

Małgorzata KOWALSKA¹, Jolanta BOHDZIEWICZ¹

USUWANIE FOSFORANÓW W BIOREAKTORZE Z ENZYMATYCZNYMI MEMBRANAMI ULTRAFILTRACYJNYMI

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki badań nad możliwością biodegradacji fosforanów w reaktorze z enzymatycznymi membranami ultrafiltracyjnymi. W procesie immobilizacji stosowano poliakrylonitrylowe membrany kapilarne, modyfikowane wodzianem hydrazyny i aldehydem glutarowym. Ultrafiltracyjne membrany enzymatyczne testowano ściekami symulowanymi, zawierającymi 5 mg P/dm³ (w formie K₂HPO₄). Podczas trwania sześciogodzinnej ultrafiltracyjnej biodegradacji z zastosowaniem wyznaczonych eksperymentalnie parametrów procesowych usunięto 53,3% fosforanów.

ENZYMATIC MEMBRANES IN BIODEGRADATION OF PHOSPHATES

Summary. The immobilization of enzymes on ultrafiltration capillary membranes made from polyacrylonitrile modified with hydrazine hydrate and glutaraldehyde and their application to the biodegradation of phosphates was examined. Ultrafiltration enzymatic membranes were tested by simulated dipotassium phosphate wastewaters which contained 5 mgP/dm³ (as K₂HPO₄). Carrying out ultrafiltration with assigned optimal parameters enable an 53.3% degradation after 6 hours.

1. Wprowadzenie

Fosfor należy do grupy pierwiastków biogennych, mających istotny wpływ na regulację rozwoju flory i fauny w zbiornikach wodnych. Wprowadzanie nadmiernych ilości tego pierwiastka lub jego związków do zbiorników powoduje intensyfikację przyrostu biomasy glonów, co pociąga za sobą obniżanie się stężenia tlenu i w konsekwencji prowadzi do obumie-

¹ Politechnika Śląska, Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice, e-mail: kowalska@polsl.gliwice.pl

rania organizmów żywych. Granicznym stężeniem tego pierwiastka, powyżej którego obserwuje się intensywny rozwój glonów, jest $0,1 \text{ mg PO}_4^{3-}/\text{dm}^3$. Najlepszą metodą uchronienia zbiorników wodnych przed tym zjawiskiem jest zmniejszenie ilości doprowadzanego do nich fosforu przez podniesienie sprawności oczyszczania ścieków oraz zastosowanie efektywnych metod ich usuwania.

Obowiązujące oraz zapowiadane regulacje prawne dotyczące wartości dopuszczalnych wskaźników zanieczyszczeń odprowadzanych do wód powierzchniowych powodują konieczność usprawniania stosowanych rozwiązań technologicznych w procesie oczyszczania ścieków oraz zmuszają do poszukiwania nowych technologii umożliwiających większy stopień redukcji zanieczyszczeń. Dotychczas dość dobrze rozpoznano i wykorzystano biologiczne procesy usuwania azotu, natomiast związki fosforu eliminuje się prawie wyłącznie metodami chemicznymi. Mogą być one również usuwane biologicznie, z wykorzystaniem metody osadu czynnego z wydzieloną strefą beztlenowo-tlenową. Fosfor w tym przypadku wbudowywany jest przede wszystkim w biomasę komórek osadu czynnego w postaci polifosforanów wewnątrzkomórkowych. Pozostała jego część, czyli około 15-30%, strącana jest chemicznie w postaci soli metali jedno-, dwu- i trójwartościowych [1-3].

Jedną z nowatorskich metod usuwania tego pierwiastka oraz jego związków mógłby okazać się proces ultrafiltracji wykorzystujący membrany enzymatyczne, posiadające zarówno właściwości separacyjne, jak i aktywność katalityczną, uwarunkowaną głównie rodzajem, ilością i sposobem unieruchamiania białka aktywnego.

O wyborze sposobu immobilizacji decyduje przeważnie konieczność zachowania jak najwyższej aktywności biokatalizatora. Do tradycyjnych technik unieruchamiania enzymów zalicza się: adsorpcję na powierzchni nośnika polimerowego, przeprowadzenie białka aktywnego w żel, kowalencyjne wiązanie z nośnikiem polimerowym, zamykanie w określonej objętości bioreaktora, kopolimeryzację z nośnikiem oraz inkluzję w strukturze polimeru [4-7].

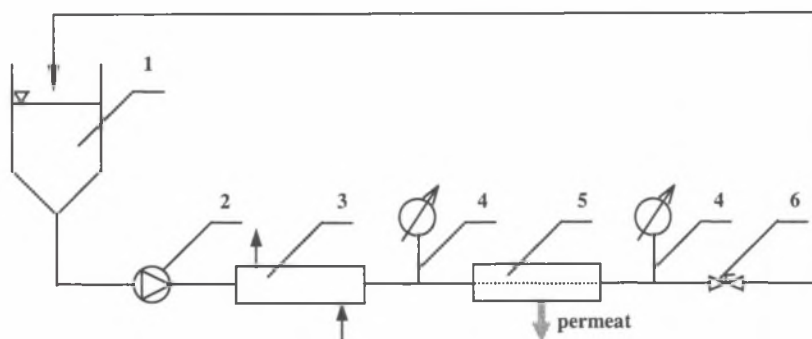
Często stosowaną techniką jest kopolimeryzacja, polegająca na wstępnym sieciowaniu enzymów za pomocą substancji mostkujących (aldehid glutarowy), a następnie unieruchamianiu białka na powierzchni membrany. Inną, również skuteczną metodą immobilizacji białek aktywnych jest ich międzycząsteczkowe sieciowanie za pomocą wiązań kowalencyjnych z powierzchnią membrany polimerowej. W początkowej fazie prowadzona jest adsorpcja enzymów na substancji makrocząsteczkowej w formie monowarstwy, a następnie układ taki jest unieruchamiany na powierzchni membrany w wyniku międzycząsteczkowego sieciowania aldehydem glutarowym [5, 6].

2. Część doświadczalna

2.1. Aparatura, enzymy

Badania nad procesem biodegradacji fosforanów w reaktorze z kapilarnymi membranami enzymatycznymi prowadzono w układzie dynamicznym z przepływem krzyżowym (rys.1). Stosowano moduł ultrafiltracyjny wypełniony kapilarami z poliakrylonitrylu o średnicy wewnętrznej 1,00 mm i powierzchni czynnej wszystkich membran wynoszącej 47 cm².

Enzymy stosowane do immobilizacji izolowano metodą Hagemana z mieszanej populacji osadu czynnego, adaptowanego do rozkładu fosforanów w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Śląskiego.



Rys. 1. Schemat przepływowego układu ultrafiltracyjnego z membranami kapilarnymi: 1- zbiornik roztworu zasilającego, 2 - pompa, 3 - wymiennik ciepła, 4 - manometr, 5 - moduł membranowy, 6 - zawór regulacji ciśnienia

Fig. 1. A schematic diagram of the cross-flow mode: 1 - feed tank, 2 - pump, 3 - heat exchanger, 4 - pressure gauge, 5 - membrane module, 6 - pressure valve

2.2. Preparowanie membran enzymatycznych

Immobilizację enzymów przeprowadzono na obojętnych membranach ultrafiltracyjnych modyfikowanych chemicznie wodzianem hydrazyny oraz aldehydem glutarowym. Proces modyfikacji polegał na filtrowaniu przez suporty 25% roztworu wodzianu hydrazyny i 5% roztworu aldehydu glutarowego. Każdorazowo ciśnienie transmembranowe procesu wynosiło 0,1 MPa, a liniowa prędkość przepływu $u=0,5$ m/s.

Unieruchamianie białka aktywnego prowadzono filtrując przez wstępnie zmodyfikowane chemicznie membrany obojętne 1 dm³ wodnego roztworu enzymów o określonym stężeniu z zastosowaniem ciśnienia 0,05 MPa i liniowej prędkości przepływu $u=0,5$ m/s.

Aktywność membran enzymatycznych wyznaczano filtrując przez nie w temperaturze 298 K, w czasie 10 minut ścieki modelowe zawierające 5 mgP/dm³ (w formie KH₂PO₄) oraz określano ilość rozłożonego w tym czasie substratu.

2.3. Metodyka badań

Przed przystąpieniem do określenia własności transportowo - separacyjnych membran obojętnych poddawano je kondycjonowaniu. W tym celu przy ciśnieniu 0,15 MPa i prędkości liniowej medium przepływającego nad membraną wynoszącej 1m/s filtrowano przez nie wodę dejonizowaną w ciągu 6 godzin.

Następnie określano własności transportowe obojętnych suportów dla ciśnienia transmembranowego zmieniającego się w zakresie wartości od 0,025 MPa do 0,15 MPa i czterech prędkości liniowych medium przepływającego nad membraną: od 0,5 m/s do 1,0 m/s, testując je wodą dejonizowaną, roztworem dekstranu oraz modelowym roztworem ścieków. Proces prowadzono w stałej temperaturze 298 K, wyznaczając wartość objętościowego strumienia permeatu (J):

$$J=V / t \text{ [m}^3\text{/s]} \quad (1)$$

gdzie: J - objętościowy strumień permeatu,

V - objętość permeatu [m³],

t - czas [s].

Właściwości separacyjne obojętnych membran kapilarnych wyznaczano testując je roztworem dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 i stężeniu 5 g/dm³, stosując ciśnienie 0,1 MPa oraz prędkość liniową płynącego medium u=1m/s. Odbierano 10% nadawy, oznaczając w permeacie i retentacie udziały poszczególnych mas cząsteczkowych dekstranu za pomocą chromatografii żelowo-permeacyjnej. Następnie membrany testowano ściekami modelowymi zawierającymi 5 mgP/dm³ (w formie KH₂PO₄) i określano ilość rozłożonego w tym czasie substratu. Stosowano zmienne ciśnienie transmembranowe w zakresie od 0,025 MPa do 0,15 MPa i zmienną prędkość liniową od 0,5 m/s do 1,25 m/s. Dla każdej próby wyznaczano objętościowy strumień permeatu (J), a w otrzymanych permeatach i retentatach określano stężenie fosforanu, co umożliwiło obliczenie współczynnika retencji (R):

$$R = (1-C_p/C_n) \cdot 100\% \quad (2)$$

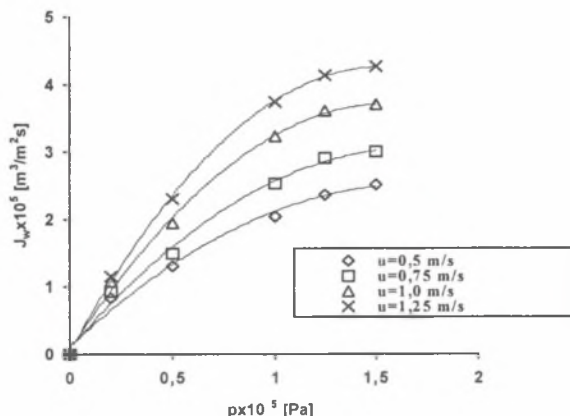
gdzie: C_p, C_n - stężenia dekstranu lub fosforanu w permeacie i nadawie.

Dla membrany z immobilizowanymi enzymami dodatkowo z bilansu masy obliczano stopień biodegradacji fosforanu:

$$B_d = 1 - (C_p \cdot V_p + C_r \cdot V_r) / C_n \cdot V_n \quad (3)$$

3. Wyniki i ich omówienie

Charakterystykę transportową obojętnych membran kapilarnych (PAN-12K), otrzymane zależności objętościowego strumienia permeatu $J = f(\Delta P)$ przedstawiono na rys.2.

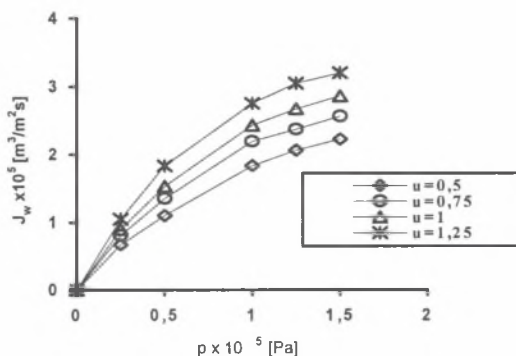


Rys. 2. Zależność objętościowego strumienia wody od ciśnienia transmembranowego dla obojętnych membran kapilarnych PAN-12K

Fig. 2. Dependence of the volumetric permeate flux on the transmembrane pressure for the neutral PAN-12K membranes

Stwierdzono, że na membranach unieruchomiono 44,16 mg białka, natomiast aktywność enzymatyczna otrzymanych suportów wynosiła 0,1335 mg P /10 min/1 cm² pow. membrany.

Na rys. 3 i 4 przedstawiono zależności objętościowych strumieni permeatów w funkcji ciśnienia transmembranowego otrzymane dla membran enzymatycznych. Rys. 3 obrazuje zależności uzyskane podczas testowania membran wodą, natomiast rys. 4 – zależności uzyskane dla ścieków modelowych. Stwierdzono, że podobnie jak dla membran obojętnych, wydajności membran rosły w całym zakresie przebadanych ciśnień. Objętościowe strumienie permeatów były jednak w tym przypadku odpowiednio o 14,5 -19,6% i 18,6 - 21,3% niższe.

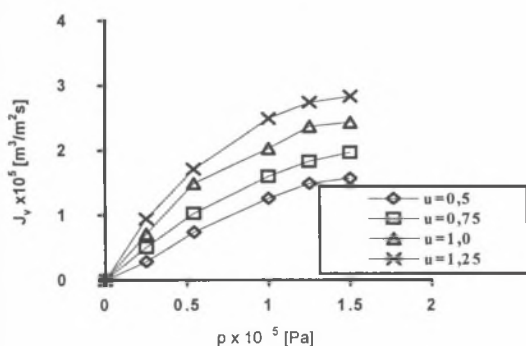


Rys. 3. Zależność objętościowego strumienia wody od ciśnienia transmembranowego dla kapilarnych membran enzymatycznych PAN 12 KE

Fig. 3. Dependence of the volume water flux on transmembrane pressure for the enzymatic capillary PAN-12KE membranes

Podstawowymi parametrami procesu ultrafiltracji, które mają decydujący wpływ na jego efektywność, są: ciśnienie transmembranowe, liniowa prędkość przepływu medium nad powierzchnią membrany oraz czas prowadzenia procesu. W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę określenia wpływu tych parametrów na stopień biodegradacji fosforanów zawartych w ściekach modelowych oraz na wydajność procesu.

Zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego ilustruje rys.4.



Rys. 4. Zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego dla kapilarnych membran enzymatycznych PAN 12 KE

Fig. 4. Dependence of the volume permeate flux on transmembrane pressure for the enzymatic PAN-12KE membranes

Stwierdzono, że wraz ze wzrostem ciśnienia wzrasta objętościowy strumień permeatu, a opisujące tę zależność równania mają postać funkcji potęgowej:

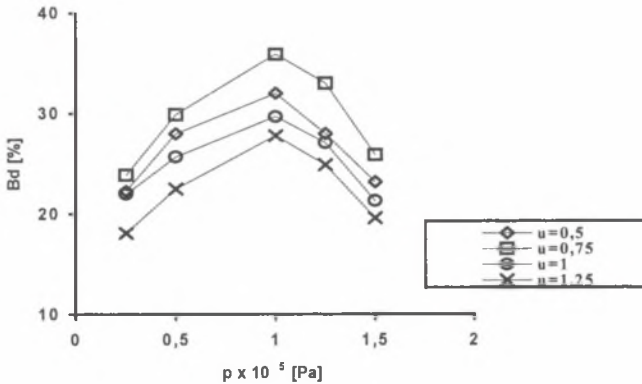
$$J_v = 0,64 \cdot 10^{-9} \cdot (\Delta P)^{0,69} \quad (\text{dla } u=0,5 \text{ m/s})$$

$$J_v = 0,73 \cdot 10^{-9} \cdot (\Delta P)^{0,71} \quad (\text{dla } u=0,75 \text{ m/s})$$

$$J_v = 0,86 \cdot 10^{-9} \cdot (\Delta P)^{0,73} \quad (\text{dla } u=1 \text{ m/s})$$

$$J_v = 0,91 \cdot 10^{-9} \cdot (\Delta P)^{0,76} \quad (\text{dla } u=1,5 \text{ m/s})$$

Analiza wpływu tego parametru na wartość stopnia biodegradacji fosforanów (rys.5) wykazała stopniowy jego wzrost wraz ze wzrostem ciśnienia.



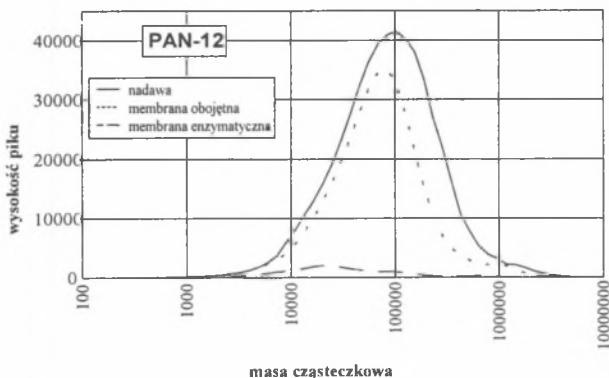
Rys. 5. Zależność stopnia biodegradacji fosforanów od ciśnienia transmembranowego dla różnych liniowych prędkości przepływu ścieków przez enzymatyczne membrany kapilarne PAN 12KE

Fig. 5. Dependence of phosphates biodegradation degree on transmembrane pressure for various linear velocities of the wastewater flowing over the capillary PAN-12KE membranes

W zakresie ciśnień od 0,05 do 0,1 MPa stopień biodegradacji dla $u=0,5$ m/s wzrósł o 9,4%; dla $u=0,75$ m/s o 11,6%; dla $u=1,0$ m/s o 7,7%, a dla 1,5 m/s o 5,4%. Powyżej ciśnienia 0,1 MPa jego wartości malały dla wszystkich prędkości liniowych. Wynika z tego, że najkorzystniejszym ciśnieniem transmembranowym, przy którym należy prowadzić proces ultrafiltracyjnej biodegradacji fosforanów zawartych w ściekach modelowych z wykorzystaniem membran kapilarnych, jest 0,1 MPa, a najkorzystniejszą liniową prędkością przepływu - prędkość 0,75 m/s.

Aby określić, w jakim stopniu zmieniają się właściwości rozdzielcze membran enzymatycznych w porównaniu z membranami obojętymi, przetestowano je roztworem dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 i stężeniu 5g/dm^3 . Z otrzymanych krzywych rozkładu mas cząsteczkowych dekstranu w nadawie i permeatach wynika, że o właściwościach

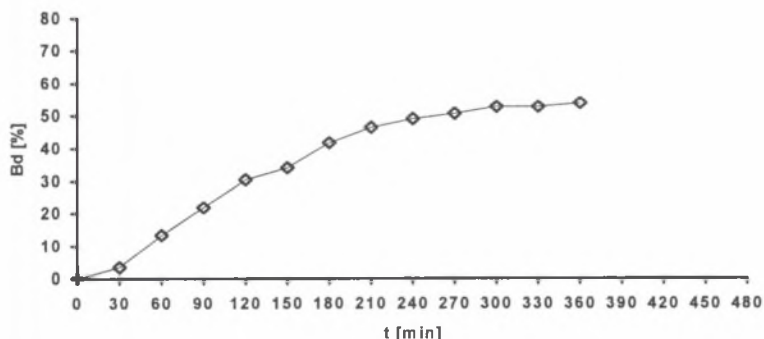
rozdzielczych membran z immobilizowanymi enzymami decyduje przede wszystkim warstwa białka aktywnego unieruchomiona na obojętnych suportach w formie membrany wtórnej (rys.6).



Rys. 6. Krzywe rozkładu mas cząsteczkowych dekstranów w nadawie i permeatach uzyskanych w wyniku testowania kapilarnych membran obojętnych i enzymatycznych

Fig. 6. Differential curves of dextrans' molar masses in the feeds and permeates for the neutral PAN-12K and enzymatic PAN-12KE capillary membranes

Określono również zależność stopnia biodegradacji od czasu prowadzenia procesu ultrafiltracji (rys.7). Po 6 godz. usunięto 53,3% fosforanu. W trakcie prowadzenia procesu zaobserwowano nieznaczny spadek aktywności membrany enzymatycznej.



Rys. 7. Zależność stopnia biodegradacji fosforanów od czasu prowadzenia procesu na membranie PAN-12 KE dla ciśnienia 0,1-MPa i liniowej prędkości przepływu $u=0,75$ m/s

Fig. 7. Change in biodegradation degree during ultrafiltration on the PAN-12KE membranes for pressure 0,1 MPa and linear velocity $u=0,75$ m/s

5. Wnioski

1. Istnieje możliwość wykorzystania bioreaktora pracującego w oparciu o kapilarne membrany ultrafiltracyjne z immobilizowanymi enzymami do biodegradacji fosforanów.
2. Skuteczną metodą unieruchamiania białka aktywnego jest metoda oparta na chemicznym wiązaniu enzymów z membraną z poliakrylonitrylu.
3. Najkorzystniejszymi parametrami operacyjnymi procesu ultrafiltracji były:
 - ciśnienie transmembranowe: 0,1 MPa,
 - liniowa prędkość przepływu 0,75 m/s.
4. Prowadzenie ultrafiltracji z wykorzystaniem najkorzystniejszych parametrów operacyjnych procesu pozwoliło na usunięcie z roztworu 53,4% fosforanów po 6 godzinach.
5. W trakcie procesu zaobserwowano nieznaczny spadek aktywności membran enzymatycznych.

Literatura

1. Bernacka J., Kurbiel J., Pawłowska L.: Usuwanie związków biogenych ze ścieków miejskich, Instytut Ochr. Środow., Warszawa 1995.
2. Czerska B., Miksch K.: Pomiar aktywności enzymatycznej do kontroli procesu biologicznej defosfatacji, Materiały konferencyjne V Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec, 10-12 grudnia 1997.
3. Benefield L.D., Hill W.E.: Observations relating to enhancer phosphorus removal in biological systems, *Wat. Res.*, 1992, 26(2), 213-223.
4. Wiseman G.H.: Handbook of enzyme biotechnology, PhP.FRSC.MI Biol. Department of Biochemistry, University of Surrey, Guildford 1985.
5. Cabasso I.: Development of a new alloy membranes for water desalination, *Polym. Sci. Technol.*, 1980, 13, 57-63.
6. Capobiagoni G., Driol E., Ragosta G.: Ultrafiltration process with enzyme-gel composite membranes, *J.Solid-Phase Biochem.*, 1977, 2, 315-322.
7. Szewczuk A., Rapak A.: Enzyme immunassay of biologically active substances and application, *Wiad.Chem.*, 1985, 39, 31-42.
8. Bodzek M., Korus I.: Wykorzystanie chromatografii żelowo-permeacyjnej do charakteryzowania membran polimerowych, *Polimery*, 1995, 40 (3), 167-172.

Abstract

Wastewater containing high concentrations of phosphorus and its derivatives require an application of multistage methods of treatment prior to its discharge to a biological wastewater treatment plant. At present, due to the accelerating degradation of the natural environment, more attention is focused on the development of unconventional methods of wastewater treatment and ultrafiltration using membranes with immobilized enzymes is one of them. The purpose of this study was immobilization of enzymes isolated from a bacterial adapted for degradation of phosphates on polyacrylonitrile membranes and testing their efficiency in biodegradation. Research project enclosed: chemical modification of the membranes obtained, immobilization of the isolated enzymes on the surface of the supports prepared, examination of ultrafiltration effectiveness of phosphates wastewater.

In summary it was found that:

- ✓ there is a possibility of applying ultrafiltration to biodegradation of phosphates, using capillary membranes with immobilized enzymes operating in cross-flow mode;
- ✓ one of the effective ways of immobilization of enzymes is a method based on chemical immobilization on the membranes made from polyacrylonitrile (part 3);
- ✓ the most optimum process parameters of ultrafiltration biodegradation are: transmembrane pressure 0,1 Mpa and linear velocity of the flowing medium 0,75 m/s (fig. 5);
- ✓ ultrafiltration carried out with the use of the most optimum operation parameters enables a 53,3% removal of phosphates respectively after 6 hours (fig. 7).