyosabbá válik. A szennyvíztisztító telepek az urbanizáció növekedése és környezetünk védelme miatt egyre fontosabb szerepet töltenek be. Mivel egyre nagyobb mennyiségű és összetettebb szennyvíz keletkezik, új szennyvíztisztítási eljárások alkalmazása egyre inkább nélkülözhetetlen. Az aerob granuláris iszap egy új, innovatív és elterjedő félben lévő technológia, amelyet kiváló tulajdonságai miatt alkalmaznak. Tudomásunk szerint Magyarországon még nem foglalkoztak az AGS szennyvíztisztítási technológia tanulmányozásával, továbbá az irodalomban a szénalapú nanoanyagok ezen szakaszos üzemű szennyvíztisztítási eljárásra gyakorolt hatásai még ismeretlenek. Ennélfogva, doktori munkám céljával a granuláris iszap kialakítását és átfogó tanulmányozását, valamint különböző koncentrációjú szénalapú nanoanyagok hosszú távú hatásának vizsgálatát tűztük ki az AGS esetében.

A kutatás első lépése, irodalmi adatok alapján, egy üveg bioreaktor megtervezése és elkészítése, amely alkalmas körülményeket biztosít a granuláris iszap kialakulására, valamint amelyben a levegőztetés és szennyvíz adagolás-élvét automatikusan történik. Következő lépés a rendszer automatizáláshoz szükséges eszközök beszerzése, programozása, végül pedig az inokulum beszerzése a szegedi szennyvíztisztító telepről. Ezt követően a granuláris iszap kialakítása, amelyet az ülepedési idő folyamatos csökkentésével érünk el. A sikeres granulációt követően

további célunk a bioreaktor stabil működtetése, amely AGS inokulumként szolgál a további kísérleteink során.

A kutatás következő részében célunk további bioreaktorok üzembehelyezése, valamint a legtöbbet kutatott, grafén-oxid nanorészecskék hatásának vizsgálata. Figyelembe véve, hogy kevés információ áll rendelkezésünkre a GO NP hagyományos szennyvíztisztásra gyakorolt hatásáról is (a granuláris iszap esetében is csak „batch test” kísérletek eredményeiről találhatunk adatokat, ahol a kontakt idő 4-5 óra és csak a nitrogén és foszfor eltávolítását vizsgálták) ezért célunk egy részletesebb tanulmány elkészítése. A GO nanorészecskéket 5-115 mg/L koncentrációban, a szintetikus szennyvízzel együtt adagoljuk a bioreaktorokba. Az egyik kísérlet során a különböző részecske koncentrációjú szennyvizet minden esetben más-más bioreaktorba adagoljuk hozzá több napon át. Ezzel ellentétben, a másik kísérlet alkalmával a növekvő GO tartalmú szennyvizet ugyanabba a bioreaktorba adagoljuk, vizsgálva a granulomok adaptálódási képességét. Ezen felül, megvizsgáljuk a granuláris iszap regenerálódó képességét is. A kísérletek alatt nyomon követjük a bioreaktorok tápanyag eltávolítási hatásfokát, az iszap tulajdonságaiban bekövetkező, valamint a mikrobiális összetételben végbemenő változásokat.

Végül harmadik kísérletünkben célunk további 3 szénalapú nanoanyag (G NP, SWCNT és MWCNT) hatásának vizsgálata, mivel egyik nanoanyag esetében sem rendelkezünk információval a granuláris iszapra gyakorolt hatásukról. Előző kísérleteinkben átfogó és mélyreható mikrobiológiai vizsgálatokat a GO NP esetében nem végeztünk el. Ezért fő célunk az említett négy különböző szénalapú anyag granuláris iszapra gyakorolt hatásának tanulmányozása lesz, annak érdekében, hogy feltárjuk és rangsoroljuk őket toxikus hatásuk erőssége szerint. Az irodalomban a nanoanyagokat csak néhány tanulmány vizsgálja ugyanolyan rendszerben, így feltett szándékunk az is, hogy azonos működési paramétereket és mikrobiális közösséget alkalmazva vizsgáljuk meg a szénalapú nanoanyagok hatását az aerob granuláris iszapos szennyvíztisztításra.

4. Anyag és módszertan

4.1. Szén-alapú nanoanyagok előállítása és jellemzése

A kísérleteknél használt G (fajlagos felület $300 \text{ m}^2/\text{g}$) és SWCNT ($\geq 90\%$) nanoanyagokat a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be, a GO és MWCNT nanoanyagokat pedig az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszéken alkalmazott módosított Hummer's és katalitikus kémiai gőzleválasztás (Catalytic chemical vapor deposition–CCVD) módszerekkel állítottuk elő [75,76].

4.1.1. GO nanorészecskék előállítása

A GO előállítására a módosított Hummer's módszert alkalmaztuk [75]. Első lépésként 9 g grafitot és 9 g nátrium nitrátot (NaNO_3) 420 mL koncentrált kénsavban (H_2SO_4) 0°C -on 30 percen át kevertettünk. Az elegyet 54 g kálium permanganát (KMnO_4) adagolásával oxidáltuk, majd szobahőmérsékleten egy napig kevertettük. Ezt követően hozzáadtunk 1000 mL ioncserélt vizet és 20 mL 30%-os (w/w) hidrogén peroxidot (H_2O_2), majd egy órán át 0°C -on kevertettük. A keletkezett terméket ioncserélt vízzel mostuk és a kapott GO szuszpenziót liofilizáltuk. A kísérletek során a GO részecskékből 15 g/L koncentrációjú törzsoldatot készítettünk.

4.1.2. MWCNT előállítása

A MWCNT-eket a CCVD módszerrel állítottuk elő [76]. Az eljárás első lépése a katalizátorok előállítása, ehhez a megfelelő mennyiségű vas-nitrát ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), kobalt-nitrát ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) és alumínium-hidroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) etanolos ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) szuszpenziókat bepároltuk. Ezt követően a kapott katalizátor prekursorokat csökemencébe helyeztük, ahol 700°C -on tíz percen keresztül nitrogén gázáramban ($270 \text{ mL}/\text{perc}$) kialakítottuk a szükséges katalizátor szerkezetét. Végül a szén nanocsövek kialakításához 1:9 arányú $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$ gázelegyet a csökemencébe áramoltattunk, ahol egy óra reakció idő elteltével, hűtés céljából nitrogén gázt áramoltattunk. A kapott terméket nátrium-hidroxid (NaOH), sósav (HCl) és KMnO_4 oldatokkal kezeltük, annak érdekében, hogy amorf szén és katalizátor mentes, tiszta végterméket kapjunk. Hasonlóan a grafén-oxidhoz, a MWCNT-ből 15 g/L koncentrációjú törzsoldatot készítettünk.

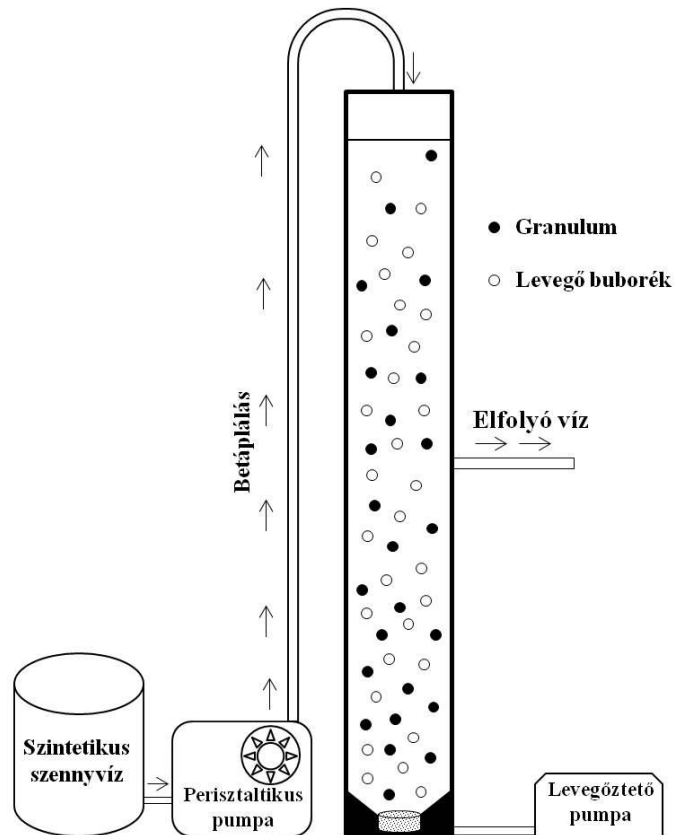
4.1.3. Szén-alapú nanoanyagok jellemzése

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a részecskék méretét és alakját, transzmissziós elektronmikroszkópos (Transmission electron microscope–TEM) és pásztázó elektron mikroszkópos (Scanning electron microscope–SEM) (FEI Tecnai G2 20 X-Twin mikroszkóp 200

kV gyorsító feszültségen és Hitachi S-4700 Type II FE-SEM mikroszkóp 10 kV gyorsító feszültségen) felvételeket készítettünk. A TEM felvételek készítéséhez a GO szuszpenziót (0,05 mg/mL) szén-rácsra cseppentettük, míg a SEM felvételekhez a liofilizált mintát szén-szalagra helyeztük. A részecskék kristályszerkezetét röntgen diffraktométer (X-ray diffractometer–XRD) segítségével állapítottuk meg (Rigaku MiniFlex II powder X-ray) Cu K α besugárzási forrást alkalmazva. A pásztázási tartomány 5° és 40° között volt, sebessége pedig 2° percenként. Az előállított részecskék molekuláris szerkezetét Raman mikroszkóp (Senterra II Raman) segítségével vizsgáltuk meg 532 nm hullámhosszon, 6,25 mW lézerezősség, 1 cm⁻¹ spektrális felbontás mellett, melynek tartománya 1000 és 3000 cm⁻¹ volt.

4.2. A bioreaktorok felépítése és működtetése

Az eleveniszapot a Szeged Városi Szennyvíztisztító Telepről szereztük be. A granuláris iszapot egy speciális üvegreaktorban állítottuk elő, melynek magasság-szélesség aránya 7:1, hasznos térfogata 1,4 L volt (*4.1. ábra*). A levegőbuborékok, amelyek biztosították az iszap oxigén ellátottságát és kevertetését, a bioreaktor alján elhelyezkedő porlasztófejen át jutottak a rendszerbe. A kísérletek során a szennyvíz hidraulikus tartózkodási ideje (Hydraulic retention time–HRT) 8 óra volt. A granulum képződést biomassza kimosásos módszerrel (az ülepedési idő folyamatos csökkentése 40 percről 5 percre), valamint magas levegő áramlási sebesség biztosításával (3,5 L/perc) értük el [77]. A granulum képződést követően további bioreaktorokat üzemeltünk be, amelyek esetében, hasonlóan az eleveniszapos beoltáshoz, 700 mL szintetikus szennyvizet és 700 mL kevert granuláris iszapot töltöttünk az üveg reaktorba, majd a lentebb leírt ciklusok szerint működtettük. Átlagosan tíz nap elteltével a beoltott bioreaktorban lévő iszap tulajdonságai (biomassza mennyiség és ülepedési sebesség) és az elfolyó szennyvíz vízkémiai paraméterei megegyeztek a már stabilan üzemelő reaktoréval, így a vizsgálni kívánt szénalapú nanoanyagok adagolását megkezdhettük.



4.1. ábra. Az aerob granuláris iszapos szakaszos üzemű bioreaktor sematikus felépítése.

A bioreaktorok $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ -on 4 órás ciklusokra felosztva működtek: 5 perc betáplálás, 225 perc levegőztetés, 5 perc ülepedés és 5 perc elvétel. A betáplált szintetikus szennyvíz és a tisztított szennyvíz elvételének folyadékárama betápláláskor és elvétkor pedig $8,4\text{ L/óra}$ volt. A pH értékét folyamatosan mértük és $7,2 \pm 0,2$ értéken tartottuk. A szennyvíz betáplálást és elvételt perisztaltikus pumpa biztosította. A szintetikus szennyvíz szerves anyag forrását glükóz biztosította, amelynek mennyisége 1391 mg/L volt (KOI: 1300 mg/L). A szintetikus szennyvíz (Synthetic wastewater–SWW) jellemzői és összetétele a következő volt: $120\text{ mg/L NH}_4\text{-N}$, $20\text{ mg/L PO}_4\text{-P}$, 200 mg/L nátrium-hidrogén-karbonát (NaHCO_3), 25 mg/L kalcium-klorid (CaCl_2), 45 mg/L magnézium-szulfát (MgSO_4) és 1 mL/L nyomelem oldat [71]. A nyomelem oldat összetétele a következő volt: $1,16\text{ mg/L}$ bórsav (H_3BO_4), $2,78\text{ mg/L}$ vas-szulfát (FeSO_4), $1,25\text{ mg/L}$ cink-szulfát (ZnSO_4), $1,69\text{ mg/L}$ mangán-szulfát (MnSO_4), $0,38\text{ mg/L}$ réz-szulfát (CuSO_4), $0,15\text{ mg/L}$ kobalt-klorid (CoCl_2) és $0,10\text{ mg/L}$ molibdén-trioxid (MoO_3).

4.3. Analitikai módszerek

Az elfolyó víz kémiai paramétereit a HACH által forgalmazott gyorsesztekkel vizsgáltuk UV-VIS spektrofotométerrel (DR5000, Hach–Lange): KOI (LCI400), $\text{NH}_4\text{-N}$ (LCK304),

$\text{NO}_2\text{-N}$ (LCK341), $\text{NO}_3\text{-N}$ (LCK339) és $\text{PO}_4\text{-P}$ (LCK349). A kevert szennyvíz szuszpendált lebegőanyag (Mixed liquor suspended solid–MLSS) tartalmát, a kevert szennyvíz illékony szuszpendált lebegőanyag (Mixed liquor volatile suspended solid–MLVSS) tartalmát, az iszap ülepedési sebességet és az iszap térfogati indexet (SVI) 30, illetve 5 perc alatt (SVI_{30} és SVI_5) az irodalomban elfogadott standard módszerek segítségével határoztuk meg [78]. Az MLSS meghatározása során adott térfogatú mintát $0,45\ \mu\text{m}$ pórusátmérőjű szűrőpapíron átszűrtünk, majd a szűrőpapírt szárítószekrényben ($103\text{-}105\ \text{°C}$ -on 24 órán át) tömegállandóságig szárítottuk, ezt követően a szűrés után és előtt mért szűrőpapírtömeg-különbségekből, valamint a leszűrt minta ismert térfogatából az iszap száraztömegét számíthattuk. Az MLVSS esetében a korábban ismertetett módon kapott szűrletet tartalmazó szűrőpapírt kemencében ($550\ \text{°C}$ -on 24 órán át) tömegállandóságig hevítettük, majd a minta száraztömege ($103\text{-}105\ \text{°C}$ utáni tömeg) és izzítás után mért szűrőpapírtömeg-különbségekből, valamint a leszűrt minta ismert térfogatából az illékony szuszpendált lebegőanyag tartalmát kiszámoltuk. Az iszap ülepedési sebességének meghatározásához 1 L-es mérőhengerbe 20 mL iszapmintát helyeztünk, majd lemértük az iszap leülepedéséhez szükséges időt. Az SVI mérésénél a bioreaktorból kivettünk egy liter térfogatú kevert iszapmintát, amit egy 1 literes mérőhengerbe töltöttünk és az iszapot 5 illetve/vagy 30 percig ülepítettük, majd az iszaptérfogatot leolvastuk, végül elosztottuk a szuszpendált lebegőanyag tartalommal.

A granuláris iszap EPS mennyiségének megállapításához 20 mL MLSS-t 3 alkalommal ioncserélt vízzel mostunk, majd centrifugáltuk ($5000\ \text{g}$, $4\ \text{°C}$, 10 perc), a felülúszót leöntöttük és vissza szuszpendáltuk eredeti térfogatára. Az elegyet $80\ \text{°C}$ -on, 30 percig kevertettük (200 rpm), majd centrifugáltuk és a felülúszót szűrtük ($0,45\ \mu\text{m}$) [79]. Az EPS PS és PN tartalmát Anthrone (glükóz, mint standard) és Lowry (szarvasmarha szérum albumin, mint standard) módszerek alapján határoztuk meg [80]. Az EPS mennyiségét a PS és PN összege alapján számítottuk ki.

A nanoanyagok adagolásának hatására a granulumok szerkezetében végbemenő változásokat pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk, amelyeket előzőleg 2,5 %-os glutáraldehid tartalmú 0,1 M-os foszfát puffer ($\text{pH}=7,3$) oldatban stabilizáltuk (12 óra, $4\ \text{°C}$). Ezt követően a mintákat etanol-víz elegyben dehidratáltuk, az etanol térfogatarányát fokozatosan növelve (50–100 v/v %). Végül a mintákat szárítottuk (3 óra, $30\ \text{°C}$) és bevontuk aranyréteggel,

majd Hitachi S-4700 Type II FE-SEM mikroszkóppal, 10 kV gyorsító feszültségen felvételeket készítettünk [81].

4.4. Granuláris iszap mikrobiális aktivitása

A mikrobiális aktivitás mérések során meghatároztuk az iszap specifikus oxigén felhasználási mértékét (Specific oxygen uptake rate–SOUR), a specifikus ammónia oxidációs mértékét (Specific ammonia oxidation rate–SAOR), a specifikus nitrit oxidációs mértékét (SNOR), a specifikus nitrit redukciós mértékét (Specific nitrite reduction rate–SNIRR), a specifikus nitrát redukciós mértékét (Specific nitrate reduction rate–SNRR), a specifikus foszfor felvétel mértékét (Specific phosphorus uptake rate–SPUR) és a specifikus foszfor leadási mértékét (Specific phosphorus release rate–SPRR).

A SOUR méréséhez 250 mL térfogatú BOI mérésre alkalmas, OxiTop IS 12 típusú mérőeszközt használtunk. A BOI mérőbe 50 mL kevert granuláris iszapot, 200 mL előlevegőztetett szintetikus szennyvizet és megfelelő mennyiségű inhibitorot (nitrifikáció gátlása) töltöttünk, majd lezártuk. A BOI mérőt 30 °C-on, 5 napon át működtettük, és a biológiai bontási folyamat során a mikroorganizmusok által elhasznált oxigén mennyiséget mértük [82]. A SOUR-t ($\text{mg O}_2/\text{g MLVSS}\cdot\text{h}$) a kapott O_2 fogyási-idő görbéből, valamint az iszap MLVSS tartalma alapján számítottuk ki.

A SAOR, SNOR, SNIRR és SNRR ($\text{mg N/g MLVSS}\cdot\text{h}$) meghatározására 500 mL térfogatú Erlenmeyer lombikot használtunk, amelybe 50 mL kevert granuláris iszapot és 350 mL szintetikus szennyvizet töltöttünk, amit a mérés során folyamatosan mágneses keverővel kevertettük. A SAOR, SNOR, SNIRR és SNRR mérése során a következő nitrogénforrásokat használtuk: NH_4Cl , NaNO_2 , NaNO_2 és NaNO_3 . Bemért mennyiségük megegyezett a 60 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$, 30 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$, 90 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$ és 90 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ koncentrációkkal. A SAOR és SNOR meghatározására az Erlenmeyer lombikba folyamatosan levegőt juttatunk be, míg a SNIRR és SNRR meghatározása során nitrogén gázt vezettünk a lombikba [83]. Kiszámításuk a minta $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ és $\text{NO}_3\text{-N}$ koncentrációk időbeli változása és az iszap MLVSS mennyisége alapján történt.

A SPRR meghatározásához az iszapmintát a levegőztetési fázis végén vettük a bioreaktorból, ezt követően pedig a mintában foszfor eltávolítása érdekében az iszapot desztillált vízzel háromszor átmostuk. Az így kapott mintát 500 mL térfogatú Erlenmeyer lombikba

helyeztük, amelyet a mérési sorozat időtartama alatt folyamatosan, szobahőmérsékleten kevertettünk. Az anaerob környezet kialakítása érdekében a lombikba nitrogén gázt vezetünk, majd 400 mg/L KOI koncentráció eléréséig nátrium-acetátot adagoltunk. Ezt követően monitoroztuk az iszap foszfor leadási képességét, 15 percenként mértük a minta foszfortartalmát. A SPUR mérése a SPRR méréséhez hasonlóan történt, azzal a különbséggel, hogy az iszapot az anaerob fázis végén, a szintetikus szennyvíz betáplálása előtt vettük ki a bioreaktorokból, majd három alkalommal desztillált vízzel mostuk. Ezt követően a szennyvíz foszfor koncentrációját 60 mg/L-re állítottuk be K_2HPO_4 és KH_2PO_4 segítségével [84]. A SPRR és SPUR (mg P/g MLVSS*h) kiszámítása a szennyvíz foszfor koncentrációjának időbeli változása és az iszap MLVSS mennyisége alapján történt.

4.5. DNS kinyerése, polimeráz láncreakció (PCR), denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) és 16S rRNS gén szekvenálás

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a szennyvíztisztítás folyamatában részt vevő mikroorganizmusokat, mintákat vettünk az eleveniszapból, a granuláris iszapból és a részecskékkel terhelt rendszerekből. A kísérletekhez három párhuzamos ismétlést végeztünk. A genomi DNS kinyeréshez a DNeasy PowerSoil Kit-et használtuk a gyártó utasítása szerint. Minden kísérletnél 1,5 mL mintát centrifugáltunk össze (5000 g, 4 °C-on 2 perc). A kivont DNS koncentrációját fluoriméter (Qubit, Invitrogen) segítségével határoztuk meg és ezeket a DNS mintákat használtuk templátként a PCR kísérletekben. A PCR reakciókban alkalmazott eubaktériumspecifikus primereket a 4.1. táblázat tartalmazza. A 16S rRNS gének V3-V4 régiók amplifikálását baktérium specifikus, EubA és EubB primerek segítségével végeztük el.

4.1. Táblázat. A használt PCR primer szekvenciák

Primer	Pozíció	Szekvencia (5'-3')	Hivatkozás
EubB (27F)	8-27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	[85]
EubA (1522R)	1509-1522	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	[85]
341F	341-357	CCTACGGGAGGCAGCAG	[86]
341F-GC ^a	341-357	GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG	[87]
907R	907-928	CCCCGTC AATTCCTTTGAGTTT	[87]

^aGC-clamp a 341F primer végén: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG

Az első PCR reakció elegy 3 µL PCR 10X puffert; 3 µL 2 mM-os dNTP-t; 1,8 µL 25 mM-os $MgSO_4$ -ot; 0,6 U KOD Hot Start DNS polimerázt (Novagen); 0,9 µL mindkét primerből (10 µM) és 1 ng DNS templátot tartalmazott 30 µL végtérfogatra összeszerve. Az amplifikációt

PTC 200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) rendszerben végeztük el a 4.2. táblázatban látható ciklusokat alkalmazva. A PCR termékek minőségét 1 %-os agaróz gélen vizsgáltuk.

4.2. táblázat. A 16S rDNS amplifikálásához alkalmazott PCR reakciók hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklus szám
Elődenaturáció	95 °C	5 perc	1
Denaturáció	95 °C	20 mp	30
Hibridizáció	55 °C	10 mp	
Extenzió	70 °C	40 mp	
Végső extenzió	70 °C	5 perc	1

A második PCR-ben a 16S rRNS gén V3-V8 variábilis régiójának amplifikációját és a GC-clamp kapcsolódását a 341F-GC és a 907R primerek alkalmazásával hajtottuk végre. A második PCR reakció elegy 3 µL PCR 10X puffert; 3 µL 2 mM-os dNTP-t; 1,8 µL 25 mM-os MgSO₄-ot; 0,6 U KOD Hot Start DNS polimerázt (Novagen); 0,9 µL-t mindkét primerből (10 µM) és 1 µL 16S rRNS gén amplikont tartalmazott 30 µL végtérfogatra kiegészítve ioncserélt vízzel. Az amplifikációt PTC 200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) rendszerben végeztük el a 4.3. táblázatban látható ciklusokat alkalmazva. A PCR termékek minőségét 1,5 %-os agaróz gélen vizsgáltuk.

4.3. táblázat. A 16S rDNS gén V3-V8 variábilis régiójának amplifikációjához alkalmazott PCR reakciók hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklus szám
Elődenaturáció	95 °C	2 perc	1
Denaturáció	95 °C	20 mp	6
Hibridizáció	63 °C	10 mp	
Extenzió	70 °C	15 mp	
Hibridizáció	55 °C	10 mp	9
Végső extenzió	70 °C	5 perc	

A denaturáló gradiens gélelektroforézist (Denaturing gradient gel electrophoresis–DGGE) előzetes kísérleteink alapján 50-60%-os denaturáló gradiens koncentráció mellett, 8%-os poliakrilamid gélen (37:1 akrilamid - bisz akrilamid 1x TAE pufferben [(0,04 M Tris-acetát és 0,001 M EDTA)]) DCode System (Bio-Rad Laboratories) rendszerben végeztük. A denaturáló ágens urea és formamid volt (a 100 mL 100%-os koncentrációjú denaturáló oldat 40 mL

formamidot és 42 g ureát tartalmazott). A futtatáshoz minden mintából 6 µL-t vittünk fel. A futtatást 60 °C-on, 100 V feszültségen, 1x TAE pufferben 16 órán át végeztük. Az elektroforézis után a gélt 30 percig etídium-bromiddal (Sigma-Aldrich) (0,5 µg/mL 1x TAE pufferben) festettük, majd UV fény alatt vizsgáltuk és digitalizáltuk. A digitalizált gélt PyElph 1.3 szoftverrel elemeztük és a súlyozás nélküli pár csoport módszer számtani átlag (Unweighted pair group method with arithmetic mean–UPGMA) módszerrel dendogramot készítettünk [88].

A 16S rRNS gének szekvenálása alapján meghatározható a részecskék hatása a különböző baktériumtörzsekre, amelyek fontos szerepet játszanak a granulumos szennyvíztisztítási folyamat során. Ezért a gélből az egyedi sávokat kivágtuk és 50 µL Milli-Q vízben 4 °C-on 12 órát áztattuk. Ezt követően 5 µL felülúszót, mint templátot használtuk az újraamplifikálás során. A DNS szekvenálást 341F és 907R primereket használva Microsynth AG szekvenáló berendezésben végeztük el. A kapott szekvenciákat a Biotechnológiai Információs Központ (National Center for Biotechnology Information–NCBI) adatbázisával hasonlítottuk össze [89].

4.6. Újgenerációs, 16S riboszómális RNS metagenomikai szekvenálás

A granuláris iszapmintákat 16S rRNS Illumina MiSeq újgenerációs szekvenálási eljárással vizsgáltuk, amelynek metagenomikai elemzését a Xenovea Kft. (www.xenovea.com) végezte el MiSeq (Illumina, USA) berendezést használva, majd a kapott adatokat feldolgoztuk, elemeztük és kiértékeltek. A kapott paired-end-es leolvasások 2 x 300 bp hosszúságúak voltak. A metagenomikai vizsgálatok eredményeit, az Illumina Miseq szoftver a 16S rRNS adatok adatbázisának felhasználásával osztályozza az organizmusokat a V3 és V4 ampikonból. Az osztályozás a Greengenes adatbázison (<http://greengenes.lbl.gov/>) alapul. Ennek az eredménye egy osztályozás a következő taxonómiai szinteken: ország, törzs, osztály, rend, család, nemzetség és faj. A kapott eredményeket az Origin (8.5.1.) szoftver segítségével ábrázoltuk a dolgozatban. A szekvenciákat az NCBI GenBank nemzetközi szekvencia- adatbázisban helyeztük el (projekt szám: PRJNA670422).

4.7. Statisztikai elemzések

A redundancia elemzést (Redundancy analysis–RDA) a GO NP mennyiségének növelése, a bioreaktorok teljesítménye és a mikrobiális közösség közötti összefüggés meghatározása érdekében végeztük el. Az RDA elemzést a GO NP koncentrációk, az EPS mennyiségek, a vízkémiai paraméterek, valamint az iszaptól azonosított nemzetségek alapján végeztük el [90].

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a szénalapú nanoanyag hatásának mértékét, mely anyag fejtette ki legkisebb, valamint a legerőteljesebb hatást a granuláris iszapra, főkomponens analízist (Principal component analysis–PCA) végeztünk el [91]. Az eredmények szignifikanciájának tesztelésére egytényezős varianciaanalízist (Analysis of variance–ANOVA) hajtottunk végre, ahol a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak [92]. A fajszámbecslő index (Chao) és alfa-diverzitás vizsgálata során a Simpson és Shannon diverzitásindex-értékeket meghatározásához az Morthur programot használtuk.

5. Eredmények és kiértékelésük

5.1. A grafén-oxid nanorészecskék hatása az aerob granuláris iszapos, szakaszos üzemű szennyvíztisztító rendszerben

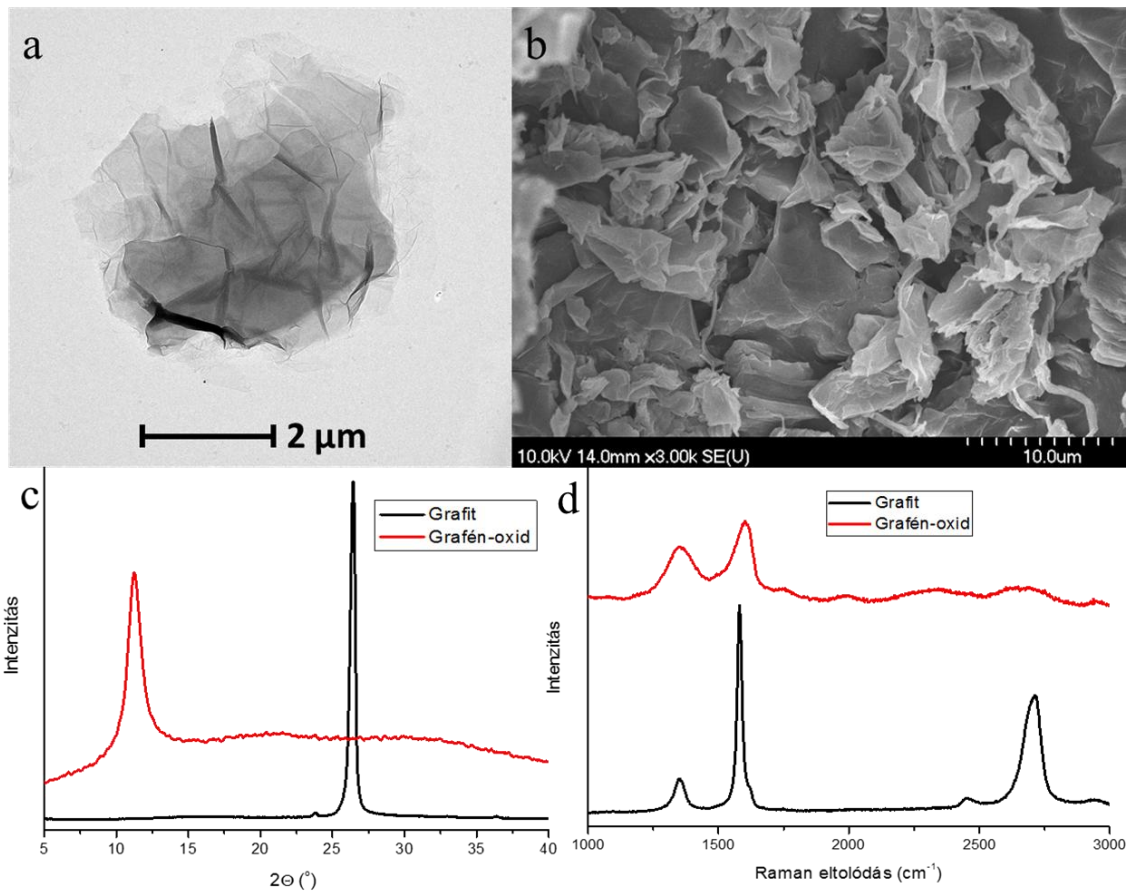
Figyelembe véve, hogy a GO nanorészecskék előállításának mennyisége a számos alkalmazási lehetőség miatt a jövőben valószínűleg növekedni fog, továbbá krónikus hatásuk a granuláris iszapos szennyvíztisztítási technológiára még ismeretlen. A kutatás első szakaszában ezen nanorészecske vizsgálatára fókuszáltunk. Fő célunk az volt, hogy széles (5-95 mg/L) koncentrációtartományban megvizsgáljuk a GO NP hosszú távú hatását a szakaszosan működő AGS biológiai szennyvíztisztítási folyamatára, tanulmányozva a tisztítási hatékonysági fokot, az EPS mennyiségét és a mikrobiális közösségre gyakorolt hatást. Eredményeinket összehasonlítottuk a legelterjedtebben használt CAS folyamatra vonatkozó irodalmi adatokkal, mely kísérletek során a GO részecskéknek már kis koncentrációban is negatív hatása volt a biológiai folyamatokra. Ezáltal meg tudtuk válaszolni azt a kérdést, hogy az AGS jobban tolerálja vagy sem a GO-t, mint a CAS rendszer. Szerettük volna elkerülni, hogy az ábrákon látható adatok zsúfoltak, ezáltal átláthatatlanok legyenek. Ezért a GO NP hatásának eredményeit 5, 45, 65 és 85 mg/L mennyiségben a bioreaktorok működésére a **mellékletekben** tüntettük fel (1., 2., 3. és 4. melléklet), melyek eredményei szorosan követik az alább ábrázoltakét.

Az AGS bioreaktorokat 7 napig GO részecske tartalmú (5-95 mg/L) szintetikus szennyvízzel tápláltuk. A kísérletek alatt monitoroztuk a bioreaktorok működését, mérve a KOI, $\text{NH}_4\text{-N}$, nitrit nitrogén ($\text{NO}_2\text{-N}$), nitrát nitrogén ($\text{NO}_3\text{-N}$) és foszfát ($\text{PO}_4\text{-P}$) eltávolítási hatásfokát az elfolyó tisztított vízben. A kimenő víz GO nanorészecske tartalmát is vizsgáltuk Raman spektroszkópiás módszerrel. A kísérletek végén a biomassza és EPS mennyiségét is mértük. Emellett a mikrobiális közösségben történő változásokat is vizsgáltuk 16S rRNS gén szekvenálási módszerrel.

5.1.1. GO nanorészecskék jellemzése

Az előállított nanorészecskék méretét és alakját TEM és SEM segítségével határoztuk meg. A felvételeken (5.1a-b. ábra) megfigyelhető a GO redőzött lemezes szerkezete [93,94]. Az XRD eredmények alapján (5.1c. ábra) megállapítható az oxidáció sikeressége, mivel egy nagy intenzitású, keskeny csúcs jelent meg $2\theta = 11,24^\circ$ -nál, míg a grafit esetében látható a rá jellemző csúcs $2\theta = 26,44^\circ$ -nál [95]. A Raman spektroszkópiás mérések (5.1d. ábra) alapján látható, hogy a GO előállításához használt grafit por esetében a D csúcs $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ körül kis intenzitású, míg

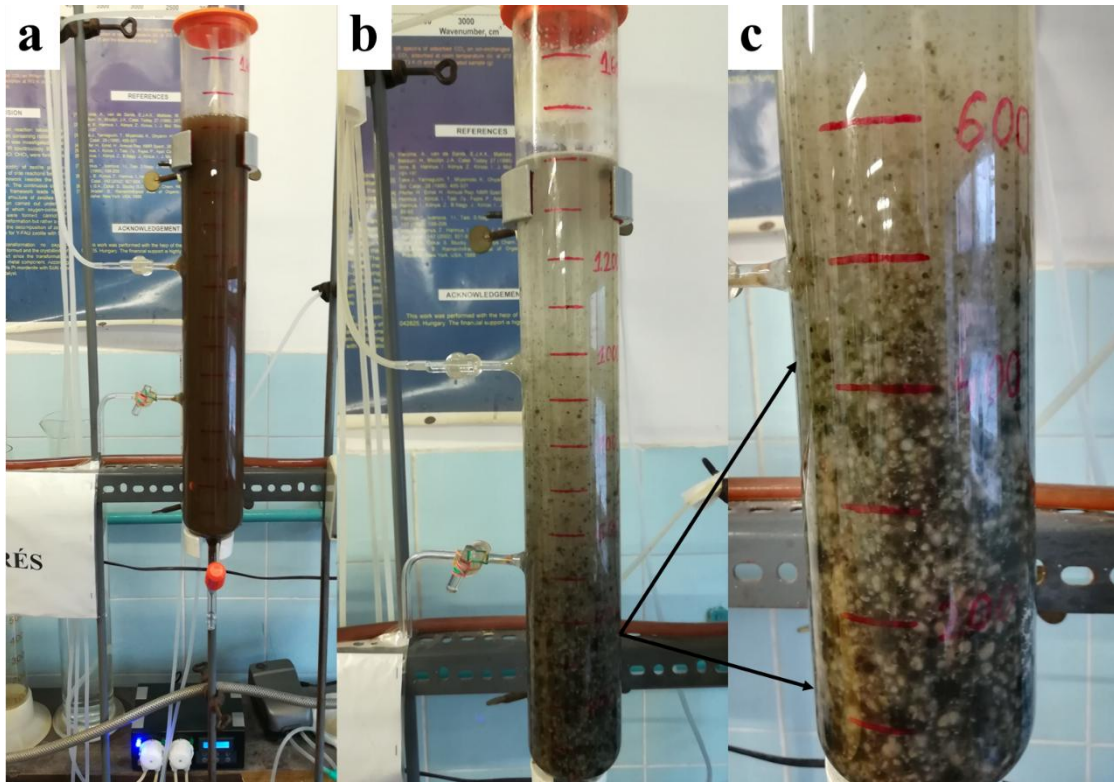
a GO esetében egy intenzív csúcs jelenik meg. A grafén-oxidra jellemző mindkét, G (1602 cm^{-1}) és D ($1354,5\text{ cm}^{-1}$) csúcs megtalálható [96,97].



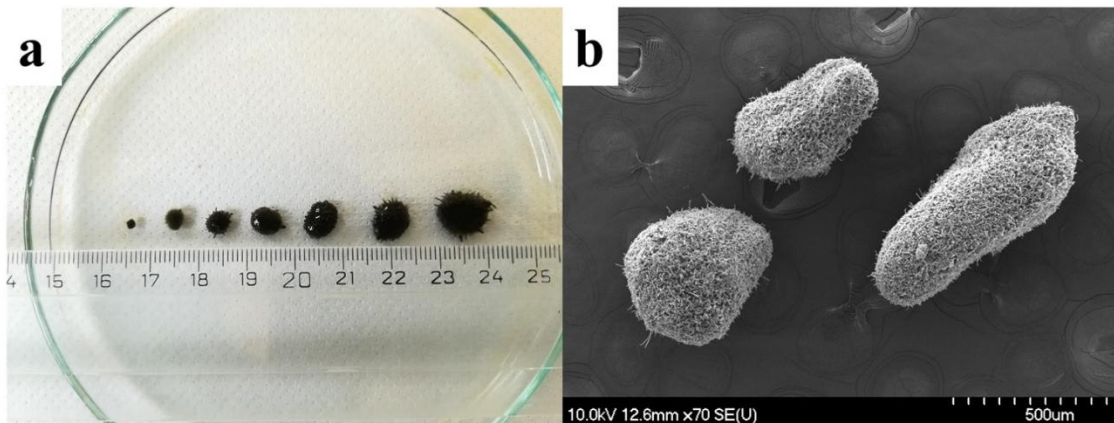
5.1. ábra. **a)** a grafén-oxid (GO) transzmissziós elektron mikroszkóp felvétele; **b)** a GO pászta elektron mikroszkóp felvétele; **c)** a grafit és GO röntgen diffraktometriás (XRD) spektruma; **d)** a grafit és a grafitból előállított GO részecskék Raman spektruma.

5.1.2. Granulumok képződése

A frissen gyűjtött eleveniszapból az általunk alkalmazott körülmények és paraméterek mellett (5.2a. ábra) már 18 nap elteltével kisméretű ($0,5\text{-}0,7\text{ mm}$) granulumok jelentek meg, míg négy hét elteltével a granulum képződés végbement (5.2b-c. ábra). A kialakult granulumok mérete $0,5\text{-}10\text{ mm}$ között változott (5.3a-b. ábra), átlagos méretük pedig $2\text{-}3\text{ mm}$ között alakult.

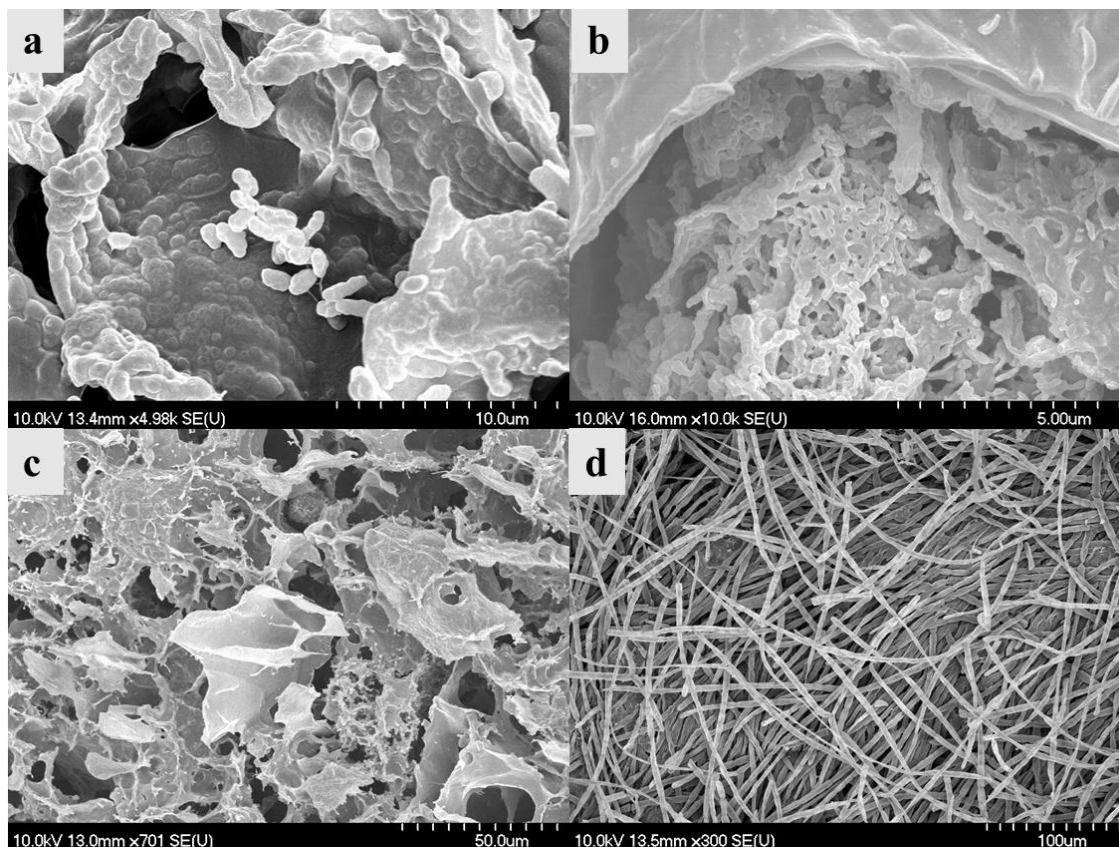


5.2. ábra. a) eleveniszap inokulum; b) és c) a kialakult granulumok 4 hét elteltével a bioreaktorban.



5.3. ábra. a) a kialakult granulumok mérete; és b) pásztázó elektron mikroszkópos (SEM) felvétele.

A granulumok felszínén jól láthatóak az EPS mátrixba beágyazódott mikroorganizmusok, amelyek főként gömb alakúak (5.4a. ábra) voltak, míg a belső részben már pálcika alakú baktériumok is megtalálhatóak voltak (5.4b. ábra).



5.4. ábra. A granulomok pásztázó elektron mikroszkópos (SEM) felvételei: **a)** granulum felülete; **b)** granulum belseje; **c)** grafén-oxid (GO) részecske a granulum felszínén; **d)** a granulum felülete 95 mg/L GO adagolás után.

A granulum képződés során a MLSS 2,3 g/L értékről 6,2 g/L-re növekedett, továbbá a SVI₅ 219 mL/g-ról 32 mL/g-ra csökkent. Az AGS bioreaktor ülepedési képessége kiváló lett, mivel az ülepedési sebesség 0,20 m/órától 53 m/óra-ra növekedett. Az elfolyó KOI, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N és PO₄-P tartalma $83 \pm 1,65$; $0,05 \pm 0,01$; $0,03 \pm 0,01$; $0,312 \pm 0,01$ és $0,79 \pm 0,12$ mg/L, míg a KOI, NH₄-N és PO₄-P tisztítási határfoka pedig 93,50%; 99,95% és 96,01% volt.

5.1.3. GO részecskék hatása a bioreaktorok működésére

A GO részecskék még 95 mg/L koncentrációban alkalmazva sem voltak kimutathatóak az elfolyó vízben a Raman spektroszkópiás mérések szerint, amely módszer már 1 µg mennyiség grafén-oxidot is képes érzékelni. Ebből arra következtettünk, hogy a nanorészecskék az iszapban halmozódtak fel, így nem jutnak ki a környezetbe további negatív hatást okozva a vízi környezetre.

Az adagolt GO nanorészecskék AGS bioreaktorok működésére kifejtett hatását a főbb vízkémiai paraméterek (KOI, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N és PO₄-P) mérésével követtük nyomon, továbbá a granuláris iszap tulajdonságait (MLSS, ülepedési sebesség és SVI₅) is meghatároztuk.

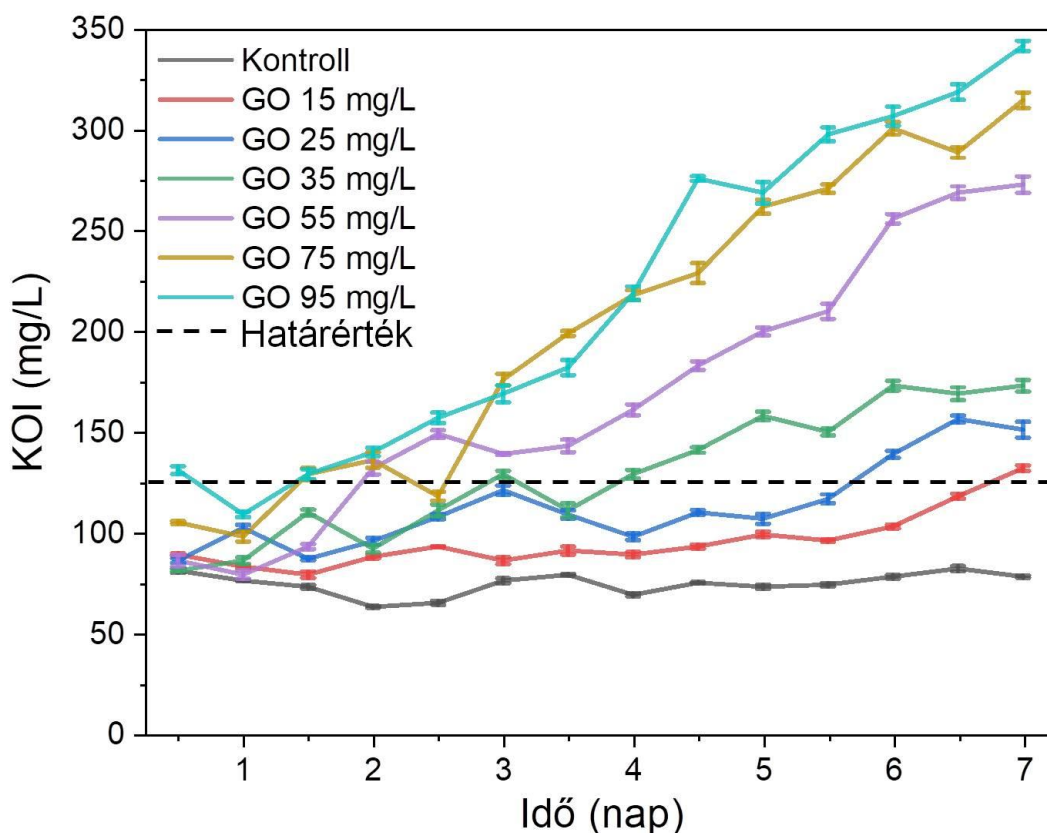
Az eredmények átláthatósága érdekében a hetedik napon mért vízkémiai paraméterek adatait táblázatban foglaltuk össze, amelyben megtalálhatóak a mért vízkémiai paraméterek kezdeti koncentrációja, a hetedik napon mért koncentrációjuk az elfolyó/tisztított szennyvízben, valamint eltávolítási hatásokuk is. Ezen felül feltüntettük az egyes kísérleti fázisok során bejutó GO NP mennyisége is (5.1. táblázat).

5.1. táblázat. Az elfolyó szennyvíz hetedik napon mért vízkémiai paraméterei: a kémiai oxigén igény (KOI), ammónia nitrogén (NH₄-N) és foszfát (PO₄-P) eltávolítási hatásokok, az iszap szuszpendált lebegőanyag tartalma (MLSS), az iszap térfogati index (SVI₅), valamint a kísérletek során bejutó grafén-oxid (GO) mennyisége. A bemenő szennyvíz KOI, NH₄-N és PO₄-P koncentrációja 1300, 120 és 20 mg/L.

Szennyvíz paraméterek	Bemenő szintetikus szennyvíz GO NP tartalma (mg/L)						
	0	15	25	35	55	75	95
Kimenő KOI (mg/L)	78,00	132,00	151,10	173,42	273,00	315,00	342,00
KOI eltávolítási hatásfok (%)	94,00	89,85	88,38	86,69	79,00	75,77	73,69
Kimenő NH ₄ -N (mg/L)	0,05	0,95	2,36	3,29	7,21	13,47	21,69
NH ₄ -N eltávolítási hatásfok (%)	99,96	99,21	98,03	97,26	93,99	88,78	81,93
Kimenő PO ₄ -P (mg/L)	0,82	3,39	4,13	4,35	5,21	6,12	6,32
PO ₄ -P eltávolítási hatásfok (%)	95,88	83,05	79,36	78,25	73,93	69,40	68,40
MLSS (g/L)	6,20	7,90	7,61	6,72	5,97	3,42	3,34
SVI ₅ (mL/g)	32	30,24	35,69	54,31	107,61	162,95	182,08
Össze bemenő GO mennyiség (mg)	0,00	441,00	735,00	1029,00	1617,00	2205,00	2793,00

A GO nanorészecskék 15 mg/L koncentrációban a KOI eltávolításának hatásfokát jelentősen nem befolyásolták a kontroll bioreaktorral összehasonlítva, csak 6,5 napot követően volt észlelhető egy kis emelkedés az elfolyó vízben (5.5. ábra). Amikor a szintetikus szennyvíz GO nanorészecske koncentrációja 25 és 35 mg/L volt, a KOI koncentráció enyhén megnövekedett 5 és 3,5 nap után, míg hét nap elteltével a kimenő vízben $151 \pm 3,9$ és $173 \pm 2,9$ mg/L volt a KOI koncentrációja. 55 mg/L GO hatására a KOI eltávolítási hatásfoka a második napon már elkezdett csökkenni, hét nap elteltével már jelentősebben csökkent. A grafén-oxid koncentrációjának növelése 75 mg/L-re már egy nap után erőteljes KOI eltávolítás csökkenést eredményezett. Ez arra utalhat, hogy amikor a GO NP mennyisége lassabban emelkedett, a granuláris iszapban lévő mikroorganizmusok képesek voltak alkalmazkodni az új környezeti

körülményekhez. Ezt a jelenséget a szennyvíz tisztítás során a NaCl és a króm(VI) esetében is megfigyelték korábban [98,99]. A KOI koncentráció 95 mg/L GO adagolás esetében is egy nap elteltével folyamatosan emelkedett az elfolyó szennyvízben, hét nap után pedig a KOI értéke $342 \pm 2,5$ mg/L körül volt, míg a tisztítási hatások 73,7%-ra csökkentek.



5.5. ábra. A kémiai oxigén igény (KOI) koncentrációja a kimenő szennyvízben a kontroll aerob granuláris iszapos (AGS) bioreaktor és a különböző mennyiségű grafén-oxiddal (15, 25, 35, 55, 75 és 95 mg/L) szennyezett AGS bioreaktorok esetében. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.

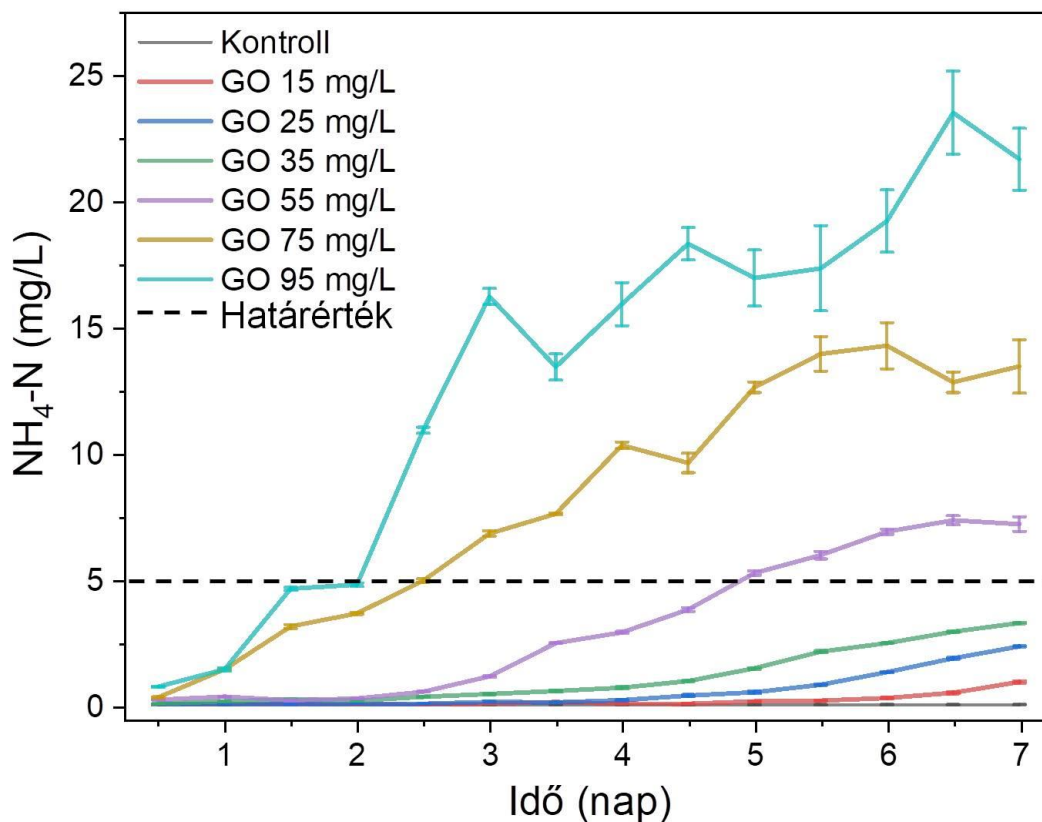
Az irodalomban eleven iszapos rendszerekben is hasonlóan figyeltek meg, a GO nanorészecskék a KOI eltávolítás hatásfokának csökkenését eredményezték. Például, a szintén szakaszos üzemű (12 óra/ciklus) 3,5 L hasznos térfogatú bioreaktorban 13 mg GO akkumulációja esetében három nap után a KOI koncentrációja az elfolyó vízben meghaladta a 91/271/EGK irányelv által előírt határértéket (125 mg/L) [60]. Ahmed és Rodrigues batch kísérleteiben (5 óra, 20 mL eleveniszap) a GO már tíz mg/L koncentrációban is szerves anyag eltávolítás csökkenést okozott [58]. Esetünkben 25 mg/L GO adagolás eredményeképpen (900 mg GO akkumuláció) hat nap elteltével lépte át a KOI koncentráció a törvényben előírt határértéket. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a granuláris iszap jobban tolerálta a GO részecskék jelenlétét, mint

az eleven iszap, mivel negatív hatást csak magasabb GO részecske koncentrációesetében figyeltünk meg.

A GO nanorészecskék adagolása a nitrit és nitrát koncentrációját a kimenő vízben nem befolyásolta. A kísérletek során a koncentrációjuk stabil maradt, csakúgy, mint a kontroll reaktorban. A denitrifikáló baktériumok, amelyek a nitrit és nitrát eltávolítását végzik, többnyire anoxikus vagy fakultatív anaerob mikroorganizmusok, így a granulum belső részében helyezkednek el, ezért a grafén-oxiddal szemben védve vannak [72]. Így feltehetően a nanorészecskék nem tudtak behatolni a granulum belső szerkezetébe és ott negatív hatást kifejteni. Ez valószínűleg a polimer anyagoknak köszönhető, mivel védelmet biztosítanak a mikroorganizmusok számára (5.4c. ábra) [100].

A GO hatása az ammónia koncentrációra az 5.6. ábrán látható. A kontroll rendszerben a $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfoka 99,95% volt. Amíg 15 mg/L koncentrációban a GO részecskék nem okoztak jelentős hatékonyság csökkenést, addig 25, 35 és 55 mg/L GO esetében az elfolyó vízben az ammónia koncentrációja már 5,5; 4 és 2,5 nap elteltével emelkedni kezdett, a hetedik napon $2,36 \pm 0,03$; $3,29 \pm 0,03$ és $7,21 \pm 0,29$ mg/L volt. A GO NP koncentrációjának 75 és 95 mg/L-re történő emelése a $\text{NH}_4\text{-N}$ tartalom erőteljes növekedését eredményezte ($13,47 \pm 1,06$ és $21,69 \pm 1,23$ mg/L), az eltávolítási hatásfok $88,7\% \pm 1,5\%$ és $81,9\% \pm 1,1\%$ -ra csökkent.

He és mtsai. hasonló megfigyeléseket írtak le a ZnO NP AGS-re gyakorolt hatásáról, ahol 20 mg/L ZnO hatására az $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfoka 99,4%-ról 75,25%-ra csökkent már egy hét elteltével a hosszú idejű kitettség következtében [70]. Nguyen és Rodrigues eleveniszapos rendszerében a kis GO koncentráció (5 mg/L) hatására már négy napot követően az elfolyó víz ammónia tartalma megnövekedett (a tisztítási hatásfok 30%-ra csökkent) és a szennyvíz minősége nem felelt meg a törvényben meghatározott határértékeknek [60].

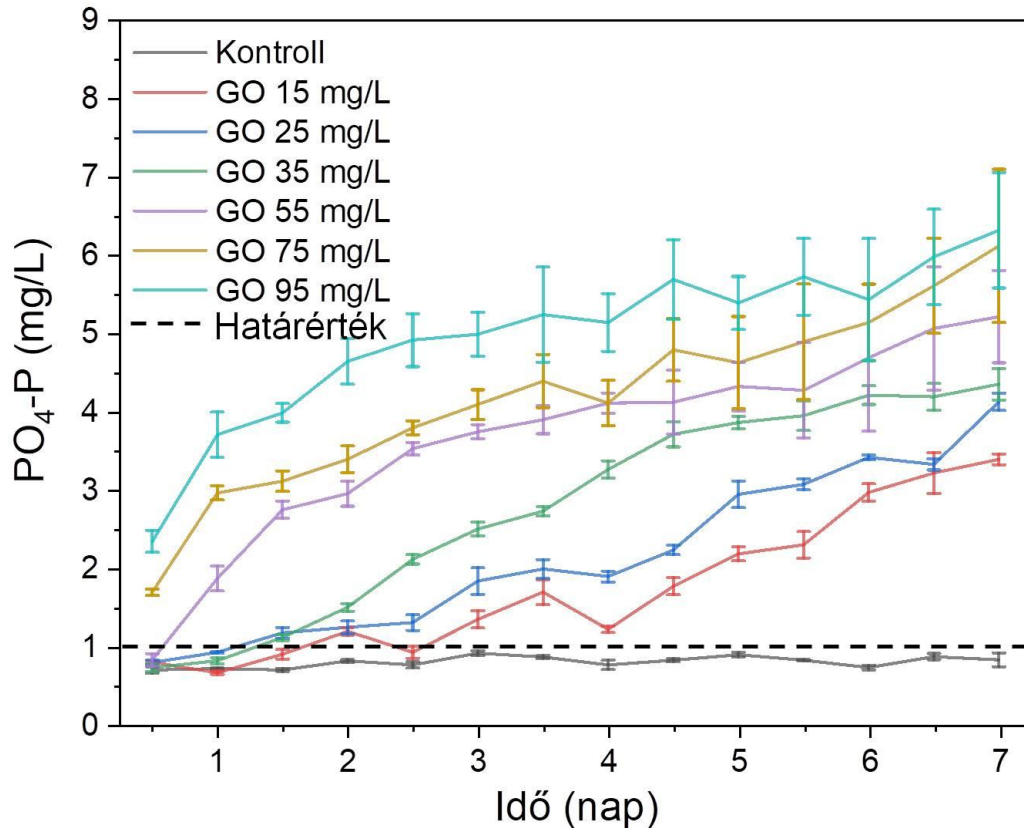


5.6. ábra. Az ammónia-nitrogén ($\text{NH}_4\text{-N}$) koncentrációja a kimenő szennyvízben a kontroll aerob granuláris iszapos (AGS) bioreaktor és a különböző mennyiségű grafén-oxiddal (15, 25, 35, 55, 75 és 95 mg/L) szennyezett AGS bioreaktorok esetében. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.

Egy előző kísérletben (batch test, 60 mg/L GO koncentráció) kimutatták, hogy a granuláris iszap nitrifikáció és a denitrifikáció folyamataira nem voltak hatással a GO részecskék, viszont ebben az esetben a kísérlet időtartama csupán négy óra volt [74]. Kísérletünkben az 55 mg/L koncentrációban alkalmazott GO NP hatására a nitrifikáció mértéke két és fél nap elteltével csökkent. 95 mg/L GO adagolás mellett már egy nap alatt csökkent a nitrifikáció, amikor az akkumulálódott GO mennyiség 285 mg volt. Ez arra enged következtetni, hogy a GO nanorészecskék képesek negatív hatást kifejteni a nitrifikációra, viszont csak egy bizonyos idő elteltével és a megnövekedett grafén-oxid mennyiség következtében.

A foszfor eltávolítás hatásfokára a GO nanorészecskék már kis koncentrációban is negatív hatást fejtettek ki (5.7. ábra). A kontroll AGS bioreaktorban a kimenő víz $\text{PO}_4\text{-P}$ koncentrációja 1 mg/L alatt volt. A foszfát koncentrációja a kezelt vízben 15 és 95 mg/L GO koncentrációk esetében hét nap elteltével $3,39 \pm 0,07$ és $6,32 \pm 0,11$ mg/L értékre növekedett, míg az eltávolítási hatásfok 83,05% és 68,4%-ra csökkent. Eleveniszapos rendszerekben is hasonlókat figyeltek meg,

ahol a GO már kis koncentrációban hét nap után a foszfát eltávolítási hatásfokát 40%-ra csökkentette [60]. Az aerob granuláris iszap foszfát eltávolítási képessége csökkent más nanorészecskék esetében is, mint például ZnO vagy CuO, viszont csak magasabb koncentrációk esetében [71, 72, 99].



5.7. ábra. A foszfát ($\text{PO}_4\text{-P}$) koncentrációja a kimenő szennyvízben a kontroll aerob granuláris iszapos (AGS) bioreaktor és a különböző mennyiségű grafén-oxiddal (15, 25, 35, 55, 75 és 95 mg/L) szennyezett AGS bioreaktorok esetében. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.

Egy lehetséges magyarázat a nanorészecskék anyag és szerkezetbeli különbsége. Az említett ZnO NP és CuO NP közel gömb alakúak voltak, míg a GO NP lemezes szerkezetűek (5.1a-b. ábra). A szennyvíztisztítás során a granulumok a reaktorban folyamatos mozgásban vannak, így a lemezes szerkezet jelentősebb fizikai hatást fejthet ki. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a GO NP gátolta a polifoszfát akkumulálására képes mikroorganizmusok (PAO) metabolikus működését, így azok nem voltak képesek a foszfort intracelluláris polifoszfátként felhalmozni, ezért a foszfor a szennyvízből való eltávolítása csökkent [101]. Továbbá a megnövekedett ammónia mennyiség is gátolhatja a foszfát hasznosítását, mivel a PAO-k érzékenyek a magas ammónia koncentrációra [102].

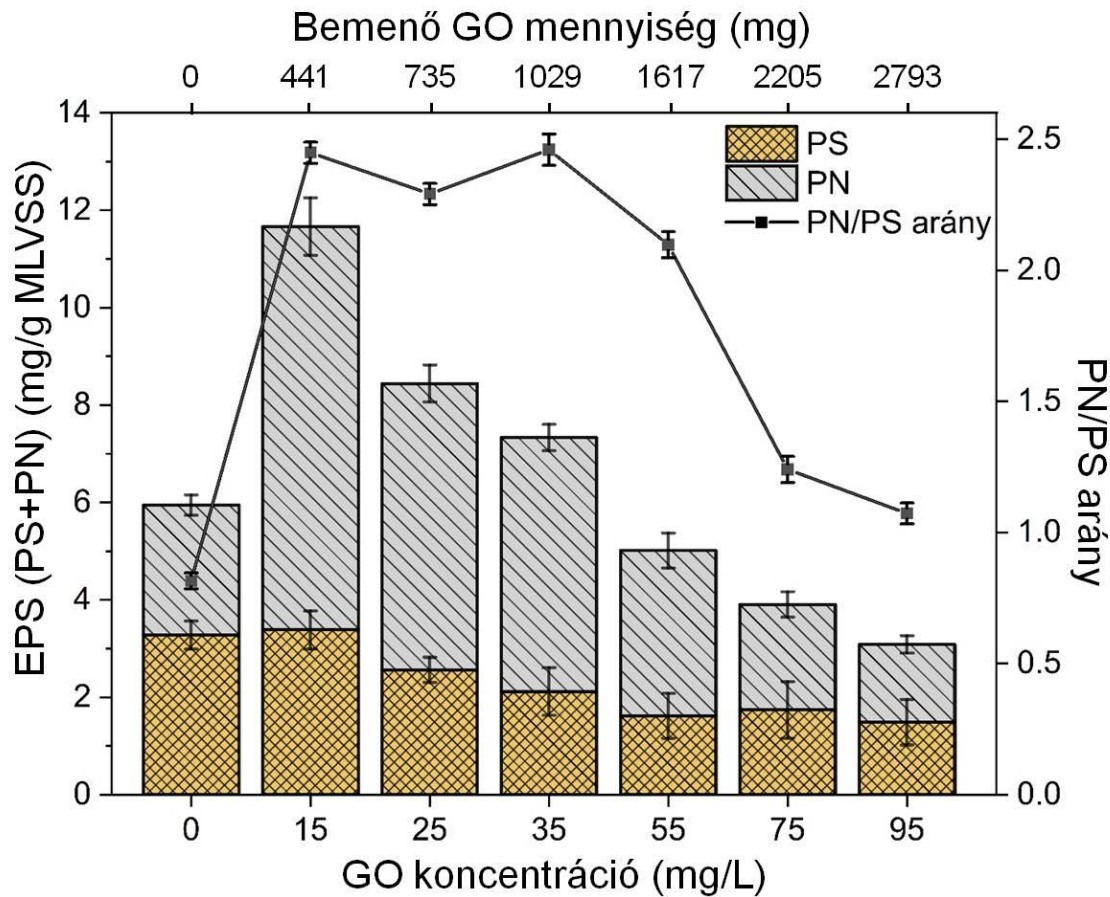
A kísérleteket $6,2 \pm 0,1$ g/L MLSS koncentrációval indítottuk el. A kontroll rendszerben ez az érték nem változott. A GO 15 mg/L koncentrációban alkalmazva az MLSS tartalom növekedését eredményezte ($7,9 \pm 0,14$ g/L), azaz a biomassza mennyiségére pozitív hatással volt. 25 és 35 mg/L GO esetében az MLSS tartalom növekedett ($7,6 \pm 0,07$ és $7,02 \pm 0,11$ g/L MLSS) a kontrollhoz képest, viszont nem volt magasabb a 15 mg/L GO-val kezelt rendszerhez viszonyítva. A GO koncentráció 75 és 95 mg/L-re emelése az MLSS erőteljes csökkenését eredményezte, a kísérletek végén az MLSS koncentrációja $3,4 \pm 0,24$ és $3,3 \pm 0,31$ g/L volt, az ülepedési sebesség 21 m/óra csökkenett és az SVI₅ $182 \pm 0,16$ mL/g-ra növekedett. A granulomok szerkezete megváltozott, a felületükön fonalas mikroorganizmusok jelentek meg (5.4d. ábra), elveszítették kezdeti összetett és tömör szerkezetüket.

A szennyvíztisztítás során korábban leírták, hogy a biomassza mennyisége jelentősen befolyásolja a KOI és nitrogén eltávolítási hatásfokát [49]. Az eredményeink megerősítették ezt, mivel az AGS alacsony koncentrációjú GO-val szemben ellenállóbb volt, viszont a magasabb koncentráció negatívan hatott a bioreaktorok működésére (a nanorészecskék a granuláris iszapban felhalmozódtak a folyamatos adagolás miatt), gátolta a biomassza képződését, valamint a KOI és nitrogén eltávolítását. A biomassza mennyiségének változása a foszfor eltávolítására nem volt közvetlen hatással. A gátló hatást más nanorészecskék esetében is megfigyelték, mint az ezüst, cink és réz. A legtöbb esetben kimutatták, hogy a csökkenő tápanyag eltávolítás hatékonysága összefüggött a granuláris iszap EPS mennyiségével [70–72,103].

5.1.4. GO részecskék hatása az EPS mennyiségére

Az EPS mennyiségét az AGS bioreaktorokban a kísérletek végén, a hetedik napon mértük meg. A kontroll rendszerben az EPS, PS és PN mennyisége 5,95; 3,27 és 2,68 mg/g MLVSS, míg PN és PS aránya (PN/PS) 0,81 volt (5.8. ábra). A GO 15, 25 és 35 mg/L koncentrációkban adagolva pozitív hatást fejtett ki az EPS termelődésére. A PS mennyisége enyhén csökkent, míg a PN kiválasztódása erőteljesen 8,28; 5,87 és 5,21 mg/g MLVSS-re növekedett. Következésképpen a PN/PS arány is növekedett, valószínűleg a környezetidegen anyag általi „heat shock” fehérjék indukálódása miatt, aminek a következménye a nagy mennyiségű fehérje kiválasztása [71]. Ezen „heat shock” fehérjék aktiválódása megnöveli a sejtek káros anyagokkal szembeni ellenálló képességét a sejtfehérjék stabilizálásával [104]. Az EPS termelődése 55, 75 és 95 mg/L GO hatására csökkent. A részecskék 95 mg/L koncentrációban az EPS, PS és PN mennyiségét 3,07;

1,48 és 1,59 mg/g MLVSS-re csökkentette, mennyiségük a kontroll granuláris iszapos rendszerhez képest körülbelül fele lett.



5.8. ábra. Az extracelluláris polimer anyag (EPS) tartalom és összetétel a kontroll bioreaktorban [0 mg/L grafén-oxid (GO)] és a különböző nanorészecske koncentrációkkal (15, 25, 35, 55, 75 és 95 mg/L GO) kezelt bioreaktorokban. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.

Az eredményeink azt sugallják, hogy a nagy mennyiségű fehérje képes védelmet biztosítani a GO nanorészecskék negatív hatásával szemben. Amikor az EPS termelődését a GO NP serkentette (15, 25 és 35 mg/L), a szerves anyag és nitrogén eltávolításában nem észleltünk jelentős negatív hatást. Ezzel ellentétben a magasabb GO koncentráció (55, 75 és 95 mg/L) csökkentette az EPS mennyiségét a granuláris iszapban, és a bioreaktorok hatásfoka csökkent. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy az EPS mennyiségének változása befolyásolta az $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfokát, mivel a PN mennyiségének csökkenése az elfolyó szennyvízben magasabb ammónia koncentrációt eredményezett.

Egy előző tanulmányban már bizonyították, hogy az EPS jelentős szerepet játszik a biológiai foszfor eltávolításában, mert a foszfor képes felhalmozódni az EPS mátrixban [38].

Továbbá kimutatták, hogy az EPS mennyiségének csökkenésével a granulum belsejében az anaerob feltételek csökkennek [105]. Esetünkben, korábbi megállapításokkal szemben, már kis GO koncentráció hatására is csökkent a foszfát eltávolításának hatékonysága, annak ellenére, hogy az EPS mennyisége magas volt. A különbség feltehetően az iszapban meglévő különböző mikrobiális közösségből eredhet [106].

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a nanorészecskék koncentrációjának növelésével a fehérje mennyiség növekedett, míg a poliszacharidoké viszonylag stabil maradt. Korábbi tanulmányokban CuO részecskék esetében ehhez hasonlóan fokozott PN termelődést figyeltek meg alacsonyabb részecske koncentrációk mellett (5 és 20 mg/L), míg magasabb nanorészecske koncentrációt alkalmazva (50 mg/L) a PN koncentrációja és a mikrobiális diverzitás is csökkent [71]. ZnO részecskék akut hatásának vizsgálata során ugyancsak serkentették a PN termelődését, míg a PS viszonylag változatlan maradt [103]. A ZnO 10 mg/L koncentrációban hosszútávon az EPS termelődését és a nitrogén eltávolítását is negatívan befolyásolta, továbbá csökkentette a bakteriális diverzitást [70].

Ezzel szemben az ezüst nanorészecskék (Ag NP) 50 mg/L koncentrációban jelentősen csökkentették a nitrifikációt és denitrifikációt, miközben a mikrobiális diverzitás nem változott a magas EPS mennyiségnek köszönhetően [72]. Az EPS és nanorészecskék fizikai, kémiai és biológiai kölcsönhatásai még nem teljesen ismertek. Az irodalomban a megfigyelt fizikai-kémiai kölcsönhatások közül az elektrosztatikus, hidrofób és sztérikus kölcsönhatásokat emelik ki. Az EPS felületére jutott nanorészecskék a mátrixon keresztül eljuthatnak a mikroorganizmusokhoz és ott sejthalált okozhatnak, magas elektron-affinitásuk miatt blokkolhatják a mikrobacejtek közötti elektronátadást, így megszakítva az elektrontranszport láncot, vagy károsítva a sejtmembránt [107,108]. A rendszerünkben megfigyelt EPS termelés csökkenését feltehetően a fent leírt jelenségek okozhatták.

Az EPS fontos szerepet tölt be a granulumos szennyvíztisztítás folyamatában. A mikrobiális közösség egy bizonyos grafén-oxid koncentrációig (35 mg/L) képes volt hatékonyan eltávolítani a szerves és szervetlen anyagokat a magas EPS mennyiség miatt. A GO felhalmozódása és toxikussága következtében az iszap EPS tartalma csökkent és valószínűleg a sejtek elhalásához vezetett. Annak érdekében, hogy feltevéseinket tisztázzuk, megvizsgáltuk a mikrobiális közösség összetételét és változását.

5.1.5. Mikrobiális közösség elemzése

A kísérletek során megvizsgáltuk a baktériumok fajösszetételének változását, ehhez az iszapból kinyert genomi DNS 16S rDNS gén szakaszát PCR segítségével amplifikáltuk, majd DGGE elválasztási-módszer után az egyedi sávokat szekvenáltuk. A vizsgálatokat a kezdeti eleveniszapon, a granuláris iszapon és a GO-val kezelt rendszereken egyaránt elvégeztük. A GO részecskékkel szennyezett rendszerekben csak azon iszapmintákat vizsgáltuk, ahol a méréseink során változást tapasztaltunk (15, 25 és 35 mg/L) hét nap elteltével. Továbbá 95 mg/L GO koncentráció esetében is, ahol az AGS bioreaktor teljesítménye jelentősen csökkent.

A kezdeti eleveniszapban a kinyert DNS koncentráció 41,19 mg/g MLVSS volt, míg a granuláris iszapban 81,46 mg/g MLVSS (közel kétszeresére emelkedett), amelyet a nagyobb biomassza sűrűséggel lehet magyarázni [109]. 15 mg/L GO kezelés után a DNS mennyisége 84,20 mg/g MLVSS volt. Magasabb grafén-oxid mennyiségek eredményeképpen (25, 35 és 95 mg/L) a DNS koncentráció csökkent 47,98; 39,52 és 23,08 mg/g MLVSS-re. Az alacsonyabb DNS koncentráció összefügghet az MLSS és EPS mennyiségével, mivel ezen paraméterek csökkenésének következtében a baktériumközösség még kitettebbé vált a külső behatásokkal szemben. Az iszapban található mikrobiális DNS mennyisége szorosan kapcsolódik az iszap szárazanyag és az EPS mennyiségéhez a szennyvíztisztítás folyamatában. Az EPS a mikroorganizmusok által kibocsátott, polimer jellegű anyagok összessége. Az EPS jelenléte és mennyisége növeli az iszap szárazanyag tartalmát, mivel az EPS nagy része vízben oldhatatlan, és hozzájárul az iszap stabilitásához, továbbá szerepet játszik a mikroorganizmusok közötti kommunikációban is. A mikrobiális DNS mennyisége az iszapban függ az iszapban jelen lévő mikroorganizmusok számától. Az iszapban található mikroorganizmusok száma és aktivitása szintén függ az iszap szárazanyag és EPS mennyiségétől. Az iszapban lévő mikrobiális DNS mennyisége tehát indikatív lehet az iszap biológiai aktivitásáról, azaz arról, hogy az iszapban milyen mértékű a mikroorganizmusok növekedése és aktivitása.

Továbbá, a DNS mennyiségének csökkenése összefügg a bioreaktorok szennyvíztisztítási határfokának csökkenésével, mivel a mikroorganizmusok mennyiségének csökkenése a szerves és szervesetlen anyagok eltávolítási határfokának csökkenését eredményezi.

A DGGE módszert a mikrobiális közösség változásának megfigyelésére alkalmaztuk. A granulum képződés során néhány faj eltűnt, míg néhányuk mennyisége az iszapban megnövekedett, így a közösség összetétele jelentősen megváltozott (5.9a. ábra).

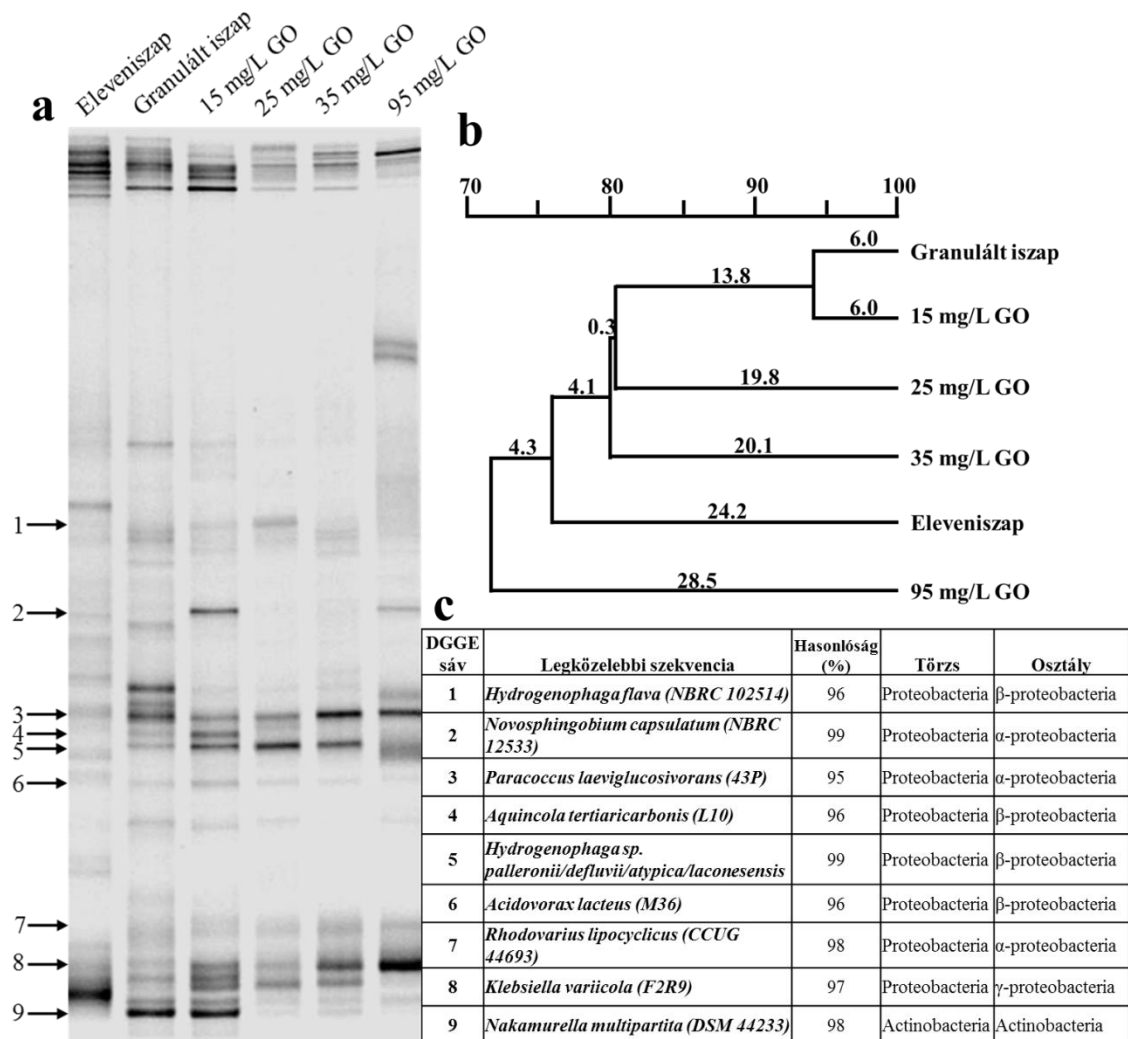
Megfigyelésünket az UPGMA elemzés is bizonyítja, mivel az eleveniszap és a granuláris iszap hasonlósága alacsony (75,8%) (5.9b. ábra) volt, melyet már mások is megfigyeltek [110].

A GO koncentráció növelése jelentős változásokat fejtett ki a közösség összetételére. Az UPGMA elemzés alapján a 15 mg/L GO tartalom kismértékű változásokat eredményezett a közösségben (94,0%-os hasonlóságot mutat a kontroll granuláris iszaphoz képest), amely alátámasztja a vízkémiai mérések eredményeit, miszerint 15 mg/L-ben alkalmazott GO koncentráció nem befolyásolta jelentősen a bioreaktor teljesítményét. A részecskék 95 mg/L koncentrációban adagolva erőteljes változásokat eredményeztek, a DGGE-n a látható sávok száma ekkor volt a legkisebb, ennek következtében a kezdeti granuláris iszaphoz képest a hasonlóság 71,5%-ra csökkent. Az UPGMA elemzés rámutatott, hogy a GO jelentős mértékben befolyásolja a granulumok mikrobiális összetételét. Tapasztalataink megegyeznek a korábbi tanulmányok megfigyeléseivel, amelyekben a növekvő nanorészecske koncentráció a mikrobiális összetételben számottevő változást eredményezett [60,70,71].

Annak érdekében, hogy további információkat kapjunk a GO mikrobiális közösségre gyakorolt hatásáról, a kivágott egyedi sávokat újra amplifikáltuk, szekvenáltuk és azonosítottuk. A baktérium azonosítások eredményei és osztályozásuk az 5.9c. ábrán látható. További egyedi sávokat is amplifikáltunk és szekvenáltunk, viszont többszöri ismétlés után sem sikerült az azonosításuk, mivel ott kettő vagy több törzs is lehetett.

A granuláris iszapot két fő törzs, *Proteobacteria* és *Actinobacteria* alkotta, melyek megléte alapvető a granulumok képződése miatt [111]. A grafén-oxiddal szemben legérzékenyebb az *Aquincola* sp. és *Nakamurella* sp., mivel 15 mg/L GO koncentráció fölött a granuláris iszapban nem voltak kimutatható mennyiségben. Ezen nemzetségeket korábban eleveniszapban, granuláris iszapban és membrán bioreaktorokban is kimutatták, szénforrásként glükózt is hasznosíthatnak és EPS termelésére is képesek lehetnek [10,112–115]. Ahogyan az 5.5, 5.8 és 5.9 ábrákon is látható, 15 mg/L GO hatására az elfolyó vízben enyhe KOI koncentráció növekedést tapasztaltuk, valamint az EPS koncentráció ekkor volt a legmagasabb. A nanorészecske koncentráció további növelésével a KOI értéke emelkedett és az EPS termelés csökkent. Az *Aquincola* és *Nakamurella* nemzetséghez tartozó mikroorganizmusok valószínűleg befolyásolták a glükóz bontását a bioreaktorokban, valamint a két nemzetség kimutathatósági szint alá csökkenése nagyban hozzájárulhatott az EPS mennyiségének csökkenéséhez. A rendszerekben kimutatható volt még a

Hydrogenophaga nemzetség több faja, melyek vizsgálataink alapján jobban tolerálták a GO jelenlétét, mivel csak a 95 mg/L GO-t tartalmazó rendszerben nem voltak kimutathatóak. *Hydrogenophaga* törzseket már AGS rendszerből is izoláltak, ahol fontos szerepet játszottak a szennyvíztisztítás folyamatában [116]. Ezen fajok a nitrát redukálására is képesek lehetnek [117], ami magyarázhatja, hogy az elfolyó szennyvízben nem mértünk nitrát mennyiség növekedést.

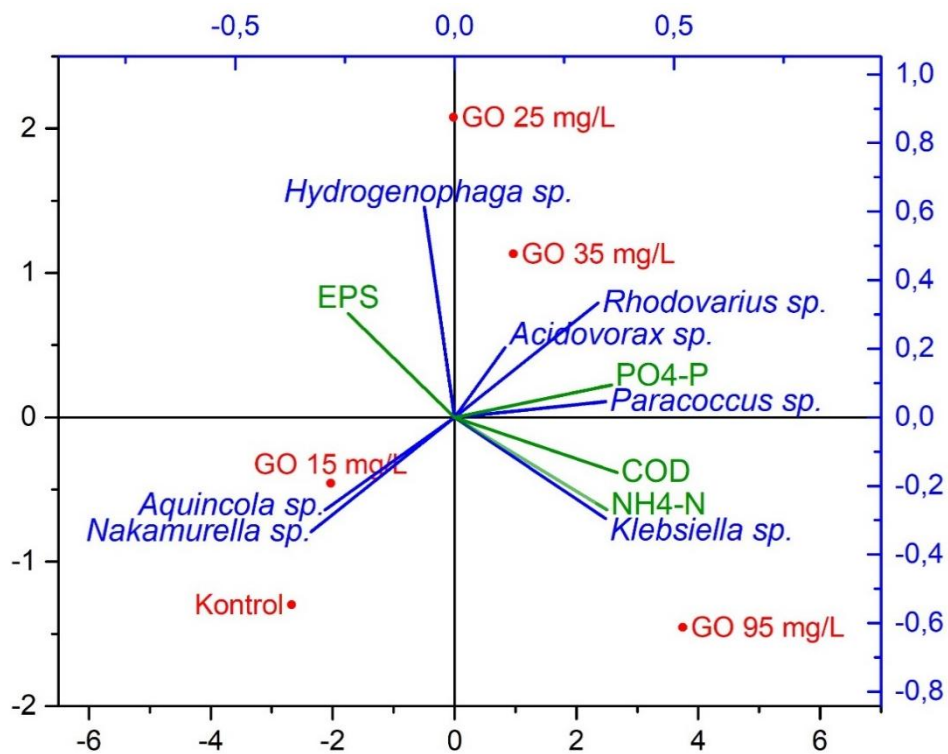


5.9. ábra. A mikrobiális közösség változása a kísérletek folyamán. **a)** Az eleveniszap, granuláris iszap és a grafén-oxiddal (15, 25, 35 és 95 mg/L) szennyezett granuláris iszapok DGGE elválasztással kapott eredménye. A nyilakkal megjelölt egyedi sávok a szekvenáláshoz kiválasztott sávokat jelölik. **b)** A DGGE profil súlyozás nélküli pár csoport módszer számtani átlag (UPGMA) analízise. **c)** 16S rDNS szekvenálás eredménye.

A magas GO koncentráció ellenére (95 mg/L) a *Paracoccus* sp., *Acidovorax* sp. és *Klebsiella* sp. fajok kimutathatóak maradtak. A *Paracoccus* sp. és *Klebsiella* sp. képesek a nitrát

redukálására [118,119], ezért feltehetően fontos szerepet töltenek be a hatékony $\text{NO}_3\text{-N}$ eltávolításában. Az *Acidovorax* sp. a szerves anyagok eltávolítását végzi a biológiai szennyvíztisztítás során [120], amely sávjának intenzitása lecsökkent (5.9a. ábra), feltehetően a baktériumsejtek száma csökkent és nem voltak képesek a rendelkezésre álló szerves anyag hatékony eltávolítására. A még azonosított *Rhodovarius* sp. legjobb tudomásunk szerint nem vesz részt a szennyvíztisztításban, a törzset egy ipari higiéniai ellenőrzés során izolálták [121].

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a környezeti tényezők és a mikrobiális közösség közti kapcsolatot, redundancia elemzést (RDA) végeztünk el (5.10. ábra).



5.10. ábra. A mikrobiális közösség összetétele és a környezeti tényezők kölcsönhatása hét nap elteltével. A redundancia elemzés a grafén-oxid (mint környezeti változó), a vízkémia paraméterek és a mikrobiális közösség közötti összefüggést mutatja be.

A redundancia elemzésen jól látható, hogy a növekvő GO nanorészecske mennyiség negatív összefüggést mutat az *Aquincola* és *Nakamurella* nemzetségekkel. Ezzel szemben a *Klebsiella* sp. pozitív összefüggést mutat a magas, 95 mg/L GO mennyiséggel, amely megegyezik a DGGE kísérlet során megfigyeltekkel. A legnagyobb alkalmazott GO koncentráció adagolás hatás (95 mg/L) szintén pozitívan összefügg az elfolyó szennyvízben megnövekedett KOI és $\text{NH}_4\text{-N}$ koncentrációkkal, hiszen ebben az esetben mértük a legmagasabb értékeket. A

magas GO NP mennyiség negatív összefüggést mutat az iszap EPS mennyiségével és a *Hydrogenophaga* nemzetséggel, ami ugyancsak azt sugallja, hogy 95 mg/L koncentrációban a polimer anyagok előállítása jelentősen gátolva volt. A RDA elemzés alapján a vizsgált rendszerünkben a *Hydrogenophaga* nemzetség fontos szerepet tölthet be az EPS termelésében, mivel egy viszonylag erős pozitív összefüggés figyelhető meg.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az aerob granuláriumok kialakítása sikerült a bioreaktorokban. A kontroll reaktorban a KOI és $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfoka 93,50% és 99,95% volt. A GO 15, 25 és 35 mg/L mennyiségben a KOI eltávolítási hatásfokát a kontrollhoz képest 3,65%, 5,12% és 6,81%-val csökkentette, az $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfokát pedig 0,74%, 1,92% és 2,69%-val csökkentette. Ezzel szemben, 55 mg/L GO esetében, amikor az EPS mennyisége már alacsonyabb volt a kontrollhoz képest, a KOI és $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfokok a kontrollhoz képest 14,5% és 5,96%-val csökkentek, vagyis ekkor tapasztaltuk a legnagyobb negatív ugrást az eltávolítási hatásfokokban. A GO 15, 25 és 35 mg/L mennyiségben növelte az EPS mennyiségét, míg 55 mg/L GO hatására az EPS mennyisége alacsonyabb volt a kezdeti iszapéhoz képest, 5,02 mg/g MLVSS-re csökkent. Habár ekkor a fehérje mennyisége magasabb volt a kontroll iszaphoz képest, az előző GO adagoláshoz képest (35 mg/L) jelentőset, 1,81 mg/g MLVSS-t csökkent. A GO mennyiségét 75 és 95 mg/L-ra növelve az EPS és PN mennyiségének további csökkenését eredményezte. A GO NP hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a GO NP 35 mg/L koncentrációig alkalmazva még a rendszer szennyvíztisztítási hatásfokában nem okozott erőteljes negatív hatásokat hét nap elteltével sem, amely főként a kezdeti granuláris iszaphoz képest magasabb EPS mennyiségének tulajdonítható. A GO NP alkalmazása nagyobb mennyiségben már jelentős hatásfokcsökkenést okozott a biológiai rendszerben, amellyel párhuzamosan a biomassza és annak EPS tartalma is csökkent. A mikrobiális közösségben is figyeltünk meg változásokat, ennek mélyebb elemzése érdekében hatékonyabb és újabb módszerekkel történő analizálása vált szükségessé. Ezért a későbbiekben a granuláris iszap mikrobiális összetételét újgenerációs szekvenálási eljárással vizsgáltuk.

5.2. Lépcsőzetes GO nanorészecske koncentráció növelésének hatása az AGS bioreaktor működésére

Zheng és mtsai. a cérium-oxid nanorészecskék (Cerium oxide nanoparticle–CeO₂ NP) granuláris iszpra gyakorolt hatását, valamint a bioreaktor regenerálódó képességét vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a nanorészecskék csökkentették a bioreaktor tápanyag eltávolítási képességét az EPS mennyiségének növekedése ellenére. Azonban, amikor a kísérlet végén a bioreaktort nanorészecske-mentes szintetikus szennyvízzel táplálták, a nitrogén és foszfor eltávolításának hatásfoka elkezdett növekedni és végül a bioreaktor működése pár nap elteltével visszaállt kezdeti állapotba [122]. Tudomásunk szerint egyetlen korábbi tanulmány sem vizsgálta a GO nanorészecskék hosszú távú hatását az AGS bioreaktor teljesítményére, ahol a részecskék koncentrációját lépcsőzetesen növelték. Továbbá arról sincs információnk, hogy a hosszú GO NP kitettséget követően képes-e a granuláris iszap regenerálódni, ami egy biológiai rendszer fontos jellemzője.

Ennélfogva a kutatás második fő célja a GO nanorészecskék hosszú távú hatásának vizsgálata volt az AGS SBR esetében. A kísérlet során, az előző kísérleti rendszerrel ellentétben, egyetlen bioreaktort alkalmaztunk (két párhuzamosan működő bioreaktor), ahol a betáplált szintetikus szennyvíz GO NP tartalmát lépcsőzetesen növeltük 0 mg/L-ről 115 mg/L-ig. Minden esetben a kísérleti időtartam tizennégy nap volt (összesen 112 nap), így összesen nyolc kisebb részre volt bontható a kísérlet, amely során a részecskék adagolási koncentrációja a következő volt: 0, 15, 35, 55, 75, 95, 115 és 0 mg/L. A nyolcadik fázisban a szintetikus szennyvíz már nem tartalmazott GO-t, így meg tudtuk vizsgálni az AGS bioreaktor regenerálódó képességét.

A kísérlet teljes időtartama alatt naponta mértük az elfolyó szennyvíz KOI, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N és TP koncentrációját. A különböző fázisok végén (14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 és 112 napokon) pedig megvizsgáltuk az iszap mikrobiális aktivitását (SOUR, SAOR, SNOR, SNIRR, SNRR, SPUR, SPRR), EPS mennyiségét (PS+PN), valamint a fontosabb iszap index paramétereket (MLSS, MLVSS, SVI₅). Az iszapban végbemenő szerkezeti változásokat pásztázó elektronmikroszkóppal követtük nyomon.

5.2.1. GO részecskék tápanyag eltávolításra gyakorolt hatása

A kísérlet során az elfolyó szennyvíz nitrit- és nitrát-nitrogén tartalma jelentős mértékben nem változott, $0,4 \pm 0,01$ és $0,5 \pm 0,15$ mg/L koncentrációk között maradt. Korábbi

kutatásunkban is hasonlót tapasztaltuk, valamint hasonlót leírtak aerob granuláris iszapos rendszerekben is, amikor CuO és Ag nanorészecskéket adagoltak a bioreaktorba [71,72]. Az 5.11. ábrán a kimenő szennyvíz KOI, NH₄-N és TP koncentrációja és eltávolítási hatásfoka látható. Az NH₄-N eltávolítási hatásfoka viszonylag stabil maradt a GO részecskék nagy koncentrációban történő adagolása esetében is. Az első fázisban (nem tartalmazott GO-t a szintetikus szennyvíz) az ammónia-nitrogén eltávolítási hatásfoka 99,95% volt, ami 115 mg/L GO adagolást követően 88,58%-ra csökkent, vagyis a részecskék nem gátolták erőteljesen a nitrifikáló mikroorganizmusok működését. Figyelembe véve az elfolyó víz alacsony NO₂-N és NO₃-N koncentrációját, valamint a viszonylag alacsony NH₄-N koncentrációkat (<15 mg/L), a szervesetlen nitrogénvegyületek eltávolítási hatásfoka 80% fölött maradt, így a bioreaktorból távozó tisztított szennyvíz minősége megfelelt az Európai Parlament 91/271/EGK irányelvének [123].

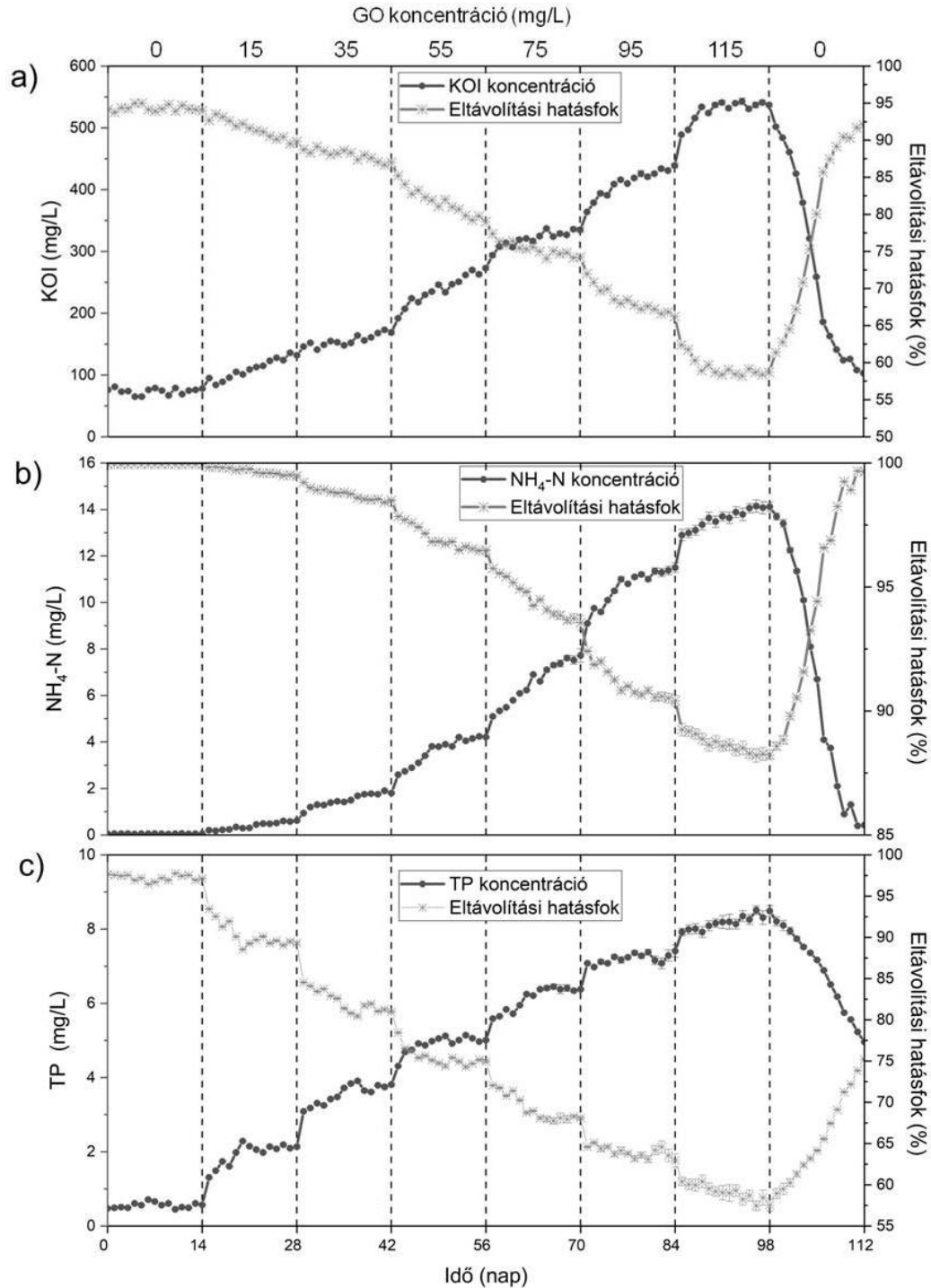
A GO NP mennyiségének lépcsőzetes emelése az elfolyó KOI koncentráció növekedését eredményezte. Az első fázisban a KOI eltávolítási hatásfok 94,15% volt, míg 87,07%-ra csökkent 35 mg/L GO hatására, a kezelt szennyvíz meghaladta az irányelvben megadott 125 mg/L KOI határértéket (5.2 táblázat). Nagyobb mennyiségű GO részecske esetében (95 és 115 mg/L) az elfolyó víz KOI koncentrációja jelentősen megemelkedett, 419,45 és 532,13 mg/L volt. Ennek egyik lehetséges oka a folyamatosan csökkenő pH lehet. Míg az első két fázisban a pH 7,3 ± 0,1 volt, a részecske koncentráció növelése a pH csökkenését eredményezte, ezért megfelelő értéken tartása folyamatos NaOH és KOH adagolást igényelt. Erre azért volt szükség, mert a szintetikus szennyvízben lévő pufferként szolgáló NaHCO₃ nem volt elegendő, így a lúgok adagolásával valamelyest biztosítani tudtuk a rendszerben a mikroorganizmusok számára optimális pH értéket. Feltehetően az aerob szerves anyag lebontását végző mikroorganizmusok érzékenyek voltak a grafén-oxiddal szemben, míg a granulumok belsejében lévő anaerob mikroorganizmusok védve voltak. Ezért az anaerob körülmények között keletkező szerves savak felhalmozódhattak a bioreaktorban, további gátló hatást kifejtve egyes prokarióta szervezetekre [124]. A KOI és NH₄-N esetében, 98 nap elteltével, amikor a bemenő szintetikus szennyvíz már nem tartalmazott nanorészecskét, a reaktor eltávolítási hatásfoka növekvő tendenciát mutatott. Tizennégy nap elteltével a kimenő szennyvíz NH₄-N és KOI koncentrációja 0,42 és 103,74 mg/L volt, amelyek közel azonosak a kezdeti értékekkel. Ezen eredmény arra utal, hogy a bioreaktorban a granuláris

iszap regenerálódó képessége kiváló volt, a heterotróf és nitrifikáló mikroorganizmusok metabolikus aktivitása javult a GO NP adagolás megszüntetése után.

5.2. táblázat. Az elfolyó szennyvíz tizennegyedik napokon mért vízkémiai paraméterei: a kémiai oxigén igény (KOI), ammónia nitrogén ($\text{NH}_4\text{-N}$) és össz-foszfor (TP) eltávolítási hatások, az iszap szuszpendált lebegőanyag tartalma (MLSS), az iszap térfogati index (SVI_5), valamint a kísérletek során bejutó grafén-oxid (GO) mennyisége. A bemenő szennyvíz KOI, $\text{NH}_4\text{-N}$ és TP koncentrációja 1300, 120 és 20 mg/L.

Szennyvíz paraméterek	Az egyes kísérleti fázisok vége napokban megadva, valamint az adagolt GO NP mennyiség mg/L-ben megadva							
	14 GO=0	28 GO=15	42 GO=35	56 GO=55	70 GO=75	84 GO=95	98 GO=115	112 GO=0
Kimenő KOI (mg/L)	76,05	113,24	168,09	273,58	335,26	419,45	532,13	103,74
KOI eltávolítási hatásfok (%)	94,15	91,28	87,07	78,96	74,21	67,73	59,07	92,02
Kimenő $\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/L)	0,05	0,62	1,87	4,24	7,72	11,38	13,71	0,42
$\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfok (%)	99,95	99,48	98,44	96,47	93,57	90,52	88,58	99,65
Kimenő TP (mg/L)	0,49	2,19	3,81	5,01	6,38	7,41	8,49	4,96
TP eltávolítási hatásfok (%)	97,55	89,05	80,95	74,95	68,10	62,95	57,55	75,20
MLSS (g/L)	6,22	8,12	7,87	7,23	5,41	4,78	3,74	4,47
SVI_5 (mL/g)	34,15	33,65	42,76	54,95	84,49	120,73	174,39	72,68
Össze bemenő, akkumulálódott GO NP mennyiség (g)	0	0,88	2,94	6,17	10,58	16,17	22,93	22,93

A TP eltávolítási hatásfokát a GO már kis mennyiségben is negatív befolyásolta. Míg a kezdeti fázisban a foszfor eltávolítási hatásfok 97,55%-os volt, addig a GO 15 mg/L koncentrációban már 89,05%-ra csökkentette a TP eltávolítást, míg 115 mg/L hatására a TP eltávolítási hatásfok 57,55%-ra csökkent. A biológiai foszfor eltávolítás során a mikroorganizmusok aerob körülmények között felveszik a foszfort, míg anaerob körülmények között a fölösleges foszfort leadják [125], így vélhetően esetünkben az aerob foszfor felvételére képes mikroorganizmusok voltak gátolva. Az utolsó, GO NP mentes fázis végén az elfolyó szennyvíz TP koncentrációja 4,96 mg/L volt, amely a foszforeltávolítás gyenge regenerálódó képességére utal. Zheng és mtsai. CeO_2 nanorészecske adagolás megszüntetést követően is hasonló figyelték meg, amely esetben a KOI eltávolítási hatásfok pár nap elteltével helyreállt, míg a TP eltávolítás nem állt vissza eredeti állapotába [122].



5.11. ábra. A grafén-oxid nanorészecskék (GO NPs) tápanyag eltávolításra gyakorolt hatása. A GO mennyiségét 14 naponta növeltük 0 mg/L-ről 15, 35, 55, 75, 95 és 115 mg/L-re, végül két héten át a bioreaktorok GO nélküli szennyvízzel tápláltuk **a)** kémiai oxigén igény (KOI), **b)** ammónia-nitrogén (NH₄-N), **c)** össz-foszfor (TP).

Eredményeinkből arra következtetünk, hogy a GO NP a foszfor eltávolításra nem csak akut hatást, hanem krónikus hatást fejtett ki. A bioreaktor csökkenő biomassza mennyisége részben

magyarázhatja a fokozatosan csökkenő tápanyag eltávolítást. Az első fázisban a reaktor MLSS tartalma 6,22 g/L volt, mely 15, 35 és 55 mg/L GO adagolást követően növekedett, viszont 75, 95 és 115 mg/L GO hatására 5,41, 4,78 és 3,74 g/L-re csökkent. Az utolsó fázis javuló tápanyag eltávolítását pedig a magasabb MLSS is magyarázhatja (4,47 g/L). Az SVI_5 már 15 mg/L GO adagolás után is csökkenő tendenciát mutatott, amely az egyre lassuló ülepedési sebességnek tulajdonítható be.

Két korábbi tanulmányban a GO részecskék eleveniszapra gyakorolt hatását vizsgálva hasonló következtetésre jutottak. Akut hatásvizsgálat során (5 óra kitettségi idő 20 mL eleveniszapban) a szerves anyag eltávolításának hatásfoka már 50%-kal csökkent 10 mg/L GO NP adagolást követően, míg a foszfor és nitrogén eltávolítás mértéke 100 mg/L GO esetében csökkent 50%-kal. [58]. A GO NP (5 mg/L) krónikus hatását 3,5 L hasznos térfogatú bioreaktorokban, tizenkét órás ciklusok esetében vizsgálták, ahol a KOI koncentrációja ez elfolyó szennyvízben 75 mg/L-ről 180 mg/L-re növekedett tíz nap elteltével, míg a foszfor és ammónia koncentrációja a kezdeti 0,4 és 0,1 és g/L-ről 16,5 mg/L-re emelkedtek [60].

Más nanorészecskék hatását vizsgálva megállapították, hogy a ZnO nanorészecskék negatívan befolyásolták a granuláris iszap nitrogén eltávolítási hatásfokát, viszont az elfolyó KOI koncentrációja nem változott [70]. A CuO nanorészecskék pedig a granuláris iszap biológiai foszfor eltávolító képességét és a biomassza mennyiségét is csökkentették [71]. Mindezek tükrében elmondható, hogy a különböző nanoanyagok hatása a bioreaktorok működésére eltérő volt, köszönhetően eltérő szerkezeti, morfológiai és kémiai tulajdonságaiknak, viszont a nanorészecskék kivétel nélkül negatív hatással vannak a vizsgált bioreaktorokban, tekintet nélkül az adott reaktorokban megtalálható mikroba közösségek összetételére.

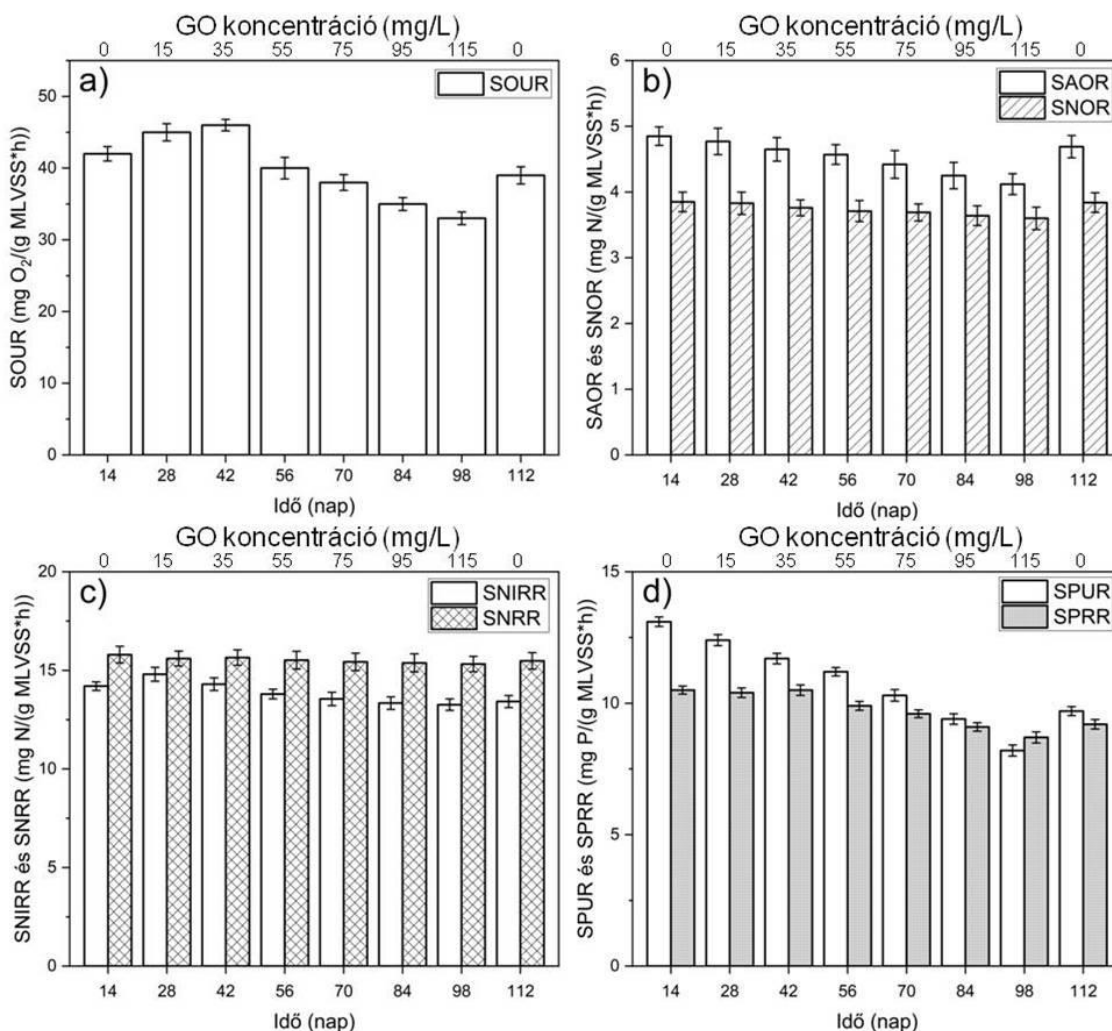
5.2.2. GO nanorészecskék hatása a granuláris iszap mikrobiális aktivitására

Az 5.12. ábrán látható a GO nanorészecskék mikrobiális aktivitásra gyakorolt hatása, amelyeket a különböző fázisok végén (tizennégy naponta) mértünk. A részecskék 15 és 35 mg/L koncentrációra emelése a SOUR szignifikáns növekedését eredményezte: 42,04-ről 45,11, illetve 45,89 mg O_2/g MLVSS*h-ra emelkedett (5.12a. ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a GO alacsonyabb mennyiségben pozitív hatással volt a granuláris iszapban lévő heterotróf, szerves anyag lebontó mikroorganizmusaira. AGS esetében, amikor a betáplált szintetikus szennyvíz sótartalmát enyhén megnövelték, a SOUR növekedését tapasztalták [126]. Ezzel szemben, a

nanorészecske koncentráció 75, 95 és 115 mg/L-re történő emelése a SOUR szignifikáns csökkenését okozta ($p < 0,01$ és $p < 0,001$), a SOUR 38,04, 34,93 és 33,14 mg O₂/g MLVSS*h-ra csökkent. A tapasztalt változások szorosan összefüggenek a KOI eltávolítási hatások csökkenésével. Az utolsó, GO mentes fázis végén, a SOUR értéke 39 mg O₂/g MLVSS*h-ra emelkedett, amely magyarázhatja az elfolyó szennyvíz csökkenő KOI tartalmát.

Mind a SAOR és a SNOR enyhén csökkenő tendenciát mutatott a GO mennyiségének folyamatos növelésének során (5.12b. ábra). A SAOR szignifikáns csökkenése csak 75, 95 és 115 mg/L-es GO koncentráció hatására volt megfigyelhető ($p < 0,05$ és $p < 0,01$), ekkor a kezdeti 4,85-ről 4,42; 4,25 és 4,12 mg N/g MLVSS*h-ra csökkent. Az aerob granuláris iszap SAOR értékének csökkenése összefüggésben van az elfolyó szennyvíz növekvő NH₄-N koncentrációjával. A SNOR vonatkozásában nem tapasztaltunk jelentős csökkenést ($p > 0,05$), a legmagasabb GO mennyiség esetén is csak 3,6 mg N/g MLVSS*h-ra csökkent a kezdeti 3,85 mg N/g MLVSS*h-ról. Az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a magasabb GO részecske koncentráció képes jelentősebb negatív hatást kifejteni az ammónia oxidáló mikroorganizmusokra, míg a nitrit oxidáló folyamatokra nem. Eleveniszapos bioreaktorban korábban hasonló megfigyelést tapasztaltak, amikor a nagyobb mennyiségű ZnO és CeO₂ nanorészecskét tartalmazott a bemenő szennyvíz [82,92].

Ahogy az 5.12c. ábrán is látható, a GO NP nem okozott szignifikáns változást a SNRR esetében ($p > 0,05$), viszont a SNIRR kimutathatóan csökkent 75, 95 és 115 mg/L GO adagolást követően ($p < 0,05$). Ezen eredmények magyarázhatják a bioreaktor kiváló NO₂-N és NO₃-N eltávolítási képességét, igazolva, hogy a GO NP nem befolyásolja lényegesen a denitrifikáló mikroorganizmusok működését köszönhetően a granulomok szerkezetének. A stabil NO₂-N és NO₃-N eltávolítási hatások egy másik magyarázata, hogy a granuláris iszap SNRR és SNIRR összértéke mindig magasabb, mint a SAOR és SNOR a kísérlet során [92,126]. Vagyis az alacsonyabb ammónia és nitrit oxidációs mérték következtében kevesebb nitrit és nitrát keletkezett, aminek redukálása akár elemi nitrogénné (köszönhetően a gyakorlatilag változatlan nitrát redukációs mértéknek) is sikeresen végbement.



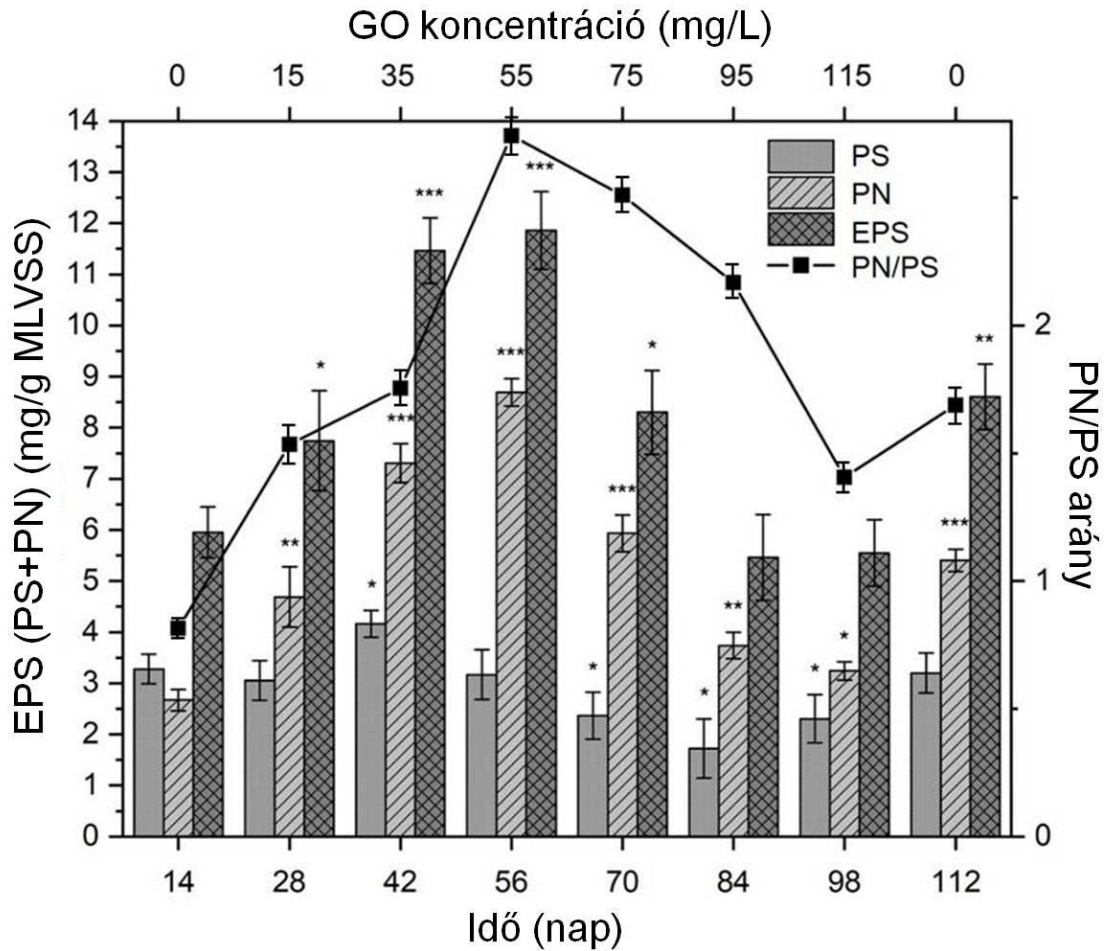
5.12. ábra. A grafén-oxid (GO) nanorészecskék mikrobiális aktivitásra gyakorolt hatása. **a)** specifikus oxigén felhasználási mértékét (SOUR), **b)** specifikus ammónia oxidációs mértékét (SAOR) és specifikus nitrit oxidációs mértékét (SNOR), **c)** specifikus nitrit redukciós mértékét (SNIRR) és specifikus nitrát redukciós mértékét (SNRR), **d)** specifikus foszfor felvétel mértékét (SPUR) és specifikus foszfor leadási mértékét (SPRR). A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ és *** = $p < 0,001$) a kontroll mintához képes (14. napon mért érték).

A kísérletben a SPRR, szemben a SPUR értékével, egy lassabban csökkenő tendenciát mutatott a részecske mennyiségének növelésével (5.12d. ábra). A SPRR szignifikáns csökkenése a GO koncentráció 55 mg/L-re emelése után volt megfigyelhető ($p < 0,05$), további nanorészecske koncentráció emelést követően pedig már erőteljes csökkenést tapasztaltunk ($p < 0,001$). Ezzel szemben a SPUR számottevő csökkenése már 15 mg/L GO adagolást követően is tapasztalható volt ($p < 0,05$), magasabb koncentrációban pedig további jelentős csökkenés volt észlelhető ($p < 0,001$). A SPRR és SPUR változása alapján arra következtettünk, hogy a GO az aerob foszfor felvételt hamarabb és erőteljesebben gátolta, mint az anaerob foszfor leadást.

Eredményeinkhez hasonlóan, korábbi tanulmányokban is a megnövekedett nanorészecske mennyisége hatására az iszap SPUR és SPRR érték csökkent, amik az elfolyó víz foszfor koncentráció növekedését eredményezték [82,92,127,128].

5.2.3. GO nanorészecskék hatása az AGS EPS mennyiségére

Az 5.13. ábrán a granuláris iszap PS, PN és EPS mennyisége látható, amely értékeket a különböző fázisok végén mértünk meg. Kezdetben az iszap EPS tartalma 5,89 mg/g MLVSS volt, míg a PS és PN tartalma 3,29 és 2,6 mg/g MLVSS. A GO részecskék 75 mg/L-es koncentrációig történő adagolása az EPS szignifikáns mennyiségének növekedését eredményezte, főként 35 és 55 mg/L koncentrációban, amely esetekben az EPS jelentősen ($p < 0,001$), közel 12 mg/g MLVSS-re növekedett. A PN mennyisége is hasonló, szignifikánsan növekvő tendenciát mutatott ($p < 0,01$ és $p < 0,001$), a kezdeti 2,6 mg/g MLVSS-ről 4,69, 7,31, 8,69 és 5,93 mg/g MLVSS-re nőtt a mennyisége, míg a PS viszonylag stabil maradt, ezért az EPS PN/PS aránya is megnövekedett 0,82-ről 1,53, 1,75, 2,74 és 2,51-re. Habár az EPS mennyisége 75 mg/L GO hatására is magasabb volt, mint kezdetben, ennek ellenére az EPS mennyiségének csökkenő tendenciáját tapasztaltuk. Továbbá az extracelluláris polimert alkotó PN/PS aránya is csökkenő tendenciát mutat, jelezvén, hogy főként fehérje mennyisége csökkent. Ekkor már olyan mennyiségben juttattunk a bioreaktorokba grafén-oxidot, hogy feltehetően az EPS, de főként a fehérje termelő mikroorganizmusok metabolikus aktivitása is jelentősen csökkenhetett, ami a későbbiekben még tovább fokozódott.



5.13. ábra. Grafén-oxid (GO) nanorészecskék hatása a poliszacharid (PS), fehérje (PN) és az extracelluláris polimer anyag (EPS) mennyiségére. A csillagok a szignifikáns különbséget jelölik (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ és *** = $p < 0,001$) a kontroll mintához képest (14. napon mért érték).

Korábbi kísérletünkben (5.8. ábra) amikor a GO mennyiséget nem szakaszosan emeltük, hanem mindig az külön reaktorba adagoltuk a GO-t az EPS mennyisége már 25 mg/L GO adagolás hatására csökkenni kezdett, ebben a kísérletben a GO részecskék 95 és 115 mg/L-es mennyiségben eredményezték az EPS (főként a fehérje) 5,46 és 5,52 mg/g MLVSS-re történő csökkenését. Ez a különbség abból adódhat, hogy míg előzőleg a GO NP mennyiséget mindig külön bioreaktorban növeltük, addig itt a GO-t ugyanazon bioreaktorban emeltük, így a mikroorganizmusok képesek voltak egyfajta védelmi mechanizmust kialakítani, valamelyest adaptálódva a környezethez. Az 5.11 és 5.13. ábrák alapján megfigyelhető, hogy amikor a fehérje mennyisége elkezdett csökkenni (75, 95 és 115 mg/L GO), az elfolyó szennyvíz ammónia koncentrációja jelentős mértékű növekedést mutatott. Feltehetően a SAOR és a PN is jelentősen

hozzájárult a hatékony ammónia eltávolításhoz. Alacsonyabb CuO NP koncentrációk (5 és 20 mg/L) is a granuláris iszap PN/PS arány és a PN mennyiségének jelentős növekedését eredményezték, míg 50 mg/L CuO részecske koncentráció esetében már csökkenő tendenciát tapasztaltak [71]. Joshi és mtsai. leírták, hogy a nagy mennyiségben termelődő EPS az Ag nanorészecskék aggregálódását eredményezte, ezáltal védve a mikroorganizmusokat a részecskék okozta stresszel szemben [129]. Korábbi tanulmányok és saját észrevételeink alapján elmondhatjuk, hogy EPS jelentős szerepet tölt be a mikroorganizmusok védelme szempontjából, mivel az iszap polimer anyag tartalmának csökkenése a bioreaktorok tápanyag eltávolítási hatásfokának csökkenéséhez vezetett.

A kísérlet utolsó fázisában, amikor csak szintetikus szennyvízzel tápláltuk a bioreaktort, az EPS mennyisége jelentősen magasabb volt a kezdeti fázishoz képest, 8,61 mg/g MLVSS-ra emelkedett. A magas EPS tartalom a megnövekedett PN mennyiségnek tulajdonítható be, mivel a PS nem változott szignifikánsan ($p > 0,05$). A bioreaktorban akkumulálódott GO részecskék további erőteljes negatív hatást már nem fejtettek ki a granuláris iszapra, valamint a hosszú távú kitettség nem okozott irreverzibilis hatást az EPS termelő mikrobiális közösségre.

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy a GO NP koncentrációjának fokozatos növelése a nitrogén eltávolítás hatásfokát kisebb mértékben befolyásolta, mint a KOI és TP eltávolítását. A denitrifikációs folyamatokat még 115 mg/L GO adagolás sem befolyásolta, míg az ammónia eltávolítás 12%-kal csökkent. A denitrifikáció anaerob körülmények között megy végbe, így azt anaerob mikroorganizmusok is végzik. A granulumok belsejében anaerob körülmények és mikroorganizmusok vannak jelen, ezért azok védve voltak a nanorészecskékkel szemben. Ezzel szemben a bioreaktorban a foszfor eltávolítási hatásfok nagyon érzékeny volt a részecskékkel szemben, amely tapasztalat megegyezik előző kísérletünkönél tett megállapításokkal. A vízkémiai mérések eredményeit szorosan követték a mikrobiális aktivitásban tapasztalt változások. Az EPS poliszacharid tartalma alig változott a kísérlet során, míg a PN mennyisége 55 mg/L GO adagolásig növekedett, és 75 mg/L GO után már csökkenő tendenciát mutat. A PN csökkenése összefügghet az ammónia oxidációs és nitrit redukciós mértékével, mivel szignifikáns csökkenésüket csak 75 mg/L GO adagolást követően tapasztaltunk. Ez arra enged következtetni, hogy az ammónia oxidálását és a nitrit redukálását végző mikroorganizmusok a fehérje szintetizálásában is fontos szerepet töltenek be. Végezetül a

több napon át tartó GO NP adagolást megszüntetve az AGS SBR kiváló regenerálódási képességet mutatott a KOI és ammónia esetében, amely egy biológiai szennyvíztisztító rendszer esetében kiemelkedő fontossággal bír. A foszfor eltávolítás esetében hasonló, nagymértékű javulását nem tapasztaltunk, habár ebben az esetben is a foszfor eltávolítási hatásfok 57%-ról 75%-ra, vagyis 18%-ot javult. A kevésbé javuló tendencia a foszfor esetében feltehetően a foszfor eltávolító mikroorganizmusok környezeti változásokkal szembeni érzékenysége vezethető vissza, amely a biológiai szennyvíztisztítók egyik sarkalatos pontja.

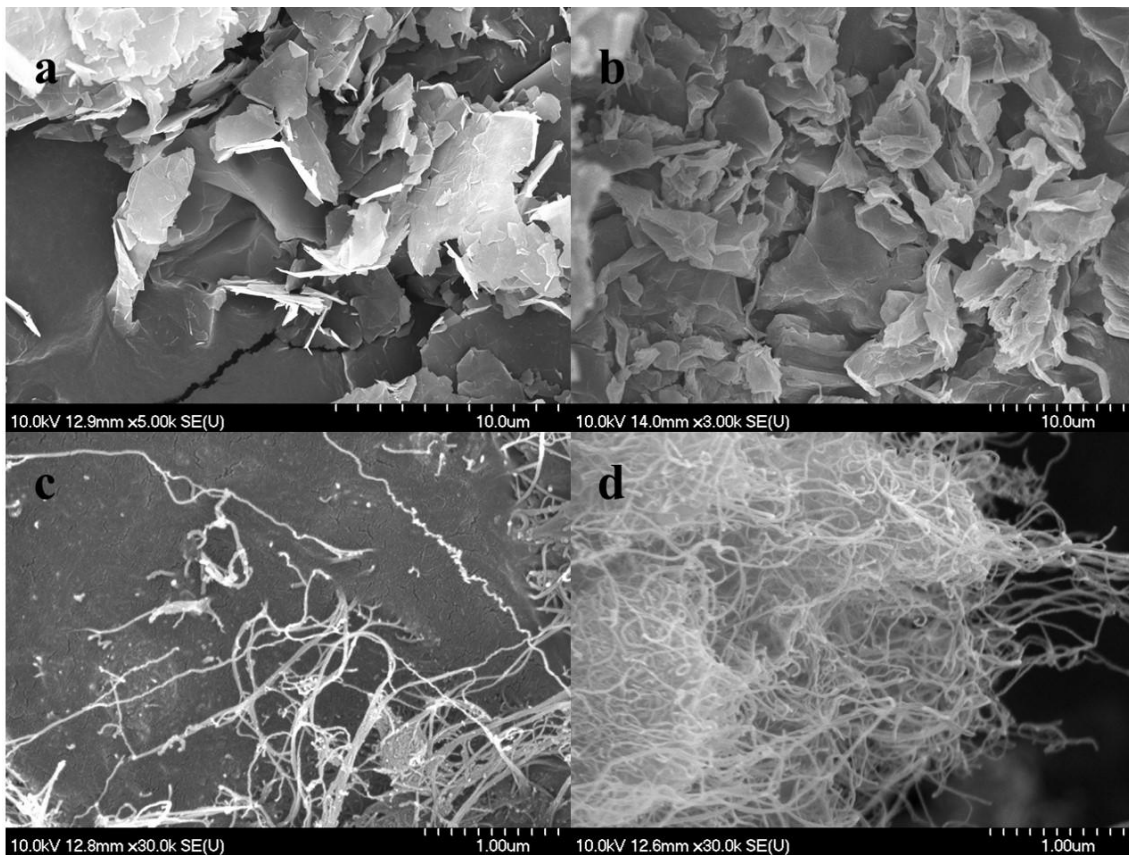
5.3. Szén-alapú nanorészecskék toxicitás vizsgálata az aerob granuláris iszapos bioreaktorokban

A szénelapú nanoanyagok aerob granuláris iszapra gyakorolt hatását még csak kevesen vizsgálták. Előző kísérleteinkben a GO nanorészecskék hatását különböző koncentrációkban vizsgáltuk, azonban a mikrobiális közösség mélyreható vizsgálatát nem végeztük el. Ennélfogva munkánk harmadik szakaszában, kutatásunk fő célja a G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT krónikus (tíz nap) hatásának vizsgálata volt. Az irodalomban a nanoanyagok hatását különböző tulajdonságú bioreaktorokban vizsgálják, amelyek működési paraméterei, a szintetikus szennyvíz összetétele és mikrobiális közössége is eltérő. Ezért fontosnak tartottuk, hogy az említett nanoanyagokat azonos körülmények között vizsgáljuk meg. A bioreaktorokat 1, 5 és 10 mg/L nanoanyag tartalmú szintetikus szennyvízzel tápláltuk tíz napon át, naponta két alkalommal mérve (minden harmadik ciklusban) a kimenő szennyvíz KOI, PO_4^{3-} , $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ és $\text{NO}_3\text{-N}$ tartalmát. Az egyes kísérletek végén (tizedik napon) pedig az iszap ülepedési képességét, mennyiségét és EPS tartalmát mértük, valamint a granuláris szerkezetében végbemenő változásokat SEM segítségével vizsgáltuk. Végül pedig 16S rRNS újgenerációs szekvenálási módszert alkalmazva a mikrobiális közösségben történt változásokat vizsgáltuk meg.

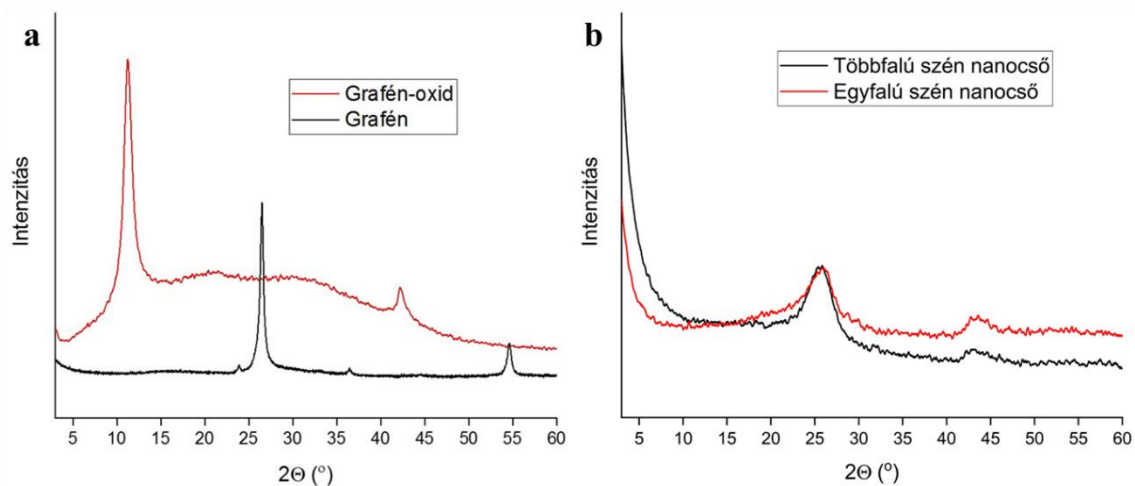
5.3.1. Szénelapú nanoanyagok jellemzése

A G NP és GO NP részecskék SEM felvételein látható azok lemezes alakja és szerkezete, valamint a SWCNT és MWCNT csőszerű alakja (5.14. ábra). Az előállított GO nanorészecskék röntgendiffraktogramján látható a jellemző $2\Theta = 11.24^\circ$ reflexió (5.15a. ábra), amely alapján a lemezek közötti távolság körülbelül 7.86 \AA [95]. A G nanorészecskék röntgendiffrakciós felvételén $2\Theta = 26.5^\circ$ -nál lévő reflexió (5.15a. ábra) utal az egykristályos szerkezetre [60]. A SWCNT és MWCNT XRD mintázatán $2\Theta = 26^\circ$ és 43° -nál láthatóak a nanocsövekre jellemző karakterisztikus reflexiók (5.15b. ábra) [130,131]. A G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT

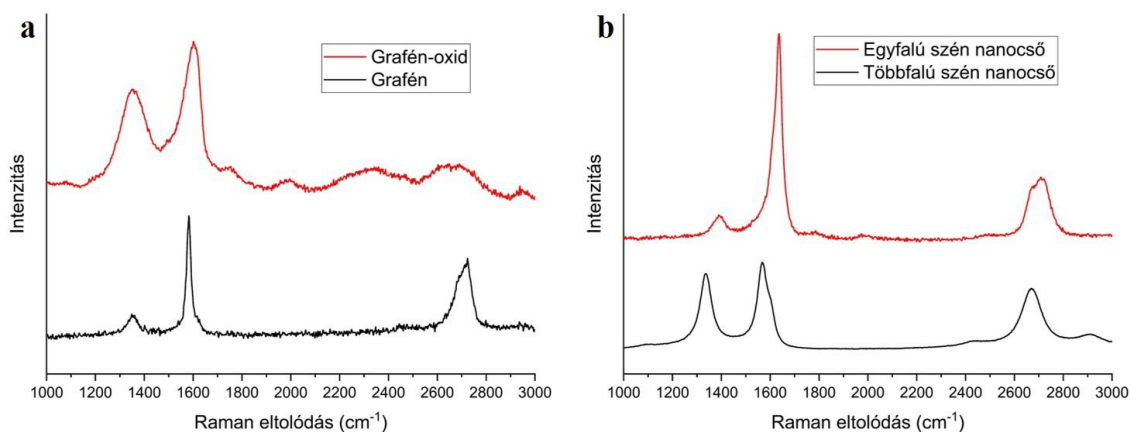
anyagok Raman spektrumán a szénalapú anyagokra jellemző G ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) és D ($\sim 1355\text{ cm}^{-1}$) sávok jól megfigyelhetőek voltak (5.16. ábra) [66,97].



5.14. ábra. Szénalapú nanoanyagok pásztázó elektron mikroszkópos (SEM) felvételei. **a)** grafén (G), **b)** grafén-oxid (GO), **c)** egyfalú szén nanocső (SWCNT), **d)** többfalú szén nanocső (MWCNT).



5.15. ábra. Szénalapú nanoanyagok röntgendiffraktometriás (XRD) spektruma. **a)** grafén (G) és grafén-oxid (GO), **b)** egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT).

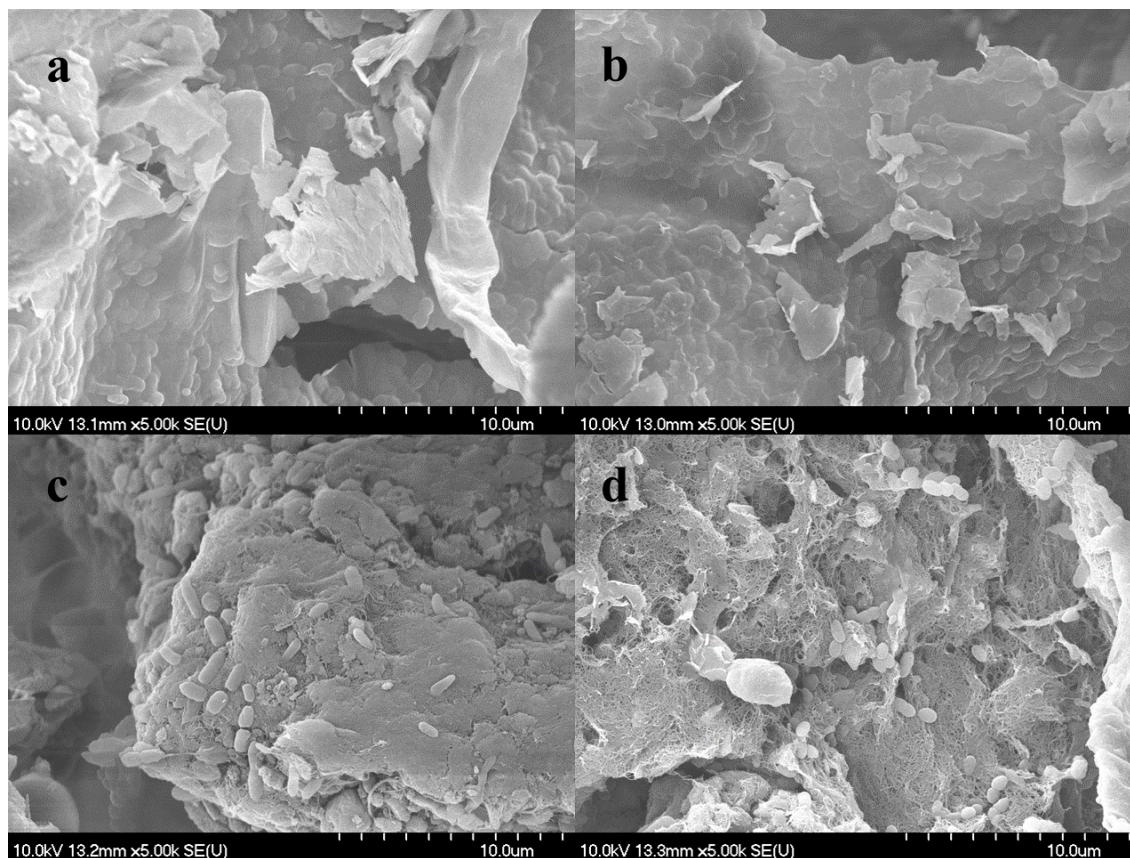


5.16. ábra. Szénalapú nanoanyagok Raman spektruma. **a)** grafén (G) és grafén-oxid (GO), **b)** egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT).

5.3.2. A granuláris iszapban végbemenő változások

A bioreaktorok kezdeti biomassa mennyisége $6,4 \pm 0,1$ g/L volt minden esetben. A nanoanyagok az általunk alkalmazott koncentrációban a biomassa mennyiségének növekedését eredményezték (5.3. táblázat). Az iszapindexben változást nem tapasztaltunk 1 és 5 mg/L CBN adagolást követően, viszont 10 mg/L GO és SWCNT hatására enyhe növekedést mértünk, köszönhetően annak, hogy az ülepedési sebesség csökkent (5.4. táblázat).

Az 5.17. ábrán a granulumok felszíne látható a 10 mg/L szén-alapú nanoanyag adagolás a tizedik napon. Míg a G nanorészecskék többnyire aggregálódott formában láthatóak, addig a hidrofil GO NP nem alkotott aggregátumokat a granulumok felszínén. Nguyen és Rodrigues eleveniszapos bioreaktorban is a G NP jobb aggregálódó képességét figyelték meg és részben ezzel magyarázták a GO nanorészecskék nagyobb toxicitását [60].



5.17. ábra. A granuláris iszap felszíne a szén-alapú nanoanyagok 10 napos kitettsége követően. **a)** grafén nanorészecske adagolás, **b)** grafén-oxid nanorészecske adagolás, **c)** egyfalú szén nanocső adagolás, **d)** többfalú szén nanocső adagolás.

A SWCNT és MWCNT adagolást követően a granulumok felszínén pálcika alakú mikroorganizmusok jelentek meg, ez a mikrobiális közösség változását vetítette előre. Továbbá az is megfigyelhető volt, hogy a szén-nanocsövek beépültek a granulumok szerkezetébe.

5.3.3. Szén-alapú nanoanyagok az aerob granuláris iszapos bioreaktorokra gyakorolt hatása

A kontroll bioreaktor elfolyó vizének $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, KOI és PO_4^{3-} tartalma 0,07; 0,04; 0,63; 74,35 és 0,78 mg/L volt, a $\text{NH}_4\text{-N}$, KOI és PO_4^{3-} eltávolítási hatásfoka pedig 99,94%; 94,28% és 96,1%. A nitrogén eltávolítás hatásfokára a nanoanyagok nem fejtettek ki hatást, kivéve a GO NP, amely 10 mg/L-es koncentrációban nyolc nap elteltével az elfolyó szennyvíz $\text{NH}_4\text{-N}$ koncentrációját 0,7 mg/L-re növelte, míg tíz nap elteltével 0,9 mg/L-re növekedett (5.3. táblázat). A granulumok felszínén található nitrifikáló mikroorganizmusok számára az EPS megfelelő védelmet biztosíthatott az általunk adagolt szennyező anyagokkal szemben, így azok

az ammóniát képesek voltak hatékonyan oxidálni. Míg a keletkező nitrátot a granulumok belsejében élő denitrifikáló mikroorganizmusok eltávolították a szennyvízből.

5.3. táblázat. Az elfolyó szennyvíz 10. napokon mért vízkémiai paraméterei: a kémiai oxigén igény (KOI), ammónia nitrogén ($\text{NH}_4\text{-N}$) és foszfát ($\text{PO}_4\text{-P}$) eltávolítási hatásfokok, az iszap szuszpendált lebegőanyag tartalma (MLSS), az iszap térfogati index (SVI_5), valamint a kísérletek során bejutó szén-alapú nanoanyagok (CBN) mennyisége [grafén (G) és grafén-oxid (GO)]. A bemenő szennyvíz KOI, $\text{NH}_4\text{-N}$ és $\text{PO}_4\text{-P}$ koncentrációja 1300, 120 és 20 mg/L.

Szennyvíz paraméterek	Bemenő szintetikus szennyvíz CBN tartalma					
	1 mg/L		5 mg/L		10 mg/L	
	G	GO	G	GO	G	GO
Kimenő KOI (mg/L)	69,43	67,39	80,23	93,63	108,29	163,35
KOI eltávolítási hatásfok (%)	94,66	94,82	93,83	92,80	91,67	87,43
Kimenő $\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/L)	0,06	0,07	0,08	0,11	0,1	0,91
$\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfok (%)	99,95	99,94	99,93	99,91	99,92	99,24
Kimenő $\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/L)	0,73	0,98	0,91	1,37	2,03	3,21
$\text{PO}_4\text{-P}$ eltávolítási hatásfok (%)	96,35	95,1	95,45	93,15	89,85	83,95
MLSS (g/L)	6,65	6,71	7,23	7,51	7,54	7,83
SVI_5 (mL/g)	33,54	34,28	35,14	33,95	34,94	39,43
Össze bemenő CBN konc. (mg)	42	42	210	210	420	420

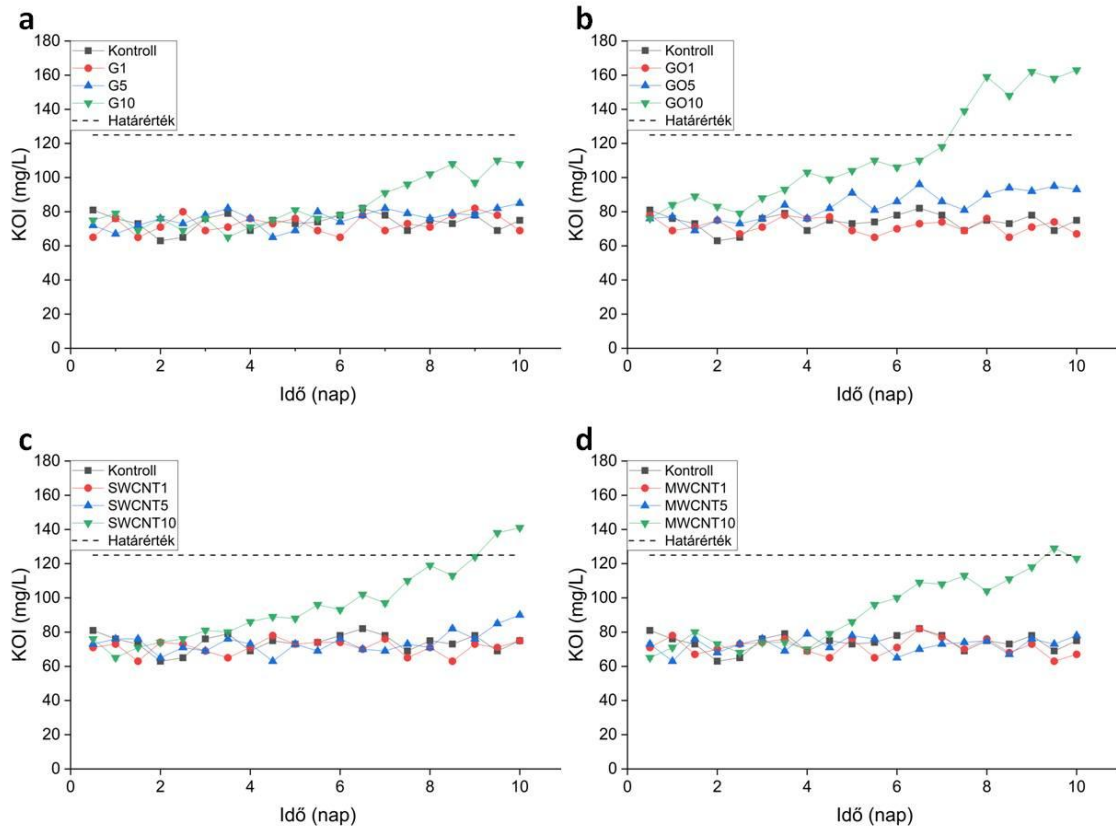
5.4. táblázat. Az elfolyó szennyvíz 10. napokon mért vízkémiai paraméterei: a kémiai oxigén igény (KOI), ammónia nitrogén ($\text{NH}_4\text{-N}$) és foszfát ($\text{PO}_4\text{-P}$) eltávolítási hatásfokok, az iszap szuszpendált lebegőanyag tartalma (MLSS), az iszap térfogati index (SVI_5), valamint a kísérletek során bejutó szén-alapú nanoanyagok (CBN) mennyisége [egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT)]. A bemenő szennyvíz KOI, $\text{NH}_4\text{-N}$ és $\text{PO}_4\text{-P}$ koncentrációja 1300, 120 és 20 mg/L.

Szennyvíz paraméterek	Bemenő szintetikus szennyvíz CBN tartalma					
	1 mg/L		5 mg/L		10 mg/L	
	SWCNT	MWCNT	SWCNT	MWCNT	SWCNT	MWCNT
Kimenő KOI (mg/L)	75,04	67,62	83,09	78,59	141,78	124,39
KOI eltávolítási hatásfok (%)	94,23	94,80	93,61	93,95	89,09	90,43
Kimenő $\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/L)	0,07	0,08	0,08	0,08	0,15	0,11
$\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfok (%)	99,94	99,93	99,93	99,93	99,88	99,91
Kimenő $\text{PO}_4\text{-P}$ (mg/L)	0,84	0,83	1,19	1,05	3,09	2,27
$\text{PO}_4\text{-P}$ eltávolítási hatásfok (%)	95,80	95,85	94,05	94,75	84,55	88,65
MLSS (g/L)	6,58	6,62	7,23	7,53	7,68	7,85
SVI_5 (mL/g)	34,29	33,52	35,27	34,73	41,56	36,71
Össze bemenő CBN konc. (mg)	42	42	210	210	420	420

A G és GO (1 és 5 mg/L) krónikus toxicitásának vizsgálata során az ammónia koncentrációjának növekedését tapasztalták három nap után, viszont a denitrifikációs folyamatok nem változtak [60]. Guo és mtsai. a granuláris iszap hatékony nitrifikációs tulajdonságát tapasztalták GO NP (60 mg/L) akut hatását vizsgálva [74]. A ZnO nanorészecskék 5 mg/L mennyiségben nem fejtettek ki negatív hatást a granuláris iszap ammónia eltávolítási hatásfokára, viszont 10 mg/L koncentrációban adagolva negyvenöt nap elteltével az ammónia eltávolítási hatásfokának 8-9%-os csökkenését okozta [70]. Ezzel szemben az AGS bioreaktorokban végbemenő nitrifikáció és denitrifikáció hatékonysága nem változott az Ag és CuO nanorészecskék 50 mg/L mennyiségben való adagolását követően sem [71,72].

A G, GO, SWCNT és MWCNT nanoanyagok 1 mg/L mennyiségben az elfolyó szennyvíz KOI koncentrációjában kimutatható változást nem okoztak (5.18. ábra). 5 mg/L-es koncentráció alkalmazása mellett csak a GO NP okozott enyhe KOI növekedést öt nap elteltével. A G, SWCNT és MWCNT adagolás 5 mg/L mennyiségben nem okozott negatív hatást, feltehetően a granuláris iszapok képesek voltak jobban tolerálni ezen anyagok jelenlétét. A nanoanyagok 10 mg/L-es adagolást követően már jelentős változást okoztak a KOI eltávolításában. Közülük a grafén okozta a legkisebb negatív hatást, a tizedik napon a KOI koncentrációja 108,29 mg/L-re emelkedett a kezdeti 74,35 mg/L-ről, viszont még így sem lépte át 91/271/EGK irányelvben meghatározott határértéket. A MWCNT negatív hatása 10 mg/L koncentrációban habár nagyobb volt a grafénhoz képest, még így is az előírt 125 mg/L-es határérték alatt volt a szennyvíz KOI értéke. Ezzel szemben a GO és SWCNT 10 mg/L-es adagolást követően az elfolyó szennyvíz KOI tartalmát a megengedett határérték fölé növelte, ezáltal a szennyvíz utókezelése szükségesszerű lenne. A GO és a SWCNT magasabb fajlagos felülettel és reaktivitással rendelkeznek, mint a G és a MWCNT, ami nagyobb mértékben befolyásolhatja a mikroorganizmusok életképességét és aktivitását a szennyvíztisztító bioreaktorokban. A magasabb reaktivitás azt is okozhatja, hogy a GO és SWCNT a bioreaktorban található kémiai anyagokkal reagálnak és új vegyületeket hozhatnak létre, amelyek negatívan befolyásolhatják a szennyvíztisztítás hatásfokát.

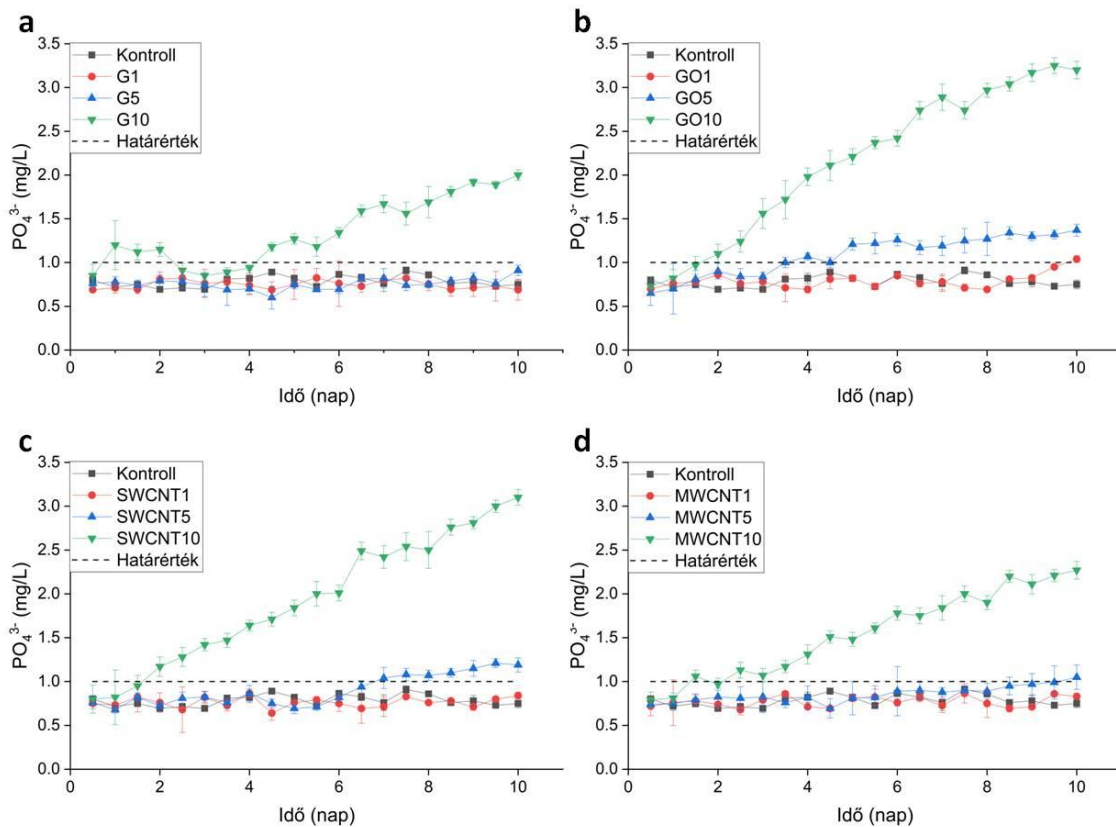
Feltehetően ebben a koncentrációban jelen lévő szén nanorészecskék gátolták az AGS aktivitását, így hosszabb időt igényelhetett a szerves anyagok eltávolítása, és ezáltal csökkent a szennyvíztisztítás hatékonysága.



5.18. ábra. A kémiai oxigén igény (KOI) koncentráció változása a kimenő szennyvízben a szén-alapú nanoanyagok 1, 5 és 10 mg/L mennyiségben történő adagolását követően. **a)** grafén (G) adagolás, **b)** grafén-oxid (GO) adagolás, **c)** egyfalú szén nanocső (SWCNT) adagolás, **d)** többfalú szén nanocső (MWCNT) adagolás.

Nguyen és Rodrigues az eleveniszapos bioreaktorba 5 mg/L mennyiségű grafént adagolva már öt nappal elteltével a KOI eltávolítás jelentős csökkenését figyelték meg [60], amely eredmény azt sugallja, hogy a granuláris iszap jobban tolerálta a G NP adagolást. A kémiai oxigén igény eltávolítására a GO 10 mg/L koncentrációban fejtette ki a legmarkánsabb negatív hatást, mivel már hét nap után az elfolyó szennyvízben lévő KOI koncentráció is a törvényben meghatározott érték felett volt (>125 mg/L), a tizedik napon pedig már 163,35 mg/L volt. A szén nanocsövek esetében a SWCNT négy nap után, a MWCNT pedig öt nap elteltével okozta az elfolyó szennyvíz minőségének romlását. Szakirodalmi adatok alapján, a G, GO és MWCNT akut hatása <100 mg/L mennyiségben nem okozta az eleveniszapos rendszer KOI eltávolításának csökkenését, viszont nagyobb mennyiségű (100-300 mg/L) adagolás mellett jelentős hatásfokcsökkenést figyeltek meg [58,65,132]. Ezzel szemben, a G és GO nanorészecskék 1 mg/L mennyiségben a bioreaktorok szerves anyag eltávolítását csökkentették [60].

A biológiai foszfor eltávolításában, hasonlóan a KOI eltávolításhoz, negatív változásokat tapasztaltunk a nanoanyagok különböző mennyiségekben történő adagolását követően (5.19 ábra). A PO_4^{3-} eltávolításra a nanoanyagok 1 mg/L mennyiségben nem okoztak negatív hatást a kísérlet időtartama alatt. 5 mg/L GO és SWCNT adagolást követően az elfolyó szennyvíz PO_4^{3-} koncentrációja enyhén megnövekedett négy és hat nap elteltével.



5.19. ábra. A PO_4^{3-} koncentráció változása a kimenő szennyvízben a szén-alapú nanoanyagok 1, 5 és 10 mg/L mennyiségben adagolást követően. **a)** grafén (G) adagolás, **b)** grafén-oxid (GO) adagolás, **c)** egyfalú szén nanocső (SWCNT) adagolás, **d)** többfalú szén nanocső (MWCNT) adagolás.

A GO és SWCNT 10 mg/L mennyiségben már jelentősen gátolta a granuláris iszap biológiai foszforeltávolítását, a tizedik napon a PO_4^{3-} 3,21 és 3,09 mg/L-re növekedett az elfolyó vízben. A G és MWCNT adagolás kisebb negatív hatást okozott, tíz nap elteltével az elfolyó szennyvíz PO_4^{3-} koncentrációja 2,03 és 2,27 mg/L volt.

A szennyvíztisztítás során a biológiai foszforeltávolítást főként az aerob polifoszfát akkumuláló mikroorganizmusok végzik el, azáltal, hogy a foszfor vegyületeket felhalmozzák. Viszont ezen organizmusok nagyon érzékenyek a környezeti változásokkal szemben [133], így

például ha a rendszer pH-ja, hőmérséklete vagy más környezeti paraméterek jelentősen megváltozik, akkor ezen organizmusok foszfor akkumuláló hatékonyságuk csökkenhet.

Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a granuláris iszapban lévő foszfor eltávolítását végző mikroorganizmusok a G és MWCNT nanoanyagokat jobban tolerálták, mint a GO-t és SWCNT-t. Ez magyarázható azzal is, hogy a GO és SWCNT reaktivitása nagyobb mint a G és MWCNT nanoanyagoké, így az amúgyis érzékeny foszfát akkumuláló mikroorganizmusokhoz sejtekhez kapcsolódva gyengítik azok membránját, így a sejtorganellumok kijutnak a környezetbe (szennyvízbe) tovább rontva az elfolyó víz minőségi paramétereit [60,134].

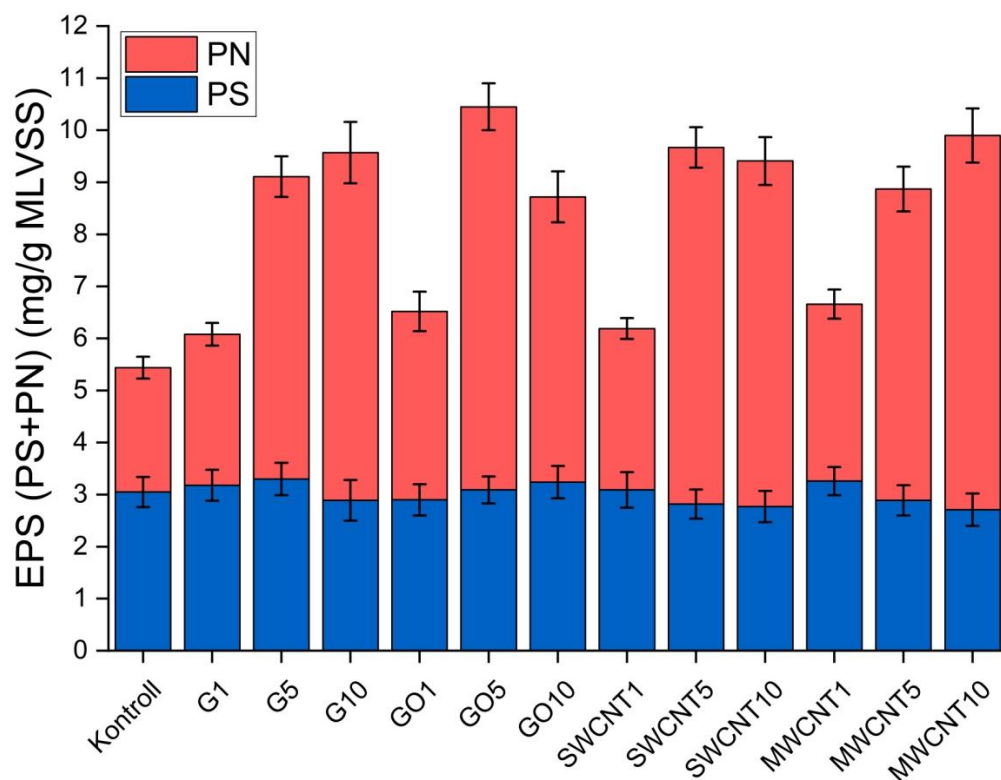
Zheng és mtsai. a SWCNT és MWCNT akut hatását vizsgálták (négy óra) az eleveniszap esetében. Méréseik során nem tapasztaltak a foszfát eltávolítás hatékonyságában negatív hatást még 100 mg/L nanocső adagolás követően sem [67]. Ezzel szemben, Hai és mtsai. a MWCNT krónikus hatásának vizsgálata során az elfolyó szennyvíz megnövekedett foszfor tartalmát figyelték meg már 1 mg/L szén nanocső bevitelénél is [65]. Eredményeinkhez hasonlóan, Nguyen és Rodrigues a GO toxikusabb hatását észlelték az eleveniszap foszfor eltávolítása során a grafén nanorészecskékkel szemben [60]. Aerob granuláris iszap esetében, a ZnO nanorészecskék 10, 50 és 100 mg/L mennyiségben nem okoztak akut negatív hatást a foszfor eltávolításában [69], viszont krónikus kitettséget követően már 5 mg/L koncentrációban is az elfolyó szennyvíz foszfor koncentrációjának a növekedését okozták, 10 és 20 mg/L mennyiségben adagolva negatív hatásuk még erőteljesebb volt [70].

5.3.4. Szén-alapú nanoanyagok hatása az EPS mennyiségére

Kísérletünk során a kontroll bioreaktorban a granuláris iszap PS és PN mennyisége 3 és 2,4 mg/g MLVSS volt (5.20. ábra). A különböző mennyiségű nanoanyagok a tesztek során az iszap PS tartalmát jelentős mértékben nem befolyásolták, amely jelenséget CeO₂-, CuO- és ZnO nanorészecskék adagolását követően korábban már megfigyeltek [69,70,122]. A poliszachariddal szemben, a PN mennyisége jelentős mértékben emelkedett a nanoanyagok adagolását követően, amely valószínűleg hozzájárult a stabil nitrogén eltávolításhoz.

A G NP és MWCNT mennyiségének emelése a PN (ezáltal az EPS) folyamatos és lépcsőzetes növekedését okozta. 1, 5 és 10 mg/L G és MWCNT hatására, az EPS mennyisége a kezdeti 5,44 mg/g MLVSS-ről 6–6,6; 9,1–8,9 és 9,6–9,9 mg/g MLVSS-re emelkedett. A GO és

SWCNT is pozitív hatással volt az iszap EPS mennyiségére. Viszont abban az esetben, amikor a betáplált szintetikus szennyvízben a nanoanyagok mennyisége 10 mg/L volt, az EPS mennyisége alacsonyabb volt, mint az 5 mg/L adagolást követően. Feltehetően a GO és SWCNT 10 mg/L mennyiségben adagolva már toxikus hatást fejtett ki, ezért a mikroorganizmusok már nem voltak képesek nagy mennyiségű EPS előállítására. Ezzel szemben, a G és MWCNT nem okozhatott hasonló mértékű negatív hatást, ezért a mikrobák nagyobb mennyiségű EPS szintetizálására voltak képesek a védekezés céljából. A granuláris iszap eltérő EPS tartalma összefüggésben van a tápanyagok eltávolításával: 10 mg/L nanoanyag adagolást követően minél kisebb volt az EPS mennyisége, annál magasabb volt az elfolyó szennyvíz tápanyag tartalma, valamint a kevesebb mikroorganizmus kevesebb tápanyagot tud metabolizálni. A GO és SWCNT magasabb toxicitása valószínűleg szerkezeti és kémiai tulajdonságaik miatt lehet, mivel a G jóval hajlamosabb az aggregálódásra, mint a GO (ahogyan az 5.14. ábrán is látható), valamint a SWCNT átmérője kisebb, mint a MWCNT, így fizikai hatása erőteljesebb lehet a sejtekkel szemben [60,67].



5.20. ábra. Szénalapú nanoanyagok hatása az extracelluláris polimer anyagok (EPS) mennyiségére és összetételére [poliszacharid (PS) és fehérje (PN)] a különböző bioreaktorokban. A grafén (G), grafén-oxid (GO), egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT) utáni számok a nanoanyagok mennyiségét jelölik mg/L-ben megadva.

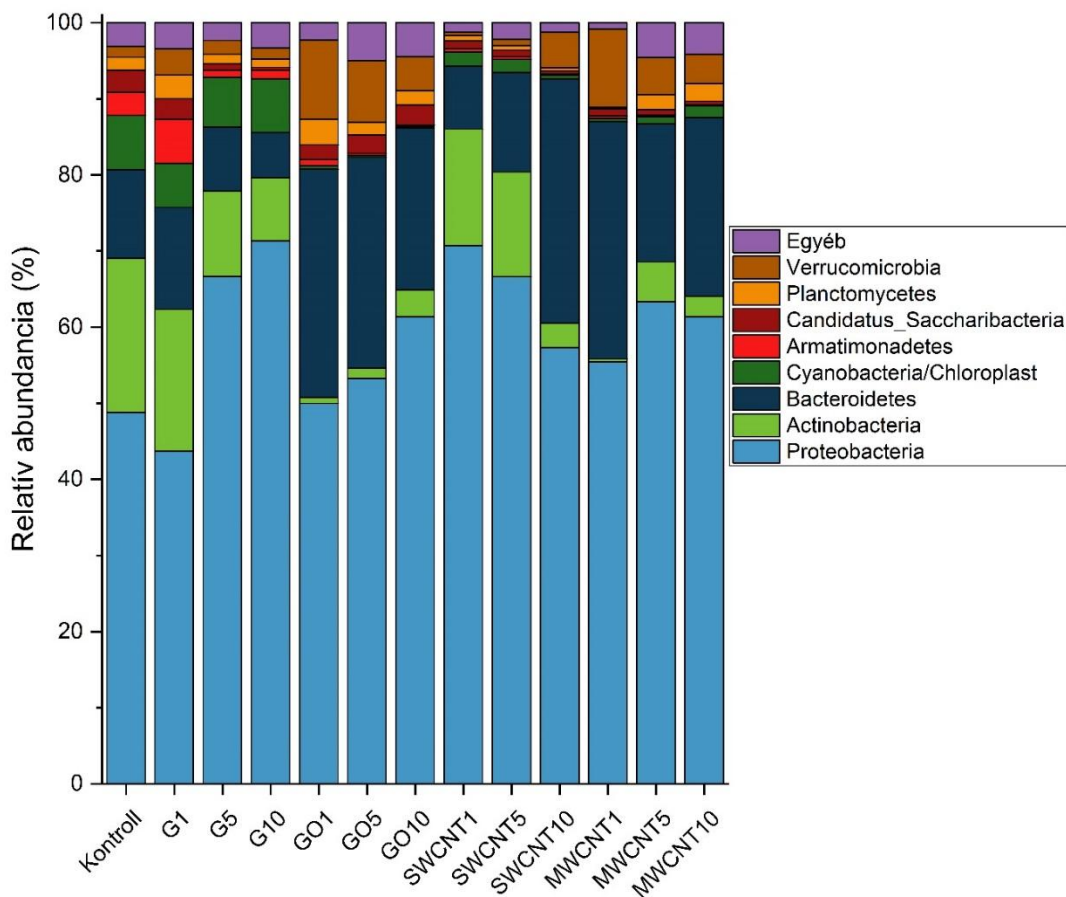
5.3.5. A nanoanyagok hatása a mikrobiális közösségre

Annak érdekében, hogy meg tudjuk vizsgálni a szénalapú nanoanyagok hatását a mikrobiális közösség esetében, a 10. napi granuláris iszap mintákat szekvenáltuk és a szekvenciákat az NCBI GenBank nemzetközi szekvencia- adatbázisban helyeztük el (projekt szám: PRJNA670422). A 13 darab szekvenált minta 16S rRNS génszekvenciájának teljes száma 1286356 leolvasás volt. Az egyes kísérletek NCBI azonosító kódjait az 5.5. táblázatban találhatók meg.

5.5. táblázat. NCBI azonosítók kísérletenként.

NCBI azonosító	Szénalapú nanoanyag típusa és mennyisége
SRR12938547	Kontroll
SRR12951107	Grafén (1 mg/L)
SRR12951108	Grafén (5 mg/L)
SRR12951110	Grafén (10 mg/L)
SRR12951158	Grafén-oxid (1 mg/L)
SRR12951159	Grafén-oxid (5 mg/L)
SRR12951166	Grafén-oxid (10 mg/L)
SRR12951167	Egyfalú szén nanocső (1 mg/L)
SRR12951168	Egyfalú szén nanocső (5 mg/L)
SRR12951171	Egyfalú szén nanocső (10 mg/L)
SRR12951173	Többfalú szén nanocső (1 mg/L)
SRR12951178	Többfalú szén nanocső (5 mg/L)
SRR12951182	Többfalú szén nanocső (10 mg/L)

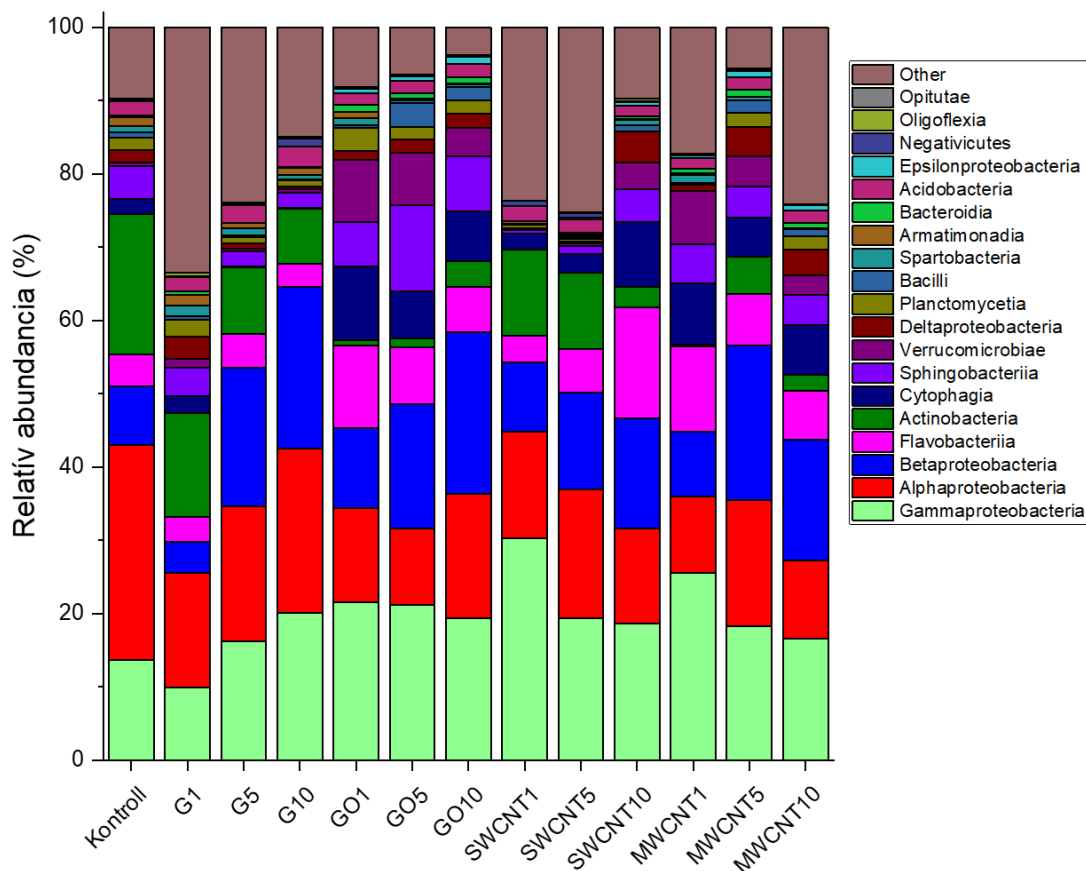
A mérés alapján a kezdeti iszapban a legdominánsabb a *Proteobacteria* törzs volt (5.21. ábra). A nanoanyagok hatására, főként a GO és SWCNT esetében, az *Actinobacteria* törzs relatív abundanciája jelentős mértékben csökkent, míg ezzel szemben a *Bacteroidetes* gyakorisága megnövekedett. Osztály szinten a legelterjedtebb képviselők a *Gamma*-, *Alpha*- és *Betaproteobacteria*, *Flavobacteriia* és *Actinobacteria* voltak, amelyek mennyisége a nanoanyagok adagolását követően szintén változott (5.22. ábra).



5.21. ábra. Szénalapú nanoanyagok hatása az aerob granuláris iszap mikrobiális összetételére törzs szinten. A grafén (G), grafén-oxid (GO), egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT) utáni számok a nanoanyagok mennyiségét jelölik mg/L-ben megadva.

A kísérletek végén mért értékeket, összehasonlítva a kezdeti granuláris iszaphól vett mintákból származó adatokkal, a nemzetségek jelentős változását tapasztaltunk (5.23. ábra). Például a *Zoogloea*, *Flavobacterium*, *Gemmobacter* és *Raoultella* abundanciája megnövekedett, míg a *Devosia*, *Stenotrophomonas* és *Tahibacter* nemzetségek csökkentek a G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT adagolását követően. A *Comamonas*, *Dyadobacter*, *Lysobacter*, *Gemmobacter* és *Pseudoxanthomonas* fontos szerepet játszanak a szennyvíz nitrogén vegyületeinek eltávolításában [135–137], gyakoriságuk a különböző nanoanyagok adagolását követően eltérően változott. A *Comamonas* és *Dyadobacter* relatív mennyisége jelentősen növekedett a GO és MWCNT hatására, míg a *Lysobacter* abundanciája a G és SWCNT adagolást követően emelkedett, a GO és MWCNT pedig csökkenést okozott ezen esetekben. Az *Acidovorax* nemzetség tagjai a nitrogén ciklus fontos szereplői, és hozzájárulnak a szennyvízben található ammónia átalakításához nitráttá és nitritté. Ezen folyamatok révén csökkentik a

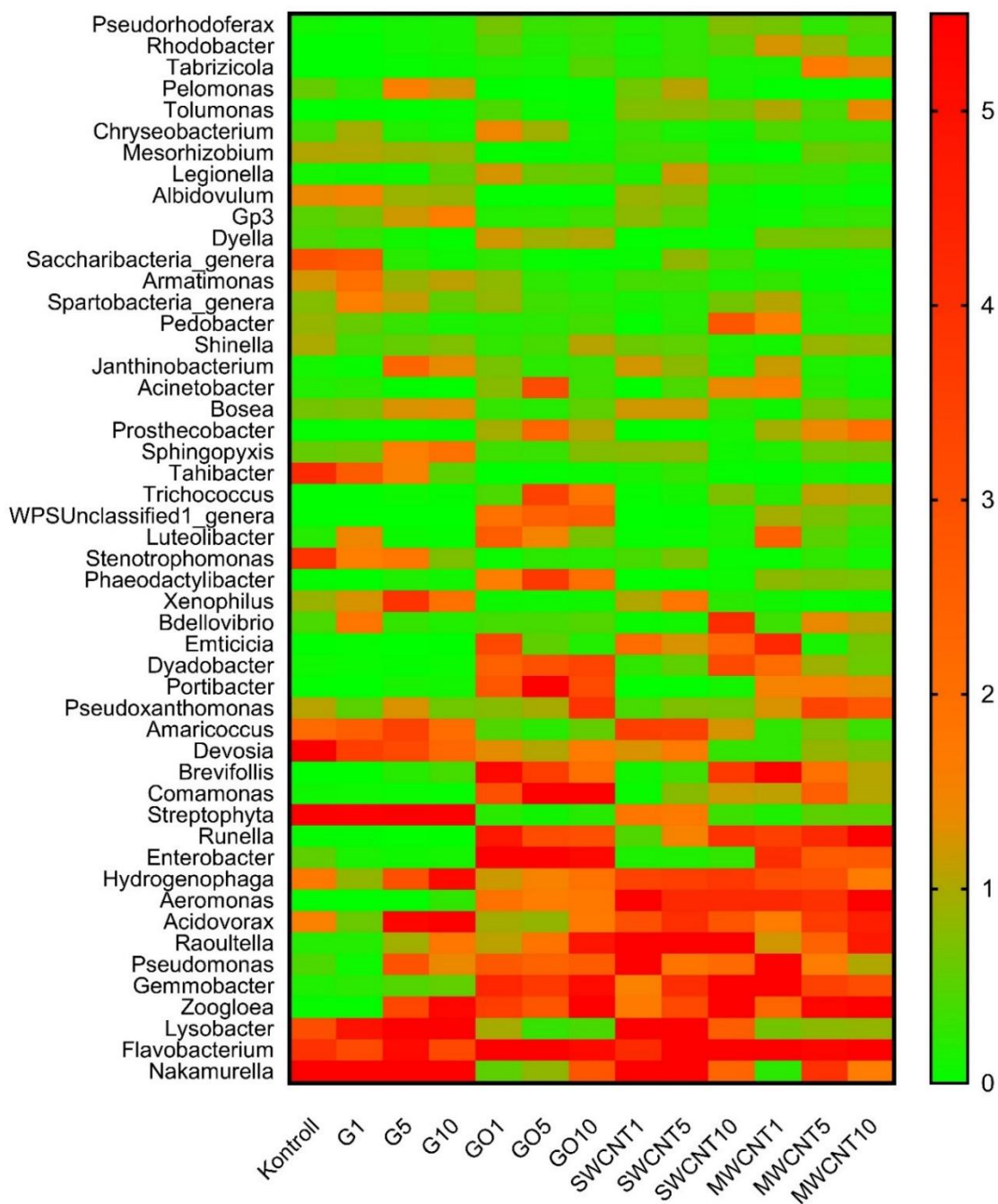
szennyvízben található ammónia koncentrációját, amely nagyon fontos a szennyvíz tisztításában. Abundanciája a nanoanyagok mennyiségének emelésével folyamatosan növekedett, ami arra utal, hogy a toxikus anyagokkal szemben ellenálló nemzetség, így elősegítve a hatékony szennyvíztisztítást. Ezen nemzetségek eltérő változása magyarázhatja a hatékony nitrogén eltávolítást, mivel a nanoanyagok eltérő nitrogén eltávolító nemzetségekre voltak hatással: míg az egyik nemzetség abundanciája csökkent, addig egy másiké növekedett.



5.22. ábra. Szénalapú nanoanyagok hatása az aerob granuláris iszap mikrobiális összetételére osztály szinten. A grafén (G), grafén-oxid (GO), egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT) utáni számok a nanoanyagok mennyiségét jelölik mg/L-ben megadva.

A *Streptophyta*, *Stenotrophomonas* és *Xenophilus* nemzetségek képesek a szennyvíz szerves anyag eltávolítására [137–139]. Abundanciájuk a GO, SWCNT és MWCNT kitettséget követően csökkent, amely magyarázhatja az elfolyó szennyvíz megnövekedett KOI koncentrációját. Ezzel szemben a *Brevifollis* és *Portibacter* nemzetségek gyakorisága, az összes fajta részecske adagolása után (kivéve GO), folyamatosan nagyobb volt a kezdeti értékhez

képest. Feltehetően ezen két szerves anyag eltávolítására képes nemzetség esetünkben nem játszott elengedhetetlen szerepet a glükóz eltávolítása során [137]. Több előző tanulmányban is megállapították, hogy az *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* és *Runella* nemzetségek fontos szerepet játszanak a szennyvízben található foszfor polifoszfátokká alakításában [136,137,140]. Rendszerünkben, a kezdeti granuláris iszapban e nemzetségek mennyisége alacsony volt, viszont főként a GO NP, SWCNT és MWCNT hatására abundanciájuk megnövekedett, míg a G jelentős változást nem okozott esetünkben. A jelentős foszfor eltávolítási hatások csökkenését azonban ezen megfigyelésekkel nem tudtuk magyarázni, valószínűleg a nanoanyagok kémiai-fizikai úton gátolták a hatékony foszforeltávolítást, azáltal, hogy a foszfát hozzáférhetőségét korlátozták. Továbbá, az is előfordulhatott, hogy a foszfor akkumulálására képes mikroorganizmusok aktivitása csökkent, így azok nem voltak képesek felhalmozni a foszfort, annak ellenére sem, hogy a foszfor akkumuláló mikroorganizmusok abundanciája megnövekedett.



5.23. ábra. Szénalapú nanoanyagok hatása az aerob granuláris iszap mikrobiális összetételére nemzetség szinten. A grafén (G), grafén-oxid (GO), egyfalú szén nanocső (SWCNT) és többfalú szén nanocső (MWCNT) utáni számok a nanoanyagok mennyiségét jelölik mg/L-ben megadva.

Az EPS szintézisére képes *Nakamurella* volt a legabundánsabb nemzetség a kezdeti granuláris iszapban [23], viszont relatív gyakorisága a G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT adagolást követően is csökkent a kezdeti értékhez képest. Valószínűleg a *Nakamurella* nemzetség

kiemelten fontos EPS termelő, ezért fontos szerepet játszik a granuláris iszap kialakulása során, viszont nagyon érzékeny a környezetidegen anyagokkal szemben. A *Zoogloea* egy jól ismert EPS termelő mikroorganizmus [135], amely relatív abundanciája a nanoanyagok mennyiségének emelésével folyamatosan növekedett rendszereinkben. He és mtsai., valamint Zheng és mtsai. ZnO és CuO nanorészecskék adagolása, valamint mennyiségük növelését követően szintén a *Zoogloea* nemzetség abundanciájának és a granuláris iszap EPS mennyiségének növekedését figyelték meg [70,71]. A *Flavobacterium* is képes EPS szintézisére [137], amely abundanciája szintén minden reaktorban magasabb volt mint a kontroll iszapban. Feltételezhetően az említett két nemzetség a granuláris iszap nélkülözhetetlen EPS termelő mikroorganizmusai, amelyek jól tolerálják a nanoanyagok jelenlétét. A *Devosia* nemzetség tagjai is képesek EPS szintézisre [141], viszont csak a grafénnal szemben voltak toleránsak, a GO, SWCNT és MWCNT jelentős csökkenést okoztak mennyiségükben.

Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a szekvenálás alapján a legelterjedtebb nemzetségek (*Nakamurella*, *Flavobacterium*, *Lysobacter*, *Zoogloea*, *Gemmobacter*, *Pseudomonas* és *Raoultella*) mindegyikénél megfigyelték, hogy képesek az EPS előállítására [140,142–146], amely szintén magyarázhatja a folyamatosan növekvő EPS mennyiséget, ezáltal védve a többi mikroorganizmust a toxikus anyagoktól, így fenntartva egy hatékony szennyvíztisztítási hatékonyságot.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a szén nanoanyagok a granuláris iszap mikrobiális közösségének jelentős összetételbeli és mennyiségi változását okozták. Néhány nemzetség, mint a *Zoogloea*, *Gemmobacter* és *Pseudomonas* alkalmazkodott az új környezethez, míg a legtöbb mikroorganizmus abundanciája csökkent, vagy mennyiségük kimutathatósági szint alá csökkent (például a *Nakamurella*, *Lysobacter* és *Devosia* nemzetségek) a granuláris iszaptól a nanoanyagok által kifejtett toxikus hatás következtében.

Az 5.6. táblázat szemlélteti a mikrobiális közösség szekvencia és taxon számát, valamint az Alfa diverzitását, összegezve a fontosabb információkat és a különböző bioreaktorokban lévő mikroorganizmusok diverzitás indexeit. A 13 minta lefedettsége 92% és 97% között változik, ami azt jelzi, hogy a kapott szekvenciák többnyire meghatározásra kerültek a szekvenálás kiértékelés során. A szekvenciák és a taxonok száma a kontroll granuláris iszapban volt a legmagasabb (kivéve az 5 mg/L MWCNT-t), amely arra utal, hogy a szén-alapú nanoanyagok negatív hatással

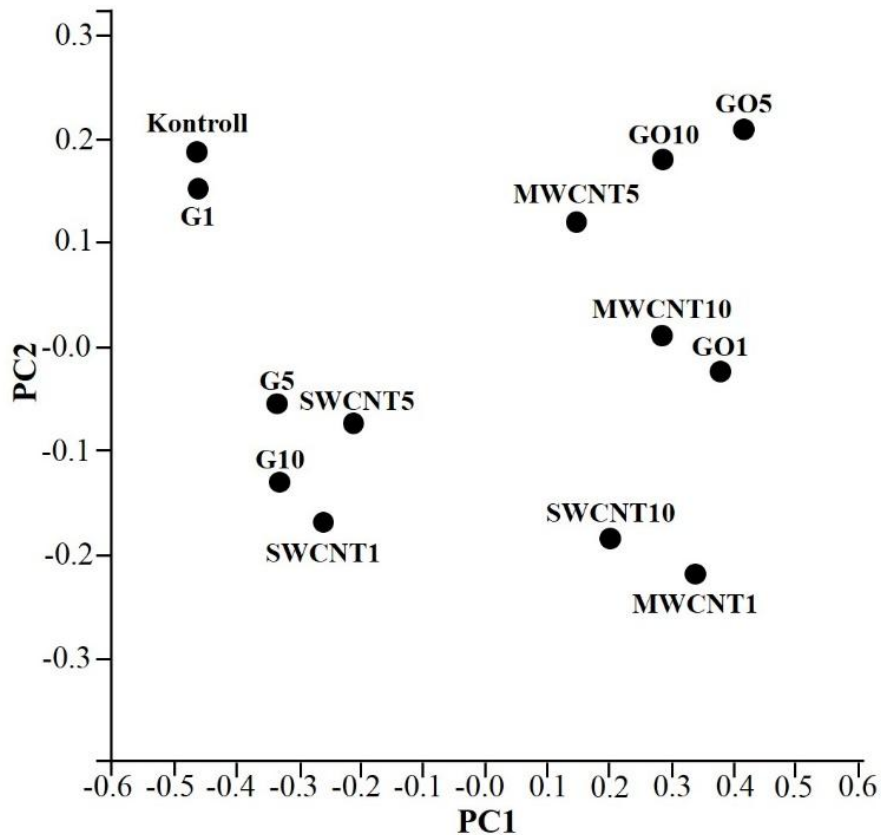
voltak a granuláris iszap össz-mikrobiális közösségére. A legtöbb szekvencia számot a GO esetében mértünk, ami arra utalhat, hogy a grafén-oxid főként a mikroorganizmusok metabolikus aktivitására volt hatással. A legkevesebb szekvencia számot a SWCNT adagolásokat követően mértünk, ami arra enged következtetni, hogy negatív hatását a mikroorganizmusokra sejthalál okozása által fejtí ki. A taxonok száma a diverzitás és az egyedszám becslésére szolgál. A taxonok számát tekintve a kontroll iszaphoz képest minden esetben csökkenést tapasztaltunk (kivéve az 5 mg/L MWCNT-t), ami alátámasztja a nanoanyagok toxikus hatását a mikroorganizmusokra nézve. A legalacsonyabb taxonszámokat a SWCNT adagolás hatására következett be, ami szintén alátámasztja azt az elképzelést, hogy a nanocsövek sejthalált okoznak, míg a többi nanoanyag inkább metabolikus aktivitás csökkenést okozhat.

5.6. táblázat. A granuláris iszap mikrobiális közösségének diverzitás becslése

Minta	Nanoanyag mennyiség (mg/L)	Szekvencia szám	Taxonok száma	Chao index	Simpson index	Shannon index	Lefedettségg
Kontroll	0	112272	716	489	0,93	3,79	0,93
	1	86903	573	392	0,95	3,96	0,92
G NP	5	93083	637	411	0,95	3,78	0,94
	10	101773	626	389	0,93	3,54	0,95
GO NP	1	105225	602	391	0,96	3,93	0,93
	5	104930	599	386	0,96	3,82	0,95
	10	111294	666	410	0,96	3,95	0,94
SWCNT	1	88566	526	334	0,93	3,34	0,97
	5	88993	596	366	0,95	3,68	0,96
	10	96652	458	297	0,94	3,47	0,97
MWCNT	1	91024	464	286	0,95	3,57	0,97
	5	116190	780	464	0,97	4,32	0,94
	10	89451	691	439	0,96	4,12	0,94

A Shannon diverzitás index alapján a G NP 1 mg/L mennyiségben a mikrobiális diverzitást növelte, míg magasabb mennyiségben a diverzitás enyhén csökkent. A GO esetében a diverzitás a kezdeti granuláris iszaphoz képest magasabb volt, ami egybevág a magasabb szekvencia és taxonómia számokkal, szintén arra utalva, hogy a GO főként aktivitás csökkenést okoz a granuláris iszapban. A SWCNT adagolást hatására a diverzitási index jelentősen alacsonyabb volt, szintén azt sugallva, hogy a szén nanocső sejthalált okoz.

A főkomponens analízis (PCA) alapján látható (5.24. ábra), hogy a mikrobiális közösségre a G NP fejtette ki a legkisebb hatást 1 mg/L-es mennyiségben. A grafén koncentrációjának növelése 5 és 10 mg/L-re már nagyobb változást okozott, hasonló, mint a SWCNT 1 és 5 mg/L mennyiségben. Viszont a mikrobiális összetételre a legerőteljesebb változást SWCNT 10 mg/L és a MWCNT 1 mg/L-es adagolása okozták. A MWCNT némileg ellentmondhat a mért vízkémiai változásoknak, ami alapján feltehetően ebben az esetben nem a legfontosabb tápanyag eltávolításáért felelős mikroorganizmusok összetételében okozott jelentős átalakulást.



5.24. ábra. A granuláris iszap mikrobiális közösségének főkomponens analízise (PCA) nemzetség szinten.

Kísérleti eredményeink azt bizonyítják, hogy a vizsgált szén-alapú nanoanyagok közül a szennyvíztisztítás hatásfokára a G és MWCNT fejtették ki a legenyhébb hatást, a KOI esetében még 10 mg/L-es mennyiségben sem lépték át 91/271/EGK irányelvben meghatározott 125 mg/L-es határértéket, míg a foszfor eltávolítás tekintetében a kimenő szennyvíz éppen, hogy átlépte a 2 mg/L-es határértéket. Ezzel szemben a GO és SWCNT 10 mg/L mennyiségben az elfolyó szennyvíz KOI és foszfor tartalma is meghaladta az irányelvben előírtakat, ami a befogadó közeg (tó vagy folyó) eutrofizációját okozhatja. A nagyobb mértékű szennyezettség az EPS

mennyiségének csökkenése is hozzájárulhatott, mivel a 10 mg/L koncentrációban adagolt szén-alapú nanoanyagok közül a GO és SWCNT hatására mértük az alacsonyabb EPS-t. A nanoanyagok hatására a mikrobiális összetétel megváltozott, mind törzs, osztály és nemzetség szinten. Mivel a nanoanyagok 1 és 5 mg/L mennyiségben még nem okozták az elfolyó szennyvíz jelentős minőségbeli romlását, ezért valószínűleg olyan kis mennyiségben lévő mikroorganizmusok szaporodtak el, amelyek toleráló képessége magasabb volt, mint azoké, amelyek mennyisége csökkent. Annak ellenére, hogy a vízminőségi romlásban a GO NP okozta a legnagyobb változást, szekvencia szám tekintetében itt mértük a legnagyobb értékeket, ami arra utal, a GO NP főként metabolikus aktivitás csökkenést okoz. Ezzel szemben a vízkémiai mérések alapján második legtoxikusabb nanoanyag a SWCNT, negatív hatását elsősorban sejthalál okozásával fejtí ki, mivel a szekvenciák száma és a diverzitási index ebben az esetben volt a legalacsonyabb, csökkentve a szennyvíztisztításban résztvevő aktív mikroorganizmusok számát.

6. Összefoglalás

Munkánk során a különböző tulajdonságú szénalapú nanoanyagok hatását vizsgáltuk az aerob granuláris iszapos szennyvíztisztítási eljárás esetében. Kísérleteinkben a nanoanyagokat különböző koncentrációkban adagoltuk a bioreaktorokhoz több napon át, miközben folyamatosan nyomon követtük a víztisztítási hatásfokot, az iszapban végmenő változásokat, valamint a mikrobiális közösségben történő átrendeződéseket is elemeztük. Szakirodalmi adatok alapján, tudomásunk szerint Magyarországon elsőként sikerült aerob granulomot kialakítani, valamint szakaszos üzemi betáplálással stabilan működtetni a granuláris aerob iszapot tartalmazó bioreaktorokat, folyamatosan fenntartva azok tápanyag eltávolítási hatásfokát.

Az eleveniszap beszerzését követően, az ülepedési idő folyamatos csökkentésével, egy hónap elteltével a bioreaktorban 0,5–10 mm nagyságú granulumokat alakítottunk ki. A sikeres granulum képződést a biomassza mennyiségének és az ülepedés sebességének követésével, valamint az EPS mátrixába beágyazódott mikroorganizmusokat ábrázoló SEM felvételekkel igazoltuk.

Munkánk első részében az egyik leggyakrabban alkalmazott nanorészecskét, a GO NP hatását vizsgáltuk több koncentrációban is az AGS SBR esetében, amely során a főbb vízkémiai paramétereket és az iszapban végbemenő változásokat elemeztük, ezt követően a kapott eredményeket kiértékeltek. A GO nanorészecskék 5-95 mg/L mennyiségben a bioreaktorok működésére eltérő hatást fejtettek ki. Az elfolyó szennyvíz nitrit és nitrát koncentrációjában nem tapasztaltunk egyik esetben sem változást, amiből arra következtettünk, hogy a granulumok hatékony védelmet biztosítottak a denitrifikáló mikroorganizmusok számára.

A GO részecskék 15, 25 és 35 mg/L koncentrációban serkentették az EPS termelődését, amely a kezdeti 5,95 mg/g MLVSS-ról 11,66; 8,44 és 8,17 mg/g MLVSS-re emelkedett. Az AGS magas EPS mennyiségének köszönhetően a rendszer $\text{NH}_4\text{-N}$ és KOI eltávolítási hatásfoka jelentős mértékben nem változott hét nap elteltével sem. A tápanyagok eltávolítási hatásfoka nem csökkent 75% alá, ezért az elfolyó szennyvíz minősége még megfelelt a 91/271/EGK európai irányelvnek.

A GO magasabb koncentrációban adagolva (55, 75 és 95 mg/L) a $\text{NH}_4\text{-N}$ és KOI eltávolítási hatásfokának és az EPS mennyiségének egyaránt jelentős csökkenését eredményezte. A legmagasabb nanorészecske koncentráció alkalmazása mellett a KOI és $\text{NH}_4\text{-N}$ eltávolítási hatásfok 73,7 és 81%-ra csökkentek, és ezzel párhuzamosan a biomassza mennyisége is csökkent.

Ezen megfigyelések alapján megállapítottuk, hogy az EPS nagyon fontos szerepet tölt be a granuláris iszap tápanyag eltávolítási képességében, azáltal, hogy védelmet biztosít a granulomot alkotó mikroorganizmusokat érő káros hatások ellen, valamint a mátrixában különböző tápanyagok is felhalmozódnak, ezért az EPS összetétel és mennyiségbeli változása szintén hozzájárul a bioreaktor tápanyag eltávolítási hatásfokának változásához. A bioreaktorok mikrobiális összetételében is jelentős változásokat figyeltünk meg. A DGGE elemzés alapján elmondható, hogy a baktériumtörzsek száma csökkent a GO NP mennyiségének növelésével, amelyre a gélen található sávok intenzitás csökkenéséből, valamint a sávok mennyiségének csökkenéséből következtetünk. Ugyanakkor a legellenállóbb törzseknek a *Paracoccus* sp., *Klebsiella* sp. és *Acidovorax* sp. bizonyultak, mely fajok fontos szerepet játszanak a biológiai szennyvíztisztításban.

Következő kísérletünkben az AGS SBR regenerálási képességét vizsgáltuk. Az előzőtől eltérően, itt egyetlen bioreaktorban két hetente fokozatosan növeltük a szintetikus szennyvíz GO NP koncentrációját (0-ról 115 mg/L-re), végül a GO adagolást megszüntetve vizsgáltuk a bioreaktor regenerálódó képességét. A rendszer vízkémiai és az iszap tulajdonságának vizsgálatán túlmenően mikrobiális aktivitás méréseket is elvégeztünk.

Az eredményekből azokat a következtetéseket vontuk le, hogy hasonlóan az előző kísérlet során tapasztaltakhoz a GO nanorészecskék nem okoztak mérhető változást a nitrit- és nitrát-nitrogén eltávolítási hatásfokában, amely összhangban áll a granuláris iszap SNRR és SNIRR változatlan értékével. A GO nanorészecskék 55 mg/L-es koncentrációban adagolva az elfolyó szennyvíz megnövekedett $\text{NH}_4\text{-N}$ és KOI koncentrációját eredményezték, valamint a SAOR és SOUR értéke is szignifikáns csökkenést mutatott. Ezen megfigyelések alapján megállapítottuk, hogy a nanorészecskék az aerob szerves anyag lebontó és ammónia oxidáló mikroorganizmusokra voltak negatív hatással, amely törzsek jellemzően a granulumok külső részén vannak beágyazódva az EPS mátrixba.

A TP eltávolítási hatásfoka már kis GO részecske koncentráció hatására is csökkent, valamint a SPUR szignifikáns csökkenése hamarabb bekövetkezett, mint a SPRR csökkenése, amely szintén arra utalt, hogy a GO az aerob folyamatokra erőteljesebb és gyorsabb hatást fejt ki. Az EPS mennyisége 55 mg/L GO adagolást követően volt a legmagasabb (a kezdeti 5,95-ről 11,86 mg/g MLVSS-ra növekedett), viszont a részecskék mennyiségének további növelése már az EPS mennyiség drasztikus csökkenését eredményezte.

Végül 98 nap elteltével a GO NP adagolást megszüntettük, és megvizsgáltuk az AGS regenerálódó képességét. Megfigyeltük, hogy tizennégy nap után a bioreaktor tápanyag eltávolítási hatásfoka jelentősen javult, az elfolyó szennyvíz KOI és $\text{NH}_4\text{-N}$ koncentrációja közel azonos volt a kezdeti értékekkel. Azonban a TP eltávolítás hatékonyságában nem tapasztaltunk ilyen mértékű javulását, amelyből arra következtettünk, hogy a GO a foszfor eltávolítás esetében nem csak akut hatást, hanem krónikus hatást fejtett ki.

Eredményeink várakozásainkat felülmúlták, hiszen a GO adagolást megszüntetve a bioreaktor működése, a foszfor eltávolítást leszámítva, teljesen visszaállt eredeti állapotába, így sikerült bebizonyítanunk az AGS SBR szennyvíztisztítási technológia kiváló regenerálódó képességét ezen nanoanyag alkalmazása esetében.

A szakirodalomban csak kevés összehasonlító tanulmány található, amelyben a különböző szénalapú nanoanyagok szennyvíztisztítási folyamatokra gyakorolt hatását vizsgálják (míg AGS esetében tudomásunk szerint nincs is). Ennél fogva fontosnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk a G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT krónikus hatását (tíz nap) az AGS reaktorban, környezeti szempontból releváns koncentrációkban (1, 5 és 10 mg/L), annak érdekében, hogy meg tudjuk állapítani hatásukat ezen elterjedőben lévő technológia esetében is.

A szénalapú nanoanyagok 1 mg/L mennyiségben a bioreaktorok működésére nem fejtettek ki negatív hatást, viszont nagyobb mennyiségben (5 és 10 mg/L) a rendszer KOI és foszfát eltávolítási hatásfoka csökkent. A nanoanyagok közül 5 mg/L mennyiségben csak a GO okozott enyhe csökkenést a KOI eltávolítási hatásfokában, míg a PO_4^{3-} eltávolítási hatásfokában a GO és SWCNT okozott enyhe negatív hatást.

A 10 mg/L G NP, GO NP, SWCNT és MWCNT adagolása a bioreaktorok KOI eltávolítási hatásfokát a tizedik napra 94%-ról 91, 87, 89 és 90%-ra csökkenését eredményezték. A PO_4^{3-} eltávolítási hatásfoka pedig 90, 84, 85 és 89%-ra csökkent a kezdeti 96%-ról. A biológiai nitrifikációt és denitrifikáció folyamatát a környezetidegen nanoanyagok nem befolyásolták, míg a granuláris iszap EPS mennyiségére pozitív hatást fejtettek ki minden esetben.

A bioreaktorok vízkémiai és EPS mennyiségbeli változásai alapján a szénalapú nanoanyagok toxikus hatásának mértéke $G < \text{MWCNT} < \text{SWCNT} < \text{GO}$ volt. A különböző mértékű toxicitásuk az anyagok különböző tulajdonságaiból származhatnak. Korábban leírtak szerint például a G aggregációra hajlamos, ezáltal kifejtett negatív hatása csökkenhet. Ezzel szemben a GO felületén meglévő funkcionális csoportok a sejtekhez kapcsolódva azok működési zavarát

vagy sejthalált okozhatják. A SWCNT mérete kisebb a MWCNT-hez képest, így a sejtmembránon való átjutása egyszerűbb. Ezen különbségekből adódóan a vizsgált nanoanyagok a mikrobiális közösségre is eltérő hatást fejtettek ki, melyet 16S rRNS újgenerációs szekvenálás segítségével vizsgáltunk. Kapott eredményeink a mikrobiális közösség jelentős változásait mutatták, mely magyarázható azzal, hogy az eltérő tulajdonságokkal rendelkező mikroorganizmusok eltérő toleráló és védekező képességekkel is rendelkeznek. A nitrogén eltávolításában fontos szerepet játszó mikroorganizmusok abundanciája eltérő mértékben változott a különböző nanoanyagok adagolásának hatására, amely jelenség magyarázza az AGS hatékony és változatlan ammónia, nitrit és nitrát eltávolítását. A *Zoogloea* és a *Flavobacterium* nemzetségek, melyek bizonyítottan EPS termelő mikroorganizmusok, bizonyultak a legtoleránsabbnak a nanoanyagokkal szemben, mivel abundanciájuk a kezdeti granuláris iszaphoz képest minden rendszerben magasabb volt, ezáltal a különböző mikroorganizmusok számára elegendő, védelmet biztosító EPS előállítására voltak képesek.

Eredményeinket összegezve elmondható, hogy habár magas nanoanyag betáplálás mellett az aerob granuláris iszap tápanyag eltávolítása romlott, ezen anyagok negatív hatása környezeti koncentrációban, figyelembe véve a 91/271/EGK európai irányelvet, elhanyagolható. A bioreaktorokból távozó szennyvíz minősége egyéb kezelési lépés beiktatása nélkül is megfelelt az előírt határértéknek, amelyeket az eleveniszapos rendszerek alkalmazásánál általában kémiai adalék anyagok segítségével érnek el. A folyamatosan növekvő szennyvíz mennyiség és annak különböző összetételű szennyezettsége a már meglévő biológiai szennyvíztisztító telepek hatékony működését veszélyeztetik. Tekintettel arra, hogy eredményeink kiváló toleráló és regenerálódó képességekkel rendelkező szennyvíztisztítási technológiára utalnak, széles körű alkalmazásának elterjedéséhez tapasztalataink hozzájárulhatnak.

7. Summary

We investigated the effects of different properties of carbon-based nanomaterials (CBNs) on aerobic granular sludge (AGS) wastewater treatment process. In our experiments, we added the nanomaterials to the bioreactors at different concentrations for several days while we were continuously monitoring the efficiency of water treatment, changes in the sludge, and analyzing the microbial community's restructuring. To our knowledge, based on literature data in Hungary, firstly we were able to develop aerobic granules and stably operating bioreactors containing granulated aerobic sludge using periodic feed input, meanwhile continuously maintaining the nutrient removal efficiency.

After obtaining activated sludge, we formed granules ranging from 0.5 to 10 mm in size in the bioreactor within a month by continuously reducing the sedimentation time. The successful granulation was confirmed by monitoring the biomass quantity and sedimentation rate, as well as scanning electron microscope (SEM) images showing microorganisms embedded in the extracellular polymeric substance (EPS) matrix.

In the first part of our work, we investigated the effect of one of the most commonly used nanomaterials, graphene oxide nanoparticles (GO NPs), at various concentrations in an AGS sequencing batch reactor (SBR). We analyzed the main water chemistry parameters and the changes occurred in the sludge, and then we evaluated the results. GO NPs at concentrations of 5-95 mg/L had different effects on the performance of the bioreactors. We did not observe any changes in nitrite and nitrate concentrations in the effluent wastewater in any case, indicating that the granules provided effective protection for denitrifying microorganisms.

The GO particles at concentrations of 15, 25, and 35 mg/L stimulated EPS production, which increased from the initial value of 5.95 mg/g mixed liquor volatile suspended solids (MLVSS) to 11.66, 8.44, and 8.17 mg/g MLVSS, respectively. Due to the high EPS content of the AGS, the removal efficiency of $\text{NH}_4\text{-N}$ and chemical oxygen demand (COD) did not significantly change even after 7 days. The nutrient removal efficiency did not decrease below 75%, so the effluent wastewater quality still met the requirements of the European Directive 91/271/EEC.

In the case of higher concentrations of GO (55, 75, and 95 mg/L), removal efficiency of $\text{NH}_4\text{-N}$ and COD as well as the EPS production were significantly reduced. The application of

the highest nanoparticle concentration resulted in a reduction of removal efficiency of COD and $\text{NH}_4\text{-N}$ to 73.7% and 81%, respectively, accompanied by a decrease in the amount of biomass. Based on these observations, we concluded that EPS plays a crucial role in maintaining the nutrient removal capacity of granular sludge by providing protection against harmful effects on microorganisms forming the granules and by accumulating various nutrients in the matrix. Therefore, changes in the composition and quantity of EPS also contribute to the changes in nutrient removal efficiency of the bioreactor. Based on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis, it can be stated that the number of bacterial strains decreased due to increased GO NP concentration, as evidenced by the decrease in band intensity and quantity on DGGE gel images. The most resistant genus were found to be *Paracoccus* sp., *Klebsiella* sp., and *Acidovorax* sp., which play an important role in biological wastewater treatment.

In our next experiment, we investigated the regenerative capacity of AGS SBR. In contrast to the previous experiment, we gradually increased the concentration of synthetic wastewater containing GO NPs (from 0 to 115 mg/L) in a single bioreactor every two weeks and then examined the reactor's regenerative capacity after discontinued GO dosing. In addition to examining the water chemistry parameters and sludge properties, we also measured microbial activity.

Based on the results, we concluded that similarly to the previous experiment, GO nanoparticles did not cause any measurable changes in the nitrite- and nitrate-nitrogen removal efficiency, which is consistent with the unchanged specific nitrate reduction rate (SNRR) and specific nitrite reduction rate (SNIRR) of the granular sludge. When GO nanoparticles were dosed at a concentration of 55 mg/L, it resulted an increased concentration of $\text{NH}_4\text{-N}$ and COD in the effluent, and the values of specific ammonia oxidation rate (SAOR) and specific oxygen uptake rate (SOUR) also showed a significant decrease. Based on these observations, we concluded that the nanoparticles had a negative effect on aerobic organic matter-degrading and ammonia-oxidizing microorganisms, which are typically embedded on the outer surface of the granules in the EPS matrix.

The total phosphorus (TP) removal efficiency decreased even at low concentrations of GO particles, and the significant decrease in specific phosphorus uptake rate (SPUR) occurred earlier than the decrease in specific phosphorus release rate (SPRR), indicating that GO has a stronger

and faster effect on aerobic processes. The amount of EPS was the highest following the addition of 55 mg/L of GO (increasing from 5.95 to 11.86 mg/g MLVSS), but further increase of the particle concentration resulted a drastic EPS amount reduction.

After 98 days, we stopped dosing GO NP and examined the AGS regeneration capacity. We observed a significant improvement in the nutrient removal efficiency after 14 days, with the effluent KOI and $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations nearly equal to the initial values. However, we did not observe such a significant improvement in TP removal efficiency, indicating that GO had a chronic effect on phosphorus removal in addition to its acute effect.

Our results exceeded our expectations, as after discontinuing the GO dosing, the parameters of the bioreactor returned completely to original state, except for phosphorus removal, thus proving the excellent regenerative capacity of the AGS SBR wastewater treatment technology in the case of this nanomaterial application.

There are only a few comparative studies in literature examining the effect of different carbon-based nanomaterials on wastewater treatment processes (while to our knowledge, none have been conducted on AGS). Therefore, we deemed it important to investigate chronic effects (over 10 days) of graphene nanoplatelets (G NP), graphene oxide nanoparticles (GO NP), single-walled carbon nanotubes (SWCNT), and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) at environmentally relevant concentrations (1, 5, and 10 mg/L) in the AGS reactor in order to determine their effects on this emerging technology as well.

Carbon-based nanomaterials did not exert any negative effects on the performance of the bioreactors at a concentration of 1 mg/L, however, at higher concentrations (5 and 10 mg/L), the removal efficiency of COD and phosphate was reduced. Among the nanomaterials, only GO caused a slight decrease in COD removal efficiency at a concentration of 5 mg/L, while both GO and SWCNT had a slight negative effect on phosphate removal efficiency.

After 10 days of dosing 10 mg/L G NP, GO NP, SWCNT, and MWCNT, the COD removal efficiency of the bioreactors decreased from 94% to 91%, 87%, 89%, and 90%, respectively. The PO_4^{3-} removal efficiency also decreased from the initial 96% to 90%, 84%, 85%, and 89%. The biological nitrification and denitrification processes were not affected by the foreign

nanomaterials, while in every case, they had a positive effect on the amount of EPS in the granulated sludge.

Based on the changes in water chemistry parameters and EPS quantity in the bioreactors, the extent of toxic effects of the carbon-based nanomaterials was $G < \text{MWCNT} < \text{SWCNT} < \text{GO}$. The different degrees of toxicity may be attributed to the different properties of the materials. As previously described, for example, G is prone to aggregation, which may reduce its negative effects. In contrast, functional groups on the surface of GO can bind to cells, causing their malfunction or even cell death. The size of SWCNT is smaller than that of MWCNT, making it easier to cross the cell membrane. Due to these differences, the tested nano-materials exerted different effects on the microbial community, which we investigated using 16S rRNA gene sequencing. Our results showed significant changes in the microbial community, which can be explained by the fact that microorganisms with different properties have different tolerating and defensive abilities. The abundance of microorganisms that play important role in nitrogen removal changed to varying degrees depending on the dosage of different nanoparticles, which explains the efficient and consistent removal of ammonia, nitrite, and nitrate by AGS. The genera *Zoogloea* and *Flavobacterium*, which are known to be EPS-producing microorganisms, proved to be the most tolerant to nanomaterials, as their abundance was higher in all systems compared to the initial granular sludge, thus they were able to produce sufficient protective EPS for different microorganisms.

Summarizing our results, it can be stated that although the nutrient removal of aerobic granular sludge deteriorated due to high nano-material concentration, the negative impact of these materials can be considered negligible when considering the environmental concentration in compliance with the European Directive 91/271/EEC. The effluent quality leaving the bioreactors met the required limit without any additional treatment steps, which are usually achieved by the use of chemical additives in activated sludge systems. The continuously increasing volume of wastewater and its various pollutant loads threaten the efficient operation of existing biological wastewater treatment plants. Considering that our results suggest excellent tolerating and regenerating ability, this could contribute to the widespread adoption of this wastewater treatment technology.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek, *Prof. Dr. Kónya Zoltán* Tudományos és innovációs rektorhelyettesnek, aki biztosította a doktori disszertációm megírásához szükséges feltételeket. Köszönöm, hogy tanácsaival, biztató szavaival segített a doktori fokozat megszerzéséig vezető rögös úton. Külön köszönöm *Dr. Rónavári Andreának*, hogy segítséget nyújtott eredményeim publikálásában.

Köszönöm *a tanszék összes dolgozójának*, elsősorban *Dr. Kukovecz Ákos* egyetemi docensnek, *Dr. Halász János* egyetemi tanárnak és *Sánta Levente* PhD hallgatónak támogató szakmai tanácsait.

Szeretném megköszönni a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft. Biotechnológiai Divízió igazgatójának, *Dr. Kiss Istvánnak* és az intézet munkatársainak segítségét a biológiai vizsgálatok során. Külön köszönettel tartozom *Dr. Balázs Margitnak*, *Dr. Kesserű Péternek* és *Vörös Andreának*, akik támogatása és segítsége nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani *szüleimnek*, *testvéremnek* és *feleségemnek*, *Kedves Orsolyának* az SZTE Mikrobiológiai tanszék tudományos segédmunkatársának, tanulmányaim során nyújtott támogatásukért.

Hivatkozások

- [1] M. Chen, Y. Sun, J. Liang, G. Zeng, Z. Li, L. Tang, Y. Zhu, D. Jiang, B. Song, Understanding the influence of carbon nanomaterials on microbial communities, *Environ. Int.* 126 (2019) 690–698. doi:10.1016/j.envint.2019.02.005.
- [2] M. Chen, S. Zhou, Y. Zhu, Y. Sun, G. Zeng, C. Yang, P. Xu, M. Yan, Z. Liu, W. Zhang, Toxicity of carbon nanomaterials to plants, animals and microbes: Recent progress from 2015-present, *Chemosphere.* 206 (2018) 255–264. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.020.
- [3] M.F.L. De Volder, S.H. Tawfick, R.H. Baughman, A.J. Hart, Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications, *Science* (80-.). 339 (2013) 535 LP – 539. doi:10.1126/science.1222453.
- [4] P. Hassanzadeh, E. Arbabi, F. Atyabi, R. Dinarvand, Application of carbon nanotubes as the carriers of the cannabinoid, 2-arachidonoylglycerol: Towards a novel treatment strategy in colitis, *Life Sci.* 179 (2017) 66–72. doi:10.1016/j.lfs.2016.11.015.
- [5] K. Aitola, J. Zhang, N. Vlachopoulos, J. Halme, A. Kaskela, A.G. Nasibulin, E.I. Kauppinen, G. Boschloo, A. Hagfeldt, Carbon nanotube film replacing silver in high-efficiency solid-state dye solar cells employing polymer hole conductor, *J. Solid State Electrochem.* 19 (2015) 3139–3144. doi:10.1007/s10008-015-2937-1.
- [6] M. Politou, I. Asselberghs, B. Soree, C.S. Lee, S. Sayan, D. Lin, P. Pashaei, C. Huyghebaert, P. Raghavan, I. Radu, Z. Tokei, S. De Gendt, M. Heyns, Single- and multilayer graphene wires as alternative interconnects, *Microelectron. Eng.* 156 (2016) 131–135. doi:10.1016/j.mee.2016.01.002.
- [7] M. Chen, X. Qin, G. Zeng, Biodiversity change behind wide applications of nanomaterials?, *Nano Today.* 17 (2017) 11–13. doi:10.1016/j.nantod.2017.09.001.
- [8] P. Laux, C. Riebeling, A.M. Booth, J.D. Brain, J. Brunner, C. Cerrillo, O. Creutzenberg, I. Estrela-Lopis, T. Gebel, G. Johanson, H. Jungnickel, H. Kock, J. Tentschert, A. Tlili, A. Schäffer, A.J.A.M. Sips, R.A. Yokel, A. Luch, Challenges in characterizing the environmental fate and effects of carbon nanotubes and inorganic nanomaterials in aquatic systems, *Environ. Sci. Nano.* 5 (2018) 48–63. doi:10.1039/C7EN00594F.
- [9] M. Chen, P. Xu, G. Zeng, C. Yang, D. Huang, J. Zhang, Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 745–755. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.003.
- [10] Y. V Nancharaiah, G.K.K. Reddy, Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications, *Bioresour. Technol.* 247 (2018) 1128–1143. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.131.
- [11] W. Ren, G. Ren, Y. Teng, Z. Li, L. Li, Time-dependent effect of graphene on the structure, abundance, and function of the soil bacterial community, *J. Hazard. Mater.* 297 (2015) 286–294. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.05.017.

- [12] Y. Hao, C. Ma, Z. Zhang, Y. Song, W. Cao, J. Guo, G. Zhou, Y. Rui, L. Liu, B. Xing, Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem, *Environ. Pollut.* 232 (2018) 123–136. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.024.
- [13] P. Begum, R. Ikhtari, B. Fugetsu, Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce, *Carbon N. Y.* 49 (2011) 3907–3919. doi:10.1016/j.carbon.2011.05.029.
- [14] L. Jin, Y. Son, J.L. DeForest, Y.J. Kang, W. Kim, H. Chung, Single-walled carbon nanotubes alter soil microbial community composition, *Sci. Total Environ.* 466–467 (2014) 533–538. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.035.
- [15] W. Zhou, J. Shan, B. Jiang, L. Wang, J. Feng, H. Guo, R. Ji, Inhibitory effects of carbon nanotubes on the degradation of ¹⁴C-2,4-dichlorophenol in soil, *Chemosphere.* 90 (2013) 527–534. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.08.022.
- [16] Y. Ge, J.H. Priester, M. Mortimer, C.H. Chang, Z. Ji, J.P. Schimel, P.A. Holden, Long-Term Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes and Graphene on Microbial Communities in Dry Soil, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 3965–3974. doi:10.1021/acs.est.5b05620.
- [17] Y. Ge, C. Shen, Y. Wang, Y.-Q. Sun, J.P. Schimel, J.L. Gardea-Torresdey, P.A. Holden, Carbonaceous Nanomaterials Have Higher Effects on Soybean Rhizosphere Prokaryotic Communities During the Reproductive Growth Phase than During Vegetative Growth, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 6636–6646. doi:10.1021/acs.est.8b00937.
- [18] B. Shrestha, V. Acosta-Martinez, S.B. Cox, M.J. Green, S. Li, J.E. Cañas-Carrell, An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on soil microbial community structure and functioning, *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 188–197. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.07.031.
- [19] D. Kerfahi, B.M. Tripathi, D. Singh, H. Kim, S. Lee, J. Lee, J.M. Adams, Effects of Functionalized and Raw Multi-Walled Carbon Nanotubes on Soil Bacterial Community Composition, *PLoS One.* 10 (2015) 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0123042.
- [20] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J.W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forró, Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials, *Nano Lett.* 6 (2006) 1121–1125. doi:10.1021/nl060162e.
- [21] E. Morgenroth, T. Sherden, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen, P.A. Wilderer, Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor, *Water Res.* 31 (1997) 3191–3194. doi:10.1016/S0043-1354(97)00216-9.
- [22] M. Pronk, M.K. de Kreuk, B. de Bruin, P. Kamminga, R. Kleerebezem, M.C.M. van Loosdrecht, Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment, *Water Res.* 84 (2015) 207–217. doi:10.1016/j.watres.2015.07.011.
- [23] A. Kedves, L. Sánta, M. Balázs, P. Kesserű, I. Kiss, A. Rónavári, Z. Kónya, Chronic responses of aerobic granules to the presence of graphene oxide in sequencing batch reactors, *J. Hazard. Mater.* 389 (2020) 121905. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121905.
- [24] Y. V Nancharaiyah, M. Sarvajith, Aerobic granular sludge process: a fast growing biological

- treatment for sustainable wastewater treatment, *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 12 (2019) 57–65. doi:10.1016/j.coesh.2019.09.011.
- [25] S.L. de Sousa Rollemberg, A.R. Mendes Barros, P.I. Milen Firmino, A. Bezerra dos Santos, Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms, *Bioresour. Technol.* 270 (2018) 678–688. doi:10.1016/j.biortech.2018.08.130.
- [26] J.-H. Tay, Q.-S. Liu, Y. Liu, The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (2001) 227–233. doi:10.1007/s002530100766.
- [27] J.J. Beun, A. Hendriks, M.C.M. van Loosdrecht, E. Morgenroth, P.A. Wilderer, J.J. Heijnen, Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Res.* 33 (1999) 2283–2290. doi:10.1016/S0043-1354(98)00463-1.
- [28] Y. Chen, W. Jiang, D.T. Liang, J.H. Tay, Structure and stability of aerobic granules cultivated under different shear force in sequencing batch reactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2007) 1199–1208. doi:10.1007/s00253-007-1085-7.
- [29] S. Deng, L. Wang, H. Su, Role and influence of extracellular polymeric substances on the preparation of aerobic granular sludge, *J. Environ. Manage.* 173 (2016) 49–54. doi:10.1016/j.jenvman.2016.03.008.
- [30] M. Verawaty, M. Pijuan, Z. Yuan, P.L. Bond, Determining the mechanisms for aerobic granulation from mixed seed of floccular and crushed granules in activated sludge wastewater treatment, *Water Res.* 46 (2012) 761–771. doi:10.1016/j.watres.2011.11.054.
- [31] D.-J. Lee, Y.-Y. Chen, K.-Y. Show, C.G. Whiteley, J.-H. Tay, Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 919–934. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.007.
- [32] H. Liu, H.H.P. Fang, Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges, *J. of Biotechnology.* 95 (2002) 249–256. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00025-1.
- [33] C. Caudan, A. Filali, M. Spérandio, E. Girbal-Neuhauser, Multiple EPS interactions involved in the cohesion and structure of aerobic granules, *Chemosphere.* 117 (2014) 262–270. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.020.
- [34] B.S. McSwain, R.L. Irvine, M. Hausner, P.A. Wilderer, Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge., *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 1051–7. doi:10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005.
- [35] Y. V Nancharaiyah, S. Venkata Mohan, P.N.L. Lens, Recent advances in nutrient removal and recovery in biological and bioelectrochemical systems, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 173–185. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.129.
- [36] M. Coma, M. Verawaty, M. Pijuan, Z. Yuan, P.L. Bond, Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater, *Bioresour. Technol.* 103 (2012) 101–108. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.014.
- [37] J.P. Bassin, M. Pronk, G. Muyzer, R. Kleerebezem, M. Dezotti, M.C.M. van Loosdrecht, Effect of

- Elevated Salt Concentrations on the Aerobic Granular Sludge Process: Linking Microbial Activity with Microbial Community Structure, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 7942–7953. doi:10.1128/AEM.05016-11.
- [38] R. Wang, Y. Peng, Z. Cheng, N. Ren, Understanding the role of extracellular polymeric substances in an enhanced biological phosphorus removal granular sludge system, *Bioresour. Technol.* 169 (2014) 307–312. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.040.
- [39] S.S. Adav, M.-Y. Chen, D.-J. Lee, N.-Q. Ren, Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 844–852. doi:10.1002/bit.21148.
- [40] H.L. Jiang, J.H. Tay, A.M. Maszenan, S.T.L. Tay, Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 6767–6775. doi:10.1128/AEM.70.11.6767-6775.2004.
- [41] A. Wosman, Y. Lu, S. Sun, X. Liu, C. Wan, Y. Zhang, D.-J. Lee, J. Tay, Effect of operational strategies on activated sludge's acclimation to phenol, subsequent aerobic granulation, and accumulation of polyhydroxyalkanoates, *J. Hazard. Mater.* 317 (2016) 221–228. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.05.074.
- [42] S.T.-L. Tay, B.Y.-P. Moy, H.-L. Jiang, J.-H. Tay, Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed, *J. Biotechnol.* 115 (2005) 387–395. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.09.008.
- [43] L. Zhu, M. Lv, X. Dai, J. Zhou, X. Xu, The stability of aerobic granular sludge under 4-chloroaniline shock in a sequential air-lift bioreactor (SABR), *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 126–130. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.017.
- [44] N. Boon, E.M. Top, W. Verstraete, S.D. Siciliano, Bioaugmentation as a Tool To Protect the Structure and Function of an Activated-Sludge Microbial Community against a 3-Chloroaniline Shock Load, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1511–1520. doi:10.1128/AEM.69.3.1511-1520.2003.
- [45] L. Zhu, X. Xu, W. Luo, D. Cao, Y. Yang, Formation and microbial community analysis of chloroanilines-degrading aerobic granules in the sequencing airlift bioreactor, *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 152–160. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03548.x.
- [46] M. Sarvajith, G.K.K. Reddy, Y. V Nancharaiah, Textile dye biodecolourization and ammonium removal over nitrite in aerobic granular sludge sequencing batch reactors, *J. Hazard. Mater.* 342 (2018) 536–543. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.08.064.
- [47] Y. V Nancharaiah, H.M. Joshi, T.V.K. Mohan, V.P. Venugopalan, S. V Narasimhan, Aerobic granular biomass: a novel biomaterial for efficient uranium removal, *Curr. Sci.* 91 (2006) 503–509. <http://www.jstor.org/stable/24093952>.
- [48] W. Liu, J. Zhang, Y. Jin, X. Zhao, Z. Cai, Adsorption of Pb(II), Cd(II) and Zn(II) by extracellular polymeric substances extracted from aerobic granular sludge: Efficiency of protein, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015) 1223–1232. doi:10.1016/j.jece.2015.04.009.
- [49] M.K. De Kreuk, J.J. Heijnen, M.C.M. Van Loosdrecht, Simultaneous COD, nitrogen, and

- phosphate removal by aerobic granular sludge, *Biotechnol. Bioeng.* 90 (2005) 761–769. doi:10.1002/bit.20470.
- [50] B.-J. Ni, W.-M. Xie, S.-G. Liu, H.-Q. Yu, Y.-Z. Wang, G. Wang, X.-L. Dai, Granulation of activated sludge in a pilot-scale sequencing batch reactor for the treatment of low-strength municipal wastewater, *Water Res.* 43 (2009) 751–761. doi:10.1016/j.watres.2008.11.009.
- [51] M.K. Jungles, M. Figueroa, N. Morales, Á. del Río, R.H.R. da Costa, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, R. Méndez, Start up of a pilot scale aerobic granular reactor for organic matter and nitrogen removal, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 763–768. doi:10.1002/jctb.2589.
- [52] N. Morales, M. Figueroa, A. Fra-Vázquez, A. Val del Río, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, R. Méndez, Operation of an aerobic granular pilot scale SBR plant to treat swine slurry, *Process Biochem.* 48 (2013) 1216–1221. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.004.
- [53] H.G. Yang, J. Li, J. Liu, L.B. Ding, T. Chen, G.X. Huang, J.Y. Shen, A case for aerobic sludge granulation: From pilot to full scale, *J. Water Reuse Desalin.* 6 (2016) 188–194. doi:10.2166/wrd.2015.188.
- [54] J. Li, L.-B. Ding, A. Cai, G.-X. Huang, H. Horn, Aerobic Sludge Granulation in a Full-Scale Sequencing Batch Reactor, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 268789. doi:10.1155/2014/268789.
- [55] A.A. Keller, A. Lazareva, Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1 (2013) 65–70. doi:10.1021/ez400106t.
- [56] Q. Dong, Y. Liu, H. Shi, X. Huang, Effects of graphite nanoparticles on nitrification in an activated sludge system, *Chemosphere.* 182 (2017) 231–237. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.144.
- [57] H.N. Nguyen, S.L. Castro-Wallace, D.F. Rodrigues, Acute toxicity of graphene nanoplatelets on biological wastewater treatment process, *Environ. Sci. Nano.* 4 (2017) 160–169. doi:10.1039/c6en00442c.
- [58] F. Ahmed, D.F. Rodrigues, Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study, *J. Hazard. Mater.* 256–257 (2013) 33–39. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.064.
- [59] S. Lian, Y. Qu, S. Li, Z. Zhang, H. Zhang, C. Dai, Y. Deng, Interaction of graphene-family nanomaterials with microbial communities in sequential batch reactors revealed by high-throughput sequencing, *Environ. Res.* 184 (2020) 109392. doi:10.1016/j.envres.2020.109392.
- [60] H.N. Nguyen, D.F. Rodrigues, Chronic toxicity of graphene and graphene oxide in sequencing batch bioreactors: A comparative investigation, *J. Hazard. Mater.* 343 (2018) 200–207. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.09.032.
- [61] A. Parise, H. Thakor, X. Zhang, Activity inhibition on municipal activated sludge by single-walled carbon nanotubes, *J. Nanoparticle Res.* 16 (2013) 2159. doi:10.1007/s11051-013-2159-3.
- [62] Q. Ma, Y. Qu, W. Shen, J. Wang, Z. Zhang, X. Zhang, H. Zhou, J. Zhou, Activated sludge microbial community responses to single-walled carbon nanotubes: community structure does matter, *Water Sci. Technol.* 71 (2015) 1235–1240. doi:10.2166/wst.2015.095.

- [63] D. Goyal, X.J. Zhang, J.N. Rooney-Varga, Impacts of single-walled carbon nanotubes on microbial community structure in activated sludge, *Lett. Appl. Microbiol.* 51 (2010) 428–435. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02913.x.
- [64] L.A. Luongo, X. (Jackie) Zhang, Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process, *J. Hazard. Mater.* 178 (2010) 356–362. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.01.087.
- [65] R. Hai, Y. Wang, X. Wang, Z. Du, Y. Li, Impacts of Multiwalled Carbon Nanotubes on Nutrient Removal from Wastewater and Bacterial Community Structure in Activated Sludge, *PLoS One.* 9 (2014) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0107345.
- [66] S. Kang, M.S. Mauter, M. Elimelech, Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 2648–2653. doi:10.1021/es8031506.
- [67] X. Zheng, Y. Su, Y. Chen, Y. Wei, M. Li, H. Huang, The effects of carbon nanotubes on nitrogen and phosphorus removal from real wastewater in the activated sludge system, *RSC Adv.* 4 (2014) 45953–45959. doi:10.1039/C4RA04128C.
- [68] X. Yang, Q. He, F. Guo, X. Sun, J. Zhang, Y. Chen, Impacts of carbon-based nanomaterials on nutrient removal in constructed wetlands: Microbial community structure, enzyme activities, and metabolism process, *J. Hazard. Mater.* 401 (2021) 123270. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123270.
- [69] Q. He, Z. Yuan, J. Zhang, S. Zhang, W. Zhang, Z. Zou, H. Wang, Insight into the impact of ZnO nanoparticles on aerobic granular sludge under shock loading, *Chemosphere.* 173 (2017) 411–416. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.085.
- [70] Q. He, S. Gao, S. Zhang, W. Zhang, H. Wang, Chronic responses of aerobic granules to zinc oxide nanoparticles in a sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal, *Bioresour. Technol.* 238 (2017) 95–101. doi:10.1016/j.biortech.2017.04.010.
- [71] X. Zheng, D. Lu, W. Chen, Y. Gao, G. Zhou, Y. Zhang, X. Zhou, M.-Q. Jin, Response of Aerobic Granular Sludge to the Long-Term Presence of CuO NPs in A/O/A SBRs: Nitrogen and Phosphorus Removal, Enzymatic Activity, and the Microbial Community, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 10503–10510. doi:10.1021/acs.est.7b02768.
- [72] X. Quan, Y. Cen, F. Lu, L. Gu, J. Ma, Response of aerobic granular sludge to the long-term presence to nanosilver in sequencing batch reactors: Reactor performance, sludge property, microbial activity and community, *Sci. Total Environ.* 506–507 (2015) 226–233. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.015.
- [73] X. Liu, Y. Zhao, Y. Luo, Y. Wang, X. Wang, Effect of Graphene Oxide on the Characteristics and Mechanisms of Phosphorus Removal in Aerobic Granular Sludge: Case Report, *Water, Air, Soil Pollut.* 229 (2017) 8. doi:10.1007/s11270-017-3657-1.
- [74] C. Guo, Y. Wang, Y. Luo, X. Chen, Y. Lin, X. Liu, Effect of graphene oxide on the bioactivities of nitrifying and denitrifying bacteria in aerobic granular sludge, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156 (2018) 287–293. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.036.

- [75] T. Varga, G. Ballai, L. Vásárhelyi, H. Haspel, Á. Kukovecz, Z. Kónya, Co₄N/nitrogen-doped graphene: A non-noble metal oxygen reduction electrocatalyst for alkaline fuel cells, *Appl. Catal. B Environ.* 237 (2018) 826–834. doi:10.1016/j.apcatb.2018.06.054.
- [76] R. Smajda, Á. Kukovecz, Z. Kónya, I. Kiricsi, Structure and gas permeability of multi-wall carbon nanotube buckypapers, *Carbon N. Y.* 45 (2007) 1176–1184. doi:10.1016/j.carbon.2007.02.022.
- [77] Q. Wang, G. Du, J. Chen, Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force, *Process Biochem.* 39 (2004) 557–563. doi:10.1016/S0032-9592(03)00128-6.
- [78] H. Vashi, O.T. Iorhemen, J.H. Tay, Extensive studies on the treatment of pulp mill wastewater using aerobic granular sludge (AGS) technology, *Chem. Eng. J.* 359 (2019) 1175–1194. doi:10.1016/j.cej.2018.11.060.
- [79] X.Y. Li, S.F. Yang, Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge, *Water Res.* 41 (2007) 1022–1030. doi:10.1016/j.watres.2006.06.037.
- [80] B. Zhang, M. Ji, F. Wang, R. Li, K. Zhang, X. Yin, Q. Li, Damage of EPS and cell structures and improvement of high-solid anaerobic digestion of sewage sludge by combined (Ca(OH)₂ + multiple-transducer ultrasonic) pretreatment, *RSC Adv.* 7 (2017) 22706–22714. doi:10.1039/C7RA01060E.
- [81] J.C. Araujo, F.C. Téran, R.A. Oliveira, E.A.A. Nour, M.A.P. Montenegro, J.R. Campos, R.F. Vazoller, Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge, *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 52 (2003) 429–433. doi:10.1093/jmicro/52.4.429.
- [82] S. Wang, M. Gao, Z. Li, Z. She, J. Wu, D. Zheng, L. Guo, Y. Zhao, F. Gao, X. Wang, Performance evaluation, microbial enzymatic activity and microbial community of a sequencing batch reactor under long-term exposure to cerium dioxide nanoparticles, *Bioresour. Technol.* 220 (2016) 262–270. doi:10.1016/j.biortech.2016.08.086.
- [83] S. Wang, M. Gao, Z. Wang, Z. She, C. Jin, Y. Zhao, L. Guo, Q. Chang, Effect of oxytetracycline on performance and microbial community of an anoxic–aerobic sequencing batch reactor treating mariculture wastewater, *RSC Adv.* 5 (2015) 53893–53904. doi:10.1039/C5RA06302G.
- [84] T. Panswad, A. Doungchai, J. Anotai, Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system, *Water Res.* 37 (2003) 409–415. doi:10.1016/S0043-1354(02)00286-5.
- [85] M.T. Suzuki, J.S. Giovannoni, Suzuki MT, Giovannoni SJ .. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* (1996) 625–630. doi: 10.1128/aem.62.2.625-630.1996.
- [86] K. Watanabe, Y. Kodama, S. Harayama, Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting, *J. Microbiol. Methods.* 44 (2001) 253–262. doi:10.1016/S0167-7012(01)00220-2.
- [87] A. Teske, C. Wawer, G. Muyzer, N.B. Ramsing, Distribution of sulfate-reducing bacteria in a

- stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1405–1415. doi: 10.1128/aem.62.4.1405-1415.1996.
- [88] A. Brândușa Pavel, C. Ioan Vasile, PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics, *BMC Bioinformatics.* 13 (2012) 9. doi:10.1186/1471-2105-13-9.
- [89] D.A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, D.L. Wheeler, GenBank: update, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D23–D26. doi:10.1093/nar/gkh045.
- [90] Y. Chen, Z. Yang, Y. Zhang, Y. Xiang, R. Xu, M. Jia, J. Cao, W. Xiong, Effects of different conductive nanomaterials on anaerobic digestion process and microbial community of sludge, *Bioresour. Technol.* 304 (2020) 123016. doi:10.1016/j.biortech.2020.123016.
- [91] F. Cui, M. Kim, C. Park, D. Kim, K. Mo, M. Kim, Application of principal component analysis (PCA) to the assessment of parameter correlations in the partial-nitrification process using aerobic granular sludge, *J. Environ. Manage.* 288 (2021) 112408. doi:10.1016/j.jenvman.2021.112408.
- [92] S. Wang, M. Gao, Z. She, D. Zheng, C. Jin, L. Guo, Y. Zhao, Z. Li, X. Wang, Long-term effects of ZnO nanoparticles on nitrogen and phosphorus removal, microbial activity and microbial community of a sequencing batch reactor, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 428–436. doi:10.1016/j.biortech.2016.05.099.
- [93] L. Stobinski, B. Lesiak, A. Malolepszy, M. Mazurkiewicz, B. Mierzwa, J. Zemek, P. Jiricek, I. Bieloshapka, Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.* 195 (2014) 145–154. doi:10.1016/j.elspec.2014.07.003.
- [94] S. Stankovich, D.A. Dikin, G.H.B. Dommett, K.M. Kohlhaas, E.J. Zimney, E.A. Stach, R.D. Piner, S.B.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Graphene-based composite materials, *Nature.* 442 (2006) 282–286. doi:10.1038/nature04969.
- [95] J.V.D. Perez, E.T. Nadres, H.N. Nguyen, M.L.P. Dalida, D.F. Rodrigues, Response surface methodology as a powerful tool to optimize the synthesis of polymer-based graphene oxide nanocomposites for simultaneous removal of cationic and anionic heavy metal contaminants, *RSC Adv.* 7 (2017) 18480–18490. doi:10.1039/c7ra00750g.
- [96] S. Gurunathan, Cytotoxicity of graphene oxide nanoparticles on plant growth promoting rhizobacteria, *J. Ind. Eng. Chem.* 32 (2015) 282–291. doi:10.1016/j.jiec.2015.08.027.
- [97] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J.W. Suk, J.R. Potts, R.S. Ruoff, Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications, *Adv. Mater.* 22 (2010) 3906–3924. doi:10.1002/adma.201001068.
- [98] M.M. Amin, M.H. Khiadani (Hajian), A. Fatehizadeh, E. Taheri, Validation of linear and non-linear kinetic modeling of saline wastewater treatment by sequencing batch reactor with adapted and non-adapted consortiums, *Desalination.* 344 (2014) 228–235. doi:10.1016/j.desal.2014.03.032.
- [99] Y. Chen, G. Gu, Preliminary studies on continuous chromium(VI) biological removal from wastewater by anaerobic-aerobic activated sludge process, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 1713–

1721. doi:10.1016/j.biortech.2004.12.024.

- [100] J. Zeng, J.M. Gao, Y.P. Chen, P. Yan, Y. Dong, Y. Shen, J.S. Guo, N. Zeng, P. Zhang, Composition and aggregation of extracellular polymeric substances (EPS) in hyperhaline and municipal wastewater treatment plants, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–9. doi:10.1038/srep26721.
- [101] O. Larriba, E. Rovira-Cal, Z. Juznic-Zonta, A. Guisasola, J.A. Baeza, Evaluation of the integration of P recovery, polyhydroxyalkanoate production and short cut nitrogen removal in a mainstream wastewater treatment process, *Water Res.* 172 (2020) 115474. doi:10.1016/j.watres.2020.115474.
- [102] X. Zheng, P. Sun, J. Lou, J. Cai, Y. Song, S. Yu, X. Lu, Inhibition of free ammonia to the granule-based enhanced biological phosphorus removal system and the recoverability, *Bioresour. Technol.* 148 (2013) 343–351. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.100.
- [103] Q. He, Z. Yuan, J. Zhang, S. Zhang, W. Zhang, Z. Zou, H. Wang, Chemosphere Insight into the impact of ZnO nanoparticles on aerobic granular sludge under shock loading, *Chemosphere.* 173 (2017) 411–416. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.085.
- [104] D. Benndorf, N. Loffhagen, W. Babel, Protein synthesis patterns in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress, *FEMS Microbiol. Lett.* 200 (2001) 247–252. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10723.x.
- [105] M. Angela, B. Béatrice, S. Mathieu, Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process, *Water Res.* 45 (2011) 3776–3786. doi:10.1016/j.watres.2011.04.031.
- [106] Y. Zhao, J. Huang, H. Zhao, H. Yang, Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates, *Bioresour. Technol.* 143 (2013) 439–446. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.020.
- [107] S. Qayyum, A.U. Khan, Nanoparticles: Vs. biofilms: A battle against another paradigm of antibiotic resistance, *Medchemcomm.* 7 (2016) 1479–1498. doi:10.1039/c6md00124f.
- [108] S. Fulaz, S. Vitale, L. Quinn, E. Casey, Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix, *Trends Microbiol.* 27 (2019) 915–926. doi:10.1016/j.tim.2019.07.004.
- [109] F.A. Dahalan, N. Abdullah, A. Yuzir, G. Olsson, Salmiati, M. Hamdzah, M.F.M. Din, S.A. Ahmad, K.A. Khalil, A.N. Anuar, Z.Z. Noor, Z. Ujang, A proposed aerobic granules size development scheme for aerobic granulation process, *Bioresour. Technol.* 181 (2015) 291–296. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.062.
- [110] Z. Song, Y. Pan, K. Zhang, N. Ren, A. Wang, Effect of seed sludge on characteristics and microbial community of aerobic granular sludge, *J. Environ. Sci.* 22 (2010) 1312–1318. doi:10.1016/S1001-0742(09)60256-4.
- [111] Z. Song, N. Ren, K. Zhang, L. Tong, Influence of temperature on the characteristics of aerobic granulation in sequencing batch airlift reactors, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 273–278. doi:10.1016/S1001-0742(08)62263-9.
- [112] J. Yun Ma, X. Chun Quan, Z. Feng Yang, A. Jie Li, Biodegradation of a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through

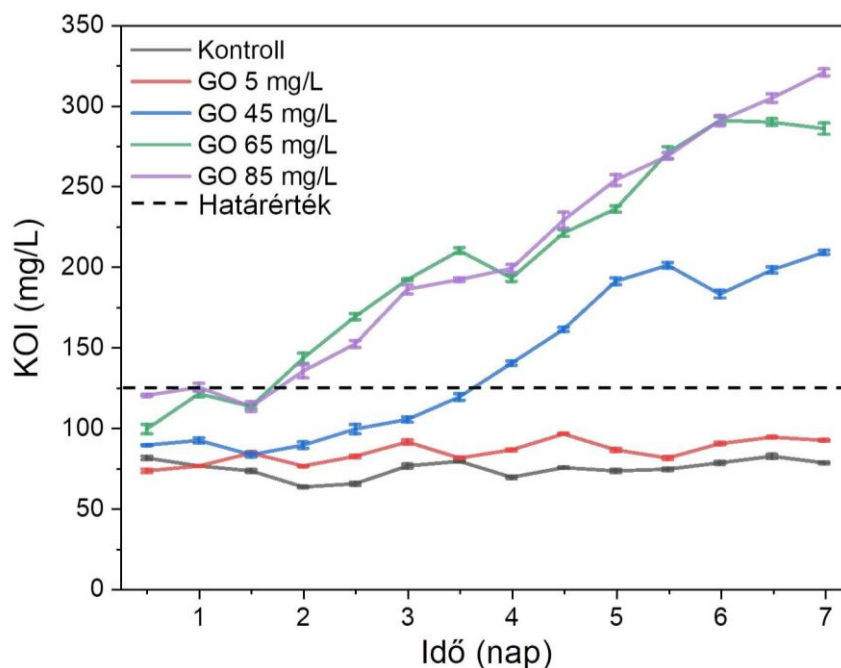
- plasmid pJP4 mediated bioaugmentation, *Chem. Eng. J.* 181–182 (2012) 144–151. doi:10.1016/j.cej.2011.11.041.
- [113] U. Lechner, D. Brodkorb, R. Geyer, G. Hause, C. Härtig, G. Auling, F. Fayolle-Guichard, P. Piveteau, R.H. Müller, T. Rohwerder, *Aquicola tertiaricarbonis* gen. nov., sp. nov., a tertiary butyl moiety-degrading bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 1295–1303. doi:10.1099/ijs.0.64663-0.
- [114] J. Liu, W. Zuo, J. Zhang, H. Li, L. Li, Y. Tian, Shifts in microbial community structure and diversity in a MBR combined with worm reactors treating synthetic wastewater, *J. Environ. Sci.* 54 (2017) 246–255. doi:10.1016/j.jes.2016.03.009.
- [115] Y. Yoshimi, A. Hiraishi, K. Nakamura, Isolation and Characterization of *Microsphaera multipartita* gen. nov., sp. nov., a Polysaccharide-Accumulating Gram-Positive Bacterium from Activated Sludge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46 (1996) 519–525. doi: 10.1099/00207713-46-2-519.
- [116] X. Wang, T. Yang, B. Lin, Y. Tang, Effects of salinity on the performance, microbial community, and functional proteins in an aerobic granular sludge system, *Chemosphere.* 184 (2017) 1241–1249. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.047.
- [117] S. Mantri, M. Rao, C. Sathyanarayana, R. Gundlapally, Description of *Hydrogenophaga laconesensis* sp. nov. isolated from tube well water, *Arch. Microbiol.* 198 (2016) 637–644. doi:10.1007/s00203-016-1224-6.
- [118] C. Jiang, X. Xu, M. Megharaj, R. Naidu, Z. Chen, Inhibition or promotion of biodegradation of nitrate by *Paracoccus* sp. in the presence of nanoscale zero-valent iron, *Sci. Total Environ.* 530–531 (2015) 241–246. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.044.
- [119] Y. Feng, J. Feng, Q.L. Shu, Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* strains from various environments, *J. Appl. Microbiol.* 124 (2018) 1195–1211. doi:10.1111/jam.13703.
- [120] R. Schulzel, S. Spring, R. Amann, I. Huber, W. Ludwigl, K. Schleiferl, P. Kampfer, Genotypic Diversity of *Acidovorax* Strains Isolated from Activated Sludge and Description of *Acidovorax defluvii* sp. nov., *Appl. Microbiology.* 214 (2020) 205–214. doi:10.1016/S0723-2020(99)80067-8.
- [121] P. Kämpfer, H.-J. Busse, R. Rossélló-Mora, E. Kjellin, E. Falsen, *Rhodovarius lipocyclicus* gen. nov. sp. nov., a New Genus of the α -1 Subclass of the Proteobacteria, *Syst. Appl. Microbiol.* 27 (2004) 511–516. doi:10.1078/0723202041748235.
- [122] X. Zheng, Y. Zhang, W. Chen, W. Wang, H. Xu, X. Shao, M. Yang, Z. Xu, L. Zhu, Effect of Increased Influent COD on Relieving the Toxicity of CeO₂ NPs on Aerobic Granular Sludge, *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 16 (2019). doi:10.3390/ijerph16193609.
- [123] M. Ostoich, M. Carcereri, Proposal for identification methodology for urban agglomerations according to directive 91/271/EEC on wastewater treatment, *Water Sci. Technol.* 64 (2011) 512–520. doi:10.2166/wst.2011.538.
- [124] S.F. Yang, X.Y. Li, H.Q. Yu, Formation and characterisation of fungal and bacterial granules

- under different feeding alkalinity and pH conditions, *Process Biochem.* 43 (2008) 8–14. doi:10.1016/j.procbio.2007.10.008.
- [125] X. Zheng, R. Wu, Y. Chen, Effects of ZnO Nanoparticles on Wastewater Biological Nitrogen and Phosphorus Removal, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2826–2832. doi:10.1021/es2000744.
- [126] Z. Wang, M. Gao, Z. She, S. Wang, C. Jin, Y. Zhao, S. Yang, L. Guo, Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor, *Sep. Purif. Technol.* 144 (2015) 223–231. doi:10.1016/j.seppur.2015.02.042.
- [127] Q. Xu, S. Li, Y. Wan, S. Wang, B. Ma, Z. She, L. Guo, M. Gao, Y. Zhao, C. Jin, J. Dong, Z. Li, Impacts of silver nanoparticles on performance and microbial community and enzymatic activity of a sequencing batch reactor, *J. Environ. Manage.* 204 (2017) 667–673. doi:10.1016/j.jenvman.2017.09.050.
- [128] B. Ma, S. Wang, Z. Li, M. Gao, S. Li, L. Guo, Z. She, Y. Zhao, D. Zheng, C. Jin, X. Wang, F. Gao, Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles induced effects on performance and microbial community of activated sludge from a sequencing batch reactor under long-term exposure, *Bioresour. Technol.* 225 (2017) 377–385. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.130.
- [129] N. Joshi, B.T. Ngwenya, C.E. French, Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances, *J. Hazard. Mater.* 241–242 (2012) 363–370. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.057.
- [130] B. Chai, T. Peng, X. Zhang, J. Mao, K. Li, X. Zhang, Synthesis of C₆₀-decorated SWCNTs (C₆₀-d-CNTs) and its TiO₂-based nanocomposite with enhanced photocatalytic activity for hydrogen production, *Dalt. Trans.* 42 (2013) 3402–3409. doi:10.1039/C2DT32458J.
- [131] P. Nie, C. Min, H.-J. Song, X. Chen, Z. Zhang, K. Zhao, Preparation and Tribological Properties of Polyimide/Carboxyl-Functionalized Multi-walled Carbon Nanotube Nanocomposite Films Under Seawater Lubrication, *Tribol. Lett.* 58 (2015) 7. doi:10.1007/s11249-015-0476-7.
- [132] H.N. Nguyen, S.L. Castro-Wallace, D.F. Rodrigues, Acute toxicity of graphene nanoplatelets on biological wastewater treatment process, *Environ. Sci. Nano.* 4 (2017) 160–169. doi:10.1039/c6en00442c.
- [133] L.L. Blackall, G.R. Crocetti, A.M. Saunders, P.L. Bond, A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81 (2002) 681–691. doi:10.1023/A:1020538429009.
- [134] A. Al-Jumaili, S. Alancherry, K. Bazaka, M. V. Jacob, Review on the antimicrobial properties of Carbon nanostructures, *Materials.* 10 (2017) 1–26. doi:10.3390/ma10091066.
- [135] J. Xia, L. Ye, H. Ren, X.-X. Zhang, Microbial community structure and function in aerobic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 3967–3979. doi:10.1007/s00253-018-8905-9.
- [136] A.N. Anuar, M.H.A. Halim, N.H. Rosman, I. Othman, H. Harun, H.F. Basri, Z. Ujang, M. van Loosdrecht, Microbial Identification and Extracellular Polymeric Substances Characterization of

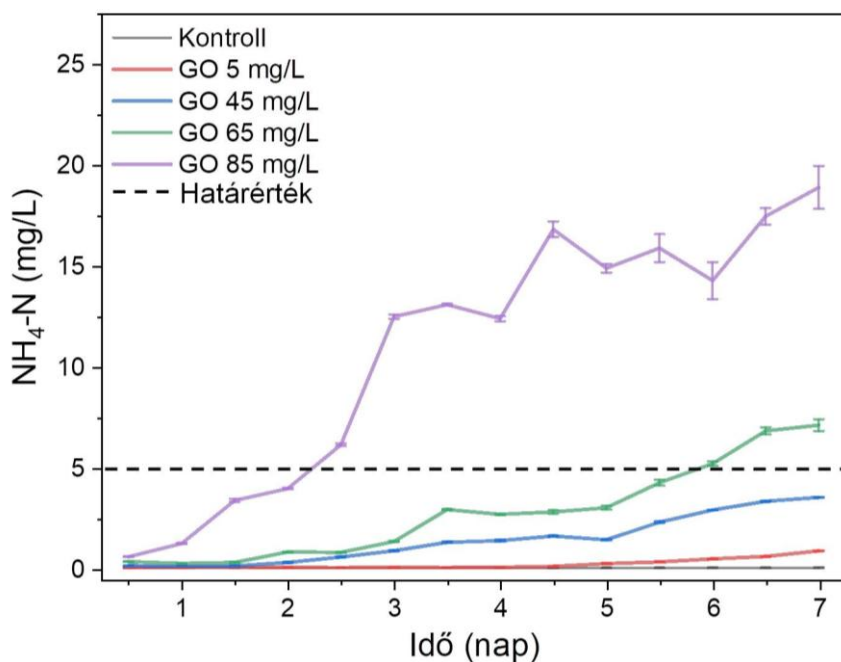
Aerobic Granules Developed in Treating Rubber Processing Wastewater, *Valorisation of Agro-industrial Residues*. Volume I: Biological Approaches, 2020: pp. 257–286. doi:10.1007/978-3-030-39137-9_13.

- [137] L. Zhang, B. Long, J. Wu, Y. Cheng, B. Zhang, Y. Zeng, S. Huang, M. Zeng, Evolution of microbial community during dry storage and recovery of aerobic granular sludge, *Heliyon*. 5 (2019) e03023. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e03023.
- [138] M.C.E. Delgado-Gardea, P. Tamez-Guerra, R. Gomez-Flores, M. Garfio-Aguirre, B.A. Rocha-Gutiérrez, C.I. Romo-Sáenz, F.J. Zavala-Díaz de la Serna, G. Eroza-de la Vega, B. Sánchez-Ramírez, M. del C. González-Horta, M. del R. Infante-Ramírez, *Streptophyta* and *Acetic Acid* Bacteria Succession Promoted by Brass in Slow Sand Filter System Schmutzdeckes, *Sci. Rep.* 9 (2019) 7021. doi:10.1038/s41598-019-43489-9.
- [139] S. Gómez-Acata, M. Vital-Jácome, M.V. Pérez-Sandoval, Y.E. Navarro-Noya, F. Thalasso, M. Luna-Guido, E. Conde-Barajas, L. Dendooven, Microbial community structure in aerobic and fluffy granules formed in a sequencing batch reactor supplied with 4-chlorophenol at different settling times, *J. Hazard. Mater.* 342 (2018) 606–616. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.08.073.
- [140] J. Zhao, Y. Li, X. Chen, Y. Li, Effects of carbon sources on sludge performance and microbial community for 4-chlorophenol wastewater treatment in sequencing batch reactors, *Bioresour. Technol.* 255 (2018) 22–28. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.106.
- [141] E. Szabó, R. Liébana, M. Hermansson, O. Modin, F. Persson, B.-M. Wilén, Microbial Population Dynamics and Ecosystem Functions of Anoxic/Aerobic Granular Sludge in Sequencing Batch Reactors Operated at Different Organic Loading Rates, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 770. doi:10.3389/fmicb.2017.00770.
- [142] A. B. Norberg, S. O. Enfors, Production of Extracellular Polysaccharide by *Zoogloea ramigera*, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 1231–1237. doi:10.1128/aem.44.5.1231-1237.1982.
- [143] B. Yang, J. Wang, Q. Shang, Z. Sun, Y. Wu, Synchronously enhanced biofilm formation and m-dichlorobenzene removal in biotrickling filters by rhamnolipid chelating rare earth elements, *Environ. Pollut. Bioavailab.* 34 (2022) 575–585. doi:10.1080/26395940.2022.2151516.
- [144] G.Y. Celik, B. Aslim, Y. Beyatli, Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 178–182. doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.021.
- [145] I. Kim, G. Chhetri, Y. So, J. Kim, T. Seo, Characteristics and Biological Activity of Exopolysaccharide Produced by *Lysobacter* sp. MMG2 Isolated from the Roots of *Tagetes patula*, *Microorganisms*. 10 (2022). doi:10.3390/microorganisms10071257.
- [146] F. de A. Sebastião, F. Pilarski, M.V.F. Lemos, Composition of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Flavobacterium columnare* isolated from tropical fish in Brazil, *Brazilian J. Microbiol.* 44 (2013) 861–864. doi:10.1590/S1517-83822013005000058.

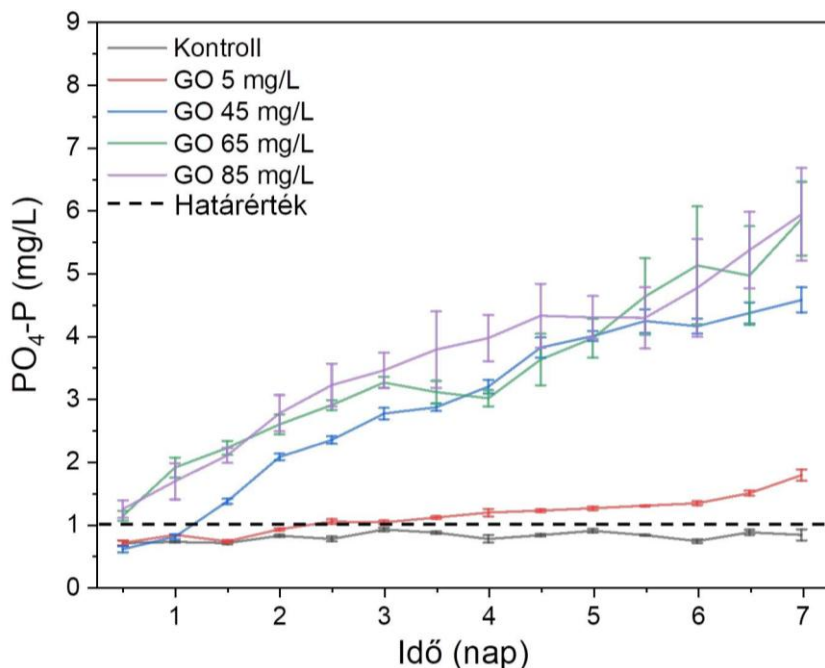
Mellékletek



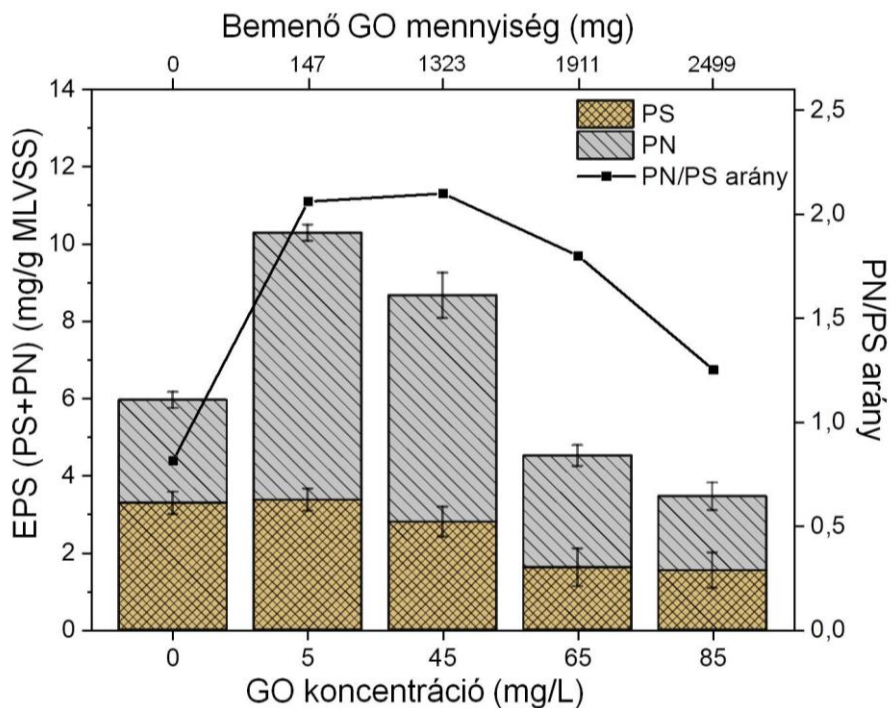
1. melléklet. A kémiai oxigén igény (KOI) koncentrációja a kimenő szennyvízben a kontroll aerob granuláris iszapos (AGS) bioreaktor és a különböző mennyiségű grafén-oxiddal (5, 45, 65 és 85 mg/L) szennyezett AGS bioreaktorok esetében. A hibaszávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.



2. melléklet. Az ammónia-nitrogén (NH₄-N) koncentrációja a kimenő szennyvízben az aerob granuláris iszapos (AGS) bioreaktor és a különböző mennyiségű grafén-oxiddal (5, 45, 65 és 85 mg/L) szennyezett AGS bioreaktorok esetében. A hibaszávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.



3. melléklet. A foszfát ($\text{PO}_4\text{-P}$) koncentrációja a kimenő szennyvízben a kontroll aerob granuláris iszapos (AGS) bioreaktor és a különböző mennyiségű grafén-oxiddal (5, 45, 65 és 85 mg/L) szennyezett AGS bioreaktorok esetében. A hibaszávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.



4. melléklet. Az extracelluláris polimer anyag (EPS) tartalom és összetétel a kontroll bioreaktorban [0 mg/L grafén-oxid (GO)] és a különböző nanorészecske koncentrációkkal (5, 45, 65 és 85 mg/L GO) kezelt bioreaktorokban. A hibaszávok a három párhuzamos minta szórását jelölik.