

# Sustavi s biofilmom u obradi otpadnih voda

---

**Marjanović, Blaženko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:547995>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Blaženko Marjanović**

7582/PT

**Sustavi s biofilmom u obradi otpadnih voda**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija u zaštiti okoliša

**Mentor:** prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### SUSTAVI S BIOFILMOM U OBRADI OTPADNIH VODA

***Blaženko Marjanović, 0058212876***

**Sažetak:** Biofilm je kompleksne strukture, predstavlja heterogenu zajednicu stanica na koju značajno utječu okolišni i mehanički uvjeti kojima je takva zajednica izložena. Sastoji se uglavnom od bakterija, ali i drugih mikroba uključujući alge, protozoe i viruse. Mikrobne zajednice u biofilmu razgrađuju različite hranjive tvari, poput spojeva koji sadrže fosfor i dušik, ugljikovodike, kao i patogene iz otpadnih voda. Raspon primjene biofilm sustava je širok, no najviše se upotrebljava prilikom pročišćavanja otpadnih voda iz raznih industrija, poput otpadne vode vinarije, mljekarske i petrokemijske industrije te komunalne otpadne vode.

**Ključne riječi:** biofilm, biofilm sustav, biofilm reaktor, obrada, otpadne vode

**Rad sadrži:** 22 stranice, 3 slike, 50 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

**Pomoć pri izradi:**

**Datum obrane:** 13. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of food technology engineering**  
**Laboratory for the Biological Waste Water Treatment**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### BIOFILM SYSTEMS IN WASTEWATER TREATMENT

*Blaženko Marjanović, 0058212876*

**Abstract:** Biofilm has an extremely complex structure and in fact represents a heterogeneous community of cells that are significantly affected by the environmental and mechanical conditions to which such a community is exposed. It consists mainly of bacteria, but also other microbes including algae, protozoa and viruses. The microbial communities in the biofilm break down various nutrients, such as compounds containing phosphorus and nitrogen, hydrocarbons, as well as pathogens from wastewater. The range of applications of biofilm systems is wide, but it is mostly used in the treatment of wastewater from various industries, such as winery wastewater, wastewater from the dairy and petrochemical industries and municipal wastewater.

**Keywords:** biofilm, biofilm system, biofilm reactor, treatment, wastewater

**Thesis contains:** 22 pages, 3 figures, 50 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor

**Technical support and assistance:**

**Defence date:** September 13<sup>th</sup> 2021

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Biofilm u sustavu obrade otpadne vode – formiranje i struktura</b> .....	2
<b>2.2.1. Čimbenici stvaranja biofilma</b> .....	6
<b>2.2.1.1. pH, temperatura i hranjive tvari</b> .....	6
<b>2.2.1.2. Topografija površine</b> .....	7
<b>2.2.1.3. Brzina, turbulencija i hidrodinamika</b> .....	7
<b>2.2.1.4. Proizvodnja izvanstaničnih polimernih tvari (EPS)</b> .....	7
<b>2.2.1.5. Izvanstanična DNA (eDNA)</b> .....	8
<b>2.2.1.6. Divalentni kationi</b> .....	8
<b>2.2.2. Nosači biofilma</b> .....	8
<b>2.3. Biofilm sustavi</b> .....	9
<b>2.4. Reaktori s biofilmom</b> .....	11
<b>2.4.1. Rotirajući biodisk</b> .....	12
<b>2.4.2. Biološki prokapnik</b> .....	13
<b>2.4.3. Submerzni biofilm sustavi</b> .....	13
<b>2.4.4. Reaktori s lebdećim biofilmom</b> .....	14
<b>2.4.5. Biofilm reaktori s pokretnim nosačima</b> .....	15
<b>2.5. Nepoželjni biofilm sustavi u obradi otpadnih voda</b> .....	16
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	17
<b>4. POPIS LITERATURE</b> .....	18

# 1. UVOD

Prvi prijavljeni nalazi mikroorganizama u slojevima zabilježeni su 1940-tih godina, a tijekom 1960-ih i 1970-ih godina intenzivirana su istraživanja biomase u slojevima, a izraz biofilm nije jednoglasno formuliran sve do 1984. Biofilm je strukturirana zajednica mikroorganizama inkapsuliranih unutar samorazvijene polimerne matrice i prijanja na živu ili inertnu površinu (Davey i O'Toole, 2000).

Mikroorganizmi u biofilmu proizvode izvanstanične polimerne tvari (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*) koje drže nakupine stanica zajedno i formiraju strukturni matriks biofilma. Prednosti rasta bakterijskih stanica u biofilmu su da se EPS proizvodi i pri uvjetima koji ograničavaju rast stanica i matrica biofilma štiti bakterijske stanice od stresa okoliša. Biofilm karakterizira učinkovita metabolička suradnja, prisutnost mikrona i olakšan prijenos gena zbog prostorne blizine stanica, a to rezultira velikom raznolikosti vrsta, jamči progresivnu evolucijsku i genetsku raznolikost povećavajući konkurentnost bakterijske stanice (Flemming i sur., 2007; Davey i O'Toole, 2000). Biofilm opisuje i karakterizira fiziološka i genetska heterogenost.

Pročišćavanje otpadnih voda sustavima biofilma ima nekoiko prednosti nad suspendiranim sustavima rasta biomase, poput: operativna fleksibilnost, mali zahtjevi za prostorom, manje hidrauličko vrijeme zadržavanja, otpornost na promjene u okolišu, povećano vrijeme zadržavanja biomase, poboljšana razgradnja spojeva, manja proizvodnja mulja zbog sporije brzine rasta mikroorganizama (Wilderer i McSwain, 2004; Lazarova i Manem, 2000). Sustavi biofilma omogućuju pojačanu kontrolu brzine reakcija kao i dinamiku populacije (Lazarova i Manem, 2000).

Različite su konfiguracije reaktora s biofilmom u obradi otpadnih voda, a opća je podjela na procese s pokretnim i nepokretnim slojem, temeljeno na vrsti nosača.

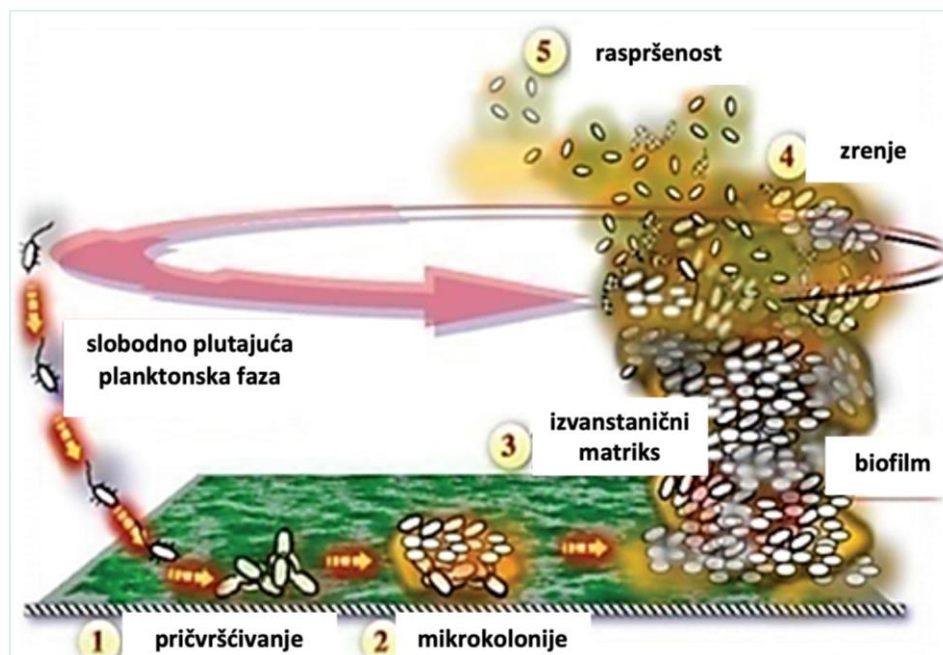
Ovaj završni rad daje pregled literature iz područja sustava sa biofilmom za obradu otpadnih voda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biofilm u sustavu obrade otpadne vode – formiranje i struktura

Biofilm je skup mikrobnih stanica zatvorenih u matriksu od bakterijskih, samostalno generiranih, ekstracelularnih polimernih tvari (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*) koje su nepovratno vezane za površinu.

Razvoj biofilma sastoji se od pet glavnih faza (Slika 1): (i) prva faza – dolazi do početnog vezanja planktonskih mikroorganizama uz izlaganje površine vodenom mediju; (ii) druga faza – zbiva se ireverzibilna adhezija uslijed nastanka EPS-a čije polihidroksilne grupe vodikovim vezama koloniziraju bakterije na površinu; (iii) treća faza – formira se monosloj mikrokolonija na nepomičnoj površini, uslijed replikacije postojećih mikrokolonija; (iv) četvrta faza – događa se sazrijevanje biofilma u trodimenzionalnu strukturu vezanjem ostataka iz susjednog okoliša i novih planktonskih bakterija; (v) peta faza – odvija se ekspanzija ili disperzija aktivnim i pasivnim procesima u kojima se nepokretne, u matriksu zarobljene, stanice biofilma pretvaraju u slobodno plivajuće planktonske bakterije putem osjeta kvoruma (QS, engl. „*quorum sensing*“) ili stanica-stanica (engl. „*cell-to-cell*“) signalnog mehanizma (Sehar i Naz, 2016).



**Slika 1.** Shematski prikaz razvoja biofilma: (1) početno vezanje; (2) ireverzibilno vezanje; (3) replikacija; (4) sazrijevanje; (5) disperzija (preuzeto i prilagođeno iz Sehar i Naz, 2016)

Stvaranje biofilma započinje adsorpcijom makromolekula (proteini, polisaharidi, nukleinske kiseline, huminske kiseline) i manjih molekula (masne kiseline, lipidi) na površinu. Adsorbirane molekule stvaraju slojeve koji imaju višestruku ulogu poput mijenjanja fizikalno-kemijskih karakteristika površine, smanjivanja ili povećavanja oslobađanja toksičnih metalnih iona s površine, opskrbljivanja nutrijentima i elementima u tragu potrebnih za rast biofilma. Također, ovako formirani slojevi služe kao koncentrirani izvor nutrijenata za rast i razmnožavanje mikroorganizama te kao okidač za otkidanje biofilma. Nakon što je površina ovako pripremljena, dolazi do povezivanja mikroorganizama (Lewandowski i Boltz, 2011).

Adhezija bakterija na površinu popraćena je proizvodnjom sluzave tvari, odnosno izvanstaničnim polimernim tvarima (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*) koje su prema kemijskoj strukturi uglavnom polisaharidi i proteini. EPS često čini više od 50% ukupne organske mase biofilma (Melo, 2003). Također, EPS sudjeluje u stvaranju zrelih biofilmova formiranjem sluzave tvari koja se naziva matriks biofilma, odnosno biofilm je agregat mikroorganizama suspendiranih u matriksu od ekstracelularnih polimernih tvari. Matriks biofilma sadrži 98-99% vode, i predstavlja zbirku polimera načinjenu od mikroorganizama iz biofilma, a polimeri se zajedno nazivaju kapsule, omotači, sluz, glikokaliks (engl., *capsules, sheaths, slime, glycocalyxes*). Glikokaliks se definira kao «one strukture polisaharida koje sadrže bakterijsko podrijetlo i leže izvan integralnih elemenata vanjske membrane gram-negativnih stanica i peptidoglikana gram-pozitivnih stanica». Glikokaliks se dijeli na: (i) podjedinice glikoproteina na površini stanice, i (ii) kapsule. Kapsule se dalje dijele na: (a) one koje su krute i isključuju čestice poput indijske tinte (klasična negativna «mrlja» u bakteriologiji), (b) one koje su fleksibilne i uključuju indijsku tintu, (c) integralne kapsule koje su usko povezane sa staničnom površinom, i (d) kapsule koje su periferne prema stanici i mogu se izgubiti u vodenoj fazi (Geesey, 1982).

Biofilmovi sastavljeni od više vrsta obuhvaćaju miješane bakterijske populacije unutar izvanstaničnog polimernog matriksa vezanog za podlogu. Te povezane-pričvršćene miješane kulture podložne su interakcijama poput simbioze ili natjecanja za prostor ili zajednički supstrat, a na interakcije izravno ili neizravno utječu brojne varijable povezane s okružujućom okolinom. Prostorne raspodjele mikrobni populacija stalno se mijenjaju pod selekcijskim pritiscima koji nastaju procesima kao što su: (a) izmjena bakterijskih vrsta s masovnom tekućom fazom, (b) relativna učinkovitost svake vrste u metaboliziranju ograničavajućeg supstrata u održivu staničnu masu i neodržive izvanstanične polimere, (c) prijenos ograničenih supstrata i esencijalnih hranjivih tvari pomoću molekularnih i konvektivnih mehanizama prijenosa, i (d) procesi



uklanjanja biofilma uzrokovani bilo fiziološkim mehanizmima (ljuskanje) ili kao rezultat prevladavajuće hidrodinamike (odvajanje povezano smicanjem). Evolucija prostorne distribucije vrsta unutar biofilma može utjecati na ukupne performanse biofilma u specifičnim situacijama (pr. prirodno pročišćavanje onečišćenih površinskih ili podzemnih voda, bioremedijacija in situ ksenobiotika i drugo). Dva su vjerojatna razloga metaboličkih – fizioloških razlika bakterija pričvršćenih na površinu i slobodno prisutnih u vodenom okruženju: (1) fizikalno-kemijski uvjeti nisu isti na granici površine kruto/tekuće i u skupnoj fazi te okolišni čimbenici utječu na bakterijski metabolizam, i (2) bakterije u biofilmu često se nalaze u neposrednoj blizini drugih bakterija, mikroorganizama, a često i makroorganizama, a na njih utječu sinergijske, međusobne, konkurentne ili antagonističke interakcije među članovima biofilma (Bryers, 1992).

Zreli bakterijski biofilmovi dinamičke su i prostorno i vremenski heterogene zajednice, različitih arhitektura ovisno o čimbenicima okoliša, poput: dostupnost hranjivih tvari pH, posmične sile, temperatura) kao i sastavu mikrobnih konzorcija. Razvojni proces stvaranja biofilma je poprilično spor, često je za postizanje strukturne zrelosti potrebno nekoliko dana.

Biofilm je izrazito kompleksne strukture i predstavlja heterogenu zajednicu stanica na koju značajno utječu okolišni i mehanički uvjeti kojima je takva zajednica izložena. Biofilm također posjeduje mogućnost komunikacije između vlastitih stanica koju koristi za regulaciju mikrobnog vezanja, kretanja, otpuštanja i ostalih zajedničkih aktivnosti. Ovakav način međusobne signalizacije stanica u biofilmu naziva se „*quorum sensing*“. Mnogo je prednosti života stanica u obliku biofilma nad slobodnim ili suspendiranim oblikom, primjerice biofilm štiti stanice od predatora i kemijskih toksina. Naime, enzimi koji se nalaze unutar matriksa biofilma razgrađuju kompleksne organske spojeve u metabolički manje zahtjevne supstrate te gustoća stanica unutar biofilma omogućuje horizontalni prijenos gena (Sengupta, 2014). Također, prednosti koje se najčešće naglašavaju su stabilnost, tolerancija na toksične spojeve te koegzistencija aerobne i anoksične metaboličke aktivnosti unutar iste jedinice procesa (Sfaelou i sur., 2015).

Optimalni nosač za biofilm mora biti atoksičan za mikroorganizme te treba imati karakteristike dobrog prijenosa mase i stabilna kemijska svojstva. Nosači mogu biti hidrofobni poput polietilena (PE) ili polarni poput polivinil alkohola (PVA). Sfaelou i sur. (2015) su istraživali stvaranje biofilma na dva tipa nosača (PE i PVA) te učinkovitost biofilma u obradi otpadne vode. U prvom reaktoru čvrsti nosač je bio polivinil alkohol (R1-PVA), a u drugom polietilen (R2-PE). Osnovna razlika između ova dva nosača je u hidroksilnim grupama na površini koje povećavaju hidrofilni karakter nosača u prvom reaktoru. Glavni je cilj ovog istraživanja bio odrediti utjecaj prisutnosti

polarne grupe na PVA nosaču u kontekstu veće količine biofilma i boljih performansi reaktora. Određivanje performansi različitih reaktora bazirano je na učinkovitosti uklanjanja organskih spojeva, dušika i fosfora. Rezultati istraživanja su pokazali da polaritet čvrstog nosača može utjecati na količinu stvorenog biofilma, a time i na učinkovitost reaktora. Također, utvrđeno je da čvrsti nosač s polarnim površinskim skupinama pospješuje stvaranje biofilma u usporedbi s hidrofobnim nosačem te da polarne grupe nosača utječu na količinu biofilma, ali ne i na kiselinsko-bazno ponašanje istoga (Sfaelou i sur., 2015).

Poznato je da različite bakterijske vrste formiraju različite strukture biofilma pri identičnim uvjetima, kao što i iste bakterijske vrste stvaraju različite strukture biofilma pri različitim uvjetima okoliša (Tolker-Nielsen, 2015).

Klausen i sur. (2003) su pokazali da *Pseudomonas aeruginosa* tvori mikrokolonije u obliku gljive kada raste u protočnim komorama koje su navodnjavane glukoznim medijem, dok isti mikroorganizam tvori ravne biofilmove kada raste u protočnim komorama navodnjavanim citratnim medijem.

Struktura uspostavljenog biofilma može se promijeniti kao odgovor na promjenu prehrambenih uvjeta. Nielsen i sur. (2003) proučavali su stvaranje biofilma, sastavljenog od bakterijskih vrsta *Pseudomonas knackmussii* i *Burkholderia xenovorans*, u protočnim komorama. Ove bakterije posjeduju potencijal metaboličke interakcije zbog sposobnosti bakterije *P. knackmussii* da metabolizira klorobenzoat kojeg je proizvela *B. xenovorans* pri uzgoju na klorobifenilu. Kada se biofilm, sastavljen od navedenih dviju vrsta bakterija, hranio klorobifenilnim medijem, tada su nastajale mješovite mikrokolonije sastavljene od združenih, bakterijskih vrsta *Pseudomonas knackmussii* i *Burkholderia xenovorans*. Nasuprot tome, kada je smjesa bakterija hranjena citratom, kojeg mogu metabolizirati obje vrste, tada su vrste formirale zasebne mikrokolonije. Nakon promjene izvora ugljika od citratnog do klorobifenilnog medija, kretanje bakterije *P. knackmussii* dovelo je do promjene u prostornoj strukturi biofilma iz zasebnih mikrokolonija prema mikrokolonijama mješovitih vrsta.

Složena mreža interakcija unutar konzorcija biofilma ključ je za razumijevanje strukture, sastava i funkcije biološke zajednice. Interakcije između i unutar vrsta vjerojatno utječu na sve aspekte biofilмова: formiranje, strukturu, proizvodnju i sastav EPS -a i polisaharida, kao i aktivnost biofilma (Hansen i sur., 2007).

Biofilmovi su heterogeni sustavi s različitim mikro okruženjima sa bakterijskim stanicama imobiliziranim u relativno fiksnim položajima. U takvom okruženju mikrobne interakcije su neizbježne. U usporedbi s suspendiranim sustavima gdje se ponašanje planktonske bakterije u mješovitim kulturama često može predvidjeti na temelju učinka svakog od pojedinačnih sojeva, sustavi biofilma mnogo su složeniji. Istraživanja su pokazala da dva soja mogu koegzistirati u biofilmovima čak i kada je jedan soj nadmašio drugi u planktonskoj kulturi zbog proizvodnje inhibicijskih spojeva ili veće brzine rasta (Komlos i sur., 2005).

## **2.2.1. Čimbenici stvaranja biofilma**

### **2.2.1.1. pH, temperatura i hranjive tvari**

Biofilmovi egzistiraju u različitim uvjetima raspoloživosti nutrijentima, od visokih do gotovo nemjerljivih. Međutim, obilniji su i gušći u okolišu bogatom hranjivim tvarima uslijed promicanja prijelaza bakterijskih stanica iz planktonskog u stanje biofilma, dok iscrpljivanje nutrijenata uzrokuje otpuštanje stanica biofilma sa površine.

Nekoliko je načina na koje se bakterijski biofilmovi opskrbljuju hranjivim tvarima (Ells i Hansen, 2006):

- (i) koncentriranjem organskih tvari na površinama putem izvanstaničnog polimera,
- (ii) korištenjem otpadnih produkata od sekundarnih kolonizatora,
- (iii) udruživanjem biokemijskih izvora pomoću različitih enzima radi razgradnje zaliha hrane

Svaka promjena pH značajno utječe na rast i razvoj biofilma uslijed nadvladavanja različitih mehanizama te naposljetku može imati negativni ili letalni efekt na mikroorganizme. Kao odgovor na unutarnje ili vanjske promjene pH, bakterije brzo prilagode aktivitet i sintezu proteina koji sudjeluju u različitim staničnim procesima. Međutim, neki od staničnih procesa, primjerice izlučivanje egzopolimernih tvari ili polisaharida, ne prilagođavaju se promjenama pH tako lako. Optimalni pH za proizvodnju polisaharida varira među različitim vrstama, ali za većinu bakterija je oko 7 (Ells i Hansen, 2006).

Mikrobne aktivnosti vrlo su osjetljive na promjenu u temperaturi. Optimalna temperatura rezultira sa zdravim rastom bakterijske populacije, dok mala varijacija može smanjiti učinkovitost rasta bakterija zbog smanjenja brzine enzimske reakcije u bakteriji. Za većinu bakterija nađenih

u vodenom sustavu hlađenja, optimalna temperatura za maksimalni rast je oko 40°C (Ells i Hansen, 2006).

### **2.2.1.2. Topografija površine**

Topografija površine značajno utječe na sposobnost prijanjanja-adhezije bakterije na površinu. Tijekom početne kolonizacije hrapavost površine na nano- i mikro-razini poboljšava adheziju bakterija na podlogu uslijed veće površine dostupne za vezanje stanica. Površinska hrapavost smanjuje posmičnu silu na bakterijske stanice i zajednice prisutne u tekućinama koje struje pri velikim protocima, poput vodovodnih cijevi u industrijskim pogonima. Površina materijala izloženog vodenom mediju neizbježno će postati kondicionirana ili premazana polimerima iz medija, te će rezultirajuća kemijska preinaka utjecati na brzinu i opseg mikrobnog vezanja. Ostali čimbenici, poput naboja, hidrofobnosti i elastičnosti, također utječu na mikrobnog vezanje (Prakash i sur., 2003).

### **2.2.1.3. Brzina, turbulencija i hidrodinamika**

Područje na površini gdje nema turbulentog strujanja poznato je kao granični sloj. Unutar ovog područja brzina protoka nedovoljna je za uklanjanje biofilma. Područje izvan graničnog sloja karakterizirano je visokom razinom turbulentnog strujanja te ima utjecaj na vezanje stanica na površinu. Veličina graničnog sloja ovisi o brzini strujanja vode. Primjerice, pri velikim brzinama strujanja veličina graničnog sloja se smanjuje te su stanice izložene visokoj razini turbulencije. Hidrodinamički uvjeti utječu na stvaranje, strukturu, proizvodnju EPS-a, debljinu, masu i metaboličke aktivnosti biofilma (Simoes i sur., 2007).

### **2.2.1.4. Proizvodnja izvanstaničnih polimernih tvari (EPS)**

Ekstracelularne polimerne tvari (EPS) složena su mješavina polimera velike molekulske mase,  $M_r$  10.000, koje izlučuju mikroorganizmi, odnosno proizvodi su lize i hidrolize, kao i adsorbirane organske tvari iz otpadnih voda. Općenito, pokazalo se da je EPS matriks bogat polimerima, tj. polisaharidima, proteinima, glikoproteinima, DNA oligomerima, fosfolipidima i huminskim kiselinama (Flemming i Wingender, 2010). Također, EPS je visokohidratiziran jer vodikovom vezom može ugraditi velike količine vode u svoju strukturu. EPS sudjeluje u stvaranju gelaste mreže, koja održava bakterije u biofilmu, povezivanjem viševalentnim kationima te hidrofobnim interakcijama. Osim toga, EPS uzrokuje prijanjanje biofilma na površinu, flokulaciju i granulaciju, štiti bakterije od štetnih okolišnih uvjeta te omogućava bakterijama uzimanje hranjivih tvari iz okoline (Zhao i sur., 2013). Različiti biofilmovi proizvode različite količine EPS-a, te se količina EPS-a povećava starenjem biofilma (O'Toole, 2011).

### **2.2.1.5. Izvanstanična DNA (eDNA)**

Izvanstanična DNA (eDNA, engl. *Extracellular DNA*) glavni je sastojak različitih biofilmova sastavljenih od jedne ili više vrsta. eDNA ili „gola DNA“ središnji je dio bakterijskih vlastitih ekstracelularnih polimernih tvari (EPS) i ima sličnost s kromosomskom DNA u svom primarnom slijedu (Bockelmann i sur., 2006). Njegova je uloga vrlo važna u različitim fazama stvaranja biofilma, poput početne adhezije bakterija, agregacije i stvaranja mikrokolonije koja pogoduje pročišćavanju otpadnih voda. eDNA također pomaže u osnaživanju biofilmova, pruža zaštitu biofilmovima od fizičkog stresa, antibiotika i deterdženata te služi kao izvrstan izvor hranjivih tvari za rast biofilma (Das i sur., 2013). Osim toga, eDNA se može koristiti u inženjeringu biofilmova u korisne svrhe, kao što je sanacija zagađivača okoliša i proizvodnja električne energije ili goriva u bioelektrokemijskim sustavima ili bioreaktorima (Sehar i Naz, 2016).

### **2.2.1.6. Divalentni kationi**

Divalentni kationi, poput  $\text{Ca}^{2+}$ , prisutni su u kopnenom i vodenom okruženju, stoga je kalcij jedan od čimbenika koje bakterije osjete tijekom rasta biofilma. Nedavna istraživanja pokazala su da eDNA kelira divalentne katione koji pomažu u promjeni svojstava bakterijske stanične površine i na taj način pogoduju otpornosti biofilmova na deterdžente i antimikrobna sredstva (Mulcahy i sur., 2008).

Divalentni kationi, poput kalcijevih, imaju važnu ulogu u početnom vezanju mikrobnih agregata flokula aktivnog mulja, anaerobnih granula mulja i biofilmova premošćivanjem negativno nabijenih mjesta na izvanstaničnim polimerima (Kerchove i Elimelech, 2008).

Nedavna istraživanja pokazala su da se debljina biofilma može povećati uvođenjem više divalentnih kationa, zbog čega biofilm postaje gušći i mehanički stabilniji (Das i sur., 2014). Utvrđeno je da kalcij ne samo da djeluje kao kofaktor za određene proteine, već djeluje i u signalizaciji stanica, virulenciji biofilma, stvaranju staničnih i izvanstaničnih proizvoda i regulaciji alginata (Sarkisova i sur., 2005).

### **2.2.2. Nosači biofilma**

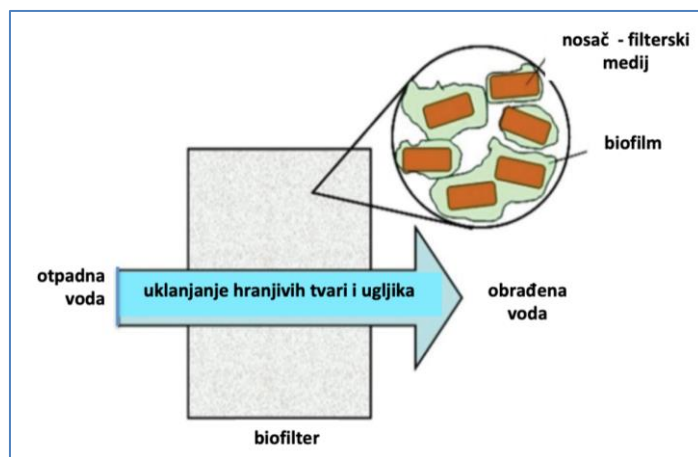
Odabir nosača mikrobne biomase temelji se na veličini, poroznosti, gustoći, kao i rezistenciji prema eroziji i kemikalijama (Christensson i Welander, 2004). Idealan nosač pruža visoku specifičnu površinu, niske troškove i dovoljno visoku poroznost da se izbjegne začepljenje i poboljša ventilacija. Nosač mora biti izdržljiv, netopljiv i otporan na kemikalije. Površina i

geometrija materijala nosača utječu na hidrodinamičke uvjete u reaktoru te na taj način utječu na stvaranje biofilma, što opet utječe na pročišćavanje otpadnih voda (Yu i sur., 2008; Matos i sur., 2011).

Trenutno se koriste različiti sintetički i prirodni materijali. Razni istraživači koristili su polistiren (Naz i sur., 2013), polipropilen (Khatoon i sur., 2014) i šljunak (Naz i sur., 2015; Khan i sur., 2015) kao nosač za biofilter u fiksnim biofilm reaktorima za pročišćavanje otpadnih voda. Kemijski sastav nosača vrlo je bitan s obzirom na njegovu kompatibilnost s biofilmovima u razvoju, odnosno potrebno je odrediti njegov elementarni sastav. Za detekciju i kvantificiranje elemenata u nosaču mogu se primijeniti različite spektroskopske tehnike, kao što je rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS, engl. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) i rendgenska spektroskopija s disperzijom energije (EDS ili EDX ili XEDS, engl. *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*). XPS je tehnika površinske kemijske analize koja se koristi za analizu kemijskog sastava površine materijala. Ova tehnika mjeri sastav elemenata u rasponu promila, empirijske formule, kemijsko stanje i elektroničko stanje elemenata koji postoje unutar materijala (Crist, 2000). S druge strane, EDS je korisna tehnika koja se primjenjuje za elementarnu analizu, odnosno kemijsku karakterizaciju nosača (Hafner, 2006).

### **2.3. Biofilm sustavi**

Biofilm sustav dobro je razvijena tehnologija u kojoj se nosači dodaju u reaktore za rast kako bi se osigurala površina za pričvršćivanje biofilma, odnosno kako bi se povećala koncentracija mikroba, a posljedično i brzina razgradnje kontaminanata biofilmom te da bi se iskoristili brojni mehanizmi uklanjanja, uključujući biorazgradnju, bioakumulaciju, biosorpciju i biomineralizaciju (Pal i sur., 2010). Mikrobne zajednice u biofilmu razgrađuju različite hranjive tvari, poput spojeva koji sadrže fosfor i dušik, ugljikovodike, kao i zarobljene patogene iz otpadnih voda. Nakon uklanjanja zagađivača, biofilterom pročišćena voda ispušta se u okoliš ili se koristi u poljoprivredi te u druge svrhe. Uklanjanje kontaminanata iz otpadnih voda biofilterom shematski je prikazano na slici 2 (Sehar i Naz, 2016).



**Slika 2.** Uklanjanje zagađivača iz otpadnih voda biofilterom (preuzeto i prilagođeno iz Sehar i Naz, 2016)

Pročišćavanje otpadnih voda biofilm sustavom ima nekoliko prednosti, uključujući operativnu fleksibilnost, male zahtjeve za prostorom, smanjeno hidrauličko vrijeme zadržavanja, otpornost na promjene u okolišu, povećano vrijeme zadržavanja biomase, visoku koncentraciju aktivne biomase, poboljšanu sposobnost razgradnje tvrdokornih spojeva, kao i sporiju brzinu rasta mikroba, što rezultira manjom proizvodnjom mulja (Sehar i Naz, 2016).

Biofilm sustavi sastoje se od četiri dijela:

- površina na koju su vezani mikroorganizmi,
- biofilm (mikroorganizmi i matriks),
- otopina hranjivih tvari
- plinska faza

Svaki odjeljak biofilm sustava može imati više komponenata, a točan broj komponenti varira, ovisno o potrebama analize koja se provodi. Primjerice, za neke analize je prikladno odrediti dvije komponente biofilma (pr. matriks i mikroorganizme), dok je u drugoj studiji potrebno identificirati tri sastavnice biofilma (EPS, mikroorganizme i određenu tvar unutar matriksa). Dakle, potrebe specifične studije ili analize diktiraju broj komponenti identificiranih u svakom dijelu biofilm sustava (Lewandowski i Boltz, 2011).

Biofilm sustavi postoje i bez ljudske intervencije, dok biofilm reaktori postoje isključivo djelovanjem čovjeka. Kada se promiče ili potiskuje proces u biofilm sustavu, odnosno kada se

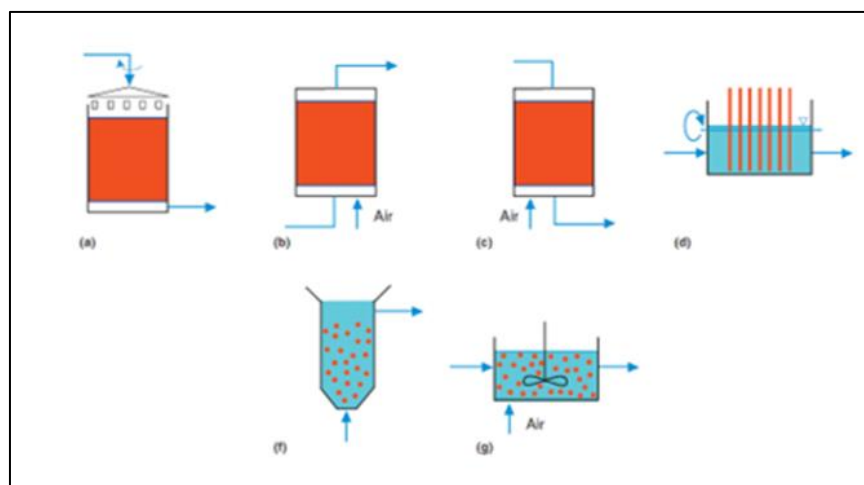
kvantificira proces u biofilm sustavu bez utjecaja na njegovu brzinu, tada biofilm sustav postaje biofilm reaktor.

## 2.4. Reaktori s biofilmom

Biološki sustavi za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda zahtijevaju nakupljanje aktivnih mikroorganizama u bioreaktoru te odvajanje mikroorganizama od obrađene otpadne vode. Bakterije pričvršćene na nosače biofilm reaktora povremeno se odvajaju od matriksa biofilma te izlaze iz sustava u struji efluenta.

Biofilm reaktori dijele se u tri kategorije (Slika 3), (Lewandowski i Boltz, 2011):

- (i) neuronjeni ili djelomično uronjeni – (a) biološki prokapnik (engl. *Trickling Filters*) i (d) rotirajući biološki kontaktor (rotirajući biodisk, engl. *Rotating Biological Contactor*),
- (ii) submerzni „*fixed bed biofilm*“ (hrv. reaktor s čvrstim slojem biofilma) – (b) „*up-flow*“ i (c) „*down-flow*“ reaktori (hrv. reaktori punjeni odozdo i odozgo) i
- (iii) različiti fluidizirani biofilm reaktori – (g) reaktor s pokretnim slojem biofilma (engl. *Moving Bed Biofilm Reactors*), i (f) reaktor s lebdećim slojem biofilma (*Fluidized Bed Biofilm Reactors*, (e) reaktor sa suspendiranim biofilmom (engl. *Suspended Biofilm Reactor*), uključujući reaktor s miješanjem pomoću zraka (engl. *Airlift Reactor*, i (h) reaktor s biofilmom pričvršćenim na membrane (engl. *Membrane Attached Biofilm Reactor*).



**Slika 3.** Vrste reaktora s biofilmom (preuzeto i prilagođeno iz Lewandowski i Boltz, 2011)



### 2.4.1. Rotirajući biodisk

Rotacijski biološki kontaktor ili rotirajući biodisk (RBC, engl. *Rotating Biological Contactor*) primjer je reaktora u kojem su mikroorganizmi pričvršćeni na nosač u obliku biofilma. Sastoji se od osovine na kojoj su smješteni diskovi s formiranom biomasom u obliku biofilma te su oni 40% uronjeni u spremnik s otpadnom vodom. Osovina se okreće (1-1,6 o/min) te se na ovaj način otpadna voda i biofilm dovode u kontakt u trenutku kada je disk uronjen u vodu, odnosno kontakt kisika iz zraka i biofilma u trenutku kada je disk van vode. Veliku specifičnu površinu i učinkovitost procesa osiguravaju diskovi koji sadrže radijalne i kružne utore. Turbulentnim strujanjem, koje se ostvaruje brzinom rotacije osovine, kontrolira se rast biofilma. Povezivanjem više jedinica rotirajućih biodiskova u seriju ili paralelno postiže se učinkovita obrada otpadne vode (Su i sur., 2015; Singh i Mittal, 2012; Lewandowski i Boltz, 2011). RBC je ustaljeni postupak uklanjanja biorazgradivih organskih tvari, kao i dušika (Waqas i Bilad, 2019; Sathian i sur., 2014).

Neke od potencijalnih prednosti RBC-a u usporedbi s konvencionalnim aktivnim muljem (CAS, engl. *Conventional Activated Sludge*) i biološkim prokapsnikom su jednostavnost i lakoća u nadzoru, niski troškovi rada i održavanja, visoka koncentracija biomase, kratko hidraulično vrijeme zadržavanja, visoka učinkovitost prijenosa kisika, nema recirkulacije mulja, te otpornost na udare i toksična opterećenja (Hassard i sur., 2015).

Gopi Kiran i sur. (2017) istraživanje su usredotočili na procjenu učinkovitosti anaerobnog rotirajućeg biološkog kontaktora (An-RBC) laboratorijskog mjerila u pročišćavanju sintetičkih metalnih otpadnih voda koje sadrže teške metale, odnosno  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  pri različitim početnim koncentracijama. Ispitan je učinak vremena zadržavanja (RT, engl. *Retention Time*) od 24 h i 48 h na uklanjanje teških metala u sustavu An-RBC. Taloženje metala pomoću sulfatoreducirajućih bakterija događa se u rasponu od nekoliko dana do 5 dana, pa su odabrane RT-vrijednosti 24 i 48 sati, koje su se temeljile na primjeni u industriji i ekonomskoj isplativosti. Postignuti su rezultati istraživanja od 97% uklanjanja  $Cu^{2+}$ , 90% uklanjanja  $Cd^{2+}$  te uklanjanje više od 77% u slučaju ostalih 6 metala. Maksimalni učinak uklanjanja za  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  dobiven je pri ulaznoj koncentraciji metala u rasponu 50 - 175 mg/L pri retencijskom vremenu 48 sati.

### **2.4.2. Biološki prokapnik**

Biološki prokapnik ili prokapni filter je biofilm reaktor s nepomičnim nosačima. Otpadna voda ulazi u bioreaktor kroz distribucijski sustav, kaplje preko površine biofilma, a zrak se kreće prema gore ili dolje gdje difundira kroz tekućinu koja teče i ulazi u biofilm. Struktura nosača osigurava strujanje zraka i tekućine, tj. osigurava dobavu kisika i hranjivih tvari do stanica mikroorganizma. Pročišćavanje otpadnih voda pomoću prokapnog filtera na kraju rezultira proizvodnjom ukupne suspendirane krutine. Stoga je potrebno odvajanje tekućine od krutih tvari, što se obično postiže kružnim ili pravokutnim sekundarnim pročišćivačima (Lewandowski i Boltz, 2011).

Veće hidrauličko opterećenje, bolja kontrola debljine biofilma i poboljšani prijenos kisika ostvareni su uslijed veće specifične površine te šupljeg prostora sintetičkih nosača.

Sun i sur. (2019) istraživali su učinkovitost serijski spojenog dvostupanjskog biološkog prokapnika pri uklanjanju sumpora iz smjese plinova (sumporovodik, metanetiol, dimetilsulfid, dimetildisulfid) koji su proizvedeni djelovanjem postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda s nekontroliranim pH. Također, istražen je učinak visoke koncentracije sumporovodika na performanse sustava. Nekontrolirani pH rezultirao je podijeljenim pH područjem u dva prokapna filtera što je imalo mali utjecaj na izvedbu sustava. Kao rezultat, učinkovitost uklanjanja dvostupanjskim biološkim prokapnikom iznosila je 90,1%, 88,4%, 85,8% i 61,8% za sumporovodik, metanetiol, dimetilsulfid i dimetildisulfid.

Zylka i sur. (2018) su istražili učinkovitost prokapnog filtera pri obradi otpadne vode mljekarske industrije. Primjenom biološkog prokapnika bez recirkulacije uklonjeno je 87,3% BPK (Biokemijska Potrošnja Kisika), 78,3% KPK (Kemijaska Potrošnja Kisika) i 27,9% ukupnog fosfora, a sa 100%-tnom recirkulacijom 95,2% BPK, 85,5% KPK i 42,0% ukupnog fosfora.

### **2.4.3. Submerzni biofilm sustavi**

Submerzni biofilm sustavi su sustavi sa stacionarnim ili raspršenim nosačima smještenima ispod površine otpadne vode. Otpadna se voda u biološkom aeriranom filteru može dovesti s gornje ili donje strane reaktora, stoga postoje „*up flow*” i „*down flow*” sustavi, a kisik se uvodi s donje strane reaktora te u obliku mjehurića putuje cijelom dužinom bioreaktora prema vrhu.

Posebna pažnja kod ovakvih sustava mora se obratiti na nosače i sprječavanje prekomjernog rasta biofilma, tj. formiranje nakupina čija je posljedica čepljenje. Problem čepljenja rješava se čišćenjem nosača upuhivanjem zraka i vode u sustav nakon određenog vremenskog razdoblja

rada bioreaktora, odnosno dok debljina biofilma ne postigne kritičnu vrijednost (Yang i sur., 2010; Osorio i sur., 2006; Chang i sur., 2002).

U istraživanju Ganesh i sur., (2009 „up flow“ sustav, tri anaerobna reaktora s čvrstim slojem biofilma, s plutajućim nosačima male gustoće, različite veličine i specifične površine, korišten je za obradu otpadne vode vinarije. Anaerobni tretman visoke djelotvornosti u reaktorima s čvrstim slojem biofilma vrlo je uspješno primijenjen na otpadne vode iz agrobiznisa koji koriste poljoprivredne proizvode koji sadrže uobičajeno visoke koncentracije organskih sastojaka koje lako razgrađuju anaerobne bakterije. Otpadne vode vinarije klasičan su primjer takvog otpada. Pri pročišćavanju otpadnih voda vinarije, odnosno otpadnih voda s visokim KPK, ali niskim sadržajem dušika i fosfora, anaerobna razgradnja nudi prednosti u odnosu na aerobnu obradu. Anaerobni reaktor s čvrstim slojem biofilma korišten u ovom istraživanju omogućuje rad pri visokoj brzini organskog opterećenja (OLR, engl. *Organic Loading Rates*), od 22–42 kg KPK/m<sup>3</sup> dan) s učinkovitošću uklanjanja od 80%, čime se doprinosi manjem obujmu reaktora i zahtjevima za površinu zemljišta (Ganesh i sur., 2009).

Anaerobni reaktori s čvrstim slojem biofilma imaju prednost u odnosu na konvencionalne aerobne sustave jer zahtijevaju manju količinu energije i proizvode manje mulja. Međutim, potrebna je naknadna aerobna obrada kako bi efluent bio prikladan za konačno odlaganje (Ganesh i sur., 2009).

#### **2.4.4. Reaktori s lebdećim biofilmom**

U reaktorima s lebdećim biofilmom, biofilm reaktoru s proširenim slojem (EBBR, engl. *Expanded Bed Biofilm Reactors*, i biofilm reaktoru s lebdećim slojem (FBBR, engl. *Fluidized Bed Biofilm Reactors*), nosači se zadržavaju u suspenziji uvođenjem zraka ili vode s dna reaktora čime se osigurava raspršenost nosača.

U EBBR i FBBR reaktorima koriste se mali nosači suspendirani u okomitom protoku otpadne vode, pa su nosači u lebdećem stanju i sloj je proširen. Nosači postanu suspendirani kada vučna sila od protoka otpadne vode (30-50 m/h) nadvlada gravitaciju i nosači se razdvoje. Kod suspendiranih nosača kontaktna površina između otpadne vode i mikroorganizama je maksimalna. Također je povećana učinkovitost obrade na način da je poboljšán prijenos mase zbog značajnog relativnog kretanja između biofilma i otpadne vode koja teče.

Zbog ravnoteže sila uključenih u fluidizaciju čestica i širenja sloja, najmanje čestice nalaze se na vrhu, a najveće na dnu lebdećeg sloja. Stupanj proširenja sloja određuje smatra li se sloj proširenim ili lebdećim.

Ekspandiranim slojem smatra se sloj koji je manji od dvostruke visine statičkog sloja ( $< 100\%$  prošireno), a lebdeći su oni koji imaju više od dvostruke visine statičkog sloja ( $> 100\%$  prošireno).

Niži stupanj širenja sloja povoljan je jer zahtijeva manju brzinu protoka, manje energije i povećava efektivnu koncentraciju biomase. U aerobnim procesima, međutim, povećava volumetrijsku potrebu za kisikom zbog povećane koncentracije biomase.

Biofilm reaktor s lebdećim slojem se pri obradi komunalne otpadne vode uobičajeno koristi za tercijarnu denitrifikaciju. Prilikom pročišćavanja podzemnih ili industrijskih otpadnih voda, FBBR se koristi za uklanjanje oksidiranih zagađivača poput nitrata i perklorata (Lewandowski i Boltz, 2011).

#### **2.4.5. Biofilm reaktori s pokretnim nosačima**

Reaktor s biofilmom na pokretnim nosačima (MBBR, engl. *Moving Bed Biofilm Reactor*) je dvofazni (anoksični) ili trofazni (aerobni) sustav s plutajućim plastičnim nosačima koji se slobodno kreću – raspršeni su u vodenom mediju i zahtijeva mehaničko miješanje ili prozračivanje za raspodjelu nosača po spremniku. Plastični nosač zauzima do 67% volumena tekućine. Postupak se sastoji od submerznog biofilm reaktora i jedinice za odvajanje tekućine i krute tvari (Ødegaard, 2006). MBBR sustav se pojavljuje kao zasebni reaktor ili nekoliko reaktora spojenih u seriju. Svaki MBBR uobičajeno ima omjer duljine i širine u rasponu od 0,5:1–1,5:1. Izvedbe s omjerom duljine i širine većim od 1,5:1 mogu rezultirati neravnomjernom raspodjelom nosača.

Aerobni MBBR sustav koristi difuzni sustav aeracije za ravnomjernu raspodjelu plastičnih nosača i zadovoljavanje potreba za kisikom u procesu, dok anoksični MBBR sustav koristi mehaničke miješalice za ravnomjernu distribuciju plastičnih nosača jer u procesu nema potrebe za kisikom (Lewandowski i Boltz, 2011). MBBR može biti učinkovit za pročišćavanje otpadnih voda petrokemijske industrije.

Cao i Zhao (2012) proveli su usporedbu MBBR sustava i sustava s aktivnim muljem i pokazali da je uklanjanje KPK provedeno MBBR sustavom uspješnije od uklanjanja konvencionalnim postupkom aktivnog mulja pri optimalnim uvjetima. Brojna su istraživanja pokazala da je MBBR

proces pouzdana tehnologija za pročišćavanje gradskih otpadnih voda i vrlo različitih vrsta otpadnih voda pri različitim uvjetima rada.

Ovi sustavi omogućuju nadogradnju postojećih postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i poboljšanje energetske učinkovitosti istoga, a mogu se integrirati u sustav za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda, otpadnih voda pri ekstremnim temperaturama i otpadnih voda s visokim salinitetom te pogoduju uklanjanju tvrdokornih spojeva (Leyva-Díaz i sur., 2016).

## **2.5. Nepoželjni biofilm sustavi u obradi otpadnih voda**

Biofilmovi mogu imati korisne ili štetne učinke, ovisno o tome gdje se stvaraju.

Do neželjenog stvaranja biofilma dolazi na površini izmjenjivača topline, rashladnih vodotornjeva, ventila, cijevi i trupova brodova, povećavajući otpor prema protoku i prijenosu topline te izazivajući, odnosno pojačavajući koroziju. Neki biofilmovi također mogu postati ozbiljan problem za ljudsko zdravlje kada zahvate pluća, zube te mokraćne katetere (Melo, 2003). Specifični problemi koje biofilmovi uzrokuju u industrijskim postrojenjima jednako su raznoliki kao i tehnološki procesi u kojima sudjeluju biofilmovi.

Nepoželjna pojava svakako je mikrobiološki uzrokovana korozija koja nastaje uslijed formiranja biofilma na metalnoj površini. U proizvodnji metala i metalnih legura, sirovine se kemijski reduciraju i povećava im se unutarnja kemijska energija. Ove materijale mikroorganizmi koriste kao izvore energije u nizu procesa u kojima se smanjuje kemijska energija zahvaćenog materijala. Ubrzana korozija metala u prisutnosti mikroorganizama rezultat je mikrobne prilagodbe na kemijsko okruženje u blizini površine metala (Lewandowski i Boltz, 2011).

Nadalje, biofilmovi na betonskim površinama uzrokuju koroziju kanalizacijskih cijevi u kojima sulfatoreducirajuće bakterije reduciraju sulfate u sulfide, koji se kisikom oksidiraju do elementarnog sumpora. Zatim se elementarni sumpor dalje oksidira, uglavnom djelovanjem bakterije *Thiobacillus thiooxidans*, ali i drugim vrstama roda *Thiobacillus*, poput *T. novellus/intermedius* i *T. neapolitanus*, u složenom ekosustavu na kanalizacijskoj cijevi. Kao rezultat toga nastaje sumporna kiselina koja razgrađuje-oštećuje-razara beton i oštećuje cijevi kanalizacije (Vincke i sur., 2001).

Sve je popularnija uporaba membranskih procesa u različitim tehnologijama pročišćavanja vode i otpadnih voda, pri čemu je neizbježna pojava stvaranja biofilma na membranama, a nanofiltracija i reverzna osmoza posebno su osjetljive na tu pojavu (Vrouwenveldera i sur.,

2009). Uklanjanje biofilma s membrana koje se koriste za reverznu osmozu može se postići mehaničkim ili kemijskim metodama ili kombinacijom mehaničkih i kemijskih metoda. Mehaničke metode uključuju ispiranje vodom ili kombinacijom vode i zraka. Ovisno o onečišćenjima nataloženim na membranama, površina se može kemijski očistiti različitim vrstama kemikalija. Ako se pretežno nataložio anorganski kamenac, kemijsko čišćenje uključuje sredstva koja djeluju uglavnom protiv kamenca, poput klorovodične kiseline (HCl) ili dušične kiseline (HNO<sub>3</sub>). Ako je biofilm glavni problem, tada se za čišćenje membrana koriste antimikrobna sredstva za uklanjanje biofilmova. U tu se svrhu uobičajeno koriste dvije vrste antimikrobnih sredstava: oksidirajući i neoksidirajući biocidi. Oksidirajući biocidi popularni u procesima čišćenja membrana uključuju klor, brom, kloramin, klor dioksid, vodikov peroksid, peroksiocetenu kiselinu i ozon. Neoksidirajući biocidi uključuju formaldehid, glutaraldehid i kvarterne amonijeve spojeve.

### **3. ZAKLJUČAK**

Biofilm je složena mikrobna megapopulacija koja se sastoji uglavnom od bakterija, ali i drugih vrsta uključujući alge, protozoe i viruse (npr. bakteriofage).

Sustavi obrade otpadnih voda temeljeni na biofilmu imaju potencijalne prednosti poput velikog kapaciteta. Za bolje projektiranje biofilm sustava za pročišćavanje otpadnih voda nužno je znanje o sastavu nosača i razvoju biofilmova. Idealni nosač za biofilm ne smije biti toksičan za mikroorganizme te treba imati stabilna kemijska svojstva te karakteristike dobrog transfera mase. Također, optimalni nosač pruža visoku specifičnu površinu, niske troškove i dovoljno visoku poroznost da se izbjegne začepljenje i poboljša ventilacija. Hidrofobnost, odnosno hidrofilitnost čvrstog nosača utječe na količinu formiranog biofilma, a posljedično i na učinkovitost samog reaktora. Hidrofilni nosač promovira stvaranje biofilma u usporedbi s čvrstim nosačem s nepolarnim površinskim skupinama te polarne grupe nosača utječu na količinu stvorenog biofilma, no ne i na kiselinsko-bazno ponašanje. Faktori koji utječu na stvaranje biofilmova su brojni, a među njima ističu se pH, temperatura, količina i sastav nutrijenata, topografija površine te turbulencija i hidrodinamika. Razne su izvedbe biofilm reaktora, ali sve ih karakteriziraju procesi prijenosa mase i biokemijske pretvorbe. Reaktori s biofilmom sadrže sustav pritoka otpadne vode, sustav za zadržavanje otpadne vode, nosač biofilma, sustav odvodnje obrađene vode i sustav aeracije ili miješanja. Raspon primjene sustava s biofilmom je širok, no najviše se

upotrebljava prilikom pročišćavanja otpadnih voda podrijetlom iz raznih industrija, poput otpadne vode vinarije, mljekarske industrije, petrokemijske industrije te komunalne otpadne vode.

## 4. POPIS LITERATURE

Andersson, S., Rajarao, G. K., Land, C. J., Dalhammar, G. (2008) Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems, *FEMS Microbiology Letters*. **283** 83–90.

Bockelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T. R., Wecke, J., Lawrence, J. R., Szewzyk, U. (2006) Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*. **262**: 31–38.

Bryers, J.D. (1992) Mixed population biofilms. U: Biofilms – Science and Technology. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville (editori), NATO ASI Series (Series E: Applied Science), vol 223, Springer, Dordrecht, 277-289.

Cao, C. Y., Zhao, Y. H. (2012) The comparison of MBBR and ASP for treatment on petrochemical wastewater. *Petroleum Science and Technology*. **30**:1461–1467

Crist, B. V. (2000) XPS Handbook: Elements and Native Oxides. John Wiley and Sons, New York. pp. 458.

Das, T., Sehar, S., Koop, L., Wong, Y.K., Ahmed, S., Siddiqui, K.S., Manefield, M. (2014) Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation. *PLoS One*. **9**(3)

Das, T., Sehar, S., Manefield, M. (2013) The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*. **5**(6): 778–786.

Davey, M.E., O'Toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**(4), 847-867.

Ells, T.C., Hansen, L.T. (2006) Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. *International Journal of Food Microbiology*. **111**(1): 34–42.

Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews of Microbiology*. **8**: 623–633.

Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. (2007) The EPS Matrix: The “House of biofilm cell”. *Journal of Bacteriology*. **189**(22), 7945-7947.

Ganesh, R., Rajinikanth, R., Thanikal, J. V., Ramanujam, R. A., Torrijos, M. (2009) Anaerobic treatment of winery wastewater in fixed bed reactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **33**:619–628

Geesey, G.G. (1982) Microbial exopolymers: Ecological and economics considerations. *American Society for Microbiology News*. **48**, 9-14.

Gopi Kiran, M., Pakshirajan, K., Das, G. (2017) A new application of anaerobic rotating biological contactor reactor for heavy metal removal under sulfate reducing condition. *Chemical Engineering Journal*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.03.080>

Hafner, B. (2006) Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: A Primer. Characterization Facility, University of Minnesota. pp. 1–26.

Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagenzen, J. A.: Molin, S (2007) Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*. **445**(7127), 533-536.

Hassard, F., Biddle, J., Cartmell, E., Jefferson, B., Tyrrel, S., Stephenson, T. (2015) Rotating biological contactors for wastewater treatment – a review. *Process Safety and Environmental Protection*. **94** 285–306

Lewandowski, Z., Boltz, J. P. (2011) Biofilms in Water and Wastewater Treatment. *Treatise on Water Science*. 529–570. doi:10.1016/b978-0-444-53199-5.00095-6

Leyva-Díaz, J. C., Martín-Pascual, J., Poyatos, J. M. (2016) Moving bed biofilm reactor to treat wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*. **14**(4), 881–910.

Kerchove, A. J., Elimelech, M. (2008) Calcium and magnesium cations enhance the adhesion of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* on alginate films. *Langmuir*. **24**: 3392–3399.

Khan, Z. U., Naz, I., Rehman, A., Rafiq, M., Ali, N., Ahmed, S. (2015) Performance efficiency of an integrated stone media fixed biofilm reactor and sand filter for sewage treatment. *Desalination and Water Treatment*. **54**(10): 2638–2647.



- Khatoon, N., Naz, I., Ali, M. I., Ali, N., Jamal, A., Hameed, A., Ahmed, S. (2014) Bacterial succession and degradative changes by biofilm on plastic medium for wastewater treatment. *Journal of Basic Microbiology*. **54**(7): 739–749.
- Komlos, J., Cunningham, A.B., Camper, A.K., Sharp, R.R. (2005) Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. *Microbial Ecology*. **49**(1), 114-125.
- Lazarova, V., Manem, J. (2000) Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment, U: Biofilms II: process analysis and applications (Bryers, J.D. Editor), Wiley-Liss, New York, 159-206.
- Matos, M., Alves, C., Campos, J. L., Brito, A. G., Nogueira, R. (2011) Sequencing batch biofilm reactor: from support design to reactor operation. *Environmental Technology*. **32**(10): 1121–1129.
- Melo, L. (2003) Biofilm formation and its role in fixed film processes. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, 337–349. doi:10.1016/b978-012470100-7/50021-2
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*. **4**
- Naz, I., Sehar, S., Perveen, I., Saroj, D. P., Ahmed, S. (2015) Physiological activities associated with biofilm growth in attached and suspended growth bioreactors under aerobic and anaerobic conditions. *Environmental Technology*. **36**(13): 1657–1671.
- O'Toole, G. A. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*. **47**: 1–2.
- Ødegaard, H. (2006) Innovations in wastewater treatment: The moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*. **53**(9): 17-33.
- Pal, S., Sarkar, U., Dasgupta, D. (2010) Dynamic simulation of secondary treatment processes using trickling filters in a sewage treatment works in Howrah, West Bengal, India. *Desalination*. **253**(1): 135–140.
- Prakash, B., Veeregowda, B. M., Krishnappa, G. (2003) Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Current Science*. **85**(9): 1299–1307.

- Sarkisova, S., Patrauchan, M. A., Berglund, D., Nivens, D. E., Franklin, M. J. (2005) Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*. **187**: 4327–4337.
- Sathian, S., Rajasimman, M., Radha, G., Shanmugapriya, V., Karthikeyan, C. (2014) Performance of SBR for the treatment of textile dye wastewater: Optimization and kinetic studies. *Alexandria Engineering Journal*. **53** (2) 417–426.
- Sehar, S., Naz, I. (2016) Role of the Biofilms in Wastewater Treatment. *Microbial Biofilms - Importance and Applications*, (August). doi: 10.5772/63499.
- Sengupta, S. (2014) Overview Wastewater Treatment and Reuse. *Comprehensive Water Quality and Purification*, 1–6. doi:10.1016/b978-0-12-382182-9.00042-6
- Sfaelou, S., Karapanagioti, H. K., Vakros, J. (2015) Studying the Formation of Biofilms on Supports with Different Polarity and Their Efficiency to Treat Wastewater. *Journal of Chemistry*, 1–7. doi:10.1155/2015/734384
- Simoës, M., Pereira, M. O., Silankorva, S., Azeredo, J., Vieira, M. J. (2007) The effect of the hydrodynamic conditions of the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*. **23**(3/4): 249–258.
- Singh, V., Mittal, A. K. (2012) Characterization of biofilm of a rotating biological contactor treating synthetic wastewater. *Water Science and Technology*. **66**(2), pp. 429–437.
- Su, R., Zhang, G., Wang, P., Li, S., Ravenelle, R. M., Crittenden, J. C. (2015) Treatment of Antibiotic Pharmaceutical Wastewater Using a Rotating Biological Contactor. *Journal of Chemistry*. **2015**, 1–8.
- Sun, S., Jia, T., Chen, K., Peng, Y., Zhang, L. (2019) Simultaneous removal of hydrogen sulfide and volatile organic sulfur compounds in off-gas mixture from a wastewater treatment plant using a two-stage bio-trickling filter system. *Front. Environ. Sci. Eng.* **13**, 60. <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1148-x>
- Tolker-Nielsen, T. (2015) Biofilm Development. *Microbiology Spectrum*. **3**(2). doi:10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014
- Vincke, E., Boon, N., Verstraete, W. (2001) Analysis of the microbial communities on corroded concrete sewer pipes – a case study. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **57**: 776-785.

- Vrouwenveldera, J. S., Graf von der Schulenburg, D. A., Kruithofa, J. C., Johnsc, M. L., van Loosdrecht, M. C. M. (2009) Biofouling of spiral-wound nanofiltration and reverse osmosis membranes: A feed spacer problem. *Water Research*. **43**: 583-594.
- Waqas, S., Bilad, M. R. (2019) A review on rotating biological contactors. *Indonesian Journal of Science and Technology*. **4** (2) 241–256.
- Waqas, S., Bilad, M. R., Man, Z. B., Klaysom, C., Jaafar, J., Khan, A. L. (2020) An integrated rotating biological contactor and membrane separation process for domestic wastewater treatment. *Alexandria Engineering Journal*. **59**(6), 4257–4265.
- Wilderer, P.A., McSwain, B.S. (2004) The SBR and its biofilm application potentials. *Water Science and Technology*. **50**(10), 1-10.
- Yu, Y., Feng, Y., Qiu, L., Han, W., Guan, L. (2008) Effect of grain-slag media for the treatment of wastewater in a biological aerated filter. *Bioresource Technology*. **99**(10): 4120– 4123.
- Zhao, K., Tseng, B. S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., Luijten, E., Parsek, M. R., Wong, G. C. L. (2013) Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. **497**: 388–391.
- Zylka, R., Dabrowski, W., Gogina, E., Yancen, O. (2018) Trickling Filter for High Efficiency Treatment of Dairy Sewage. *Journal of Ecological Engineering*. **19**(4):269–275

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Blaženko Marjanović

Blaženko Marjanović