

Małgorzata KOWALSKA¹, Ewa PAWLAK¹ i Jolanta BOHDZIEWICZ¹

USUWANIE 2,4,6-CHLOROFENOLU PODCZAS ULTRAFILTRACJI Z ZASTOSOWANIEM MEMBRAN ENZYMATYCZNYCH*

REMOVAL OF 2,4,6-CHLOROPHENOL DURING ULTRAFILTRATION WITH USE OF ENZYMATIC MEMBRANES

Abstrakt: Omówiono badania prowadzone nad możliwością wykorzystania membran poliakrylonitrylowych, z zaimmobilizowanymi na ich powierzchni enzymami adaptowanymi do rozkładu fenolu i jego chloropochodnych, do usuwania tych ksenobiotyków. Procesowi ultrafiltracyjnej biodegradacji poddawano ścieki symulowane zawierające 1 milimol 2,4,6 trichlorofenolu w 1 dm³. Podczas sześciogodzinnego eksperymentu, prowadzonego z wykorzystaniem doświadczalnie wyznaczonych, optymalnych parametrów procesowych, usunięto 26,4% ksenobiotyku.

Słowa kluczowe: immobilizacja, ultrafiltracja, membrany enzymatyczne, biodegradacja, 2,4,6-trichlorofenol

Wprowadzenie

Chlorofenole powstają podczas dezynfekcji wody w wyniku chlorowania substancji humusowych oraz w wyniku foto- lub biodegradacji innych substancji chemicznych. Do środowiska przedostają się głównie ze źródeł rolniczych i w większości trafiają do wód powierzchniowych. Ich emisję do atmosfery ogranicza stosunkowo niska lotność tych związków. Głównym źródłem narażenia człowieka na toksyczne działanie chlorofenoli jest woda pitna po dezynfekcji, która zawiera 4-chlorofenol, 2,4,5-trichlorofenol bądź 2,4,6-trichlorofenol.

Cechą charakteryzującą wszystkie chlorofenole jest intensywny, charakterystyczny zapach, wyczuwalny w wodzie już na poziomie ppb. Związki te wyróżnia również nieprzyjemny smak, ponadto wykazują one właściwości toksyczne, mutagenne oraz kancerogenne. Najbardziej niebezpiecznymi z tej grupy związków są 2,4,6-trichlorofenol oraz pentachlorofenol [1-3].

Fenol jest podatny na rozkład przez mikroorganizmy - wiele szczepów bakterii potrafi wykorzystywać go jako źródło węgla i energii. Zauważono, że zaimmobilizowane (unieruchomione) szczepy bakterii usuwają znacznie większe stężenia fenolu aniżeli ma to miejsce w przypadku mikroorganizmów w stanie wolnym. Ponieważ czysty fenol okazał się związkiem dość dobrze biodegradowalnym, dlatego coraz częściej podejmowane są próby usuwania również i jego pochodnych za pomocą mikroorganizmów i enzymów zarówno natywnych, jak i unieruchomionych [4-8].

Interesującym rozwiązaniem wydaje się wykorzystanie do usuwania z wody skażonej chloropochodnymi fenolu ultrafiltracyjnych membran enzymatycznych. Charakteryzują się

¹ Zakład Chemii Sanitarnej i Procesów Membranowych, Instytut Inżynierii Wody i Ścieków, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice, tel. 32 237 15 64, fax 32 237 10 47, email: małgorzata.kowalska@polsl.pl

*Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 12, Zakopane, 10-13.10.2012

one zarówno właściwościami separacyjnymi, jak i aktywnością katalityczną, na którą mają wpływ rodzaj, ilość i sposób unieruchomienia biokatalizatora [9-12].

Oprócz wielu korzyści, do których należą:

- większa odporność enzymów na działanie podwyższonej temperatury, inhibitorów i czynników chemicznych,
- łatwiejsze oddzielenie produktów reakcji od biokatalizatora,
- otrzymywanie produktów o większej czystości,
- możliwość wielokrotnego użycia enzymu,
- niskie koszty eksploatacyjne i obniżone zużycie enzymów,

immobilizacja enzymów wywołuje również nieestetyczne efekty niepożądane, takie jak zmniejszenie ich powinowactwa do substratu czy obniżenie maksymalnej szybkości katalizowanej reakcji. Zjawiska te wywołane są najczęściej trudnościami sferycznymi w dotarciu substratu do centrum aktywnego białka. O wyborze sposobu immobilizacji decyduje jednak najczęściej konieczność zachowania jak najwyższej aktywności katalitycznej enzymu [13, 14].

Cel i metodyka badań

Przeprowadzone badania miały na celu otrzymanie poliakrylonitrylowych membran ultrafiltracyjnych z unieruchomionymi na ich powierzchni białkami aktywnymi, zdolnymi do biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu oraz określenie możliwości zastosowania otrzymanych membran enzymatycznych do usuwania z wody tej pochodnej fenolu.

Zakres pracy obejmował:

- otrzymanie obojętnych poliakrylonitrylowych membran ultrafiltracyjnych, będących nośnikami w procesie immobilizacji enzymów,
- określenie własności transportowo-separacyjnych membran obojętnych,
- chemiczną modyfikację nośników wodzianem hydrazyny i aldehydem glutarowym,
- unieruchomienie białek aktywnych na powierzchni zmodyfikowanych membran,
- wyznaczenie charakterystyk transportowo-separacyjnych membran enzymatycznych,
- określenie wpływu parametrów operacyjnych procesu ultrafiltracji na efektywności biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu,
- ocenę przydatności otrzymanych membran enzymatycznych w procesie ultrafiltracyjnej biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu.

Badania zostały przeprowadzone w reaktorze, którym była aparatura ultrafiltracyjna firmy Nuclepore typ S-76-400, o pojemności 500 cm³ i powierzchni membrany płaskiej 38,5 cm². Reaktor pracował w układzie statycznym, a strumień przepływającej cieczy był styczny do powierzchni membrany.

Do izolacji frakcji enzymów rozkładających fenole i cyjanki użyto szczepów bakterii wyodrębnionych z mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego uzyskanego na drodze transformacji osadów organicznych po fermentacji metanowej. Adaptację drobnoustrojów prowadzono, zasilając hodowlę wzrastającymi dawkami fenolu i 2,4,6-trichlorofenolu.

Dominującymi w populacji rodzajami bakterii były: *Micrococcus Sadentarius*, *Staphylococcus Scium*, *Bacillus Cereus* oraz *Pseudomonas Putida*.

Membrany syntezowano metodą rozdziału fazowego, polegającą na wylaniu filmu o grubości 0,2 mm z jednorodnego roztworu polimeru (włókno PAN) w odpowiednim rozpuszczalniku (dimetyloformamid), a następnie żelowaniu go w wodzie w temperaturze pokojowej. Roztwory błonotwórcze różniły się procentową zawartością poliakrylonitrylu, dzięki czemu otrzymane z nich membrany płaskie, stanowiące suport do immobilizacji enzymów charakteryzowały się różną zawartością poliakrylonitrylu, a więc i przepuszczalnością.

Proces immobilizacji enzymów przeprowadzano na obojętnej membranie ultrafiltracyjnej, wcześniej poddanej modyfikacji chemicznej mającej na celu trwałe, chemiczne związanie białek z jej powierzchnią. Modyfikacja chemiczna polegała na filtrowaniu przez membranę, pod ciśnieniem 0,05 MPa, 500 cm³ 25% roztworu wodzianu hydrazyny (H₂NNH₂·H₂O), a następnie po przemyciu jej wodą destylowaną (5x1000 cm³), 500 cm³ 5% roztworu aldehydu glutarowego [15, 16].

Unieruchamianie białek aktywnych na tak przygotowanych suportach polegało na kilkukrotnym przepuszczaniu przez zmodyfikowaną membranę obojętną wodnego roztworu enzymów o stężeniu 124 mg białka/dm³, przy ciśnieniu transmembranowym 0,05 MPa, aż do momentu, gdy otrzymany permeat nie zawierał biokatalizatora. Następnie membranę aktywną przemywano solą fizjologiczną w celu usunięcia z jej powierzchni enzymów niezwiązanych trwale.

Aktywność membrany enzymatycznej określano, przepuszczając przez nią w temperaturze 298 K w czasie 10 minut ścieki modelowe o stężeniu 0,01 mol/dm³ 2,4,6-trichlorofenolu, podając ilość rozłożonego w tym czasie ksenobiotyku.

Własności transportowe membran 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) obliczono ze wzoru:

$$J_v = V_v / s \cdot t \quad [\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}] \quad (1)$$

gdzie: J_v - objętościowy strumień permeatu [$\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$], V_v - objętość permeatu [m^3], s - powierzchnia membrany [m^2], t - czas [s].

Własności separacyjne membran (obojętnych i enzymatycznych) określone zostały na podstawie wyników otrzymanych podczas testowania ich roztworem dekstranu oraz ścieków symulowanych. Wodny roztworu dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 (produkcji Zakładów Farmaceutycznych „Polfa” w Kutnie) i stężeniu 5 g/dm³ filtrowano pod ciśnieniem 0,15 MPa oraz intensywności mieszania 150 obr/min. Odbierano 10% nadawy, oznaczając w permeacie i retentacie udziały poszczególnych mas cząsteczkowych dekstranu za pomocą chromatografu żelowego. Na podstawie zarejestrowanych chromatogramów wyznaczano zawartość dekstranu w poszczególnych przedziałach mas cząsteczkowych, na które podzielony został cały strumień nadawy i permeatu.

Obliczone wartości współczynników retencji pozwoliły na wyznaczenie przepuszczalności granicznej (cut-off) badanych membran. Charakteryzuje ona membranę poprzez wskazanie najmniejszej masy molowej wybranej substancji (w tym przypadku dekstranu), ulegającej retencji w 90%.

Dla membrany enzymatycznej dodatkowo z bilansu masy obliczano stopień biodegradacji B_d 2,4,6-trichlorofenolu:

$$B_d = [1 - (C_p V_p + C_r V_r) / C_n V_n] \cdot 100\% \quad (2)$$

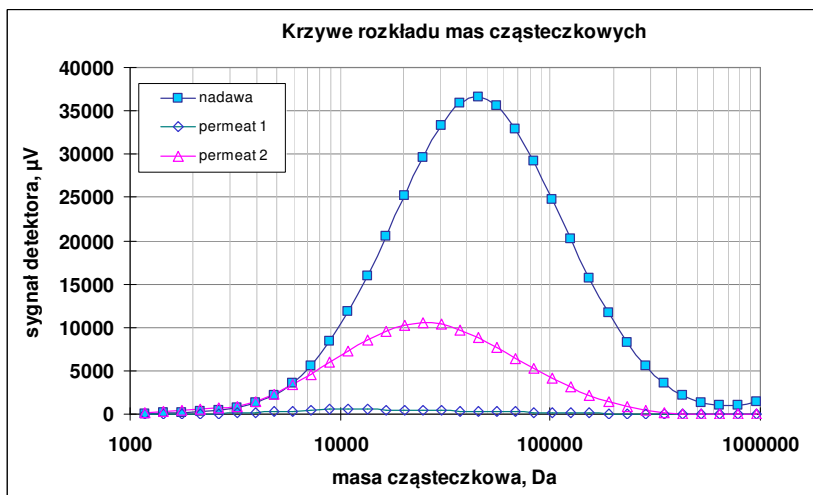
gdzie: B_d - stopień biodegradacji kwasu monobromooctowego [%], C_p - stężenie kwasu monobromooctowego w permeacie [mol/dm^3], C_r - stężenie kwasu monobromooctowego w retentacie [mol/dm^3], C_n - stężenie kwasu monobromooctowego w nadawie [mol/dm^3], V_p - objętość permeatu [dm^3], V_r - objętość retentatu [dm^3], V_n - objętość nadawy [dm^3].

W badaniach wyznaczano również najkorzystniejsze parametry operacyjne procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu, a mianowicie: ciśnienie transmembranowe oraz intensywność mieszania. Przy ich zastosowaniu wydajność procesu membranowego i efektywność usuwania ksenobiotyku były najwyższe.

Stężenie białka aktywnego oznaczano kolorymetryczną metodą Bradforda, polegającą na barwnej reakcji białka z odczynnikiem Bio-Rad-Protein-Assay, natomiast stężenie 2,4,6-trichlorofenolu z użyciem spektrofotometru UV VIS Carry 50 (Varian).

Wyniki badań i ich omówienie

Ostateczne wyniki badań uzyskano z zastosowaniem membrany enzymatycznej PAN-16E. Otrzymano ją na bazie obojętnej membrany poliakrylonitrylowej PAN-16 (membrana otrzymana metodą inwersji faz z roztworu błonotwórczego zawierającego 16% poliakrylonitrylu). Na zmodyfikowanej wodzianem hydrazyny i aldehydem glutarowym membranie obojętnej PAN-16 unieruchomiono 24,1 mg białka, a oznaczona aktywność enzymatyczna otrzymanej membrany PAN-16E wynosiła 0,081 milimola 2,4,6-trichlorofenolu/10 min/1 cm^2 powierzchni.



Rys. 1. Krzywe rozkładu mas cząsteczkowych dekstranu w nadawie i permeatach (1 - PAN - 16E, 2 - PAN - 16), zależność wysokości chromatogramu od masy cząsteczkowej

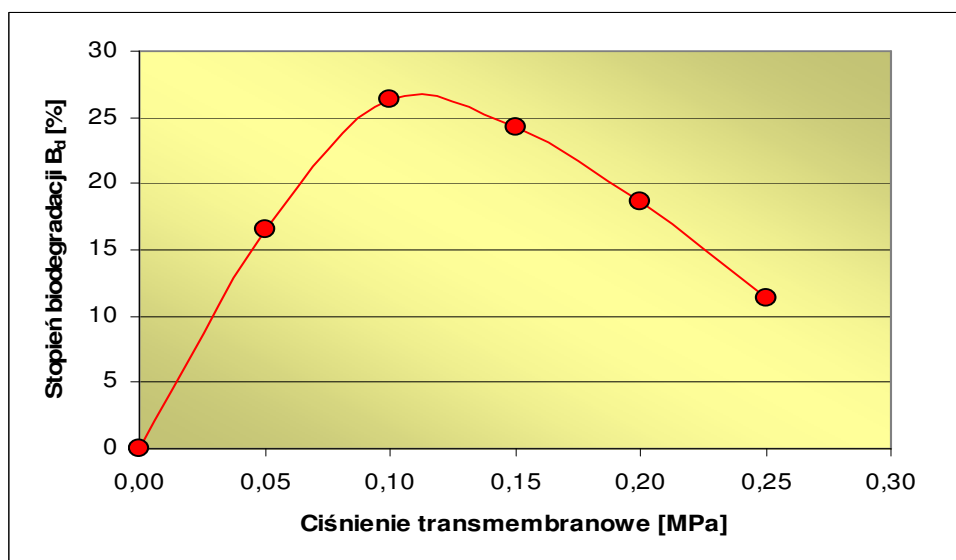
Fig. 1. The distribution curves of molecular weights of dextrane in the feed and permeates (1 - PAN-16E membranes, 2 - PAN-16 membranes). The dependence of the chromatogram height on molecular weight

Właściwości separacyjne membrany PAN-16E wyznaczono, filtrując przez nią roztwór dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 Da i stężeniu 5 g/dm³ (ciśnienie - 0,15 MPa oraz prędkość mieszania 150 obr/min). Rozkład mas cząsteczkowych w nadawie oraz permeatach (rys. 1) wskazuje, iż o właściwościach rozdzielczych membrany enzymatycznej decyduje głównie tzw. membrana wtórna z białka aktywnego, unieruchomiona na obojętnym suporcie.

Na podstawie zależności współczynnika retencji od masy cząsteczkowej dekstranu wyznaczono cut-off, który dla membrany PAN-16E wyniósł 13,4 kDa, natomiast dla membrany obojętnej PAN-16 - 189 kDa.

Na efektywność procesu biodegradacji mają wpływ zarówno odpowiednio spreparowana membrana enzymatyczna, jak i parametry operacyjne ultrafiltracji. Należą do nich: ciśnienie transmembranowe, intensywność mieszania oraz czas trwania biodegradacji. Prowadzone badania służyły wyznaczeniu optymalnych parametrów procesu, przy których stopień usunięcia 2,4,6-trichlorofenolu byłby jak najwyższy.

Określenie optymalnego ciśnienia transmembranowego dla procesu biodegradacji 2,4,6 trichlorofenolu polegało na filtracji roztworu wodnego wyżej wymienionej pochodnej fenolu przez membranę PAN-16E przy zmiennym ciśnieniu transmembranowym, którego zakres wynosił 0,05-0,25 MPa, oraz stałej intensywności mieszania, wynoszącej 50 obr./min. Wyniki w postaci zależności stopnia biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu od ciśnienia transmembranowego przedstawiono na rysunku 2.

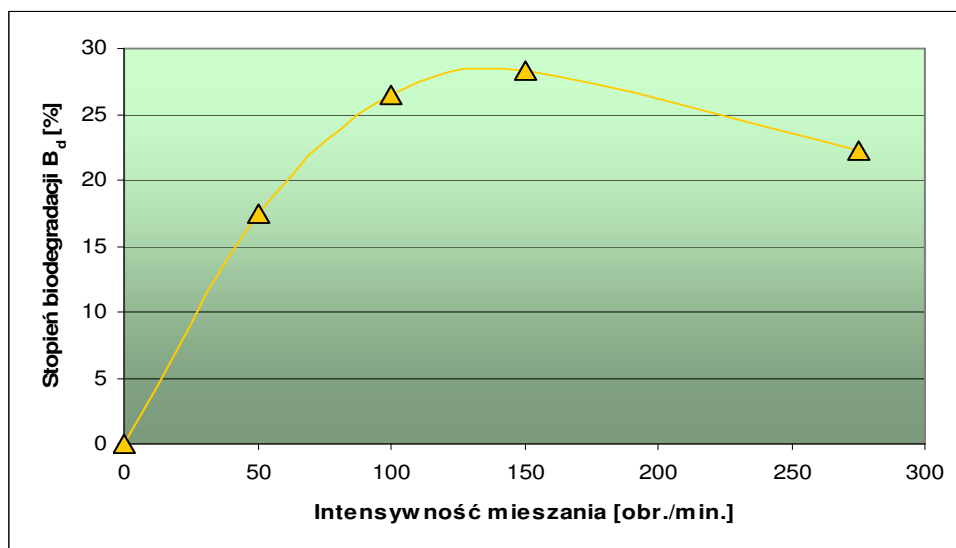


Rys. 2. Zależność stopnia biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu od ciśnienia transmembranowego (przy zastosowaniu membrany PAN-16E)

Fig. 2. Dependence of the biodegradation degree of 2,4,6-trichlorophenol on the transmembrane pressure (at applying PAN-16E membrane)

Najwyższy stopień biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu osiągnięto przy ciśnieniu 0,1 MPa, dla którego B_d badanej pochodnej fenolu wyniósł 26,4%. Jednakże, przez wzgląd na niewielką różnicę w skuteczności za optymalne uznano ciśnienie 0,15 MPa, gwarantujące znacznie większą objętość permeatu (wydajność membrany). Stopień biodegradacji osiągnięty przy tym ciśnieniu to 24,3%.

Wyznaczenie optymalnej prędkości mieszania polegało na przepuszczeniu przez membranę enzymatyczną PAN-16E ścieków modelowych przy wcześniej określonym, najkorzystniejszym ciśnieniu transmembranowym wynoszącym 0,15 MPa. Badania obejmowały zakres prędkości mieszania od 50 do 275 obr./min.



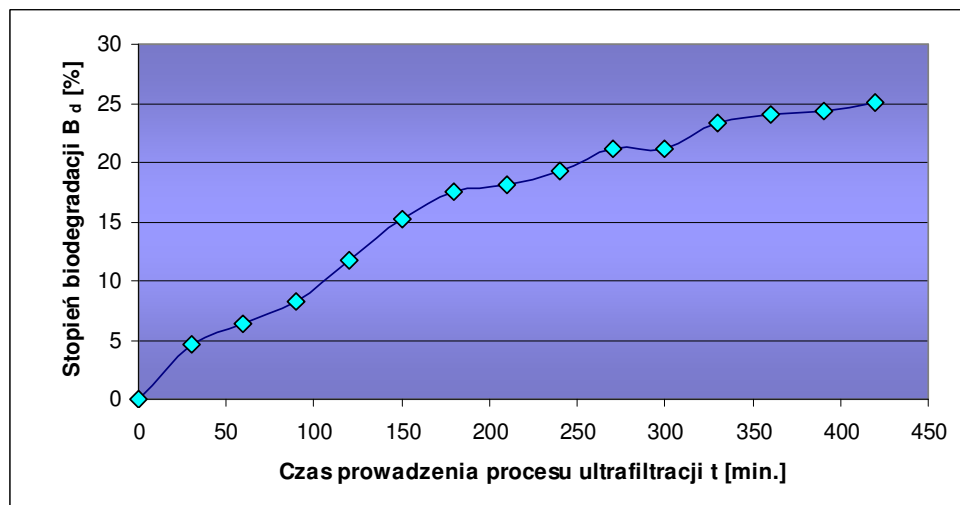
Rys. 3. Zależność stopnia biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu od intensywności mieszania dla stałego ciśnienia transmembranowego 0,15 MPa

Fig. 3. Dependence of the biodegradation degree of 2,4,6-trichlorophenol on the speed of stirring (at the constant pressure 0,15 MPa)

Powyższy wykres obrazuje, że dla prowadzonego procesu biodegradacji badanej pochodnej fenolu optymalną prędkością mieszania jest 150 obr./min. Najwyższy otrzymany stopień biodegradacji wyniósł 28,3%.

Największy wpływ na stopień usunięcia ksenobiotyku ma czas jego kontaktu z enzymem unieruchomionym na membranie. Ostatni etap badań polegał na określeniu, czy proces ultrafiltracyjnej biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu może być stosowany do usuwania tego ksenobiotyku z wody. W tym celu przez 7 godzin filtrowano przez membranę PAN-16E wodny roztwór 2,4,6-trichlorofenolu, stosując wyznaczone wcześniej optymalne parametry operacyjne procesu (ciśnienie transmembranowe 0,15 MPa i prędkość mieszania 150 obr./min). Co 30 minut pobierano do analizy próbkę nadawy, permeatu i retentatu. W próbkach oznaczano stężenie 2,4,6-trichlorofenolu. Wyniki w postaci

zależności stopnia biodegradacji ksenobiotyku od czasu prowadzenia procesu przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Zależność stopnia biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu od czasu prowadzenia procesu

Fig. 4. Dependence of the biodegradation degree of 2,4,6-trichlorophenol on the time of process

Otrzymane wyniki badań jasno określają, iż wraz ze wzrostem czasu kontaktu ksenobiotyku z białkiem aktywnym osadzonym na powierzchni membrany rośnie jego stopień biodegradacji. Wartość B_d po 30 minutach trwania procesu wyniosła 4,7%, natomiast po 7 godzinach już 25,1%.

Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań laboratoryjnych sformułowano następujące wnioski:

1. Istnieje możliwość prowadzenia procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu przy użyciu poliakrylonitrylowej membrany enzymatycznej.
2. Najkorzystniejszymi, wyznaczonymi doświadczalnie, parametrami operacyjnymi procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu okazały się: ciśnienie transmembranowe 0,15 MPa i intensywność mieszania 150 obr/min.
3. Czas kontaktu 2,4,6-trichlorofenolu z białkiem aktywnym unieruchomionym na powierzchni membrany wpływa znacząco na wzrost stopnia biodegradacji ksenobiotyku. Po 30 min trwania procesu B_d wynosił 4,7%, po 210 min kształtował się na poziomie 18,1%, natomiast jego wartość po 420 min osiągnęła 25,4%.
4. Długotrwały proces biodegradacji 2,4,6-trichlorofenolu ma wpływ na niewielkie obniżenie wydajności membrany (objętościowy strumień permeatu). Przez okres pierwszych 4 godzin trwania procesu wartość J_v utrzymywała się na poziomie

$1,01 \cdot 10^{-5} \text{ (m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s)}$, jednak po kolejnych 3 godzinach zmalała do $0,97 \cdot 10^{-5} \text{ (m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s)}$.

Literatura

- [1] Manahan SE. Toksykologia środowiska - aspekty chemiczne i biochemiczne. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2006.
- [2] Jagiełło M. Wybrane metody ekstrakcji fenoli do faz stałych, *Przemysł Chem.* 2004;83(11):47-52.
- [3] Piotrowski JK. Podstawy toksykologii, Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne; 2006.
- [4] Pawlaczyk-Szpilowa M. Mikrobiologia wody i ścieków. Warszawa; PWN: 1978.
- [5] Karigar Ch, Mahesh A, Nagenahalli M, Yun DJ. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation.* 2006;17:47-55.
- [6] Kączkowski J. Podstawy biochemii. Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne; 2002.
- [7] Liu YJ, Zhanga AN, Wanga XC. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochem Eng J.* 2009;44:187-192.
- [8] Santos VL, Monteiro AS, Braga DT, Santoro MM. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *J Hazard Mater.* 2009;161:1413-1420.
- [9] Krajewska B. Membrany enzymatyczne. *Wodociągi - Kanalizacja.* 2007;6:114-119.
- [10] Berezin W, Kliaczko NL. *Biotechnologia. Immobilizowane enzymy.* Poznań: Wyd Nauk Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; 1992.
- [11] Zaborski OR. *Immobilized Enzymes.* Cleveland, Ohio: CRP Press; 1973.
- [12] Cheryan M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook.* Basel: Technomic Publishing Company, Inc.; 1998.
- [13] Cheryan M. *Ultrafiltration Handbook.* Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc.; 1986.
- [14] Muller M. *Basic Principles of Membrane Technology.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1991.
- [15] Stengaard FF. Preparation of asymmetric ultrafiltration membranes and modification of their properties by chemical treatment. *J Membr Sci.* 1998;36:257-275.
- [16] Vasileva N, Godjevargova T, Ivanova D, Gabrovska K. Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water. *Int J Biological Macromol.* 2009;44:190-194.

REMOVAL OF 2,4,6-CHLOROPHENOL DURING ULTRAFILTRATION WITH USE OF ENZYMATIC MEMBRANES

Division of Sanitary Chemistry and Membrane Processes
Institute of Water and Wastewater Engineering, Faculty of Energy and Environmental Engineering
Silesian University of Technology, Gliwice

Abstract: The purpose of this study was immobilization of a group of enzymes isolated from a bacterial strain *Pseudomonas* adapted for degradation of phenol and its chlorinated derivatives on polyacrylonitrile membranes and testing their efficiency in biodegradation of the above-mentioned xenobiotic. Ultrafiltration enzymatic membranes were tested by simulated wastewaters which contained 1 mM/dm^3 2,4,6-trichlorophenol. Carrying out ultrafiltration with assigned optimal parameters enabled an 26.4% degradation of phenol after 7 hours.

Keywords: immobilization, ultrafiltration, enzymatic membranes, biodegradation, 2,4,6-trichlorophenol