

MAŁGORZATA KOWALSKA, MARIUSZ DUDZIAK, JOLANTA BOHDZIEWICZ

Instytut Inżynierii Wody i Ścieków  
Politechnika Śląska w Gliwicach

## USUWANIE KWASÓW HALOGENOOCTOWYCH Z WODY W BIOREAKTORZE Z ENZYMATYCZNĄ MEMBRANĄ ULTRAFILTRACYJNĄ

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono wyniki badań możliwości usuwania mieszaniny kwasów halogenooctowych z uzdatnianej wody w reaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. W procesie immobilizacji jako nośników używano poliakrylonitrylowych membran płaskich, modyfikowanych wodzianem hydrazyny i aldehydem glutarowym. Nadawą w procesie biodegradacji był wodny roztwór mieszaniny pięciu HAA o stężeniu  $1 \text{ mg/dm}^3$  każdego z nich. Po 6 h trwania procesu z zastosowaniem optymalnych, wyznaczonych eksperymentalnie parametrów operacyjnych całkowicie usunięto wszystkie kwasy.

**Słowa kluczowe:** kwasy halogenooctowe, immobilizacja, biodegradacja, enzymatyczne membrany ultrafiltracyjne

### Wstęp

Kwasy halogenooctowe (HAA) są grupą ubocznych produktów dezynfekcji wody, istotną z punktu widzenia jej walorów zdrowotnych. Powstają one w wyniku przemian prekursorów HAA (głównie substancji humusowych) zachodzących pod wpływem chloru. Wśród powstających w procesie dezynfekcji wody kwasów halogenooctowych wyróżnić można kwasy: chlorooctowy (MCAA), bromooctowy (MBAA), dichlorooctowy (DCAA), trichlorooctowy (TCAA), dibromooctowy (DBAA) i inne. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (USEPA) ustanowiła dopuszczalną wartość stężenia dla sumy pięciu kwasów HAA, tj. kwasów MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA na  $60 \text{ mg/m}^3$ . W przyszłości jednak przewiduje się obniżenie tej wartości do  $30 \text{ mg/m}^3$  ze względu na zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt substancjami rakotwórczymi, za które uznano HAA. Wytyczne WHO dotyczące jakości wody do picia określają zalecane dopuszczalne stężenia kwasu dichlorooctowego do  $50 \text{ mg/m}^3$  i kwasu trichlorooctowe-

go do  $100 \text{ mg/m}^3$ . Polskie Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 roku w sprawie warunków, jakim powinna odpowiadać woda do picia i na potrzeby gospodarze (ROZPORZĄDZENIE... 2007) odnosi się tylko do jednego kwasu – monochloroocetowego. Największe dopuszczalne stężenie tego kwasu może wynosić  $30 \text{ mg/m}^3$ . Na podstawie wyników badań zawartości HAA w wodzie Jeziora Zegrzyńskiego, w Wodociągu Północnym oraz w wodzie pitnej w Warszawie dowiedziono, że zmiany procesu oczyszczania mogą spowodować zmniejszenie ilości powstających HAA. Stwierdzono, że istnieje zależność powstawania kwasów halogenooctowych od stężeń organicznych prekursorów HAA. Zaobserwowano również dużą korelację między ilością powstających HAA a temperaturą wody. W zimie stężenie kwasów HAA było bardzo małe, natomiast w miesiącach letnich, kiedy temperatura powietrza przekraczała  $24^\circ\text{C}$ , stężenia HAA były wysokie (UBOCZNE... 2002). Zaobserwowano również dużą zgodność między stężeniami kwasów halogenooctowych a stężeniami trihalometanów. Świadczy to o istnieniu tych samych powodów powstawania THM i HAA. Obecnie obserwuje się ogólnościatową tendencję do eliminowania chloru w procesach uzdatniania wody i zastępowania go ozonem lub dwutlenkiem chloru, co znacznie zmniejsza ilość powstających kwasów HAA.

Badania miały określić możliwość usuwania kwasów halogenooctowych z uzdatnianej wody w reaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. Proces ultrafiltracyjnej biodegradacji, oparty na membranach z unieruchomionymi białkami aktywnymi, przebiega bowiem w temperaturze otoczenia, charakteryzuje się niską energochłonnością i niewielkimi kosztami eksploatacyjnymi. Pozwala na zmniejszenie stężenia substancji toksycznych w miejscu ich powstawania do wartości dopuszczalnych i umożliwia doczyszczanie uzdatnianej wody w procesie ultrafiltracji.

## Material i metody

Badania prowadzono w reaktorze typu S-76-400 firmy Nuclepore, o pojemności  $500 \text{ cm}^3$ , zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, pozwalającym na pracę z membraną o powierzchni  $38,5 \text{ cm}^2$ .

Zakres pracy obejmował:

- wytworzenie z poliakrylonitrylu metodą inwersji faz płaskich membran ultrafiltracyjnych, które stosowane były jako nośniki (suporty) w procesie immobilizacji enzymów,
- określenie właściwości transportowo-separacyjnych otrzymanych membran,
- modyfikację chemiczną membran obojętnych,
- unieruchomienie enzymów na powierzchni zmodyfikowanych membran za pomocą wiązania kowalencyjnego,
- określenie własności transportowo-separacyjnych membran enzymatycznych,
- ocenę przydatności wytworzonych membran enzymatycznych w procesie ultrafiltracyjnej biodegradacji roztworu kwasów halogenooctowych.

Do izolacji frakcji enzymów rozkładających kwasy halogenooctowe użyto szczepów bakterii wyodrębnionych z mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego uzyskanego na drodze transformacji osadów organicznych po fermentacji metanowej.

Adaptację drobnoustrojów prowadzono przez 30 dni, zasilając hodowlę wzrastającymi dawkami HAA.

Dominującymi w populacji rodzajami bakterii były: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* oraz *Bacillus*. Wszystkie szczepy użyte w badaniach adaptowano do degradacji 0,005 g/dm<sup>3</sup> wybranych kwasów. Frakcje enzymatyczne izolowane były metodą Hagemanna (PAWLIKOWSKA i IN. 1985).

Aby trwale związać komórki z powierzchnią membrany, obojętne superty poddano procesowi modyfikacji chemicznej. W tym celu przez membranę obojętną filtrowano 15% roztwór wodzianu hydrazyny (H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O), po czym zostały one przemyte wodą dejonizowaną. Kolejnym etapem była filtracja 100 cm<sup>3</sup> 5% roztworu aldehydu glutarowego (CHO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHO) oraz ponowne przemycie wodą dejonizowaną (WANG i IN. 2009). Immobilizację białek aktywnych na zmodyfikowanych chemicznie membranach obojętnych uzyskano dzięki dwukrotnej filtracji przez nie 250 cm<sup>3</sup> wodnego roztworu białka aktywnego przy ciśnieniu 0,05 MPa oraz intensywności mieszania 50 obr/min.

Własności transportowe membran obojętnych i enzymatycznych określano, wyznaczając zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego. W tym celu filtrowano przez nie wodę dejonizowaną, stosując ciśnienie transmembranowe zmieniane w zakresie od 0,05 do 0,25 MPa. Objętościowy strumień permeatu ( $J_v$ ) obliczano ze wzoru:

$$J_v = \frac{V_v}{s \cdot t}$$

gdzie:

- $J_v$  – objętościowy strumień permeatu (m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>·s),
- $V_v$  – objętość permeatu (m<sup>3</sup>),
- $s$  – powierzchnia membrany (m<sup>2</sup>),
- $t$  – czas (s).

Własności separacyjne membran (obojętnych i enzymatycznych) zostały wyznaczone na podstawie wyników otrzymanych podczas testowania ich roztworem dekstranu oraz wodnym roztworem mieszaniny pięciu kwasów halogenooctowych, a mianowicie: monochlorooctowego, dichlorooctowego, trichlorooctowego, monobromooctowego i dibromooctowego. Stężenie każdego z nich wynosiło 1 mg/dm<sup>3</sup>. Podobnie jak w testacji wodą dejonizowaną, stosowano zmienne ciśnienie transmembranowe (od 0,05 do 0,25 MPa) i obliczano objętościowy strumień permeatu. Stwierdzono, że membrany obojętne nie zatrzymywały żadnego z kwasów, czyli współczynniki retencji HAA wynosiły zero.

Wodny roztwór dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 Da i stężeniu 5 g/dm<sup>3</sup> filtrowano przez membrany przy ciśnieniu 0,15 MPa oraz prędkości mieszania 100 obr/min. Odbierano 10% nadawy, oznaczając w permeacie i retentacie udziały poszczególnych mas cząsteczkowych dekstranu przy pomocy chromatografu żelowego. Na podstawie zarejestrowanych chromatogramów obliczano zawartość dekstranu w poszczególnych przedziałach mas cząsteczkowych, na które podzielono cały strumień nadawy i permeatu. Współczynniki retencji dekstranu obliczano z zależności:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_n}\right) \cdot 100\%$$

gdzie:

- $C_p$  – stężenie składnika w permeacie,  
 $C_n$  – stężenie składnika w nadawie.

Obliczone wartości współczynników retencji pozwoliły na wyznaczenie przepuszczalności granicznej (cut-off) badanych membran.

Własności transportowo-separacyjne membran enzymatycznych określano w taki sam sposób, jak w wypadku membran obojętnych, wyznaczając zależności objętościowego strumienia permeatu (dla wody dejonizowanej i roztworu kwasów) od ciśnienia transmembranowego. Dodatkowo, w oparciu o otrzymane stężenia poszczególnych kwasów w strumieniach ultrafiltracyjnych, obliczano stopień ich biodegradacji ( $B_d$ ) zgodnie z równaniem:

$$B_d = \frac{1 - (C_p \cdot V_p + C_r \cdot V_r)}{C_n \cdot V_n} \cdot 100\%$$

gdzie:

- $B_d$  – stopień biodegradacji ksenobiotyku (%),  
 $C_p$  – stężenie ksenobiotyku w permeacie (mol/dm<sup>3</sup>),  
 $C_n$  – stężenie ksenobiotyku w nadawie (mol/dm<sup>3</sup>),  
 $C_r$  – stężenie ksenobiotyku w retentacie (mol/dm<sup>3</sup>),  
 $V_p$  – objętość permeatu (dm<sup>3</sup>),  
 $V_n$  – objętość nadawy (dm<sup>3</sup>),  
 $V_r$  – objętość retentatu (dm<sup>3</sup>).

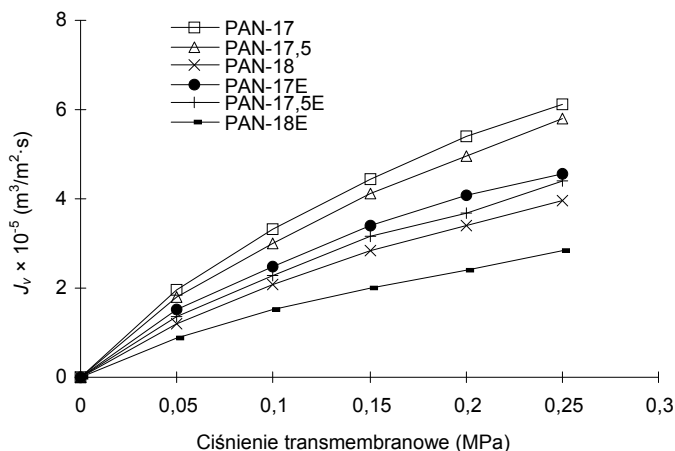
Ponieważ ciśnienie transmembranowe oraz szybkość obrotów mieszadła mają wpływ na czas kontaktu ksenobiotyków z biokatalizatorem, określono również najkorzystniejsze wartości tych parametrów operacyjnych procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji HAA. Przy ich zastosowaniu wydajność procesu membranowego i efektywność usuwania HAA były największe.

Stężenie białka aktywnego oznaczano kolorymetryczną metodą Bradforda, polegającą na barwnej reakcji białka z odczynnikiem Bio-Rad-Protein-Assay. Korzystano ze spektrofotometru UV VIS Cary 50 (Varian). Aktywność membran enzymatycznych określano, filtrując przez nie w temperaturze 298 K, w czasie 10 minut, roztwór mieszaniny kwasów o stężeniu 0,1 mg/dm<sup>3</sup>. Ciśnienie transmembranowe wynosiło 0,1 MPa, a intensywność mieszania – 50 obr/min. Następnie w nadawie, permeacie i retentacie oznaczano stężenie kwasów i na tej podstawie określano ilość rozłożonego w tym czasie każdego z nich. Analizę jakościowo-ilościową kwasów halogenooctowych prowadzono przy użyciu chromatografu GC-MS (model Saturn 2100 T firmy Varian) wyposażonego w kolumnę SLB<sup>TM</sup>-5ms firmy Supleco. Temperaturę pieca chromatograficznego podczas analizy programowano w zakresie od 40 do 210°C. Pozostałe parametry temperaturowe były następujące: dozownik typu Split/Splitless – 210°C, pułapka jonowa i źródło jonów – 200°C. Analizę ilościową prowadzono na podstawie metody FS (full scan) w zakresie mas od 50 do 250 a.m.u. Procedura przygotowania próby

wodnej była adaptacją metody US EPA 552.2 i obejmowała dwa zasadnicze etapy: ekstrakcję związków z użyciem eteru tert-butylo-metylowego (MTBE) oraz ich upochładnianie do estrów metylowych.

## Wyniki

Na rysunku 1 przedstawiono krzywe obrazujące zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmbranowego wyznaczone dla membran obojętnych i enzymatycznych. We wszystkich membranach wraz ze wzrostem ciśnienia transmbranowego wzrastała wartość objętościowego strumienia permeatu. W membranach enzymatycznych wartość  $J_v$ , w porównaniu z podobną zależnością otrzymaną podczas testacji membran obojętnych, nieznacznie się obniżyła (średnio o 3,5% dla wszystkich membran).



Rys. 1. Zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia dla membran obojętnych i enzymatycznych; nadawa: roztwór mieszaniny kwasów

Fig. 1. The dependence of volume permeate flux on transmembrane pressure for the neutral end enzymatic membranes; filtration medium: the HAA solution

Wyniki obrazujące ilość unieruchomionego białka oraz aktywność otrzymanych membran enzymatycznych przedstawiono w tabeli 1. Najwięcej białka (20,7 mg) udało się związać z membraną PAN-17,5E i ta też membrana charakteryzowała się najwyższą aktywnością enzymatyczną.

Na podstawie wyników zdecydowano, że dalsze badania (określenie najbardziej efektywnych parametrów procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji) zostaną prowadzone z wykorzystaniem membrany PAN-17,5E, charakteryzowała się ona bowiem najwyższą aktywnością enzymatyczną oraz zadowalającymi własnościami transportowo-separacyjnymi.

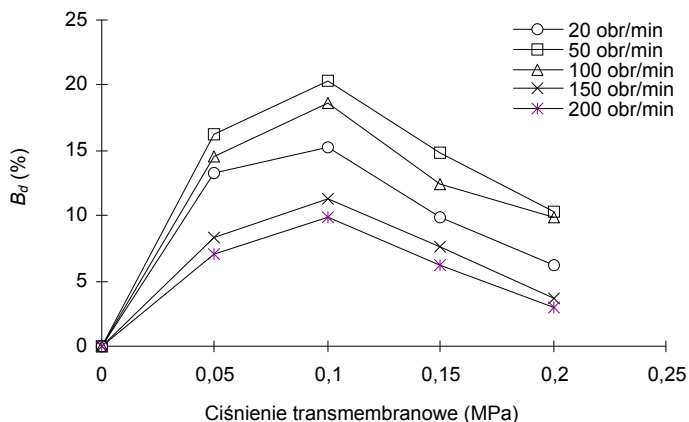
Tabela 1. Ilość unieruchomionego białka oraz aktywność membran enzymatycznych  
Table 1. Enzymatic activity of the immobilized membrane

Membrana	Ilość unieruchomionego białka (mg)	Aktywność membrany (mmol kwasu na 10 min na 1 cm <sup>2</sup> pow. membrany)				
		MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA
PAN-17E	20,1	0,0343	0,0345	0,0344	0,0348	0,0342
PAN-17,5E	20,7	0,0351	0,0352	0,0352	0,0356	0,0348
PAN-18E	19,8	0,0332	0,0334	0,0331	0,0340	0,0330

Dzięki wynikom uzyskanym podczas filtracji roztworu dekstranu przez membrany PAN-17,5E i PAN-17,5 (na podstawie zależności współczynnika retencji od masy cząsteczkowej dekstranu) wyznaczono ich cut-off. Dla PAN-17,5E wyniósł on 13,4 kDa, a dla membrany obojętnej PAN-17,5 – 189 kDa.

Aby wyznaczyć najkorzystniejsze parametry prowadzenia procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji HAA (ciśnienia transmembranowego oraz intensywności mieszania nadawcy), przez membranę PAN-17,5E filtrowano roztwór mieszaniny kwasów, zmieniając ciśnienie transmembranowe od 0,05 do 0,2 MPa dla różnych szybkości obrotów mieszadła (od 20 do 200 obr/min.). Otrzymane zależności (na przykładzie kwasu dichlorooctowego – w pozostałych kwasach otrzymane wartości były podobne) przedstawiono na rysunku 2. Wynika z nich, że ciśnienie, przy którym nastąpił najwyższy stopień usunięcia kwasów, to 0,1 MPa, a intensywność mieszania – 50 obr/min. Podobne zależności uzyskano dla pozostałych kwasów znajdujących się w mieszaninie. Wyznaczone parametry pozwoliły na uzyskanie największego stopnia biodegradacji HAA, kształtującego się na poziomie 20,4%. Niewiele mniejszy stopień usunięcia uzyskano dla tego samego ciśnienia, lecz dla intensywności mieszania wynoszącej 100 obr/min. Wynosił on 18,7%. Podczas stosowania intensywności mieszania wynoszącej 150 obr/min. stopień ten był już o 4,7% niższy od poprzedniego, a  $B_d$ , wynoszący tylko 9,9%, uzyskano dla największej intensywności mieszania wynoszącej 200 obr/min. Tak mała wartość  $B_d$  może być wynikiem zbyt krótkiego kontaktu cząstek ksenobiotyków z biokatalizatorem oraz częściowym uszkodzeniem struktury cząsteczek białka aktywnego unieruchomionego na powierzchni membrany, a co za tym idzie niższą aktywnością enzymatyczną stosowanej membrany. Z rysunku 2 wynika również, że największy stopień biodegradacji kwasu dichlorooctowego uzyskano przy szybkości mieszania wynoszącej 50 obr/min dla każdego ze stosowanych ciśnień transmembranowych. Największy stopień biodegradacji uzyskano dla ciśnienia 0,1 MPa – wynosił on 18,7%. Przy ciśnieniu 0,15 MPa stopień usunięcia kwasu był o 2,4% niższy. Wartość  $B_d$ , wynoszącą 16,3%, uzyskano dla najmniejszego przyłożonego ciśnienia transmembranowego (0,05 MPa), najniższy stopień biodegradacji ksenobiotyku zaś, przy intensywności mieszania wynoszącym 50 obr/min., otrzymano dla największego z ciśnień, wynoszącego 0,2 MPa.

Na stopień usunięcia kwasu wpływ ma przede wszystkim czas kontaktu ksenobiotyków z enzymem, czyli czas prowadzenia procesu filtracji. Filtrację wodnego roztworu



Rys. 2. Zależność stopnia biodegradacji HAA (na przykładzie DCAA) na membranie PAN-17,5E od ciśnienia transmembranowego i intensywności mieszania

Fig. 2. Dependence of the biodegradation degree of HAA (for example DCAA) on the transmembrane pressure and on the stirring intensity for enzymatic membrane PAN-17,5E

HAA przez membranę PAN-17,5E prowadzono w czasie 6 h przy zastosowaniu wyznaczonych wcześniej najkorzystniejszych parametrów procesowych, oznaczając stopień biodegradacji poszczególnych kwasów w półgodzinnych odstępach czasu. Po trzech godzinach procesu całkowicie usunięto kwas dibromooctowy, a po czterech – dichlorooctowy. Po kolejnej godzinie biodegradacji całkowicie uległy: kwas monochlorooctowy i trichlorooctowy, a po sześciu godzinach ostatni z kwasów – dibromooctowy. Wraz z czasem prowadzenia filtracji nieznacznie zmienił się objętościowy strumień permeatu. Średnia wartość  $J_v$ , którą uzyskano podczas prowadzenia procesu, wynosiła  $3,8 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ .

## Dyskusja

Badania prowadzono w ramach projektu badawczego finansowanego przez KBN i były one kontynuacją prowadzonych prac wcześniej. Poprzednio procesowi ultrafiltracyjnej biodegradacji poddawano roztwory pojedynczych kwasów halogenooctowych (KOWALSKA i BOHDZIEWICZ 2010) i uzyskiwano wówczas zbliżone do siebie wyniki dla wszystkich pięciu kwasów: podobna aktywność membran enzymatycznych i czas całkowitego usunięcia ksenobiotyku. Prowadząc badania, nie spodziewano się takiej różnicy w czasie usunięcia między poszczególnymi kwasami. Wyjaśnienie tego będzie tematem kolejnych badań. Ponieważ w literaturze nie ma opisu podobnych badań, autorzy nie mogą skonfrontować wyników.

## Wnioski

1. Istnieje możliwość prowadzenia procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji mieszaniny kwasów halogenoocetowych w bioreaktorze z enzymatyczną membraną poliakrylonitrylową.

2. Najkorzystniejszymi, wyznaczonymi doświadczalnie parametrami operacyjnymi procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji roztworu wybranych pięciu HAA były: ciśnienie transmembranowe – 0,1 MPa oraz intensywność mieszania – 50 obr/min.

3. Prowadzenie ultrafiltracyjnej biodegradacji z zastosowaniem optymalnych parametrów operacyjnych procesu po sześciu godzinach pozwoliło na całkowite usunięcie wszystkich kwasów.

## Literatura

- DRIOLI E., GIORNO L., 1999. *Biocatalytic membrane reactors*. Taylor & Francis, London, UK.
- KOWALSKA M., BOHDZIEWICZ J., 2010. Usuwanie kwasu dichlorooctowego z wody w bioreaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. *Monogr. Kom. Inż. Środ. PAN* 49: 279-294.
- PAWLIKOWSKA Cz., CHMIEŁOWSKI J., SIKORA M., 1985. Bakterie rodzaju *Pseudomonas* rozkładające cyjanek wyodrębnione z osadów organicznych. *Acta Biol.* 18: 24-32.
- ROZPORZĄDZENIE Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 roku w sprawie warunków jakim powinna odpowiadać woda do picia i na potrzeby gospodarcze. 2007. *Dz. U.* 61, poz. 417.
- UBOCZNE produkty dezynfekcji wody. 2002. Red. J. Dojlido. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- WANG Y., ZHANG J., YIN J., 2009. Progress of enzyme immobilization and its potential application. *Desalin. Water Treat.* 1: 157-171.

## REMOVAL OF HALOGENOACETIC ACIDS BY MEANS OF ULTRAFILTRATION WITH THE USE OF ENZYMATIC MEMBRANE

**Summary.** The immobilization of enzymes on ultrafiltration flat membranes made from polyacrylonitrile modified with hydrazine hydrate and glutaraldehyde and their application to the removed mixture of five halogenacetic acids was examined. The solution contained 1 mg/dm<sup>3</sup> of each acid. The experiment, during which 100% of xenobiotics was removed, lasted 6 hours and was carried out under experimentally determined conditions.

**Key words:** halogenacetic acids, immobilization, biodegradation, ultrafiltration enzymatic membranes



Kowalska M., Dudziak M., Bohdziewicz J., 2011. Usuwanie kwasów halogenooctowych z wody w bioreaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 4, #37.

---

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

*Małgorzata Kowalska, Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, Politechnika Śląska w Gliwicach, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice, Poland, e-mail: malgorzata.kowalska@polsl.pl*

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print:*

*11.05.2011*

*Do cytowania – For citation:*

*Kowalska M., Dudziak M., Bohdziewicz J., 2011. Usuwanie kwasów halogenooctowych z wody w bioreaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. *Nauka Przyr. Technol.* 5, 4, #37.*