# ELEKTRO-BIOREAKTOROK AZ IVÓVÍZTISZTÍTÁS TERÜLETÉN

Doktori értekezés

*Készítette:*

Kiss István

molekuláris biológia és biotechnológia ágazatú biológus

*Témavezető:*

Dr. Kálmán Miklós

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet

Szeged, 2002.

**TARTALOMJEGYZÉK**


1. Bevezetés ..... 4

2. Irodalmi áttekintés

I. Denitrifikáció – biológia háttér – enzimrendszer ..... 9

I.1. A denitrifikáció lépései és az abban résztvevő enzimek ..... 10

I.2. A denitrifikáció szabályozása – az oxigén hatása ..... 12

I.3. A denitrifikáció génszintű szabályozása ..... 13

I.4. A denitrifikáció energiaigénye – elektrondonorok ..... 14

II. Az alkalmazott izolátumok bemutatása ..... 17

III. Biofilmek létrehozása, jellemzése ..... 20

III.1. A biofilm kialakulása ..... 20

III.2. A biofilmképzés képessége a mikroorganizmusoknál ..... 21

III.3. A szilárd felület, hordozó jellemzői ..... 22

III.4. Anyagtranszfer a biofilm reaktorokban ..... 23

III.5. Biofilm és aktív szén ..... 24

III.6. A biofilmképzés ismert eljárásai ..... 25

IV. Kemolitotróf denitrifikáción alapuló bioreaktorok – elektro-bioreaktorok ..... 26

V. Elektrokémia – hidrogéntermelés vízbontással ..... 30

3. Célkitűzések ..... 32

4. Anyagok és módszerek ..... 33

I. Anyagok, vegyszerek ..... 33

II. Mikrobiológia - Törzsdúsítás, törzsszelekció ..... 33

II.1. Mintavétel ..... 33

II.2. Szelektív izolálás ..... 33

II.3. Mikroorganizmus tenyésztés ..... 34

II.4. Törzsek jellemzése és azonosítása ..... 35

II.5. A kísérletekben alkalmazott izolátumok jellemzése ..... 36

III. Biofilmképzés – Reaktor elrendezés ..... 38

III.1. A hordozó és előkészítése ..... 38

III.2. Biofilm 1. - Kitapadás vizsgálat ..... 38

III.3. Biofilm 2. – Kitapadás vizsgálat előkezelt granulált aktív szén hordozón ..... 39

III.4. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítése GAC hordozón lévő biofilmről ..... 39

III.5. A biofilmképzés során kapott granulált aktív szén minták kezelése ..... 40

IV. Reaktorüzemeltetés - üzemi körülmények meghatározása ..... 41

IV.1. Általános ismertetés ..... 41

IV.2. Kísérletileg meghatározott paraméterek ..... 42

IV.3. Számított mennyiségek ..... 43

IV.4. Mintavétel ..... 43

IV.5. Kolorimetriás nitrát-, nitrit- és ammónia meghatározás ..... 43

IV.6. A folyadékban oldott hidrogén mérésére szolgáló amperometriás módszer és mérőelrendezés .. 44

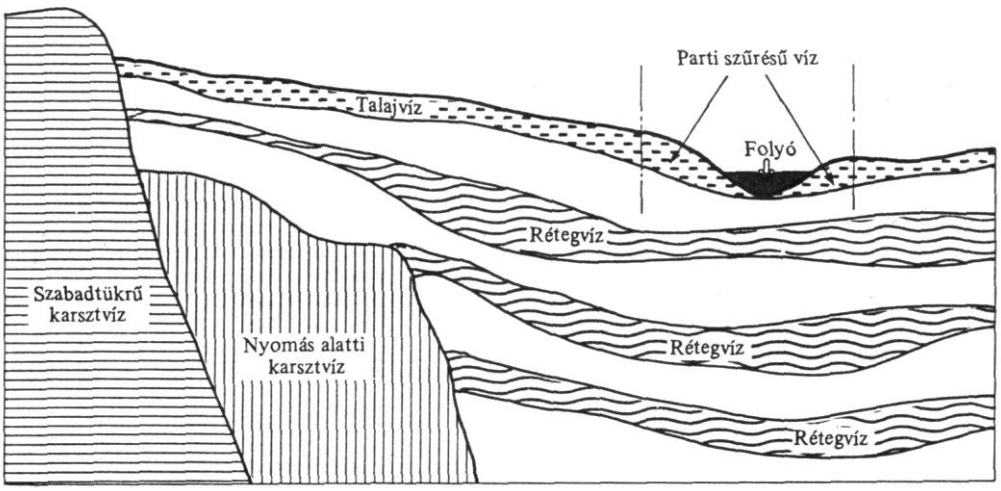
IV.7. Elektrokémiai alkalmazások – elektrokémiai cellák ..... 45

IV.8. Elektrokémiai cellák karbantartása ... 46
IV.9. Oszlopkészítés, egyéb reaktor paraméterek ... 46
IV.10. HRT és denitrifikációs aktivitás értékek meghatározása különböző áramerősségek esetében ... 47
IV.11. Alkalmazott egyéb statisztikai módszerek, számítógépes programok ... 47
5. Eredmények bemutatása
I. Biofilmképzés eredményeinek bemutatása ... 48
I.1. Biofilmképzés GAC felszínen, oszlop elrendezésben ... 48
I.2. Biofilmképzési módszerek összehasonlítása ... 49
I.3. A kialakult biofilmek térbeli eloszlása oszlop elrendezésben ... 52
I.4. A Biofilm C módszer részletes vizsgálata ... 53
I.4.1. A biofilmképzés fázisai ... 53
I.4.2. A "C" módszer további vizsgálata és optimalizálása ... 54
I.4.2.1 A pH hatása az adhézióra ... 55
I.4.2.2 Az M2 törzs hatása az adhézióra ... 56
I.4.2.3 A kitozán hatása a biofilmképzésre ... 57
II. Két szakaszos reaktorok működtetéséből származó eredmények bemutatása ... 58
II.1. Két részes (EC+BR) reaktorok ... 58
II.2. Általános összehasonlítás ... 59
II.3. Minimális tartózkodási idők (HRT) meghatározása EC+BR reaktorok esetében ... 64
II.4. Denitrifikációs aktivitások megállapítása EC+BR reaktorok esetében ... 64
II.5. Az elektrondonor szerepe – hidrogén limitáció ... 65
II.6. Az alkalmazott áramerősség felhasználásának effektivitása ... 66
II.7. Denitrifikáció térbeli lokalizációja a reaktoron belül ... 68
II.8 Egyéb paraméterek vizsgálata ... 68
II.9. Populációdinamikai vizsgálatok ... 69
II.10. Gyakorlati tapasztalatok az EC+BR reaktorok alkalmazása során ... 70
III. Egy szakaszos reaktorok (ECBR) működtetéséből származó eredmények bemutatása ... 71
III.1. Az ECBR reaktor ... 71
III.2. Az ECBR reaktorok üzemeltetése során kapott eredmények bemutatása ... 72
III.3. Minimális tartózkodási idők (HRT) meghatározása ECBR reaktorok esetében ... 75
III.4. Az alkalmazott áramerősség felhasználásának effektivitása ... 76
III.5 Egyéb paraméterek vizsgálata ... 77
**6.** Eredmények értékelése
I. A biofilmképzés eredményeinek értékelése ... 78
I.1. A biofilmképzési módszerek összehasonlítása ... 78
I.2. Mikroorganizmusok a biofilmben ... 79
I.3. A "C" módszer további optimalizálása ... 79
I.4. A granulált aktív szén, mint hordozó a denitrifikáló reaktorok esetében ... 80
II. A bioreaktorok működésének értékelése ... 81
II.1. Denitrifikációs aktivitások, tartózkodási idők ... 81
II.2. Elektrokémiai folyamatok lehetősége az ECBR reaktoroknál ... 82

II.3. Az alkalmazott áramerősség hatásának vizsgálata ..... 83
II.4. Mi történik az üzemi periódus alatt a reaktor belsejében? ..... 84
II.5. Reaktorok karbantartása – gyakorlati tapasztalatok ..... 85
II.6. Üzemeltetési költségek ..... 86
II.7. A kifejlesztett reaktor elrendezések és a gyakorlati alkalmazhatóság kérdése ..... 87
7. Összefoglalás ..... 88
8. Irodalomjegyzék ..... 90
9. Köszönetnyilvánítás ..... 98
10. Saját közlemények jegyzéke ..... 99
11. Summary ..... 100

# Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben felismertük, hogy az élőhelyünket jelentő globális ökoszisztémára mekkora veszélyt jelentünk mi magunk, illetve az ipari és mezőgazdasági tevékenységünk következtében fellépő környezetszennyezés. Számos értekezés, helyzetfelmérés számolt be hatalmas mértékű, olykor visszafordíthatatlan környezet-károsításokról. Ezek a jelentések a problémák felvetése mellett arra is rámutattak, hogy megelőző lépésekkel e káros hatásokat ki lehet küszöbölni a jövőben. Egyes területeken azonban a megelőzés mellett szükség van a szennyezések közvetlen és mielőbbi felszámolására is. Az egyik ilyen kiemelt terület a megfelelő minőségű ivóvízkészlet biztosítása. Az általánosan elterjedt gyakorlat szerint az ivóvizet felszín alatti vizekből nyerik, melynek elhelyezkedését az 1. ábra szemlélteti vázlatosan.




**1. ábra. Felszín alatti vizek elrendeződése és felosztása**

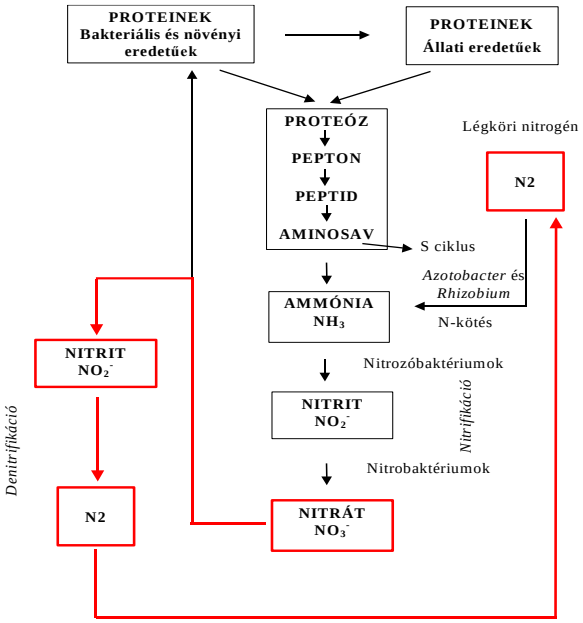
A felszín alatti vizek számos forrásból szennyeződhetnek. Az általánosan elfogadott felosztás szerint szerves és szervetlen szennyezőket különböztetünk meg (Standard Methods, 1992). A szerves szennyező anyagok esetében érdemes megjegyezni, hogy ezek jelentős része a természetben nem fordul elő, megjelenésükért egyértelműen a vegyipar, az intenzív mezőgazdasági termelés, illetve a nem megfelelő környezetvédelmi eljárások és előírások a felelősek.

A szervetlen szennyezők esetében a helyzet nem ennyire egyértelmű. Legnagyobbrészt olyan anyagokról van szó, melyek természetes körülmények között is előfordulhatnak a vizekben, azonban mennyiségük jelentősen megemelkedett az emberi tevékenység következtében, így koncentrációjuk gyakran eléri a toxikus szintet.

A szervetlen szennyezők közül az egyik legjelentősebb a nitrát-, illetve a nitrition.

A felszín alatti vizek nitrát-szennyezettsége az elmúlt 50 évben a fejlett iparral és mezőgazdasággal rendelkező országokban egyre inkább fenyegető jelenséggé vált. A felszín közeli vizek - elhelyezkedésüknél fogva és a nitrátion mobilitása miatt - az egyik legjobban veszélyeztetett víztartalékok. Jelenleg hazánkban a lakosság vízellátásának biztosítása döntően felszín alatti vizekből történik. Így az ivóvizek nitráttartalmának csökkentése olyan élő probléma, mely azonnali megoldást igényel, amint erre már az Országos Vízügyi Hivatal Vízgazdálkodási Intézete is részletesen kitért 1980-as kiadványában. Érdemes megvizsgálni, hogy a nitrátionok hogyan illeszkednek az egyik legfontosabb biogén elem, a nitrogén természetes körforgásába.

Mint a 2. ábra is mutatja, a folyamatban az ökoszisztéma minden alkotója részt vesz, lévén a nitrogén a biomolekulák egyik fő alkotója, a szerves élet egyik alapköve. Maga a nitrátion természetes körülmények között főként bakteriális folyamatok, továbbá légköri kisülések során keletkezik ($N_2O$, NO származékaként). Az emberi beavatkozások ezt a folyamatot két irányból módosították.




**2. ábra. A nitrogén körforgása a természetben**

Az intenzív mezőgazdasági művelés során a nitráttartalmú műtrágyák nagy mennyiségű alkalmazása és az állattartás során keletkező végtermékek (hígtrágya) bizonyítottan megemelték a környezet, és azon belül is főként talajvizek nitrát-terhelését.

Az ivóvíz forrásául szolgáló felszín alatti vizekben lévő nitrátion (az általánosan mérhető előfordulási koncentrációjában – 100-1000 mg $l^{-1}$) közvetlenül nem toxikus. Azonban a túlzottan magas nitráttartalmú ivóvíz, illetve élelmiszer fogyasztása súlyos egészségügyi problémát jelent. Már az 1940-es években felismerték, hogy a csecsemők egy bizonyos anémiás megbetegedése és ivóvizük nitráttartalma között szoros összefüggés áll fenn. A betegség kialakulása arra vezethető vissza, hogy a bél baktériumflórájának tagjai, köztük az *Escherichia coli*, a nitrátot nitritté alakítják át. Ez a molekula bekerül a vérbe, majd ott irreverzibilisen kötődik a hemoglobin oxigénkötő csoportjához, azt methemoglobinná

alakítva. Innen ered a létrejövő tünet együttes tudományos elnevezése, a *methemoglobinaemia* (Zapol és tsai., 1994, Warren és Higenbottam, 1996, Demirakca és tsai., 1996). A betegek hemoglobinja nem képes az oxigén megkötésére, így a szervezetben oxigénhiány lép fel. Mindez kékes bőrelszíneződéshez ("kék csecsemők"), légzési elégtelenséghez, majd végül fulladásos halálhoz vezet.

A magas nitráttartalmú vízre elsősorban a csecsemők érzékenyek, de kisgyermekeknél is gyakori a megbetegedés, sőt leírtak felnőttkori eseteket is.

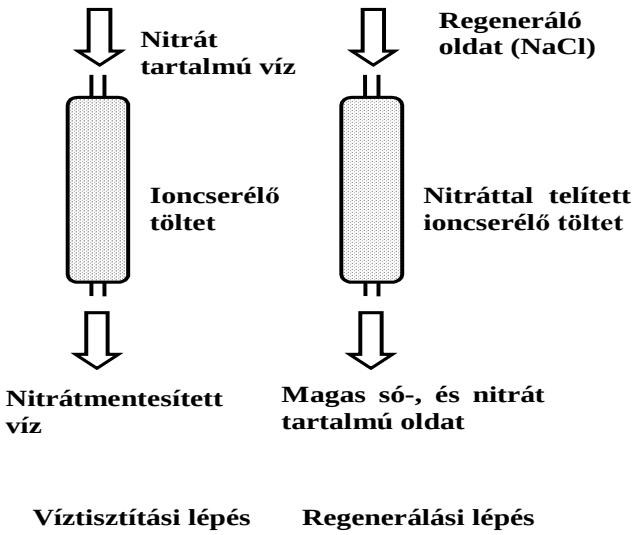
A nitráttal és más szennyezőkkel terhelt talajvizek okozta megbetegedések nem egyedi előfordulású, helyi problémák. Magyarországon a csecsemők csak vezetékes vizet fogyaszthatnak, de Európa jelentős részén is hasonló a helyzet.

Az emberi fogyasztásra szánt víz felszín alatti vizekből származik, különböző tisztítási lépéseken keresztül, melyek között megtaláljuk a nitrátmentesítést is. A gyakorlati megvalósítások során három csoportba oszthatóak a nitrátmentesítő eljárások:

- fiziko-kémiai eljárások
- biológiai eljárások
- fiziko-kémiai és biológiai eljárások kombinációja

*Fiziko-kémiai eljárások*

E módszerek a vízben oldott nitrát fiziko-kémiai tulajdonságait kihasználva csökkentik annak mennyiségét. Két alapvető tisztítási eljárás ismeretes. Az egyikben az ionszelektív technológiákat tökéletesítve, szelektív gyanta felületére adszorbeálódik a nitrátion, adott csereion leválása mellett (Lauch és Guter, 1986). A másik módszer alkalmazása során szelektív membránfiltráció (ultrafiltráció) révén csökken a nitrátion mennyisége az ivóvízben. E módszer előnye az ioncserés eljárásokkal szemben (3. ábra), hogy a megtisztított vizet nem terheli csereionnal, illetve nem igényel regenerálási lépéseket. Mindkét módszer gyors és gazdaságos, hatékonyságuk magas, viszont hátrányuk, hogy az ionszelektív gyanta esetében regenerálni




**3. ábra. Ioncserés víztisztító berendezés vázlatos rajza**

kell a gyantát, azaz eltávolítani a megkötött nitrátot, amire általában NaCl vagy $NaHCO_3$ oldatot alkalmaznak, majd az így létrejövő nagy só- és nitráttartalmú regeneráló oldatot tovább kell kezelni. A membrántechnológiák alkalmazása esetén is keletkezik melléktermék, szintén magas nitráttartalmú oldat formájában.

A fiziko-kémiai módszerek egy újabban leírt, egyelőre kísérleti szakaszban lévő csoportja, a nitrátionok katalízis útján történő eliminálása (Pintar és tsai., 2001). Ezekben a módszerekben általában Pd–Cu/γ-$Al_2O_3$ katalizátorral redukálják a nitrátot nitrogénné.

*Biológiai eljárások*

A biológiai eljárás során egyes baktériumok azon tulajdonságát használják fel, hogy képesek anaerob körülmények között a nitrátot nitrogénig redukálni. Ez a biológiai folyamat az alkalmazott mikroorganizmusok szén- és energiaforrása szerint alapvetően két csoportra osztható: *heterotróf* (szerves szénforrást igénylő) és *kemolitotróf* (szerves szénforrást nem, viszont egyéb energiaforrást (pl. $H_2$) igénylő) folyamatokra. Mindkét módszer számos előnnyel és hátránnyal rendelkezik. A heterotróf denitrifikáció nagy kapacitású folyamat, azonban a magas baktérium-mennyiség és a szerves szénforrás jelenléte gátat szab az alkalmazásnak, különösen az ivóvíztisztítás területén. A kemolitotróf denitrifikáció esetében a szerves szénforrás hiányában nem jellemzőek egyéb, esetlegesen humánpatogén fertőzések, azonban a folyamat hatékonysága alacsony, általában a heterotróf eljárás aktivitásának mintegy tizede érhető el.

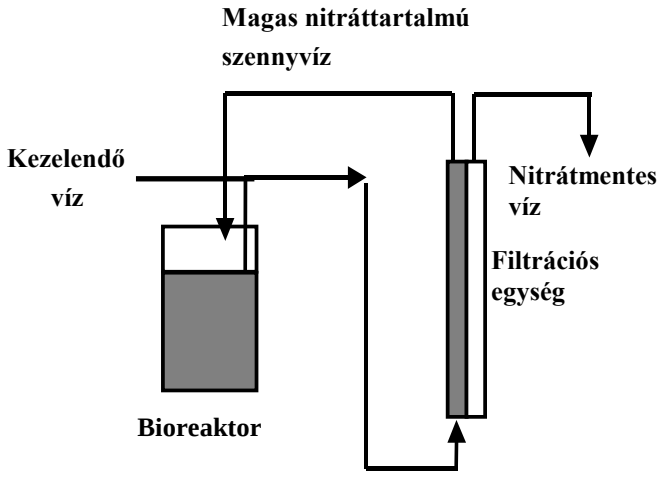
Az ivóvizek denitrifikálása esetében mindkét biológiai denitrifikáció típus alkalmazásakor utókezelésre van szükség. E folyamat során a baktériumokkal kezelt vizet fertőtleníteni kell. A kemolitotróf denitrifikáció egyik előnye az alacsony csíraszám, illetve az, hogy az alkalmazott baktériumok között kis mennyiségben találni patogén törzseket. Így összehasonlítva a heterotróf denitrifikációval e folyamat kevesebb utókezelést igényel.

*Fiziko-kémiai eljárások és biológiai eljárások kombinációja*

Ezen módszerek legnagyobb előnye, hogy maga az ivóvíz nem érintkezik sem a denitrifikáló baktériumokkal, sem a denitrifikáció során esetleg alkalmazott szerves anyagokkal. A technológiák alapja, hogy a fiziko-kémiai eljárásokkal kivont nitrátot mikrobiális úton bontják el.

Az ioncserés elrendezés alkalmazása során keletkező magas nitrát- és sótartalmú vizes oldatokat biológiailag tisztítják meg (van der Hoek és Klapwijk, 1988, Yang és tsai., 1995), beiktatva egy harmadik, a regenerálás utáni lépcsőt.

A membrántechnológiánál léteznek már folyamatos üzemű reaktorok is (4. ábra), ahol a tisztítandó vizet a nitrát számára nem átjárható membránon keresztül áramoltatva csökkentik annak nitrát szintjét (Yeom és tsai., 1999, Barreiros és tsai., 1988), a keletkező magas nitráttartalmú szennyvizet ezek után bakteriálisan tisztítják. Ez az eljárás lehetővé teszi a bakteriális szakasz és az ivóvíz fizikai szeparációját, azonban a membrán alkalmazása, illetve a szűrés csökkentheti a folyamat sebességét (Minh és Wiley, 1998).




**4. ábra. Membrántechnológia és biológiai denitrifikáció kombinációja**

Összehasonlítva az ivóvizek nitrátmentesítésére kidolgozott három fő csoportot, megállapíthatjuk, hogy ugyan a legnagyobb kapacitással a fiziko-kémiai technológiák rendelkeznek, viszont magát a szennyezőanyagot csak a biológiai módszerek képesek hatékonyan megszüntetni. Így a biológiai denitrifikáció alkalmazása és a vele kapcsolatos fejlesztések akár önállóan, akár más módszerekkel kombinálva nagy gyakorlati jelentőséggel bírnak.

# Irodalmi áttekintés

## *I. Denitrifikáció – biológia háttér – enzimrendszer*

Természetes körülmények között a denitrifikáció (nitrát nitrogénné történő redukálása) kizárólag prokarióták által végzett folyamat, amely többnyire csak molekuláris oxigén hiányában megy végbe. A 2. ábrán, ahol a nitrogén természetes körforgását mutattuk be, piros vonallal jelöltük a bakteriális denitrifikáció folyamatát, melyeket a továbbiakban részletesen is áttekintünk.

Az eddig legjobban feltérképezett denitrifikáló enzimrendszerrel a *Paracoccus denitrificans* rendelkezik (Stouthamer, 1990), mivel a biológiai denitrifikációval foglalkozó munkákban ez a baktérium már régóta áll az érdeklődés középpontjában, mivel ez az egyetlen mikroorganizmus, amelynél a nitráttól a molekuláris nitrogénig történő átalakulást katalizáló enzimrendszer legtöbb elemét sikerült leírni. Mai ismereteink szerint közel negyven gén vesz részt a nitrátbontás szerkezeti és szabályozó fehérjéinek kódolásában, de ezek együttműködéséről még nincsenek pontos adatok.

Más mikroorganizmusoknál is vizsgálták már a denitrifikáció enzimeit. Az *E.coli* képes a nitrátot redukálni, de a folyamat csak nitritig megy végbe, mert nitrit-reduktázzal már nem rendelkezik (Metheringham és tsai., 1996). A *Pseudomonas denitrificans* nevű baktérium rendelkezik a denitrifikáció teljes enzimkészletével, ami egy multienzimkomplexet alkot (Hole és tsai., 1996, Gregory és tsai., 2000), míg a *Paracoccus denitrificans*-nál ezek jól elkülönülnek egymástól. Ezért ez utóbbi faj alkalmas a denitrifikáció molekuláris szintű mechanizmusainak bemutatására.

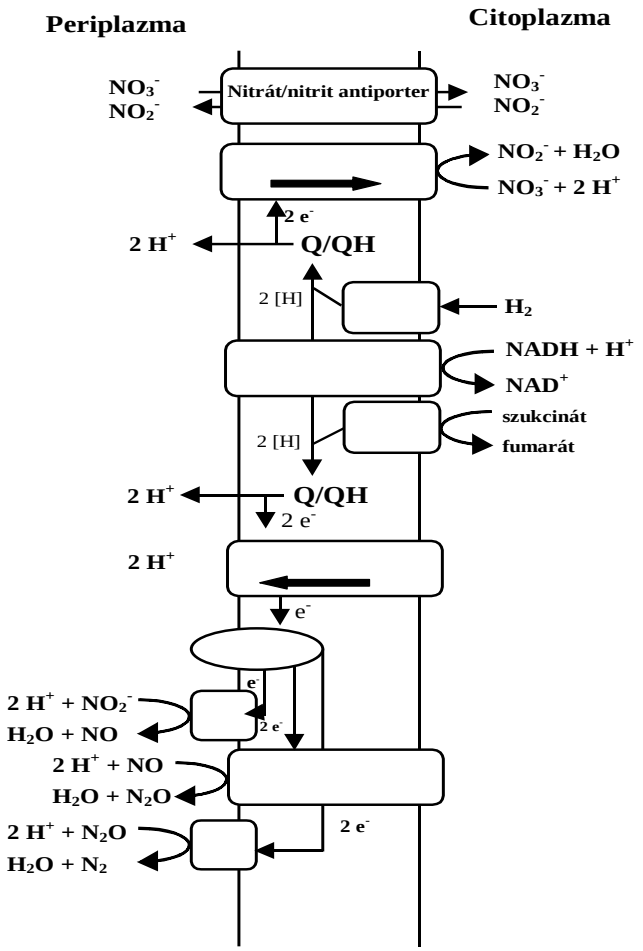
Mivel a dolgozatban kemolitotróf, hidrogén-függő denitrifikáción alapuló eljárásokat fejlesztettünk ki, és e törzs képes ilyen körülmények között hidrogén oxidálásával is nitrátot redukálni, ezért a *Paracoccus denitrificans* denitrifikációs enzimrendszerére vonatkozó utalásokra igyekszünk részletesen is kitérni.

A denitrifikációban résztvevő enzimek ismertetésén túl érdemes megvizsgálni az enzimek génszintű szabályozását és az egyik legfontosabb, extracelluláris faktor, az oxigén hatását. A sejtszintű folyamatok áttekintése után röviden összefoglaljuk a gyakorlatban is alkalmazott elektrondonorokat, melyek biztosítják a nitrát redukciójához szükséges elektronokat.

## *I.1. A denitrifikáció lépései és az abban résztvevő enzimek*

### I.1.1 A denitrifikáció első lépése

Az első lépés a nitrát nitritté történő redukciója, amely folyamat viszonylag elterjedt az élővilágban. Növényi sejtek és a baktériumok jelentős csoportja képes a nitrát-nitrit átalakulás katalizálására. A legszélesebb körű vizsgálatokat *E. coli* esetében végezték. A folyamatért felelős nitrátreduktáz a legtöbb esetben integráns fehérje, amelynek belsejében egy oxidációs szám változásra képes, kovalensen kötött $Mo^{2+}$ ion található. Ezen a kofaktoron kívül az enzim tartalmaz még vas–kén csoportokat is (Johnson, 1985). Az enzim 127 kDa méretű α-alegysége, amely tartalmazza a vas-kén csoportok és a molibdén kofaktor alkotta aktív centrumot (Chaudry és MacGregor, 1983), a citoplazma felé néz. Ez azt jelenti, hogy csak azokat a nitrátionokat tudja az enzim redukálni, melyek bejutnak a sejtbe.




**5. ábra. A denitrifikáció enzimrendszere**

A transzportért egy speciális antiport fehérje felel, amely a sejt belsejébe nitrátot, a periplazmatikus térbe pedig nitritet szállít (5. ábra). Ennek a transzportmolekulának a meglétét klorát-redukciós kísér-letekkel sikerült bizonyítani. Ugyanis a tisztított nitrát-reduktáz szinte a nitráttal megegyező koncentrációban volt képes klorátot is redukálni, míg erre az intakt sejt képtelen. Ez bizonyította azt a korábbi feltételezést, hogy lennie kell egy transzportmechanizmusnak, amely specifikus a nitrátionra (Forget, 1974).

A β-alegység 61 kDa tömegű, szintén vas-kén csoportokat magában foglaló fehérje. Feladata a membránkötődés és az elektron-transzport biztosítása a γ- és az α-alegységek közt.

A 21 kDa-os γ-alegység gyakorlatilag egy *b* típusú citokróm, amely a nitrát redukciója során az elektronokat az elektron-traszportlánc *ubiquinol* nevű tagjától kapja, és továbbítja a β-alegység felé.

I.1.2. A denitrifikáció második lépése

Ez a folyamat a nitrit nitrogén-monoxiddá történő redukciója a nitrit-reduktáz által. Széleskörű vizsgálatok során eddig két típusát sikerült izolálni. Az első, mely általánosan elterjedt a mikroorganizmusok körében, egy $Fe^{2+}$-tartalmú membrán felszíni fehérje (Hochstein és tsai., 1988), amit gyakran citokróm *cd*-ként is neveznek, mivel jelentős citokróm-oxidáz aktivitással is bír. A *Paracoccus denitrificans* esetében is ilyen nitrit-reduktáz található.

Az enzim periplazmatikus elhelyezkedésű, 120 kDa tömegű; funkciója a citoplazmából kikerülő nitrit nitrogén-monoxiddá alakítása. Központjában egy kovalensen kötött porfirinvázas hem *c*, illetve egy hasonló szerkezetű, de nem kovalensen kötődő hem *d* csoport található.

A másik esetben, melyet az *Achromobacteraceae* család egyes tagjainál mutattak ki, az oxidációs szám változásra képes prosztetikus csoport a $Cu^{2+}$ (Fenderson, 1991).

A reakció lefolyását és a NO, mint intermedier szerepét, sokáig vitatták. Ennek oka, hogy nem volt megfelelő mérési módszer a NO kimutatására (Hochstein és tsai., 1988), mivel az könnyen oxidálódik $NO_2$-dá. Végül azt a biokémiai sajátságát használták fel meglétének és szerepének bizonyítására, hogy a hemoglobin nagy affinitással, irreverzibilisen képes kötni, mivel méretében és elektronszerkezetében is nagyon hasonlít a molekuláris oxigénhez. Az így kialakult ún. nitrozil-hemoglobin nevű komplex pedig már kolorimetriás méréssel is jól detektálható (Goretski és Hollocher, 1988).

I.1.3 A denitrifikáció harmadik lépése

A harmadik lépés a nitrogén-monoxid redukciója dinitrogén-oxiddá. A folyamatért felelős enzimet (nitrogén-monoxid reduktáz) először *Pseudomonas stutzeri*-ből izolálták (Heiss, 1989). Megállapították, hogy a *P. stutzeri* esetéhez hasonlóan, a *Paracoccus denitrificans*-nál is membránkötött az enzim, amelynek aktív centruma a periplazmatikus tér felé néz (Carr és Ferguson, 1990). Az enzim két fehérje alegységet tartalmaz, továbbá egy hem *b* és egy hem *c* csoportot. Ez az egyetlen eddig ismert enzim, amely N-N kötést képes létrehozni.

I.1.4 A denitrifikáció negyedik, befejező lépése

A befejező lépés során molekuláris nitrogén keletkezik, mely folyamatot katalizáló fehérje a 140 kDa-os, két alegységes, periplazmatikus elhelyezkedésű dinitrogén-oxid reduktáz (Zumft, 1987). Az enzim prosztetikus csoportja, hasonlóan egyes nitrit-reduktázokhoz egy $Cu^{2+}$ iont tartalmaz (Coyle és tsai., 1989).

## *I.2. A denitrifikáció szabályozása – az oxigén hatása*

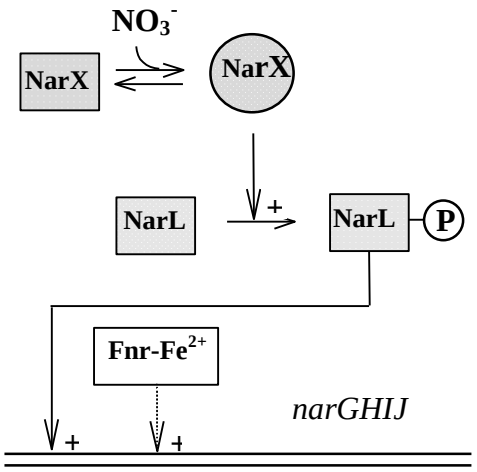
Az egyik legfontosabb külső szabályzó faktor az oxigén. Jól ismert tény, hogy az oxigén jelenlétében a denitrifikáció nem, vagy csak részlegesen játszódik le (Stouthamer, 1976). Az oxigén egyes enzimatikus lépéseket gátol, ami általában génexpresszió szintjén valósul meg. Az *E. coli* esetében a nitrátreduktázt kódoló gén indukciója (Stewart és Berg, 1988), míg a *Paracoccus denitrificans* esetében a dinitrogén-oxidáz génexpressziója gátolt (Sapshead és Wimpenny, 1972). *Thiosphaera pantotropha* esetében az oxigén gátolta a citokróm *cd* nitrit-reduktáz termelődését, míg a folyamat többi enzime kimutatható volt a sejtekben, azonban ezek mennyisége is erősen függött a közeg oxigén koncentrációjától (Moir és tsai., 1995). Az oxigénnek a nitrátredukcióra gyakorolt kizárólagos gátló hatását árnyalja az a megfigyelés, hogy *Citrobacter* sp. esetében oxigén jelenlétében magasabb denitrifikációs aktivitások tapasztalhatók, megfelelő mennyiségű szerves szénforrás esetében, anaerob körülmények között (Huang és Tseng, 2001).

*Paracoccus denitrificans* esetében az oxigén hatását olyan kísérleti elrendezésben vizsgálták, ahol aerob és anaerob szakaszok követték egymást. Megállapították, hogy az oxigén jelenlétének megszüntetése után először a nitrát- és nitrogén-monoxid reduktáz szintje emelkedik meg, majd ezt követi a nitrit-reduktáz megjelenése. A kísérletet elvégezték fordítva is, azaz az oxigénmentes környezetben nevelt mikroorganizmusokat aerob körülmények közé helyezték. A nitrátredukció gyakorlatilag teljesen megszűnt, egyedül a nitrit reduktáz mutatott némi aktivitást (Baumann és tsai., 1996). Az elmúlt tíz évben sikerült kimutatni egy újfajta nitrátreduktázt is, amelyet elsőként a *Thiosphaera pantotropha* baktériumban írták le. Ez egy periplazmatikus enzim, melynek jellegzetessége, hogy aerob körülmények közt szintetizálódik, kikerülve így az oxigénnek a denitrifikációra vonatkozó indirekt gátló hatását (Berks, 1994). E törzs besorolása azonban kérdéses, mivel korábban ezen baktériummal folytatott vizsgálatok kimutatták, hogy nem egy különálló fajról, hanem a *Paracoccus denitrificans* egy változatáról van szó, mely megfelelő körülmények közt képes visszaalakulni az eredeti formává (Ludwig és tsai., 1993).

## *I.3. A denitrifikáció génszintű szabályozása*

Mivel a denitrifikációban résztvevő közel negyven enzim igen bonyolult, több lépcsős központi folyamatot katalizál, várhatóan a különböző lépések jól szabályozottak. Az egyik legrészletesebben feltérképezett modell az *E. coli* nitrátreduktázára vonatkozik (6. ábra) (Stewart és Berg, 1988).

A nitrátreduktáz alegységeit kódoló géneket (narGHIJ) a külső és belső környezetből érkező jelek befolyásolják. Ezek közül kiemelt jelentősége van a nitrát jelenlétének, amit a NarL és NarX transzkripciós faktorokból álló, két szakaszos szabályozó folyamat közvetíti. A narX gén terméke, a NarX egy nitrátszenzor fehérje, amely konformációs változáson megy át a nitrát megkötésének hatására. Ezután képes a NarX aktiválni a NarL fehérje foszforilációját. A foszforilált NarL faktor így képes kapcsolódni a narGHIJ operon promóteréhez, indukálva a transzkripciót.




**6. ábra. A nitrátreduktáz génjének szabályozása *E. coli*-ban**

A másik környezeti paraméter, mely szabályozza a génexpressziót, a sejt redox állapota, melyet az $Fnr\text{-}Fe^{2+}$ transzkripciós faktor közvetít. Az $Fnr\text{-}Fe^{2+}$ transzkripciós faktor az anaerob metabolizmus indukálásához és fenntartásához nagy mennyiségben szükséges fehérje, mely aktivitásáért cisztein kötött vas(II) ionok felelősek (Trageser és Unden, 1989). Megfelelő körülmények között pozitív aktivátorként kötődik a narGHIJ operonhoz (Spiro és tsai., 1989).

Más nitrátredukcióra képes mikroorganizmusok esetében még nem sikerült a fent leírt szabályozó mechanizmus összes elemét azonosítani.

## *I.4. A denitrifikáció energiaigénye – elektrondonorok*

### *I.4.1. Heterotróf denitrifikáció*

A bakteriális denitrifikáció enzimrendszerének rövid áttekintése után áttérünk néhány, a gyakorlatban alkalmazott bakteriális denitrifikációt érintő kérdésre.

A mesterséges körülmények között, tervezetten végzett mikrobiológiai denitrifikáció kivitelezésekor a baktériumoknak biztosítani kell a denitrifikáció véghezviteléhez szükséges elektrondonor mennyiséget. Ez a folyamat az alábbi általános képlettel jellemezhető:

$$\boldsymbol{A_{red} + NO_3^- \rightarrow A_{ox} + N_2}$$

ahol $\boldsymbol{A_{red}}$ lehet szerves vagy szervetlen elektrondonor.

Heterotróf denitrifikáció esetében, valamilyen szerves szénforrást ($C_xH_yO_z$) alkalmazva a folyamatot részletesen a következő sztöchiometriai egyenletekkel lehet felírni (Drtil és tsai., 1995):

Első szakasz: a nitrát nitritté történő redukciója ($NO_3^- \rightarrow NO_2^-$)

$$C_xH_yO_z + (2x+½y-z)NO_3^- = x\ CO_2+½yH_2O + (2x+½y-z)NO_2^-$$

Második szakasz: a nitrit nitrogénné történő redukciója ($NO_2^- \rightarrow N_2$)

$$3C_xH_yO_z + (4x+y-2z)NO_2^- = 3xCO_2 + (y-2x+z)H_2O + (4x+y-2z)OH^- + (2x+½y-z)N_2$$

A két szakaszt összegezve a következőt kapjuk:

$$5C_xH_yO_z + (4x+y-2z)NO_3^- = 5xCO_2 + (2y-2x+z)H_2O + (4x+y-2z)OH^- + (2x+½y-z)N_2$$

Az egyenletek felhasználásával meg lehet adni a gyakorlati alkalmazás során szükséges szerves szénforrás mennyiségét, az ún. szén:nitrogén tömegarányt (C/N), mely a következőképpen alakul (1. tábla) (Drtil és tsai., 1995):

**1. tábla. Szén:nitrogén arányok heterotróf denitrifikáció esetén**

| Szénforrás | Elméleti szükséglet szén:nitrogén arány (C/N) | Javasolt mennyiség arányok | Forrás |
|---|---|---|---|
| **Glükóz** | 1.07 | 1.10 | Lee 2001 |
| **Ecetsav** | 1.07 | 1.20 | Cervantes 2001 |
| **Etanol** | 0.71 | 1.08 | Gómez 2000 |
| **Metanol** | 0.71 | 1.10 | Gómez 2000 |

Ezek az adatok általában olyan kísérleti rendszerekből kapott eredmények, melyeket a minimálisan szükséges szerves szénforrás mennyiségének meghatározására végeztek el.

Azonban megállapították, hogy magasabb C/N arányokat alkalmazva, a denitrifikációs ráta emelkedik. Ez az effektus különösen a kevert mikroorganizmus populációkat tartalmazó rendszerek esetében volt jellemző (Lee, 2001).

Ennek oka kettős: egyrészt az alkalmazott szerves szénforrás nemcsak a denitrifikáció folyamatában, hanem egyéb metabolikus folyamatokban (asszimilatív folyamatok) is felhasználódik. Így például a mikroorganizmus populáció növekedéséhez is hozzájárul, és a stabilabb populáció magasabb denitrifikációs aktivitást eredményez. Másrészt egy kevert mikroorganizmus populációban versengés folyik a tápanyagért. Ebben a kompetícióban nemcsak a denitrifikáló baktériumok vesznek részt, így a szerves szénforrás egy része nem a célzott folyamatra fordítódik (Carucci és tsai., 1999).

*I.4.2. Kemolitotróf denitrifikáció, a hidrogén szerepe*

Mivel a dolgozatban kemolitotróf, hidrogén-függő denitrifikálókkal foglalkozunk, ezért érdemes kitérni a kemolitotróf, anaerob metabolizmus kulcsenzimére, a hidrogenázra, mely a hidrogén oxidációjáért felelős (Germonpore és tsai., 1992, Mateju és tsai., 1992, Takács és tsai., 2001). Maga a hidrogén a nitrát redukciójához szükséges elektronokat biztosítja. A hidrogén oxidációja és a nitrátredukció kapcsolata az 5. ábrán van feltüntetve. Az ott jelzett hidrogenáz enzim egy vas-kén fehérje, mely nikkel ionokat is tartalmaz. Az *Alcaligenes eutrophus* kemolitotróf mikroorganizmus esetében kimutatták, hogy az enzim membránhoz kötött (Kortlüke és tsai., 1992), és egy megaplazmidon kódolt (Eberz és tsai., 1986). *Paracoccus denitrificans* esetében szintén leírták az enzim membránkötöttségét, illetve kimutatták a két mikroorganizmus hidrogenáza közti fehérje szintű egyezéseket (Knuttel és tsai., 1989).

Más szerzők különböző *Paracoccus denitrificans* izolátumok esetében egyértelműen bizonyították a membránkötöttséget, illetve azt, hogy heterotróf körülmények között az enzim nem mutat aktivitást. Továbbá kimutatták, hogy az enzim indukciójához a hidrogén jelenléte elengedhetetlen (Nokhal és Schlegel, 1980).

A kemolitotróf denitrifikáció során a szükséges hidrogénmennyiséget az alábbi folyamatok szerint írhatjuk fel (Lee, 2001):

| | |
|---|---|
| Nitrátredukció | $NO_3^- + H_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O$ |
| Nitritredukció | $NO_2^- + ½\ H_2 + H^+ \rightarrow NO + H_2O$ |
| Nitrogén-monoxid redukció | $2\ NO + H_2 \rightarrow N_2O + H_2O$ |
| Dinitrogén-oxid redukció | $N_2O + H_2 \rightarrow N_2 + H_2O$ |

A részreakciók összesítése után a következő egyenletet kapjuk:

$$2\ NO_3^- + 5\ H_2 + 2\ H^+ \rightarrow N_2 + 6\ H_2O$$

Ez az összegzett egyenlet általánosan alkalmazott a hidrogén alapú denitrifikációs rendszerek elektrondonor igényének kiszámításakor.

A heterotróf rendszereknél tapasztaltakhoz hasonlóan a kemolitotróf rendszerek esetében is feleslegben alkalmazzák az elektrondonort, a hidrogént, aminek oka szintén összetett. A hidrogén-oxidáló mikroorganizmusok a többi redukcióval járó, egyéb biokémiai folyamataik jelentős részéhez, köztük a szintézis folyamataikhoz is hidrogént használnak.

## *II. Az alkalmazott izolátumok bemutatása*

A törzsizolálás során kapott, denitrifikációra képes törzsek közül három izolátumot vizsgáltunk a továbbiakban. A kiválasztás szempontja a magas denitrifikációs aktivitás és a hidrogén oxidációjára való képesség volt. A törzsek azonosítása után áttekintettük a vonatkozó szakirodalmi utalásokat, különös tekintettel a dolgozat további, kísérletes részeihez kapcsolódó szempontokra: biofilmképzés, ivóvíz nitrátmentesítés, kemolitotróf, hidrogén alapú denitrifikáció, egyéb nitrátmentesítéssel kapcsolatos adatok.

*Pseudomonas stutzeri* (M2 izolátum)

- Biofilmképzés.

  A törzs képes aktív biofilmet kialakítani különböző felületeken, ami ivóvíz vezetékeken, vízművek esetében problémákat is okozhat (Brözel és tsai., 1995). A törzs kifejezett extracelluláris poliszaharid-termelő képességét, a termelt poliszaharidok összetételét leírták (Osman és tsai., 1994).

- Ivóvíz nitrátmentesítés, kemolitotróf, hidrogén alapú denitrifikáció.

  Ivóvíztisztítás esetében nem találtunk utalást a *Pseudomonas stutzeri* alkalmazására, csak erősen szennyezett szennyvizek esetében írták le, mint felhasználható törzset (Wang és Lee, 2001). Így e törzs ilyen jellegű felhasználása mindenképpen újszerű, különösen hidrogén-függő denitrifikáló rendszerekben.

  A hidrogén-oxidáló képesség egyik feltétele, a hidrogenáz enzim jelenléte bizonyított a törzs esetében (Zumft és Matsubara, 1982). Anyagcseréjére jellemző az is, hogy ezt az izolátumot obligát heterotrófként jellemzik (Sorokin és tsai., 1999), ami kérdésessé teszi felhasználhatóságát kemolitotróf rendszerekben.

- Egyéb, nitrátredukcióval kapcsolatos alkalmazások, adatok.

  A törzs régóta ismert, mint anaerob denitrifikáló mikroorganizmus, a nitrátredukcióban szerepet játszó enzimeket meghatározták és génszinten is jellemezték (Glockner és Zumft, 1996, Urbani és tsai., 2001).

Gyakorlati jelentősége van a törzsnek a bioszenzor technológiák területén is. Kifejlesztettek egy olyan amperometriás módszert (Kirstein és tsai., 1999), mely a törzs nitrátreduktáz enzimén alapszik. A módszer lényege, hogy a mesterséges membránra kötött, tisztított fehérje nitrátredukció közben redox változáson megy keresztül, amely változást redox átvivő-anyagok segítségével lehet mérhető jellé alakítani.

A törzs denitrifikációs képességén alapuló módszerben (McNally és tsai., 1999) azt a tulajdonságát használják ki, hogy anaerob körülmények között képes poliaromás szénhidrogének gyűrűbontására és a további oxidációs lépések elvégzésére, úgy hogy nitrátot használ elektron akceptorként. A törzs gyakorlati alkalmazhatóságának másik területe a környezetvédelem. Erre számos példát találhatunk; e törzs képes klórozott bifenilek degradációjára aerob körülmények között (Tandlich és tsai., 2001), de ismert róla az is, hogy anaerob körülmények között a tioszulfátot képes oxidálni tetrationáttá, mely reakció a geokémiai folyamatok között kiemelten szerepel (Sorokin és tsai., 1999).

Azonban a törzs egyes változatainak esetében jelzések vannak arra, hogy képes humán fertőzések okozására (Priestley és tsai., 1996), ami arra figyelmeztet, hogy a *Pseudomonas stutzeri* tartalmú reaktorok igénylik a fertőtlenítést, amire egyébként már kidolgozott módszerek állnak rendelkezésre, speciálisan erre a törzsre adaptálva (Matsuda és tsai., 1996).

*Ochrobactrum athropi* (A4 izolátum)

- Biofilmképzés.

A törzs biofilmképző tulajdonsága jól ismert, egyes területeke, mint gyógyászati eszközök sterilizálása, problémákat is okozhat (Cieslak és tsai., 1996). Hasonlóan az előző izolátumhoz, víztisztító berendezésekben, vízvezetékekben is képes megtapadni, kolóniákat létrehozni (Tall és tsai., 1995). Előfordulására jellemző, hogy vegyes mikroorganizmus konzorciumok gyakori tagjaként megtalálható betonfelületeken, közlekedési alagutak falán (Gu és tsai., 1998).

- Ivóvíz nitrátmentesítés, kemolitotróf, hidrogén alapú denitrifikáció.

Utalást a törzs alkalmazására az ivóvíz tisztítás területéről nem találtunk, aminek oka egyértelmű patogenitásában keresendő (Ramos és tsai., 1996). A kemolitotróf anyagcserére egyértelmű utalást nem találtunk, azonban a korábban említett vegyes, kemolitotróf körülmények között élő konzorciumokban való gyakori előfordulása (Gu és tsai., 1998) alapján nem zárható ki annak a lehetősége, kemolitotróf feltételek esetében is képes lehetett szaporodásra.

- Egyéb, nitrátredukcióval kapcsolatos alkalmazások, adatok.

A törzs denitrifikáló tulajdonságai ismertek (Holmes és tsai., 1988, Kesserű és tsai., 2002). Nitrát és foszfáttartalmú szennyvizek esetében nagy hatékonysággal alkalmazták, mint foszfátakkumuláló és denitrifikáló mikroorganizmust (Merzouki és tsai.,1999).

*Paracoccus pantotrophus* (M3 izolátum)

- Biofilmképzés, ivóvíz nitrátmentesítés.

Az izolátum esetében a biofilmképzésről és alkalmazásáról az ivóvíz nitrátmentesítében nem találtunk adatokat.

- Kemolitotróf, hidrogén alapú denitrifikáció.

A törzs denitrifikációs enzimrendszerének egyes részeit jellemezték, különös tekintettel a nitrit-reduktázra (Jafferji és tsai., 2000, George és tsai., 2000) és a periplazmatikus nitrátreduktázra (Ranghino és tsai., 2000, Bardischewsky és Friedrich, 2001, Kobayashi és tsai., 2001). A törzs esetében egyértelműen leírták a kemolitotróf szaporodási képességet (Friedrich és tsai., 2000), sőt hidrogenáz enzimét is jellemezték (Bardischewsky és Friedrich, 2001).

Egyéb, a nitrátredukcióval kapcsolatos gyakorlati alkalmazásokra nem találtunk utalásokat, adatokat.

*Paracoccus denitrificans* (P11 törzs)

- Biofilmképzés.

Homokágyas, denitrifikáló bioreaktor esetében tanulmányozták a törzs biofilmképző tulajdonságait (Neef és tsai., 1996). Megállapították, hogy a *P. denitrificans,* metanol szerves anyag forrás mellett magas aktivitású és stabil biofilmet képes alkotni.

- Ivóvíz nitrátmentesítés, kemolitotróf, hidrogén alapú denitrifikáció.

A törzset a szakirodalom kemolitotróf denitrifikációra képes törzsként jellemzi (Baumann és tsai., 1997, Moir, 1999), melynek denitrifikációs enzimrendszerét is alaposan feltérképezték (Stouthamer, 1990), illetve leírták, hogy kemolitotróf anyagcserére képes (Stouthamer, 1990). Ivóvíztisztítási eljárásokban elterjedt a genusz; kemolitotróf, hidrogén alapú rendszerekben, kevert mikróba-konzorciumok jellemző tagja (Werner és Hambsch 1989).

## *III. Biofilmek létrehozása, jellemzése*

A mikroorganizmusok speciális anyagcsere-folyamataira épülő biotechnológiai, ipari műveletek során általában szabadsejtes kultúrákat használtak a fermentációs eljárások alkalmazásának kezdetén. Az elmúlt évtizedekben azonban olyan technológiákat fejlesztettek ki, melyek hatékonysága messze meghaladja a szabadsejtes folyamatokét. Ezekben olyan biokatalizátorokat alkalmaznak, melyekben az aktív mikroorganizmusok viszonylag kis térfogatban, nagy mennyiségben helyezkednek el. A rögzített sejtes vagy más néven immobilizációs eljárások során valamely szilárd hordozó felületén vagy annak belsejében rögzítik az aktív sejteket, enzimeket, míg az átalakítandó szubsztrát általában a külső, mozgó fázisban található meg (Nicolella és tsai., 2000).

A módszer előnyei a következőkben foglalhatóak össze:

- A biokatalizátor folyamatos üzemmódban alkalmazható, ahol a sejtek a reaktorban maradnak.
- Aktív és nagy sejtkoncentráció érhető el, mely stabilan fenntartható.
- A termék tisztítása általában sokkal egyszerűbb, mivel optimális esetben a reaktorról távozó ún. effluens kevés sejtet tartalmaz.
- Hatékonyabb szubsztrátfelhasználás és -átalakítás érhető el.
- A rendszer-optimalizálás egyszerű, kevés lépésből megoldható.

### *III.1. A biofilm kialakulása*

A felületi rögzítés esetén a biológiailag aktív réteget nevezzük biofilmnek. A biofilm kialakulása mesterséges és természetes körülmények között hasonlóan megy végbe. A teljes folyamatot az alábbi lépésekre oszthatjuk fel (Bos és tsai., 1999):

1. A biofilmalkotó mikroorganizmusok adszorpciója a szilárd felszínre (hordozó). Reverzibilis szakasz, melyet a felület és a mikroorganizmusok felületének fiziko-kémiai tulajdonságai határoznak meg (felületi töltés, hidrofobicitás).
2. Mikroorganizmusok közötti kapcsolat létrejötte.

   A már kitapadt mikroorganizmusok között létrejövő ko-aggregátumok kialakulása, specifikus sejten kívüli képletekkel. Általában az ún. elsődleges biofilm alakul ki az adszorbció során, majd a már kitapadt baktériumok felületén, azok segítségével alakul ki a másodlagos biofilm (ko-aggregáció).
3. Stabil biofilm kialakulása – dinamikus egyensúly.

   A folyamat során a már adszorbeálódott mikroorganizmusok kötőanyagok

(poliszaharidok) kiválasztásával extracelluláris mátrixot hoznak létre a hordozó felszínén. Ebben a mátrixban történik a mikroorganizmusok szaporodása és pusztulása, a biofilm komponenseinek termelése, így a biofilm épülése és destrukciója egyensúlyba kerül, melynek eredménye a stabil biofilm. Ezt az állapotot a környezet, valamint a tápanyagforrás nagymértékben befolyásolja.

*III.2. A biofilmképzés képessége a mikroorganizmusoknál*

Általában három fő faktort emelnek ki, melyek meghatározó szerepet játszanak a biofilm kialakításában egy adott mikroorganizmus esetében (Fletcher, 1989), inert hordozó felületén.

1. Genetikai determináltság.

   Mivel a biofilmképzés első lépése az adhézió az adott hordozóra, a baktérium genetikailag kódolt felületi tulajdonságai meghatározóak. Egyes mikroorganizmusok számos felülettípusra képesek kitapadni, ami arra utal, hogy képesek megváltoztatni felszínük fiziko-kémiai tulajdonságait, amit elsősorban a felszíni poliszaharid összetétel módosításával érnek el. Sajnos kevés adat áll rendelkezésre az ilyen jellegű, nem-specifikus adhézió, azaz nem ligand–receptor kölcsönhatás molekuláris hátteréről.

   Egyes tengeri ökoszisztémák esetében sikerült közvetlen kapcsolatot találni a különböző extracelluláris poliszaharidok és a környezet hatása között (Bartlett és tsai., 1989). Az elmélet szerint létezik egy olyan genetikai mechanizmus, mely képessé teszi az adott szervezeteket, hogy a felületi adhéziót meghatározó tulajdonságaikat változtassák, a kiválasztott extracelluláris mátrix összetételén keresztül, így alkalmazkodva a változó környezeti hatásokhoz. Egyes mikroorganizmus törzsek az evolúció során úgy fejlődtek ki, hogy képesek bekapcsolni a biofilmképzésért felelős rendszerüket több különböző felülettel történő találkozáskor is. Másként megközelítve az elméletet, ha a felületi adszorbció élettani előnyt jelentett a mikroorganizmusnak, akkor az el tudott szaporodni az adott körülmények között, ami evolúciós előnyt biztosított számára a többiekkel szemben.

2. A mikroorganizmusok fenotípusos válasza a tápanyagok hatására.

   Nemcsak a genetikailag kódolt információk határozhatják meg egy mikroorganizmus biofilmképző tulajdonságait, hanem a külső közeg tápanyag-ellátottsága. Így a gyakorlati életben alkalmazott biofilmek esetében különös tekintettel kell lenni pl. a szénforrás minőségére és mennyiségére (McEldowney és Fletcher, 1987).

   A tápanyag jelenlétére, annak koncentráció változására adott fenotipikus válaszokkal egy

helyen említik meg a közeg redukáló erő (elektron donor) szintjének befolyásoló hatását is (Casey és tsai., 2000).

3. Fiziko-kémiai hatások – a környezet szerepe.

   A fiziko-kémiai hatások (hőmérséklet, pH, ionkoncentráció) szintén befolyásolják a kialakuló biofilm minőségi és mennyiségi paramétereit. A hatás kétoldalú, egyrészt a biofilmet létrehozó adhézióra hathatnak, másrészt a baktériumok szaporodási sebességét és a különböző baktérium törzsek közötti kapcsolatokat befolyásolhatják. Az adhézióra nézve a környezeti paraméterek közül kiemelt szerepe van az ionerősségnek és a hőmérsékletnek (Bos és tsai., 1999). Speciális csoportja a kémiai kölcsönhatásoknak a ligand-receptor kapcsolat, melynek szerepe van az inter-mikrobiális kapcsolatok kialakításában, ugyanis a biofilm stabilitásában fehérjék és különböző kapcsoló faktorok is szerepet játszhatnak (Zubkov tsai., 1999).

*III.3. A szilárd felület, hordozó jellemzői*

A biofilmképzés szempontjából a hordozó fiziko-kémiai tulajdonságai is meghatározóak. Ezek közül az alábbiakat kell kiemelni (Gavrilescu és tsai., 2000):

1. A felület töltése.

   - A baktériumok kikötődése szempontjából előnyös a pozitív töltésű felület, mivel ők maguk általában negatív felületi töltéssel rendelkeznek a felületi molekuláik negatív töltése miatt.

   - A közeg kémhatása is befolyásolja a felületi töltést.

2. A felület érdessége.

   A pórusokkal rendelkező felület elősegíti a biofilm képződését, jobb tapadást biztosítva a baktériumok által termelt extracelluláris mátrixnak.

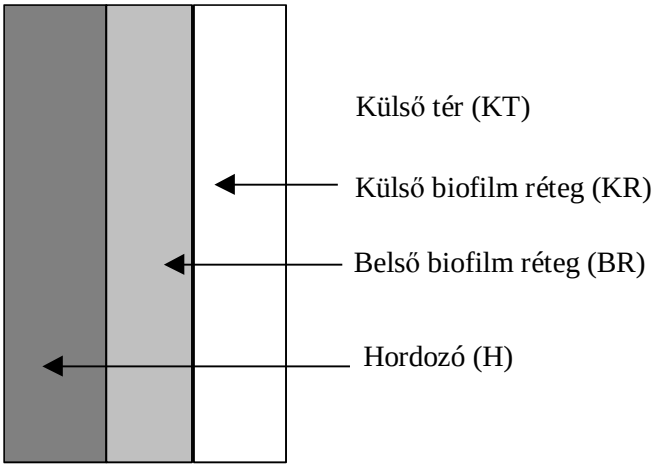
3. A felület hidrofóbicitása, nedvesedési képessége.

   A felület hidrofóbicitása meghatározó a felület és a víz közt kialakuló kapcsolatokban, ami azért fontos, mivel a víz aktív szereplő a bakteriális adhézióban szerepet játszó másodlagos kémiai erők kialakításában (van der Wals kötések, hidrátburok).

### *III.4. Anyagtranszfer a biofilm reaktorokban*

Biofilmreaktorok esetében 3 fizikai fázist különíthetünk el. A biofilmmel borított szilárd fázis helyezkedik el a folyadékfázisban, ahol az átalakítandó szubsztrát és/vagy tápanyag van oldott állapotban. A gázfázis anaerob denitrifikáló rendszerek esetében $N_2$, $H_2$, $CO_2$ valamint egyéb nitrózus gázokat tartalmaz, melyek folyadékban oldott mennyisége egyensúlyban van a gázfázisban lévővel.

Figyelembe véve a lehetséges felületeket, fázisokat, anyag-áramokat és egyensúlyokat, a 7. ábrán bemutatott sémából kiindulva modellezhetjük egy kemolitotróf, hidrogén-oxidáción alapuló denitrifikáló rendszerben lévő, *steady-state* állapotú biofilm esetében a denitrifikáció szempontjából leg-fontosabb folyamatokat (2. tábla) (Eggers és Terlouw, 1979).




**7. ábra. Inert hordozó felületén kialakult biofilm vázlatos szerkezete**

**2. tábla. Inert hordozó felületén kialakult denitrifikáló biofilmben végbemenő folyamatok vázlata**

| Külső tér (KT) és a külső biofilm réteg (KR) transzport folyamatai | Külső biofilm réteg (KR) és a belső biofilm réteg (BR) transzport folyamatai |
|---|---|
| $NO_3^-{}_{(KT)} \leftrightarrow NO_3^-{}_{(KR)}$ | $NO_3^-{}_{(KR)} \leftrightarrow NO_3^-{}_{(BR)}$ |
| $NO_2^-{}_{(KR)} \leftrightarrow NO_2^-{}_{(KT)}$ | $NO_2^-{}_{(BR)} \leftrightarrow NO_2^-{}_{(KR)}$ |
| $H_{2(gáz)} \leftrightarrow H_{2(KT\ oldott)} \leftrightarrow H_{2(KR)}$ | $H_{2(KR)} \leftrightarrow H_{2(BR)}$ |
| $N_{2(KR\ oldott)} \leftrightarrow N_{2(KT\ oldott)} \leftrightarrow N_{2(gáz)}$ | $N_{2(BR)} \leftrightarrow N_{2(KR)}$ |

A biofilm reaktorban lejátszódó események áttekintéséhez a fentebb felsorolt fiziko-kémiai egyensúlyi folyamatok ismerete szükséges. A bemutatott folyamatok diffúzió eredményeképpen jönnek létre, ahol a diffúzió irányát a jelenlévő anyagok koncentráció-különbsége határozza meg. Az adott anyagok koncentrációját befolyásolják a mikroorganizmusok anyagcsere-folyamatai (denitrifikáció), így az egyensúlyokat jelentős befolyásolják.

A biofilm két részre osztható a bennük lejátszódó mikrobiológia folyamatok alapján. A külső biofilm (KR) réteg érintkezik közvetlenül a tápközeggel, ahol a nitrát, hidrogén és más

szubsztrátok találhatóak. Ebben a rétegben folyik a mikrobiális denitrifikáció első szakasza, a nitrátredukció. Mivel a nitrát gátló hatással (Batchelor és Lawrence, 1978) van a nitrit-reduktázra, ezért itt a nitrit redukciója elhanyagolható mértékű – amit a felhalmozódó nitrit is jelez, és a nitrátredukció a jellemző folyamat.

A belső biofilm rétegben (BR) történik a nitrit redukciója nitrogénné. Itt már a nitrátredukció nem jellemző, viszont $N_2$ gáz termelődik, ami a két rétegen keresztül a külső térbe távozik. Megfelelő intenzitású denitrifikáció esetén ez gázbuborékok formájában figyelhető meg a külső térben.

Mivel kísérleteinkben nagy fajlagos felületű granulált aktivált szenet (GAC) használtunk hordozóként, ezért elképzelhető, hogy maga a hordozó is részt vesz a gázok megkötésében, illetve a kialakuló egyensúlyi folyamatokban puffer szerepét töltheti be. A GAC szubsztrát megkötő képességét írták le abban a kísérletsorozatban, melyben hordozóként használtak aromás anyagok biodegradációjához. Ebben az esetben a hordozó nemcsak az aktív biofilm, hanem az apoláros, aromás anyagok megkötésében is szerepet játszott (Caldeira és tsai., 1999, Mason és tsai., 2000).

### *III.5. Biofilm és aktív szén*

A jelen dolgozatban bemutatott rendszerek aktív szén hordozón nevelt biofilmet tartalmaznak. A granulált aktív szén, mint hordozó szintén elterjedt anyag a szennyvíztisztító bioreaktorok alkalmazásának területén. A GAC szerepe kettős, egyrészt felület a megtapadó mikroorganizmusoknak, másrészt a lebontandó anyagot kiválóan adszorbeálja (Armenante és tsai., 1996, Caldeira és tsai., 1999). A GAC másik alkalmazása az ivóvíz tisztítási technológia területén a víz baktérium-mentesítése, ahol mint szűrőt alkalmazzák (Camper és tsai., 1985, Okochi és tsai., 1997).

Így a GAC hordozóként történő alkalmazása mellett számos érv szólt:

- Más alkalmazásokban bevált, mint biofilm hordozó.
- Teljesen indifferens, vízben oldhatatlan. Fizikai paraméterei (nagyobb szemcseméret) alapján a homokágyas reaktorok esetében fellépő buborékképződés által okozott aktivitásvesztés kiküszöbölhető (Soares és tsai., 1991).
- Pórusmérete, fajlagos felülete magas, ami elősegíti nagy mennyiségű biomassza megtapadást.

*III.6. A biofilmképzés ismert eljárásai*

Az alkalmazott biodegradációs, illetve denitrifikáló rendszerek egy részében meghatározatlan, denitrifikáló aktivitással rendelkező, mikrobiális konzorciumokat alkalmaznak (Yang és tsai., 1995, Caldeira és tsai., 1999). Az oltóanyagok eredete, összetétele, minősége nincs megadva, esetleg "aktivált iszapként" (*activated sludge*) határozzák meg. Maga a biofilmképzés heterotróf módon, azaz szerves szénforrás jelenlétében történik, ami alapján feltételezhető, hogy a biofilm nemcsak a célcsoportot, azaz a denitrifikáló mikroorganizmusokat tartalmazza, hanem más, esetleg patogén törzseket is. A gyakorlatban ez annyit jelent, hogy a leendő hordozót inkubálják ebben az aktivált iszapban, ahol kialakul egy kezdeti biofilm, mely a reaktor üzemelése során még számos változáson megy keresztül.

Azokban a biológiai denitrifikáló rendszerekben, melyeket a gyakorlati életben is alkalmaznak, a biofilmképzés hasonló módon történik. Mind a heterotróf, szerves szénforrást igénylő, mind a kemolitotróf denitrifikáció esetében a reaktorban "magától" alakul ki az aktív biofilm. Ez annak tulajdonítható, hogy a reaktor belsejében létrejövő körülmények annyira speciálisak (szelekciós nyomás), hogy csak néhány mikroorganizmus képes ezen feltételek mellett szaporodni és stabil populációt kialakítani (Gros és Treutler, 1986).

A későbbiekben bemutatandó kísérletekben olyan biofilm előállítási módszereket vizsgáltunk, melyek során granulált aktív szénre, mint hordozóra a korábban bemutatott mikroorganizmus törzsekkel biofilmet képeztünk.

## *IV. Kemolitotróf denitrifikáción alapuló bioreaktorok – elektro-bioreaktorok*

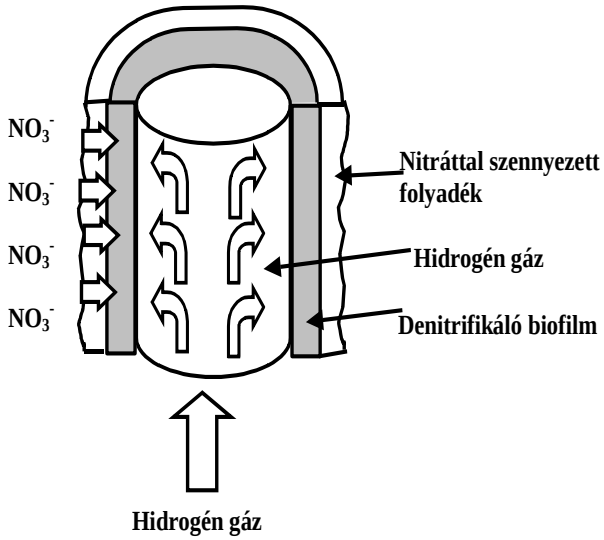
Mint korábban bemutattuk, a bakteriális nitrátmentesítő rendszereket az alkalmazott elektrondonor szerint heterotróf és kemolitotróf csoportra oszthatjuk. A heterotróf denitrifikáció számos előnye mellett olyan hátrányokkal is rendelkezik, melyek a kemolitotróf folyamatok esetén nem merülnek fel, mint például a hosszadalmas utókezelés, a szerves szénforrás eltávolítása, az effluens magas csíraszáma.

A denitrifikációra képes mikroorganizmusok egy részénél tehát a denitrifikáció teljes folyamata kemolitotróf módon is végbemehet, így a szerves szénforrás alkalmazása kikerülhető. Ezekben a rendszerekben az egyik lehetséges energiaforrás a hidrogén gáz, mely alkalmazásának gátat szab gyúlékonysága és robbanékonysága, illetve az a tény, hogy oldódása vízben alacsony mértékű (1 mmól $l^{-1}$ 20 ºC-on). Ennek ellenére számos denit-rifikációs rendszert fejlesztettek ki, melyekben hidrogén gázt alkalmaztak energiaforrásként.

Az egyik legelső, homokágyas rendszerben (Kurt és tsai., 1987), 25 mg nitrát-N $l^{-1}$ tartalmú, hidrogén gázzal átbuborékoltatott influenst alkalmazva, 4.5 órás tartózkodási idő mellett 0.55 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ (1 $m^3$ reaktortérfogat esetén egy nap alatt elbontott nitrát-N egyenérték tömeg) denitrifikációs aktivitást értek el.

Egy másik, merőben eltérő elrendezésű, két szakaszos rendszer (Dries és tsai., 1988) is hasonló denitrifikációs aktivitást eredményezett (0.5 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$), poliuretán hordozót alkal-mazva, ahol az első szakaszban a nitrátredukció történt, míg a második szakaszban az akkumulálódott nitrit és a feleslegben adott hidrogén gáz eliminálása történt meg.

A hidrogén alapú biológiai denitrifikáló rendszerek egy új irányát képviselik azok a fejlesztések, ahol egy membránt alkalmazva juttatják a hidrogént a bioreaktorba (Lee és Rittmann, 2000). Az elrendezés alapja egy hidrogénre nézve permeábilis membránból készült cső, melynek külső felén található a denitrifikáló biofilm, míg a belső részében áramlik a hidrogén gáz (8. ábra). A cső falán átjutó hidrogén mennyiségét pontosan lehet szabályozni a




**8. ábra. Hidrogén permeábilis membrán-reaktor vázlatos rajza és működési elve**

csőben lévő nyomással, ugyanis nagyobb nyomás értékek esetében az átdiffundáló hidrogén mennyisége is emelkedik. Ez az eljárás a hidrogéngáz nagyon pontos és gazdaságos felhasználását teszi lehetővé.

A gyakorlatban is megvalósított alkalmazások közül ki kell emelni a DENITROPUR elnevezésű rendszert, amelyet Mönchengladbach-ban máig alkalmaznak (Gros és Treutler, 1986, Gros és tsai., 1986). A rendszer egy hidrogéntelítő mechanikus szakasszal kezdődik, majd egy foszfát és széndioxid adagoló rész következik a biológiailag aktív töltetet tartalmazó reaktor előtt. A reaktor maga több lépcsős (kaszkád) elrendezés, ahol az utókezelés levegőztetést, UV sterilizálást és szűrést foglal magába. Az egész rendszer denitrifikációs aktivitása 0.25 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$, illetve 11.29 mg $NO_3$-N $l^{-1}$ eliminálásához 1-2 óra tartózkodási időre volt szükség.

A hidrogén gáz direkt felhasználása, annak fokozott robbanásveszélye miatt, azonban csökkenti ezen alkalmazások, valamint az ivóvíz tisztítás szempontjából előnyös kemolitotróf baktériumok gyakorlati felhasználását és elterjedését. Egy üzembiztos, jól szabályozható hidrogénforrás kifejlesztése és alkalmazása megoldaná a problémát. Ezeket a feltételeket teljesíti a víz elektrokémiai bontása, melynek terméke hidrogén és oxigén gáz. A folyamat direkt alkalmazásának gátat szab, hogy az elektrolízis eredménye az ún. durranógáz (hidrogén és oxigén 1:1 arányú keveréke), mely egyrészt robban, másrészt az oxigén gátolja a denitrifikációt.

Az első olyan biológiai denitrifikáló rendszerben, ahol víz elektrolízisével állítottak elő hidrogént, a katód felületén alakították ki a biofilmet, anaerob, heterotróf neveléssel (Sakakibara és Kuroda, 1993). Amikor a biofilm látható volt, a rendszerre áramot kapcsolva hidrogént fejlesztettek a katódon, amelyet a mikroorganizmusok helyben használtak fel a denitrifikációhoz. A rendszer hibája a viszonylag alacsony stabilitás volt, ami annak a következménye, hogy a katódon termelődő hidrogén buborékokat alkotva destabilizálta a biofilmet.

Ugyanezen szerzők a rendszerüket továbbfejlesztették egy érdekes megoldással, melyben a katód cső formában vette körül az anódként funkcionáló szénrudat, a biológiailag aktív réteget pedig Ca-alginátban rögzítették a katód felszínére. Ennek a folyamatos üzemű rendszernek 10 mg $NO_3$-N $l^{-1}$ teljes eliminálásához 2.5 mA áram felvétele esetében 9 óra tartózkodási időre volt szüksége (Sakakibara és tsai., 1994).

A továbbiak ezt a rendszert is továbbfejlesztették, poliuretán habbal rögzített sejteket alkalmazva a katód felületén (Feleke és tsai., 1997). Bebizonyították, hogy az adott rendszerben a nitrát redukciója teljes egészében biológiai és nem elektrokémiai folyamat,

illetve az előzőekhez képest igen stabil (> 400 nap üzemidő) biofilmrögzítési módszert dolgoztak ki. A rendszer hátránya, hogy aktivitása kb. negyede a DENITROPUR rendszer esetében mértnek.

Az előbbiekben bemutatott kombinált elektrokémiai-biológiai denitrifikáló rendszerek hosszú ideig stabilak voltak, ami azt jelzi, hogy a víz elektrolízise során keletkezett hidrogén alkalmas a biológiai denitrifikációban résztvevő baktériumok számára *in situ* energiaforrásnak, illetve az elektrokémiai cellában lévő katód alkalmas felületnek bizonyult biofilmképzésre.

Az eddig ismertetett reaktor elrendezések esetében az anód és a katód elektród egy térben helyezkedett el. Ennek egyik következménye, hogy az anódon termelődő oxigén gátolhatja a denitrifikációt, másrészt a katód felületén jelentős karbonát kiválás fordulhat elő, ami csökkenti az aktív felszínt, amely meghatározza az aktív biofilm mennyiségét. Továbbá konstans áramerősségek esetében növeli a szükséges feszültség nagyságát, az egység elektromos ellenállásának emelkedése révén.

Az elrendezések alacsony hatásfokának másik oka a katódon kialakult biofilm fizikailag károsodhat, különösen magasabb áramerősségek esetében a keletkező gázbuborékok miatt. Ennek elkerülésére a hidrogéntermelést alacsonyan kell tartani, ami csökkenti a denitrifikáció sebességét. A biofilm mennyiségének növelésére kifejlesztett, multi-elektród elrendezés (Sakakibara és Nakayama, 2001) ugyan növelte az effektív felületet, azonban a denitrifikációs aktivitás így is alacsony maradt.

Az eddig bemutatott hidrogén felhasználásán alapuló biológiai denitrifikáló rendszerek jellemző adatait a 3. táblában foglaljuk össze:

**3. tábla. Néhány, hidrogén alapú, kemolitotróf denitrifikáló rendszer összehasonlítása**

| **Hidrogén forrás** | **Biofilm rögzítése - hordozó** | **Denitrifikációs aktivitás** | **Hivatkozás** |
|---|---|---|---|
| Külső forrás (gázpalack) | Felületi rögzítés, homokágy | 0.55 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Kurt és tsai. 1987 |
| Külső forrás (gázpalack) | Felületi rögzítés, poliuretán hordozó | 0.50 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Dries 1988 |
| Külső forrás (gázpalack) | Membrán reaktor | 0.16 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Lee és Rittmann 2000 |
| Külső forrás (gázpalack) | Homok ágyas biofilm reaktor | 0.25 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Gros és Treutler 1986<br>Gros és tsai 1986 |
| Víz elektrolízise | Biofilm reaktor | 0.01 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Sakakibara 1994 |
| Víz elektrolízise | Rögzített sejtes reaktor (gél) | 0.08 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Feleke és tsai. 1997 |
| Víz elektrolízise | Felületi rögzítés | 0.1 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Sakakibara 2001 |
| Külső forrás (gázpalack) | Rögzített sejtes rendszer (gél) | 0.6 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | Chang és tsai. 1999 |

Az itt bemutatott, hidrogén-függő, kemolitotróf denitrifikáló rendszerek száma is jelzi, hogy a téma az ivóvíz nitrátmentesítéssel foglalkozó terület kiemelt és fejlődő ágát képviseli. A laboratóriumi szintű rendszereken át a gyakorlatban is alkalmazottakig számos megvalósítást találunk, melyek bizonyították felhasználhatóságukat. A módszer hatékonysága azonban még messze nem tökéletes. A rendszerek stabilitása, a biztonságos és gazdaságosan adagolható hidrogénforrás megoldása és a méretnövelési problémák még javarészt megoldásra várnak.

## *V. Elektrokémia – hidrogéntermelés vízbontással*

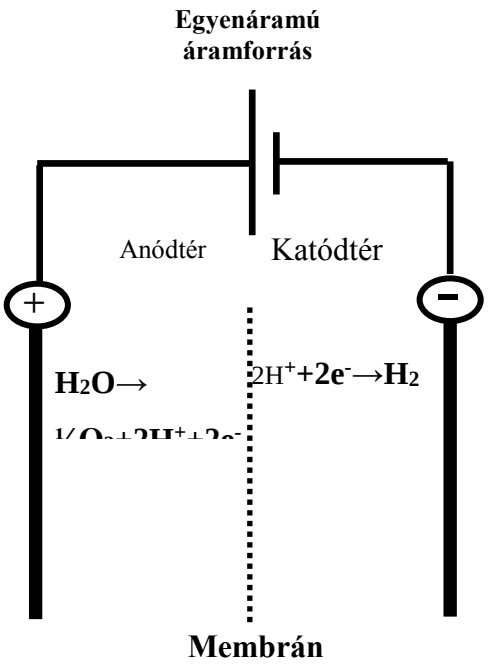
A dolgozatban bemutatandó kemolitotróf, denitrifikáló rendszerekben a nitrát redukciójához szükséges hidrogént a víz elektrolízisével, elektrokémia cellában állítottuk elő.

### *V.1. Vízbontás, elektrokémiai cella*

Elektrolízis alatt elektromos energia befektetésével végrehajtott kémiai reakciót értünk. Az elektrolizáló cella (elektrokémiai reaktor) katódján redukció, anódján oxidáció megy végbe. A cella részei az elektródok (az elektrolitoldattal közvetlenül érintkező vezető), az elektrolitok (elektronokat vezető folyadék) és egy egyenáramú tápegység.

A vízbontás egyik legklasszikusabb elrendezése esetében, az ún. Hofmann-féle vízbontó készülékkel kénsav híg vizes oldatát elektrolizáljuk platina elektródok között, ahol a katódon hidrogéngáz, míg az anódon oxigén keletkezik.

Ez történik a későbbiekben bemutatandó kísérleti elrendezésekben alkalmazott elektrokémiai cellák esetében is (9. ábra), azzal a változtatással, hogy az anód- és katódteret egy ioncserélő membránnal választottuk el, mely nem gátolta az elektronok áramlását, viszont megakadályozta a két térrészben keletkező gázok és az alkalmazott elektrolitok keveredését. Elektrolitként az anódtérben kénsav oldat, a katódtérben a reaktorra felmenő, nitrát-, karbonát-tartalmú csapvíz volt.




**9. ábra. Elektrokémiai cella és a benne lejátszódó folyamatok egyszerűsített vázlata**

*V.2. Várható egyéb elektrokémiai reakciók az elektrokémiai cellában*

A dolgozatban alkalmazott gyakorlati elrendezésekben az elektrokémiai cella anód terében 0.1 N kénsav oldatot keringettünk, míg a katód térben telítődött hidrogéngázzal a bioreaktorokra áramló tápoldat. A tápoldatok összetételének ismeretében az alábbi reakciók játszódhattak le a cellában (Stumm, 1981, Feleke, 1998) (4. tábla):

**4. tábla. Az alkalmazott rendszerben elvileg lejátszódható elektrokémiai és egyéb reakciók**

| **Reakció séma** | **Elektrokémiai reakció (anód)** | |
|---|---|---|
| $H_2O = ½O_2 + 2H^+ + 2e^-$ | ($-e^0 = 1.23$ V) | **E-1** |
| | **Elektrokémiai reakció (katód)** | |
| $2\ H_2O + 2e^- = H_2 + 2OH^-$ | ($e^0 = -0.828$ V) | **E-2** |
| $NO_2^- + 6H_2O + 6e^- = NH_4^+ + 8\ OH^-$ | ($e^0 = -0.212$ V) | **E-3** |
| $NO_2^- + H_2O + e^- = NO + 2\ OH^-$ | ($e^0 = -0.46$ V) | *E-4* |
| $NO_3^- + H_2O + 2e^- = NO_2^- + 2\ OH^-$ | ($e^0 = 0.017$ V) | **E-5** |
| | **Kémiai precipitáció** | |
| $Ca^{2+} + HPO_4^{2-} = CaHPO_4$ | (pKsp = -6.6) | **C-1** |
| $Ca^{2+} + CO_3^{2-} = CaCO_3$ | (pKsp = -8.4) | **C-2** |
| $Mg^{2+} + CO_3^{2-} = MgCO_3$ | (pKsp = -7.5) | **C-3** |
| $Ca^{2+} + Mg^{2+} + 2CO_3^{2-} = CaMg(CO_3)_2$ | (pKsp = -16.7) | **C-4** |

Az E-1 reakció az anódtérre jellemző, ahol $e^0$ a standard elektród potenciál, és elektrokémiai okok miatt az oxigén fejlődése jellemző az alkalmazott rendszerekben.

A katódtérben lehetséges reakciók közül a hidrogénfejlődés standard potenciálja a legalacsonyabb, így a hidrogénfejlődés a kedvezményezett reakció (E-2). Azonban elméleti alapon nem lehet kizárni a többi reakció lejátszódását sem (E-3, E-4 és E-5).

A kémiai precipitációk különösen a gyakorlati alkalmazás szempontjából jelentősek, ugyanis a katód felületén létrejövő precipitáció a cella ellenállásának növelésén keresztül emeli - konstans áramerősség esetén - a szükséges feszültséget, ezáltal a cella működési költségeit, másrészt a hordozóra kicsapódó anyagok csökkenthetik a reaktor effektivitását (Arvin, 1982).

## Célkitűzés

Munkánk során olyan kísérleti elrendezés kidolgozását tűztük ki célul, mely alkalmas kistelepülések, háztáji gazdaságok ivóvizének biológiai nitrátmentesítésére. Figyelembe véve a heterotróf és kemolitotróf denitrifikáció előnyeit és hátrányait, az utóbbi eljárás alkalmazása mellett döntöttünk, mivel a szerves szénforrások mellőzése egyszerűsíti a technológia kivitelezését, és humán vonatkozású alkalmazásakor kisebb mértékű utókezelést igényel. Másrészt a kemolitotróf denitrifikáció alkalmazása esetében várható denitrifikációs aktivitások alacsony és közepes nitráttartalmú vizek esetében is kielégítőek (Gros és Treutler, 1986).

A feladat kivitelezéséhez az alábbi kritériumokat adtuk meg:

- Az alkalmazott mikroorganizmusokra legyen jellemző a kemolitotróf denitrifikáció, mely során energiaforrásként hidrogént képesek felhasználni.
- A denitrifikációhoz szükséges hidrogént a víz elektrokémiai bontása során nyerjük.
- A reaktor-elrendezések folyamatos üzeműek legyenek.

# Anyagok és módszerek

*I. Anyagok, vegyszerek*

Az alkalmazott vegyszerek, táptalajkomponensek analitikai tisztaságú (Sigma Co. illetve Reanal Rt.) vegyszerek voltak.

*II. Mikrobiológia - Törzsdúsítás, törzsszelekció.*

II.1. Mintavétel

A Ben Gurion Kibuc (Izrael) iszapderítőjének anaerob iszapjából, illetve egy korábban működő homokágyas denitrifikáló bioreaktorból vettünk mintákat. Mivel célunk anaerob törzsek izolálása volt, ezért az ilyenkor szokásos eljárást (Standard Methods, 1992) alkalmazva 10-10 ml iszapot 20 ml-es steril üveg edényekbe helyeztünk, majd nitrogén atmoszféra alatt lezártuk azokat. A szállítás, illetve tárolás 4 C˚-on történt.

II.2. Szelektív izolálás

Anaerob kemolitotróf mikroorganizmusok dúsítására alkalmazott módszer alapján dolgoztunk (Schlegel és tsai., 1961). A dúsítási módszer során hetente tápoldatot cseréltünk a kultúrákon, a baktériumpopuláció összetételét DSM1 (6. tábla) heterotróf táptalajon történő telepszámlálással jellemeztük.

Az izolálás alatt minden tenyészetet anaerosztátban inkubáltunk 25 ˚C-on, ahol az atmoszféra 96% $N_2$-4% $H_2$ összetételű gázkeveréket tartalmazott. A kultúrákban lévő denitrifikálásra képes mikroorganizmusok számát gázképződés alapján határoztuk meg (Tiedje 1982).

Három hét inkubációs idő után egyéni baktériumizolálást végeztünk telepmorfológia alapján és minden telepet DSM1 tápfolyadékra (10 ml) oltottunk ki, melyet 26 mg $l^{-1}$ $NO_3$-N-tal dúsítottunk (nitrát-nitrogén egyenérték tömeg). Anaerosztátban történt két napos inkubáció után mértük a tápoldatok nitrát és nitrit koncentrációját kolorimetriásan (lásd később IV.5).

A denitrifikálás szempontjából aktív mikroorganizmusokat további felhasználásig ⁻80 ˚C-on tároltuk, 10% glicerint tartalmazó kemolitotróf tápoldatban (5. tábla).

II.3. Mikroorganizmus tenyésztés

Starter tenyészetek előállítása: A ⁻80 ˚C - on tárolt törzseket 10 ml DSM1 tápoldatban vettük fel, majd 24 óra inkubáció után oltottuk tovább a megfelelő tápoldatba.

Aerob, heterotróf nevelés: A starter tenyészeteket 100 ml DSM1 tápoldatban neveltük tovább újabb 24 órán át. A tenyésztés minden esetben 30 ˚C-on, Gallenkamp inkubátorban történt 100 rpm rázatás mellett. Amennyiben szilárd táptalajon neveltük a törzseket, 1.5 % agar tartalmú DSM1 táptalajra oltottuk, majd 30 ˚C - os aerob termosztátban inkubáltuk őket.

Kemolitotróf nevelés: A starter tenyészeteket 100 ml kemolitotróf tápoldatban neveltük anaerosztátban lassú rázatás mellett. Amennyiben szilárd táptalajon neveltük a törzseket tovább, kemolitotróf táptalajra oltva inkubáltuk a tenyészeteket anaerosztátban.

**5. tábla Az alkalmazott kemolitotróf tápoldat/talaj összetétele**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 2.44 | g | | Mikroelem-oldat | |
| $KH_2PO_4$ | 1.52 | g | | $ZnSO_4$ x 7 $H_2O$ | 0.10 g |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0.50 | g | | $MnCl_2$ x 4 $H_2O$ | 0.30 g |
| $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ | 0.20 | g | | $H_3BO_3$ | 0.30 g |
| $CaCl_2$ x 2 $H_2O$ | 0.05 | g | | $CoCl_2$ x 6 $H_2O$ | 0.20 g |
| **$NaHCO_3$** | 1.00 | g | | $CuCl_2$ x 2 $H_2O$ | 0.01 g |
| **Mikroelem oldat** | 10.00 | ml | | $NiCl_2$ x 6 $H_2O$ | 0.02 g |
| Desztillált víz | 990.00 | ml | | $Na_2MoO_4$ x 2 $H_2O$ | 0.03 g |
| (táptalaj esetében agar) | 15.0 | g | | Desztillált víz | 1000.00 ml |

**6. tábla DSM1 táptalaj összetétele**

| | |
|---|---|
| Pepton | 5.0 g |
| Húskivonat | 3.0 g |
| Agar | 15.0 g |
| Desztillált víz | 1000.0 ml |

*II.4. Törzsek jellemzése és azonosítása*

- Morfológia, külső jellemzők.

  Az izolátumok jellemzése és meghatározása az ilyenkor szokásos eljárás szerint történt. A telepmorfológiát DSM1 táptalajon határoztuk meg, a mikroszkópikus tipizálást fénymikroszkóppal végeztük, ahol a baktériumok dimenzióit kalibrált okulárral határoztuk meg. A törzsek mozgásra való képességét egy korábban leírt módszernek megfelelően határoztuk meg (Adler, 1966). A Gram festés Gerhardt és tsai. (1994) által leírt módszer szerint készült. A poly-ß-hidroxi butirát meghatározást mikroszkópos úton, Szudán fekete festéssel, míg az endospórák esetleges jelenlétét malahit zölddel történő festéssel vizsgáltuk.

- Enzimaktivitások vizsgálata

  A kataláz aktivitást 3%-os peroxid oldattal végeztük, az oxidáz aktivitást N,N,N,N-tetrametil-p-feniléndiaminon történő neveléssel vizsgáltuk.

- Növekedés – sótűrés - hőmérsékletfüggés

  A törzseket 0.5, 1 és 1.5 M NaCl tartalmú DSM1 táptalajon neveltük. Hasonló táptalajon neveltük a mikroorganizmusokat a hőmérséklet hatásának vizsgálatakor 4, 37, 40 és 45 ºC-on.

- Denitrifikációs aktivitás

  Gázképződés vizsgálata Durham csövekben 1 g $l^{-1}$ $KNO_3$ tartalmú DSM1 tápoldatban történt.

- Szénforrás analízis

  A kemolitotróf tápoldatot kiegészítettük az alábbi anyagokkal, úgy hogy a végkoncentrációjuk 2 g $l^{-1}$ legyen az adott oldatban. Felhasznált vegyületek: α-ketoglutarát, propionsav, L-alanin, L-arginin, kaprilsav, triptofán, etilén-glikol, propilén-glikol. A további asszimilációs és metabolit teszteket API 20NE kit (BioMerieux SA, Marcy, l'Etoile, France) felhasználásával végeztük el.

- A zsírsav és 16S RNS analízist a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelkulturen (DSMZ) laboratóriumában, Braunschweig-ben végezték el, standard eljárást alkalmazva.

- RAPD-PCR analízis

  A DNS izolálása és az RAPD-PCR analízis Szekeres és tsai. (2002) szerint történt.

*II.5. A kísérletekben alkalmazott izolátumok jellemzése*

Az izolátumok denitrifikációs aktivitását összehasonlítva, 3 izolátumot választottunk ki, figyelembe véve makroszkópikus és mikroszkópikus jellemzőiket is. 2 törzs az aktív iszap mintákból (a továbbiakban M2 és M3), egy törzs pedig a homokágyas reaktorból (A4) származott. Alkalmaztunk egy referencia törzset is (P11 - *Paracoccus denitrificans*), mely törzsgyűjteményből származott (DSMZ), és számos adat állt rendelkezésre róla a szakirodalomban.

***M2 izolátum***

- *Mikroszkópos kép*: Pálca alakú, 0,5-0,8 μm széles és 1,5-5 μm hosszú, Gram negatív, mozgó sejtek. Spóra nem látható.
- *Makroszkópikus jellemzés*: DSM1 táptalajon szabálytalan alakú, áttetsző, sárgás udvarú, telepek. Növekedésre 7-41 ˚C között képes.
- *Biokémiai jellemzés*: Pozitív reakciót adott a kataláz, oxidáz és aminopeptidáz reakció. Hidrogén jelenlétében teljes denitrifikációra képes. Negatív eredményeket adott az ureáz reakció, az indol termelés, az arginin dehidroláz, a β-galaktozidáz, a glükóz acidifikációs teszt és a zselatin hidrolízis.
- *Molekuláris biológiai analízis*: A 16S RNS szekvencia analízis és a zsírsav analízis alapján több, mint 99 %-os azonosságot mutatott az izolátum a *Pseudomonas stutzeri* törzzsel.

***A4 izolátum***

- *Mikroszkópos kép*: pálca alakú, 0,5-0,7 μm széles és 1,5-2 μm hosszú, Gramm negatív sejtek. Spóra nem látható.
- *Makroszkópikus jellemzés*: DSM 1 táptalajon szabályos kör alakú, tejfehér, nem áttetsző telepek. Növekedik 37 ˚C-on, azonban 7 és 41 ˚C -on nem képes szaporodni.
- *Biokémiai jellemzés*: pozitív eredményt adott a kataláz, oxidáz, ureáz és aminopeptidáz reakció, illetve $H_2S$ termelést figyeltünk meg. Hidrogén jelenlétében teljes denitrifikációra képes. Savképzést D-glükóz, D-fruktóz, D-xilóz, arabinóz, etanol, ramnóz és raffinóz jelenlétében történt.

  Negatív eredményeket adott az indol termelés, az arginin dehidroláz, a β-galaktozidáz és a glükóz acidifikációs teszt, illetve a zselatin, keményítő, kazein és eszkulin hidrolízis.
- *Molekuláris biológiai analízis*: A 16S RNS szekvencia analízis alapján több, mint 99.5 %-os azonosságot mutatott az izolátum az *Ochrobactrum anthropi* törzzsel. A kapott zsírsav profil alapján megegyezik a típustörzzsel.

***M3 izolátum***

- *Mikroszkópos kép*: a törzs mikroszkópos képe megegyezett a P11 törzsével. rövid pálcák, 0,6-0,8 μm széles és 1,5-3 μm hosszú, Gram negatív, nem mozgó sejtek, általában egyesével vagy párban találhatóak.
- *Makroszkópikus jellemzés*: DSM1 táptalajon szabálytalan alakú, sárgás, kifejezett okkersárga központtal rendelkező telepeket képzett az izolátum.
- *Biokémiai jellemzés*: Az izolátum jellemzői megegyeztek a P11 izolátuméval, kivétel a triptofán teszt pozitív eredménye volt. Ez a törzs is kemolitotróf körülmények között szaporodik; hidrogén jelenlétében teljes denitrifikációra képes.
- *Molekuláris biológiai analízis*: A részleges 16S RNS szekvencia analízis alapján 100 %-os azonosságot mutatott az izolátum a *Paracoccus pantotrophus* törzzsel (illetve 97,8%-os hasonlóságot a *Paracoccus denitrificans* törzzsel). A kapott zsírsav profil egyezik a *Paracoccus* genusban találhatóval.

***P11 törzs-referenciatörzs***

- *Mikroszkópos kép*: rövid pálcák, 0,6-0,8 μm széles és 1,5-3 μm hosszú, Gram negatív, nem mozgó sejtek, általában egyesével vagy párban találhatóak. Spóra nem látható, viszont PHB (poli-béta-hidroxi butirát kristály) megfigyelhető.
- *Makroszkópikus jellemzés*: DSM1 táptalajon szabályos, apró, kör alakú, fehér nem áttetsző, kerettel rendelkező telepeket képez. Növekedésre 7-41 ˚C között képes.
- *Biokémiai jellemzés*: Kemolitotróf körülmények között szaporodik, hidrogén jelenlétében a teljes denitrifikációra képes. Pozitív reakciót adott a kataláz, oxidáz és aminopeptidáz teszt, illetve $H_2S$ termelésre képes. Negatív eredményt ad az indol termelés, az arginin dehidroláz, ureáz, β-galaktozidáz reakció, savtermelést nem mutat glükóz jelenlétében, a zselatin és eszkulin hidrolízise is negatív eredményt ad.
- *Molekuláris biológiai analízis*: A 16S RNS szekvencia analízis alapján 100 %-os azonosságot mutatott az izolátum a *Paracoccus denitrificans* törzzsel. A kapott zsírsav profil egyezik a típustörzsével.

# III. Biofilmképzés – Reaktor elrendezés

## *III.1. A hordozó és előkészítése*

A hordozóként alkalmazott granulált aktív szén paraméterei a következők voltak: 0.85-1.70 mm átmérőjű, gázkromatográfiás eljárásokban használt, nagy tisztaságú anyag (Chemviron Carbon, Belgium).

A mikroorganizmusok adszorbcióját granulált aktív szén hordozóra, minden esetben oszlop elrendezésű töltettel végeztük el a következő lépések szerint:

- A kísérletekben alkalmazott műanyag oszlopok átmérője 0.5, hosszuk 30 cm volt.
- Aktív szén minták előkészítése – az aktív szenet (mosás és tömegállandóságig történő szárítás után) ismert tömegben helyeztük az oszlopba. Az oszlopok bemeneti és kimeneti nyílását üveggyapottal zártuk. Az így elkészített oszlopokat autoklávban sterilizáltuk. A steril oszlopokon 5 térfogatnyi, kemolitotróf tápoldatot áramoltattunk át, hogy biztosítsuk a töltet nedvességét.

## *III.2. Biofilm 1. - Kitapadás vizsgálat*

- Biofilm A előállítása

  A starter kultúrákat kemolitotróf tápoldatban felvéve (100 ml tápoldat, baktériumkoncentráció: $10^5$ db sejt $ml^{-1}$) recirkuláltattunk az oszlopon, zárt rendszerben, nitrogén atmoszféra alatt, 0.5 ml $perc^{-1}$ sebességgel 48 órán keresztül. Az inkubáció elteltével friss, steril kemolitotróf tápoldatot áramoltattunk át az oszlopon, 1 ml $perc^{-1}$ sebességgel 96 órán át.

- Biofilm B előállítása

  Starter mikroorganizmus oltókultúrákkal oltottunk le szerves szénforrással dúsított (1 g $l^{-1}$ Na-acetát) kemolitotróf tápoldatot (100 ml tápoldat, baktérium szám: $10^5$ db sejt $ml^{-1}$), majd ezt a szuszpenziót recirkuláltattuk az oszlopon 48 órán keresztül, 0.5 ml $perc^{-1}$ sebesség mellett, nitrogén atmoszféra alatt. Ezt követően 96 órán keresztül friss, steril tápoldatot áramoltattunk az oszlopon át 1 ml $perc^{-1}$ sebességgel.

- Biofilm C előállítása

  A 24 óráig, aerob tenyésztési körülmények között, DSM1 tápoldatban nevelt mikroorganizmus törzseket kemolitotróf tápoldatba helyezve (100 ml tápoldat, baktérium koncentráció: $10^8$-$10^9$ db sejt $ml^{-1}$) recirkuláltattuk az oszlopon, 1 ml $perc^{-1}$ sebességgel.

  A kísérlet kivitelezése során a tároló edényben lévő szuszpenziót folyamatosan kevertettük a homogenitás megőrzése végett. A mintavétel óránként történt, 1 ml mintát vettünk a

tároló edényben lévő baktérium-szuszpenzióból, melynek denzitását fotometriás úton határoztuk meg 660 nm-es hullámhosszon.

- A kísérlet lezárása – a kísérlet időtartalmának végeztével az oszlopon 5 oszloptérfogatnyi (150 ml) steril kemolitotróf tápoldatot folyattunk át, hogy eltávolítsuk a nem kötött baktériumokat.
- Mintavétel az oszlopokból: a műanyag oszlopokat felvágva, annak különböző szegmenseiből töltetet gyűjtöttünk steril körülmények között későbbi analízis céljából.

*III.3. Biofilm 2. – Kitapadás vizsgálat előkezelt granulált aktív szén hordozón*

- ***Előkezelés M2 izolátummal***

  A Biofilm C képzési módnak megfelelően, M2 izolátummal kezeltük az aktív szénnel töltött oszlopokat. Az inkubációs idő letelte és a mosási fázis után steril levegő átfúvásával 24 órán át szárítottuk a töltetet az oszlopban, 30 ˚C -on. Az így előkezelt oszloptöltetekkel az "C" módszer szerint jártunk el a továbbiakban.
- Előkezelés kitozánnal

  Szilárd kitozánból törzsoldatot készítettünk, úgy hogy 1% ecetsav tartalmú desztillált vízben oldottunk fel 1 g kitozánt. A kísérletek során a kitozán oldat koncentrációját 5 mg $l^{-1}$ koncentrációra hígítottuk. A kontroll kísérletekben a megfelelő ecetsav koncentrációt alkalmaztuk. A már hígított szuszpenzió minden mililiteréhez 0.2 g GAC-ot raktunk, majd lassú keverés mellett 24 órán át inkubáltuk 25 ˚C-on a hordozót. Az inkubáció leteltével a kiülepedett hordozót 25 ˚C-on szárítottuk súlyállandóságig.

III.4. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítése GAC hordozón lévő biofilmről

Az előkészítés során a mintákat lépcsőzetesen víztelenítettük emelkedő koncentrációjú etanol oldatban (20, 40, 60, 80 és 100% etanol, 30 perces inkubálás), majd ezt emelkedő aceton koncentrációjú aceton-etanol oldattal (20, 40, 60, 80 és 100 % aceton) folytattuk. A tiszta acetonban felvett mintákat kritikus pont szárítással kezeltük tovább, majd 30-50 nm vastag arany réteget alkalmazva készítettük a fotókat HITACHI S-2400 típusú pásztázó elektronmikroszkóppal a Szegedi Tudományegyetem Növénytani tanszékén.

*III.5. A biofilmképzés során kapott granulált aktív szén minták kezelése*

A minták kezelése az alábbiak szerint zajlott:

- Denitrifikációs aktivitás mérése – $C_2H_2$ gátlási módszer
- Fehérje és poliszaharid mennyiségi meghatározás
- Száraz tömeg mérése

III.5.1. Denitrifikációs aktivitás mérése

Az oszlopokból nyert mintákat az (0.3-0.7 g) 10 ml-es, gumidugóval zárható üvegedényekbe tettük, majd 3 ml kemolitotróf tápoldatot helyeztünk rájuk, amely tápoldat 26 mg $l^{-1}$ $NO_3$-N – tal és 0.2 % ecetsavval egészítettünk ki (pH 7-re állítva). A baktériumflóra szaporodását elkerülendő kloramfenikolt alkalmaztunk (1.2 mg $l^{-1}$) (Aragno és Schlegel, 1992). A reakcióedényeket $N_2$ gázzal oxigén-mentesítettük, majd acetilént fecskendeztünk az edények gázterébe10 tf % végkoncentrációra számítva. A kultúrákat 25 ˚C-on inkubáltuk lassú rázatás mellett. Az inkubálás leteltével vizsgáltuk a minták gázterének $N_2O$ tartalmát 0.1 ml minta gázkromatográfiás analízisével.

A minták totál $N_2O$ tartalmát az un. Bunsen adszorpciós állandó alkalmazásával számítottuk ki, az alábbiak szerint:

$$M = C_g (V_g + V_l \alpha)$$

Ahol $C_g$ a $N_2O$ gáz koncentrációja a gáz fázisban, $V_g$ a gázfázis térfogata, $V_l$ a folyadák fázis térfogata és az α a Bunsen abszorpciós koefficiens, mely $N_2O$ gáz esetében 25 ˚C-on 0.544 (Wilhelm és tsai., 1977). A denitrifikációs aktivitást mg $N_2O$-N $gramm^{-1}$ GAC-ra vonatkozóan adtuk meg

III.5.2. Fehérje meghatározás

A minták minden grammjához (0.2-0.5 g nedves tömeg) 1 ml 1 N NaOH-t adtunk, majd lezárva a 10 ml-es üveg reakcióedényeket, 60 ˚C-os vízfürdőben 2 órán át inkubáltuk a mintákat. A mintákat 10 percig ultrahangos fürdőben homogenizáltuk tovább, majd a folyadékfázist centrifugálással (15 perc, 13 000 rpm) megtisztítottuk a törmeléktől.

A minták fehérjetartalmát Lowry és tsai. (1951) módszere szerint végeztük el. A kalibrációt bovine serum albumin (BSA) hígítási sorozattal végeztük el. Az eredményeket mg fehérje $gramm^{-1}$ GAC hordozóra vonatkozóan adtuk meg.

III.5.3. Poliszaharid meghatározás

A minták minden grammjához 1 ml 0.01 M EDTA oldatot adtunk. 30 perc inkubálás után (250 rpm) rázatás mellett 60 ˚C-os vízfürdőben) a mintákból centrifugálással eltávolítottuk a törmeléket, majd az össz poliszaharid tartalmat fenol-kénsav módszerrel analizáltuk (Dubois és tsai., 1956). A kapott eredményeket mg glükóz egyenértékben adtuk meg, 1 gramm GAC-ra vonatkozóan.

III.5.4. Tömegmérés

A GAC mintákat (0.3-0.7 g) tömegállandóságig szárítottuk (105 ˚C, 3 óra), majd analitikai mérleggel meghatároztuk a tömegüket.

III.5.5. $N_2O$ meghatározás gázkromatográffal

Az alkalmazott gázkromatográfiás készülék (GOW-MAC Inst. Co.Terrance, CA, USA) hővezetőképesség detektorral volt felszerelve. Az alkalmazott oszlop Porapak Q (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) volt. A detektor hőmérséklete 50 ˚C volt, míg az alkalmazott vivőgáz (hélium) áramlási sebessége 25 ml $perc^{-1}$ volt. Az adatok kiértékelését Hewlett Packard 3390A integrátorral végeztük. Az eredményeket 1 gramm GAC-ra vonatkozóan adtuk meg.

III.5.6. Populációdinamikai vizsgálatok

Párhuzamosan 6 reaktort elindítva és a biofilmképzést elvégezve (“C”), közvetlen a telepítés után, majd 3 és 6 hét üzemi periódust követően leállítottunk 2-2 oszlopot, majd a hordozót kíméletesen eltávolítottuk, úgy hogy 3 cm töltet képzett egy mintát. A minták 1 g-ját 0.85% NaCl és 0.01 % (tf) Tween 80 tartalmú oldat 10 ml-ében inkubáltuk, erőteljes keverés mellett. A szuszpenziót úgy hígítottuk, hogy egyéni telepeket kapjunk DSM1 táptalajra szélesztve. A telepek azonosítása telepmorfológia és RAPD analízis alapján történt (Szekeres és tsai. 2002).

## *IV. Reaktorüzemeltetés - üzemi körülmények meghatározása.*

IV.1. Általános ismertetés

Az alkalmazott reaktor-elrendezéseket a következőképpen neveztük el, illetve jelöltük:

EC+BR reaktor: a biológiai reaktor fizikailag el van különítve a hidrogéntermeléstől, az elektrokémiai cella katódterétől (*E*lectro*C*hemical+*B*iological *R*eactor);

ECBR reaktor: a biológiai reaktor a katódtérben helyezkedik el.

A reaktorok fizikai paraméterei az alábbiak voltak:

| | EC+BR | ECBR |
|---|---|---|
| Teljes térfogat (ml) | 550 | 60 |
| Töltet mennyisége (gramm GAC) | 370 | 35 |

A reaktorra felmenő, influens oldat összetétele a következő volt:

| | |
|---|---|
| $NO_3$-N | 23 mg |
| $KH_2PO_4$ | 50.0 mg |
| $NaHCO_3$ | 50.0 mg |
| csapvíz | 1000.0 ml |

Ezt az oldatot általában 20 literes mennyiségekben készítettük el, nem steril körülmények között.

A reaktorok állandó 25 ˚C-os hőmérsékleten, temperált szobában helyezkedtek el, a tápoldat áramlását perisztaltikus pumpákkal oldottuk meg.

IV.2. Kísérletileg meghatározott paraméterek

Input oldal

- A reaktorra felmenő oldat, a továbbiakban *influens* komponenseinek koncentrációja.

  A komponensek közül a legfontosabb a nitrátion szintje volt. Konstans koncentrációt alkalmaztunk minden kísérletnél, a kiválasztott koncentráció igazodott az ivóvizek, illetve közepesen és alacsonyan szennyezett vizek tisztításával foglalkozó szakcikkekben leírtakhoz. A nitrát szint mellett állandó koncentrációban alkalmaztuk az egyéb tápanyag összetevőket is (*Anyagok és módszerek influens összetétel*).

- Áramerősség.

  A rendszerbe jutó hidrogén szintje az áramerősség függvénye. A kísérletek során változtatott mennyiségek közül ezt az értéket tudtuk a legpontosabban szabályozni.

- Áramlási sebesség.

  Napi gyakorisággal mértük a reaktorokról lejövő oldat térfogatát, amit ml $min^{-1}$ egységben adtunk meg. A mérést kivitelezése során 5 órán keresztül gyűjtöttük a lefolyó oldatot, térfogatát meghatároztuk, illetve ebből számítottuk az időegységre eső mennyiségeket.

Output oldal

- A reaktorról lejövő, továbbiakban *effluens* komponenseinek összetétele.

  Nitrát és nitrit koncentráció, határértékként a WHO által elfogadott szintet vettük alapul (1 mg $l^{-1}$ $NO_2$-N és 10 mg $l^{-1}$ $NO_3$-N). Ezenkívül mértük az effluens ammónia szintjét.

- Hidrogén koncentráció.

  A kísérleti elrendezések működtetése során a hidrogént, mint energia- és elektronforrást feleslegben alkalmaztuk, így feltétel volt az effluensben történő megjelenése.

- Egyéb paraméterek.

  Vizsgáltuk az effluens baktériumszámát és kémhatását.

## IV.3. Számított mennyiségek

Az input és output oldalon mért adatokból az alábbi mennyiségeket kaptuk a mért értékekből, számítások útján:

- Fogyott nitrogén mennyiség (N lost). Mértékegység: mg $l^{-1}$.
- Denitrifikációs aktivitás. Mértékegység: kg $NO_3$-N $m^{-3}$ $d^{-1}$.
- Tartózkodási idő (HRT – *H*ydaulic *R*etention *T*ime). Mértékegység: óra (h).
- Az alkalmazott árammennyiség felhasználásának effektivitása (η), (dimenzió nélküli mennyiség).

## IV.4. Mintavétel

A mintákat naponta gyűjtöttük. A tápoldat tartályából, az EC+BR reaktorok esetében az elektrokémiai cella után, és a reaktor után vettünk mintát. A minták térfogata 3-5 ml volt, ezeket általában azonnal analizáltuk, vagy tároltuk $^{-}$20 $^{\circ}$C-on további vizsgálatokhoz. A mintákat a korábbiakban leírtaknak megfelelően analizáltuk nitrát-, nitrit- és ammóniatartalomra kolorimetriás módszerrel.

## IV.5. Kolorimetriás nitrát-, nitrit- és ammónia meghatározás

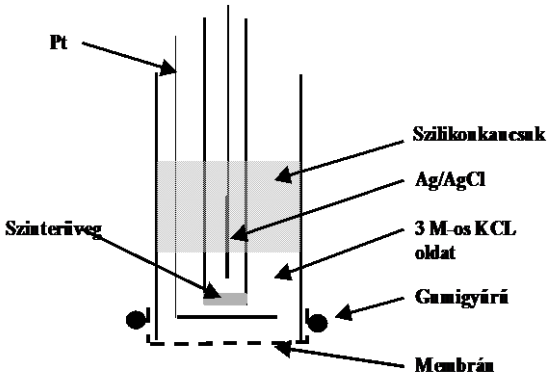
A nitrát koncentráció meghatározását a Cataldo (1975) által leírt módszer szerint végeztük el, kolorimetriás úton (Na-szalicilát reagens, 410 nm-en detektált származék). A nitritmeghatározást Snell (1949) szerint végeztük szintén kolorimetriás úton (szulfanilsavas eljárás, 560 nm-en detektált származékokkal). Az ammónia jelenlétét illetve mennyiségét Nessler módszere szerint detektáltuk (Fishbein, 1967).

*IV.6. A folyadékban oldott hidrogén mérésére szolgáló amperometriás módszer és mérőelrendezés*

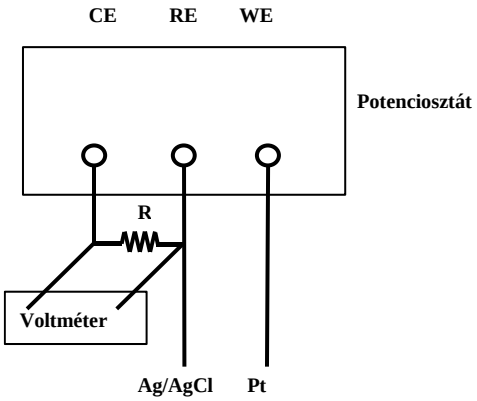
Kísérleteinkben egy oldott oxigén mérésére alkalmazott elektrokémiai módszert (Schill, 1994) módosítottunk céljainknak megfelelően.

Abban az esetben, ha egy oxigén elektród polarizációját megfordítjuk egy potenciosztát segítségével (azaz +600 mV lesz a beállított potenciálkülönbség a platina elektródon az Ag/AgCl referencia elektróddal szemben), a platina felszínén oxidáció játszódik le, mégpedig a közegben lévő $H_2$ oxidációja, ahol a kapott jel sztöchiometrikusan arányos lesz az oxidált hidrogén mennyiségével (Wang és tsai., 1971). Ez az eljárás azonban az eredeti, aranyból készült, átpolarizált oxigén elektródokkal alacsony érzékenységű volt.

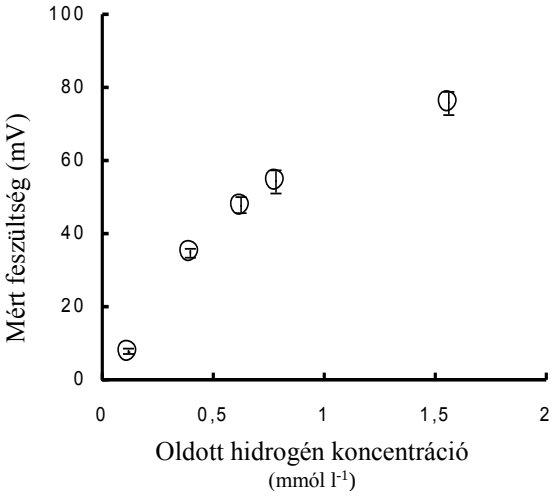
Az általunk épített mérőelektród (10. ábra) esetében azzal értünk el nagy érzékenységet, hogy a platina elektród felületét jelentősen megnöveltük, úgy hogy a lap vagy sima drót helyett az elkészített elektrokémiai cella tartalmazott egy spirális platina szálat (WE: working electrode), és egy $Ag^+$/AgCl referencia (RE) elektródot. A referencia elektród egy üvegcsőben helyezkedett el, amit porózus üvegmembránnal (szinterüveg) zártunk le. Ezt az üvegcsövet (a tulajdonképpeni referencia elektródot) helyeztük el egy nagyobb üveghengerben, a platina elektród társaságában. Az üvegcső alját polipropilén membránnal zártuk, melyet egy gumigyűrűvel rögzítettünk az üvegcsőre.




**10. ábra. Hidrogén mérésére alkalmazott elektród keresztmetszeti, sematikus képe**




**11. ábra. Hidrogén mérésére alkalmas elrendezés kapcsolás vázlata**
**CE: Ellenelektród, RE: referenciaelektród, WE: munkaeleketród, R: ellenállás**




**12. ábra. Hidrogén elektród kalibrációja**
$10^6$ Ohm-os ellenállás esetében kapott értékek platina elektródon, 25 ºC.

Az elektrokémiai cellát egy potenciosztáttal (Microstat Model 1503) kontrolláltuk, úgy hogy az alkalmazott potenciál +600 mV legyen (WE vs. RE). Mivel várhatóan a mérési tartományunk a $10^{-5}$ amper tartományba esett, ezért egy igen pontosan meghatározott $10^6$ Ohm-os ellenállást is be kellett iktatnunk. A potenciálesés mérését egy digitális pH mérővel végeztük, ahol 1 mV változás megfelelt 1 nA-nek (11. ábra).

Az elektród kalibrációja során kapott görbe a rendszer használhatóságáról tanúskodik az adott tartományban (12. ábra), melyről leolvasható, hogy a 0.6-0.8 mM oldott hidrogén koncentrációig a kapott jel (mV) egyenesen arányos a mért anyagmennyiséggel. Ez a tartomány jól fedi a várhatóan vízben oldott hidrogén gáz mennyiségét, hiszen a hidrogén maximális vízben oldható mennyisége 1 mM.

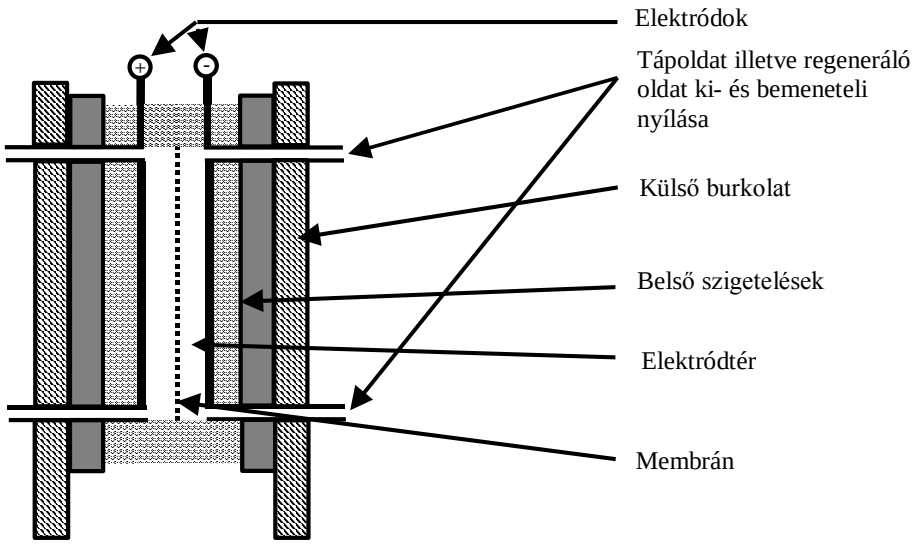
*IV. 7 Elektrokémiai alkalmazások – elektrokémiai cellák*

A kísérletek során alkalmazott elektrokémiai cellák fizikai paramétereit a 7. táblában foglaltuk össze, illetve a keresztmetszeti képüket a 13. ábrán mutatjuk be.

**7. tábla. Elektrokémiai cellák fizikai paraméterei**

| | | **ECBR** | **EC+BR** |
|---|---|---|---|
| Elektródok | Méret (cm) | 17 x 9 | 12 x 7 |
| | Felület ($cm^2$) | 153 | 84 |
| | | | |
| Katódtér | Méret (cm) | 14 x 7 x 0.6 | 9 x 5 x 0.3 |
| | Teljes térfogat ($cm^3$) | 60 | 13.5 |

**13. ábra. Az elektrokémiai cella keresztmetszeti képe**




Mindkét elrendezés (EC+BR, ECBR) esetében az anód 2 mm vastag platina borítású fémötvözet, míg a katódtérben 5 mm vastag szénelektród volt. Az anódtérben 0.1 N $H_2SO_4$-at recirkuláltattunk, a katódtéren keresztül folyt a reaktorok tápoldata. A két félcellát kationcserélő membrán választotta el. Az ioncserélő membrán szerepe a két rész fizikai elválasztása volt, másrészt az elektronok megfelelő irányú áramlását is biztosította.

IV.8. Elektrokémiai cellák karbantartása

Az EC+BR reaktorok esetében az áramerősséget 50-100 mA között változtattuk. A várható feszültség 6-15 V volt, függően az elektródfelületre kiváló csapadéktól. Abban az esetben, ha a kívánt áramerősségek előállításához szükséges feszültség meghaladta a 15 V-ot, a cellát lekapcsoltuk és 1 N HCl oldattal mostuk, majd desztillált vízzel eltávolítottuk a savmaradékot.

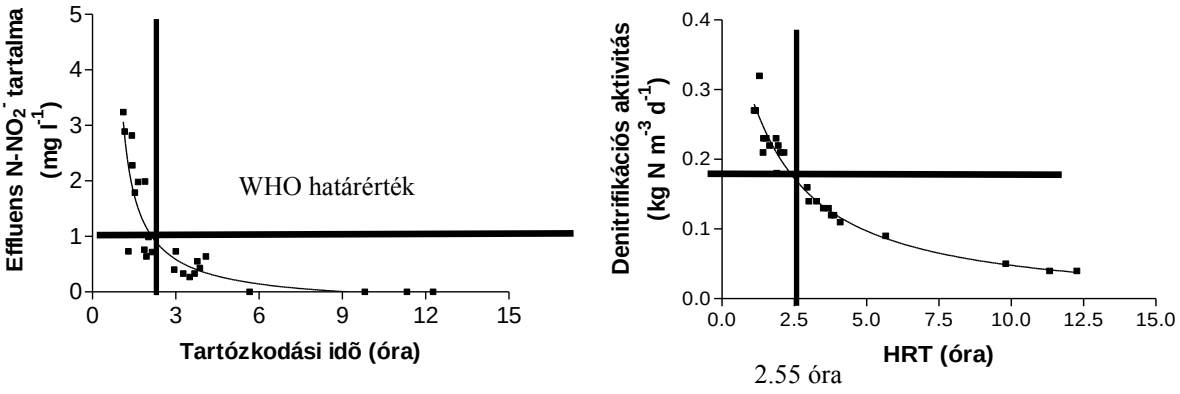
IV.9. Oszlopkészítés, egyéb reaktor paraméterek

A reaktorokkal foglakozó részben leírt EC+BR reaktorok paraméterei a következők szerint alakultak: egy 38.5 cm magas, 4.5 cm átmérőjű üvegcsövet megtöltöttünk 550 g granulált aktív szénnel, ahol a reaktor teljes térfogata ~600 $cm^3$ volt. Az ECBR reaktor esetében az emelt térfogatú katódtérbe (60 $cm^3$) 35 g GAC került.

IV.10. HRT és denitrifikációs aktivitás értékek meghatározása különböző áramerősségek esetében

Az adott áramerősség esetében alkalmazott tartózkodási idők függvényében ábrázoltuk az effluens nitrittartalmát, majd nem-lineáris regressziót alkalmazva görbét illesztetünk a pontokra (14. ábra). A konkrét példa szerint: a kapott görbe egyenlete alapján kiszámítottuk, hogy mely HRT értéknél teljesíti az egészségügyi szabvány értékét. Az így kapott HRT (2.55 óra) értékeken megvizsgáltuk, mennyi az adott reaktor denitrifikációs aktivitása (0.181 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$). A számítások elvégzéséhez GraphPad Prism programot használtunk.

**14. ábra. HRT és denitrifikációs aktivitás értékének számítása konstans áramerősség esetén**




*IV.11. Alkalmazott egyéb statisztikai módszerek, számítógépes programok*

Az egyéb statisztikai értékelésekhez Student t tesztet használtunk, szignifikánsnak tekintettük a változásokat, ha P értéke kisebb volt, mint 0,05. A felhasznált programok Windows Office 98 csomag tagjai voltak.

# Eredmények bemutatása

## *I. Biofilmképzés eredményeinek bemutatása*

A felületi sejtrögzítésen alapuló rendszerekben történő biológiai denitrifikáció során a szilárd hordozóra kötődött biofilmben játszódnak le a jellemző folyamatok. Az itt bemutatandó rendszerekben granulált aktív szén hordozót alkalmaztunk, amin három, általunk izolált (M3, M2, A4), és egy referencia törzzsel (P11 – *Paracoccus denitrificans*) képeztünk biofilmet. A szakirodalomi adatok szerint a granulált aktív szén széles körben elterjedt, mint inert és szilárd hordozó, amit egyrészt baktériumszűrő, másrészt magas adszorbciós képességének köszönhet (Okochi és tsai., 1997, Mason és tsai., 2000). A denitrifikáció területén, biofilm hordozóként történő felhasználásról azonban kevés adat állt rendelkezésre. Ezért a reaktorok megépítése előtt célszerű volt elvégezni olyan kísérleteket, melyek a biofilmképzés optimalizálását célozták.

### *I.1. Biofilmképzés GAC felszínen, oszlop elrendezésben*

*A biofilmképzés során a baktériumoknak megfelelő körülményeket kell biztosítani a felületi adszorbcióhoz és a szaporodáshoz. A következő eljárásokat alkalmaztuk, mindegyik esetben oszlop elrendezést alakítva ki:*

- Biofilm A módszer.

  Az első módszer az üzemi körülmények alkalmazásán alapult. Mivel a reaktorokban lévő baktériumokat anaerob, kemolitotróf körülmények között kívántuk felhasználni, a biofilmképzés a tesztoszlopokon is hasonló feltételek mellett történt.
- Biofilm B módszer.

  Ebben az esetben a biofilmképzés anaerob, de heterotróf körülmények között zajlott le. Célunk a magas biomassza mennyiség elérése volt, ezért a mikroorganizmus kultúrák szaporodásához szerves szénforrást biztosítottunk.
- Biofilm C módszer.

  Az előző két esettel szemben itt nem volt célunk a stabil biofilm kialakítása, ezért kihasználva a GAC szűrő és adszorbeáló tulajdonságát, a biofilmképzés első szakaszát, a *bakteriális adhéziót* valósítottuk meg. További eltérés, hogy az előzőekhez képest magas kiindulási sejtkoncentrációkat alkalmaztunk, biztosítandó a biokatalizátor várt aktivitásához szükséges baktérium szintet.

*I.2. Biofilmképzési módszerek összehasonlítása*

A telepített biofilmek esetében összehasonlítottuk az oszlopok különböző magasságaiból vett minták fehérje és poliszaharid tartalmát (15/1. ábra). Megvizsgáltuk a granulált aktív szén felületén kialakult biofilmek denitrifikáló aktivitását közvetlenül a biofilmképzési periódus befejezése után, majd 6 hetes üzemelést követően, mely anaerob, kemolitotróf körülmények között történt (15/2. ábra).

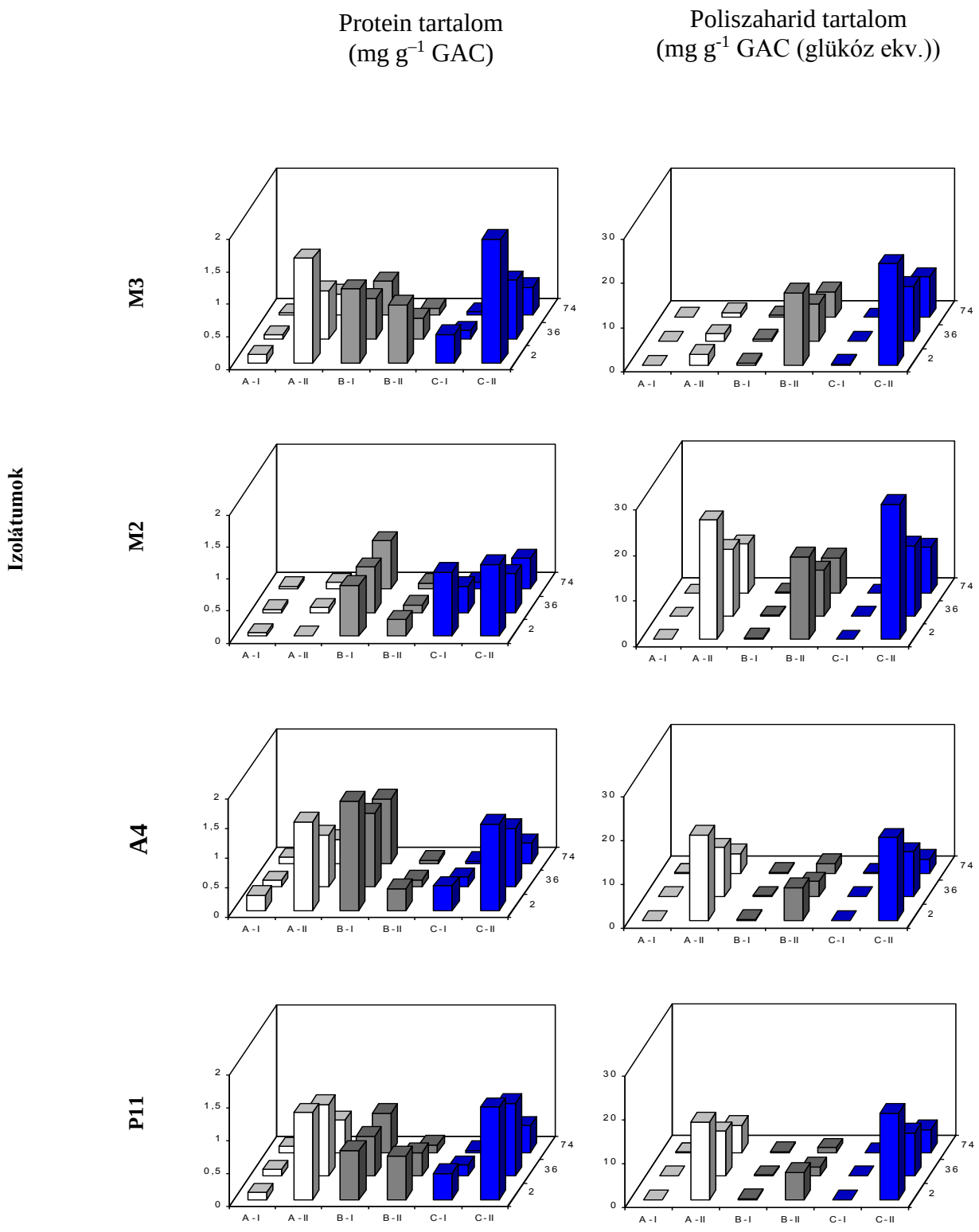
A biofilmek aktivitása és a biofilmekben lévő baktériumok mennyisége arányos *a hordozó felületén kötött fehérje* mennyiségével. Az "A" és "C" módszer esetében a biofilmképzési szakasz után közvetlenül vett minták fehérjetartalma ugyan alacsony volt (0.1-0.5 mg $g^{-1}$ GAC), azonban ez jelentősen megnövekedett az üzemi periódus alatt az M3, A4 és P11örzsek esetében (1.2-1.8 mg $g^{-1}$ GAC). Az M2 törzsnél számottevő növekedést nem tapasztaltunk, sőt az üzemi periódus után még csökkent is az egységnyi hordozóra eső fehérje mennyisége.

A "B" módszer esetében magas kiindulási értékeket kaptunk (az "A" és "C" módszernél 2-6-szor magasabb: 1-2 mg $g^{-1}$ GAC), majd az üzemi periódus alatt ezek jelentősen csökkentek (0.3-0.7 mg $g^{-1}$ GAC). Ez arra utal, hogy a "B" módszer esetében a felszaporodott mikroorganizmusok jelentős része nem képez biofilmet, csak laza ko-aggregációs kapcsolattal csatlakozik a hordozóhoz.

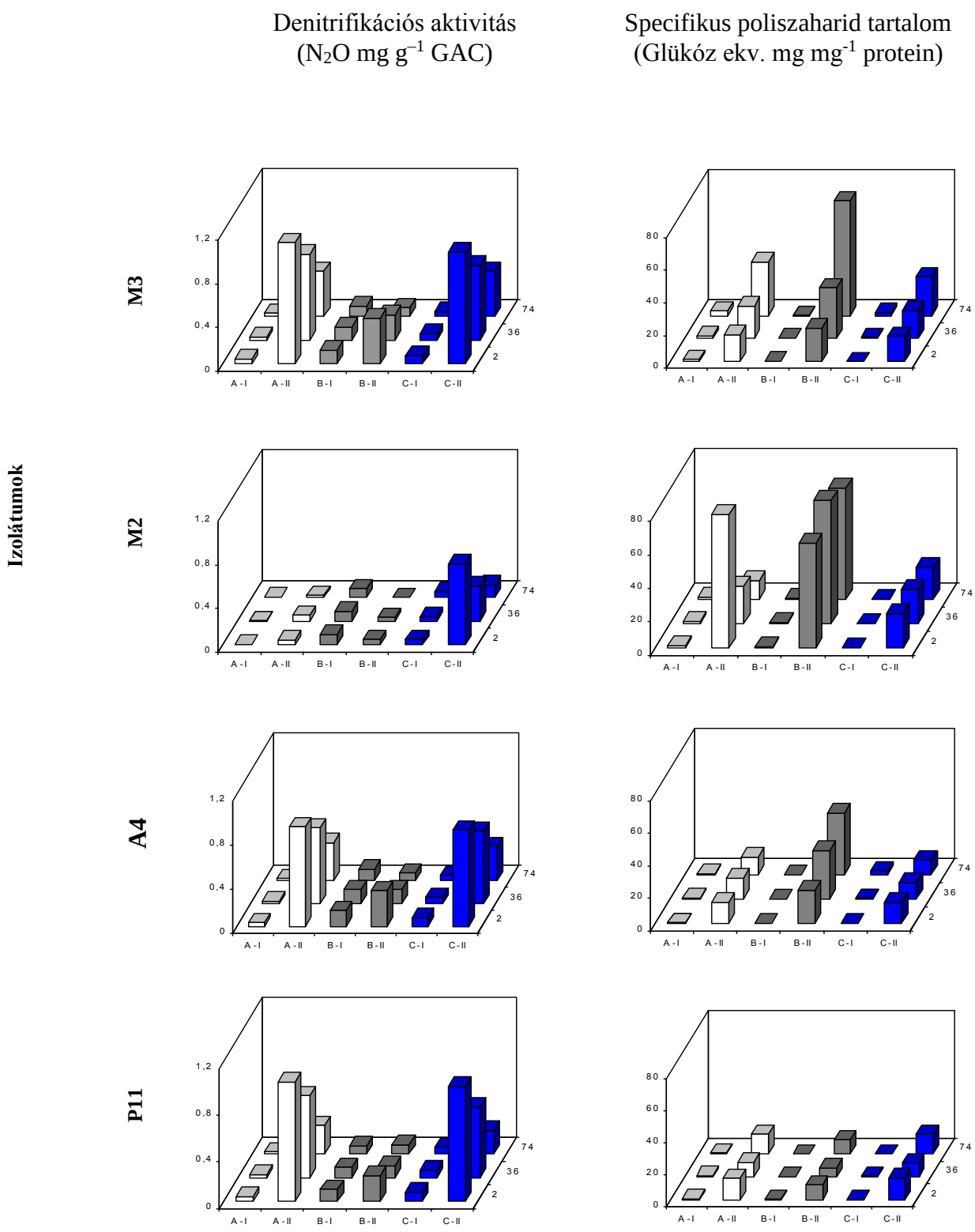
A biofilmek minőségét, stabilitását meghatározza az azt alkotó mikroorganizmusok által termelt *extracelluláris poliszaharidok* mennyisége is. Ennek alakulása a különböző izolátumok esetében, a három telepítési módszer esetében hasonlóan alakult (<0.5 mg $g^{-1}$ GAC), és az üzemi periódus után minden esetben jelentősen megnövekedett az egységnyi hordozóra eső poliszaharid mennyisége (>10 mg $g^{-1}$ GAC). Az üzemi periódus utáni legmagasabb poliszaharid termelést az M2 törzsnél tapasztaltunk mindhárom telepítési módszer esetében.

A hordozón lévő *poliszaharid- és fehérjemennyiségek aránya* jellemző a biomassza extracelluláris poliszaharid termelő képességére. A telepítést követően minden izolátum esetében az "A" módszer esetében találtuk a legmagasabb poliszaharid:fehérje arányokat. Az üzemi periódus után mindegyik telepítési eljárás esetében emelkedett az egységnyi biomasszára eső poliszaharid mennyisége.

A reaktorok teljesítménye szempontjából a *hordozó egységnyi tömegegységére eső denitrifikációs aktivitást* érdemes megvizsgálni. Az M3, A4 izolátum és a P11 referencia törzs esetében azt tapasztaltuk, hogy az "A" és "C" képzési eljárás esetében (viszonylag alacsony kezdeti aktivitásokkal ~0.04 mg $N_2O$ $g^{-1}$ GAC), a hathetes üzemeltetés után magas aktivitási értékek voltak mérhetőek (~1 mg $N_2O$ $g^{-1}$ GAC). Az M2 törzs esetében az "A" eljárás és az




**15/1. ábra. Biofilmképzés GAC hordozón különböző izolátumokkal és módszerekkel, a kísérleti elrendezés három magasságában.**
A-I: Biofilm "A" képzés után, A-II: Biofilm "A" üzemi periódus után (fehér oszlop)
B-I: Biofilm "B" képzés után, B-II: Biofilm "B" üzemi periódus után (szürke oszlop)
C-I: Biofilm "C" képzés után, C-II: Biofilm "C" üzemi periódus után (kék oszlop)
Az oszlopmagasságokat a Z tengelyen, cm-ben adtuk meg.




**15/2. Ábra. Biofilmképzés GAC hordozón különböző izolátumokkal és módszerekkel, a kísérleti elrendezés három magasságában.**
A-I: Biofilm "A" képzés után, A-II: Biofilm "A" üzemi periódus után (fehér oszlop)
B-I: Biofilm "B" képzés után, B-II: Biofilm "B" üzemi periódus után (szürke oszlop)
C-I: Biofilm "C" képzés után, C-V: Biofilm "C" üzemi periódus után (kék oszlop)
Az oszlopmagasságokat a Z tengelyen, cm-ben adjuk meg.

üzemi periódusok befejezése után is igen alacsony értékeket kaptunk (~0.04 mg $N_2O$ $g^{-1}$ GAC), ami arra utal, hogy ez az izolátum nem kedveli a kemolitotróf, anaerob körülményeket.

A "B" eljárás esetében, minden izolátum esetében az aktivitás a biofilmképzés után magas értékeket mutatott (~0.2 mg $N_2O$ $g^{-1}$ GAC), azonban az üzemi periódus után az aktivitás értékek elmaradtak a másik két módszer esetében tapasztalttól, ami egyértelműen a biofilm pusztulására utal.

A fehérje és poliszaharid szintek, valamint a denitrifikációs aktivitások mellett érdemes összehasonlítani a különböző típusú telepítések időigényét. Az "A" és "B" módszer esetében 6 napos (48+96 óra) anaerob körülmények közötti inkubáció után vizsgáltuk a jellemző paramétereket, míg a "C" módszernél mindez 24 órát vett igénybe, ami a gyakorlati alkalmazásnál előnyt jelenthet.

*I.3. A kialakult biofilmek térbeli eloszlása oszlop elrendezésben*

Mivel a biofilmképzést oszlop elrendezésben végeztük el, így a mikroorganizmusok (biomassza) térbeli elhelyezkedését is figyelemmel kísérhettük a hordozó fehérjetartalmának mennyiségének meghatározásával. Az üzemi periódus megkezdése előtt az "A" és "B" módszer esetében a hordozó fehérje tartalma közel egyenletesnek mutatkozott, míg a "C" módszernél az oszlop első szakaszában tapasztaltunk magas fehérje értékeket. Ezt azzal magyarázzuk, hogy míg az "A" és "B" módszer esetében a mikroorganizmusok a hosszú inkubációs idő alatt szaporodni is képesek voltak, addig az "C" módszer esetében a hordozó GAC szűrő tulajdonságát használtuk ki, ahol az oszlop elrendezés első szakasza kötötte meg a mikroorganizmusok jelentős részét.

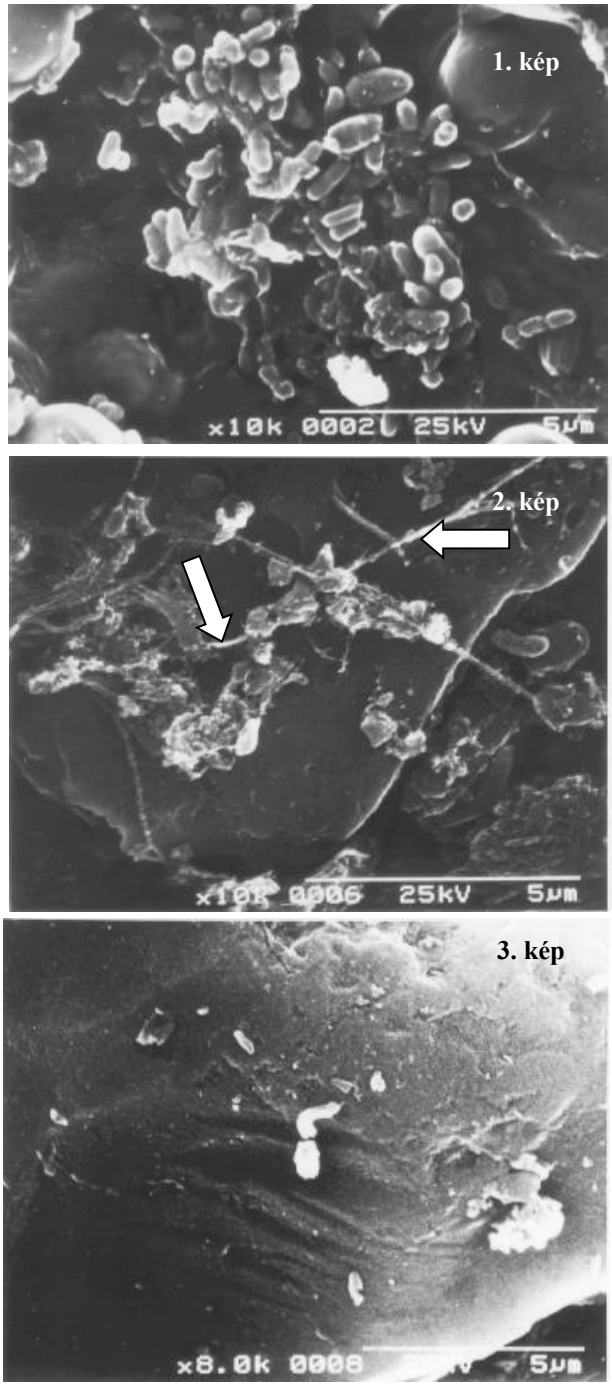
A bemutatott eredmények alapján a "C" módszert találtuk a legelőnyösebbnek, így a későbbiekben ezt a módszert vizsgáltuk és fejlesztettük tovább.

*I.4. A Biofilm C módszer részletes vizsgálata*

*I.4.1. A biofilmképzés fázisai*

Megvizsgáltuk a biofilm kialakulásának különböző szakaszait pásztázó elektron-mikroszkópos módszerrel. A szakirodalmi adatok szerint a biofilm képzés fő szakaszai a mikroorganizmusok kitapadása a hordozóra, a mikrobiális ko-agregátumok kialakulása és a stabil biofilm kialakulása, melyet egy dinamikus egyensúly jellemez (Scott és tsai., 1995, Bos és tsai., 1999).

A felvételek tanulsága szerint (16. ábra) az általunk alkalmazott törzsek esetében is hasonló fázisokat különíthetünk el, ahol az első lépés a mikroorganizmusok adszorbciója a hordozó felületére. Az 1. képen jól láthatóak a kitapadt baktériumok, melyek között még nem figyelhető meg kapcsolat. Az üzemi körülmények között működő reaktorból vett 3 napos minták esetében már láthatóak ún. hálószerű képződmények, melyek valószínűleg bakteriális eredetű extracelluláris poliszaharid eredetű képletek (2. kép nyilak). Hosszabb idő elteltével (>1 hét üzemi körülmények között) a biofilm teljesen homogén képet ad, a tömör extracelluláris mátrixnak köszönhetően (3. kép).




**16. ábra. A biofilm kialakulás lépései**
**Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek, melyeken M3 törzs által képzett biofilm látható, "C" módszerrel, üzemi körülmények között inkubálva.**

*I.4.2. A "C" módszer további vizsgálata és optimalizálása*

A továbbiakban célunk a minél nagyobb kötött biomassza mennyiség elérése volt a hordozó felületén, mivel az eddigi eredmények arra utaltak, hogy a magasabb fehérje tartalom nagyobb aktivitást jelentett.

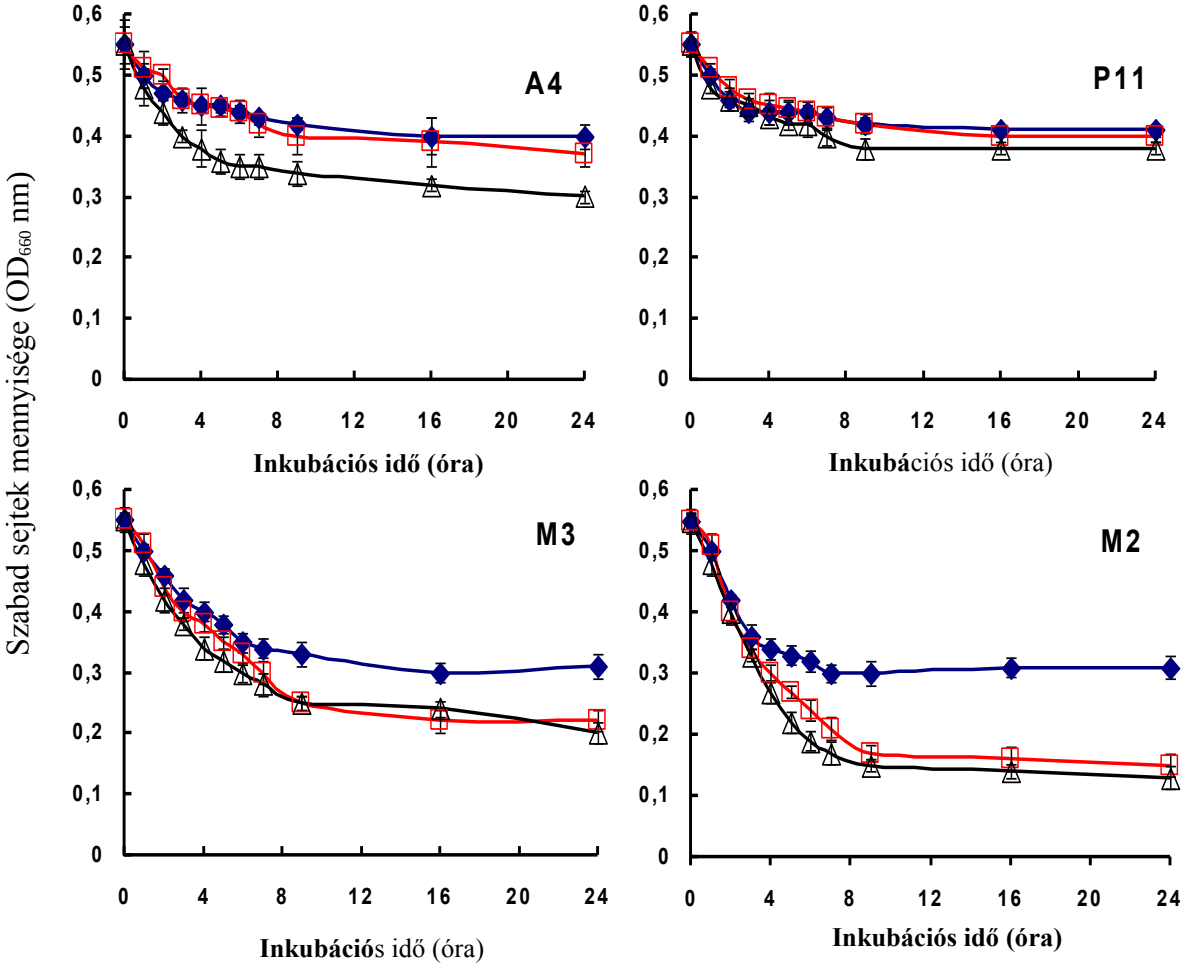
- A kitűzött cél megvalósításához először a felületi adhézió pH függését akartuk meghatározni, mivel a mikroorganizmusok felületi adhézióját jelentősen befolyásoló paraméter a közeg hidrogén ion koncentrációja (Freeman és Lilly, 1998).
- Ezután annak a lehetőségét vizsgáltuk, hogy hogyan lehet a hordozó felületi adszorbciós kapacitását növelni felületmódosító előkezelést alkalmazva.

Itt két kiindulási koncepciónk volt: az első szerint kevert mikroorganizmus populációk esetében magasabb kitapadt biomasszát kapunk. Arra alapoztuk ezt a hipotézist, hogy a mikroorganizmusok között kialakuló kapcsolatokat általában olyan kölcsönhatások alakítják, melyekben egyes, extracelluláris poliszaharidok is fontos szerepet játszanak (Vijayan és Chandra, 1999). Mivel az M2 izolátum viszonylag magas poliszaharid termelő aktivitást mutatott a biofilmképzés során, ezért feltételezhető volt, hogy elősegítheti más, magasabb denitrifikációs aktivitású törzsek kitapadását, mikrobiális ko-aggregátumok létrehozását.

A másik előkezelési módszer esetében a granulált aktív szén felületét kezeltük olyan anyaggal, mely elősegíti a baktériumok kitapadását. A kísérletek során kitozánt alkalmaztuk, mely vízoldható deacetilált formája a természetes eredetű kitin poliszaharidnak, amelyet mikrokarrierként is alkalmaznak sejttenyészetek esetében (Gemeiner és tsai., 1994), tehát bizonyítottan képes sejtekkel kapcsolatot létrehozni.

*I.4.2.1 A pH hatása az adhézióra*

A környezet kémhatása jelentősen befolyásolta a GAC felszínére történő mikrobiális kitapadást. Szakirodalmi adatok is alátámasztják, hogy a biofilmképzés kezdeti szakasza függ a külső körülményektől (Bos és tsai., 1999), ami egyértelműen megmutatkozott az M2, M3 és A4 törzsnél, míg a P11 törzsnél nem tapasztaltunk ilyen hatást. Jellemző módon, mindhárom törzs esetében a magasabb pH értékek kedveztek a mikroorganizmusok adszorbciójának (17. ábra).



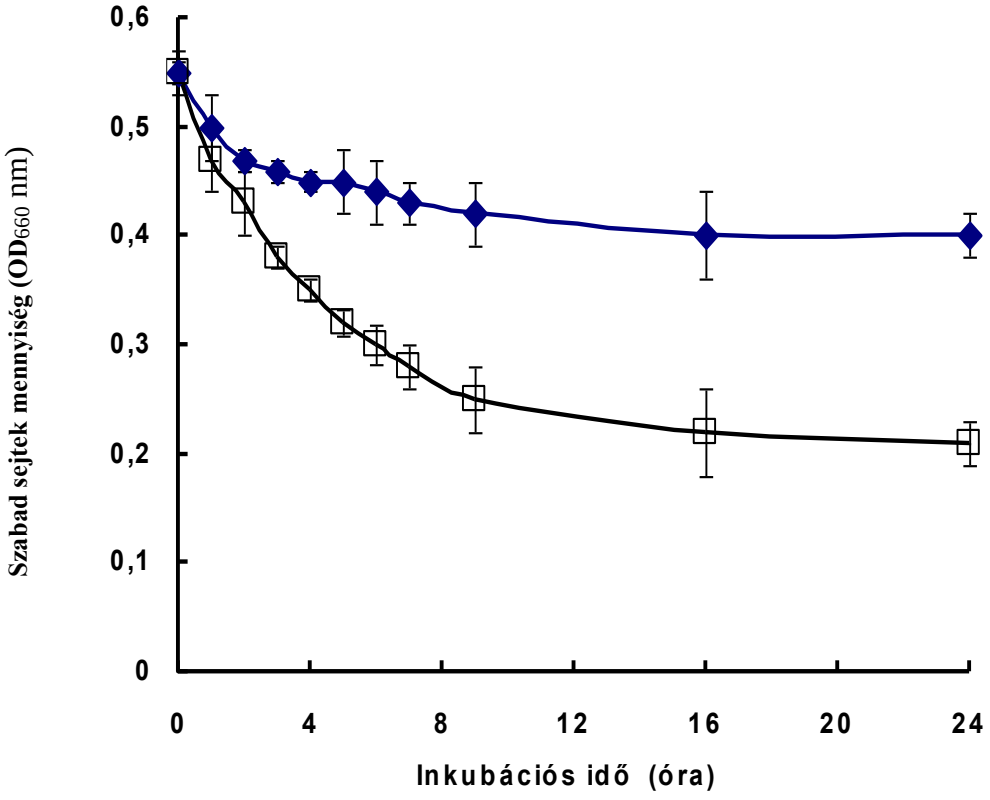

**17. ábra. Izolátumok kitapadásának pH függése GAC hordozón**

Az alkalmazott kémhatások és jelölésük a következő: pH 4.5: ♦; pH 7.0: □ , pH 8.4: -Δ -.

*I.4.2.2 Az M2 törzs hatása az adhézióra*

Mint látható volt a korábbiakban, az M2 törzs magas poliszaharid termelő aktivitásokkal rendelkezett az alkalmazott biofilmképzési módszerek esetében. Az extracelluláris poliszaharidok szerepének ismeretében a biofilmképzésében és a törzsre vonatkozó kísérleti tapasztalatok alapján megvizsgáltuk, hogy a törzs alkalmazásával növelhető-e a hordozó baktériumkötő kapacitása. Így a továbbiakban az M3, A4 és P11 törzsek adhézióját vizsgáltuk M2 izolátummal előkezelt GAC hordozón. A három vizsgált törzs esetében az A4 törzsnél tapasztaltunk magasabb kikötődést, a kontroll, M2 törzzsel nem kezelt GAC hordozó hoz képest. A kapott eredmények arra utalnak, hogy az M2 törzs elősegíti a mikrobiális ko-aggregációt az A4 izolátummal, így alkalmazásával emelhető a töltet aktivitása (18. ábra).

Az M2 törzs kedvező hatása arra utalt, hogy a későbbiekben kialakítandó reaktorok esetében fontolóra kell venni a kevert mikrobiális populációk alkalmazását magasabb aktivitású biofilmek elérésének érdekében.

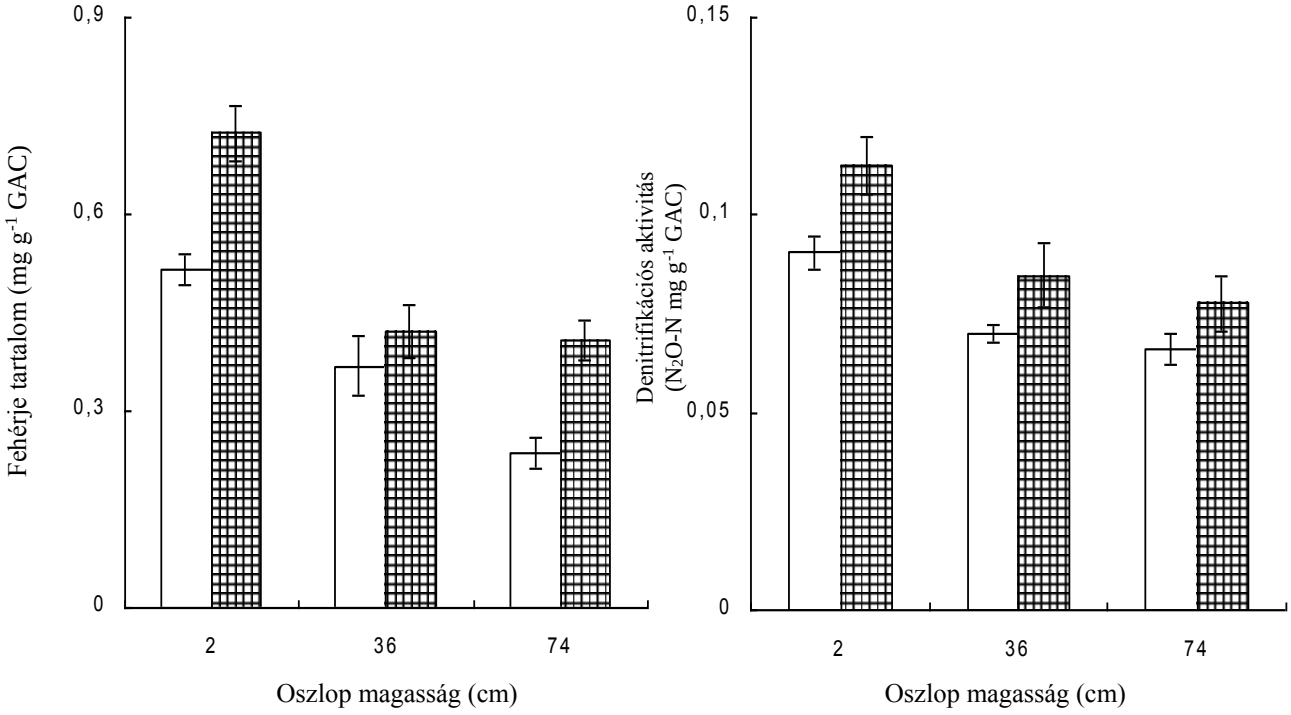



18. ábra. A4 törzs ad**héziója M2 törzzsel előkezelt GAC hordozón**
Az M2 törzzsel előkezelt GAC-on kapott adszorbciós görbe (pH7): □ ,
a kontroll, kezeletlen hordozón kapott adszorbciós görbe: ♦.

*I.4.2.3 A kitozán hatása a biofilmképzésre*

A kitozán, mely a kitinhez hasonlóan baktériumkötő tulajdonsággal rendelkezik, olyan specifikus lektinekkel képes kialakítani kötést, melyek a baktériumok felszínén fordulhatnak elő (Gildemeister és tsai., 1994). Ez a tulajdonsága felhasználhatóvá teszi mikroorganizmusok immobilizálásra, hordozók felületi kapacitásának emelésére.

Az alkalmazott felületkezelés, melynek során a szolubilizált kitozán oldatban előinkubáltuk a hordozót, emelte a kikötődött baktériumok mennyiségét, de csak az A4 törzs esetében (19. ábra), míg az M2, M3 és P11 törzsek esetében nem tapasztaltunk eltérést.




**19. ábra. A4 törzs adhéziója kitozánnal előkezelt hordozóra**
Az oszlop elrendezésben kapott protein és denitrifikációs aktivitásokat ábrázoltuk. Kontrollként a kitozán oldószerében (1% ecetsav) előkezelt GAC-ot alkalmaztunk (üres oszlop: kontroll GAC-on kapott eredmények, kockás oszlop: kitozánnal kezelt GAC**.**

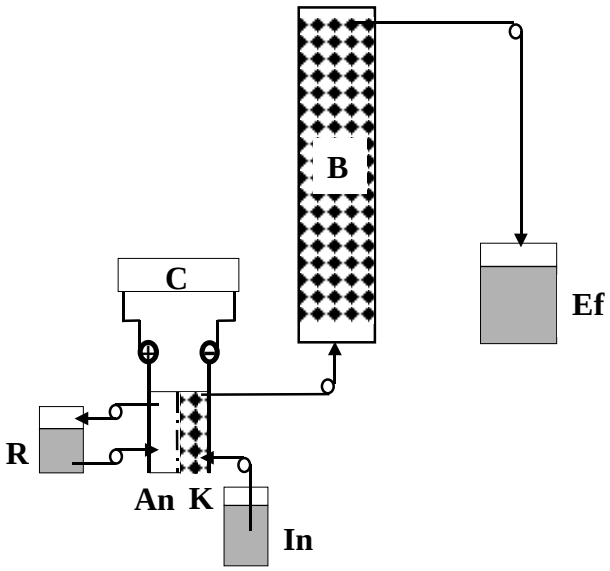
## *II. Két szakaszos reaktorok működtetéséből származó eredmények bemutatása*

A korábbiakban ismertettük a dolgozatban alkalmazott bioaktív töltetet, illetve annak létrehozását. A következőkben az alkalmazott reaktorelrendezéseket, azok működését ismertetjük.

Célunk az volt, hogy a már korábban ismertetett izolátumokkal képzett denitrifikáló töltetek alkalmazásával hidrogén-függő, folyamatos üzemű denitrifikáló bioreaktorokat építsünk, és azok optimális működési paramétereit meghatározzuk üzemeltetésük során, figyelembe véve a hatályos egészségügyi határértékeket, különös tekintettel az ivóvizek esetében megadott nitrát és nitrit szintekre.

### *II.1. Két részes (EC+BR) reaktorok*

Az EC+BR reaktor elrendezésnél a nitrátmentesítendő víz (nitráttartalmú oldat - influens) először az elektrokémiai cella katódterén folyt keresztül, ahol telítődött hidrogénnel, majd a bioaktív töltetet tartalmazó oszlopra, a denitrifikáció helyére folyt (20. ábra).




**20. ábra. EC+BR reaktor vázlatos elrendezése**

B: bioreaktor; C: áramforrás; An: anód/anódtér; K: katód/katódtér; R: regeneráló oldat; In: influens; Ef: effluens.

Mivel rendelkezésünkre álltak adatok az alkalmazott mikroorganizmus törzsek biofilmképző képességéről és denitrifikáló aktivitásáról, ezért négyféle töltetet készítettünk: A4 izolátum, M3 izolátum, P11 referencia törzs és BMIX (M3, M2, A4 és P11 törzsek keveréke) tartalmút, (a reaktorokra a könnyebb követhetőség miatt a töltet képzésekor használt mikroorganizmus jelölése alapján hivatkozunk a továbbiakban). (Az M2 izolátumot nem alkalmaztuk külön, mivel a biofilmképzésnél kapott adatok alapján nem találtuk eléggé effektívnek a törzs denitrifikációs képességét). A töltetek üzemi körülmények között történő alkalmazásával adatokat kaptunk az egyedi törzsek denitrifikációs aktivitásáról, illetve ezzel összehasonlíthattuk a kevert populáció aktivitását. A reaktorokat az input és output oldalon mért paraméterek szerint jellemeztük, melyeket az *Anyagok és módszerek* fejezetben foglalunk össze.

*II.2. Általános összehasonlítás*

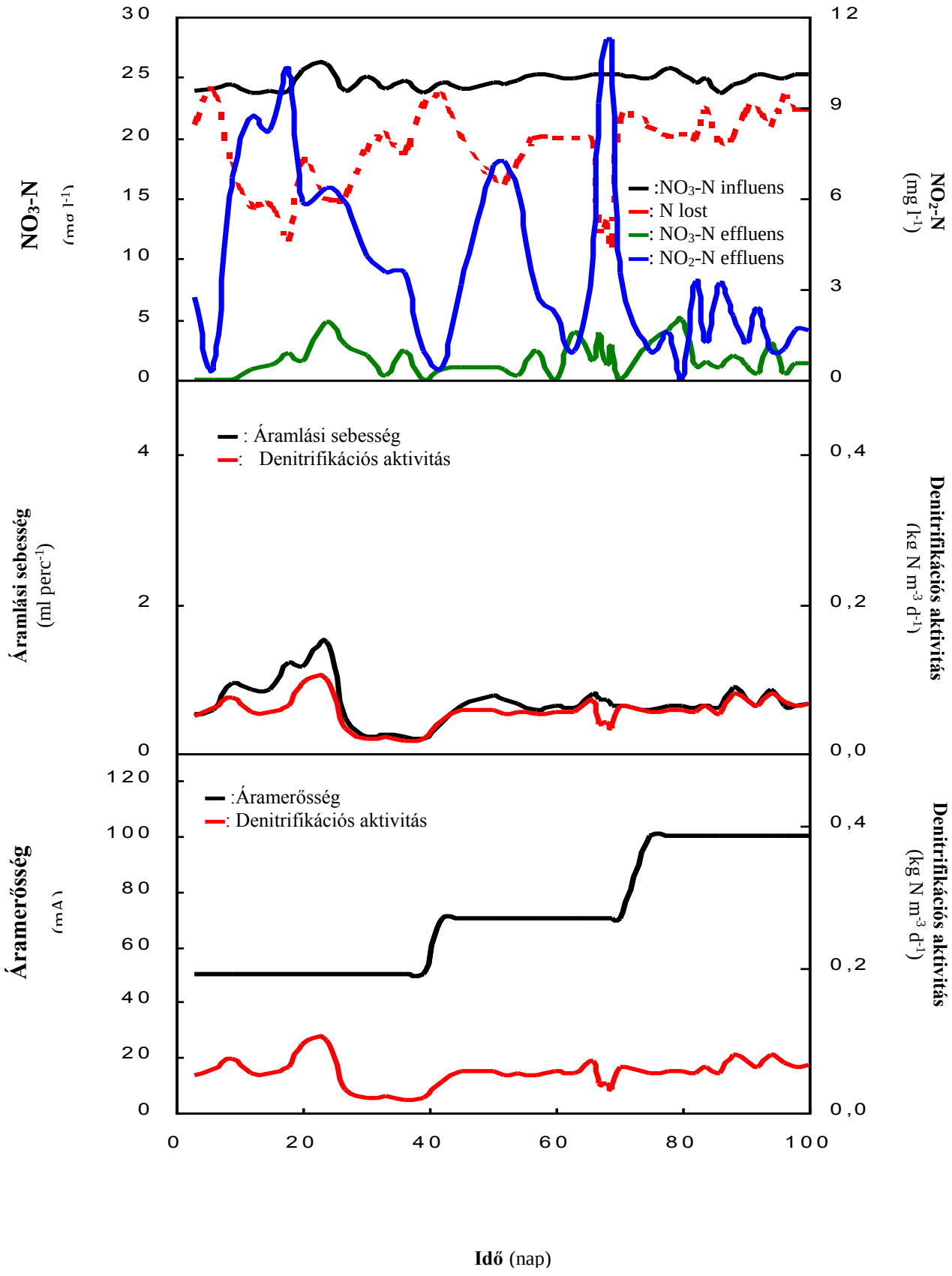
Az EC+BR reaktorok működtetése közben mértük az effluensek nitrit- és nitráttartalmát, melyekből kiszámítottuk a denitrifikációs aktivitást. Ezeket a mennyiségeket az eltelt idő függvényében ábrázoltuk, bemutatva az áramerősség és az áramlási sebesség hatását is a reaktorok effluensének összetételére a négy töltet esetében (21/1, 21/2, 21/3 és 21/4. ábra).

Az ábrákból a különböző töltetek tulajdonságait, aktivitását csak nagy vonalakban lehet összehasonlítani, azokat a számszerű adatokat, melyekkel egy nitrátmentesítő reaktort lehet jellemezni, nehéz megadni. Ennek egyik oka, hogy a megépített rendszerben az áramlási sebesség biztosításáért felelős perisztaltikus pumpák nem bírtak konstans sebességeket produkálni.

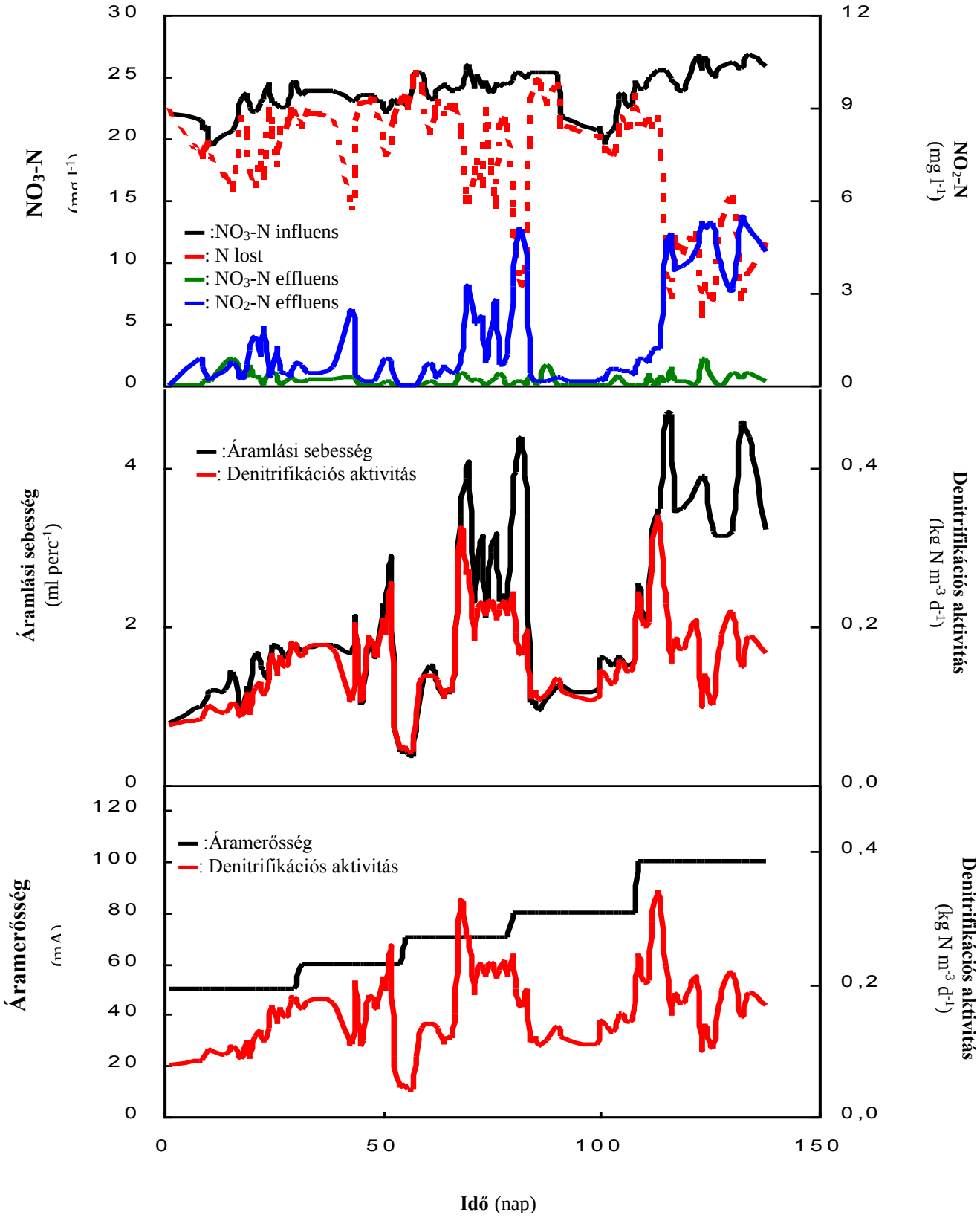
Az adatok ilyen ábrázolása viszont képet ad a reaktorok üzemeltetése során történt eseményekről, az áramlási sebesség vagy áramerősség alakulásáról, illetve az effluens és influens jellemző összetételéről.

Az üzemi körülmények között működő reaktorok esetében két, a denitrifikációs aktivitást befolyásoló, külső paramétert változtattunk. Ezek a tartózkodási idő és az alkalmazott áramerősség voltak. A tartózkodási idő (HRT) határozza meg a reaktortérben lévő szubsztrát (nitrát, nitrit stb.) lebontására, felvételére rendelkezésre álló időt, míg az alkalmazott áramerősség a rendszer hidrogéntartalmát befolyásolta. Az optimalizálás során az effluens nitrit- és nitráttartalmát tekintettük vezérlő paraméternek, a WHO által megadott határértékek ismeretében és azokhoz igazodva ($NO_2$-N<1 mg $l^{-1}$, $NO_3$-N<10 mg $l^{-1}$).

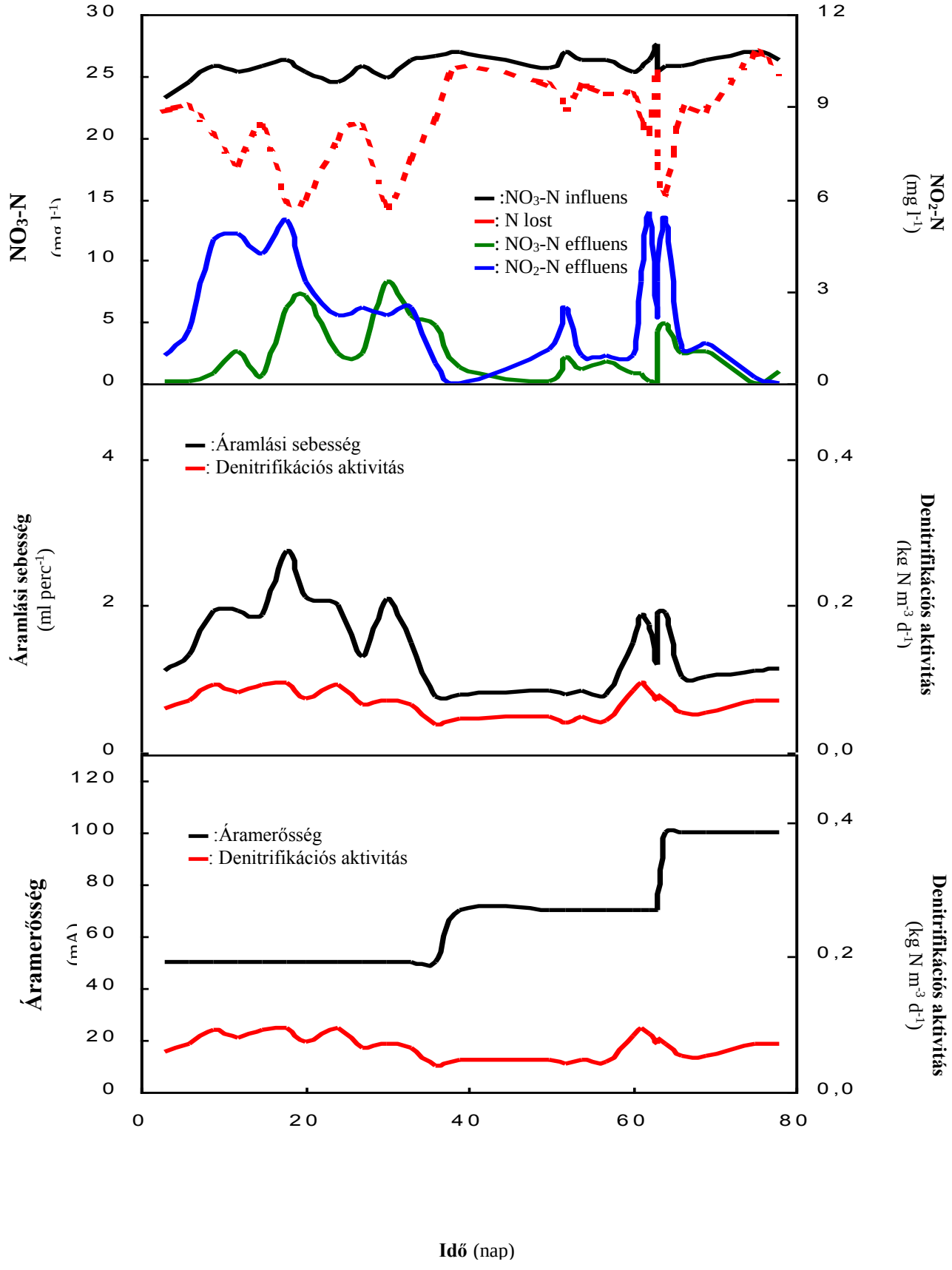
**21/1. ábra EC+BR reaktor diagrammok. Töltet: P11 referencia törzs**



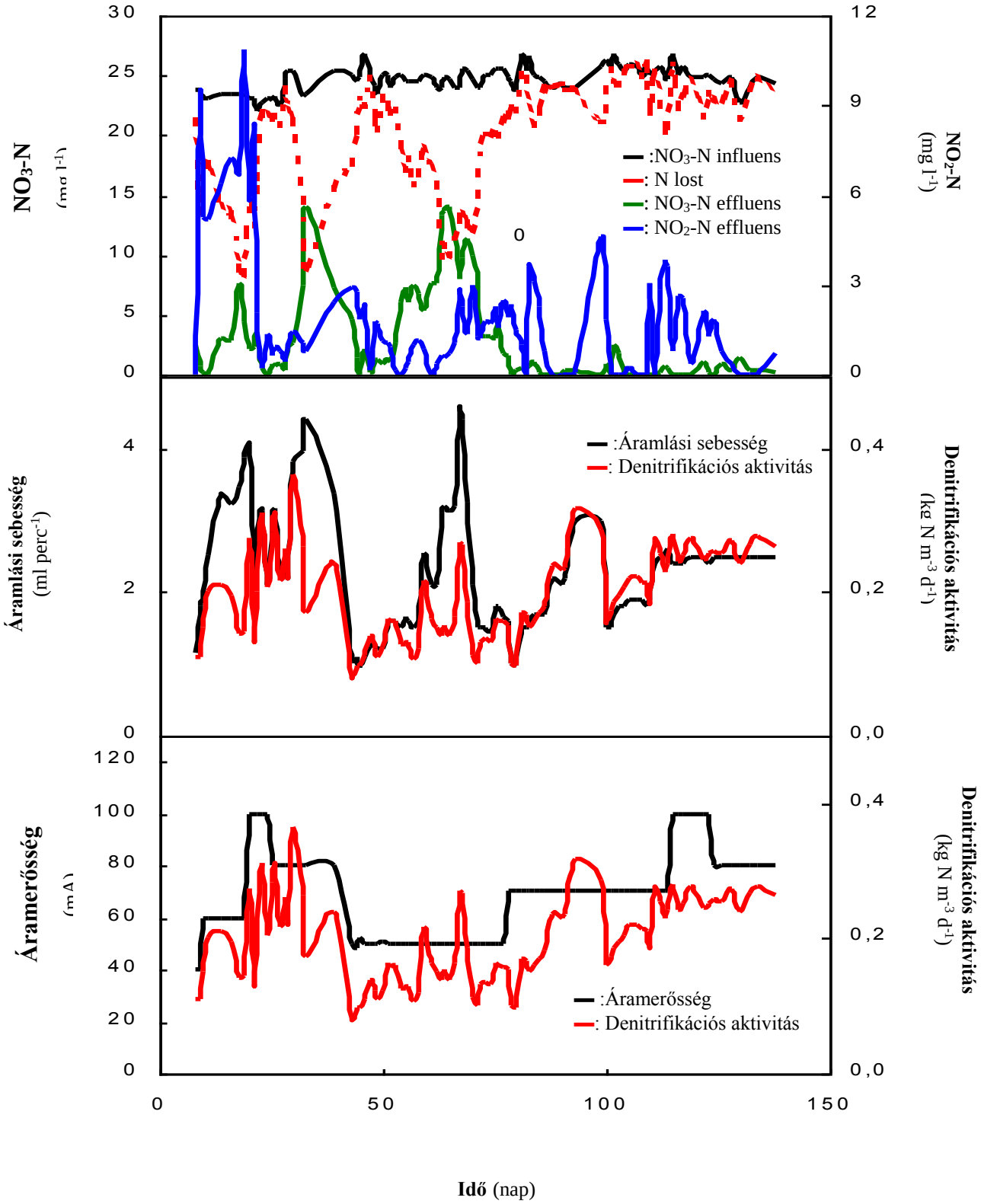
**21/2. ábra EC+BR reaktor diagrammok. Töltet: M3 izolátum**



**21/3. ábra EC+BR reaktor diagrammok. Töltet: A4 izolátum**



**21/4. ábra EC+BR reaktor diagrammok. Töltet: BMIX törzs keverék**



*II.3. Minimális tartózkodási idők (HRT) meghatározása EC+BR reaktorok esetében*

Az áramlási sebesség csökkentése a reaktorokról lejövő nitrit szint csökkenését okozta, konstans áramerősségek mellett. A törzsek között jelentős eltérések adódtak; a referenciatörzsként alkalmazott P11 törzs és az A4 izolátum esetében viszonylag alacsony nitrit szinteket ($NO_2$-N<3 mg $l^{-1}$) csak alacsony áramlási sebességek esetében kaptunk (V<0.5 ml $min^{-1}$). Az M3 és a BMIX (törzsmix) esetében magasabb áramlási sebesség értékek alkalmazásával is (V≈1 ml $min^{-1}$) elérhető volt ez a szint (21. ábra).

Az adott töltetek esetében statisztikai módszereket alkalmazva meghatároztuk azt a minimális HRT értékeket, melyek alkalmazása esetén az effluens nitrit és nitrát szintje megadott határok között eléri a WHO által megállapított határértéket az effluens $NO_2$-N tartalmára nézve (8. tábla). Mivel az effluens $NO_3$-N tartalma ezekben a tartózkodási tartományokban az egészségügyi határérték alatt maradt, ezért erre külön nem térünk ki.

**8. tábla. Minimális tartózkodási idők EC+BR reaktorok esetében 1 mg $l^{-1}$ $NO_2$-N nitrit szint, mint határérték esetében** ($R^2$>0.8)

| Töltet | 50 mA | 70 mA | 80 mA | 100 mA |
|---|---|---|---|---|
| M3 | 4.23 óra | 2.15 óra | 2.25 óra | 2.11 óra |
| BMIX | 3.22 óra | 2.46 óra | 2.26 óra | 1.98 óra |
| A4 | 4.91 óra | 5.06 óra | - | 3.99 óra |
| P11 | > 10 óra | > 10 óra | - | ~ 10 óra |

A kapott adatok alapján az M3 és BMIX töltetek esetében minimálisan 2-2.5 óra körül tartózkodási idők alkalmazásával, 70 mA, illetve ennél magasabb áramerősségek esetében már határérték alatti nitrit szintekre lehet számítani. Az A4 izolátum esetében ez az idő mintegy kétszer ekkora, míg a P11referencia törzs esetében 10 óra körüli tartózkodási idők esetén csökkenne a határértékig a nitrit szintje.

*II.4. Denitrifikációs aktivitások megállapítása EC+BR reaktorok esetében*

A denitrifikáló bioreaktorok összehasonlításánál és általános jellemzésénél a gyakorlatban alkalmazott mennyiség a határérték alatti $NO_3$-N és $NO_2$-N értékek esetén számítható *denitrifikációs aktivitás* (kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$), aminek kiszámítását az *Anyagok és módszerek* fejezetben ismertettük.

A legmagasabb számított denitrifikációs aktivitással a BMIX és az M3 izolátumot tartalmazó töltetek rendelkeztek, az A4 és P11 törzsek esetében jelentősen alacsonyabb aktivitásokat kaptunk (9. tábla).

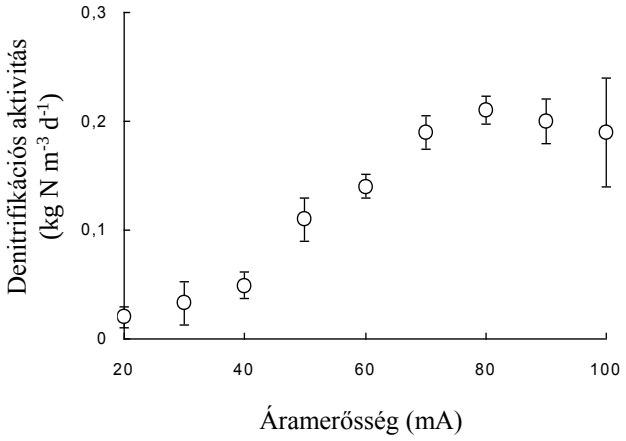
**9. tábla. Denitrifikációs aktivitások összehasonlítása különböző mikro-organizmusokat tartalmazó töltetek esetében EC+BR reaktoroknál**
(Aktivitás: kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$)

| Törzs | **50 mA** | **70 mA** | **80 mA** | **100 mA** |
|---|---|---|---|---|
| M3 | 0.090 | 0.161 | 0.173 | 0.199 |
| BMIX | 0.121 | 0.168 | 0.193 | 0.240 |
| A4 | 0.049 | 0.052 | - | 0.062 |
| P11 | < 0.020 | < 0.020 | - | 0.034 |

II.5. Az elektrondonor szerepe – hidrogén limitáció

A reaktorok üzemeltetése folyamán arra törekedtünk, hogy a hidrogén ne legyen limitáló tényező, így minden alkalmazott áramerősség és tartózkodási idő esetében hidrogént lehetett detektálni az effluensben. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy hidrogén koncentrációjának csökkentése milyen hatással van a denitrifikációra, konkrétan az egyik legnagyobb aktivitásokat mutató töltet, a BMIX esetében.

Azt tapasztaltuk, hogy alacsonyabb áramerősségeknél azonos tartózkodási időt alkalmazva a denitrifikációs aktivitások csökkenek. (22. ábra). Az effluens oldott hidrogén tartalma 40 mA-es áramerősségnél érte el a kimutathatósági határt, majd 30 és 20 mA-nál a reaktorok effluenséből nem tudtunk kimutatni hidrogént, és ezzel párhuzamosan az aktivitás is csökkent.




**22. ábra EC+BR reaktor denitrifikációs aktivitásának áramerősség függése**
A reaktor BMIX töltetet tartalmazott, HRT: ~ 3 óra.

*II.6. Az alkalmazott áramerősség felhasználásának effektivitása*

A rendszer-optimalizáció során ugyan nem törekedtünk a leghatékonyabb áramfelhasználásra, mivel a hidrogént feleslegben biztosítottuk, azonban a reaktorok üzemeltetési költségének egyik fő alkotója a felhasznált árammennyiség, ezért megvizsgáltuk a befektetett töltésmennyiség felhasználásának hatékonyságát.

A komplett nitrátredukció az alábbi, egyszerűsített képlet szerint folyik le:

$$NO_3^- + 5\,e^- + 3\,H_2O = \tfrac{1}{2}\,N_2 + 6\,OH^-$$

Az egyenlet szerint 1 mól nitrátion ½ mól nitrogénné történő redukálásához 5 mól elektron szükséges. Ezen adat felhasználásával kiszámíthatjuk, hogy az elméletileg szükséges töltésmennyiség hogyan arányul a gyakorlatban felhasználthoz, amit a η dimenzió nélküli mennyiség jellemez.

A számításokhoz a következő egyenlet használtuk fel (Sakakibara és Nakayama, 2001):

$$\eta = \frac{(I/5FV)}{C_{NO3^-inf}/HRT}$$

Ahol I= az alkalmazott áramerősség (Coulomb óra$^{-1}$), F= Farraday konstans (96 485,309 Coulomb óra$^{-1}$), V= a reaktor folyadék térfogata, $C_{NO3^-inf}$ = az influens nitráttartalma (mól l$^{-1}$) és a HRT= tartózkodási idő (óra).

Az eredeti közleményben leírt egyenletben az influens nitrátion tartalma szerepelt, feltételezve, hogy az a kísérlet során teljes mértékben lebomlik. Megfelelő változtatások után az egyenletet értelmezhetjük azonban úgy is, hogy a η érték az adott áramerősség melletti maximálisan elfogyasztható nitrát *helyett* a gyakorlatban fogyott nitrát mennyiségére vonatkozik. Erre azért van szükség véleményünk szerint, mivel az általunk üzemeltetett reaktorok esetében nem volt cél az effluens nitráttartalmának nullára csökkentése, így az egyenlet apró változtatásával jobban közelítettünk a valóságos adatokhoz. Ennek megfelelően az alkalmazott egyenletben a $C_{NO3\text{-}inf}$ mennyiség helyett $C_{Nlost}$ (fogyott nitrát mennyisége (mól l$^{-1}$)) mennyiséget használtunk.

A η értéket úgy magyarázhatjuk meg egy konkrét példán keresztül, hogy abban az esetben, ha a rendszerbe vitt töltésmennyiség hatására termelődött hidrogén teljes mértékben a denitrifikáció elektronszükségletére fordítódik, akkor a η értéke 1. Abban az esetben, ha

egynél nagyobb értéket kapunk, akkor a szükségesnél nagyobb áramot alkalmazunk (például, ha az egyenlet eredménye 2, akkor a bevitt töltésmennyiség kétszerese az elméletileg szükségesnek).

**10. tábla. Számított η értékek EC+BR reaktorok esetében**

| Töltetek | **50 mA** | **70 mA** | **80 mA** | **100 mA** |
|---|---|---|---|---|
| M3 | 3.35 | 3.45 | 3.65 | 3.95 |
| BMIX | 3.25 | 3.25 | 3.25 | 3.25 |
| A4 | 4.20 | 4.99 | - | 5.78 |
| P11 | > 18 | > 18 | - | 17.25 |

A tábla számadatai azt jelzik (10. tábla), hogy minden esetben a szükséges töltésmennyiség többszörösét használtuk. Ennek az volt oka, hogy a reaktorok üzemeltetése során arra törekedtünk, hogy a hidrogén feleslegben álljon rendelkezésre. Ettől eltekintve, az alkalmazott törzsek között jelentős eltéréseket tapasztaltunk az áramfelesleget tekintve.

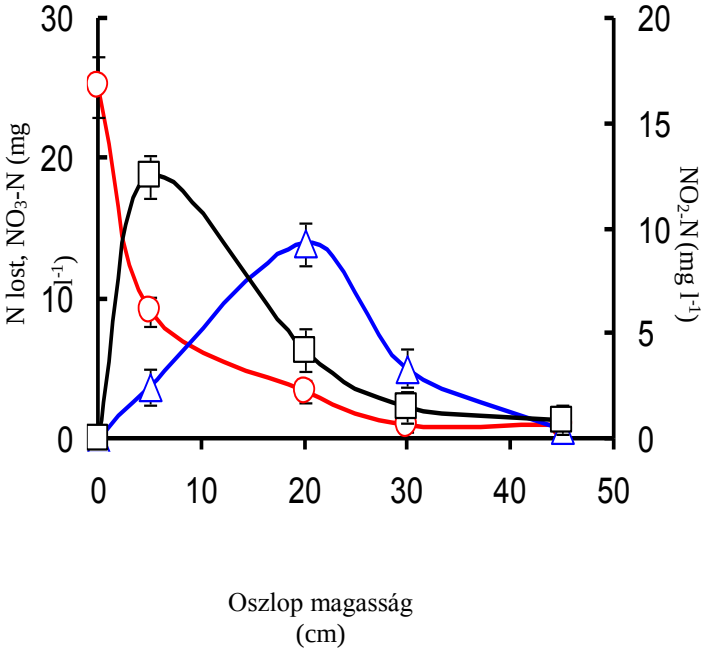
Az eltérések oka a különböző töltetek (illetve mikroorganizmus törzsek) denitrifikációs aktivitása. A hatékonyabb, kisebb tartózkodási időt igénylő töltetek esetében (M3, BMIX) a η értéke alacsony, míg az alacsonyabb aktivitású törzsek esetében (A4, P11) magasabb. Ez azt is jelenti, hogy az M3 és BMIX tartalmú töltetek esetében az áramfelhasználás hatékonysága nagyobb volt.

A különböző törzseket tartalmazó töltetek esetében a η értéknek csökkentését alacsonyabb áramerősségek alkalmazásával is el lehetett volna érni. Mint bemutattuk (22. ábra), a legmagasabb aktivitású BMIX törzs esetében a 40 mA alatti áramerősségek alkalmazása az aktivitás romlásával járt. Az M3 és BMIX törzshöz képest alacsonyabb denitrifikációs aktivitásokkal rendelkező P11 és A4 törzsek esetében nem tartottuk gyakorlati szempontból lényegesnek az ilyen irányú további kísérleteket, mivel egyrészt célunk egy minél nagyobb aktivitású reaktor kidolgozása és optimalizálása volt, és nem az összes törzsre jellemző optimum értékek megadása, másrészt az aktivitás várhatóan hasonló jelleggel csökkent volna.

*II.7. Denitrifikáció térbeli lokalizációja a reaktoron belül*

A legkedvezőbb paraméterekkel (legnagyobb denitrifikációs aktivitás, legalacsonyabb nitrit akkumuláció) rendelkező töltet, a BMIX esetében analizáltuk az oszlop különböző magasságaiban tapasztalható effluens összetételét, azaz megvizsgáltuk, hogy tapasztalható-e eltérés az oszlop különböző részein a denitrifikációs aktivitásban. A méréseket olyan feltételek mellett végeztük el, ahol az effluens nitrát- és nitrittartalma gyakorlatilag nulla, azaz a teljes denitrifikáció lejátszódik (100 mA, 4.5 óra tartózkodási idő).

A mérések eredménye szerint (23. ábra) jellemző profilt mutat a nitrát és nitrit szint alakulása a reaktorban a magasság függvényében. A reaktor első, legalsó szakaszán a nitrát szint hirtelen csökkenésével együtt járó ugrásszerű nitrit akkumuláció a jellemző. A további részeken a nitrit és a maradék nitrát szintje folyamatosan csökken, míg az összes fogyott nitrát (N lost) szintje emelkedik, a reaktor második felében pedig már csak nitritredukció történik.




**23. ábra. EC+BR reaktorokban lejátszódó denitrifikációs folyamatok térbeli elhelyezkedése**
$NO_3$-N szint az effluensben: -O-, $NO_2$-N szint effluensben: -□-, N lost: -Δ-. Az oszlop magasság adatai a kiindulástól értendőek, az oszlop elejétől Működési paraméterek: töltet BMIX, 100 mA és 4,5 óra tartózkodási idő

A kapott mintázat hasonlít a batch elrendezésben lejátszódó denitrifikációs kinetikák általános alakulására (Batchelor és Lawrence, 1978, Kesserű és tsai., 2002), csak esetünkben a folyamatok időbeni elkülönülése (a reaktor-) térben is megnyilvánul, mivel folyamatos üzemű, átfolyós rendszerről van szó.

*II.8 Egyéb paraméterek vizsgálata*

A reaktorok effluensének nitrát- és nitrittartalma mellett vizsgáltuk az ammónia mennyiségét, mely lehetséges bakteriális termékként megjelenhet. A kísérlet időtartalma alatt nem tapasztaltuk az ammónia megjelenését.

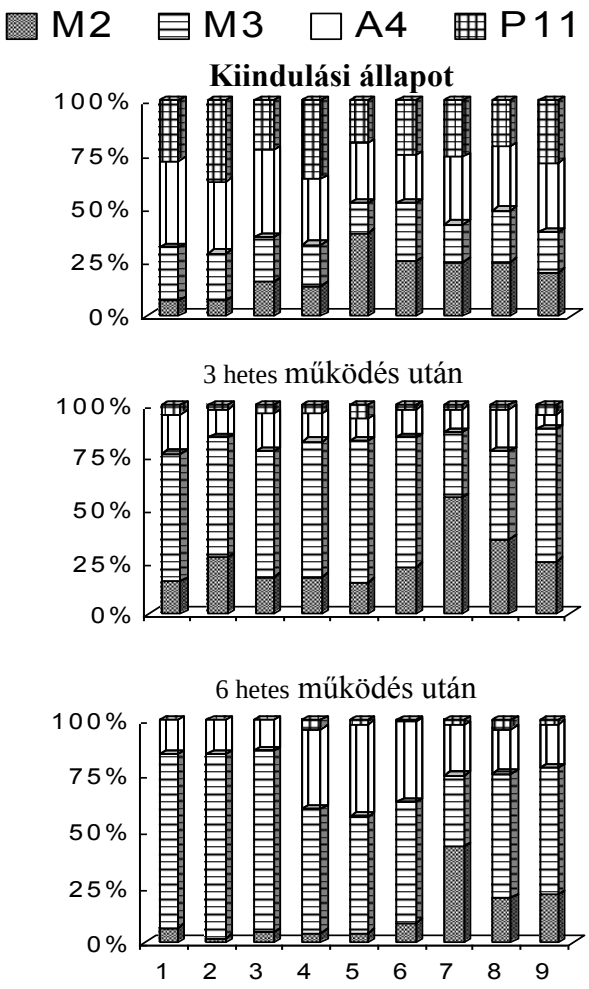
Vizsgáltuk továbbá a közeg kémhatását. Tapasztalataink szerint a kiindulási tápoldat 7 körüli pH-ja az elektrokémiai cella katódterén történő áthaladás után 7.5-7.8-ra emelkedett, a bioreaktor elhagyása után megközelítette a 8– 8.5-ös értéket.

A kezelt víz csíraszáma $10^4$-$10^5$ db sejt $ml^{-1}$ körüli érték volt, gyakorlatilag minden áramlási érték esetében ebben a tartományban kaptunk értékeket, függetlenül a töltetek minőségétől.

*II.9. Populációdinamikai vizsgálatok*

Mivel a reaktorkísérleteknél alkalmazott töltetek közül a BMIX jelzésű volt a legnagyobb aktivitású, ezért elvégeztünk egy olyan kísérletsorozatot, melyben azt vizsgáltuk, hogy az üzemi körülmények között működő reaktorban hogyan változik a mikroorganizmusok aránya. Az azonos körülmények között indított és üzemeltetett reaktorokból három időpontban vettünk mintákat, melyekből meghatároztuk a mikrobiális összetételt (24. ábra), és a következőket állapítottuk meg:

- A töltet mikroorganizmus populá-ciói dinamikus változáson mennek át, azonban a kiindulási mikroorganizmusok maradnak túlsúlyban a vizsgált időszakban.
- A négy törzs közül a P11 izolátum mennyisége erősen lecsökken, a domináns törzsek az M3 és A4.
- A nem-steril körülmények ellenére nem jelentek meg jelentős mennyiségben más mikroorganizmusok, melyek a töltet denitrifikációs aktivitását esetleg csökkent-hették volna. Ez arra utal, hogy az izolátumok az alkalmazott körülmények




**24. ábra. Nem-steril, üzemi körülmények között működő reaktor (BMIX töltet) denitrifikáló mikroflóra mintázatának alakulása**
Az oszlopok a mintavételi helyeket jelölik (X tengely, minden oszlop 3 cm magaságot foglal magában, ahol az 1. minta az oszlop kezdete), a függőleges tengelyen a töltetről izolálható mikroorganizmusok aránya található, százalékban.

között stabil mikroflórát hoztak létre, azaz a szelekciós nyomás nem teszi lehetővé más, nem kívánt mikroorganizmusok elszaporodását. Másrészt az alkalmazott biofilm telepítési módszer ("C") esetében a kiindulási sejtszámok magasak (>$10^8$ db sejt gramm$^{-1}$ GAC), ami megakad-ályozhatja más mikroorganizmusok szaporodását, illetve előnyt jelent a jelenlévő, mesterségesen telepítetteknek.

*II.10. Gyakorlati tapasztalatok az EC+BR reaktorok alkalmazása során*

A reaktorelrendezés az üzemeltetés során teljesítette azokat az elvárásokat (stabil üzemmód, alacsony üzemeltetési költségek, egyszerű kezelés), melyeket egy háztáji, kisüzemi rendszertől elvárunk. A rendszerek folyamatos működtetése során az alábbi hibalehetőségekből adódó tapasztalatokat gyűjtöttük össze:

- Elektrokémiai cella katódterének tisztítása.

  Az elektrokémia cella üzemletetése során konstans áramerősségeket alkalmaztunk. Ohm törvénye szerint egy elektromos fogyasztó esetében igaz, hogy I=R/U (ahol I= az áramerősség, R= a fogyasztó ellenállása, U= az alkalmazott feszültség). A lejátszódó elektrokémiai folyamatok miatt a katód felületén lerakódó karbonátok növelik a cella ellenállását, és a konstans áramerősségek előállításához szükséges feszültséget is (5. tábla). Az elektrokémiai cella üzemeltetésének költségeit az alkalmazott áramerősségek előállításához szükséges feszültség határozza meg, azaz magasabb ellenállású cella esetében magasabb költségekkel kell számolni, azonos áramerősségek esetében. A feszültség változásának nyomon követése segít ezt a problémát megoldani. A katód felületére kiváló karbonátokat savas kezeléssel rövid idő alatt el lehet távolítani.
- Az üzemeltetés során, a korábbi homokágyas reaktorok tapasztalataiból okulva, gázbuborékok képződésére számítottunk, melyek csökkentik a reaktor hasznos térfogatát és aktivitását. Az alkalmazott hordozó, a GAC esetében nem tapasztaltunk stabil légzárvány képződést, azok csak időlegesen (1-2 nap) voltak megfigyelhetőek.
- A reaktorok működési idejét a bennük lévő mikroorganizmus populáció mennyisége szabta meg. Egyes reaktorok esetében, ahol az üzemidő meghaladta a 200 napot, olyan mértékű biomassza felhalmozódást tapasztaltunk, mely gátat jelentett a tápoldat áramlásának. Erre a problémára még nem találtunk megoldást, valószínű, hogy a tápoldat összetételének változatásával csökkenteni lehet a mikroorganizmusok szaporodási rátáját.

## *III. Egy szakaszos reaktorok (ECBR) működtetéséből származó eredmények bemutatása*

Az ECBR reaktorok kialakításakor egy olyan elrendezés létrehozására törekedtünk, melyben, hasonlóan a már korábban leírt rendszerekhez (Sakakibara és tsai., 1994), az elektrokémiai úton előállított hidrogén már a katódtérben hasznosul a biológiai denitrifikáció energiaforrásaként. Célunk volt e rendszerek hibáinak kiküszöbölése, hatékonyságának javítása. Mint a bevezető részben említettük, az első elektrokémiai és biológiai módszert ötvöző denitrifikáló rendszerben (Sakakibara és tsai., 1994) a katód felületén neveltek aktív denitrifikáló biofilmet. Ennek a módszernek két hátránya volt: egyrészt a keletkező hidrogén fizikailag károsította a biofilmet, másrészt a biofilm kialakítására szolgáló felület kicsi volt.

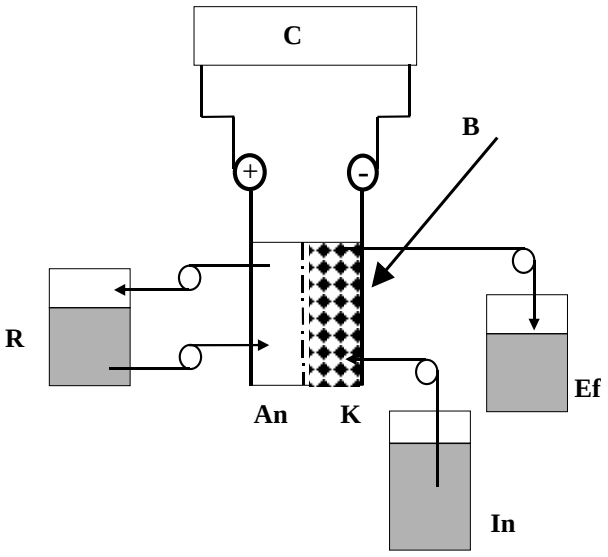
### *III.1. Az ECBR reaktor*

Az általunk kifejlesztett eljárás során az emelt térfogatú katódteret granulált aktív szén szemcsékkel töltöttük fel, majd biofilmet képeztünk ("C" módszer szerint) a cellában (25. ábra).

Az így kapott reaktor már nagyobb felületű biofilmmel rendel-kezett, és a keletkező hidrogén nem károsította azt, mivel az nem a katód felületén helyezkedett el.

25. ábra. ECBR reaktor vázlatos elrendezése

**C: árramforrás, R: regeneráló oldat (0,1 N kénsav), B: bioaktív töltet a katód térben, An: anódtér, K: katódtér, In: influens, Ef: effluens**



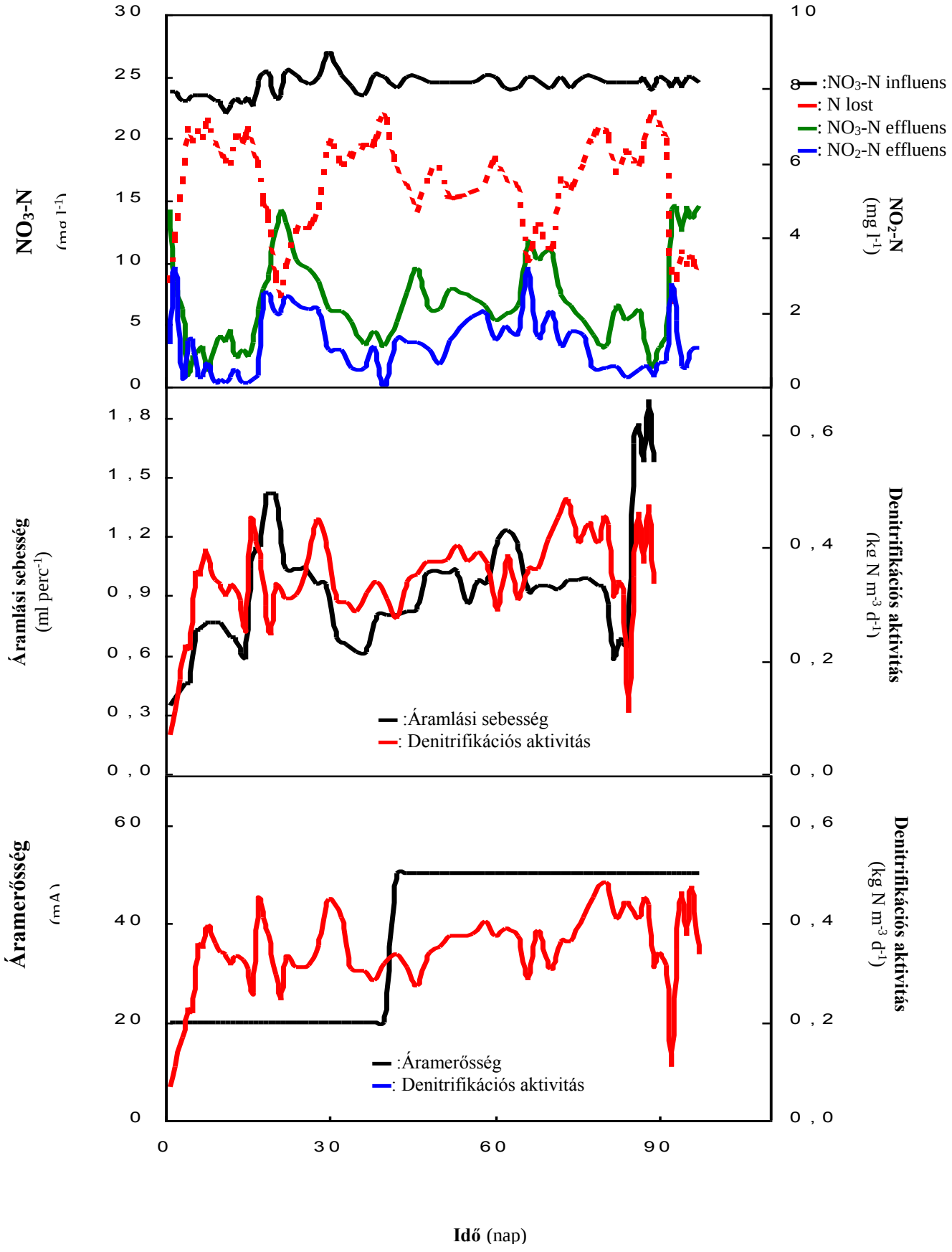
*III.2. Az ECBR reaktorok üzemeltetése során kapott eredmények bemutatása*

Az ECBR reaktorok üzemeltetése során kétféle töltetet vizsgáltunk, mindkettőt "C" módszerrel telepítettük. A töltetek kiválasztásánál az játszott szerepet, hogy meg akartuk vizsgálni, hogy az EC+BR reaktorelrendezésben kapott adatok alapján alacsony, illetve magas aktivitással rendelkező töltetek hogyan viselkednek ebben az elrendezésben. A kiválasztott alacsony aktivitású töltet az A4, a magas aktivitású pedig a BMIX (törzsmix) volt.

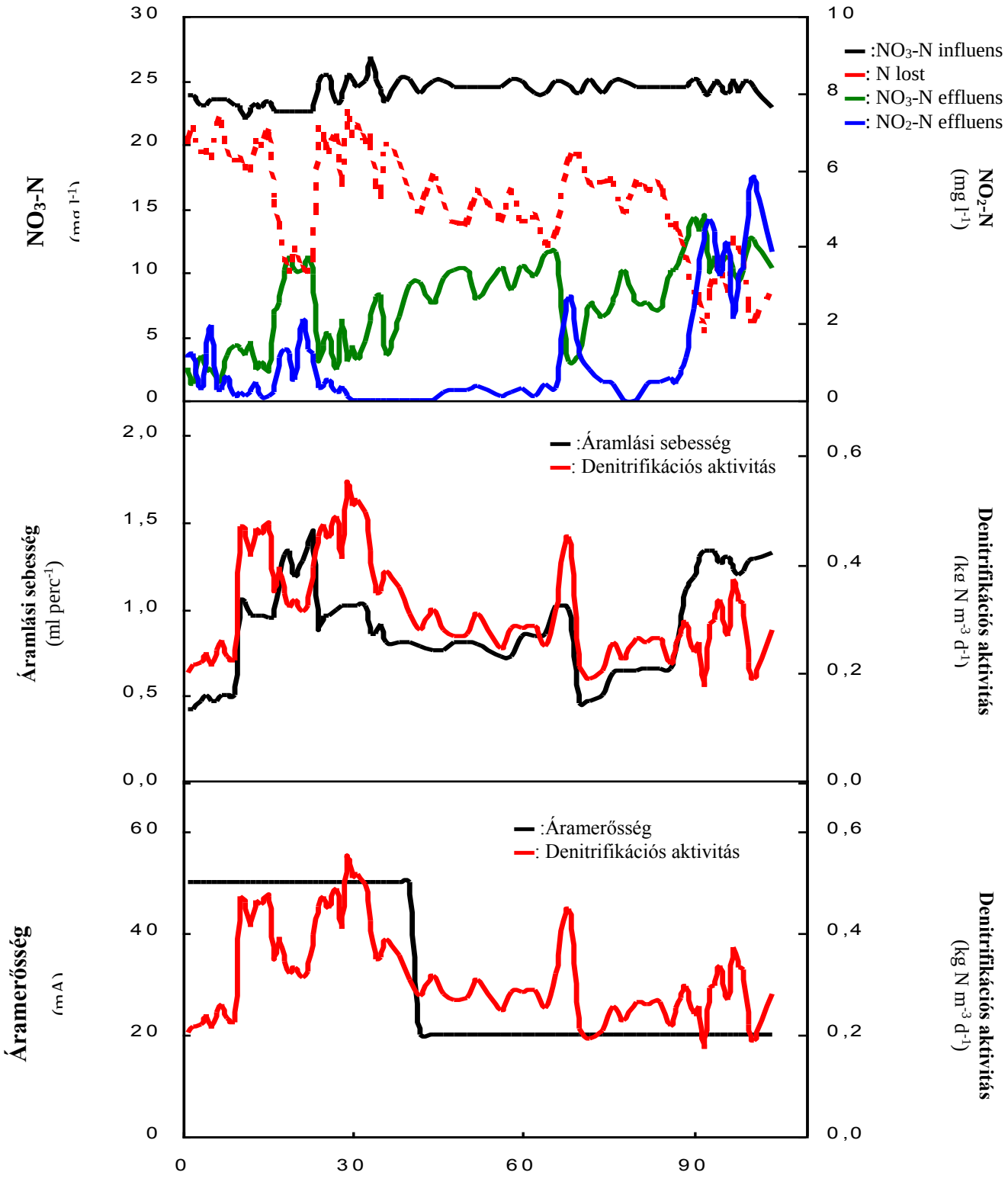
Hasonlóan az EC+BR reaktorokhoz, mértük az effluens nitrát-, nitrit- és ammóniatartalmát, kiszámítottuk a denitrifikációs aktivitást. A kapott adatokat, valamint az áramlási sebességet és az áramerősségeket ábrázoltuk az eltelt idő függvényében (26/1 és 26/2 ábra).

A két reaktorelrendezés működtetése során kapott mérési és számítási adatok összehasonlításához, különösen a tartózkodási idő esetében, figyelembe kell venni az eltérő reaktortérfogatokat. Az EC+BR reaktorok esetében ez 600 ml, míg az ECBR elrendezésnél 60 ml. A bioaktív töltet közel egy nagyságrenddel kisebb térfogata ellenére az áramlási sebességek az EC+BR reaktorok esetében alkalmazottakéval hasonló tartományba estek és az effluens nitrit szintjei is hasonló tartományban voltak. Eltérés, hogy a nitrát szint viszont jelentős volt (5-10 mg $l^{-1}$ $NO_3$-N) a reaktor effluensében.

**26/1 ábra. ECBR reaktor diagrammok. Töltet: A4 izolátum**



26/2 ábra. ECBR reaktor diagrammok Töltet: BMIX izolátum keverék



*III.3. Minimális tartózkodási idők (HRT) meghatározása ECBR reaktorok esetében*

Az EC+BR reaktorokhoz hasonlóan itt is az effluens analizálása útján kapott mérési adatokból kiindulva, nem-lineáris regressziót alkalmazva határoztuk meg a szükséges minimális tartózkodási időket, melyek alkalmazása esetén az effluens nitrit illetve nitrát szintje a határérték közelébe vagy alá kerül (11. tábla).

**11. tábla. A tartózkodási idők alakulása ECBR reaktorok esetében, különböző áramerősségek esetében**

| Töltet | **20 mA** | **50 mA** |
|---|---|---|
| BMIX | 0.30 óra | 0.28 óra |
| A4 | 0.51 óra | 0.41 óra |

Megállapíthatjuk, hogy az ECBR reaktorok esetében a WHO által megszabott ivóvíz nitrit és nitrát szintjének eléréséhez szükséges tartózkodási idő mindkét töltet esetében kisebb volt az azonos töltettel üzemeltetett EC+BR reaktoroknál tapasztalható értékeknél. A kapott HRT értékek esetében kiszámított denitrifikációs aktivitásokat a 12. tábla tartalmazza.

**12. tábla. Denitrifikációs aktivitások összehasonlítása különböző mikroorganizmusokat tartalmazó töltetek esetében ECBR reaktoroknál** (Aktivitás: kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$)

| Töltet | **20 mA** | **50 mA** |
|---|---|---|
| BMIX | 0.299 | 0.377 |
| A4 | 0.215 | 0.301 |

A denitrifikációs aktivitások esetében is hasonló volt a tapasztalat, mint a tartózkodási idők esetében, vagyis az ECBR elrendezés esetében magasabb aktivitásokat kaptunk, mint az azonos töltetek esetében az EC+BR reaktoroknál.

*III.4. Az alkalmazott áramerősség felhasználásának effektivitása*

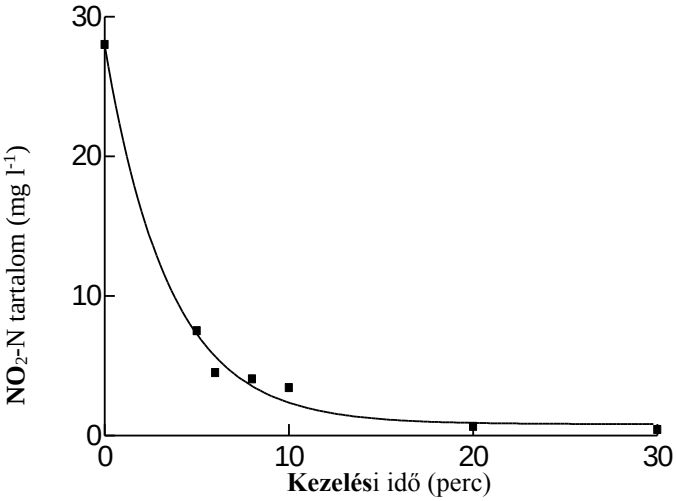
Az EC+BR reaktorokhoz hasonlóan, megvizsgáltuk, hogy a felhasznált töltésmennyiség milyen arányban hasznosul az ECBR reaktorok esetében (13. tábla).

**13. tábla. Számított η értékek ECBR reaktorok esetében**

| Töltet | **20 mA** | **50 mA** |
|---|---|---|
| BMIX | 2.61 | 6.09 |
| A4 | 4.10 | 7.05 |

A töltés, illetve áramfelhasználás effektivitásának értékei arra utalnak, hogy hasonlóan az EC+BR reaktorokhoz, itt is a szükségesnél magasabb hidrogén-koncentrációt alkalmaztunk, amit megerősített a reaktorok effluensének oldott hidrogén tartalmának meghatározása, mely szerint az oldat telített volt, és a gáztér is tartalmazott hidrogént.

A meglepően rövid tartózkodási időre és magas denitrifikációs aktivitásra ma-gyarázatot kellett keresnünk. Az alkalmazott mikro-organizmus törzsek azonosak voltak, és figyelembe véve az EC+BR reaktor esetében kapott eredményeket is, valószínű, hogy az aktivitás növekedés nem biológiai folyamatok eredménye. Elsősorban elektro-kémiai reakciókra kell gondolni, melyek során csök-kenhet a nitrit szint. A nitrát-szint csökkenése a katódtérben bizonyítottan nem megy végbe, ugyanis az EC+BR reaktorok esetében a nitrátszinteket az elektrokémiai cella és a bioreaktor között, illetve a bioreaktor után mértük, és számottevő különbséget nem találtunk (<1%). Ezért azt feltételeztük, hogy a katódtérben olyan elektrokémiai reakciók játszódhatnak le, melyek során a nitrit redukálódik. A kérdés eldöntésére steril elektrokémiai cella katódterébe vezettünk ismert koncentrációjú nitrit oldatokat, majd konstans áram és feszültség-értékek mellett inkubáltuk a rendszert. Azt




**27. ábra Nitrit ionok szintjének csökkenése elektromos áram hatása**
(U=15 V, I= 50mA)

tapasztaltuk, hogy a nitrit koncentrációja erősen csökkent az alkalmazott áramerősségek esetében (27. ábra).

Megvizsgáltuk a kezelt oldatok kémhatását, és azt találtuk, hogy azok savas kémhatásúak (pH 3-4) voltak.

Ezek a mérések arra utalnak, hogy az ECBR reaktorok magas aktivitás értékeinek elérésében nemcsak biológiai, hanem elektrokémiai reakciók is szerepet játszanak. Továbbá a számított η értéke is módosul, mivel az alkalmazott töltésmennyiség a vízbontáson túl a nitritionok redukciójára is fordítódott.

*III.5 Egyéb paraméterek vizsgálata*

A reaktorok effluensének nitrát- és nitrittartalma mellett vizsgáltuk az ammónia mennyiségét, mely lehetséges bakteriális termékként megjelenhet. Méréseink szerint a kísérlet időtartalma alatt nem volt tapasztalható az ammónia megjelenése.

Az effluens kémhatásának vizsgálata azt mutatta, hogy az EC+BR reaktorokkal ellentétben a bioaktív töltetet tartalmazó katódteret elhagyó oldat pH-ja gyengén savas, illetve közel semleges (pH 6.4-7.1) volt.

Az alkalmazott üzemi paraméterek esetében az effluens baktériumszáma elérte a $10^4$-$5.0x10^5$ db sejt $ml^{-1}$ értéket.

# Eredmények értékelése

## *I. A biofilmképzés eredményeinek értékelése*

Mivel az elkészítendő reaktorokat folyamatos, átfolyós üzemben terveztük működtetni, ezért célszerű volt rögzített sejtes elrendezést kifejleszteni az adott izolátumok felhasználásával.

A felszíni és a gélpolimerbe történő rögzítési eljárások közül az előbbi mellett döntöttünk. Ennek oka egyrészt az volt, hogy az ivóvíz- és szennyvíztisztításban általánosan elterjedt a baktériumok biofilmképző tulajdonságait kihasználó felületi rögzítés, másrészt néhány alkalmazástól eltekintve (Kis-Tóth és tsai., 1996) nem ismeretes olyan eljárás, mely olyan gélszerkezetet eredményezne, mely megőrzi stabilitását az adott körülmények között.

A hordozó kiválasztásánál szerepet játszott a nagy fajlagos felület, az inertség denitrifikáció és a baktériumok szempontjából, valamint az egyszerű kezelhetőség. Ezen előfeltételeknek megfelelt a GAC, mely elterjedt hordozó más biológiai eljárásokban (Caldeira és tsai., 1999, Armenante és tsai., 1996), de az ivóvízkezelés területén is alkalmazzák, mint baktérium-mentesítésre alkalmas szűrőt (Camper és tsai., 1985).

A reaktorok elkészítéséhez szükséges bioaktív töltet fejlesztése során tehát granulált aktív szén felületére telepítettünk biofilmet. A biofilmek telepítése során három izolátumot és a referencia törzset, illetve ezek ismert összetételű keverékét alkalmaztuk.

### *I.1. A biofilmképzési módszerek összehasonlítása*

Háromféle telepítési módszert vizsgáltunk, úgymint:

- Biofilm A módszer: Eredménye egy anaerob, kemolitotróf körülmények között képzett biofilm.
- Biofilm B módszer: A telepítés anaerob körülmények között, szerves szénforrás felhasználásával történt.
- Biofilm C módszer: A biofilmképzés első, adhezív szakaszát valósítottuk meg, kihasználva a hordozó és a mikroorganizmusok fiziko-kémiai és felületi sajátságait.

A telepítési módszerek összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy az anaerob, heterotróf biofilm telepítés (“B”) nem eredményezett stabil és magas aktivitású biofilmet. A szerves szénforrás felhasználásával az izolátumok ugyan nagy mennyiségű biomasszát képeztek, azonban az üzemi periódus alatt a biofilm, illetve a bakteriális ko-aggregátmok destrukciója

ment végbe, ami a töltet jelentős aktivitásvesztését vonta maga után. Emellett a telepítés költségeit növeli a szerves szénforrás adagolása, illetve magasabb a külső fertőződés esélye is.

Az anaerob, kemolitotróf telepítéssel ("A") stabil biofilmet lehet képezni; ennek aktivitása magas, azonban az alkalmazott körülmények között a mikroorganizmusok növekedési sebessége lassú, emiatt a biofilmképzés e módja időigényes.

A "C" módszer, ahol csak a biofilmképzés kezdeti, adhéziós szakaszát valósítottuk meg, szintén hasonló magas aktivitású és stabil biofilmet eredményezett. Ez arra utal, hogy egyrészt a hordozóként alkalmazott granulált aktív szén jó adszorbense a mikroorganizmusoknak, amit az így képzett oszlopok fehérje profilja is mutatott (15/1 ábra), másrészt az alkalmazott mikroorganizmusok az anaerob, kemolitotróf üzemi körülmények között – ahogy az "A" képzés esetében is láthattuk – képesek a biofilmképzés további lépéseit véghezvinni. Ezt a megfigyelést pásztázó elektronmikroszkópos felvételekkel is megerősítettük (16. ábra), ahol a talált felületi, bakteriális képletek egyezést mutattak más szerzők munkáiban leírtakkal (Scott és tsai., 1995).

*I.2. Mikroorganizmusok a biofilmben*

A három biofilmképzési módszer kivitelezése során kapott eredmények azt mutatták, hogy az M3 és A4 izolátum, illetve a P11 referenciatörzs képes biofilm létrehozására granulált aktív szén felületén, kemolitotróf, anaerob körülmények között. Ezzel szemben az M2 törzs gyenge eredményeket adott: az "A" módszer esetében már a telepítés után, illetve a mindhárom módszert követő üzemi periódus befejeztével a mért egységnyi hordozóra eső denitrifikációs aktivitás és proteintartalom erősen visszaesett (15/1-15/2. ábra). Ez az eredmény jól egyezik a szakirodalmi utalásokkal, mely szerint a törzs (*Pseudomonas stutzeri*) obligát heterotróf. A törzs alkalmazása esetén azonban az üzemi periódusok után az egységnyi hordozóra eső poliszaharid mennyiség magas volt. Erre a megfigyelésre alapozva az M2 törzs magasabb poliszaharid termelő képességét a későbbiekben ki is használtuk a töltet előkezelésére. A törzs magas poliszaharid termelő aktivitását más szerzők is megerősítették (Stanley és tsai., 1994)

*I.3. A "C" módszer további optimalizálása*

A további kísérletekben már csak a "C" módszert alkalmaztunk, mivel ez a telepítési mód stabil, magas aktivitású biofilmet hozott létre, rövid előkészítés után. Célunk volt olyan eljárások kidolgozása, melyekkel meg lehet emelni a granulált aktív szénen képződő biofilm mennyiségét és aktivitását.

Jó módszer volt a közeg kémhatásának emelése, mely pozitív eredményt adott a három izolátumnál (M2, M3 és A4), míg a referencia törzsnél (P11) nem volt jelentős hatása (17. ábra).

Az inert hordozó felületkezelésére tett kísérletek is hoztak pozitív eredményeket. Mivel az M2 törzs magas poliszaharid termelő tulajdonságot mutatott a biofilmképzési kísérletek első felében, ezért ezzel a törzzsel előkezeltük a hordozót. A várt hatás azonban csak az A4 törzs esetében volt megfigyelhető, hasonlóan a kitozánnal történő előkezelés során kapott eredményekhez (18-19. ábra).

Valószínűleg az M2, M3 és P11 törzsek esetében olyan felületi molekula nem található, mely képes kötést kialakítani a kitozánnal, viszont az A4 izolátum tartalmazhat kitozán kötő faktort. Az M2 törzzsel előkezelt hordozó esetében hasonló jelenségről beszélhetünk. Bár konkrét kísérleti eredményekkel nem rendelkezünk, feltételezhetjük, hogy az A4 és az M2 törzs között valamilyen felületi kompetencia létezhet, mely lehetővé teszi a mikrobiális ko-aggregátumok kialakulását.

A granulált aktív szén adszorbciós kapacitásának növelésére tett kísérletek egy része pozitív eredménnyel végződött, melyek jobb megértéséhez és a gyakorlatban történő alkalmazásukhoz további vizsgálatok szükségesek. Ezért a további, reaktorokkal folytatott kísérletekben a “C” képzési módszert alkalmaztuk, kezeletlen granulált aktív szén hordozóval.

*I.4. A granulált aktív szén, mint hordozó a denitrifikáló reaktorok esetében*

A GAC, mint hordozó felületi adszorbciós képessége fontos volt a “C” módszer kifejlesztésében, továbbá szemcsemérete miatt az üzemi körülmények között nem okoztak gondot a keletkező gázbuborékok, szemben egy homokágyas reaktorral (Soares és tsai., 1991).

## *II. A bioreaktorok működésének értékelése*

### *II.1. Denitrifikációs aktivitások, tartózkodási idők*

Az aktív töltetek birtokában kétféle reaktorelrendezést építettünk meg. Az első típus esetében az elektrokémiai cella és maga a bioreaktor térben elkülönült (EC+BR elrendezés, 20. ábra), míg a második esetben a biológiailag aktív töltet a katódtérben helyezkedett el (ECBR elrendezés, 25. ábra).

Mindkét esetben stabil működést tapasztaltunk, a reaktorok alkalmasak voltak a feladat elvégzésére, azaz az ivóvíz hidrogén-függő nitrátmentesítésére.

A kemolitotróf denitrifikáció egyik gyakorlati problémája a magas nitrit akkumuláció (Soares és tsai., 1991), ami az általunk üzemeltetett reaktorok esetében is tapasztalható volt. Ez erősen függött a biofilmet képező baktériumtól, a tartózkodási időtől (HRT) és az áramerősségtől. Azonos tartózkodási idők és áramerősségek esetében, az EC+BR reaktoroknál az A4 és P11 tartalmú töltetek mutattak magas nitrit-akkumulációt, majd az M3 következett, és a legalacsonyabb szinteket a baktériumkeverékkel készült töltet mutatatta (BMIX) (21/1, 21/2, 21/3 és 21/4 ábra). A hosszabb tartózkodási idők mindegyik töltet esetében csökkentették a nitrit mennyiségét, hasonlóan a magasabb áramerősséghez.

A reaktorok jellemzése során a kapott mérési adatokból matematikai módszerekkel meghatároztuk a minimális tartózkodási időket, melyek teljesülése esetén az effluens nitrit és nitrát szintje kielégíti az egészségügyi határértékként megadott értékeket.

A számítások alapján megállapítottuk, hogy az áramerősség emelése csökkentette az egészségügyi határértékek eléréséhez szükséges tartózkodási időt, azonban a különböző törzsek és reaktor elrendezések esetében jelentős eltérések adódtak. Az M3 és a BMIX törzskeveréket tartalmazó reaktornál az 50 mA-ről 100 mA-re történő áramerősség-emelés a tartózkodási időt közel felére csökkentette az EC+BR elrendezés esetében, addig az A4 és P11 tartalmú reaktor esetében ilyen éles hatás nem volt megfigyelhető (8. tábla).

Az ECBR reaktoroknál rövidebb tartózkodási időket kaptunk, általában fél óra körüli értékeket, melyek jóval kisebbek az EC+BR elrendezés azonos töltetű, de eltérő konfigurációjú és térfogatú reaktorainál tapasztaltaknál (11. tábla).

A számított, ideális tartózkodási idők felhasználásával meghatároztuk az adott HRT értékhez tartozó denitrifikációs aktivitásokat. Az EC+BR elrendezéseknél, az M3 és BMIX töltetű reaktorok aktivitása jelentősen meghaladta a másik két esetben kapott értékeket (A4 és P11) (9. tábla). Az ECBR reaktoroknál, hasonlóan a tartózkodási idők esetében tapasztaltakhoz, ismét kedvezőbb értékeket kaptunk (12. tábla), melyek még az egyébként

alacsony aktivitású A4 töltetnél is magasak voltak (EC+BR: 0.049 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ és ECBR: 0.301 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$, 50 mA esetében).

*II.2. Elektrokémiai folyamatok lehetősége az ECBR reaktoroknál*

Az ECBR reaktorok rövid tartózkodási idő értékei és a hozzájuk tartozó magas aktivitások felvetették, hogy nemcsak mikrobiális, hanem elektrokémiai folyamatok is szerepet játszhatnak a teljes nitrátredukció folyamatában.

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy egy baktériummentes, a kísérleteknek megfelelő körülmények között működő (áramerősség, feszültség) elektrokémiai cellán átfolyó nitrát mennyisége nem, míg a nitrité jelentősen csökken (27. ábra). Ez arra utal, hogy a nitrit lebontásának elektrokémiai okai vannak, amire érdemes részletesebben is kitérni.

A korábban ismertetett elektrokémiai adatok szerint az alábbi reakciók játszódhatnak le a katódtérben (Feleke, 1998, Stumm, 1981):

**14. tábla. Elektrokémiai cella katód terében lejátszódó elektrokémiai reakciók**

| | **Elektrokémiai reakció (katód)** | |
|---|---|---|
| $2\ H_2O + 2e^- = H_2 + 2OH^-$ | (e0 = -0.828 V) | **E-1** |
| $NO_2^- + 6H_2O + 6e^- = NH_4^+ + 8\ OH^-$ | (e0 = -0.212 V) | **E-2** |
| $NO_2^- + H_2O + e^- = NO + 2\ OH^-$ | (e0 = -0.46 V) | *E-3* |
| $NO_3^- + H_2O + 2e^- = NO_2^- + OH^-$ | (e0 = 0.017 V) | **E-4** |

Mint az elektrokémiával foglalkozó fejezetben ismertettük, az adott rendszerben a hidrogénfejlődés a kedvezményezett folyamat a standard elektrokémiai potenciálok alapján (E-1), azonban a kísérleti eredmények azt jelezték, hogy a nitrit esetében más reakciók is lejátszódhattak. Ahhoz, hogy pontosan meg tudjuk mondani, hogy mely egyéb reakciók játszódnak le, ismerni kell a katód potenciálját valamilyen referencia elektródhoz képest, azonban ezt a mérést a rendelkezésre álló eszközökkel nem tudtuk megoldani, így csak kísérleti eredményekre alapozott hipotéziseket állíthatunk fel.

Méréseink szerint viszont a felírt reakcióegyenletek közül az E-2 megvalósulása nem valószínű, mivel ammóniát nem tudtunk kimutatni a kezelés után, valamint az ammónia termelődése a közeg kémhatását emelte volna, míg a tapasztalat azt mutatta, hogy az csökkent. Ez a kísérleti tapasztalat az E-3 reakció mellett szól, mivel a nitrogén-monoxid vízben

oldódva salétromos savat képez. Meg kell jegyezni, hogy maga az alacsony kémhatású közeg viszont a bakteriális denitrifikációra hat kedvezően.

Tehát feltételezhetjük, hogy az ECBR reaktorokban a denitrifikáció első, nagy reakciósebességű lépése, a nitrát redukciója nitritté, bakteriális folyamat, míg a nitrit továbbalakítása bizonyos mértékig az elektromos áram hatására történik.

### II.3. Az alkalmazott áramerősség hatásának vizsgálata

Az alkalmazott áramerősségek ismeretében kiszámítható a keletkezett hidrogén mennyisége. Ebből és a fogyott nitrát mennyiségéből meghatározható a reaktorok működése során alkalmazott áramerősség felhasználásnak gazdaságossága.

Mindkét reaktorelrendezés esetében azt tapasztaltuk, hogy a felhasznált áramerősség az elméleti szükséglet többszöröse. Megvizsgálva a hidrogénkoncentráció változtatásának hatását a denitrifikációs aktivitásra, azt tapasztaltuk (EC+BR reaktor, BMIX töltet), hogy a csökkenő hidrogén mennyiség egyértelműen negatív hatással volt a denitrifikációs aktivitásra (22. ábra).

Érdemes azonban azt is megjegyezni, hogy a BMIX és M3 töltet esetében közel azonos hidrogén felhasználási effektivitásokat (10. tábla) kaptunk az alkalmazott különböző áramerősségek esetében, az A4 és P11 esetében ez az érték viszont csökkent. Ez a jelenség valószínűleg az alkalmazott mikroorganizmusok élettani sajátságaira vezethetőek vissza, ahol egyrészt a mikroorganizmusok denitrifikációs enzimeinek, másrészt a hidrogén felhasználásért felelős hidrogenázoknak lehet szerepe e különbségek kialakulásában. Itt szintén feltételezésekre kell támaszkodnunk, mivel mérési adataink csak a törzsek denitrifikációs aktivitásáról vannak, mely szerint az A4 és a P11 törzsek alacsonyabb aktivitásokat mutattak, mint az M3 törzs, de különbségek adódhatnak a törzsek hidrogenáz aktivitásainak szintjeiben is.

Az alkalmazott áramerősség felhasználásának számításakor kapott értékek értelmezésekor figyelembe kell venni, hogy ezek az adatok csak tájékoztató jellegűek. Ugyanis a módszer (Sakakibara és tsai., 2001) szerint a termelődött hidrogén csak a bakteriális denitrifikáció során használódott fel. Azonban ez az állítás megkérdőjelezhető, mivel a hidrogén egy kemolitotróf körülmények között működő mikrobiális rendszerben várhatóan más szintézis folyamatok során is felhasználódhat, mint elektrondonor (asszimilatív folyamatok).

*II.4. Mi történik az üzemi periódus alatt a reaktor belsejében?*

A reaktorokra vonatkozó eddigi eredmények és számítások során a bioreaktorokban lévő folyamatokkal nem foglalkoztunk, csak az input és output oldalt vizsgáltuk. Az EC+BR reaktorok esetében elvégeztünk két kísérletsorozatot, melyek eredményeivel a reaktor belsejében lejátszódó folyamatokat jellemezhetjük. Így megvizsgáltuk a kevert mikrobiális populáció változását és a denitrifikáció folyamatának alakulását az oszlopmagasság függvényében.

A különböző töltetet tartalmazó EC+BR reaktorok esetében figyelemreméltó volt, hogy az M3 és BMIX töltetek hasonló szintű aktivitásokat produkáltak azonos áramerősségek és tartózkodási idők esetében. Ebben minden bizonnyal szerepe van annak a jelenségnek, hogy a kevert populáció összetétele jelentős változáson ment keresztül az üzemeltetés alatt és az M3 törzs (*Paracoccus pantotrophus*) lett a meghatározó faj. Ez a törzs jellemzését ismerve érthető, ugyanis egyértelmű utalások vannak a kemolitotróf anyagcseréjére.

Ez magyarázat arra, hogy az alkalmazott körülmények (anaerob, kemolititróf környezet) között az alkalmazott törzsek közül ez az izolátum képes legjobban elszaporodni és válik a "legsikeresebb" fajjá. A második legnagyobb mennyiségben előforduló törzs, az A4 izolátum fennmaradása (*Ochrobactrum anthropi*) szintén várható volt, mivel egyes szakirodalmi források szerint olyan helyekről izolálták, ahol egyébként kemolitotróf körülmények, de legalábbis alacsony szerves anyag forrás volt jelent (Gu, 1998).

A vizsgált kevert populáció harmadik kimutatható törzse az M2 jelű (*Pseudomonas stutzeri*) volt, ami viszont obligát heterotrófként jellemezett. Hipotézisünk szerint az M2 izolátum a biofilmben lejátszódó dinamikus folyamatoknak az eredményeként létrejövő elpusztult biomasszát, extracelluláris anyagokat használja fel.

A törzskeverék negyedik tagja a kemolitotróf anyagcserére képes P11 (*Paracoccus denitrificans*) volt. A törzs aránya az üzemi periódus alatt folyamatosan csökkent, annak végén nem volt számottevő mennyiségben kimutatható. Erre magyarázatot nem tudunk adni, bár megvizsgáltuk a törzsek esetlegesen egymásra kifejtett növekedés-gátló hatását, de nem találtunk ilyen effektust (24. ábra).

Ez a vizsgálat arra is választ adott, hogy miért őrzi meg stabilitását a reaktor. A töltetek mikroorganizmus-összetételét vizsgálva kiderült, hogy a BMIX töltet esetében a négy kiindulási törzsön kívül más, a nem steril üzemi körülményekből adódó esetleges külső fertőzésként a rendszerbe kerülő törzsek elenyésző mennyiségben fordultak elő. Ez a megfigyelés arra is bizonyíték, hogy a megvalósított biofilmtelepítési módszer ("C") hatékony

és stabil biokatalizátorok készítésére alkalmazható, a kezdeti magas biomassza előnyt ad az alkalmazott baktériumoknak a reaktor telítéséhez.

Az EC+BR reaktor elrendezés és a legmagasabb aktivitásokat mutató töltet, a BMIX baktériumkeverék esetében megvizsgáltuk, hogy a reaktoron belül hogyan szeparálódik a denitrifikáció folyamata (23. ábra). A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a reaktor kezdeti szakasza felelős a nitrát nitritté történő redukciójáért, míg a folyamat többi lépése a reaktor további szakaszaiban játszódik le. A reaktorban történő fizikai szeparáció, figyelembe véve, hogy folyamatos üzemű, átfolyós rendszerről van szó, az adott reakciók időbeni sorrendjét is jelzi.

*II.5. Reaktorok karbantartása – gyakorlati tapasztalatok*

Mint az elektrokémiai részben és a két reaktorelrendezésnél is ismertettük, az elektrokémiai cellák üzemeltetése során a kémiai precipitáció a legnagyobb probléma. Ez a kombinált, ECBR reaktorok esetében hosszú távon a cella ellenállásának olyan mérvű növekedéséhez vezethet, ami már a gyakorlati alkalmazás ellen szól. Az EC+BR reaktorok esetében a cellák leválaszthatóak a bioreaktorokról, egyszerűen és gyorsan tisztíthatók. Ezek a gyakorlati tapasztalatok az EC+BR reaktorok alkalmazása mellett szólnak, a viszonylag kisebb aktivitási eredmények ellenére.

*II.6. Üzemeltetési költségek*

A következőkben néhány számításon keresztül szeretnénk bemutatni a reaktorelrendezések gyakorlatban történő működtetésének gazdaságossági oldalát.

Azt feltételezve, hogy a rendszerek olyan helyeken lesznek alkalmazva, ahol vezetékes víz nincs, és a talajvíz (fúrt kutak) vize határérték feletti nitráttartalommal bír (100-200 mg $l^{-1}$ $NO_3$) a humán felhasználású ivóvizet palackozva lehet beszerezni, ennek költsége a következők szerint alakul:

2001 évi árakon számítva a nitráttal szennyezett településekre szállított ivóvíz önköltsége 8 Ft/liter körüli összeg. Ebben szerepel a tiszta víz ára, a palackozási költség és a szállítási költségek.

Egy négy fős család ivóvíz igénye kb. 10 liter/nap = 80 Ft/nap = 29 200 Ft/év.

Az összeg nem tartalmazza a palackok árát, a palackozó kapacitás kiépítéséhez szükséges beruházási költségeket és a palackok újra felhasználásával kapcsolatos gyűjtési, vagy egyszer használatos műanyag palackok esetén a hulladék-elhelyezési költségeket.

A Fővárosi Csatornázási Művek 112 Ft-ot számláz 1 $m^3$ vízért (1 liter 0,112 Ft), ebben az esetben 408.8 Ft az egy évre eső ivóvíz költsége.
Ez az összeg nem tartalmazza a karbantartást, készenléti díjat stb.

Az EC+BR reaktort alkalmazva (M3 töltet, 80 mA áramerősség, a korábban számított tartózkodási idő értéket (2.25 óra) és denitrifikációs aktivitásokat felhasználva
(0.179 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$), 150 mg $l^{-1}$ $NO_3$ szennyezettség mellett), 2001 évi áramárakat figyelembe véve az adatok a következőképpen alakulnak:
Egy M3 töltettel rendelkező, 600 ml térfogatú EC+BR reaktor egy év alatt 39.1 g $NO_3$-N elbontására képes. 4 felhasználó esetében napi 10 liter vizet számítva, egy év alatt 3640 l x 150 mg $NO_3$ –ot kell eliminálni, ami 123.3 g $NO_3$-N-nek felel meg (546 g $NO_3$). Ezt a mennyiséget egy, a példába szereplő reaktor 1148 nap alatt képes eliminálni.
Áramfogyasztás: 80 mA esetében, maximális feszültséggel számítva:
U = 15 V; t = 27552 h (1148 nap); I = 0.08 A;

Az elektrokémiai cella által ideális esetben felvett energia nagysága:
W = U x I x t = 15 x 0.08 x 27552
W = 33 062.4 Wh = 33.062 kWh
1 kWh ára: 18 Ft : 33.062 kWh = 595.12 Ft.

(Mivel egy reaktor a számított $NO_3$-N mennyiséget 1148 nap alatt képes eliminálni, ezért 3-4 reaktorra van szükség.)
Ezekből a számításokból kiderül, hogy egy négy fős családdal számítva, a bemutatott EC+BR reaktor esetében a víztisztítás összege jóval kevesebb, mint a hasonló mennyiségű palackozott víz előállítási költsége, illetve két laborszintű reaktorral megoldható ez az igény.
(A számítási adatok hálózati áramforrás alkalmazásán és költségein alapulnak. Mivel az elektrokémiai cella egyenárammal működik, ezért szükséges egy egyenirányító alkalmazása is. Ennek egyszeri költsége 1500 HUF körüli érték (csengő transzformátor). A cella működtetésének anyagi vonzata, figyelembe véve bizonyos hatásfok- és veszteség-számításokat, kb. 5-10%-kal lesz magasabb).

Abban az esetben, ha az adott helyen nincs hálózati áramforrás, a cellák működtethetőek akkumulátorról. Ennek költségvonzata a következők szerint alakul:
Egy gépkocsi akkumulátor 8 000 HUF körüli értéken már kapható, jellemzői: 12 V és 55 Ah áramleadás. Ez azt jelenti, hogy 12 V feszültség mellett 0.08 A áramot 687,5 órán keresztül

képes biztosítani (29 nap ~ 1 hónap.), ami éves szinten 12 db új akkumulátort jelent, ami 96 000 HUF. Ez az összeg már lényegesen magasabb, mint bármelyik ismertetett módszer költsége, viszont abban az esetben, ha a felhasználó feltölti hálózati áramról az akkumulátort, akkor nem kell 12 db-ot venni.

Ezek a számított adatok azonban nem tartalmazzák a víz utókezelési költségeit, amely kérdéskörre a továbbiakban térünk ki.

*II.7. A kifejlesztett reaktor elrendezések és a gyakorlati alkalmazhatóság kérdése*

Az itt bemutatott reaktorelrendezések fejlesztése nem tekinthető befejezettnek, a gyakorlati felhasználásra alkalmasnak, mivel a nitrátmentesített víz utókezelést igényel a lejövő baktérium-mennyiség miatt. Azonban, mint egy ivóvíztisztító berendezés biológiai modulja, mindenképpen számításba jöhet. A gyakorlati alkalmazáshoz meg kell vizsgálni a méretnövelés kérdését. Az elrendezés elektrokémiai részénél, a cellánál a fizikai méretnövelés és a termelt hidrogén gáz között elméleti számítások szerint egyenes arányosság van, ugyanis az elektródok felületének növelésével lehet a termelt hidrogén mennyiségét emelni (azonos áramerősségek és feszültségek esetén).

Ahogy bemutattuk, a felhasznált árammennyiség költsége az alkalmazott feszültségtől, áramerősségtől és az időtől függ (UxIx T). Az áram és feszültség értékek függnek a fogyasztó ellenállásától (R=U/I), az ellenállás pedig az elektródok közti távolságtól. Tehát megtartva az alkalmazott cellák elektród-távolságát, igen nagyméretű, viszont kis áramfelvételű elektrokémiai cellákat lehet készíteni, ahogy az a galvániparban is történik.

Magának a bioreaktornak (EC+BR elrendezés) a méretnövelése a szokásos fejlesztési és mérési lépéseket igényeli. Meg kell határozni a reaktor ideális fizikai paramétereit, a méretnövelés esetében várható aktivitásváltozást stb. A biofilmképzés esetében, úgy véljük, a bemutatott “C” módszer mérettől függetlenül, gyors és biztonságos telepítést biztosíthat.

# Összefoglalás

A bemutatott dolgozatban egy kemolitotróf, hidrogén-felhasználó biológiai denitrifikáló rendszert mutattunk be, elemezve kifejlesztését, annak működését, aktivitását és egyéb tulajdonságait. Megállapításainkat az alábbiakban foglaljuk össze:

- Az általunk izolált mikroorganizmusok stabil és aktív denitrifikáló biofilmet képesek létrehozni szilárd felszínen.
- A hordozó granulált aktív szén (GAC) adszorbciós képességeit és a reaktorok üzemeltetése során alkalmazott kemolitotróf körülményeket kihasználva stabil, magas denitrifikációs aktivitású biofilmet lehet létrehozni.
- A granulált aktív szén hordozó alkalmazása esetén nem merülnek fel a reaktorok üzemeltetése alatt olyan fizikai jellegű problémák, melyek egyébként csökkenthetnék az aktivitást.
- A reaktorok stabil működése azt jelzi, hogy az elektrokémiai cellák a gyakorlatban is alkalmazhatók a kemolitotróf denitrifikáció hidrogénigényének biztosítására, működtetésük egyszerű, költségigényük alacsony.
- Az általunk kifejlesztett ECBR elrendezésben, a katódtérben elhelyezett bioaktív töltet működőképes volt, alacsony tartózkodási idők mellett magas denitrifikációs aktivitásokat mutatva (HRT=0.28 óra, aktivitás=0.377 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$, 50 mA, BMIX töltet).
- A kétféle reaktorelrendezés összehasonlítása során megállapítottuk, hogy azonos mikroflórát tartalmazó töltetek használata esetében a kombinált, ECBR reaktorok esetében tapasztalhatóak nagyobb aktivitások (EC+BR: 0.05 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ és ECBR: 0.30 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$, 50 mA esetében).
- Kísérleti úton bizonyítottuk, hogy ebben az esetben a reaktor denitrifikációs aktivitásának kialakításában biológiai és elektrokémiai folyamatok vesznek részt.
- A reaktorban lejátszódó folyamatokat vizsgálva bemutattuk, hogy a denitrifikáció szakaszai térben elkülönülnek, a nitrát redukciója játszódik le az elrendezés kezdeti részén, majd a nitrit redukciója következik.
- Megvizsgáltuk a BMIX törzskeverék populáció összetételének változást az üzemi szakasz különböző időpontjaiban. Azt tapasztaltuk, hogy a nem-steril körülmények ellenére csak a kiindulási izolátumok maradnak fenn, ezek közül is a kemolitotróf szaporodásra képes *Paracoccus pantotrophus* (M3) izolátum fordul elő a legnagyobb mennyiségben.

- A két reaktorelrendezést gyakorlati szempontból összehasonlítva megállapítottuk, hogy a kémiai precipitációk miatt az ECBR reaktorok használhatósága korlátozott, míg EC+BR reaktorok ilyen szempontból minimális karbantartást igényelnek.
- A reaktorok üzemeltetése alacsony költségű, ami megerősíti a jövőbeli gyakorlati alkalmazás lehetőségét. A méretnövelés is megoldható, mivel az elektrokémiai cella esetében nem jelent megemelt költségeket a nagyobb méret.
- A reaktorok működtetése során kapott és számított eredmények a nemzetközi szakirodalomban megjelent adatokkal hasonló tartományba esnek, illetve a víz elektrolízise során keletkező hidrogénen alapuló denitrifikáló rendszerekkel összehasonlítva, azoknál minden tekintetben jobb eredményeket kaptunk (15. tábla).

**15.tábla. Hidrogén-függő denitrifikáló rendszerek összehasonlítása**

| **Hidrogénforrás** | **Reaktor elrendezés - hordozó** | **Baktériumok** | **Denitrifikációs aktivitás** | **Tartózkodási idő (HRT)** | **Hivatkozás** |
|---|---|---|---|---|---|
| Külső forrás (gázpalack) | Felületi rögzítés, homokágy | Kevert populáció | 0.55 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 4.5 óra | Kurt és tsai. 1987 |
| Külső forrás (gázpalack) | Felületi rögzítés, poliuretán hordozó | Kevert populáció | 0.5 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 3-5 óra | Dries 1988 |
| Külső forrás (gázpalack) | Membrán reaktor | Kevert populáció | 0.16 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 0.75 óra | Lee és Rittmann 2000 |
| Külső forrás (gázpalack) | Rögzített sejtes rendszer (gél) | *Alcaligenes eutrophus* | 0.60 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 2.0 óra | Chang és tsai. 1999 |
| Külső forrás (gázpalack) | Homok ágyas biofilm reaktor | Kevert populáció | 0.25 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 1-2 óra | Gros és Treutler 1986, Gros és tsai 1986 |
| Víz elektrolízise | Biofilm reaktor | Kevert populáció | 0.01 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 9.0 óra | Sakakibara 1994b |
| Víz elektrolízise | Rögzített sejtes reaktor (gél) | Kevert populáció | 0.08 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | | Feleke és tsai. 1997 |
| Víz elektrolízise | Biofilm reaktor | Egyedi izolátumok | 0.20 kg N $m^{-3}$ $d^{-}$ | 2.5 óra | * Kiss és tsai 2000, Szekeres és tsai. 2001 |
| Víz elektrolízise | Biofilm reaktor | Egyedi izolátumok | 0.38 kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$ | 0.3 óra | * Kiss és tsai 2000, Szekeres és tsai. 2001 |

# Hivatkozások jegyzéke


Adler J. (1966) Chemotaxis in bacteria. *Science* 153:708-716.

Aragno M. and Schlegel H. (1992) The mesophilic hydrogen-oxidizing (Knallgas) bacteria. In *The Prokaryotes*, A. Balows, H. C. Trupper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (eds), Springer-Verlag, New York,(1) 344-384.

Armenante P. M., Colella L. S., Kafkewitz D. és Larkin M. J. (1996) Effect of a biofilm on the adsorption of 4-chlorophenol on activated carbon *Appl Microbiol Biotechnol.* 46:667–672.

Arvin E. and Kristensen H.G. (1982) Precipitation of calcium phosphate and pH-effect in denitrifying biofilms. *Water Science and Technology* 14:1505-1508.

Bardischewsky F. és Friedrich C.G. (2001) The shxVW locus is essential for oxidation of inorganic sulfur and molecular hydrogen by Paracoccus pantotrophus GB17: a novel function for lithotrophy. *FEMS Microbiology Letters* 202:215-220.

Barreiros A.M., Rodrigues C.M. Crespo J.P.S.G. és Reis M.A.M. (1998) Membrane bioreactor for drinking water denitrification. *Bioprocess Engineering* 18:297-302.

Bartlett D. H., Wright M.E. Yayanos A.A. és Silverman M. (1989) Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature* 342(6249):572-4.

Batchelor B. és Lawrence A.W. (1978) A kinetic model for autotrophic denitrification using elemental sulfur. *Water Research* 12:1075-1084.

Baumann B., Snozzi M., Van der Meer J.R. és Zehnder A.J.B. (1997) Development of stable denitrifying cultures during repeated aerobic-anaerobic transient periods. *Water Research* 31:1947-1954.

Baumann B., Snozzi M., Zehnder A.J. és Van Der Meer J.R. (1996) Dynamics of denitrification activity of Paracoccus denitrificans in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J Bacteriol*. 178(15):4367-74.

Berks B.C. és Ferguson S.J. (1991) Simplicity and complexity in electron transfer between NADH and c-type cytochromes in bacteria. *Biochem Soc Trans*. 19(3):581-8.

Berks B.C., Richardson D.J., Robinson C., Reilly A., Aplin R.T. és Ferguson S.J. (1994) Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from Thiosphaera pantotropha. *Eur J Biochem.* 220(1):117-24.

Bos R., van der Mei H.C. és Busscher H.J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 23:179-230.

Brözel V.S., Pietersen B. és Cloete T.E. (1995) Resistance of bacterial cultures to non-oxidising water treatment bactericides by adaptation. *Water Science and Technology*, 31(5-6):169-175.

Caldeira M., Heald S.C., Carvalho M. F., Vasconcelos I., Bull A. T. és Castro P.M.L. (1999) 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:722-729.

Camper AK, LeChevallier MW, Broadaway SC, McFeters GA. (1985) Growth and persistence of pathogens on granular activated carbon filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(6):1378-82.

Carr G.J. és Ferguson S.J.(1990) The nitric oxide reductase of Paracoccus denitrificans. *Biochem J.* 269(2):423-9.

Carucci A., Kühni M., Brun R., Carucci G., Koch G., Majone M. és Siegrist H. (1999) Microbial competition for the organic substrates and its impact on EBPR systems under conditions of changing carbon feed. *Water Science and Technology* 39(1):75-85.

Casey E., Glennon B. és Hamer G. (2000) Biofilm development in a membrane-aerated biofilm reactor: effect of intra-membrane oxygen pressure on performance. *Bioprocess Engineering* 23(5):457-465.

Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E. és Youngs V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6:71-80.

Cervantes F.J., De la Rosa D.A. és Gómez J. (2001) Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresource Technology* 79(2):165-170.

Chang C.C., Tseng Sz.K. és Huang H.K. (1999) Hydrogenotrophic denitrification with immobilized Alcaligenes eutrophus for drinkig water treatment. *Bioresource Technology* 69:53-58.

Chaudhry G.R. és MacGregor C.H. (1983) Escherichia coli nitrate reductase subunit A: its role as the catalytic site and evidence for its modification. *J. Bacteriol*.154(1):387-94.

Cieslak T.J., Drabick C.J. és Robb M.L. (1996) Pyogenic infections due to Ochrobactrum anthropi. *Clin. Infect. Dis*. 22(5):845-7.

Coyle C.L., Zumft W.G., Kroneck P.M., Korner H. és Jakob W. (1985) Nitrous oxide reductase from denitrifying Pseudomonas perfectomarina. Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem*. 153(3):459-67.

Crawford J.J., Traina S. J. és Tuovinen O. H. (1998) Biodegradation of benzoate with nitrate as electron acceptor at different redox potentials in sand column microcosms. *Biology and Fertility of Soils 27(1): 71-78.*

Demirakca S., Dutsch J., Knothe C., Magsaam J., Reiter H.L., Bauer J. és Kuehl P.G. (1996) Inhaled nitric oxide in neonatal and pediatric acute respiratory distress syndrome: dose response, prolonged inhalation, and weaning. *Crit. Care. Med.* 24:1913-1919.

Dincer K, Fikret K. (2000) Effects of operating parameters on performances of nitrification and denitrification processes. *Bioprocess Engineering* 23:75-80.

Dries D., Liessens J., Verstrate W., Stevens P., de Vos P. és Ley J. (1988) Nitrate removel from drinking water by means of hydrogenotrophic denitrifiers in a polyurethane carrier reactor. *Water Supply* 6:181-192.

Drtil M., Németh P., Kucman K., Bodík I. és Kasparek V. (1995) Acidobasic balances in the course of heterotrophic denitrification. *Wat. Res.* 29: 1353-1360.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. és Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 28:350-356.

Eberz G., Hogrefe C., Kortluke C., Kamienski A. és Friedrich B. (1986) Molecular cloning of structural and regulatory hydrogenase (hox) genes of Alcaligenes eutrophus H16. *J. Bacteriol*. 168(2):636-41.

Eggers E. és Terlouw T. (1979) Biological denitrification in fluidized bed with sand as carrier material. *Water Res.* 13:1077-1090.

Eisentraeger A., Klag P., Vansbotter B., Heymann E. és Dott W. (2001) Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor. *Wat. Res*. 35(9):2261–2267.

Feleke Z., Araki K., Sakakibara Y., Watanabe T. és Kuroda M. (1998) Selective reduction of nitrate to nitrogen gas in a biofilm-electrode reactor. *Wat. Res.* 32:2728-2734.

Fenderson F.F., Kumar S., Adman E.T., Liu M.Y., Payne W.J. és LeGall J. (1991) Amino acid sequence of nitrite reductase: a copper protein from Achromobacter cycloclastes. *Biochemistry* 30(29):7180-5.

Fishbein W.N. (1967) Determination of hydroxylamine with Nessler reagent. *Anal. Chim. Acta.* 37(4):484-9

Fletcher M. (1989) Surfaces and bacteria in natural environments – Nature's banquet table? *Physiology of immobilized cells*. Elsevier publication.

Forget P. (1974) The bacterial nitrate reductases. Solubilization, purification and properties of the enzyme A of Escherichia coli K 12. *Eur. J. Biochem*.42(2):325-32.

Freeman A. és Lilly M.D. (1998) Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology* 23:335–345.

Friedrich C.G., Quentmeier A., Bardischewsky F., Rother D., Kraft R., Kostka S. és Prinz H. (2000) Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of Paracoccus pantotrophus GB17. *J. Bacteriol*. 182(17):4677-87.

Fuchs W., Schatzmayer G., Braun R. (1997) Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor *Applied Microbiology and Biotechnology* 48(2):267-274.

Gavrilescu M. és Macoveanu M. (2000) Attached-growth process engineering in wastewater treatment. *Bioprocess Engineering* 23. 95-106.

Gemeiner P, Rxova-Benkova L., Svec F. és Norrolow O. (1994) Natural and synthetic carriers suitable for immobilization of viable cells, active organelles, and molecules. In: *Immobilized Biosystems Theory and Practical Applications*. Velik I.A. and McLean R.J. (eds.) Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK. pp., 1-128.

George S.J., Allen J.W., Ferguson S.J. és. Thorneley R.N (2000) Time-resolved infrared spectroscopy reveals a stable ferric heme-NO intermediate in the reaction of Paracoccus pantotrophus cytochrome cd1 nitrite reductase with nitrite. *J. Biol. Chem*. 275:33231-7.

Germonpre R., Liessens J., Verstraete W., Stevens P. és de Vos P. (1992) Methylotropic and hydrogenotropic denitrification at the blankart part. *Water Supply* 10:53-64.

Gildemeister OS, Zhu BC, Laine RA. (1994) Chitovibrin: a chitin-binding lectin from Vibrio parahemolyticus. *Glycoconj. J*. 11(6):518-26

Glockner A.B. és Zumft W.G. (1996) Sequence analysis of an internal 9.72-kb segment from the 30-kb denitrification gene cluster pf Pseudomonas stutzeri. *Biochimica et Biophysica Acta* 1277:6-12.

Gómez M. A., González-Lópeza J. és Hontoria-Garcíab E. (2000) Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter .*Journal of Hazardous Materials* 80(1-3):69-80

Goretski J. és Hollocher T.C. (1988) Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem*. 263(5):2316-23.

Gregory L.G., Karakas-Sen A., Richardson D.J. és Spiro S. (2000) Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 183(2):275-9.

Gros H. and Treutler K. (1986) Biological denitrification process with hydrogen-oxidizing bacteria for drinking water treatment. *Aqua* 5:288-290.

Gros H., Schnoor G. and Rutten P. (1986) Nitrate removel from groundwater by autotrophic microorganisms. *Water Supply* 4:11-21.

Gu J.D., Roman M., Esselman T. és Mitchell R. (1998) The role of microbial biofilms in deterioration of space station candidate materials. *Int. Biodeterior Biodegradation*. 41(1):25-33.

Heiss B., Frunzke K. és Zumft W.G. (1989) Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome bc complex of nitrate-respiring (denitrifying) Pseudomonas stutzeri. *J. Bacteriol.* 171(6):3288-97.

Hochstein L.I. és Tomlinson G.A. (1988) The enzymes associated with denitrification. Review. *Annu. Rev. Microbiol*. 42:231-61.

Hole U.H., Vollack K.U., Zumft W.G., Eisenmann E., Siddiqui R.A., Friedrich B. és Kroneck P.M. (1996) Characterization of the membranous denitrification enzymes nitrite reductase (cytochrome cd1) and copper-containing nitrous oxide reductase from Thiobacillus denitrificans. *Arch. Microbiol.* 165(1):55-61.

Holmes B., Popoff M., Kiredjian M. és Kersters K. (1988) Ochrobactrum anthropi gen. nov., sp. nov. from human clinical speciments and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:40-416

Huang H. K. és Tseng S. K. (2001) Nitrate reduction by Citrobacter diversus under aerobic environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55(1):90-94

Jafferji A., Sami M., Nuttall J., Ferguson S.J., Berks B.C. és Fulop V. (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of nitrous oxide reductase from Paracoccus pantotrophus.

Johnson M.K., Bennett D.E., Morningstar J.E., Adams M.W. és Mortenson L.E. (1985) The iron-sulfur cluster composition of Escherichia coli nitrate reductase. *J. Biol. Chem*. 260(9):5456-63.

Kesserű P. Kiss I. Bihari Z. (2002) The effect of NaCl and some heavy metals on denitrification activity of Ochrobactrum anhtropi. *J. Basic. Microbiol* (kiadás alatt).

Kirstein D., Kirstein L., Scheller F., Borcherding H., Ronnenberg J., Diekmann S., Steinrucke P. (1999) Amperometric nitrate biosensors on the basis of Pseudomonas stutzeri nitrate reductase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 474:43–51.

Kiss-Tóth, E., Kálmán, M., Polyák, B., Büdi, Á., Kiss I. (1996) Eljárás L(-)almasav elõállítására rekombináns E. coli baktérium felhasználásával. *Találmány. Ügyiratszám P 94 02689*.

Knuttel K., Schneider K., Schlegel H.G. és Muller A. (1989) The membrane-bound hydrogenase from Paracoccus denitrificans. Purification and molecular characterization. *Eur. J. Biochem.* 179(1):101-8.

Kobayashi K., Koppenhofer A., Ferguson S.J., Watmough N.J. és Tagawa S. (2001) Intramolecular electron transfer from c heme to d1 heme in bacterial cytochrome cd1 nitrite reductase occurs over the same distances at very different rates depending on the source of the enzyme. *Biochemistry*. 40(29):8542-7.

Kortlüke C., Horstmann K., Schwartz E., Rohde M., Binsack R.és Friedrich B. (1992) A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of Alcaligenes eutrophus H16. *J. Bacteriol*. 174:6277-6289.

Kurt M., Dunn I.J. and Bourne J.R. (1987) Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with $H_2$ in fluidized-bed biofilm reactor. *Biotechnol. Bioeng*. 29:493-501.

Lauch, R.P. and Guter G.A. (1986) Ion exchange for the removel of nitrate from well water. *J. Am. Water Works Assoc.* 78:83-88.

Lee D., Lee I., Choi Y. és Bae J. (2001) Effects of external carbon source and empty bed contact time on simultaneous heterotrophic and sulfur-utilizing autotrophic denitrification. *Process Biochemistry* 36(12):1215-1224.

Lee K-C. és Rittmann B.E. (2000) A novel hollow-fibre membrane biofilm reactor for autohydrogenotrophicdenitrification of drinking water. *Water Science and Technology* 41:(4-5) 219-226.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. és Randall R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275

Ludwig W., Mittenhuber G. és Friedrich C.G. (1993) Transfer of Thiosphaera pantotropha to Paracoccus denitrificans. *Int. J. Syst. Bacteriol*.43(2):363-7.

Mason C.A., Ward G., Abu-Salah K., Keren O. és Dosoretz C.G. (2000) Biodegradation of BTEX by bacteria on powdered carbon. *Bioprocess Engineering* 23.334-336.

Mateju V.; Cizinska S.; Krejci J.; Janoch T. (1992) Biological water denitrification - A review *Enzyme Microb. Technol.* 14(3):170-183.

Matsuda N., Agui W., Ogino K., Kawashima N., Watanabe T., Sakai H. és Abe M. (1996) Disinfection of viable Pseudomonas stutzeri in ultrapure water with ion exchange resins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7:91-100.

McEldowney D.C., Fletcher M. (1987). Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Arch. Microbiol*. 148(1):57-62.

McNally D.L., Mihelcic J.R. és Lueking D.R. (1999) Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions, *Chemosphere* 38:1313-1321.

Merzouki M., Delgenes J.P., Bernet N., Moletta R. és Benlemlih M. (1999) Polyphosphate-Accumulating and Denitrifying Bacteria Isolated from Anaerobic-Anoxic and Anaerobic-Aerobic Sequencing Batch Reactors. *Curr. Microbiol.* 38:9-17.

Metheringham R. és Cole J.A. (1997) A reassessment of the genetic determinants, the effect of growth conditions and the availability of an electron donor on the nitrosating activity of Escherichia coli K-12. *Microbiology*. 143(8):2647-56.

Minh H. és Wiley D.E. (1998) The relationship between membrane cleaning efficiency and water quality. *Journal of Membrane Science* 145: 99-110.

Moir J.W.B. (1999) Cytochrome c' from Paracoccus denitrificans: spectroscopic studies consistent with a role for the protein in nitric oxide metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1430:65-72.

Moir J.W.B., Richardson D.J. és Ferguson S. J. (1995) The expression of redox proteins of denitrification in Thiosphaera pantotropha grown with oxygen, nitrate, and nitrous oxide as electron acceptors. *Archives of Microbiology* 164 (1):43-49.

Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H. és Schleifer K.H. (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of Paracoccus spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 62(12):4329-39.

Nicolella C., van Loosdrecht M.C.M. és Heijnen S. J. (2000) Particle-based biofilm reactor technology. *TIBTECH* 18:312-320

Nokhal T.H. és Schlegel H.G. (1980) The regulation of hydrogenase formation as a differentiating character of strains of Paracoccus denitrificans. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 46(2):143-55.

Okochi M., Lim T.-K., Nakamura N. és Matsunaga T. (1997)Electrochemical disinfection of drinking water using an activated-carbon-fiber reactor capable of monitoring its microbial fouling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 18-22.

Osman S.F., Fett W.F. és Dudley R.L. (1994) Structure of the exopolysaccharide of Pseudomonas stutzeri strain ATCC 17588. *Carbohydr. Res*. 265(2):319-22.

Osman S.F., Fett W.F. és Dudley R.L. (1994) Structure of the exopolysaccharide of Pseudomonas stutzeri strain ATCC 17588. *Carbohydrate Research* 265:319-322.

Paerl H.W. és Pinckney .L. (1996) A Mini-review of Microbial Consortia: Their Roles in Aquatic Production and Biogeochemical Cycling. *Microb. Ecol.* 31(3):225-47.

Pintar A., Batista J. és Levec J. (2001) Catalytic denitrification: direct and indirect removal of nitrates from potable water. *Catalysis Today* 66: 503-510.

Priestley G.S., Holland J., Marsh B. és Wilson R. (1996) Pseudomonas stutzeri septicaemia in association with a bullous skin eruption. *Anaesth. Intensive Care*. 24:710-3.

Ramos J.M., Roman A., Fernandez-Roblas R., Cabello A. és Soriano F. (1996) Infection caused by Ochrobactrum anthropi. *Clin. Microbiol. Infect.* (3):214-216.

Ranghino G., Scorza E., Sjogren T.,. Williams P.A, Ricci M. és Hajdu J. (2000) Quantum mechanical interpretation of nitrite reduction by cytochrome cd1 nitrite reductase from Paracoccus pantotrophus. *Biochemistry*. 39:10958-66.

Sakakibara Y. and Kuroda M. (1993) Electric prompting and control of denitrification. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 535-537.

Sakakibara Y. és Nakayama T. (2001) A novel multi-electrode system for electrolytic and biological water treatments: electric charge transfer and application to denitrification. *Water Res*. 35(3):768-78.

Sakakibara Y., Araki K., Tanaka T., Watanabe T. és Kuroda M. (1994) Denitrification and neutralization with an electrochemical and biological reactor. *Wat. Sci. Tech.* 30:151-155.

Sapshead L.M. és Wimpenny J.W. (1972) The influence of oxygen and nitrate on the formation of the cytochrome pigments of the aerobic and anaerobic respiratory chain of Micrococcus denitrificans. *Biochim Biophys Acta*. 267(2):388-97.

Schill N., Schlatter C., Comninellis C. és von Stockar U. (1994) Development of a probe for amperometric measurement of dissolved hydrogen concentration", 45th annual meeting of ISE, Porto, Portugal, Proc. III-45, Vol. 1.

Scott J.A, Karanjkar A.M. és Rowe D.L. (1995) Biofilm covered granulated activated carbon for decontamination of streams containing heavy metals and organic chemicals. *Minerals Engineering*, 8: 221-230.

Snell F.D. és Snel C.T. (1949) Colrimetric method of analysis, D. Van Nostrand Company, New York. pp. 802-807.

Soares M.I.M., Belkin S., Abeliovich A. (1991) Denitrification in laboratory sand columns: carbon regime, gas accumulation and hydraulic properties. *Water Res.* 25. 325-332.

Sorokin D.Y., Teske A., Robertson L.A. és Kuenen J.G. (1999) Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 113-123.

Spiro S., Roberts R.E. és Guest J.R. (1989) FNR-dependent repression of the ndh gene of Escherichia coli and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 3(5):601-8.

Standard methods for the examination of water and wastewater (1992) Microbial examination 9-1, 9-18. (Edited: Greenberg A.E., Clesceri L.S. és Eaton A.D.).

Stewart V. és Berg B.L. (1988) Influence of nar (nitrate reductase) genes on nitrate inhibition of formate-hydrogen lyase and fumarate reductase gene expression in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol*. 170(10):4437-44.

Stouthamer A.H. (1976) Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microb Physiol.* 14(11):315-75.

Stouthamer A.H., de Boer A.P., van der Oost J. és van Spanning R.J. (1997) Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in Paracoccus denitrificans and related bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 71(1-2):33-41.

Stumm W. and Morgan J. (1981) Aquatic Chemistry, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

Szekeres Sz., Kiss I., Kalman M. és Soares M.I.M. (2002) Microbial population in an hydrogen dependent denitrification reactor. *Wat.Res*. (közlés alatt).

Takacs M., Rakhely G, Kovacs K.L (2001) Molecular characterization and heterologous expression of hypCD, the first two [NiFe] hydrogenase accessory genes of Thermococcus litoralis. *Archives of Microbiology* 176(3):231-235.

Takayama K. (1998) Biocatalyst electrode modified with whole-cells of P. denitrificans for the determination of nitrate. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45: 67-72.

Tall B.D., Williams H.N., George K.S., Gray R.T. és Walch M. (1995) Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Can. J. Microbiol*. 41(7):647-54.

Tandlich R., Brená B. és Dercová K. (2001) The effect of terpenes on the biodegradation of polychlorinated biphenyls by Pseudomonas stutzeri. *Chemosphere* 44:1547-1555.

Trageser M. és Unden G. (1989) Role of cysteine residues and of metal ions in the regulatory functioning of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in Escherichia coli. *Mol. Microbiol*. 3(5):593-9.

Urbani A., Gemeinhardt S., Warne A. és Saraste M. (2001) Properties of the detergent solubilised cytochrome c oxidase (cytochrome cbb3) purified from Pseudomonas stutzeri. *FEBS Letters* 508: 29-35.

van der Hoek J.P. és Klapwijk A. (1988) The use of a nitrate selective resin in the combined ion exchange/biological denitrification process for nitrate removal from ground water. *Wat. Supply* 6: 57-62.

Vijayan M. és Chandra N. (1999) Lectins. *Current Opinion in Structural Biology* 9:707-714.

Volokita M., Abeliovich A., és Soares M.I.M. (1996) Denitrification of ground water using cotton as energy source. *Water Science and Technology* 34:379-385

Wang C.-C. és Lee C.-M. (2001) Denitrification with acrylamide by pure culture of bacteria isolated from acrylonitrile¯butadiene¯styrene resin manufactured wastewater treatment system. *Chemosphere*, 44: 1047-1053

Wang R., Healey F.P. és Myers J. (1971) Amperometric measurement of hydrogen evolution in Chlamydomonas. *Plant. Physiol*. 48:108-110.

Warren J.B. és Higenbottam T. (1996) Caution with the use of inhaled nitric oxide. *The Lancet* 348: 629-630

Werner P. és Hambsch B. (1989) Determination of the growth rate of bacteria in monitoring denitrification plants for drinking water processing. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg*. 81:161-74.

Wilhelm E., Battino R. és Wilcock R.J. (1977) Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev*. 77:219-262.

Yang P.Y., Nitisoravut S. és Wu J.Y.S. (1995) Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt conditions. *Wat. Res.* 29: 1525-1532.

Yeom I.T, Nah Y.M. és Ahn K.H (1999) Treatment of household wastewater using an intermittently aerated membrane bioreactor. *Desalination* 124: 193-204

Zapol M.W, Rimar S, Gillis N, Marletta M. és Bosken C.H. (1994) Nitric oxide and the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149: 1375-1380

Zellner G., Feuerhake E., Jördening H.-J. és Macario, E.C (1995) Denitrifying and methanogenic bacteria in the biofilm of a fixed-film reactor operated with methanol/nitrate demonstrated by immunofluorescence and microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(3): 566-571.

Zubkov M.V.és Sleigh M.A. (1999) Growth of Amoebae and Flagellates on Bacteria Deposited on Filters. *Microbial Ecology Volume* 37(2):107-115.

Zumft W.G. és Matsubara T. (1982) A novel kind of multi-copper protein as terminal oxidoreductase of nitrous oxide respiration in Pseudomonas perfectomarinus. *FEBS Letters* 148 (1):107-112.

Zumft W.G., Gotzmann D.J. és Kroneck P.M. (1987) Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite-reducing system in Pseudomonas aureofaciens. *Eur. J. Biochem*. 168(2):301-7.

# Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

szüleimnek és szeretteimnek, amiért tanulmányaim során mindvégig támogattak és biztattak;

témavezetőmnek, dr. Kálmán Miklósnak, hogy irányította és hasznos tanácsaival elősegítette kutatásaimat, illetve hogy kísérletes munkámat az általa vezetett intézetben lehetővé tette;
Prof. M. Ines Soaresnek, hogy irányította és hasznos tanácsaival elősegítette a Jacob Blaustein Institute for Desert Research-ben (Ben Gurion University of the Negev, Sede Boqer, Israel) végzett laboratóriumi munkámat;

Kesserű Péter és Bihari Zoltán Ph.D. hallgatónak a lelkesítő támogatásért és a kiváló ötletekért;

Tóth Máriának és Gárgyán Anikónak, akiknek a mindennapi segítsége, tanácsai és útmutatása, no meg türelme nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el;

David Durham-nek a publikációk kéziratának angol nyelvi lektorálásáért;

Prof. Pungor Ernőnek és Prof. Biacs Péternek, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány volt és jelenlegi főigazgatójának, hogy tanulmányaimhoz ösztöndíjat biztosítottak;

Dr. Polyák Bélának, hogy a Biotranszformációs laboratóriumban a kutatásaimhoz a körülményeket biztosította;

a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézete és a Szegedi Tudományegyetem valamennyi munkatársának, aki munkám sikeréhez bármilyen formájában hozzájárult.

## Saját közlemények jegyzéke

**Kiss I.**, Szekeres Sz., Bejerano T.T. és Soares M.I.M. (2000). Hydrogen-dependent denitrification: preliminary assessment of two bio-electrochemical systems. *Water Science and Technology* 42:373-379.

Szekeres Sz., **Kiss I.**, Bejerano T.T. és Soares. M.I.M. (2001). Hydrogen-dependent denitrification in a two-reactor bio-electrochemical system. *Water Research* 35:715-719.

Szekeres Sz., **Kiss I.,** Kalman M., Soares M.I.M. (2002). Microbial population in an hydrogen-dependent denitrification reactor. *Water Research* (Elfogadott közlemény).

## Summary

The objective of this study was to develop an efficient, cost-effective microbial process for the removal of nitrate from polluted groundwater. A small-scale biological system was produced in which denitrification is achieved by autotrophic bacteria that use hydrogen as their energy source.

Generation of the required hydrogen is an integral part of the denitrification set-up and is achieved by electrolysis of the water to be treated in an electrolysis cell. The main conclusions that can be drawn from the results:

- The isolated and selected bacteria can develop a stable biofilm characterized by high denitrification activity on the solid surface.
- The presented biofilm set-up method is available for the development of a biofilm of high activity of on the surface of granulated activated carbon (GAC), based on its adsorption capacity. Under the applied anaerobic, autotrophic conditions the biofilm established on GAC preserves its stability.
- When GAC is applied, the physical problems observed with other carriers do not appear.
- The stable operation of such bioreactors indicates the practical applicability of electrochemical cells for providing a hydrogen source for the denitrification process. The maintenance of the cells is simple, and their running costs are low.
- The GAC covered in active biofilm placed in the cathodic chamber in the ECBR (*E*lectro*C*hemical *B*io*R*eactor) reactor set-up displayed long and high activity with short hydraulic residual times.
- The higher activities of the ECBR set-up are due to electrochemical reactions, including nitrite reduction.
- Although the calculated denitrification is higher in the ECBR type, the EC+BR reactor has practical advantages such as easier cleaning of the electrochemical cell.
- The bioreactors have low maintenance costs which indicates the possibility of their future practical application. Scaled-up processes can be developed, with the same maintenance costs as for electrochemical cells.
- The processing data reveal that the calculated denitrification activities are in the range of levels given in the literature. However, in comparison with data from other denitrification systems based on water electrolysis, the denitrification activities are higher and the hydraulic retention times are shorter. Such a comparison is presented in the following table:

**Comparison of hydrogen-dependent biological denitrification systems**

| **Hydrogen source** | **Reactor set-up, carrier** | **Bacteria** | **Denitrification activity** (kg N $m^{-3}$ $d^{-1}$) | **Hydraulic retention time** (hours) | **Reference** |
|---|---|---|---|---|---|
| External hydrogen source | Surface attachment Sand | Mixed population | 0.55 | 4.5 | Kurt et al. 1987 |
| External hydrogen source | Surface attachment Polyurthane | Mixed population | 0.5 | 3-5 | Dries 1988 |
| External hydrogen source | Membrane reactor | Mixed population | 0.16 | 0.75 | Lee and Rittmann 2000 |
| External hydrogen source | Gel-entrapped cells | *Alcaligenes eutrophus* | 0.60 | 2.0 | Chang et al. 1999 |
| External hydrogen source | Surface attachment Sand | Mixed population | 0.25 | 1-2 | Gros and Treutler 1986, Gros et al. 1986 |
| Water electrolysis | Surface attachment, cathodic surface | Mixed population | 0.01 | 9.0 | Sakakibara 1994b |
| Water electrolysis | Gel-entrapped cells | Mixed population | 0.08 | - | Feleke et al. 1997 |
| Water electrolysis | Surface attachment, GAC EC+BR | Identified isolates | 0.20 | 2.5 | Kiss et al. 2000, Szekeres et al. 2001 |
| Water electrolysis | Surface attachment, GAC ECBR | Identified isolates | 0.40 | 0.3 | Kiss et al. 2000, Szekeres et al. 2001 |