

DENITRIFICATION OF ION-EXCHANGE BRINES USING LENTIKATS BIOTECHNOLOGY

DENITRIFIKACE ZASOLENÝCH VOD PO REGENERACI IONTOMĚNIČOVÝCH KOLON POMOCÍ BIOTECHNOLOGIE LE NTIKATS

**Josef Trögl 1), Věra Pilařová 1), Jana Měchurová 1), Jana Krudencová 1), Pavel Janoš 1),
Alžběta Boušková 2), Jan Mrákota 2), Radek Stloukal 2), Lucie Čechovská 2)**

1) Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí,

Králova Výchina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem, e-mail: josef.trogl@ujep.cz

2) LentiKat's a.s., Evropská 423/178, 160 00 Praha 6

Abstract:

Paracoccus denitrificans encapsulated in polyvinyl alcohol matrix (Lentikats Biocatalyst, LB) was applied for elimination of high nitrate concentrations (up to $2.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$) from ion-exchange regeneration brines ($12.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cl}^-$, $1.35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$). The elimination of nitrates followed zero-order kinetics, while the concentration of nitrite-intermediates exhibited a peaking course. The maximum obtained activity of 1 kg of Lentikats Biocatalyst was $>1000 \text{ mg}$ of N-NO_3^- removed per hour and the nitrates removal efficiency exceeded 99 %. Correlation analysis of results from preliminary batch experiments revealed that the main factors affecting denitrification activity were temperature and time elapsed from the last Biocatalyst's cultivation, while the effect of salinity was statistically insignificant. A decrease of Biocatalyst's activity during the course of repetitive experiments was caused by a lack of nutrients in the brines, disabling any proliferation of encapsulated microorganisms. Integration of nutrient-supplementing cultivation steps into the treatment process enabled restoration of the initial denitrification activity and repetitive long-term applicability of the Biocatalyst. Initial batch results were further confirmed in a four-month continuous operation. The results show that *P. denitrificans* encapsulated in Lentikats Biocatalyst is applicable for the removal of high concentrations of nitrates from similar types of ion-exchange brines.

Keywords:

Lentikats Biotechnology; Polyvynylalcohol; Denitrification; Ion-exchange brines regeneration; High-salinity waters; *Paracoccus denitrificans*

Iontoměničové kolony na odstraňování dusičnanů z pitných a bazénových vod jsou pravidelně regenerovány vodnými roztoky s vysokým obsahem solí, zejména NaCl. Produkují se tak kapalné odpady, eluáty s vysokým obsahem anorganických solí, které je žádoucí zbavit dusičnanů a použít zpět do technologie regenerace iontovýměných kolon. Dochází tak ke snížení spotřeby regeneračních solí a tím ke snížení technologických provozních nákladů. Pro odstraňování dusičnanů je možné použít biologickou cestu - čištění pomocí denitrifikačních mikroorganismů. Výhodné je použití imobilizovaných mikroorganismů, které umožňují proces intenzifikovat použitím vysoké koncentrace biomasy v daném objemu. Imobilizace umožňuje také snadnou separaci a opakované používání imobilizované biomasy.

Jako matrice na imobilizaci biomasy je možné použít Biokatalyzátor lentikats (BL). Biokatalyzátorem lentikats je označován biologický materiál imobilizovaný v polyvynylalkoholové matrici technologií Lentikats® dle německého patentu DE 198 27 552 (v ČR patent č. 294179). Použití BL přináší četné výhody pro biotechnologické aplikace. Na rozdíl od jiných maticí a tvarů nedochází díky čočkovitému tvaru prakticky k difuzní limitaci. PVA také nebrání rozmnožování mikroorganismů uvnitř matrice a umožňuje tak za vhodných podmínek dlouhodobé udržení aktivity BL. Čočky jsou díky hustotě blízké hodnotě hustoty vody snadno udržovány ve vznosu a umožňují tak dosáhnout vysokých rychlostí konverze. Velice snadná je separace po skončení procesu. Výroba BL je zvládnuta v průmyslovém měřítku společností LentiKat's a.s. a je tak možné získat velké množství homogenního Biokatalyzátoru [1-4].

Cílem této práce bylo posouzení vlivu anorganických solí na biomasu imobilizovanou v Biokatalyzátoru lentikats. Konečným výstupem celého projektu bude návrh Biotechnologie lentikats na odstranění vysoké koncentrace dusičnanů (až 10 g/l) z eluátů z iontoměničových kolon obsahujících vysoké koncentrace anorganických solí (20 g/l NaCl, 2 g/l Na₂SO₄) v procesu denitrifikace. Pro tento účel byl použit BL s imobilizovanou denitrifikační kulturou *Paracoccus denitrificans*.

Experimentální část

BL byl připraven na velkokapacitní lince LentiKat´s a.s.

Experimenty byly prováděny ve skleněných reaktorech o objemu 15 litrů, bez automatické úpravy teploty a pH, promíchávaném pomaloběžným lopatkovým míchadlem s možností regulace otáček. Otáčky míchadla se pohybovaly v rozmezí 75-120 rpm tak, aby bylo dosaženo potřebné homogenity BL v celém objemu reaktoru. Pomocí měřicích elektrod byly sledovány a zaznamenávány hodnoty pH, rozpuštěného kyslíku a teploty. Průtočného uspořádání bylo dosaženo osazením reaktoru síťovými separátory, které zadržovaly BL v reaktoru, pomocí sady dávkovacích a odtahových peristaltických čerpadel a kontinuálním dávkováním externí CHSK. Průtoky systémem byly průběžně kontrolovány. Simulované roztoky eluátů byly připravovány z destilované vody přidavkem chloridu sodného, síranu sodného (20 g/l NaCl, 2 g/l Na₂SO₄ = 100%) a dusičnanu draselného o čistotě p.a. Jako zdroj CHSK pro denitrifikaci byl dávkován ethanol v mírném přebytku 4,2 g CHSK (0,58 ml ethanolu) / g N-NO₃⁻. Aktivita Biokatalyzátoru je vyjadřována v gramech odbouraného dusíku jedním kilogramem Biokatalyzátoru lentikats za jednu hodinu.

Kontinuální část experimentu navazuje na dříve provedené testy, ve kterých byl sledován vliv počáteční koncentrace dusičnanů na aktivitu BL při konstantní maximální koncentraci anorganických solí (20 g/l NaCl, 2 g/l Na₂SO₄) [6]. Eluát takového složení lze produkovat regulací délky regenerace iontoměničové kolony. Výsledky prokázaly, že systém je možné provozovat při maximální koncentraci solí, přičemž nejvyšší aktivity Biokatalyzátoru bylo dosaženo při počáteční koncentraci dusičnanů cca 5 g/l. Dlouhodobý provoz kontinuálního procesu měl za úkol prokázat dlouhodobý vliv anorganických solí na stabilitu Biokatalyzátoru. Na začátku průtočného experimentu byl reaktor naplněn 12 litry roztoku modelového eluátu bez dusičnanů i CHSK. Do této výchozí matrice byl pak spuštěn nátok simulovaných eluátů s koncentrací dusičnanů 5,5 g/l a zároveň také dávkování externí CHSK.

Cílem vsádkových experimentů bylo sledovat aktivitu Biokatalyzátoru v závislosti na stupni ředění eluátové matrice. Tato fáze testů simuluje případ, pokud by se v první fázi projektu prokázalo, že není možné eluáty biologicky čistit v jejich koncentrované formě. V první fázi byla provedena 4 opakování pro roztoky s postupně 40 %, 60 %, 80 % a 100 % koncentrovaného eluátu (20 g/l NaCl, 2 g/l Na₂SO₄) doplněného destilovanou vodou na výsledný objem. Koncentrace dusičnanů byla ve všech testech stejná 5 g/l NO₃⁻. Poté byl Biokatalyzátor regenerován a byla provedena série dalších testů při různých ředěních matrice (viz graf 2). Na začátku experimentů bylo vždy upraveno pH na hodnotu 7,0 pomocí kyseliny chlorovodíkové ředěné 1:1. Vsádkové pokusy byly zahajovány přidavkem ethanolu. Mezi jednotlivými testy byl Biokatalyzátor vždy opakovaně proplachován definovaným množstvím pitné vody.

V případě dlouhodobého poklesu aktivity Biokatalyzátoru na hodnotu 150 mg N/kg BL/hod byla prováděna regenerace samotného BL za účelem revitalizace imobilizované biomasy. Regenerace byla prováděna pomocí standardního kultivačního - živného média (KM) o složení KH₂PO₄ 2,3 g/l, Na₂HPO₄·2H₂O 2,9 g/l, NH₄Cl 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l, NaHCO₃ 0,5 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,1 g/l, citrát amonoželeznatý 0,5 g/l, roztok stopových prvků 5 ml/l (ZnSO₄·7H₂O 0,1 g/l, MnCl₂·4H₂O 0,03 g/l, H₃BO₃ 0,3 g/l, CoCl₂·6H₂O 0,2 g/l, CuCl₂·2H₂O 0,01 g/l, NiCl₂·6H₂O 0,02 g/l, Na₂MoO₄·2H₂O 0,03 g/l) s přidavkem dusičnanu draselného.

Ve všech případech byla pravidelně sledována koncentrace dusičnanů, dusitanů, CHSK (filtrovaná

a celková) a zákal (optická densita, OD). vyjadřující koncentraci volné biomasy. V kontinuálním testu byla rovněž sledována koncentrace fosforečnanů pro posouzení vlivu přítomnosti nutrientů na aktivitu Biokatalyzátoru. Vzorky byly odebírány přímo z reaktoru (5 ml do 25 ml odměrné baňky pro stanovení iontů, 5 ml neředěných na stanovení volné biomasy, 10 ml na stanovení CHSK). Koncentrace dusičnanů a fosforečnanů byla stanovena iontovou chromatografií (DIONEX ICS 1000, kolona IonPac® AS14 4x250 mm, mobilní fáze 3,5mM Na₂CO₃/1mM NaHCO₃, průtok 1,2 ml/min). Kalibrační rozsah stanovení byl 1-10 mg/l, vzhledem k interferenci chloridů byla dolní mez stanovitelnosti u většiny vzorků 25 mg/l. Dusitany byly stanoveny spektrofotometricky pomocí setu Spectroquant (Merck, k.č. 1.14776). Kalibrační rozsah byl 0,1-1 mg/l, vzhledem k interferenci chloridů byla dolní mez stanovitelnosti u většiny vzorků 2,5 mg/l. Zákal (optická densita, OD) byla měřena spektrofotometricky při 600 nm.

Výsledky a diskuze

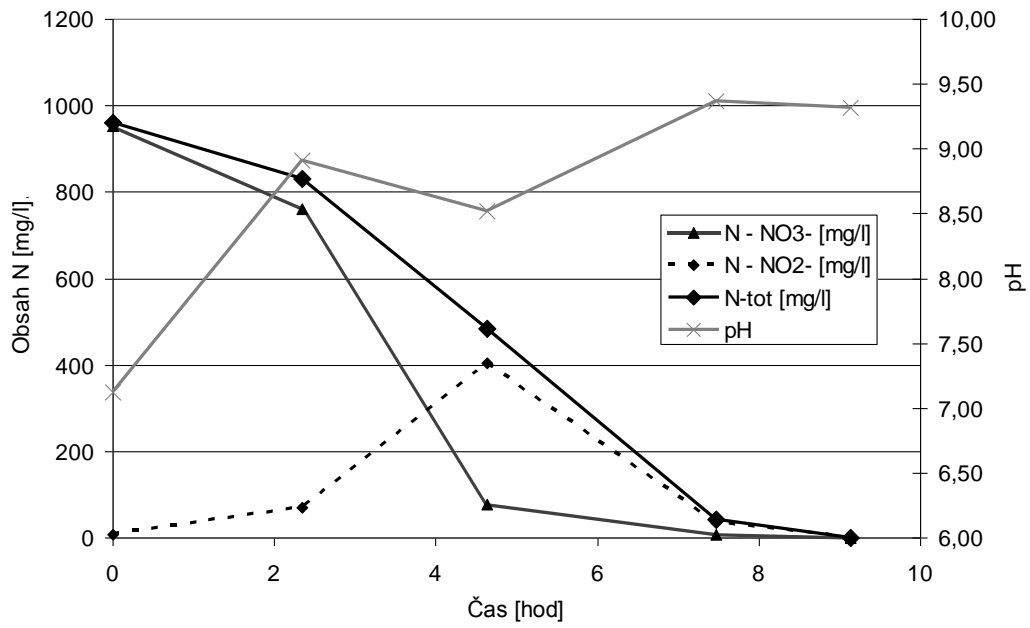
Kontinuální test

Nejdůležitější výsledky dlouhodobé denitrifikace v průtočném uspořádání shrnuje graf 1. Pokus byl prováděn po předchozí opakované regeneraci použitého BL na aktivitu cca 550 mg N/kg BL/hod. Zatížení systému bylo postupně zvyšováno z počátečních 230 mg N-NO₃⁻/hod zvyšováním průtoku na hodnotu 439 mg N-NO₃⁻/hod. Systém po celou dobu dosahoval nulových koncentrací dusíku na odtoku. Po zvýšení zatížení systému na 439 mg N-NO₃⁻/hod začala aktivita Biokatalyzátoru prudce klesat, což bylo doprovázeno nejprve zvýšenou koncentrací dusitanů a později i dusičnanů na odtoku z reaktoru. V důsledku toho bylo zatížení opět postupně snižováno až na hodnotu 280 mg N-NO₃⁻/hod. V cca 2200té hodině (91 dní) od počátku experimentu byl experiment restartován výměnou vody v reaktoru za nový eluát bez dusičnanů a opětovným spuštěním dávkování eluátu s 5,5 g/l NO₃⁻ (černá šipka v grafu 1). Systematický pokles aktivity však byl zaznamenáván až do konce experimentu, což naznačuje, že inhibice systému byla nevratná. Zároveň vylučuje, že inhibice byla způsobena příliš vysokým zatížením systému. V předchozích vsádkových testech [6] bylo prokázáno, že Biokatalyzátor je schopen pracovat i při vyšších počátečních koncentracích dusičnanů. Příčinou tak zřejmě je dlouhodobý vliv vysoké koncentrace anorganických solí (osmotického tlaku), který postupně snižuje schopnost regenerace a reprodukce imobilizované biomasy a dochází tak k vyčerpání denitrifikační kapacity použitého Biokatalyzátoru. Vliv přítomnosti nutrientů je předmětem dalšího sledování.

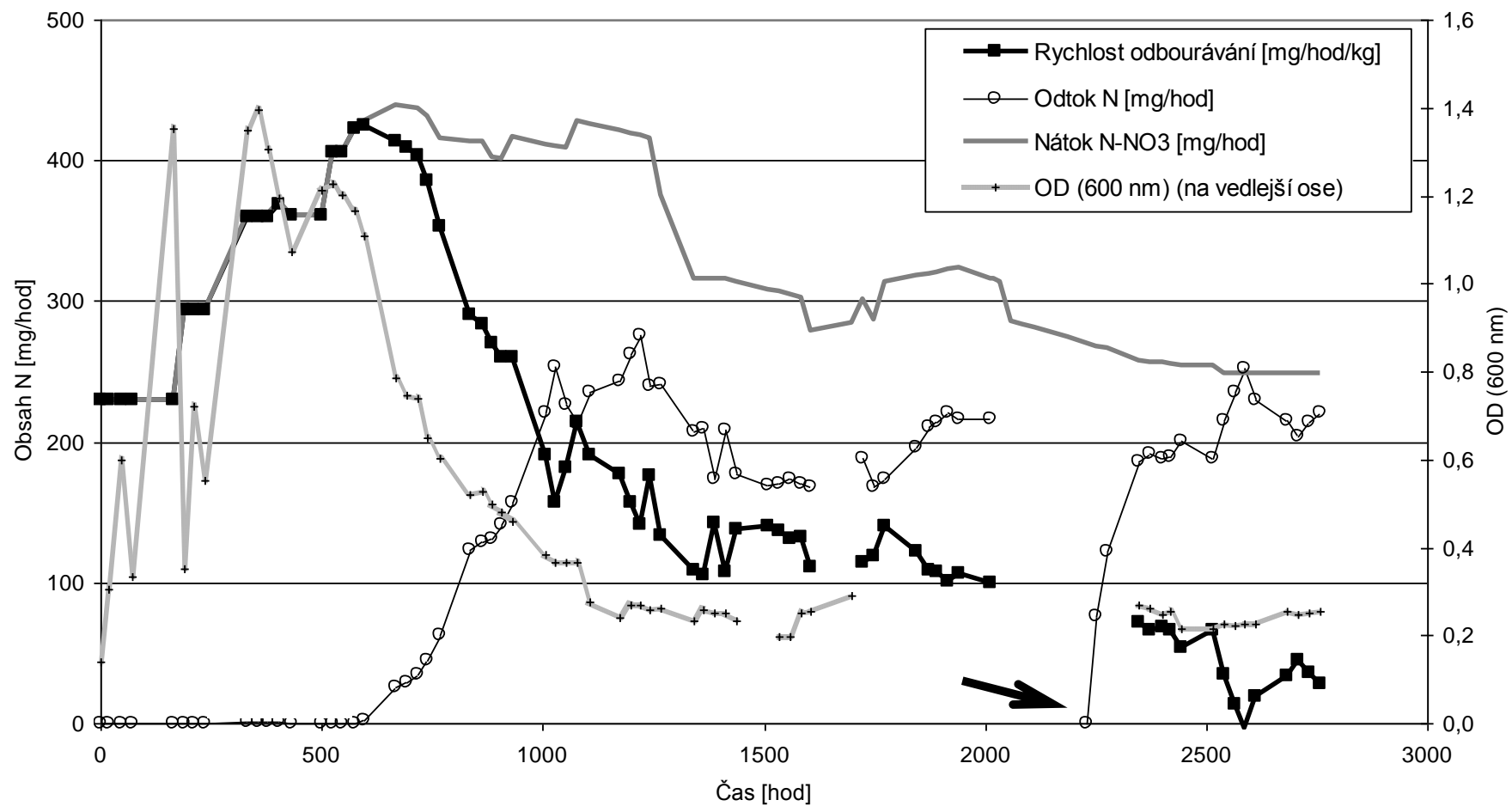
Výsledky naznačují, že systém je možné provozovat po dobu cca 1,5 měsíce před nutnou regenerací Biokatalyzátoru. Cílem dalšího sledování je tak toto zjištění ověřit a nalézt optimální způsob a podmínky provozování kontinuálního procesu. Hledanými parametry bude maximální délka provozování systému mezi regeneracemi Biokatalyzátoru v živném médiu a optimální zatížení systému pro dosažení stabilních výsledků.

Vsádkové experimenty

Typický průběh vsádkového experimentu ukazuje graf 2. Odbourávání dusičnanů probíhá ze začátku přibližně lineárně (někdy po kratší prodlevě) a současně jsou kumulovány dusitany jako meziprodukt odbourávání. Při konstantní počáteční koncentraci dusičnanů je maximální koncentrace dusitanů úměrná rychlosti odbourávání dusičnanů. Redukce dusitanů (denitritace) tak představuje kineticky limitní krok. Na začátku pokusů byl také zaznamenán rychlý vzestup pH z počátečních 7,0 na hodnoty 9-10. Ten souvisí se spotřebou oxoniových kationtů při denitritaci. U experimentů v regeneračním KM médiu byl vzestup pozvolnější díky pufrovací schopnosti v médiu obsažených hydrogenfosforečnanů a dihydrogenfosforečnanů.



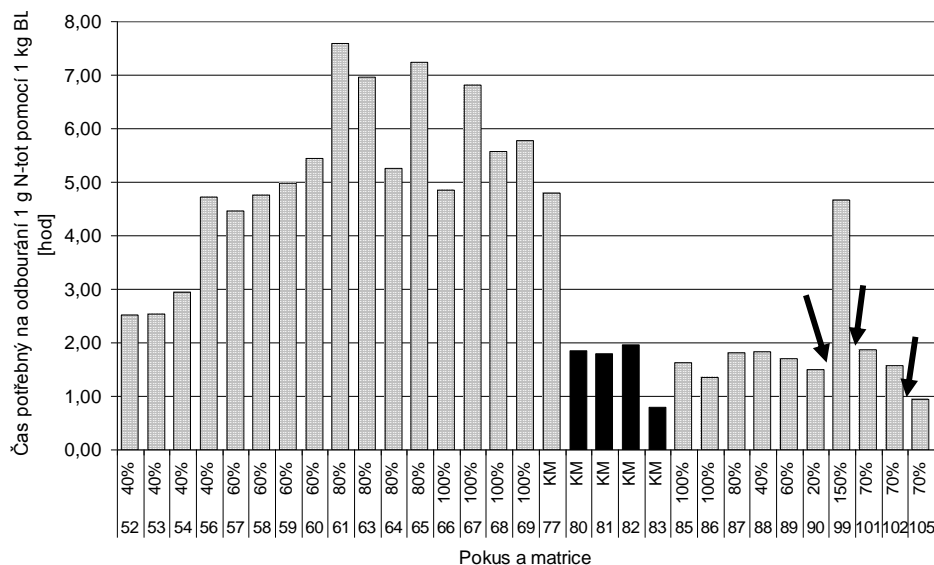
Graf 2 Typický průběh vsádkového experimentu



Graf 1 Dlouhodobý kontinuální experiment. Vynesen je nátok a odtok celkového dusíku, rychlost odbourávání a volná biomasa (OD při 600 nm). Černá šipka označuje restart experimentu, reaktor byl vyčištěn a naplněn simulovaným eluátem (slanou vodou) s nulovou koncentrací dusičnanů, Biokatalyzátor lentikats nebyl nijak regenerován.

Kinetická data z vybraných experimentů s konstantní výchozí koncentrací dusičnanů (5 g/l) a proměnlivým pozadím chronologicky zobrazuje graf 3. Před zahájením testů byl BL regenerován v živném kultivačním médiu na aktivitu cca 500 mg/kg BL/hod. V průběhu testování pak aktivita Biokatalyzátoru postupně klesala s rostoucí koncentrací anorganických solí v médiu z počáteční průměrné hodnoty 360 mg N/kg/hod při 40% koncentraci eluátů až na 140 mg N/kg/hod při 100% koncentraci eluátu. Poté byl BL opět regenerován na aktivitu cca 1600 mg N/kg BL/hod. Regenerace BL na trojnásobně vyšší počáteční aktivitu měla za následek, že při následném opětovném použití v eluátu dosahoval BL až několikanásobně vyšších aktivit při daných podmínkách než v testech provedených před regenerací (např.: 100% koncentrace eluátu v médiu: před rekultivací aktivita 150 mg/kg BL/hod, po kultivaci aktivita 980 mg/kg BL/hod; viz graf 3).

Graf 3 Chronologicky seřazený seznam pokusů zaměřených na odbourávání 5 g/l dusičnanů v různé matrici (100%=20 g/l NaCl + 2 g/l Na₂SO₄, KM = regenerační kultivační médium). Regenerační pokusy jsou zvýrazněny černou barvou resp. černou šipkou.



Tabulka I Korelace kinetických dat s faktory potenciálně ovlivňujícími kinetiku denitrifikace. Korelace významné na hladině $\alpha=0,95$ jsou vyznačeny tučně.

	ředění matrice	lin v N-NO ₃	lin v N-tot	t na 1 g N-tot	prům. tep.	prům. pH	pH start	čas od regen.	NO ₂ max t	NO ₂ max
ředění matrice	1,00	-0,13	-0,28	0,42	0,04	0,41	0,24	0,57	0,29	0,20
lin v N-NO ₃	-0,13	1,00	0,87	-0,81	0,79	0,00	0,20	-0,56	-0,91	0,41
lin v N-tot	-0,28	0,87	1,00	-0,84	0,61	-0,09	0,11	-0,65	-0,86	0,16
t na 1 g N-tot	0,42	-0,81	-0,84	1,00	-0,62	0,10	-0,13	0,80	0,82	0,00
prům. tep.	0,04	0,79	0,61	-0,62	1,00	-0,13	0,17	-0,34	-0,71	0,24
prům. pH	0,41	0,00	-0,09	0,10	-0,13	1,00	0,49	0,03	-0,05	0,06
pH start	0,24	0,20	0,11	-0,13	0,17	0,49	1,00	-0,20	-0,29	0,23
čas od regen.	0,57	-0,56	-0,65	0,80	-0,34	0,03	-0,20	1,00	0,59	0,14
NO ₂ max t	0,29	-0,91	-0,86	0,82	-0,71	-0,05	-0,29	0,59	1,00	-0,35
NO ₂ max	0,20	0,41	0,16	0,00	0,24	0,06	0,23	0,14	-0,35	1,00

ředění matrice = koncentrace solí v experimentu, lin v N-NO₃ = počáteční lineární rychlost odbourávání dusičnanů, lin v N-tot = počáteční lineární rychlost odbourávání celkového dusíku, t na 1 g N-tot = čas potřebný na odstranění 1 g celkového dusíku pomocí 1 kg BL, prům. tep. = průměrná teplota, pH start = počáteční pH, čas od regen. = čas, který uplynul mezi začátkem experimentu a začátkem posledního regeneračního experimentu. NO₂ max t = čas, při kterém bylo dosaženo maximální koncentrace dusitanů, NO₂ max = dosažené maximum dusitanů.

Je zřejmé, že aktivita Biokatalyzátoru není závislá ani tak na aktuální koncentraci anorganických solí, ale hlavně na době od poslední regenerace a na stupni této regenerace Biokatalyzátoru. Dalším faktorem ovlivňujícím aktivitu denitrifikačních mikroorganismů je teplota. Korelace mezi těmito parametry a dosaženou aktivitou Biokatalyzátoru je shrnuta v tabulce I. Provedená statistická analýza opět potvrzuje výše uvedený závěr, neboť aktivita BL významně koreluje s časem od poslední regenerace (0,80), zatímco mezi lineární rychlostí odbourávání a ředěním matrice nebyla nalezena žádná korelace a mezi celkovou aktivitou BL a mírou ředění matrice pouze velmi slabá (0,42).

Závěr

Pro praktické odstraňování dusičnanů z eluátů se použití Biotechnologie Lenticats jeví perspektivně. Pozitivní je zejména vysoká denitrifikační rychlost, která je srovnatelná s použitím v komunálních či jiných typech průmyslových odpadních vod. V porovnání s aplikací Biokatalyzátoru lenticats v komunálních či kalových vodách však dochází v iontoměničových eluátech k poklesu aktivity Biokatalyzátoru za podstatně kratší dobu. Příčinou je zřejmě snížená schopnost reprodukce mikroorganismů vlivem vysokého osmotického tlaku a nedostatku živin. Zařazením regenerační fáze je však možné Biokatalyzátor opětovně revitalizovat na původní aktivitu. Možnost dlouhodobého provozu takového systému je předmětem dalšího sledování.

Poděkování

Výzkum byl spolufinancován firmou LentiKat's a.s. a výzkumným centrem „Pokročilé sanační technologie a procesy“ (projekt MŠMT 1M0554).

Použitá literatura

- [1] JAHNZ U., WITTLICH P., PRÜSSE U., VORLOP K.D. (2001): New matrices and bioencapsulation processes. in M. Hofman, P. Thonart (eds.), Engineering and manufacturing for biotechnology, 293-307. Kluwer Academic Publishers, Netherland
- [2] JEKEL M., BUHR A., WILKE T., VORLOP K.D.: (1998): Immobilization of biocatalysts in LentiKats. Chem. Eng. Technol. 21, 275
- [3] SCHLIEKER M., VORLOP K.D. (2006): A novel immobilization method for entrapment LentiKats®. in J.M. Guisan (ed.), Immobilization of enzymes and cells, Second edition, 333-343, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey
- [4] SIEVERS M., SCHÄFER S., JAHNZ U., SCHLIEKER M., VORLOP K.D. (2002): Significant reduction of energy consumption for sewage treatment by using LentiKat® encapsulated nitrifying bacteria. Landbauforsch. Volk. SH 241, 81-86
- [5] KRÍŽENECKÁ S., TRÖGL J., PILAŘOVÁ V., BUCHTOVÁ H, ČECHOVSKÁ L. (2009): Čištění specifických odpadních vod pomocí imobilizovaných mikroorganismů. Studia Oecologica. 1, 95-103
- [6] MRÁKOTA J., BOUŠKOVÁ A., TRÖGL J., LEDERER T.,PILAŘOVÁ V., MĚCHUROVÁ J., KRUDENCOVÁ J., STLOUKAL R.: Využití Biotechnologie lenticats pro čištění průmyslových odpadních vod, Odpadní vody 2009, Plzeň, 5.-7.5.2009