

Usuwanie azotanów z wody pitnej w układzie łączącym wymianę jonową z biologiczną denitryfikacją

Paweł Cyplik

Tomasz Małyszka

Włodzimierz Grajek

Wojciech Burda

Anna Anioł

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Akademia Rolnicza

Poznań

1. Wstęp

W wyniku intensyfikacji produkcji rolniczej oraz silnego rozwoju przemysłu obserwuje się w środowisku znaczny wzrost poziomu pierwiastków biogennych, w tym również azotanów. Jony azotanowe migrując w glebie dostają się do ujęć wody pitnej i przyczyniają się do poważnego obniżenia jakości spożywanej wody. Szkodliwy wpływ azotanów na organizm człowieka polega na ich udziale w powstawaniu kancerogennych nitrozoamin oraz na wywoływaniu methemoglobinemii, choroby szczególnie groźnej dla niemowląt.

Obowiązujące normy dopuszczają zawartość azotanów w wodzie na poziomie 10 mg N-NO₃⁻ w litrze, jednakże można przypuszczać, że norma ta zostanie zaostrzona do 5 mg N-NO₃⁻ na litr. Nadmierna zawartość azotanów w wodzie pitnej występuje również w naszym kraju. Sytuacja ta wymusza szukanie rozwiązań technologicznych pozwalających na ograniczenie obecności azotanów w środowisku, a przede wszystkim na skuteczne usuwanie azotanów z wody pitnej.

Ze względu na pewne wady denitryfikacji biologicznej, jak zmniejszenie aktywności drobnoustrojów w niskiej temperaturze, możliwość skażenia mikrobiologicznego wody oraz powstawanie azotynów, poszukuje się metod rozdzielania procesu separacji azotanów od ich mikrobiologicznego rozkładu. Duże perspektywy ma separacja azotanów na drodze wymiany jonowej, a następnie usunięcie azotanów z odpadu poregeneracyjnego poprzez mikrobiologiczną konwersję azotanów do gazowych form azotu (tlenku azotu, podtlenku azotu, czy azotu cząsteczkowego) (1-3).

Wśród stosowanych jonitów można wyróżnić żywice nieselektywne i selektywne. Te ostatnie są szczególnie zalecane, gdy uzdatniana woda zawiera dużą ilość jonów siarczanowych, konkurencyjnych dla jonów azotanowych. Użycie takich żywic zwiększa wydajność i skuteczność procesu denitryfikacji. Wysycenie jonitów anionami powoduje konieczność ich okresowej regeneracji za pomocą roztworów soli. Dzięki zastosowaniu zestawu kilku kolumn można prowadzić proces w sposób ciągły, a przesunięcie cyklu pracy kolumn umożliwia wyłączenie kolumny bez zatrzymania procesu i poddanie jej regeneracji. Do regeneracji stosuje się kilkuprocentowe roztwory NaCl, bądź NaHCO_3 . Podczas regeneracji najpierw z kolumny usuwane są jony najslabiej z nią związane (HCO_3^-), a na koniec jony wykazujące największe powinowactwo chemiczne do anionitu (SO_4^{2-}). Ujmując stechiometrycznie problem regeneracji, na każdy gramorównoważnik żywicy stosuje się od 1 do 9 gramorównoważników chlorków. Po każdej regeneracji kolumnę jonowymienną należy dokładnie przepłukać w celu usunięcia nadmiaru jonów niezwiązanych z jonitem (4). Usunięcie azotanów z regenerantu metodą mikrobiologicznej denitryfikacji umożliwia jego wielokrotne wykorzystanie do regeneracji żywic.

Z technologicznego punktu widzenia ważne jest zastosowanie takiego stężenia NaCl, aby ilość chlorków była wystarczająca do regeneracji żywicy, a także aby nie wpływała negatywnie na organizmy prowadzące proces denitryfikacji. Stosownym rozwiązaniem, jak się wydaje, jest wykorzystanie denitryfikatorów halofilnych, które charakteryzują się znaczną tolerancją na wysokie stężenie soli. Zaletami tego procesu jest brak skażenia mikrobiologicznego kolumny jonowymiennej w wyniku rozdzielenia procesów separacji azotanów i ich biokonwersji do gazowych form azotu, nieobecność w wodzie związków organicznych będących źródłem węgla dla bakterii i możliwość wielokrotnego wykorzystania solanki (obieg zamknięty). Omawiana metoda ma jednak pewne wady, jak konieczność dezynfekcji jonitów po procesie regeneracji, konieczność stosowania materiałów odpornych na korozję i precyzyjny dobór parametrów pracy kolumn jonowymiennych i bioreaktora denitryfikacyjnego.

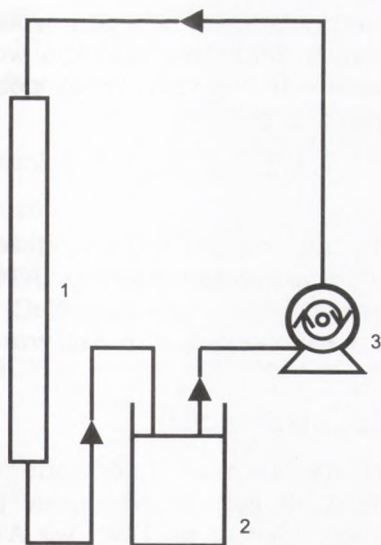
Celem pracy było zbadanie możliwości wykorzystania żywic jonowymiennych do usuwania azotanów z wody pitnej, określenie kinetyki procesu biodenitryfikacji solanki poregeneracyjnej oraz opracowanie matematycznych modeli zmian stężenia azotanów w funkcji czasu.

2. Materiały i metody

2.1. Żywice jonowymienne

Do badań wykorzystano następujące żywice jonowymienne:

- Amberlite IRA 410 o teoretycznej zdolności jonowymiennej 3,9 eq/kg,
- Amberlite IRA 400 o teoretycznej zdolności jonowymiennej 3,9 eq/kg,
- Dowex 2 o teoretycznej zdolności jonowymiennej 3,6 eq/kg,
- Wofatit SBK o teoretycznej zdolności jonowymiennej 3,0 eq/kg.



Rys. 1. Schemat stanowiska badawczego: 1 — kolumna jonowymienna, 2 — zbiornik, 3 — pompa.

Stanowisko badawcze przedstawione zostało na rysunku 1 i składało się ono ze szklanej kolumny o wysokości 40 cm i średnicy 1,5 cm, wypełnionej żywicą jonowymienną, pompy perystaltycznej firmy Watson-Marlow i naczynia wyrównawczego. Parametry charakteryzujące układ ujęte zostały w tabeli 1.

TABELA 1
PARAMETRY UKŁADU DOŚWIADCZALNEGO DO WYMIANY JONOWEJ

wysokość kolumny (cm)	40
średnica kolumny (cm)	1,5
objętość kolumny (cm ³)	71
masa jonitów (g)	
Amberlite IRA 410	30
Amberlite IRA 400	33
Wolfatit SKB	33,5
Dowex 2	30
szybkość obrotów pompy (obr/min)	5
wydajność pompy (cm ³ /min)	47
wymiana objętości w czasie 20 min	13,2

W kolumnie umieszczano poszczególne żywice i przepuszczano roztwór azotanów. Następnie kolumnę regenerowano 5% roztworem NaCl w ilości

500 cm³. Przeprowadzono trzy ładowania jonitu azotanami i trzy regeneracje. Przed i po regeneracji żywicę dokładnie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia jonów nie związanych z żywicą. Próby pobierano w stałych odstępach czasu co 20 min przez 2 godziny.

2.2. Mikroorganizmy

Do denitryfikacji wody zawierającej NaCl w stężeniach 0% (kontrola), 1, 1,5 i 2% użyto bakterii *Paracoccus denitrificans* (ATCC19367), natomiast do denitryfikacji solanki zawierającej 6, 10 i 12% NaCl (w/v) wykorzystano halofilne bakterie z gatunku *Halobacterium mediterranei* (ATCC 33500).

2.3. Inoculum bakterii *H. mediterranei*

Szczep *Halobacterium mediterranei* hodowano na skosach agarowych w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Następnie przenoszono bakterie ze skosów do kolb na pożywkę płynną nr 1176 wg ATCC, wykorzystując trzy skosy na zaszczepienie 100 ml płynnej pożywki. Po 48 godzinach odwirowywano 25 ml hodowli przy 3700 g i uzyskaną biomasą zaszczepiano kolbę zawierającą 250 ml pożywki hodowlanej.

TABELA 2

SKŁAD POŻYWKI 1176 UŻYWANEJ DO HODOWLI *Halobacterium mediterranei*

Składniki pożywki	Ilość składnika (g)
NaCl	156
MgCl ₂ × 6H ₂ O	13
MgSO ₄ × 6H ₂ O	20
CaCl ₂ × 6H ₂ O	1
KCl	4
NaHCO ₃	0,2
NaBr	0,5
ekstrakt drożdżowy	5
glukoza	1
woda destylowana	1000

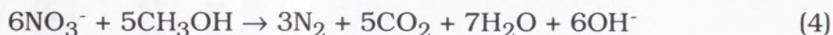
2.4. Inoculum bakterii *P. denitrificans*

Bakterie *Paracoccus denitrificans* hodowano na skosach stosując pożywkę składającą się ze wzbogaconego agaru (25 g dm⁻³) z dodatkiem glukozy (10 g dm⁻³). Hodowlę prowadzono przez 2 dni w temperaturze 30°C, po czym zawiesiną komórek uzyskaną ze zmycia trzech skosów zaszczepiano kolbę zawierającą 100 ml bulionu (15 g dm⁻³). Hodowlę prowadzono przez 48 go-

dzin w temperaturze 30°C w warunkach beztlenowych. Następnie 25 ml pożywki wirowano przy 3700 g przez 10 min i wyizolowane bakterie przenoszono do szczelnie zakorkowanych kolb o pojemności 250 ml.

2.5. Warunki prowadzenia procesu biodenitryfikacji

Początkowe stężenie azotanu sodowego wynosiło 6 g i 7 g $\text{NO}_3^- \text{dm}^{-3}$. Jako źródło węgla i donora elektronów stosowano metanol, którego ilość została obliczona z równania stechiometrycznego, z 30% nadmiarem:



Dla uzyskania stosunku C:P równego 56:1 dodawano dodatkowo KH_2PO_4 . Proces denitryfikacji prowadzono przy pH 6,5 – 7, w temperaturze 30°C.

2.6. Metody analityczne

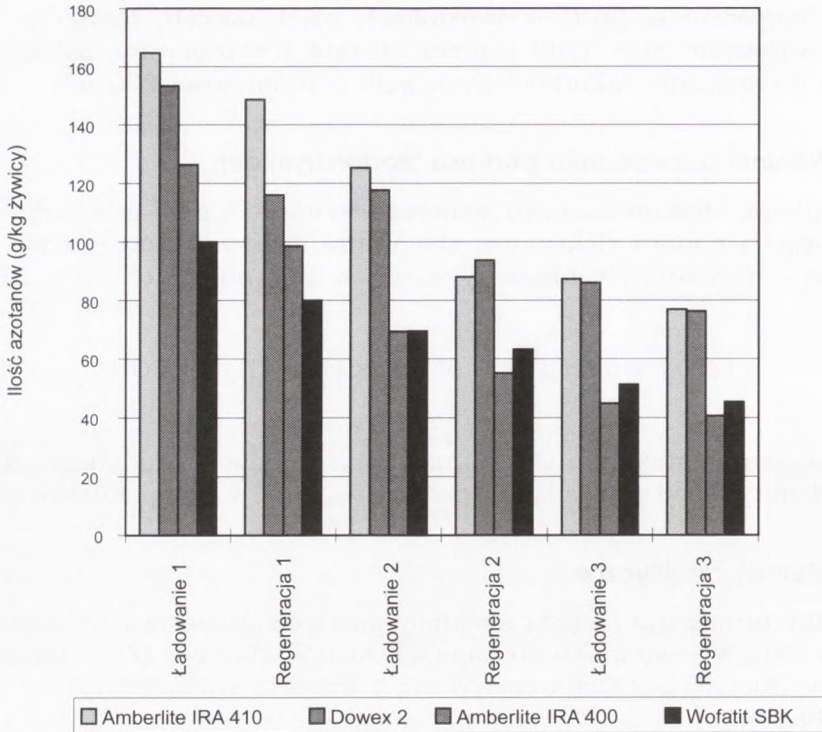
Azotany oznaczano metodą spektrofotometryczną opartą na reakcji z salicylanem sodu w środowisku stężonego kwasu siarkowego (7), natomiast azot azotynowy metodą spektrofotometryczną z kwasem sulfanilowym i 1-naftyloaminą (8).

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Sorpcja jonów azotanowych na żywicach

Na rysunku 2 przedstawiono wyniki badań nad sorpcją azotanów w czasie trzech kolejnych ładowań i regeneracji żywic jonowymiennych. Po przeprowadzeniu serii wymian jonowych stwierdzono, że regeneracja miała statystycznie istotny, negatywny wpływ na pojemność roboczą jonitów. Po każdej regeneracji następował znaczny spadek zdolności adsorpcyjnych żywic. Było to spowodowane tym, że część azotanów nie uległa desorpcji, lecz trwale związała się z grupami funkcyjnymi jonitów oraz niecałkowitym wypłukaniem niezwiązanych jonów. Ponadto wysokie stężenie jonów azotanowych podczas regeneracji mogło mieć wpływ na stałą równowagi procesu wymiany jonowej. Porównując badane żywice jonowymiennie należy stwierdzić, że największą pojemnością roboczą charakteryzowała się żywica Amberlite IRA 410, następnie Dowex 2 i Amberlite IRA 400, najmniejszą zaś Wofatit SBK. Na usunięcie 1g azotanów z wody należy użyć od 6,45 – 12,20 g żywicy Amberlite IRA 410, od 7,0 – 12,4 g żywicy Dowex 2 od 7,9 – 22,3 żywicy Amberlite IRA 400 i 10,0 – 19,5 g żywicy Wofatit SBR.

W wyniku regeneracji żywic jonowymiennych powstawał roztwór o dużej zawartości chlorku sodowego i azotanów. Roztwór ten mógłby być ponownie



Rys. 2. Ilość związanych i uwolnionych azotanów w czasie trzech kolejnych cykli pracy wymiennika jonowego.

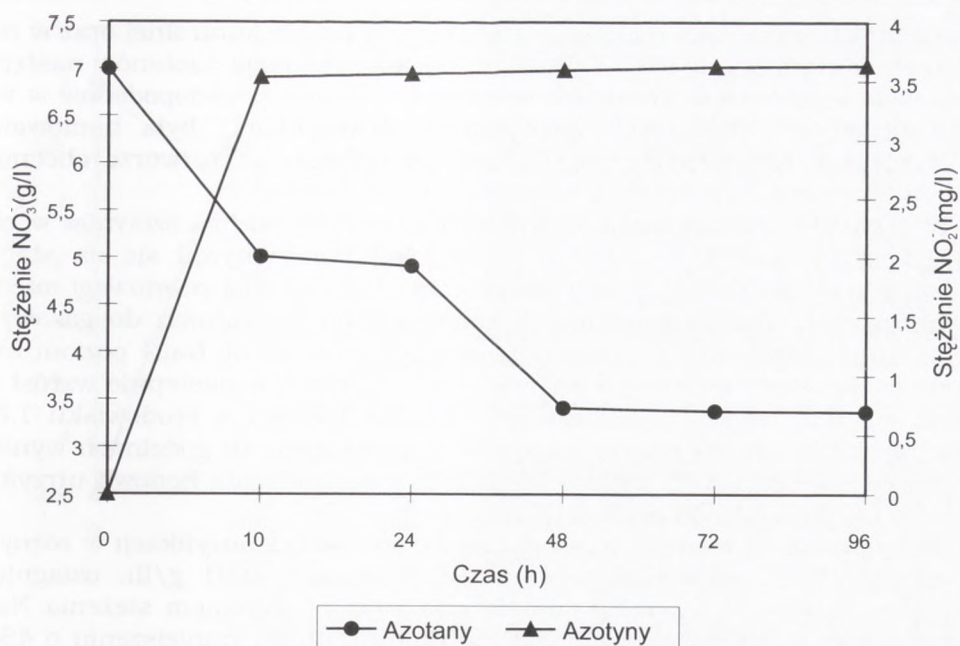
użyty o ile możliwa byłaby pełna redukcja azotanów do azotu gazowego. Możliwość taką stwarza denitryfikacja mikrobiologiczna.

Poważny problem stanowi w tym przypadku wysokie ciśnienie osmotyczne roztworu poregeneracyjnego, ograniczające w praktyce rozwój większości mikroorganizmów denitryfikujących. Jedynym rozwiązaniem jest zastosowanie bakterii halofilnych.

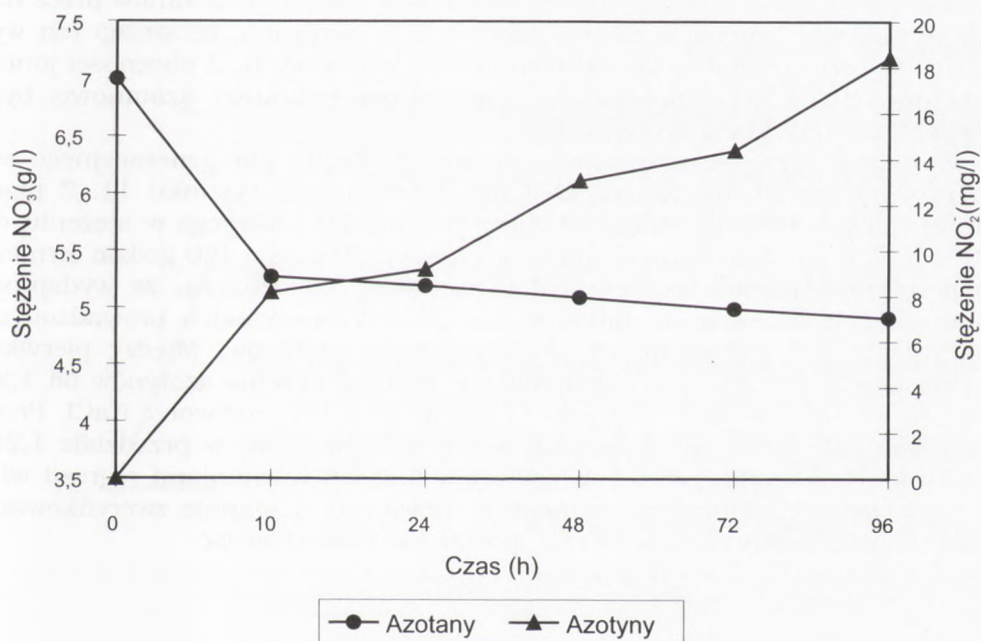
3.2. Denitryfikacja mikrobiologiczna

Badania nad denitryfikacją mikrobiologiczną przeprowadzono przy użyciu dwóch gatunków bakterii. Jednym z nich był znany i powszechnie stosowany w procesach denitryfikacyjnych gatunek *P. denitrificans*. Bakterie te zastosowano do denitryfikacji roztworów zawierających małe stężenia chlorku sodowego. Drugim mikroorganizmem, dotąd nie opisanym w literaturze, były halofilne bakterie z gatunku *H. mediterranei*, wytrzymujące nawet 30% stężenie NaCl.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników fermentacyjnych potwierdziła niekorzystny wpływ dużego stężenia NaCl na wydajność biodenitryfikacji odpadu regeneracyjnego (rys. 3-7). Wraz ze wzrostem stężenia NaCl w srodo-



Rys. 3. Kinetyka denitryfikacji roztworu wodnego nie zawierającego NaCl przez bakterie *P. denitrificans*.



Rys. 4. Kinetyka denitryfikacji 1,0% solanki przez bakterie *P. denitrificans*.

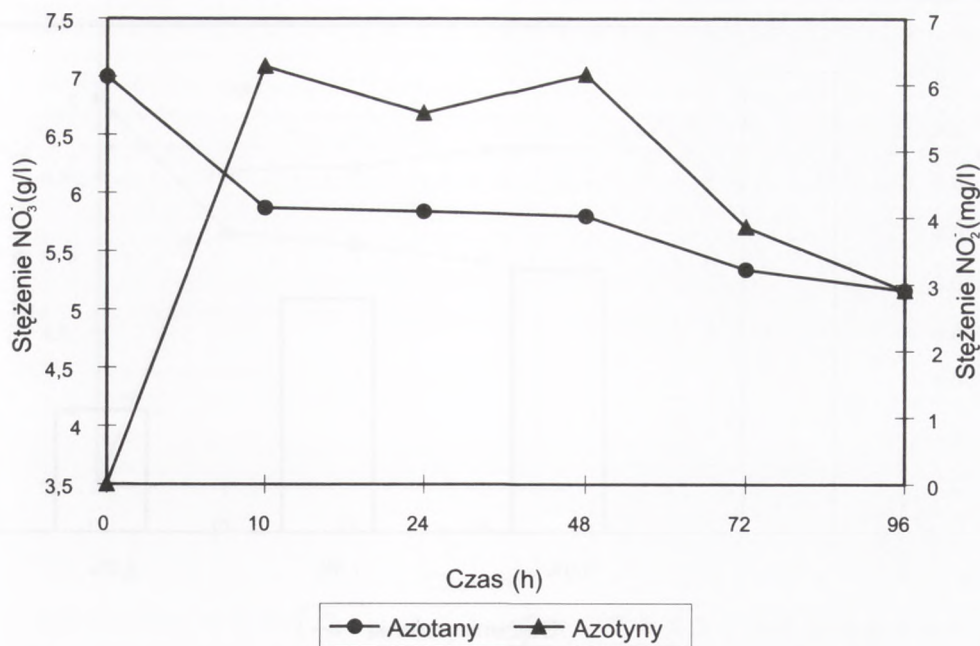
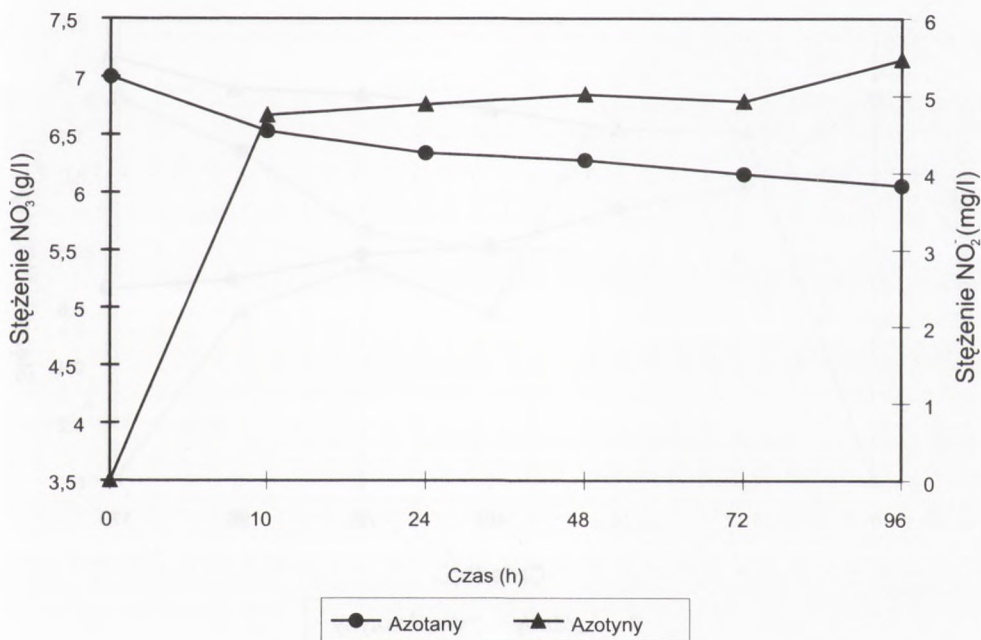
wisku malała dynamika usuwania azotanów. W próbie kontrolnej oraz w roztworach zawierających 1,0 i 1,5% NaCl, szybka redukcja azotanów następowała tylko w pierwszych godzinach fermentacji. Później, prawdopodobnie w wyniku produkcji szkodliwych metabolitów, denitryfikacja była hamowana. W każdym z opisywanych przypadków stwierdzono w roztworze obecność azotynów.

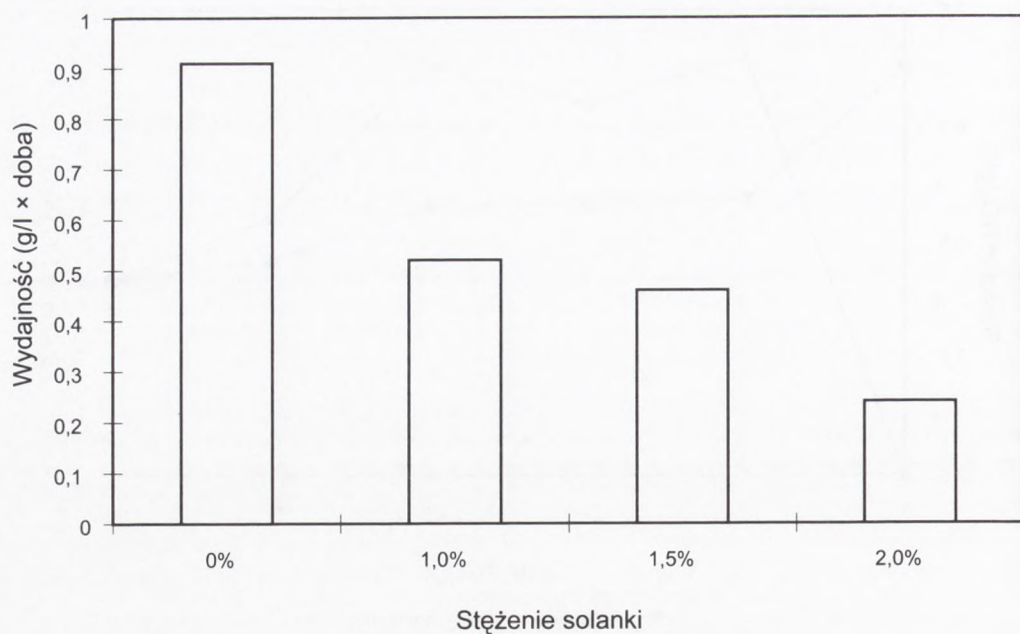
W przypadku denitryfikacji w środowisku bez NaCl poziom azotynów w ciągu 10 godzin wzrósł do wartości 3,53 mg/l i utrzymywał się na stałym poziomie (rys. 3). Świadczy to o osiągnięciu stanu pewnej równowagi między redukcją azotanów do azotynów a konwersją tych ostatnich do gazowych form azotu. Natomiast w procesie prowadzonym w 1,0% NaCl poziom azotynów w 10 godzinie procesu wyniósł 7,02 mg dm⁻³, a następnie wzrósł do 18,42 mg dm⁻³ (rys. 4). Podczas prowadzenia hodowli w środowisku 1,5% (rys. 5) i 2,0% (rys. 6) poziom azotynów w pierwszych 10 godzinach wyniósł odpowiednio 6,28 i 4,75 mg dm⁻³ i do końca prowadzenia hodowli utrzymywał się na poziomie od 2,91-6,15 mg dm⁻³.

Na rysunku 7 przedstawiono wydajność procesu denitryfikacji w różnych stężeniach NaCl. Największą wydajność, wynoszącą 0,91 g/lh, osiągnięto w próbie kontrolnej i zmniejszała się ona wraz ze wzrostem stężenia NaCl w roztworze. W hodowli z 1,0% NaCl wydajność uległa zmniejszeniu o 45%, w 1,5% NaCl o 49,5%. Najsilniejsza inhibicja denitryfikacji wystąpiła w roztworze zawierającym 2,0% NaCl. Spadek wydajności denitryfikacji w porównaniu z próbą kontrolną wynosił w tym przypadku aż 73,6%.

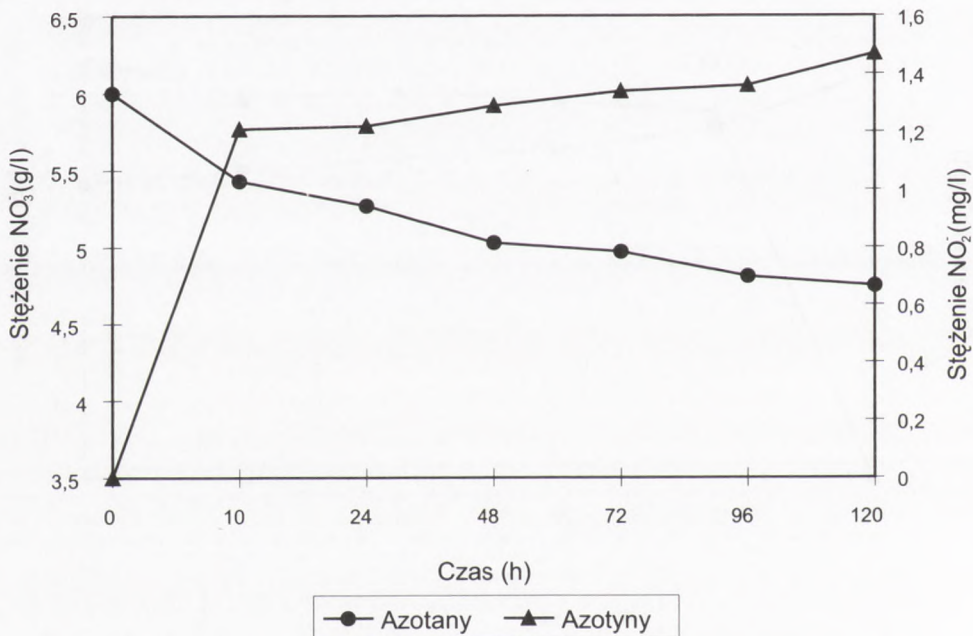
Na rysunkach 8-10 przedstawiono kinetykę usuwania azotanów przez halofilne bakterie *Halobacterium mediterranei*. Stwierdzono, że szczep ten wykazuje wyraźną zdolność do redukcji jonów azotanowych. Z obecności jonów azotynowych można wnioskować, że aktywność reduktazy azotanowej była większa niż reduktazy azotynowej.

Wydajność procesu usuwania azotanów z odpadu poregeneracyjnego zawierającego od 6,0 do 12,0% NaCl przedstawiono na rysunku 11. Z przeprowadzonych badań wynika, że obecność chlorku sodowego w stężeniu do 10% nie powodowała hamowania denitryfikacji. W czasie 120 godzin fermentacji mikroorganizmy usunęły 1,3 g azotanów, co oznacza, że wydajność denitryfikacji wynosiła ok. 0,054 g dm⁻³ h⁻¹. We wszystkich prowadzonych hodowlach zaobserwowano nagromadzenie się azotynów. Między pierwszą a dziesiątą godziną hodowli stwierdzono przyrost stężenia azotynów od 1,21 mg dm⁻³ w 6% roztworze NaCl do 17 mg dm⁻³ w 10% roztworze NaCl. Przez następne 110 godzin stężenie azotynów utrzymywało się w przedziale 1,22-19,3 mg dm⁻³. Zmiany stężenia azotanów opisano równaniami regresji wielomianowej i przedstawiono w tabeli 3. Równania następnie zweryfikowano statystycznie potwierdzając w ten sposób ich prawidłowość.

Rys. 5. Kinetyka denitryfikacji 1,5% solanki przez bakterie *P. denitrificans*.Rys. 6. Kinetyka denitryfikacji 2,0% solanki przez bakterie *P. denitrificans*.



Rys. 7. Wydajność procesu denitryfikacji solanek o różnym stężeniu NaCl przez bakterie *P. denitrificans*.



Rys. 8. Kinetyka denitryfikacji 6,0% solanki przez bakterie *H. mediterranei*.

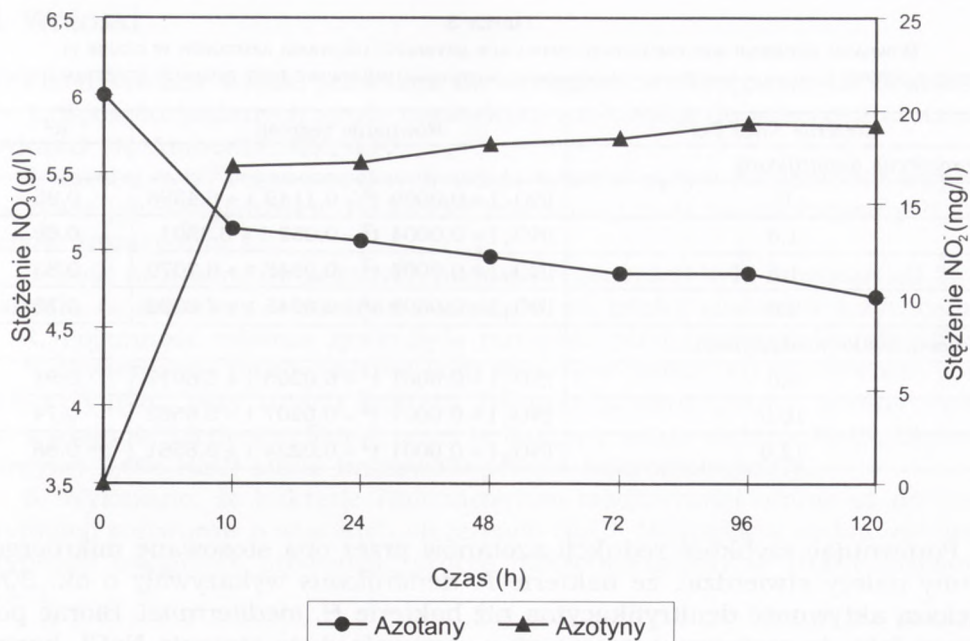
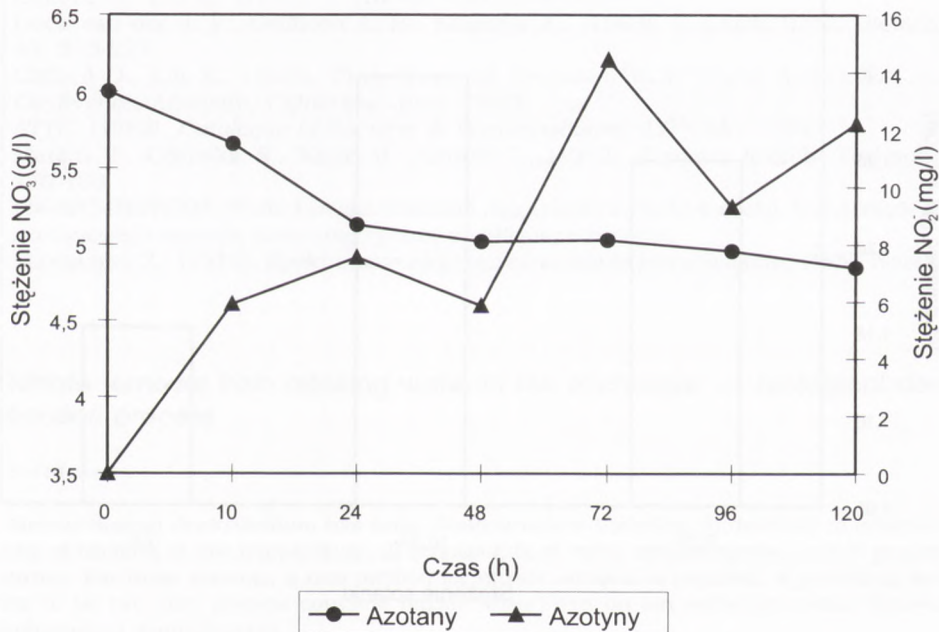
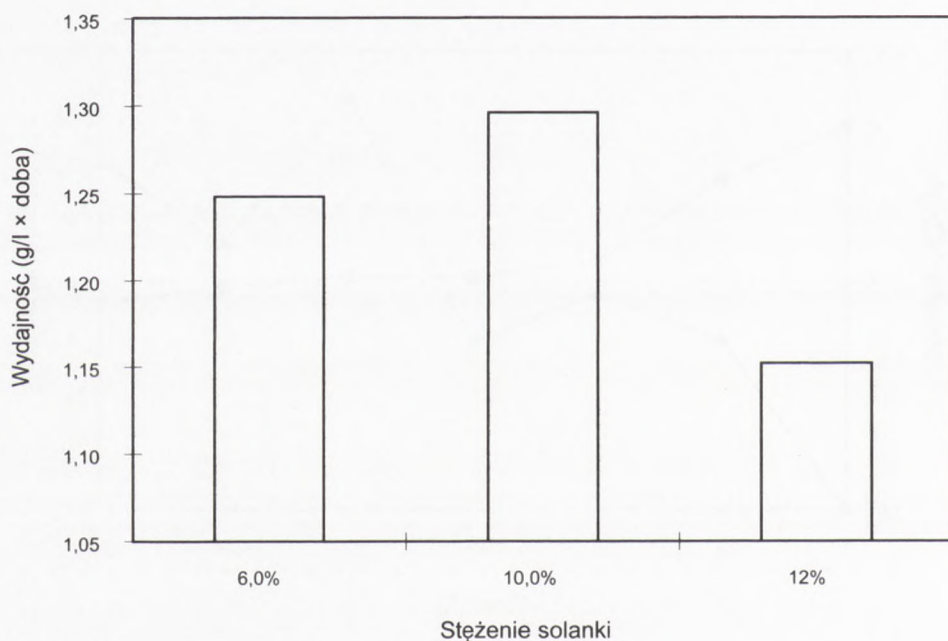
Rys. 9. Kinetyka denitryfikacji 10,0% solanki przez bakterie *H. mediterranei*.Rys. 10. Kinetyka denitryfikacji 12,0% solanki przez bakterie *H. mediterranei*.

TABELA 3

RÓWNANIA REGRESJI WIELOMIANOWEJ OPISUJĄCE SZYBKOŚĆ USUWANIA AZOTANÓW W CZASIE (t) PRZEZ BAKTERIE *Paracoccus denitrificans* i *Halobacterium mediterranei*, HODOWANE PRZY RÓŻNYCH STĘŻENIACH NaCl

Stężenie NaCl (%)	Równanie regresji	R ²
<i>Paracoccus denitrificans</i>		
0	$[\text{NO}_3^-] = 0,0009 t^2 - 0,1149 t + 6,4396$	0,95
1,0	$[\text{NO}_3^-] = 0,0004 t^2 - 0,052 t + 6,3501$	0,68
1,5	$[\text{NO}_3^-] = 0,0002 t^2 - 0,0348 t + 6,7079$	0,83
2,0	$[\text{NO}_3^-] = 0,0002 t^2 - 0,0245 t + 7,0092$	0,75
<i>Halobacterium mediterranei</i>		
6,0	$[\text{NO}_3^-] = 0,0001 t^2 - 0,0205 t + 5,8017$	0,91
10,0	$[\text{NO}_3^-] = 0,0001 t^2 - 0,0207 t + 5,6562$	0,74
12,0	$[\text{NO}_3^-] = 0,0001 t^2 - 0,0224 t + 5,8561$	0,88

Porównując szybkość redukcji azotanów przez oba stosowane mikroorganizmy należy stwierdzić, że bakterie *P. denitrificans* wykazywały o ok. 30% większą aktywność denitryfikacyjną niż bakterie *H. mediterranei*. Biorąc pod uwagę fakt, że roztwory regeneracyjne zawierają duże stężenia NaCl, korzystniejszym rozwiązaniem jest stosowanie organizmów halofilnych.



Rys. 11. Wydajność procesu denitryfikacji solanek o różnym stężeniu NaCl przez bakterie *H. mediterranei*.

4. Wnioski

Przedstawione wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Spośród badanych żywic największą zdolnością do adsorpcji azotanów wykazał się Amberlite IRA 410.

2. Liczba cykli regeneracyjnych miała istotny wpływ na zdolność sorpcyjną żywic jonowymiennych. Po każdej regeneracji ilość zaadsorbowanych azotanów zmniejszała się.

3. Ilość azotanów uwolnionych podczas regeneracji była mniejsza niż związanych, co świadczy o trwałym związaniu się części azotanów z żywicami.

4. Pojemność robocza żywic była mniejsza niż pojemność teoretyczna.

5. Stwierdzono możliwość redukcji azotanów zawartych w roztworze poregeneracyjnym, przy użyciu bakterii *Paracoccus denitrificans*. Istotny wpływ na wydajność biodenitryfikacji przez te bakterie miało stężenie NaCl. Stężenie powyżej 2,0% NaCl silnie hamowało proces mikrobiologiczny.

6. Wykazano, że bakterie *Halobacterium mediterranei* zdolne są do denitryfikacji roztworów o wysokich stężeniach NaCl. Największą wydajność denitryfikacji osiągnięto prowadząc proces mikrobiologiczny w 10,0% roztworze NaCl.

Literatura

1. Clifford D., Liu X., (1993), *Wat. Res.*, 27, 1477-1484.
2. Clifford D., Liu X., (1993), *J. AWWA*, 135, 135-143.
3. Hoek van der J. P., Griffioen A. B., Klapwijk A., (1988), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 43, 213-222.
4. Clifford D., Liu X., (1995), *Proceedings of American Water Works Association Annual Conference*, Anaheim, California; June 19-22.
5. ATTC, (1989), *Catalogue of Bacteria & Bacteriophages*, 17th ed., 336.
6. Matějů V., Cížinská S., Krajčí J., Janoch T., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 170-183.
7. PN-82C-04576.08, Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu azotanowego metodą kalorymetryczną z salicylanem sodu.
8. Marzenko Z., (1978), *Spektrofotometryczne oznaczanie pierwiastków*, PWN, Warszawa.

Nitrate removal from drinking water in ion exchange — biological denitrification process

Summary

Microbiological denitrification has some disadvantages, including 1) decrease of fermentation activity of bacteria at low temperature, 2) serious risk of water contamination, and 3) production of nitrites. For these reasons, a new method for nitrate removal is required. A promising method seems to be two step process coupling nitrate adsorption on ion exchange resins followed by microbiological denitrification.

The aim of this work was to determine usefulness of exchange resins in nitrate ion adsorption, the influence of resin regeneration on the performance of exchange column, the effect of

various salt concentrations on biological denitrification, nitrate removal kinetics, as well as mathematical modeling of nitrate exchange in the function of time.

Ion exchange experiments were performed using Amberlite IRA 400, Amberlite IRA 410, Wolfatit SKB (Rohm & Haas, USA) and Dowex 2.

For denitrification of low salted water, up to 2% NaCl, bacteria *Paracoccus denitrificans* (ATCC 19367) were used, whereas denitrification of higher salted water, with NaCl concentration up to 12% w/v, was performed with a halophilic strain *Halobacterium mediterranei* (ATCC 33500). Methanol was used as carbon source, with 30% excess compared to stoichiometric amount. To achieve C/P ratio 56/1 potassium monophosphate was added. During fermentation, the pH value of brine was automatically controlled at 6,5-7,0. Initial concentration of nitrate was $7,0 \text{ g dm}^{-3}$. Microbiological denitrification was carried out in batch fermentations. Nitrate concentration in water was determined using spectrophotometric method with salicylate, and nitrate concentration was measured in reaction with sulfanilamide and 1-naphtylenediamine.

All used resins showed the ability to adsorb nitrate ions. Adsorption capacity of resins was significantly affected by the number of regeneration courses and decreased with every regeneration course because of strong linkage of ions to the resins.

Fermentation was carried out in glass flask. Both microorganisms used in this study demonstrated very good ability to reduce nitrate level. In the case of *Paracoccus denitrificans*, statistical analysis of experimental data showed that salt concentration significantly affected denitrification efficiency. The denitrification process was inhibited even when 2% solution was used. An important decrease of denitrification rate versus fermentation time was noticed.

Data showed that *Halobacterium mediterranei* was able to reduce nitrate ions in high chloride concentration. Mathematical analysis proved that the most important factor influencing denitrification rate is chloride concentration. The maximum of denitrification rate appeared in post-regeneration brine with 10% of sodium chloride.

Key words:

denitrification, drink water nitrate, ion exchange, *Paracoccus denitrificans*, *Halobacterium mediterranei*.

Adres do korespondencji:

Paweł Cyplik, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.