

Małgorzata Kowalska, Mariusz Dudziak, Jolanta Bohdziewicz

Usuwanie kwasów halogenooctowych w zintegrowanym procesie biodegradacja–ultrafiltracja z zastosowaniem enzymatycznych membran kapilarnych

Kwasy halogenooctowe (HAA) powstają przede wszystkim podczas chlorowania wody zawierającej ich organiczne prekursory. Udział ilościowy HAA w TOX (suma halogenowanych związków organicznych) jest zwykle mniejszy niż trójhalemetanów, lecz większy od pozostałych grup ubocznych produktów utleniania chlorem [1, 2], przy czym zawartość HAA jest wprost proporcjonalna do ilości ich prekursorów organicznych w wodzie i dawki chloru [3–5]. Według Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (U.S. EPA) z 2008 r., suma pięciu kwasów halogenooctowych (monochlorooctowego, dichlorooctowego, trichlorooctowego, monobromooctowego i dibromooctowego) w wodzie nie może być większa niż 60 mg/m³. W przyszłości przewiduje się jednak obniżenie tej wartości do 30 mg/m³, ze względu na zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt substancjami rakotwórczymi, za które uznano HAA [6, 7]. Według wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), dotyczących jakości wody do picia, dopuszczalna zawartość kwasu monochlorooctowego wynosi 20 mg/m³, dichlorooctowego 50 mg/m³, a trichlorooctowego 200 mg/m³ [8]. W polskich wymaganiach stawianych wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi kwasy halogenooctowe nie są uwzględnione [9].

Cel i metodyka badań

Celem przeprowadzonych badań było określenie skuteczności usuwania kwasów halogenooctowych z wody w zintegrowanym procesie biodegradacja–ultrafiltracja. Proces ten, oparty na membranach z unieruchomionymi białkami aktywnymi, przebiega w temperaturze otoczenia i charakteryzuje się małą energochłonnością oraz niewielkimi kosztami eksploatacyjnymi. Równocześnie pozwala on na zmniejszenie zawartości substancji toksycznych w miejscu ich powstawania do wartości dopuszczalnych oraz umożliwia doczyszczanie wody w procesie ultrafiltracji, co jest charakterystyczną cechą reaktorów wielofunkcyjnych [10, 11]. Zakres badań obejmował:

- modyfikację chemiczną (wodzianem hydrazyny i aldehydem glutarowym) obojętnych kapilarnych membran poliakrylonitrylowych celem otrzymania grup funkcyjnych zdolnych do utworzenia trwałego, kowalencyjnego wiązania z enzymem,

- unieruchomienie na wewnętrznej powierzchni zmodyfikowanych kapilar enzymów rozkładających kwasy halogenooctowe,
- określenie właściwości transportowo-separacyjnych membran enzymatycznych,
- ocenę przydatności membran enzymatycznych w zintegrowanym procesie biodegradacja–ultrafiltracja kwasów halogenooctowych.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia Labscale™ TFF System (Millipore) ze zbiornikiem o pojemności 500 cm³, wyposażonego w moduł poliakrylonitrylowych ultrafiltracyjnych membran kapilarnych o powierzchni 49 cm².

Enzymy uzyskano metodą Hagemana ze szczepów bakterii wyodrębnionych z osadu czynnego zaadaptowanego do rozkładu HAA. Wyizolowane szczepy bakterii należały do rodzajów *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Bacillus*. Wodny roztwór modelowy był mieszaniną pięciu kwasów halogenooctowych – monochlorooctowego (MCAA), dichlorooctowego (DCAA), trichlorooctowego (TCAA), monobromooctowego (MBAA) i dibromooctowego (DBAA) o zawartości 1 g/m³ każdego z nich.

Właściwości transportowo-separacyjne membran określono filtrując przez nie modelowy roztwór mieszaniny kwasów, jednocześnie wyznaczając zależność strumienia objętości roztworu (J_v) od ciśnienia transmembranowego i liniowej prędkości przepływu roztworu, natomiast na podstawie obliczonego stężenia ksenobiotyku w strumieniu ultrafiltracyjnym określono skuteczność usuwania poszczególnych HAA [10, 12]. Strumień objętości roztworu modelowego obliczono ze wzoru:

$$J_v = V_v / st \quad (1)$$

w którym:

J_v – strumień objętości roztworu modelowego, m³/m²s

V_v – objętość roztworu modelowego, m³

s – powierzchnia membrany, m²

t – czas, s

Skuteczność usuwania kwasów halogenooctowych wyznaczono z zależności:

$$S_{HAA} = \left(1 - \frac{c_p V_p + c_r V_r}{c_n V_n} \right) 100 \quad (2)$$

w której:

S_{HAA} – skuteczność usuwania HAA, %

c_p – stężenie HAA w permeacie (w odpływie), mol/dm³

c_r – stężenie HAA w retentacie, mol/dm³

c_n – stężenie HAA w dopływie, mol/dm³

V_p – objętość permeatu (odpływu), dm^3

V_r – objętość retentatu, dm^3

V_n – objętość roztworu modelowego, dm^3

Zawartość białka aktywnego oznaczono metodą kolorymetryczną Bradforda, polegającą na barwnej reakcji białka z odczynnikiem Bio-Rad-Protein-Assay. Korzystano ze spektrofotometru UV VIS Cary 50 (Varian). Aktywność membran enzymatycznych określono filtrując przez nie roztwór mieszaniny kwasów o stężeniu 1 g/m^3 (temp. 25°C , czas 10 min). Ciśnienie transmembranowe wynosiło $0,1 \text{ MPa}$, a liniowa prędkość przepływu roztworu modelowego $0,5 \text{ m/s}$. Następnie w roztworze dopływającym oraz permeacie i retencie oznaczono zawartość kwasów i na tej podstawie określono ilość rozłożonego w tym czasie każdego z nich.

Do oznaczenia kwasów halogenooctowych zastosowano metodę 552.2 (U.S. EPA) [13], a do analizy jakościowo-ilościowej ekstraktu wykorzystano chromatograf gazowy sprzężony z detektorem mas (GC-MS). Włączenie analizy GC-MS w szlak oznaczania kwasów halogenooctowych stanowiło modyfikację standardowej metody. W celu wydzielenia kwasów halogenooctowych do próbki wody o objętości 30 cm^3 wprowadzono $1,5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$, 12 g stałego Na_2SO_4 i 3 cm^3 eteru terbutylometylowego, a następnie intensywnie wytrząsano przez 5 min w rozdzielaczu. Po rozdzieleniu frakcji organicznej pobrano $2,5 \text{ cm}^3$ ekstraktu do szklanej próbki i dodano 1 cm^3 $10\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ w CH_3OH . Tak przygotowaną próbkę w celu upochodnienia inkubowano przez 30 min w temperaturze 50°C . Po tym czasie do roztworu dodano 4 cm^3 10% wodnego roztworu Na_2SO_4 i przeniesiono ponownie do rozdzielacza, po czym rozdzieloną warstwę organiczną poddano analizie GC-MS. Do oznaczeń wykorzystano aparat GC-MS model Saturn 2100 T (Varian). Parametry oznaczenia chromatograficznego przedstawiono w tabeli 1. Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o metodę FS (full scan) w zakresie mas $50\div 250 \text{ u}$. Opracowana procedura umożliwia rozdział 5-składnikowej mieszaniny kwasów halogenooctowych i ich oznaczenie w wodzie w zakresie $15\div 30 \text{ mg/m}^3$, w zależności od analizowanego związku.

Tabela 1. Parametry procesowe GC-MS
Table 1. Parameters of GC-MS assays

GC	kolumna	Varian SLB™ – 5 ms $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $0,25 \mu\text{m}$
	program temperaturowy	40°C (10 min), $20^\circ\text{C}/\text{min}$ do 210°C (1,5 min)
	objętość nastrzyku iniektor	$1 \mu\text{l}$ 210°C (splitless)
	gaz przepływ	hel $1,1 \text{ cm}^3/\text{min}$
MS	jonizacja energia jonizacji	El 70 eV
	temperatura źródła jonów	200°C

Dyskusja wyników badań

Na skuteczność procesu biodegradacji kwasów halogenooctowych miały wpływ zarówno właściwości membrany enzymatycznej (aktywność enzymatyczna i charakterystyka transportowo-separacyjna), jak i parametry operacyjne ultrafiltracji, takie jak ciśnienie transmembranowe, liniowa prędkość przepływu roztworu modelowego oraz czas

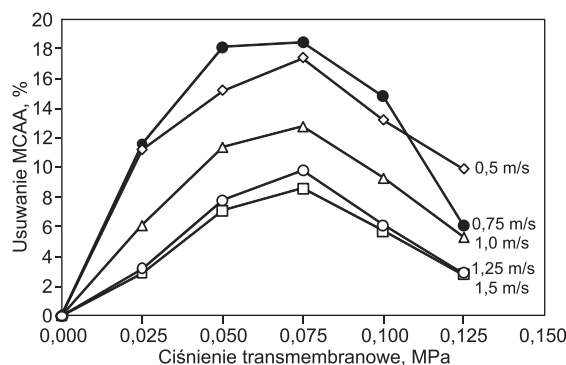
kontaktu ksenobiotyku z powierzchnią aktywną membrany (czas trwania procesu). Wyniki obrazujące ilość unieruchomionego białka oraz aktywność otrzymanych membran enzymatycznych przedstawiono w tabeli 2. Uzyskane wartości były wyższe od otrzymanych w badaniach wstępnych [10], w których proces biodegradacja–ultrafiltracja przeprowadzono w systemie filtracji jednokierunkowej.

Tabela 2. Ilość unieruchomionego białka i aktywność membran enzymatycznych

Table 2. Quantity of immobilized proteins and enzymatic activity of the membranes

Ilość białka mg	Aktywność membrany, $\text{mmol}/10 \text{ min} \cdot \text{cm}^2$				
	MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA
23,8	0,0365	0,0364	0,0364	0,0361	0,0362

W celu wyznaczenia optymalnych wartości ciśnienia transmembranowego oraz prędkości przepływu w procesie biodegradacja–ultrafiltracja, przez membrany filtrowano wodny roztwór mieszaniny HAA, zmieniając ciśnienie w zakresie $0,025\div 0,125 \text{ MPa}$ i przyjmując prędkość przepływu w przedziale $0,5\div 2,0 \text{ m/s}$. Czas trwania każdego cyklu filtracji wynosił 1 h. Otrzymane przykładowe zależności, uzyskane w przypadku kwasu monochlorooctowego (MCAA), przedstawiono na rysunku 1. W przypadku pozostałych kwasów wystąpiły podobne tendencje.

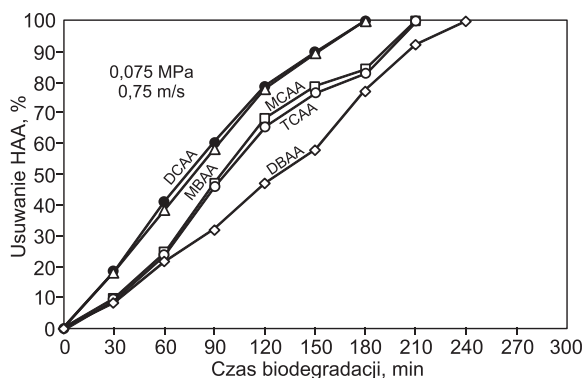


Rys. 1. Zależność skuteczności usuwania MCAA od ciśnienia transmembranowego

i liniowej prędkości przepływu roztworu modelowego
Fig. 1. Efficiency of MCAA removal related to transmembrane pressure and linear flow velocity of the model solution

Największa skuteczność usunięcia kwasu monochlorooctowego – $18,5\%$ – miała miejsce przy ciśnieniu transmembranowym $0,075 \text{ MPa}$ i liniowej prędkości przepływu roztworu modelowego $0,75 \text{ m/s}$. Podobne zależności uzyskano w przypadku pozostałych kwasów znajdujących się w mieszaninie. Bardzo zbliżone wyniki otrzymano przy tym samym ciśnieniu i prędkości $0,5 \text{ m/s}$ – $18,1\%$. W przypadku pozostałych zastosowanych liniowych prędkości przepływu roztworu modelowego przez membranę, usunięcie ksenobiotyków było dużo mniejsze ($12,8\%$, $9,8\%$ i $8,6\%$, odpowiednio przy prędkości 1 m/s , $1,25 \text{ m/s}$ i $1,5 \text{ m/s}$). Takie niewielkie wartości były wynikiem zbyt krótkiego czasu kontaktu kwasów z biokatalizatorem oraz częściowym uszkodzeniem struktury unieruchomionego białka aktywnego, co skutkowało zmniejszeniem aktywności enzymatycznej membran. Z rysunku 1 wynika również, że liniowa prędkość przepływu równa $0,75 \text{ m/s}$ zapewniła największą skuteczność usuwania kwasów halogenooctowych przy wszystkich badanych ciśnieniach transmembranowych. Na stopień usunięcia HAA miał przede wszystkim

wpływ czasu kontaktu ksenobiotyku z enzymem, czyli czas prowadzenia procesu filtracji. Filtrację wodnego roztworu mieszaniny HAA przez membrany kapilarne prowadzono przez 4 h (rys. 2), przy zastosowaniu wyznaczonych wcześniej najkorzystniejszych wartości parametrów procesowych, oznaczając skuteczność usuwania poszczególnych kwasów w odstępach półgodzinnych. Po 3 h prowadzeniu procesu w tych warunkach procesowych z roztworu modelowego całkowicie zostały usunięte kwasy dichlorooctowy i monobromooctowy, po 3,5 h – także kwasy monochlorooctowy i trichlorooctowy, natomiast kwas dibromooctowy został usunięty po 4 h filtracji. Wydajność procesu w czasie badań nie uległa zmianie, a średnia wartość strumienia objętości permeatu wynosiła $3,40 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$.



Rys. 2. Zależność skuteczności usuwania kwasów halogenooctowych (HAA) od czasu trwania procesu

Fig. 2. Efficiency of haloacetic acid (HAA) removal related to the duration of the process

Podsumowanie

Zintegrowany proces biodegradacja–ultrafiltracja, prowadzony w wielofunkcyjnym bioreaktorze z poliakrylonitrylowymi kapilarnymi membranami enzymatycznymi, okazał się skuteczną metodą usuwania kwasów halogenooctowych z wody. Najkorzystniejszymi, wyznaczonymi doświadczalnie, parametrami operacyjnymi biodegradacji ultrafiltracyjnej wybranych HAA były: ciśnienie transmembranowe – 0,075 MPa oraz liniowa prędkość przepływu roztworu przez membrany – 0,75 m/s. Prowadzenie procesu z zastosowaniem optymalnych parametrów operacyjnych pozwoliło w czasie 4 h na całkowite usunięcie wszystkich badanych kwasów halogenooctowych. Skrócenie wyznaczonego czasu kontaktu można uzyskać zwiększając powierzchnię aktywną membran, co będzie przedmiotem dalszych prac z tego zakresu.

Praca naukowa została sfinansowana ze środków przeznaczonych na naukę w latach 2009–2011, jako projekt badawczy nr N N523 4523 36 pt. „Biodegradacja kwasów halogenooctowych w reaktorze z enzymatycznymi membranami ultrafiltracyjnymi”.

LITERATURA

1. A. JANCEWICZ, U. DMITRUK, A. KWIATKOWSKA: Badania zawartości wybranych substancji halogenoorganicznych (AOX) w wodzie i ściekach. *Ochrona Środowiska* 2011, vol. 33, nr 1, ss. 25–29.
2. J. CZARNIECKA, A.M. DZIUBEK, J. MAĆKIEWICZ: Badania wpływu jakości wody na powstawanie adsorbowanych chlorowcopochodnych związków organicznych (AOX). *Ochrona Środowiska* 2007, vol. 29, nr 2, ss. 41–42.
3. J.R. DOJLIDO, E. ZBIEC: Kwasy halogenooctowe w wodzie do picia. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 1998, nr 5, ss. 221–225.
4. S. BATTERMAN, L. ZHANG, S. WANG: Quenching of chlorination disinfection by products formation in drinking water by hydrogen peroxide. *Water Research* 2009, Vol. 34, No. 5, pp. 1652–1658.
5. E. ZBIEC, J.R. DOJLIDO: Uboczne produkty dezynfekcji wody. *Ochrona Środowiska* 1999, vol. 21, nr 3, ss. 37–44.
6. M. KUCHARSKI, D. KOPROWICZ: Chloroacetic acids in drinking water as ozonation and disinfection chlorine by-products. *Polish Journal of Environmental Studies* 2007, Vol. 16, No. 2A, pp. 150–157.
7. J.M. SYMONS: Treatment techniques for controlling trihalomethanes in drinking water. *Journal American Water Works Association* 1975, Vol. 47, No. 67, pp. 634–642.
8. R.I.B. PETERS, C. ERKELENS, E.W.B. LEER, L. GLAN: The analysis of halogenated acetic acids in Dutch drinking waters. *Water Research* 2008, Vol. 25, No. 4, pp. 473–477.
9. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. nr 72, poz. 466.
10. M. KOWALSKA, J. BOHDZIEWICZ: Usuwanie kwasu monobromooctowego z zastosowaniem ultrafiltracyjnych membran enzymatycznych. *Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN* 2008, ss. 126–135.
11. W. ADAMSKI, K. MAJEWSKA-NOWAK: Zastosowanie reaktorów wielofunkcyjnych do oczyszczania wody. *Ochrona Środowiska* 2010, vol. 32, nr 1, ss. 3–8.
12. M. KOWALSKA, J. BOHDZIEWICZ: Usuwanie kwasu dichlorooctowego z wody enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. *Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN* 2010, ss. 132–147.
13. Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection. Method 552.2, Rev. 1.0, U.S. EPA, 1995.

Kowalska, M., Dudziak, M., Bohdziewicz, J. Removal of Haloacetic Acids by the Integrated Process Biodegradation–Ultrafiltration Involving Enzymatic Capillary Membranes. *Ochrona Środowiska* 2011, Vol. 33, No. 4, pp. 49–51.

Abstract: Five haloacetic acids (HAA) of choice were removed from a model solution in the course of the integrated process biodegradation–ultrafiltration. Experiments were performed in a reactor containing capillary ultrafiltration membranes with HAA-degrading enzymes immobilized on their surfaces. The enzymes had been isolated from bacterial strains of the genera *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* and *Bacillus* separated from active sludge adapted to HAA degradation. The model HAA

solution was a mixture composed of MCAA, DCAA, TCAA, MBAA and DBAA (each in the amount of 1 g/m^3). Based on the results obtained, the most advantageous operating parameters of the process were determined. Optimal transmembrane pressure amounted to 0.075 MPa, linear flow velocity of the model solution being 0.75 m/s. Under such conditions, complete removal of monohaloacetic and monobromoacetic acids was achieved after 3 hours, and that of the other acids after 4 hours of the process. The time of contact can be reduced by increasing the active surface area of the membranes, but this issue will be dealt with in a future study.

Keywords: Haloacetic acids, biodegradation, enzymatic ultrafiltration membrane.