

**Małgorzata KOWALSKA, Jolanta BOHDZIEWICZ**

*Instytut Inżynierii Wody i Ścieków  
Politechnika Śląska*

## **USUWANIE KWASÓW HALOGENOOCETOWYCH Z WODY W PROCESIE ULTRAFILTRACYJNEJ BIODEGRADACJI Z WYKORZYSTANIEM ENZYMATYCZNYCH KAPILARNYCH MEMBRAN POLIAMIDOWYCH**

### **THE REMOVAL OF HALOACETIC ACIDS FROM WATER BY MEANS OF ULTRAFILTRATION BIODEGRADATION USING POLYAMIDE CAPILLARY MEMBRANES**

*Haloacetic acids (HAA) are produced mainly during chlorination of water containing their precursors. According to US EPA regulations the total concentration of five HAA (monochloro-, dichloro-, trichloro-, monobromo- and dibromoacetic acid) must not exceed 60 mg/m<sup>3</sup>. However, it is planned to reduce the permissible concentration of HAA in water up to 30 mg/m<sup>3</sup> according to their cancerogenic effect on humans and animals. The article presents results obtained during the studies of removal of HAA from water with ultrafiltration biodegradation process. Membranes with enzymes immobilized on their surface are applied in the process which is operated in the room temperature and characterized with low energy consumption and exploitation costs. Such a water treatment solution enables both, the decrease of HAA concentration to the permissible value and polishing of the treated water via ultrafiltration. The studies were carried out in the reactor equipped with polyamide capillary ultrafiltration membranes on the surface of which enzymes decaying haloacetic acids were immobilized. Those enzymes were isolated from bacterial strains separated from the activated sludge mixture adapted for HAA degradation. The dominant strains in bacteria populations were: Acinetobacter, Arthobacter, Pseudomonas and Bacillus. The feed introduced to the treatment process was the simulated water solution of five haloacetic acids (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA) in which concentration of every acid was equal to 1 mg/dm<sup>3</sup>. Membranes separation area was equal to 47 cm<sup>2</sup>. During the filtration of acids solution through enzymatic membranes the dependence of volumetric permeate flux on transmembrane pressure was determined. Additionally, basing on the concentration of xenobiotics in ultrafiltration process streams the degree of degradation of HAA was determined. Obtained results allowed to establish optimal parameters of ultrafiltration biodegradation process i.e. pressure – 0.075 MPa and linear feed flow rate – 0.75 m/s. Such operation conditions enabled the highest process capacity and the most effective removal of HAA. After 3 hours of the process run the total removal of monochloroacetic acid and monobromoacetic acid was obtained and in the next hour the rest of investigated acids was decayed. The capacity of the process was constantly monitored and no change of volumetric permeate flux was observed.*

## 1. Wprowadzenie

Kwasy halogenooctowe (HAA) są po trihalometanach (THM) drugą grupą ubocznych produktów dezynfekcji wody, istotną z punktu widzenia zdrowotnych walorów wody do picia. Powstają one w wyniku przemian zachodzących pod wpływem działania chloru na związki organiczne występujące w wodzie, określane prekursorami HAA (głównie substancji humusowych).

Wśród powstających w procesie dezynfekcji wody kwasów halogenooctowych wyróżnić można: kwas chlorooctowy  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$  (MCAA), bromooctowy  $\text{CH}_2\text{BrCOOH}$  (MBAA), dichlorooctowy  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$  (DCAA), trichlorooctowy ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$  – TCAA), dibromooctowy ( $\text{CHBr}_2\text{COOH}$  – DBAA) i inne.

Na skutek prowadzonych badań dowiedziono, że występujące w wodzie przeznaczonej do picia kwasy halogenooctowe są szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Niektóre z nich, takie jak kwas dichlorooctowy i trichlorooctowy uznane zostały za rakotwórcze. Stwierdzono, że kwas dichlorooctowy powoduje neuropatię, zmniejszenie masy ciała oraz powstawanie nowotworów wątroby [4, 8, 10, 17].

W związku z tym, w wielu krajach wprowadza się systematyczne pomiary zawartości kwasów halogenooctowych w wodzie do picia, podczas trwania procesu jej uzdatniania oraz wprowadza się normy limitujące dopuszczalne stężenie HAA w wodzie pitnej.

Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (USEPA) obecnie ustanowiła dopuszczalną wartość stężenia dla sumy pięciu kwasów HAA, tj. kwasów monochlorooctowego, dichlorooctowego, trichlorooctowego, monobromooctowego i dibromooctowego jako  $60 \text{ mg/m}^3$ . Przewiduje się jednak, że w przyszłości nastąpi obniżenie tej wartości do  $30 \text{ mg/m}^3$ , ze względu na zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt substancjami rakotwórczymi, za które uznano HAA.

Wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) określają zalecane dopuszczalne stężenia w wodzie pitnej kwasu dichlorooctowego do  $50 \text{ mg/m}^3$  i kwasu trichlorooctowego do  $100 \text{ mg/m}^3$  [14].

W polskich wymaganiach stawianych wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi, kwasy halogenooctowe obecnie nie są uwzględnione, choć jeszcze w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie warunków jakim powinna odpowiadać woda do picia i na potrzeby gospodarcze (Dz.U. 2007 nr 61 poz. 417), ograniczono stężenie kwasu monochlorooctowego do  $30 \text{ mg/m}^3$  [12].

Na podstawie wyników badań zawartości kwasów HAA w wodzie Jeziora Zegrzyńskiego, w procesie oczyszczania w Wodociągu Północnym oraz w wodzie pitnej w Warszawie, dowiedziono że zmiany procesu oczyszczania mogą spowodować zmniejszenie ilości powstających HAA. Stwierdzono, że istnieje zależność powstawania kwasów halogenooctowych od stężeń ich organicznych prekursorów. Zaobserwowano również dużą korelację pomiędzy ilością powstających HAA, a temperaturą wody. W okresie zimy, w niskich temperaturach stężenie kwasów halogenooctowych było bardzo małe, natomiast duże stężenia HAA wystąpiły w wysokich temperaturach wody (w miesiącach letnich).

Zaobserwowano również dużą zgodność między stężeniami kwasów halogenooctowych a stężeniami trihalometanów. Świadczy to o istnieniu tych samych powodów powstawania THM i HAA. Stwierdzono również, iż gotowanie wody nie pozwala na usunięcie kwasów halogenooctowych w tak wysokim stopniu, jak w przypadku trihalometanów.

Obecnie obserwuje się ogólnoswiatową tendencję do eliminowania chloru z procesów uzdatniania wody i zastępowania go ozonem lub dwutlenkiem chloru, co znacznie zmniejsza ilość powstających HAA [1, 8, 13].

Zgodnie z terminologią Europejskiego Towarzystwa Membranowego z roku 1984 „membrana odgrywa rolę selektywnej bariery w transporcie masy, a separacja zostaje osiągnięta dzięki różnicy w szybkości transportu oddzielanych substancji.” Zateżanie, oczyszczanie czy frakcjonowanie to możliwości, które dają procesy wykorzystujące techniki membranowe. Podczas separacji na membranach, filtrowaniu poddawane są głównie ciecze o dużej zawartości składników i różnym stopniu dyspersji. Filtracja surowca (nadawy) prowadzi do powstania strumienia permeatu (odcieku) złożonego z wody i substancji przenikających przez membranę oraz retentatu (koncentratu), którego strumień zawiera składniki tworzące permeat i te zatrzymane przez membranę.

Jedną z ważniejszych zalet technik membranowych jest małe zużycie energii, które wynosi od połowy do jednej trzeciej części energii zużytej w metodzie destylacyjnej. Instalacje oparte na ultrafiltracji czy odwróconej osmozie wyróżnia prostota konstrukcji oraz łatwość obsługi, dodatkowo cały proces oczyszczania przy pomocy membran może być zautomatyzowany, a obsługa ograniczona do kontroli pomp i ciśnienia membran oraz stanu powierzchni membran. Techniki membranowe jako metody separacji znajdują zastosowanie w technologiach oczyszczania odpadów produkcyjnych, przyczyniają się do recykulacji surowców oraz wprowadzania czystych technologii, dodatkowo nie wymagają dawkowania chemikaliów, oraz nie powodują transformacji zanieczyszczeń. Woda oczyszczona w procesach membranowych może być zwracana z powrotem do produkcji.

Podsumowując, do głównych zalet procesów membranowych można zaliczyć:

- niskie zużycie energii,
- brak wymogów dawkowania chemikaliów,
- prowadzenie procesu w łagodnych warunkach środowiskowych,
- ciągły sposób separacji,
- możliwość tworzenia tzw. procesów hybrydowych łączących procesy membranowe z innymi procesami jednostkowymi,
- możliwość wprowadzania systemu modułowego, ułatwiającego powiększanie skali,
- możliwość stosowania ulepszeń własności rozdzielczych membran podczas eksploatacji systemu.

Realizacja procesów membranowych wymaga odpowiednich konstrukcji aparaturowych. Ważne jest, by podczas prowadzenia procesu uzyskać możliwie duży i stabilny w czasie strumień permeatu o niskiej zawartości składnika oddzielanego przez membranę.

Niestety, stosunkowo często pojawiają się trudności techniczne podczas stosowania procesów membranowych. Zalicza się do nich:

- polaryzację stężeniową,
- fouling i scaling membran,
- ograniczoną wytrzymałość chemiczną i termiczną membran (głównie polimerowych)
- ograniczoną żywotność i selektywność membran [3].

Jedną z nowatorskich metod usuwania kwasów halogenooctowych z wody jest proces biodegradacji prowadzony w reaktorze z enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. Pierwsze badania nad enzymatyczną degradacją kwasów halogenooctowych sięgają lat 50-tych XX wieku. Ze względu na duże możliwości zastosowań, badania te w dalszym ciągu rozwijają się dynamicznie i do chwili obecnej znaleziono wiele mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych, wytwarzających enzymy katalizujące proces degradacji HAA przebiegający według różnych mechanizmów.

Membrany enzymatyczne charakteryzują się zarówno właściwościami separacyjnymi jak i aktywnością katalityczną, na którą ma wpływ rodzaj, ilość i sposób unieruchomienia biokatalizatora. 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 niestety efekty niepożądane, takie jak zmniejszenie ich powinowactwa do substratu oraz obniżenie maksymalnej szybkości katalizowanej reakcji. Zjawiska te, wywoływane są najczęściej trudnościami sferycznymi w dotarciu substratu do centrum aktywnego białka. O wyborze sposobu immobilizacji decyduje najczęściej konieczność zachowania jak najwyższej aktywności katalitycznej enzymu.

Najważniejszymi z praktycznie stosowanych metod unieruchamiania białek są:

- adsorpcja na powierzchni nośnika polimerowego,
- kowalencyjne wiązanie z nośnikiem,
- zamykanie w porowatej strukturze membrany (inkluzja wewnątrz polimeru),
- kopolimeryzacja z nośnikiem białkowym
- przeprowadzanie ich w żel.

Ze względu na wielkocząsteczkowy charakter enzymów, jak również i niektórych substratów oraz konieczność prowadzenia immobilizacji i katalizowanych procesów biochemicznych w środowisku wodnym, nośniki stosowane do unieruchamiania biokatalizatorów powinny spełniać następujące warunki:

- być substancjami wielkocząsteczkowymi, względnie tworzyć z podłożem fazę stałą;
- charakteryzować się właściwościami hydrofilowym;
- posiadać dużą porowatość;
- mieć grupy chemicznie aktywne lub nadające się do aktywacji;
- wykazywać stabilność chemiczną oraz dużą wytrzymałość mechaniczną i termiczną;
- być nietoksyczne i odporne na biodegradację;
- nie powodować dezaktywacji enzymu;
- mieć niskie koszty uzyskania.

Dotychczas nie udało się jednak otrzymać nośnika, który spełniałby jednocześnie wszystkie te wymagania [9, 15, 16].

W membranowych reaktorach biokatalitycznych, praktyczne zastosowanie jako suporty do immobilizacji enzymów znajdują dotychczas najczęściej membrany otrzymywane na bazie polimerów. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem do tego celu membran nieorganicznych jako że są one szczególnie trwałymi i aktywnymi nośnikami do immobilizacji białek aktywnych, głównie za pomocą wiązań kowalencyjnych. Można jednak zaryzykować stwierdzenie, iż stosowanie kosztownego sposobu immobilizacji nietrwałego enzymu na wyjątkowo trwałej membranie jest mało ekonomiczne.

Membrany polimerowe stosowane do immobilizacji enzymów są wytwarzane w postaci różnych konfiguracji, a mianowicie jako:

- płaskie folie (arkusze i dyski), umieszczane w modułach płytowo - ramowych;
- w kształcie rur o średnicy  $> 10$  mm i długościach dochodzących niejednokrotnie do kilku metrów, pracujące w modułach rurowych;
- w postaci kapilar (średnica 0,5 - 10 mm), umieszczane w płaszczu cylindrycznym w formie pęków, tworzących moduły kapilarne.

Każda z wymienionych konfiguracji wykazuje szereg zalet i wad, a więc wybór właściwej powinien być dokonywany w oparciu o dokładną analizę przydatności oraz kosztów eksploatacyjnych i inwestycyjnych. Dodatkową rolę, odgrywa tu również gęstość upakowania membran. W modułach rurowych jest ona najmniejsza i osiąga wartość do  $360 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , w płytowo - ramowych  $500\text{-}800 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , natomiast w reaktorach z membranami kapilarnymi jest największa i wynosi do kilku tysięcy  $\text{m}^2/\text{m}^3$ . Stąd, w większości procesów biokatalitycznych najszersze zastosowanie znalazło to ostatnie rozwiązanie, chociaż reaktory z membranami płaskimi również są stosowane często, głównie z uwagi na prostą budowę i łatwość wymiany membran w modułach.

Znaczący wpływ na efektywność procesu katalitycznego zachodzącego w bioreaktorach membranowych ma rodzaj polimeru, z którego wytwarzana jest membrana. Decyduje on o sposobie unieruchamiania biokatalizatorów, powinowactwie materiału membrany i substancji występujących w filtrowanym roztworze, o jej własnościach hydrofilowych lub hydrofobowych, mających wpływ na grubość strefy reakcyjnej w membranie oraz szybkości zachodzącej reakcji biochemicznej.

Dzięki modyfikacji chemicznej i fizycznej można łatwo otrzymać z nośników (membran) polimerowych nowe polimery z grupami reaktywnymi, posiadające żadaną strukturę fizyczną. Przykładem takiej modyfikacji jest metoda O-alkilowania stosowana w prowadzonych badaniach [3, 5, 15, 16].

## 2. Cel i zakres pracy

Celem pracy było otrzymanie ultrafiltracyjnych, poliamidowych membran kapilarnych z zaimmobilizowanymi na ich powierzchni enzymami zaadoptowanymi do rozkładu kwasów halogenooctowych oraz określenie ich własności transportowo-separacyjnych pod kątem zastosowania do usuwania HAA z wody.

Membrany, będące nośnikami (suportami) w procesie immobilizacji, powinny pozwalać na trwałe wiązanie biokatalizatora, dając w efekcie membrany enzymatyczne, charakteryzujące się zarówno korzystnymi właściwościami separacyjnymi jak i aktywnością katalityczną, maksymalnie zbliżoną do aktywności enzymów w stanie natywnym. Ponadto, proces immobilizacji nie powinien pogarszać własności transportowych i wytrzymałościowych obojętnych suportów.

Zakres pracy obejmował:

- wyznaczenie własności transportowo-separacyjnych membran obojętnych;
- modyfikację chemiczną membran obojętnych;
- unieruchomienie enzymów na powierzchni zmodyfikowanych membran za pomocą wiązania kowalencyjnego;
- wyznaczenie własności transportowo-separacyjnych membran aktywnych;

- ocenę przydatności wytworzonych membran enzymatycznych w procesie ultrafiltracyjnej biodegradacji mieszaniny wybranych pięciu kwasów halogenooctowych (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA).

Proces ultrafiltracyjnej biodegradacji, oparty na membranach z unieruchomionymi białkami aktywnymi przebiega w temperaturze otoczenia, charakteryzuje się niską energochłonnością i niewielkimi kosztami eksploatacyjnymi. Pozwala na obniżenie stężenia substancji toksycznych w miejscu ich powstawania do wartości dopuszczalnych i umożliwia doczyszczanie uzdatnianej wody w procesie ultrafiltracji.

### 3. Aparatura i enzymy

Badania prowadzono z wykorzystaniem urządzenia Labscale™ TFF System, produkcji firmy Millipore, ze zbiornikiem o pojemności 500 cm<sup>3</sup>. Zastosowano moduł poliamidowych ultrafiltracyjnych membran kapilarnych o powierzchni 47 cm<sup>2</sup>.

Do izolacji frakcji enzymów rozkładających kwasy halogenooctowe 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 HAA.

Dominującymi w populacji rodzajami bakterii były: *Acinetobacte*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Bacillus*. Wszystkie szczepy użyte w badaniach adaptowano do degradacji 5 mg/dm<sup>3</sup> każdego z kwasów. Frakcje enzymatyczne były izolowane metodą Hagemanna [12].

### 4. Metodyka badań

Własności transportowo-separacyjne membran określano filtrując przez nie roztwór mieszaniny kwasów, jednocześnie wyznaczając zależności objętościowego strumienia permeatu ( $J_v$ ) od ciśnienia transmembranowego i liniowej prędkości przepływu nadawy, a w oparciu o obliczone stężenia ksenobiotyków w poszczególnych strumieniach ultrafiltracyjnych określano stopień biodegradacji HAA ( $B_d$ ). Nadawę w procesie biodegradacji stanowił wodny roztwór mieszaniny pięciu kwasów: monochlorooctowego (MCAA), dichlorooctowego (DCAA), trichlorooctowego (TCAA), monobromooctowego (MBAA) i dibromooctowego (DBAA) o stężeniu 1 mg/dm<sup>3</sup> każdego z nich. [8-9].

Własności transportowe membran obojętnych określano wyznaczając zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego. W tym celu filtrowano przez nie wodę dejonizowaną, stosując ciśnienie transmembranowe zmieniane w zakresie od 0,025 do 0,125 MPa. Objętościowy strumień permeatu ( $J_v$ ) obliczono ze wzoru:

$$J_v = \frac{V_v}{s \cdot t}$$

gdzie:  $J_v$  – objętościowy strumień permeatu [m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>×s]

$V_v$  – objętość permeatu [m<sup>3</sup>]

$s$  – powierzchnia membrany [m<sup>2</sup>]

$t$  – czas [s]

Własności separacyjne membran (obojętnych i enzymatycznych) określone zostały na podstawie wyników otrzymanych podczas testowania ich roztworem dekstranu oraz wodnego roztworu mieszaniny pięciu HAA. Wodny roztwór dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 (produkcji Zakładów Farmaceutycznych „Polfa” w Kutnie) i stężeniu 5 g/dm<sup>3</sup> filtrowano przy ciśnieniu 0,15 MPa oraz liniowej prędkości przepływu równej 0,5 m/s. 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. Współczynniki retencji dekstranu obliczano z zależności:

$$R = \left( 1 - \frac{C_p}{C_n} \right) \cdot 100\%$$

gdzie:  $C_p$  – stężenie składnika w permeacie,  
 $C_n$  – stężenie składnika w nadawie.

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% [2].

Własności transportowo-separacyjne membran enzymatycznych określano w ten sam sposób jak w przypadku membran obojętnych, wyznaczając wstępnie zależności objętościowego strumienia permeatu (dla wody dejonizowanej i roztworu mieszaniny kwasów) od ciśnienia transmembranowego zmieniającego się w zakresie 0,025 – 0,125 MPa. W oparciu o oznaczone stężenia ksenobiotyków w poszczególnych strumieniach ultrafiltracyjnych, dodatkowo obliczano stopień biodegradacji ( $B_d$ ) wszystkich kwasów zawartych w uzdatnianej wodzie zgodnie z równaniem:

$$B_d = \frac{1 - (C_p \cdot V_p + C_r \cdot V_r)}{C_n \cdot V_n} \cdot 100\%$$

gdzie:  $B_d$  – stopień biodegradacji ksenobiotyku [%],  
 $C_p$  – stężenie ksenobiotyku w permeacie [mol/dm<sup>3</sup>],  
 $C_n$  – stężenie ksenobiotyku w nadawie [mol/dm<sup>3</sup>],  
 $C_r$  – stężenie ksenobiotyku w retentacie [mol/dm<sup>3</sup>],  
 $V_p$  – objętość permeatu [dm<sup>3</sup>],  
 $V_n$  – objętość nadawy [dm<sup>3</sup>],  
 $V_r$  – objętość retentatu [dm<sup>3</sup>].

Wyznaczano również najkorzystniejsze parametry operacyjne procesu usuwania mieszaniny kwasów halogenooctowych w układzie zintegrowanym biodegradacja - ultrafiltracja, a mianowicie: ciśnienie transmembranowe i liniową prędkość przepływu nadawy przez membrany. Przy ich zastosowaniu wydajność procesu membranowego i efektywność usuwania z filtrowanej wody pięciu wybranych kwasów halogenooctowych były najwyższe.

W celu unieruchomienia białka aktywnego na powierzchni membran kapilarnych za pomocą trwałego wiązania kowalencyjnego, obojętne superty poddano modyfikacji chemicznej.

Jako miejsca wiążące enzymy z poliamidem wykorzystuje się przede wszystkim końcowe grupy funkcyjne łańcuchów polimerowych. Z tego względu, stosowane polimery nie powinny mieć zbyt dużej masy cząsteczkowej lub też ich łańcuchy należy poddawać częściowej degradacji w procesie aktywacji nośnika. Zgodnie z danymi literaturowymi chemiczną immobilizację enzymów na poliamidowych suportach prowadzi się trzema metodami:

- przez kowalencyjne wiązanie enzymów z poliamidem za pośrednictwem wiązań peptydowych,
- poprzez kowalencyjne wiązanie enzymu z poliamidem metodą O-alkilowania,
- przez kowalencyjne wiązanie enzymu z poliamidem metodą N-alkilowania.

Pierwsza metoda opiera się na trzech oddzielnych operacjach: częściowej depolimeryzacji poliamidu, aktywacji grup końcowych polimeru i reakcji enzymu ze zmodyfikowanym nośnikiem. Etap pierwszy realizuje się poprzez rozszczepienie łańcucha poliamidu za pomocą N,N-dimetylo-1,3-propanodiaminy lub przez poddanie poliamidu hydrolizie w kwasie chlorowodorowym. Uwolnione grupy aminowe i karboksylowe mogą być w dalszej kolejności aktywowane różnymi sposobami.

Metoda O-alkilowania pozwala na prowadzenie procesu immobilizacji bez uprzedniej depolimeryzacji poliamidu. Grupy aktywne są szczepione bezpośrednio na łańcuchu polimerowym, dzięki czemu nośnik nie ulega osłabieniu mechanicznemu. W tym celu poliamidy poddaje się działaniu czynników silnie alkilujących, co prowadzi do O-alkilacji niektórych wiązań peptydowych materiału polimerowego nośnika. Podczas początkowej O-alkilacji polimeru z solą trietyloksoniową tetrafluoroboranu, pierwszy produkt - sól imidowa poliamidu jest nietrwałym stanem przejściowym, który pozwala na bezpośrednią immobilizację białka, ale w większości przypadków nie prowadzi do otrzymania trwałych, aktywnych membran enzymatycznych. Częściej, wykorzystywany jest fakt, iż sól imidowa poliamidu reagując w warunkach bezwodnych z kwaśnym hydrazidem, daje stabilną pochodną hydrazydową poliamidu, która następnie aktywowana jest aldehydem glutarowym. Kolejny etap, to immobilizacja białka aktywnego, które przyłącza się do wolnej grupy funkcyjnej cząsteczki aldehydu.

Sposób wiązania enzymu z poliamidem metodą N-alkilowania, jest oparty na kontrolowanej kwaśnej hydrolizie poliamidu, prowadzącej do utworzenia par COOH-NH<sub>2</sub>- na powierzchni jego struktury, oraz ich zablokowaniu w reakcji czteroskładnikowej kondensacji (4CC). Otrzymuje się poliizonitrylo-poliamid, z bardzo aktywnym potrójnym wiązaniem N≡C, do którego przyłącza się enzym [14]. Podczas prowadzonych badań w celu trwałego związania komórek enzymów z powierzchnią membran i zapewnieniu długotrwałej aktywności katalitycznej membran obojętne suporty poddano procesowi O-alkilowania [16].

Immobilizację białek aktywnych na zmodyfikowanych chemicznie membranach obojętnych uzyskano poprzez dwukrotną filtrację przez nie 250 cm<sup>3</sup> wodnego roztworu kompleksu enzymów przy ciśnieniu 0,025 MPa oraz liniowej prędkości przepływu 0,5 m/s. Po zakończeniu procesu immobilizacji membrany dokładnie płukano wodą dejonizowaną w celu usunięcia cząsteczek nie związanych trwale z powierzchnią membran.

Aktywność membran enzymatycznych określano filtrując przez nie w temperaturze 298 K, w czasie 10 minut, roztwór mieszaniny kwasów o stężeniu 1 g/m<sup>3</sup>. Ciśnienie transmembranowe wynosiło 0,1 MPa, a liniowa prędkość przepływu nadawy – 0,5 m/s. Następnie w nadawie, permeacie i retentacie oznaczano stężenie kwasów i na tej podstawie określano ilość rozłożonego w tym czasie każdego z nich.



Stężenie białka aktywnego oznaczano kolorymetryczną metodą Bradforda, polegającą na barwnej reakcji białka z odczynnikiem Bio-Rad-Protein-Assay, natomiast stężenie kwasów halogenooctowych przy użyciu spektrofotometru UV VIS Carry 50 (Varian).

Oznaczenie kwasów halogenooctowych polega na zakwaszeniu próbki wody do  $\text{pH} < 2$ . Dzięki temu cofa się dysocjację kwasów, co umożliwia ich ekstrakcję do rozpuszczalnika organicznego (Liquid – Liquid Extraction – LLE) nie mieszającego się z wodą. Zwykle stosuje się to tego celu eter terbutylometylowy (MTBE). Ekstrakcję tak polarnych związków jakimi są kwasy halogenooctowe wspomaga się wysalaniem. Wyekstrahowane kwasy upochadnia się do estrów metylowych, które następnie rozdzielają się stosując techniki chromatografii gazowej wykorzystując detektor wychwyty elektronów na etapie detekcji. Granice oznaczalności dla tej techniki wynoszą zwykle ok.  $0,5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  z wyjątkiem kwasu monochlorooctowego dla którego ta granica wynosi ok.  $1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  [10, 11].

W niniejszej pracy, do przygotowania próbki wodnej do oznaczeń kwasów halogenooctowych zastosowano metodę US EPA 552.2 [14] a chromatografię GC-MS w analizie jakościowo-ilościowej ekstraktu.

W celu wydzielenia kwasów halogenooctowych do próbki wody wprowadzano  $1,5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ , 12 g stałego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i  $3 \text{ cm}^3$  eteru terbutylometylowego, a następnie intensywnie wytrząsano przez 5 minut w rozdzielaczu. Po rozdzieleniu frakcji organicznej pobierano  $2,5 \text{ cm}^3$  ekstraktu do szklanej probówki i dodawano  $1 \text{ cm}^3$  10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  w metanolu. Tak przygotowaną próbkę w celu upochodnienia zawartych w niej kwasów halogenooctowych inkubowano przez 30 minut w temperaturze  $50^\circ\text{C}$ . Po tym czasie, do roztworu dodawano  $4 \text{ cm}^3$  10% wodnego roztworu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i przenoszono ponownie do rozdzielacza. Po rozdzieleniu, warstwę organiczną poddawano analizie GC-MS.

Do oznaczeń wykorzystano chromatograf gazowy sprzężony z detektorem masowym (GC-MS, pułapka jonowa) model Saturn 2100 T, firmy Varian. Parametry oznaczenia chromatograficznego przedstawiono w tabeli 1. Analizę ilościową prowadzono w oparciu o metodę *FS* (*full scan*) w zakresie mas od 50 do 250 a.m.u.

Opracowana procedura umożliwia rozdział 5 składnikowej mieszaniny kwasów halogenooctowych i ich oznaczenie ilościowe w wodach na poziomie stężeń od  $15$  do  $30 \text{ mg}/\text{m}^3$  w zależności od związku.

Tab. 1. Parametry oznaczenia chromatograficznego GC – MS

Tab. 1. Parameters of GC-MS assays

	Program temperaturowy	GC
	Objętość nastrzyku Iniektor	$1 \mu\text{m}$ $210^\circ\text{C}$ , <i>splitless</i>
	Gaz Przepływ	hel $1,1 \text{ ml}/\text{min}$
MS	Jonizacja Energia jonizacji	EI $70 \text{ eV}$
	Temperatura źródła jonów	$200^\circ\text{C}$

## 5. Wyniki badań

Na efektywność procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji mają wpływ zarówno własności membrany enzymatycznej (aktywność enzymatyczna oraz charakterystyka transportowo-separacyjna), jak i parametry operacyjne ultrafiltracji. Należą do nich: czas kontaktu ksenobiotyku z powierzchnią aktywną membrany (czas trwania procesu), ciśnienie transmembranowe oraz liniowa prędkość przepływu filtrowanego medium.

Wyniki obrazujące ilość unieruchomionego białka oraz aktywność otrzymanych membran enzymatycznych przedstawiono w tabeli 2. Uzyskane wartości okazały się podobne do wyników uzyskanych podczas badań z wykorzystaniem membran poliakrylonitrylowych [7].

Tab. 2. Ilość związanego białka oraz aktywność membran enzymatycznych

Tab. 2. Enzymatic activity of the immobilized membrane

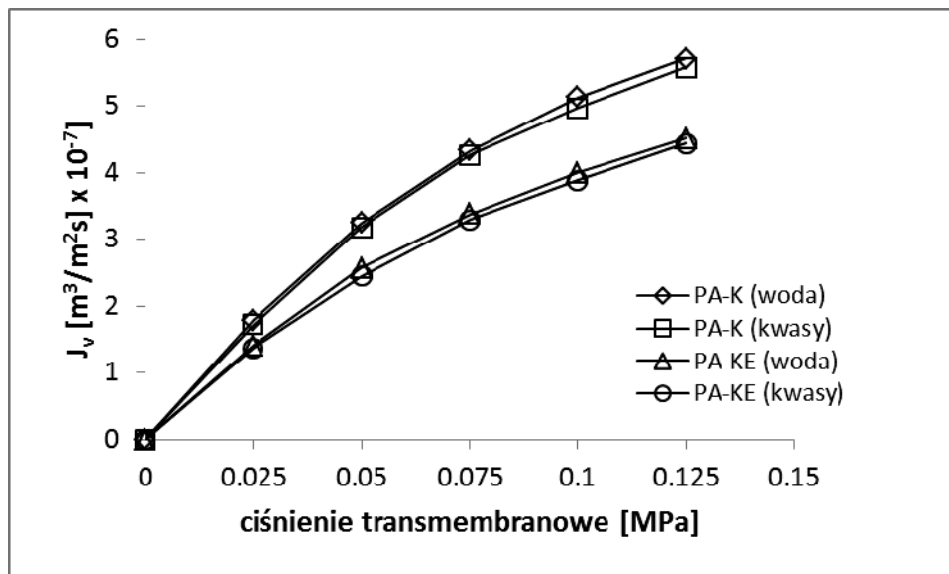
Ilość związanego białka [mg]	Aktywność membrany [mg kwasu /10min/1cm <sup>2</sup> pow. membrany] x 10 <sup>3</sup>				
	MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA
32,6	1,182	1,181	1,180	1,177	1,178

### 5.1. Własności transportowo - separacyjne membran obojętnych i enzymatycznych

Na rysunku 1 przedstawiono krzywe obrazujące zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego (dla liniowej prędkości przepływu nadawy,  $u = 0,5$  m/s) dla membran obojętnych i enzymatycznych, a w tabeli 3 równania opisujące wyznaczone zależności.

Zgodnie z oczekiwaniami (zarówno podczas filtracji wody dejonizowanej jak i roztworu kwasów halogenooctowych), wraz ze wzrostem ciśnienia transmembranowego wzrastała wartość objętościowego strumienia permeatu. W przypadku membran obojętnych od wartości  $1,79 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$  dla najniższego ciśnienia stosowanego podczas testacji równego  $0,025$  MPa do  $5,71 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$  dla ciśnienia najwyższego ( $0,125$  MPa). Objętościowe strumienie permeatu uzyskane dla membran enzymatycznych również rosły, od  $1,41 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$  dla  $p = 0,025$  MPa do  $4,51 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$  dla ciśnienia  $0,125$  MPa. W stosunku do wartości  $J_v$  uzyskanych dla membran obojętnych były o  $21,2$  % niższe dla  $0,025$  MPa i  $21,02$  % dla  $0,125$  MPa. Obniżenie własności transportowych membran enzymatycznych było spowodowane „przytkaniem” porów membran aldehydem glutarowym stosowanym podczas modyfikacji obojętnych suportów oraz cząsteczkami unieruchomionych enzymów.

Objętościowe strumienie permeatu uzyskane podczas testacji membran (zarówno obojętnych jak i enzymatycznych) roztworem kwasów halogenooctowych były niewiele niższe niż te otrzymane podczas filtracji wody dejonizowanej. W przypadku membran obojętnych poszczególne  $J_v$  uzyskane podczas filtracji mieszaniny pięciu kwasów halogenooctowych były o ok.  $1\%$  niższe, niż te uzyskane dla wody dejonizowanej (dla odpowiednich ciśnień transmembranowych). W przypadku membran enzymatycznych, wartości objętościowych strumieni permeatów otrzymane podczas filtracji wody zawierającej kwasy halogenooctowe były o ok.  $2$  % niższe niż  $J_v$  uzyskane dla odpowiednich ciśnień transmembranowych podczas filtracji wody dejonizowanej.



Rys. 1. Zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego dla membran obojętnych i enzymatycznych; nadawa: woda dejonizowana (roztwór kwasów halogenooctowych).

Fig. 1. The dependence of volumetric permeate flux on transmembrane pressure for the neutral and enzymatic membranes; feed water: deionized water/HAA solution

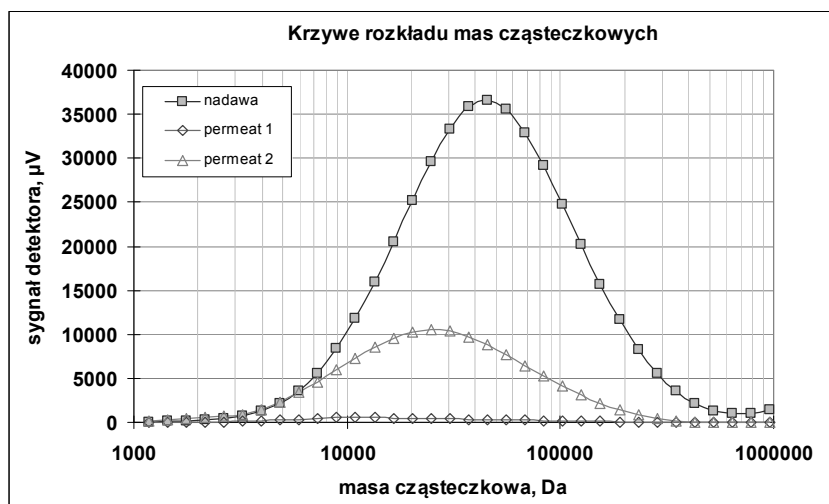
Tab. 3. Równania opisujące zależność objętościowego strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego dla membran obojętnych i enzymatycznych; nadawa: woda dejonizowana (roztwór kwasów halogenooctowych)

Tab. 3. The equations describing the volumetric permeate flux on transmembrane pressure for the neutral and enzymatic membranes; feed water: deionized water/HAA solution

Membrany	Funkcja $J_w=f(\Delta P)$ $J_w[\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}], \Delta P[\text{MPa}]$	Współczynnik korelacji	Przepuszczalność wody $L_w \cdot 10^{-4} [\text{m}^3/\text{m}^2\text{sMPa}]$ (dla 0,05 MPa)
PA-K (woda)	$J_v = 45,314(\Delta P) + 0,5362$	0,989	3,18
PA-K (kwasy)	$J_v = 44,263(\Delta P) + 0,5186$	0,987	2,42
PA-KE (woda)	$J_v = 35,577(\Delta P) + 0,4214$	0,991	3,16
PA-KE (kwasy)	$J_v = 34,937(\Delta P) + 0,3881$	0,989	2,38

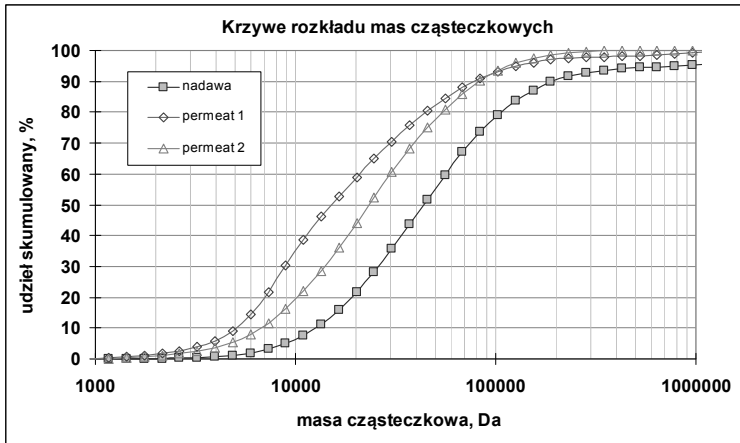
Własności separacyjne membran enzymatycznych PA-KE (w porównaniu z własnościami separacyjnymi membran obojętnych PA-K, stanowiących suport do otrzymania PA-KE) wyznaczono filtrując przez nie roztwór dekstranu o nominalnej masie cząsteczkowej 200 000 Da i stężeniu 5 g/dm<sup>3</sup> (ciśnienie - 0,025MPa oraz liniowa prędkość przepływu nadawy 0,5 m/s). Rozkład mas cząsteczkowych w nadawie oraz permeatach wskazuje, iż o właściwościach rozdzielczych membran enzymatycznych decyduje głównie tzw. membrana wtórna z białka aktywnego, unieruchomiona na obojętnym suporcie (rys. 2, 3, 4).

Analiza wyników przedstawionych na rysunkach 3 i 4 wykazała, iż membrana enzymatyczna PA-KE posiada własności separacyjne dużo lepsze od membrany obojętnej PA-K.



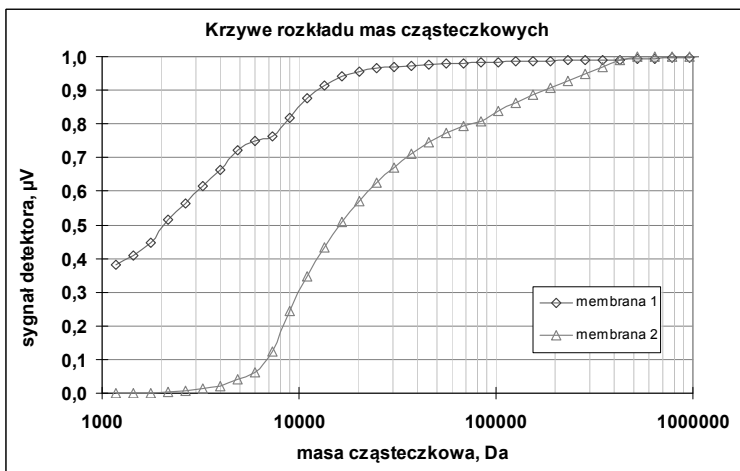
Rys.2. Krzywe rozkładu mas cząsteczkowych w nadawie i permeatach (1 - membrany PA-KE, 2 - membrany PA-K). Zależność wysokości chromatogramu od masy cząsteczkowej.

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



Rys.3. Krzywe rozkładu mas cząsteczkowych w nadawie i permeatach (1 - membrany PA-KE, 2 – membrany PA-K). Zależność skumulowanego udziału cząsteczek dekstranu od ich masy cząsteczkowej.

Fig. 3. The distribution curves of molecular weights of dextrane in the feed and permeates (1 – PA-KE membranes, 2 – PA-K membranes). The dependence of the cumulate fraction of dextrane particles on their molecular weight



Rys.4. Zależność współczynnika retencji od masy cząsteczkowej dekstranu (1 - membrany PA-KE, 2 – membrany PA-K). Zależność skumulowanego udziału cząsteczek dekstranu od ich masy cząsteczkowej.

Fig. 4. The dependence of the retention coefficient on dextrane molecular weight (1 - PA-KE membranes, 2 – PA-K membranes). The dependence of cumulated fraction of dextrane particles on their molecular weight.

Na podstawie zależności współczynnika retencji od masy cząsteczkowej dekstranu, przedstawionej na rysunku 4, wyznaczono cut – off, który dla membran enzymatycznych (PA–KE) wyniósł 13,4 kDa, natomiast dla membran obojętnych 189 kDa.

## 5.2. Zależność efektywności ultrafiltracyjnej biodegradacji mieszaniny kwasów halogenooctowych od parametrów procesu

Na efektywność procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji mają wpływ zarówno odpowiednio spreparowana membrana enzymatyczna jak i parametry operacyjne ultrafiltracji. Należą do nich: przede wszystkim czas kontaktu usuwanych substancji z enzymem (czas prowadzenia procesu), ciśnienie transmembranowe oraz liniowa prędkość przepływu nadawy przez membrany. Prowadzone badania miały na celu również wyznaczenie optymalnych parametrów procesu, przy których stopień usunięcia mieszaniny wybranych pięciu kwasów halogenooctowych z wody byłby jak najwyższy.

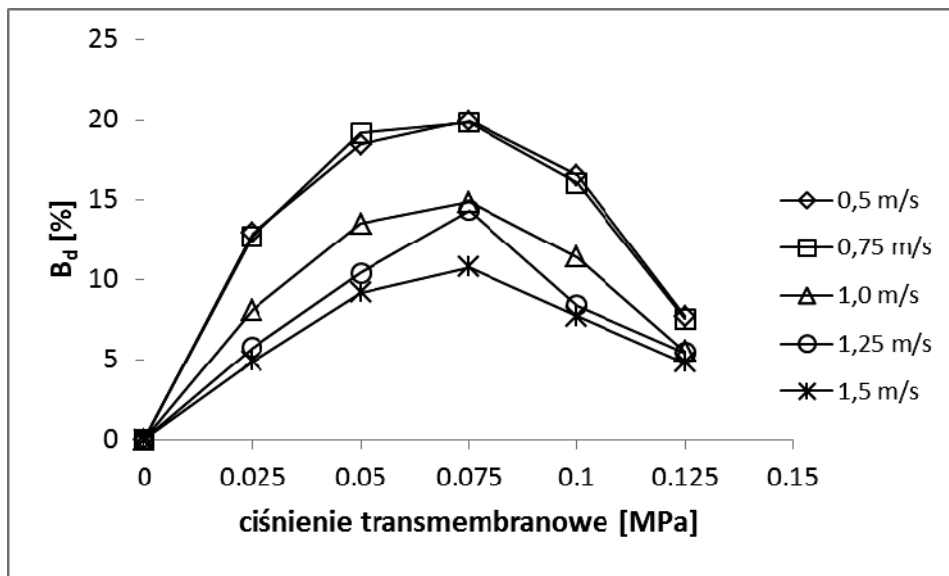
W celu wyznaczenia optymalnych: ciśnienia transmembranowego oraz liniowej prędkości przepływu filtrowanego medium, przy których należałoby prowadzić proces ultrafiltracyjnej biodegradacji mieszaniny HAA, filtrowano przez membrany enzymatyczne wodę zawierającą w 1 dm<sup>3</sup> po 1 mg każdego z pięciu wybranych kwasów halogenooctowych, zmieniając ciśnienie transmembranowe w zakresie od 0,025 do 0,125 MPa dla różnych prędkości przepływu nadawy (od 0,5 m/s do 1,5 m/s). Wszystkie otrzymane zależności przedstawiono w tabeli 4 oraz na rysunku 5 (dla jednego przykładowego kwasu).

Tab. 4. Zależność stopnia biodegradacji mieszaniny pięciu kwasów halogenooctowych od ciśnienia transmembranowego i liniowej prędkości przepływu nadawy.

Tab. 4. Dependence of the biodegradation degree of simulated water solution of five haloacetic acids on the transmembrane pressure and on the linear feed flow rate

ciśnienie transmembranowe	B <sub>d</sub> dla u=0,5 m/s	B <sub>d</sub> dla u=0,75 m/s	B <sub>d</sub> dla u=1,0 m/s	B <sub>d</sub> dla u=1,25 m/s	B <sub>d</sub> dla u=1,5 m/s
<b>Kwas monochlorooctowy (MCAA)</b>					
0	0	0	0	0	0
0,025	13,2	12,8	8,12	5,74	4,91
0,05	19,7	19,2	13,52	10,32	9,18
0,075	20,05	19,73	14,81	14,28	10,74
0,1	16,4	15,94	11,42	8,35	7,74
0,125	7,8	7,51	5,67	5,43	4,86

ciśnienie trans- membranowe	$B_d$ dla $u=0,5$ m/s	$B_d$ dla $u=0,75$ m/s	$B_d$ dla $u=1,0$ m/s	$B_d$ dla $u=1,25$ m/s	$B_d$ dla $u=1,5$ m/s
<b>Kwas dichlorooctowy (DCAA)</b>					
0	0	0	0	0	0
0,025	12,9	12,7	8,1	5,74	4,86
0,05	18,4	19,1	13,49	10,4	9,14
0,075	19,92	19,8	14,82	14,31	10,76
0,1	16,5	16,02	11,37	8,37	7,7
0,125	7,7	7,54	5,49	5,41	4,79
<b>Kwas trichlorooctowy (TCAA)</b>					
0	0	0	0	0	0
0,025	11,4	11,47	7,86	5,14	4,17
0,05	18,7	18,4	12,45	9,56	8,71
0,075	19,75	19,07	14,1	13,18	9,94
0,1	15,6	15,38	11,01	7,85	7,04
0,125	6,9	7,03	5,2	5,03	4,11
<b>Kwas monobromooctowy (MBAA)</b>					
0	0	0	0	0	0
0,025	13,2	12,8	8,12	5,74	4,91
0,05	19,7	19,2	13,52	10,32	9,18
0,075	20,05	19,73	14,81	14,28	10,74
0,1	16,4	15,94	11,42	8,35	7,74
0,125	7,8	7,51	5,67	5,43	4,86
<b>Kwas dibromooctowy (DBAA)</b>					
0	0	0	0	0	0
0,025	11,4	11,47	7,86	5,14	4,17
0,05	18,7	18,4	12,45	9,56	8,71
0,075	19,75	19,07	14,1	13,18	9,94
0,1	15,6	15,38	11,01	7,85	7,04
0,125	6,9	7,03	5,2	5,03	4,11



Rys. 5. Zależność stopnia biodegradacji mieszaniny HAA od ciśnienia transmembranowego i liniowej prędkości przepływu (na przykładzie kwasu dichlorooctowego).

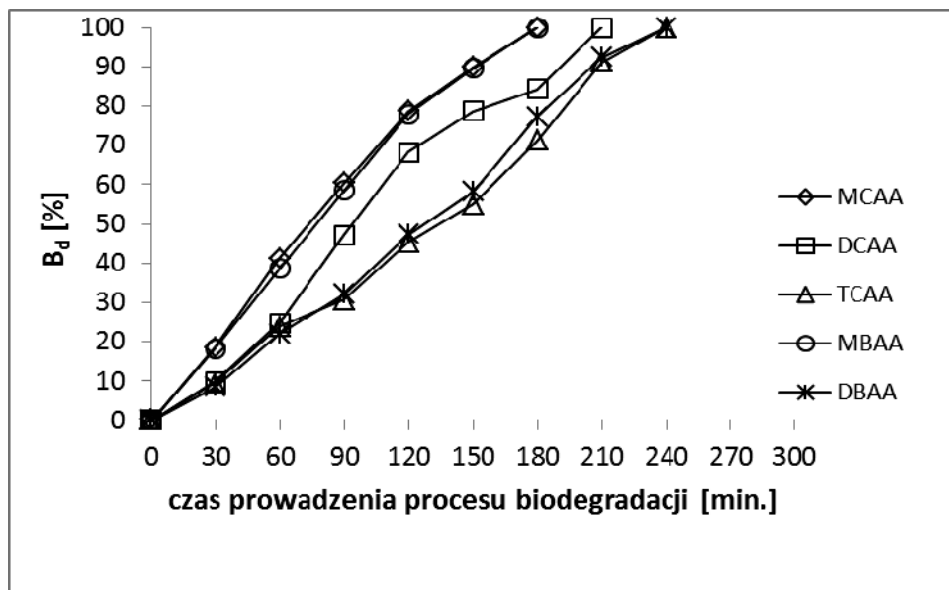
Fig. 5. Dependence of the biodegradation degree of HAA (for example DCAA) on the transmembrane pressure and on the linear feed flow rate

Najwyższy stopień usunięcia kwasu dichlorooctowego obserwowano dla ciśnienia transmembranowego równego 0,075 MPa. Dla tej wartości ciśnienia i liniowej prędkości filtrowanego medium  $u = 0,75$  m/s, stopień biodegradacji kwasu wynosił 19,8%. Podobne zależności uzyskano dla pozostałych kwasów znajdujących się w mieszaninie. Bardzo zbliżone wyniki otrzymano dla tego samego ciśnienia i prędkości równej 0,5 m/s – 19,1%. W przypadku pozostałych zastosowanych liniowych prędkości przepływu nadawy przez membranę, usunięcie ksenobiotyków było dużo niższe (14,8%, 14,31% i 10,76% dla prędkości 1 m/s, 1,25 m/s i 1,5 m/s). Takie niskie wartości stopnia biodegradacji są wynikiem zbyt krótkiego czasu kontaktu kwasów z biokatalizatorem oraz częściowym uszkodzeniem struktury cząsteczek unieruchomionego białka aktywnego, co skutkuje obniżeniem aktywności enzymatycznej membran. Z rysunku 5 wynika również, że liniowa prędkość przepływu nadawy 0,75 m/s - to prędkość, przy zastosowaniu której uzyskane stopnie biodegradacji wszystkich pięciu kwasów były najwyższe dla wszystkich stosowanych ciśnień transmembranowych.

Na stopień usunięcia kwasów ma przede wszystkim wpływ czas kontaktu ksenobiotyków z enzymem, czyli czas prowadzenia procesu filtracji. Filtrację wodnego roztworu mieszaniny pięciu wybranych kwasów halogenooctowych przez poliamidowe membrany kapilarne prowadzono w czasie 4 godzin (rys. 6), przy zastosowaniu wyznaczonych wcześniej najkorzystniejszych parametrów procesowych, oznaczając stopień biodegradacji poszczególnych kwasów w półgodzinnych odstępach czasu. Po trzech godzinach prowadzenia procesu ultrafiltracyjnej biodegradacji w wybranych warunkach procesowo-



wych z nadawy usunięto całkowicie kwas dichlorooctowy i monobromooctowy, a po trzech i pół godzinie – kwas monochlorooctowy i trichlorooctowy. Z kolei kwas dibromooctowy usunięto po czterech godzinach filtracji. Wydajność procesu w czasie trwania eksperymentu nie zmieniła się, a średnia wartość objętościowego strumienia permeatu wynosiła  $3,40 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ .



Rys. 6. Zmiany stężenia kwasów halogenooctowych w permeacie podczas ultrafiltracyjnej biodegradacji

Fig. 6. Dependence of the biodegradation degree of HAA on duration of hybrid process ultrafiltration-biodegradation

## 6. Podsumowanie

Proces ultrafiltracyjnej biodegradacji mieszaniny kwasów halogenooctowych w bioreaktorze z enzymatycznymi, kapilarnymi membranami poliakrylonitrylowymi jest skuteczną metodą usuwania HAA z wody. Najkorzystniejszymi, wyznaczonymi doświadczalnie parametrami operacyjnymi ultrafiltracyjnej biodegradacji wybranych pięciu HAA (dla zastosowanego bioreaktora) okazały się: ciśnienie transmembranowe wynoszące 0,075 MPa oraz liniowa prędkość przepływu nadawy przez membrany równa 0,75 m/s. Prowadzenie procesu z zastosowaniem optymalnych parametrów operacyjnych pozwoliło w czasie 4 godzin na całkowite usunięcie z wody wszystkich badanych kwasów. Obniżenie wyznaczonych czasów kontaktu można uzyskać zwiększając powierzchnię aktywną membrany, co będzie realizowane w dalszych pracach z tego zakresu.

Praca naukowa została sfinansowana ze środków przeznaczonych na naukę w latach 2009–2011 jako projekt badawczy nr N N523 4523 36 pt. „Biodegradacja kwasów halogenoocetowych w reaktorze z enzymatycznymi membranami ultrafiltracyjnymi”.

## Bibliografia

- [1] Batterman S., Zhang L., Wang S. Quenching of chlorination disinfection by products formation in drinking water by hydrogen peroxide. *Water Research* 2009, 34 (5) 1652-1658
- [2] Bodzek M., Korus I., Wykorzystanie chromatografii żelowo-permeacyjnej do charakteryzowania membran polimerowych, *Polimery*, 1995, 40 (3) 167-172
- [3] Bodzek M., Bohdziewicz J., Konieczny K.: *Techniki membranowe w ochronie środowiska*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 1997
- [4] Dojlido J.R., Zbieć E. Kwasy halogenoocetowe w wodzie do picia. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 1998, (5) 221-225
- [6] Kowalska M., Bohdziewicz J. Usuwanie kwasu dichloroocetowego z wody enzymatyczną membraną ultrafiltracyjną. *Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN* 2010, 132-147
- [7] Kowalska M., Dudziak M., Bohdziewicz J., Usuwanie kwasów halogenoocetowych w zintegrowanym procesie biodegradacja – ultrafiltracja z zastosowaniem enzymatycznych membran kapilarnych, *Ochrona Środowiska*, 2011, 33 (4) 49–51
- [8] Kucharski M., Koprowicz D. Chloroacetic acids in drinking water as ozonation and disinfection chlorine by-products. *Polish Journal of Environmental Studies* 2007, 16 (2A) 150-157
- [9] Liu Y.J., Zhanga A.N., Wang X.C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03, *Biochemical Engineering Journal* 2009, (44) 187–192
- [10] Nawrocki J.; Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody *Ochrona Środowiska* 2005, 27(4) 3-12
- [11] Peters R.I.B., Erkelens C., Leer E.W.B., Glan L. The analysis of halogenated acetic acids in dutch drinking water. *Water Research* 2008, 25 (4) 473-477
- [12] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, *Dziennik Ustaw*, nr 72
- [13] Symons. M. Treatment techniques for controlling trihalomethanes in drinking water, *Journal AWWA* 1975, 47 (67) 634–642
- [14] USEPA, Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection, Method 552.2, Rev.

- [15] Wang Y., Zhang J., Yin J., Progress of enzyme immobilization and its potential application, *Desalination and Water Treatment* 2009, (1) 157-171
- [16] Zaborski O.R. *Immobilized Enzymes*, CRP Press, Cleveland, Ohio 1973
- [17] Zbieć E., Dojlido J.R. Uboczne produkty dezynfekcji wody. *Ochrona Środowiska* 1999, 3 (74) 37-44

