

Usuwanie rtęci z roztworów wodnych metodą biotransformacji

Stanisław Ledakowicz¹
Wolf-Dieter Deckwer²

1. Wprowadzenie

Szacuje się, że roczna emisja rtęci do środowiska wynosi około $5 \cdot 10^4$ Mg, z czego $4,6 \cdot 10^4$ Mg przedostaje się do atmosfery, a $4 \cdot 10^3$ Mg do wód (1). Rtęć metaliczna i niemal bez wyjątku wszystkie jej związki są toksyczne, z czego najbardziej niebezpieczne są połączenia jonowe, gdyż łatwo reagują z grupami SH protein i są silnymi inhibitorami enzymów. Połączenia rtęci Hg(II) należą do najsilniejszych trucizn nieorganicznych. W związkach organicznych rtęć łączy się bezpośrednio z atomem węgla, a jej metylo-, etylo- i fenylo pochodne są szczególnie niebezpieczne z powodu ich rozpuszczalności w lipidach.

Dopuszczalne stężenia rtęci w ściekach w krajach Europejskiej Wspólnoty są ustalone na poziomie $50 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, a w wodzie pitnej $1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, przy czym rtęć i kadm zostały zakwalifikowane do I grupy substancji szkodliwych i należy się liczyć z dalszym obniżeniem tych progowych wartości stężeń rtęci (2).

Współcześnie stosowane metody usuwania rtęci ze ścieków takie jak: elektroliza, strącanie, elektrochemiczna redukcja, wymiana jonowa, adsorpcja są w wielu przypadkach nieefektywne lub nieekonomiczne (3, 4). Stąd też w ostatnich latach obserwuje się poszukiwania nowych metod usuwania rtęci ze ścieków zwłaszcza z wykorzystaniem mikroorganizmów, czy ogólnie biomasy (3 - 7). W pobliżu instalacji emitujących rtęć np. w zakładach produkcji chloru, baterii itp., znaleziono dzikie szczepy bakterii wykazujących wyjątkową odporność względem wysokich stężeń rtęci i zdolność jej akumulacji (8). Konieczne jest rozróżnienie pomiędzy pasywną i aktywną sorpcją metali ciężkich. Podczas pasywnej biosorpcji mamy do czynienia najczęściej z adsorpcją fizyczną, tworzeniem kompleksów i wymianą jonową pomiędzy jonami metali ciężkich a jonami H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ze ściany komórkowej, przy czym do czynnych grup ściany komórkowej biorących udział w tych procesach należą grupy karboksylowe, tiolowe, tioeterowe, hydroksylowe itp.

Aktywną biosorpcję metali ciężkich zwaną inaczej biotransformacją można zaliczyć do chemosorpcji, połączonej z aktywnym transportem przez błonę

¹ Katedra Podstaw Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź.

² Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig.

cytoplazmatyczną i biochemicznymi przemianami Hg(II) do mniej toksycznej postaci Hg(0). Aktywna biosorpcja jest, w przeciwieństwie do pasywnej, zależna od metabolizmu komórki. Żywe organizmy potrzebują źródła węgla i energii do biotransformacji i akumulacji rtęci.

Procesy detoksykacji rtęci mogą zachodzić poprzez strącanie siarczków rtęci na zewnętrznej powierzchni komórki, jak to ma miejsce w przypadku producenta H₂S *Desulfovibrio desulfuricans* (9) lub w wyniku enzymatycznych reakcji oksydacyjno-redukcyjnych (10). Tę odporność niektórych szczepów bakterii na obecność jonów rtęci w wysokich stężeniach np. 5 mg HgCl₂/dm³ (10) tłumaczy się redukcją Hg(II) do Hg(0), katalizowaną przez wewnątrzkomórkową cytoplazmatyczną reduktazę rtęciową. Szczepy bakterii odpornych na rtęć wyizolowano z naturalnych szczepów żyjących w okolicach o podwyższonym poziomie stężenia rtęci pochodzenia antropogenne (10 – 12). Stosując immobilizowane komórki drożdży *Sacharomyces cerevisiae* 211 jako źródło węgla i energii dla wzrostu bakterii spośród kilkudziesięciu mieszanych populacji wyizolowano i zidentyfikowano w GBF i DSM (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*) w Braunschweigu, RFN kilkanaście szczepów tolerujących rtęć w stężeniach wyższych od 10 ppm, np. *Aeromonas hydrophila*, *Xantomonas maltophilia* i in. (12). W szczepach tych zidentyfikowano geny odpowiadające za odporność względem rtęci i metodami inżynierii genetycznej wprowadzono je do chromosomu *Pseudomonas putida* KT2442 (13). Spośród trzydziestu pochodnych *Ps. putida* KT2442 metodą skriningu wybrano do dalszych prac utylitarnych najbardziej aktywne, a jednocześnie genetycznie stabilne mutanty, charakteryzujące się konstytutywną ekspresją reduktazy rtęciowej.

Celem pracy było sprawdzenie możliwości wykorzystania tych aktywnych szczepów do usuwania rtęci z wodnych roztworów w skali laboratoryjnej, w dwóch typach reaktorów: ze złożem stałym lub fluidalnym.

2. Materiały i metody

Roztwory wodne przyrządzano ze zdemineralizowanej wody. Jako źródła rtęci używano chlorek rtęci cz.d.a., a do sporządzania roztworów buforowych stosowano kwas piperazino-1,4-bis(2 etanosulfonowy) (bufor PIPES), który nie tworzy żadnych kompleksów z metalami. Zastosowano dwie metody unieruchamiania wybranych szczepów bakterii:

1) osadzanie powierzchniowe na porowatych nośnikach, których rodzaje i właściwości zamieszczono w tab. 1, bądź

2) inkludowanie w strukturę kriożelu alkoholu poliwinylowego (PVA) metodą Vorlopa (14, 15), polegającą na żelowaniu zhomogenizowanych wodnych roztworów PVA i biomasy w wyniku wymrożenia w ciekłym azocie.

Do badań akumulacji rtęci w złożu stałym użyto szczepu *A. hydrophila* immobilizowanego powierzchniowo na nośnikach porowatych, natomiast do badań biotransformacji w reaktorze fluidalnym zastosowano genetycznie zmo-

dyfikowany szczep *Ps. putida* KT2442::mer73 równomiernie zdyspergowany w żelu PVA, o kształcie kulek o średnicy 2,6 mm.

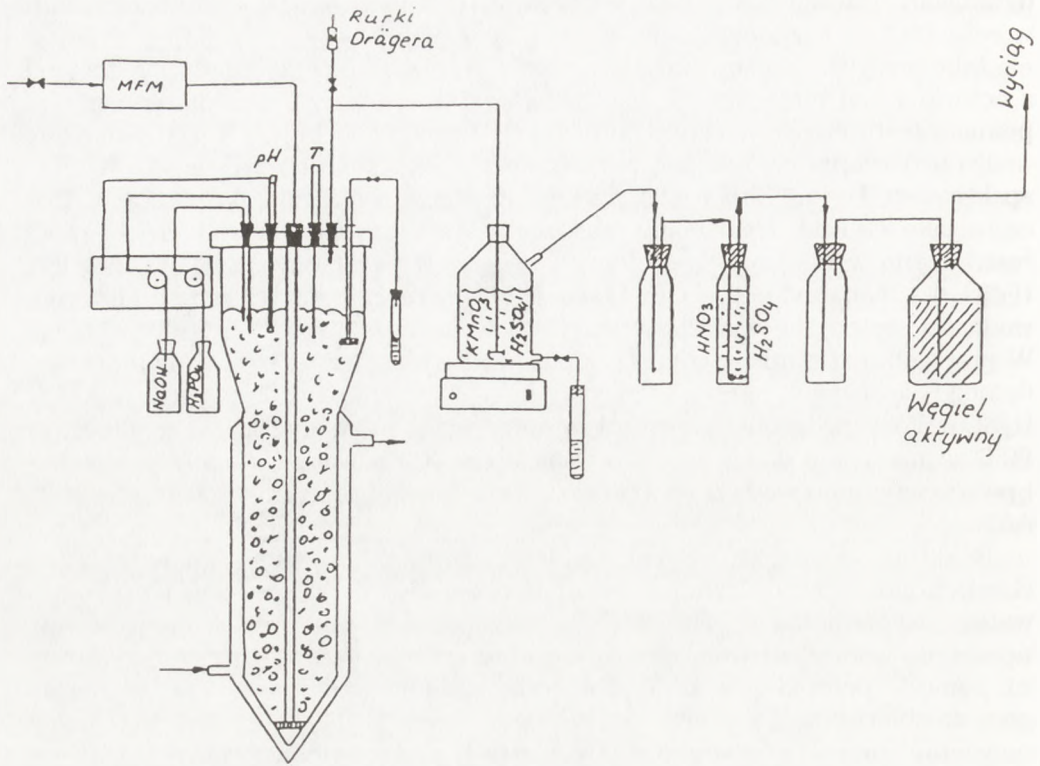
Jako pożywki stosowano tzw. media minimalne, składające się głównie z octanu i soli mineralnych. Zawartość octanu oznaczano fotometrycznie za pomocą testu enzymatycznego nr 148261 firmy Boehringer, Mannheim, RFN.

Do oznaczania rtęci stosowano atomową spektrometrię absorpcyjną (AAS) — spektrometr Perkin Elmer 2100, z wykorzystaniem techniki zimnych par, przy czym jako czynnik redukcyjny stosowano 0,2% roztwór NaBH_4 . Próbkę ciekłą roztwarzano w mieszaninie stężonych kwasów $14 \text{ mol/dm}^3 \text{ HNO}_3$, $9 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ i $1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ w temperaturze 80°C i rozcieńczano zdemineralizowaną wodą do stężeń Hg w zakresie $20 - 100 \mu\text{g/dm}^3$ (liniowy zakres absorbancji). W przypadku badania szybkości odparowania metalicznej rtęci z reaktora fluidalnego stosowano płuczki z roztworem $0,2 \text{ mol/dm}^3 \text{ KMnO}_4$ i $9 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$. Pobrane próbki cieczy ogrzewano przez kilka godzin w temperaturze 80°C , a następnie dodawano określoną objętość roztworu $0,4 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaNO}_2$ i po rozcieńczeniu wodą do podanego zakresu stężeń rtęci analizowano techniką AAS.

Reaktory ze złożem stałym stanowiły termostатовane szklane kolumny chromatograficzne o średnicy wewnętrznej 1,6 cm i 10 cm wysokości porowatego wypełnienia z naniesionym szczepem *A. hydrophila*. Przygotowany uprzednio wodny roztwór HgCl_2 o stężeniu od 0 do 10 mg/dm^3 wprowadzano za pomocą pompki perystaltycznej do dolnej części kolumny, a odbierano górą do zbiornika z roztworem stężonych kwasów HNO_3 i H_2SO_4 . Objętościowe natężenie przepływu wodnych roztworów zmieniano w zakresie $40 - 80 \text{ cm}^3/\text{h}$, co odpowiadało $2 - 4 \text{ m}^3/\text{m}^3$ złoża/h. Eksperymenty te prowadzono w sposób ciągły, w temperaturze 20°C i przy $\text{pH} = 7$ w warunkach sterylnych.

Badania biotransformacji rtęci w reaktorze fluidalnym prowadzono w reżimie półprzepływowym, napełniając go okresowo wodnym roztworem HgCl_2 z minimalną pożywką i w sposób ciągły przepuszczając powietrze — czynnik fluidyzujący złożę wolnych lub inkludowanych w żelu bakterii *Ps. putida*, a jednocześnie desorbujący pary rtęci na zewnątrz reaktora do płuczek oksydacyjnych z roztworami KMnO_4 i stężonych kwasów. Średnio ładowano do reaktora około 250 g wilgotnej masy żelu PVA zawierającego $40 - 50 \text{ g}$ biomasy, w tym $8 - 10 \text{ g}$ suchej masy bakterii. Natężenie przepływu powietrza nie przekraczało $5 \text{ dm}^3/\text{min}$ w warunkach normalnych, pH było automatycznie regulowane na poziomie 7,0 za pomocą roztworów $3 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_3\text{PO}_4$ i NaOH , a temperatura wynosiła 30°C . Schemat stanowiska doświadczalnego przedstawiono na rys. 1.

Jako reaktor zastosowano $1,5 \text{ dm}^3$ fermentor firmy Bioengineering AG, wymieniając metalową pokrywę reaktora na szklaną i dystrybutor gazu na szklany spiek aby uniknąć ewentualnych strat rtęci w wyniku tworzenia się amalgamatów. Proces biotransformacji rozpoczynano ($t=0$) przez wstrzyknięcie 6 cm^3 roztworu HgCl_2 o stężeniu 1000 ppm, co odpowiada początkowemu stężeniu 6 mg/dm^3 , a przebieg reakcji śledzono pobierając w określonych odstępach czasu próbki cieczy, żelu lub biomasy, gazu i roztworu utleniają-

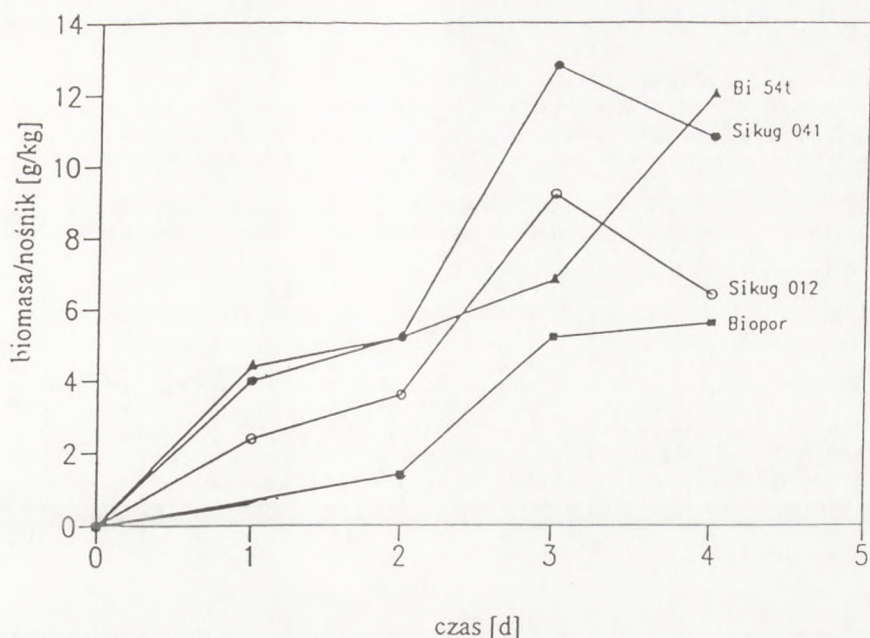


Rys. 1. Schemat stanowiska doświadczalnego.

cego z płuczki. Chwilową zawartość par rtęci w gazie oznaczano dodatkowo (oprócz techniki AAS) za pomocą rurek Drägera.

3. Wyniki i dyskusja

Do powierzchniowego unieruchamiania szczepów *A. hydrophila* zastosowano porowate nośniki zestawione w tab. 1. Wzrost zaadsorbowanej biomasy w czasie przedstawiono na rys. 2. Z rysunku wynika, że najwięcej biomasy zostało zaadsorbowane na najmniejszych cząstkach Siranu o średnicy 0,4 – 1 mm, tj. 11 g/kg nośnika i na Bi 54 t – 12 g/kg, gdy tymczasem na nośniku Biopor czy Siran o średnicy 1 – 2 mm zaadsorbowana biomasa osiągnęła zaledwie wartości 6 g/kg nośnika. Porównując te wartości z danymi literaturowymi dotyczącymi unieruchamiania *Zymomonas mobilis* – 32 g/kg nośnika Siran (16) można przypuszczać, że w naszym przypadku utworzyła się jedynie pojedyncza warstwa bakterii, gdy te znaczne ilości zaadsorbowanych mikroorganizmów odpowiadają 5 warstwom. Jednakże celem tej pracy nie było



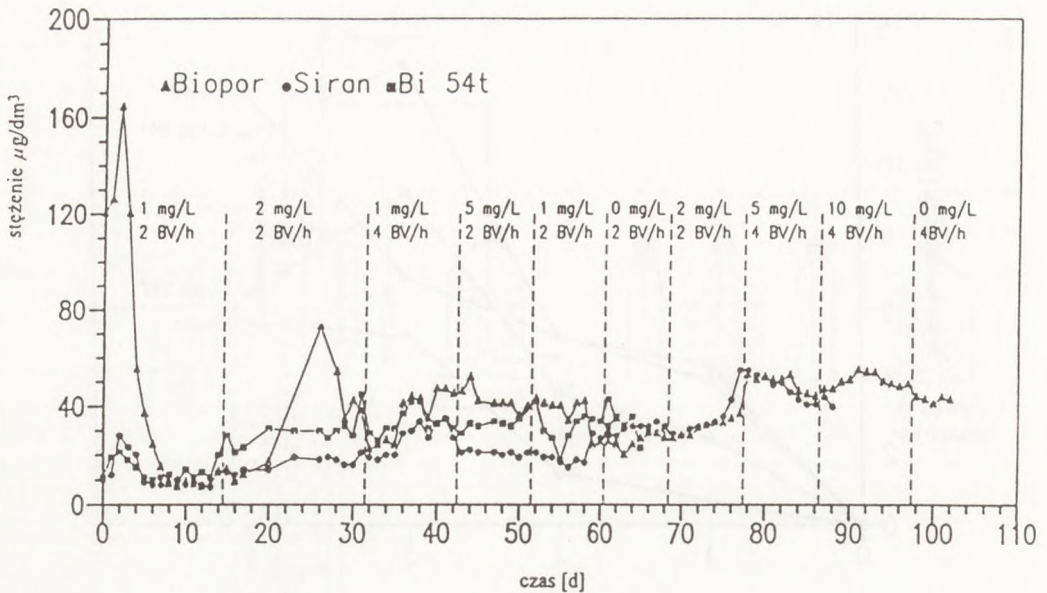
Rys. 2. Dynamika osadzania się biomasy na nośnikach porowatych.

osiągnięcie maksymalnie możliwych stężeń biomasy a uzyskanie enzymatycznie aktywnej powierzchni nośnika.

TABELA 1
WŁAŚCIWOŚCI POROWATYCH NOŚNIKÓW

Nazwa	Producent	Średnica cząstki [mm]	Średnica porów [μm]	Porowatość [%]	Skład
Siran	Schott, Mainz	0,4 - 1,0	<120	55 - 60	SiO ₂
Siran	Schott, Mainz	1,0 - 2,0	<120	55 - 60	SiO ₂
Bi 54t	Dr. Feurefest, Bochum	1,0 - 1,8	< 50	75	Al ₂ O ₃
Biopor	Schumacher, Crailsheim	0,5 - 10	10 - 200	<60	silikat

O aktywności unieruchomionych mikroorganizmów świadczy wykres zależności stężenia Hg na wylocie z reaktora w czasie, co przedstawia rys. 3. Ilustruje on także stężenie wlotowe rtęci i objętościowe natężenie przepływu



Rys. 3. Zmiana stężenia Hg w czasie na wylocie z reaktora ze złożem stałym bakterii *A. hydrophila* zaadsorbowanych na różnych nośnikach porowatych.

lub dokładniej objętościowe obciążenie jednostki złoża w ciągu godziny, utrzymywane na stałym poziomie w ciągu określonych odstępów czasowych. Interesujące jest, że podwojenie obciążenia złoża z 2 do 4 m³/m³ złoża/h nie ma większego wpływu na stężenie wylotowe. Natomiast daje się zaobserwować stały powolny wzrost stężenia Hg w strumieniu wylotowym do 55 µg/dm³. Rozpuszczalność metalicznej rtęci w wodzie w temperaturze pokojowej wynosi 50 µg/dm³(2), co odpowiadałoby znalezionej wartości stężenia Hg w strumieniu wylotowym.

Oznaczenia stężenia octanów na wylocie z reaktorów wykazywały około 80% przereagowania w stosunku do strumienia wlotowego.

Podczas wizualnej obserwacji nieruchomego złoża zauważono stopniowy wzrost zabarwienia nośnika na matowy, czarny kolor, poczynając od wlotu do kolumny. Po miesiącu można było zaobserwować znaczny wzrost biomasy w tym rejonie — powstanie szlamu, w którym pod mikroskopem stwierdzono obecność wyraźnych aglomeratów biomasy i kuleczek metalicznej rtęci. To powstanie szlamu doprowadziło w końcu do zastopowania przepływu i przerwania eksperymentu.

Każde ze złożeń po zakończeniu eksperymentu zostało zanalizowane na zawartość zakumulowanej rtęci. Wyniki tych analiz przedstawiono w tab. 2. Przy czym należy stwierdzić, że przeważająca część metalicznej rtęci zakumulowana została w części wlotowej złoża, w której zaobserwowano największy wzrost biomasy. Aby temu zapobiec należałoby ograniczyć źródła azotu

lub fosforu w pożywcę, ale mimo to nie uniknione jest zatrzymanie reaktora ze złożem stałym w celu regeneracji złoża, np. przez oddestylowanie rtęci.

TABELA 2
BILANS RTĘCI W KOLUMNACH ZE ZŁOŻEM STAŁYM

Nośnik	Czas [d]	Masa rtęci [mg]			Bilans [%]
		wlot	złoże	wylot	
Siran	88	321,4	305,7	2,6	96
Bi 54t	68	118,3	108,3	1,8	93
Biopor	103	439,2	454,8	4,2	104

Wady tej nie posiada reaktor fluidalny, w którym przeprowadzono wstępne pomiary biotransformacji rtęci Hg(II) do Hg(0) z jednoczesną desorpcją rtęci z wodnego środowiska reakcji do fazy gazowej. W reaktorze tym przeprowadzono dwa rodzaje eksperymentów z udziałem:

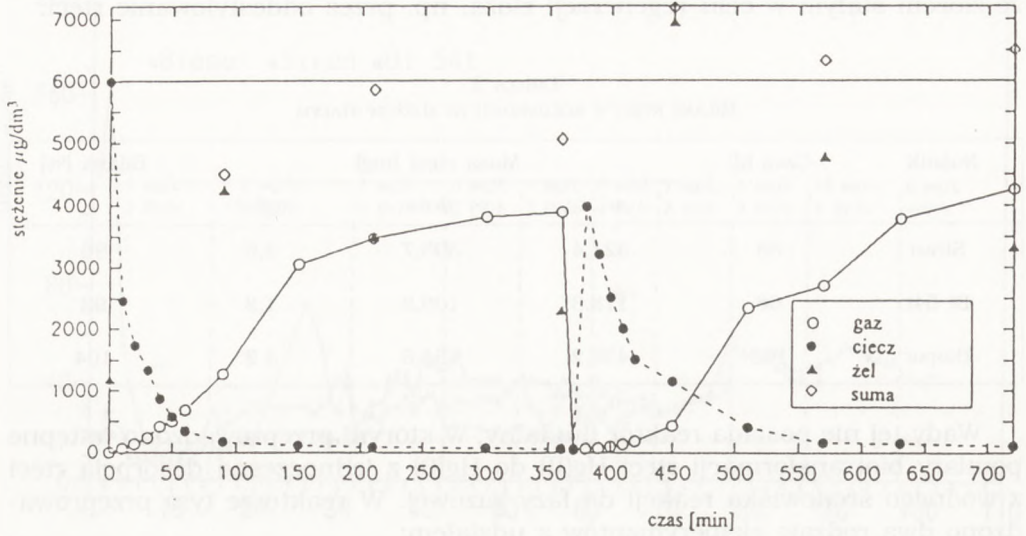
1) unieruchomionych w polimerowym (PVA) żelu bakterii *Ps. putida* KT2442::mer73,

2) tych samych bakterii, ale w zawiesinie.

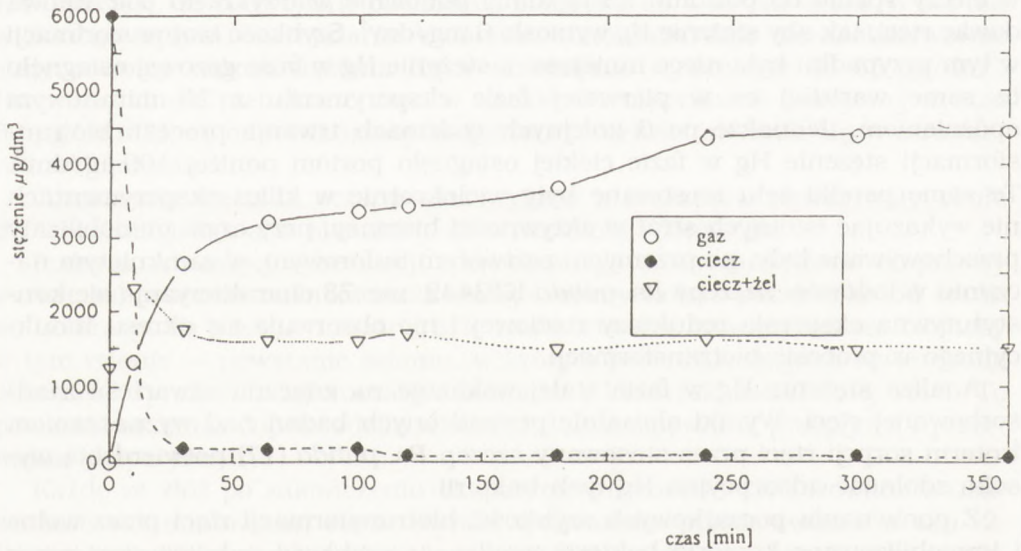
Przebiegi zmian stężenia Hg w poszczególnych fazach (gazowej, ciekłej i stałej) w czasie, odpowiednio dla unieruchomionych i wolnych bakterii przedstawiono na rys. 4 i 5. Na rys. 4 przedstawiono eksperyment, który był przeprowadzony w ten sposób, że po 6 godzinach reakcji, gdy stężenie Hg w cieczy spadło do poziomu $55 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, ponownie wstrzyknięto początkową dawkę rtęci, tak aby stężenie Hg wyniosło $6 \text{mg}/\text{dm}^3$. Szybkość biotransformacji w tym przypadku była nieco mniejsza, a stężenie Hg w fazie gazowej osiągnęło te same wartości co w pierwszej fazie eksperymentu z 20 minutowym opóźnieniem. Jednakże po 6 kolejnych godzinach trwania procesu biotransformacji stężenie Hg w fazie ciekłej osiągnęło poziom poniżej $100 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Te same perełki żelu stosowane były wielokrotnie w kilku eksperymentach nie wykazując istotnych strat w aktywności biomasy, przy czym immobilizaty przechowywane były, po przemyciu roztworem buforowym, w zamkniętym naczyniu w lodówce. Szczepy *Ps. putida* KT2442::mer73 charakteryzują się konstytutywną ekspresją reduktazy rtęciowej i nie obserwuje się okresu indukcyjnego w procesie biotransformacji.

Analiza stężenia Hg w fazie stałej wskazuje na znaczną zawartość zaadsorbowanej rtęci. Wyniki aktualnie prowadzonych badań nad wyznaczeniem izoterm sorpcji rtęci przez stosowany szczep *Ps. putida* (17) potwierdzają wysoką zdolność adsorpcyjną Hg tych bakterii.

Z porównania początkowych szybkości biotransformacji rtęci przez wolne i immobilizowane komórki bakterii wynika, że szybkość redukcji rtęci przez unieruchomione bakterie (r_{imm}) jest 20 – 25 razy mniejsza od szybkości redukcji dla swobodnych bakterii (r_{fre}). Wartość stosunku $r_{\text{imm}}/r_{\text{fre}} = 0,04 - 0,05$



Rys. 4. Rozkład stężenia Hg w czasie dla poszczególnych faz reaktora fluidalnego z zastosowaniem unieruchomionych bakterii *Ps. putida* KT2442.



Rys. 5. Zmiana stężenia Hg w czasie w reaktorze fluidalnym z zastosowaniem swobodnych bakterii *Ps. putida* KT2442 w zawiesinie.

znanego w reakcjach katalitycznych jako współczynnik efektywności katalizatora świadczy o znacznym wpływie dyfuzji wewnętrznej na szybkość procesu. Biotransformacja rtęci przez *Ps. putida* KT2442::mer73 jest szybką reakcją przebiegającą w obszarze dyfuzyjnym, dlatego w celu zwiększenia szybkości procesu należy poszukiwać sposobów zmniejszenia oporów dyfuzyjnych.

Literatura

1. Clarkson T., (1978), Mercury Criteria Document, EPA USA.
2. Projahn H.-D., Pohl B., Steeg U., (1992), GIT Fachz. Lab., 2, 115 - 121.
3. Wilkinson S. C., Goulding K. H., Robinson P. K., (1990), J. Appl. Phycol., 2, 223 - 230.
4. Rohricht M., Weppen P., Deckwer W.-D., (1990), Chem. Ing. Tech., 62, 582 - 583.
5. Aksu Z., Kutsal T., (1987), Proc. 4th Europ. Cong. Biotech., 2, 80 - 83.
6. Kuyucak N., Volesky B., (1988), Biotech. Lett., 10, 137 - 142.
7. Wilkinson S. C., Goulding K. H., Robinson P. K., (1989), Biotech. Lett., 11, 861 - 864.
8. Thriene B., Hellwig A., (1985), Z. Ges. Hyg. Grenzgeb., 31, 109 - 111.
9. Wood J. M., Wang H.-K., (1985), Environ. Inorg. Chem., 487 - 512.
10. Baldi F., Olson G. J., Brinckman F. E., (1987), Geomicrobiol. J., 5, 1 - 16.
11. Hellwig A., Thriene B., (1986), Z. Ges. Hyg., Grenzgeb., 34, 36 - 40.
12. Frischmuth A., Weppen P., Deckwer W.-D., (1992), J. Biotechnol., (w druku).
13. Brunke M., Horn J., Deckwer W.-D., Timmis K. N., (1992), Poster na DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Karlsruhe, Juni.
14. Vorlop K. D., Klein J., (1983), Enzyme Technology, ed. Lafferty R. M., Springer Verlag, 219 - 235.
15. Remmers P., Vorlop K. D., (1992), Poster na DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Karlsruhe, Juni.
16. Weuster D., Aivasidis A., Wandrey C., (1988), BioEngng., 3, Sonderdruck Nr. 60006 d.
17. Becker U., Ledakowicz S., Deckwer W.-D., (1993), J. Biotechnol., (w druku).

Mercury removal from aqueous solutions by biotransformation

Summary

Experimental investigations of biotransformation of mercury Hg(II) to Hg(0) in aqueous solution by immobilized bacteria were carried out in two types of lab scale bioreactors: in fixed and fluidized bed. An isolated and identified natural strain of *Aeromonas hydrophila* was immobilized on the surfaces of porous carriers and employed in mercury removal from liquid phase in the fixed bed reactor. For mercury biotransformation in the fluidized bed a genetically modified strain of *Pseudomonas putida* KT2442::mer73 entrapped in PVA gel beads was used. The investigations reveal that mercury biotransformation is a fast process controlled by diffusion. The most promising way of mercury removal from waste-water is employment of fluidized bed of immobilized bacteria, because of continuous mercury volatilization and possible recovery of this metal.

key words:

mercury removal, biotransformation, environmental biotechnology, bioprocess engineering, fluidized and fixed bed bioreactor, wastewater treatment.

Adres dla korespondencji:

Stanisław Ledakowicz, Katedra Podstaw Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 175, 90-924 Łódź.