

Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode

DOI: 10.15255/KUI.2014.014
KUI-12/2015
Izvorni znanstveni rad
Prispjelo 21. ožujka 2014.
Prihvaćeno 21. svibnja 2014.

M. Šabić,^a M. Vuković Domanovac,^{a*} Z. Findrik Blažević^a i E. Meštrović^b

^a Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb, Hrvatska

^b Pliva Hrvatska d.o.o., Prilaz baruna Filipovića 25, 10 000 Zagreb, Hrvatska

|| Sažetak

U radu je istražena bioremedijacija otpadne vode iz proizvodnje farmaceutika tvrtke Pliva Hrvatska d.o.o. pomoću aktivnog mulja i bioaugmentiranog aktivnog mulja s izoliranom mješovitom bakterijskom kulturom. Pokusi su provedeni šaržno u submerznim uvjetima s početnom koncentracijom organske tvari u otpadnoj vodi $\gamma_{S0} = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$, izraženoj kao vrijednost KPK te s različitim početnim koncentracijama biomase, γ_{X0} , u rasponu od 1,16 do 3,54 g dm^{-3} . Endo-Haldaneova jednadžba odabrana je za matematički opis procesa biorazgradnje farmaceutika. Procijenjene vrijednosti biokinetičkih parametara μ_{max} , K_S , K_I , Y i k_d iznosile su 1,66 d^{-1} ; 46,2 g dm^{-3} ; 131,2 g dm^{-3} ; 0,23 g g^{-1} ; 0,002 d^{-1} za pokus s aktivnim muljem i 1,69 d^{-1} ; 44,3 g dm^{-3} ; 132,0 g dm^{-3} ; 0,22 g g^{-1} ; 0,001 d^{-1} za pokus s bioaugmentiranim aktivnim muljem. Bioaugmentacijom aktivnog mulja skratilo se vrijeme obrade otpadne vode za 24 sata. Učinkovitost procesa bioremedijacije u prosjeku je iznosila 64,8 % za sve provedene pokuse.

|| Ključne riječi

Kinetika, bioremedijacija, bioaugmentacija, otpadna voda, farmaceutici

Uvod

Za zdravstvenu zaštitu ljudi u Europi je odobreno oko 3000 aktivnih farmaceutskih tvari te se očekuje da će se širom svijeta te količine nastaviti povećavati zbog porasta stanovništva, poboljšanja zdravstvene zaštite i očekivanog duljeg životnog vijeka ljudi.^{1,2} Farmaceutici su dizajnirani s ciljem specifičnog djelovanja u biološkim sustavima te ukoliko dopijaju u okoliš, predstavljaju problem zbog mogućeg štetnog djelovanja na pojedine organizme u ekosustavima. Zbog zakonski nereguliranih graničnih vrijednosti emisija te nedovoljno poznatog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje, farmaceutici spadaju u skupinu tzv. "novih onečišćujućih tvari".^{3,4} Njihov ulazak u okoliš moguć je iz više raznovrsnih izvora, pri čemu se glavina onečišćujućih tvari ispušta iz industrijskih postrojenja za farmaceutske proizvodnje, postrojenja za obradu otpadnih voda, bolnica, životinjskih farmi, odlagališta pa čak i groblja.^{2,5,6} Karakteristike otpadnih voda iz farmaceutske industrije ovise o proizvodnji određenog proizvoda. Sastav otpadnih voda ovisi o polaznoj sirovini, tehnološkim postupcima i procesima te otpadnim produktima. Specifična onečišćenja koja mogu dospjeti u otpadne vode iz farmaceutske proizvodnje su organska otapala, katalizatori, aditivi, neizreagirani reaktanti, međuprodukti te ostaci aktivnih farmaceutskih tvari.⁷

Otpadna voda nastala iz farmaceutske proizvodnje sadrži specifična onečišćenja i svojstva. Glavna prednost farmaceutskih otpadnih voda je njihov poznati sastav, zbog kojeg je omogućena ciljana obrada takve vode te uklanjanje njezinih karakterističnih onečišćenja. Prije nego li se otpadna

voda ispusti u okoliš, potrebno ju je obraditi na odgovarajući način kako bi se zadovoljili zakonom propisani uvjeti i granične vrijednosti emisija. Obrada farmaceutskih otpadnih voda provodi se fizikalno-kemijskim, elektrokemijskim ili biološkim postupcima.⁸ Biološki postupci su najjeftiniji te najprihvatljiviji za okoliš jer se obrada zasniva na upotrebi mikroorganizama pomoću kojih dolazi do razgradnje organskih tvari. Mikroorganizmi, najčešće bakterije, apsorbiraju organsko onečišćenje i hranjive soli koje su raspršene ili otopljene u otpadnim vodama. Svojim metabolizmom i enzimatskim procesima razgrađuju različita prisutna onečišćenja.⁹ U sklopu metaboličkog procesa, kemijska struktura aktivne farmaceutske tvari mijenja se biotransformacijom, biorazgradnjom te abiotičkim transformacijama, što često rezultira promjenom u njezinim fizikalno-kemijskim i farmaceutskim svojstvima.⁵ Karakteristike otpadnih voda imaju važnu ulogu pri odabiru načina biološke obrade. Otapala, aktivne farmaceutske tvari, međuprodukti te polazne sirovine predstavljaju biološki teže razgradive tvari koje mogu utjecati na učinkovitost biološkog sustava koji se primjenjuje za obradu otpadne vode.¹⁰ Sve češće primjenjivan biološki postupak obrade je bioremedijacija, proces kojim se organske otpadne tvari iz vode ili tla u kontroliranim uvjetima biološki razgrađuju do koncentracija koje nisu štetne za ljudsko zdravlje i okoliš ili se prevode u krajnje netoksične produkte ugljikov dioksid i vodu.^{10,11} Biološka razgradnja spoja često je rezultat djelovanja više mikroorganizama. Sama učinkovitost i brzina procesa uklanjanja onečišćujućih tvari iz tla i vode može se povećati inokuliranjem selektivnih mikroorganizama, pri čemu se takav postupak bioremedijacije naziva bioaugmentacija.¹² Najčešće se upotrebljavaju autohtoni mikroorganizmi, koji se izoliraju iz tla ili aktivnog mulja za obradu onečišćene vode. Radi učinkovitog i kontinuiranog procesa bioremedi-

* Autor za dopisivanje: Izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac
e-pošta: mvukovic@pierre.fkit.hr

jacije poželjno je temeljno poznavati strukturu i stabilnost mikrobnog zajedništva te njezinu reakciju na različite onečišćujuće tvari u tlu ili otpadnim vodama.^{9,11} U mikrobnom ekosustavu, koncentracija supstrata koja okružuje mikroorganizme značajna je u određivanju kinetičkih parametara. U novije vrijeme razvijeno je više kinetičkih modela za opis biološke razgradnje organskih tvari u otpadnim vodama, koji se koriste u razumijevanju, primjenjivosti i ograničenjima procesa obrade.¹³

U ovom je radu istražena učinkovitost procesa bioremedijacije pri uklanjanju organskih onečišćujućih tvari iz farmaceutske otpadne vode, pri čemu je aktivni mulj bioaugmentiran autohtonim bakterijskim kulturama dobivenim iz aktivnog mulja upotrijebljenog za obradu farmaceutske otpadne vode. Navedeni je proces opisan Endo-Haldanovom jednadžbom iz koje su, na temelju podataka iz serije provedenih pokusa, optimiranjem procijenjeni biokinetički parametri.

Eksperimentalni dio

Materijali

Aktivni mulj, koji je upotrijebljen za naciepljivanje reaktora, dopremljen je iz aerobnog reaktora pilotnog uređaja za obradu procesnih otpadnih voda s lokacije Savski Marof, PLIVA Hrvatska d.o.o. Aktivni je mulj tri puta ispran i ugušćen pomoću centrifuge (Sigma 3K15, Njemačka) pri 5500 okretaja u minuti i 0 °C tijekom 10 min. Priređene početne koncentracije aktivnog mulja, izražene preko vrijednosti suspendirane tvari, iznosile su $\gamma_{X01} = 1,19 \pm 0,04 \text{ g dm}^{-3}$, $\gamma_{X02} = 2,11 \pm 0,04 \text{ g dm}^{-3}$ te $\gamma_{X03} = 3,46 \pm 0,11 \text{ g dm}^{-3}$ te su označene kao X1, X2 i X3.

Otpadna voda iz proizvodnje farmaceutika s lokacije Savski Marof, PLIVA Hrvatska d.o.o. u ovom radu upotrijebljena je za provedbu biološke obrade u šaržnim uvjetima. Početne vrijednosti KPK i BPK₅ iznosile su 5,01 g dm⁻³ te 3,00 g dm⁻³. pH je iznosio 8,23. Za otpadnu vodu proveden je test toksičnosti pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Inhibicija bioluminiscencije izmjerena je na uređaju Lumistox 300 (Dr Lange GmbH, Njemačka) nakon inkubacije od 30 min prema standardnoj metodi EN ISO 11348-3, 1998.¹⁴ Početne vrijednosti KPK i BPK₅ te pH i toksičnost otpadne vode određene su nakon filtriranja uzorka kroz membranu veličine pora 0,45 μm. Za uzgoj bakterijskih kultura priređena je hranjiva podloga (Biolife Manual, Second Edition, Ingraf, Milano, Italija, 1991). Od uzgojene kulture priređena je suspenzija čija je optička gustoća iznosila 0,2 pri $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Proces bioremedijacije

Proces bioremedijacije proveden je šaržno pri početnom KPK, koji aproksimira koncentraciju supstrata u otpadnoj vodi iz proizvodnje farmaceutika, $\gamma_s = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$ te pri različitim početnim koncentracijama aktivnog mulja, pokus P1, i bioaugmentiranog aktivnog mulja s izoliranim bakterijskim kulturama početne koncentracije 0,28 ± 0,07 g dm⁻³, pokus P2. Pokusi su provedeni u Erlenmeyerovim tikvicama od 1 dm³ u submerznim uvjetima pri 160 okretaja u minuti i 25 ± 2 °C tijekom četiri dana.

Erlenmeyerove su tikvice sadržavale 10, 20 te 30 g aktivnog mulja, 20 cm³ priređene suspenzije izoliranih bakterijskih kultura i 500 cm³ otpadne vode. Uzorci otpadne vode i aktivnog mulja uzimani su svaka 24 sata tijekom četiri dana te analizirani. U prosjeku je dnevno uzimano 10 cm³ uzorka. Određivani su suspendirana tvar, organski i anorganski udio u suspendiranoj tvari i KPK prema standardnim metodama¹⁵ te pH i koncentracija topljenog kisika (WTW Multi 340i, Njemačka). Uzorak aktivnog mulja svakodnevno je pregledavan pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

Obrada podataka

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri modela. Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom primjenjujući simpleksnu metodu i metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu Scientist.¹⁶ Rezultati dobiveni simulacijom s pomoću matematičkog modela uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalno odstupanje između eksperimentalnih podataka i vrijednosti izračunatih pomoću modela. Skup optimalnih parametara modela upotrijebljen je za simulacije koje su uspoređene s rezultatima pokusa.

Rezultati i rasprava

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća većina istraživanja o utjecaju kemijski nastalih onečišćujućih tvari bila je usmjerena isključivo na klasične "prioritetne" onečišćujuće tvari. Međutim, rastuća proizvodnja i upotreba farmaceutika diljem svijeta postali su problem današnjice u području zaštite okoliša, koji je pobudio velik interes znanstvenika u proteklih nekoliko godina. Iako su farmaceutici u okolišu pronađeni u vrlo niskim koncentracijama, još uvijek nema dovoljno saznanja o dugoročnim posljedicama koje širok spektar farmaceutika može imati na nedefinirane organizme i ljudsko zdravlje.^{17,18} Aktivne farmaceutske tvari većinom su biološki aktivne i hidrofilne kako bi ih ljudsko tijelo lakše apsorbiralo. Također, moraju biti stabilne kako bi se izbjegla razgradnja prije nego li dođe do ciljanog djelovanja. Iako su to poželjna svojstva sa stajališta farmakologije, ekofarmakologija ukazuje da upravo te karakteristike stvaraju potencijalni problem u okolišu.^{5,17,19}

Uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda zahtijeva primjenu različitih postupaka obrade, pri čemu sam izbor postupka obrade ovisi o mjestu nastanka otpadne vode, odnosno o onečišćujućim tvarima koje se nalaze u otpadnoj vodi.⁸ Proces bioremedijacije ponajprije ovisi o mikroorganizmima čiji enzimi reagiraju s onečišćujućim tvarima te ih prevode u bezopasne ili manje štetne produkte. Mikroorganizmi koji se upotrebljavaju za bioaugmentiranje moraju biti aktivni, kompatibilni i otporni za određenu vrstu onečišćenja.^{20–22}

U ovom radu izmjerena vrijednost KPK farmaceutske otpadne vode iznosila je 5,01 g dm⁻³, što je 2,5 puta niža vrijednost u odnosu na tipične efluente farmaceutske in-

dustrije.⁶ Određivanje vrijednosti BPK_5 važno je za procjenu biorazgradivosti organskih tvari u otpadnim vodama. Omjer BPK_5/KPK iznosio je 0,60, što ukazuje na biorazgradivost organskih tvari u otpadnoj vodi iz farmaceutske industrije, odnosno za obradu ove vode može se primijeniti biološki proces. Izmjeren pH otpadne vode iznosio je 8,23, što je u skladu s izmjerenim vrijednostima efluenta farmaceutske industrije.^{6,17}

Ispitivanje toksičnosti otpadne vode iz farmaceutske industrije provedeno je bakterijom *V. fischeri*. Ova metoda je standardna i primjenjuje se za procjenu ekotoksičnosti industrijskih otpadnih voda, otpadnih voda gradova i naselja, procjednih voda s odlagališta otpada te kakvoće riječnih voda.²³ Metoda se temelji na mjerenju emisije svjetlosti bakterije *V. fischeri*. Iz dobivene vrijednosti EC_{50} izračunat je indeks utjecaja toksičnosti TII_{50} (TII_{50} – toxicity impact index), koji je izravno proporcionalan s toksičnošću i omogućava usporedbu toksičnog utjecaja različitih vrsta otpadnih voda na prirodne vode.²⁴ Na temelju ove analize akutna toksičnost otpadne vode iz farmaceutske industrije EC_{50} iznosi 17,0 %, a $TII_{50} = 5,9$; što ukazuje na toksičnost otpadne vode. Vrijednosti upućuju na to da se takva otpadna voda iz farmaceutske industrije bez prethodne obrade ne smije ispuštati u okoliš.²⁵

Nakon što je okarakteriziran efluent farmaceutske industrije, priređen je aktivni mulj početnih vrijednosti koncentracija od $1,16 \pm 0,02 \text{ g dm}^{-3}$ do $3,54 \pm 0,08 \text{ g dm}^{-3}$. U tablici 1 prikazane su vrijednosti dobivene u procesu bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnim uvjetima tijekom ispitivanog perioda.

Iz tablice 1 vidljivo je da se omjer γ_{Xv}/γ_X održavao tijekom provedbe pokusa. Visoke vrijednosti omjera kretale su se u rasponu od 0,90 do 0,95 za sve pokuse, što ukazuje na to da se udio anorganske tvari nije povećavao, odnosno da se udio biomase održavao tijekom pokusa. U slučaju kada se omjer γ_{Xv}/γ_X smanjuje, tada se povećava udio anorganske tvari u aktivnom mulju, odnosno biomasa odumire.²⁶ Prosječan prinos biomase iznosio je $0,83 \text{ g dm}^{-3}$ za sve provedene pokuse. Navedene srednje vrijednosti pokazale su zadovoljavajuća srednja kvadratna odstupanja. Koncentracije otopljenog kisika pri procesu bioremedijacije za sve koncentracije aktivnog mulja u prosjeku su iznosile

$4,79 \pm 0,40 \text{ mg dm}^{-3}$. Razgradnjom organskih tvari u vodi koncentracija kisika opada, što je ujedno pokazatelj onečišćenosti vode. Kod bioloških aerobnih procesa, najkritičniji parametar je raspoloživa količina otopljenog kisika za rast mikroorganizama jer ograničava djelotvornost procesa.²⁷ S povećanjem koncentracije biomase od γ_{X1} do γ_{X3} , proporcionalno se smanjuju srednje vrijednosti koncentracije kisika. Najniže koncentracije otopljenog kisika zabilježene su za γ_{X3} i iznose $1,14 \text{ mg dm}^{-3}$ i $1,34 \text{ mg dm}^{-3}$ u odnosu na P1 i P2. Na temelju toga može se zaključiti da veća koncentracija biomase troši više kisika za aerobnu razgradnju organske tvari prisutne u otpadnoj vodi. Potreba za kisikom je u prosjeku za $0,14 \text{ mg dm}^{-3}$ veća u pokusu P1 u odnosu na pokus P2, što ukazuje i na povećanu aktivnost mikroorganizama.¹³ Vrijednost pH je vrlo bitan čimbenik za rast određenih mikroorganizama. Optimalan pH za rast bakterija je u neutralnom području, dok gljivama pogoduju kiseliji uvjeti.²⁷ Srednje vrijednosti izmjerenih pH kretale su se u rasponu između 7,45 i 8,19, što odgovara području rasta bakterija.

Mikrobni procesi su vrlo kompleksni, ali se pojedina procesna zbivanja ili skupine tih zbivanja mogu predstaviti pomoću modela.^{13,27} Haldaneov model, koji se uobičajeno primjenjuje u kinetičkoj analizi procesa biorazgradnje, prikazan je jednadžbom (1):^{28,29}

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot \gamma_S}{K_s + \gamma_S + \gamma_S^2 / K_i} \quad (1)$$

gdje je μ – specifična brzina rasta, d^{-1} , μ_{\max} – maksimalna specifična brzina rasta, d^{-1} , γ_S – koncentracija supstrata, g dm^{-3} , K_s – konstanta zasićenja supstratom, g dm^{-3} i K_i – konstanta inhibicije. Nakon uključivanja konstante odumiranja biomase, k_d , u Haldaneov model, jednadžba poprima sljedeći oblik:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot \gamma_S}{K_s + \gamma_S + \gamma_S^2 / K_i} - k_d \quad (2)$$

Ovako modificirani Haldaneov model poznat je kao Endo-Haldaneov model.

Tablica 1 – Rezultati procesa bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnom reaktoru

Table 1 – Results of pharmaceutical wastewater bioremediation process in batch reactor

Pokus Experiment	$\gamma_{X0}/\text{g dm}^{-3}$	γ_{Xv}/γ_X	$\gamma_{O_2}/\text{mg dm}^{-3}$	pH
P1, X1		$0,90 \pm 0,07$	$5,06 \pm 1,28$	$8,19 \pm 0,36$
P2, X1	$1,19 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,05$	$5,44 \pm 1,98$	$8,14 \pm 0,18$
P1, X2		$0,93 \pm 0,05$	$4,77 \pm 1,45$	$8,09 \pm 0,32$
P2, X2	$2,10 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,03$	$4,69 \pm 2,51$	$7,97 \pm 0,17$
P1, X3		$0,93 \pm 0,02$	$4,34 \pm 2,03$	$7,45 \pm 1,00$
P2, X3	$3,46 \pm 0,11$	$0,95 \pm 0,02$	$4,46 \pm 2,99$	$7,51 \pm 0,73$

Kao posljedica procesa biorazgradnje uklanjanjem supstrata dolazi do promjene u koncentraciji biomase kao što to opisuju sljedeće jednadžbe:

$$r_s = \frac{\mu}{Y} \cdot \gamma_X \quad (3)$$

$$r_X = Y \cdot r_s - k_d \cdot \gamma_X \quad (4)$$

gdje su r_s i r_X – brzina potrošnje supstrata odnosno brzina rasta biomase, $\text{g dm}^{-3} \text{d}^{-1}$, γ_X – koncentracija aktivnog mulja, g dm^{-3} , t – vrijeme, d , i Y – koeficijent iskorištenja, g g^{-1} . Bilance tvari za supstrat i biomasu u šaržnom reaktoru opisane su jednadžbama (5) i (6).

$$\frac{d\gamma_s}{dt} = -r_s \quad (5)$$

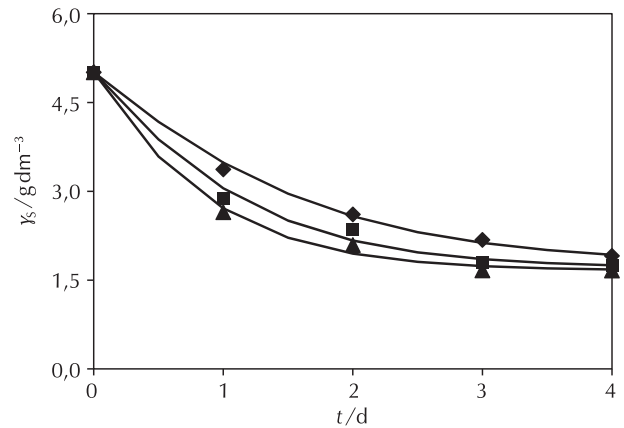
$$\frac{d\gamma_X}{dt} = r_X \quad (6)$$

Primjenjujući Endo-Haldanovu kinetiku, procijenjeni su biokinetički parametri. Metodom optimiranja biokinetičkih parametara dobivene su vrijednosti μ_{\max} , K_s , K_i , Y i k_d . Pretpostavljeni model (jedin. (2) – (6)) s procijenjenim vrijednostima parametara iz tablice 2 primijenjen je za simulaciju procesa bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnom reaktoru. Vrijednosti dobivenih biokinetičkih parametara u rasponu su očekivanih vrijednosti za proces biorazgradnje pomoću aktivnog mulja¹³ u šaržnim uvjetima^{28–31} i za farmaceutske otpadne vode.³²

Slike 1 i 2 prikazuju promjenu koncentracije supstrata u otpadnoj vodi iz proizvodnje farmaceutika $\gamma_{s0} = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$ za početne koncentracije aktivnog mulja X1 – X3 u pokusima P1 i P2 tijekom četiri dana. Uspoređujući rezultate pokusa s modelom, može se ustanoviti da model (jedin. (2) – (6), tablica 2) može opisati kinetiku procesa. Vrijednosti R^2 za X1 – X3 kreću se iznad 0,99 u P1 i u P2. Koncentracija supstrata u otpadnoj vodi iz proizvodnje farmaceutika se u svim pokusima smanjuje s vremenom, a samim tim se povećava učinkovitost procesa bioremedijacije (slike 1 – 3). Najveća promjena se dogodila u prvom danu kada se γ_s u prosjeku smanjila za $40,8 \pm 7,4 \%$ u P1 i $41,1 \pm 2,2 \%$ u P2. Provedena istraživanja^{19,33} ukazuju na to da pri uklanjanju različitih farmaceutika iz otpadne vode do procesa biorazgradnje dolazi zahvaljujući prisutnim bakterijama u pahuljici aktivnog mulja, njihovu brzom rastu i raznolikom enzimskom potencijalu za razgradnju sastojaka različitih kemijskih struktura u otpadnoj vodi.

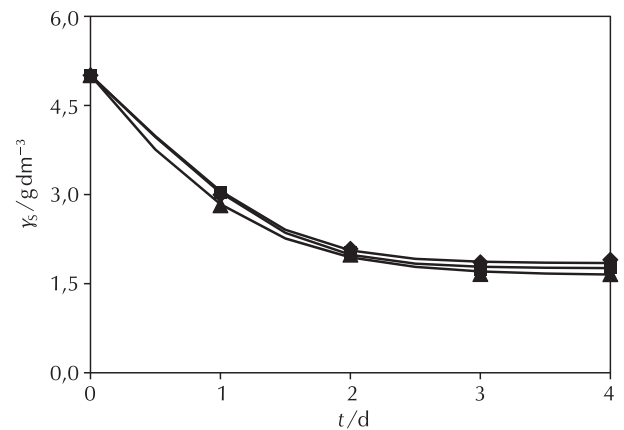
Tablica 2 – Biokinetički parametri modela
Table 2 – Biokinetic model parameters

Pokus Experiment	μ_{\max}/d^{-1}	$K_s/\text{g dm}^{-3}$	$K_i/\text{g dm}^{-3}$	$Y/\text{g g}^{-1}$	$10^2 k_d/\text{d}^{-1}$
P1	$1,66 \pm 0,30$	$46,2 \pm 2,90$	$131,2 \pm 3,26$	$0,23 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,02$
P2	$1,69 \pm 0,34$	$44,3 \pm 1,66$	$132,0 \pm 2,06$	$0,22 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,01$



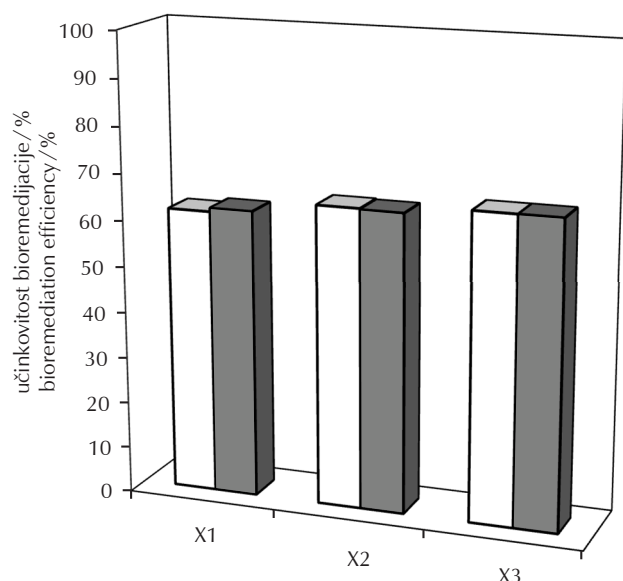
Slika 1 – Promjena koncentracije supstrata u otpadnoj vodi iz proizvodnje farmaceutika $\gamma_{s0} = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$ za početne koncentracije aktivnog mulja X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) u pokusu P1 tijekom četiri dana. Usporedba rezultata pokusa i modela (—)

Fig. 1 – Changes in concentrations of substrate from pharmaceutical wastewater $\gamma_{s0} = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$ for initial concentrations of activated sludge, X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) in experiment P1 during four days. Comparison of experimental results and model (—)



Slika 2 – Promjena koncentracije supstrata u otpadnoj vodi iz proizvodnje farmaceutika $\gamma_{s0} = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$ za početne koncentracije aktivnog mulja X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) u pokusu P2 tijekom četiri dana. Usporedba rezultata pokusa i modela (—)

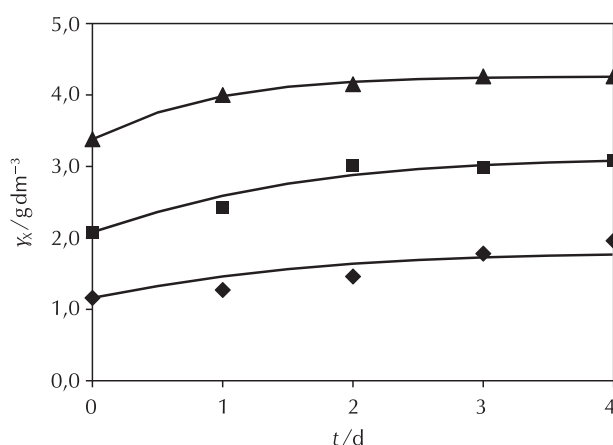
Fig. 2 – Changes in concentrations of substrate from pharmaceutical wastewater $\gamma_{s0} = 5,01 \text{ g dm}^{-3}$ for initial concentrations of activated sludge, X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) in experiment P2 during four days. Comparison of experimental results and model (—)



Slika 3 – Učinkovitost procesa bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnom reaktoru u P1 (□) i P2 (■)

Fig. 3 – Efficiency of bioremediation process of pharmaceutical wastewater in batch reactor in P1 (□) i P2 (■)

Učinkovitosti bioremedijacije farmaceutske otpadne vode za koncentracije X1–X3 u prosjeku su približno jednake i iznose $64,7 \pm 2,5$ % za P1 i $64,9 \pm 2,0$ % za P2 (slika 3), pri čemu je približno isti stupanj učinkovitosti s bioaugmentiranim muljem postignut u 24 sata kraćem vremenu, odnosno u trećem danu pokusa P2 (slika 2), u odnosu na proces obrade otpadne vode s aktivnim muljem koji navedenu vrijednost učinkovitosti postiže u četvrtom danu u P1



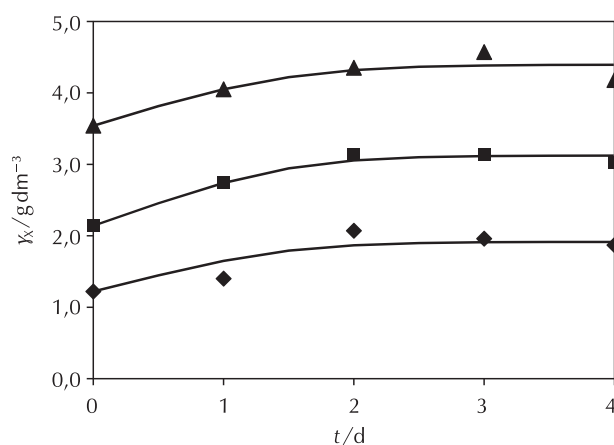
Slika 4 – Promjene koncentracija aktivnog mulja X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) u pokusu P1 tijekom četiri dana. Usporedba rezultata pokusa i modela (—)

Fig. 4 – Changes in concentrations of activated sludge X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) in experiment P1 during four days. Comparison of experimental results and model (—)

(slika 1). Najviša vrijednost učinkovitosti iznosi 66,8 % za koncentraciju X3 u oba pokusa.

U procesima biološke obrade otpadnih voda važan čimbenik koji omogućava obradu je koncentracija aktivnog mulja, X_x , koju predstavlja mješavina otpadne vode i suspendirane tvari. Promjene koncentracija aktivnog mulja, X1–X3, u pokusima P1 i P2 tijekom četiri dana prikazane su slikama 4 i 5. Koncentracija aktivnog mulja se tijekom pokusa povećavala u prosjeku za $0,22 \pm 0,03$ $g\,dm^{-3}$ u P1 i $0,18 \pm 0,03$ $g\,dm^{-3}$ u P2. Uspoređujući rezultate pokusa i rezultata simulacije procesa, može se ustanoviti da model (jedn. (2) – (6), tablica 2), u rasponu početnih koncentracija za provedene pokuse, dobro opisuje kinetiku procesa, uz visoke vrijednosti R^2 ($> 0,99$) u P1 i u P2.

Kinetički rezultati dobiveni procesom bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnom reaktoru prikazani su u tablici 3. Specifična brzina rasta, μ , izračunata je prema jednadžbi (2). Dobivene vrijednosti μ kreću se u rasponu od 0,06 do 0,12 d^{-1} . Prosječna vrijednost specifične brzine rasta je za 8,5 % veća u P2 u odnosu na P1. Brzina potrošnje supstrata u otpadnoj vodi iz proizvodnje farmaceutika odnosno brzina rasta biomase, r_s i r_x , izračunate su prema jednadžbama (3) i (4) te su prikazane u tablici 3. Uspoređujući pokuse P1 i P2 za iste početne koncentracije aktivnog mulja, vidljivo je da su vrijednosti specifičnih brzina rasta kao i brzina potrošnje supstrata odnosno brzina rasta biomase nešto više u P2. Brzina potrošnje supstrata, r_s , u prosjeku je iznosila $0,24 \pm 0,19$ $g\,dm^{-3}\,d^{-1}$ i $0,25 \pm 0,20$ $g\,dm^{-3}\,d^{-1}$ u odnosu na pokuse P1 i P2, što je za 6,0 % viša vrijednost u P2. Brzina rasta biomase, r_x , u prosjeku je iznosila $0,22 \pm 0,05$ $g\,dm^{-3}\,d^{-1}$ i $0,26 \pm 0,06$ $g\,dm^{-3}\,d^{-1}$ u odnosu na pokuse P1 i P2. Također je u P2 vrijednost r_x viša za 13,8 %.



Slika 5 – Promjene koncentracija aktivnog mulja X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) u pokusu P2 tijekom četiri dana. Usporedba rezultata pokusa i modela (—)

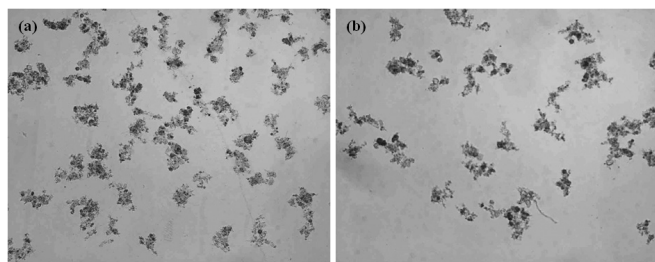
Fig. 5 – Changes in concentrations of activated sludge X1 (◆), X2 (■), i X3 (▲) in experiment P2 during four days. Comparison of experimental results and model (—)

Tablica 3 – Kinetički rezultati dobiveni procesom bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnom reaktoru

Table 3 – Kinetic results obtained from bioremediation process of pharmaceutical wastewater in batch reactor

Pokus Experiment	μ/d^{-1}	$r_s/g\ dm^{-3}\ d^{-1}$	$r_x/g\ dm^{-3}\ d^{-1}$
P1, X1	0,12 ± 0,05	0,45 ± 0,27	0,17 ± 0,03
P2, X1	0,12 ± 0,06	0,47 ± 0,25	0,19 ± 0,04
P1, X2	0,10 ± 0,04	0,18 ± 0,12	0,25 ± 0,07
P2, X2	0,11 ± 0,05	0,19 ± 0,09	0,28 ± 0,08
P1, X3	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,05	0,25 ± 0,10
P2, X3	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,31 ± 0,11

Prema mikrofotografijama prikazanim slikom 6 može se zaključiti da bioaugmentacija ne utječe na izgled pahuljica aktivnog mulja, već povećava samu učinkovitost bioremedijacije, odnosno obrada farmaceutske otpadne vode brža je i učinkovitija pomoću bioaugmentiranog aktivnog mulja (tablica 3, slika 2). Pahuljice u oba pokusa po obliku i veličini vizualno izgledaju podjednako. Razlog tome je što bakterijske stanice ne utječu na ukupan volumen mulja. Pahuljice imaju specifičan oblik za sustav farmaceutskih otpadnih voda u kojemu se nalaze u odnosu na druge sustave otpadnih voda u kojima se upotrebljava aktivni mulj za uklanjanje organskog onečišćenja.^{13,26}



Slika 6 – Mikrofotografije pahuljica aktivnog mulja prvog dana u šaržnom reaktoru, povećanje 100×, $\gamma_{SO} = 5,01\ g\ dm^{-3}$; a) $\gamma_{X03} = 3,46 \pm 0,11\ g\ dm^{-3}$, P1; b) $\gamma_{X02} = 2,10 \pm 0,04\ g\ dm^{-3}$, P2

Fig. 6 – Microphotographs of activated sludge flocs on the first day in batch reactor, magnification 100×, $\gamma_{SO} = 5.01\ g\ dm^{-3}$; a) $\gamma_{X03} = 3.46 \pm 0.11\ g\ dm^{-3}$, P1; b) $\gamma_{X02} = 2.10 \pm 0.04\ g\ dm^{-3}$, P2

Zaključak

U radu je istražen proces bioremedijacije farmaceutika iz otpadne vode farmaceutske industrije u šaržnom reaktoru. Učinkovitosti smanjenja vrijednosti KPK kretale su se u rasponu od 62,0 % do 66,8 %, što ukazuje da je aktivni

mulj otporan na organske otpadne tvari koje se mogu naći u otpadnim vodama farmaceutske industrije. Bioremedijacijom, odnosno bioaugmentacijom aktivnog mulja s autohtonim bakterijskim kulturama povećava se kvaliteta same biomase te se ubrzava proces biorazgradnje.

ZAHVALA

Prikazani rezultati dobiveni su tijekom izrade diplomskog rada na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zavod za industrijsku ekologiju, u suradnji s Plivom Hrvatska d.o.o.

Popis kratica i simbola

List of abbreviations and symbols

- k_d – konstanta odumiranja, d^{-1}
– decay constant, d^{-1}
- K_i – konstanta inhibicije, $g\ dm^{-3}$
– inhibition constant, $g\ dm^{-3}$
- K_s – konstanta zasićenja supstratom, $g\ dm^{-3}$
– substrate saturation constant, $g\ dm^{-3}$
- r_s – brzina potrošnje supstrata, $g\ dm^{-3}\ d^{-1}$
– substrate consumption rate, $g\ dm^{-3}\ d^{-1}$
- r_x – brzina rasta biomase, $g\ dm^{-3}\ d^{-1}$
– biomass growth rate, $g\ dm^{-3}\ d^{-1}$
- R^2 – koeficijent korelacije
– correlation coefficient
- t – vrijeme, d
– time, d
- Y – koeficijent iskorištenja, $g\ g^{-1}$
– growth yield, $g\ g^{-1}$
- γ_{O_2} – koncentracija kisika, $mg\ dm^{-3}$
– oxygen concentration, $mg\ dm^{-3}$
- γ_S – koncentracija supstrata, $g\ dm^{-3}$
– substrate concentration, $g\ dm^{-3}$
- γ_X – koncentracija aktivnog mulja, $g\ dm^{-3}$
– activated sludge concentration, $g\ dm^{-3}$
- γ_{X_v} – koncentracija biomase, $g\ dm^{-3}$
– biomass concentration, $g\ dm^{-3}$
- λ – valna duljina, nm
– wavelength, nm
- μ – specifična brzina rasta, d^{-1}
– specific growth rate, d^{-1}
- μ_{max} – maksimalna specifična brzina rasta, d^{-1}
– maximum growth rate, d^{-1}
- BPK – biokemijska potrošnja kisika, $g\ dm^{-3}$
- BOD – biochemical oxygen demand, $g\ dm^{-3}$
- EC – djelotvorna koncentracija, %
– effective concentration, %
- KPK – kemijska potrošnja kisika, $g\ dm^{-3}$
- COD – chemical oxygen demand, $g\ dm^{-3}$
- TII – indeks utjecaja toksičnosti
– toxicity impact index

Literatura References

1. C. Zwiener, Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment, *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 1159–1162, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0818-2>.
2. S. Khetan, T. Collins, Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry, *Chem. Rev.* **107** (2007) 2319–2364, <http://dx.doi.org/10.1021/cr020441w>.
3. T. Deblonde, C. Cossu-Leguille, P. Hartemann, Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature, *Int. J. Hyg. Environ. Heal.* **214** (2011) 442–448, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>.
4. I. Sirés, E. Brillas, Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review, *Environ. Int.* **40** (2012) 212–229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.07.012>.
5. K. Kümmerer, *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2008, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-74664-5>.
6. M. Doble, A. Kumar, *Biotreatment of Industrial Effluents: Pharmaceuticals*, Elsevier Inc., London, 2005, <http://www.elsevier.com/books/biotreatment-of-industrial-effluents/doble/978-0-7506-7838-4>.
7. D. Sreekanth, D. Sivaramakrishna, V. Himabindu, Y. Anjaneyulu, Thermophilic treatment of bulk drug pharmaceutical industrial wastewaters by using hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactor, *Bioresource Technol.* **100** (2009) 2534–2539, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.028>.
8. M. Deegan, B. Shaik, K. Nolan, K. Urell, M. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey, Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **8** (2011) 649–666, <http://dx.doi.org/10.1007/BF03326250>.
9. M. Megharaj, B. Ramakrishnan, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, R. Naidu, Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective, *Environ. Int.* **37** (2011) 1362–1375, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>.
10. S. Semrany, L. Favier, H. Djelal, S. Taha, A. Amrane, Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds (Bio-ROCs), *Biochem. Eng. J.* **69** (2012) 75–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.017>.
11. A. Singh, R. C. Kuhad, O. P. Ward, *Advances in applied bioremediation*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2009, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-89621-0>.
12. M. Martín-Hernández, M. E. Suárez-Ojeda, J. Carrera, Bioaugmentation for treating transient or continuous *p*-nitrophenol shock loads in an aerobic sequencing batch reactor, *Bioresource Technol.* **123** (2012) 150–156, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.014>.
13. M. Vuković, I. Čosić, K. Kolačko, F. Briški, Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada, *Kem. Ind.* **61** (2012) 417–425.
14. EN ISO 11348-3:1998, Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze dried bacteria.
15. APHA, *Standard methods for examination of water and wastewater*, 20th Edition. APHA, Washington DC, USA, 1995.
16. *Scientist handbook*, Micromath®, Salt Lake City, 1986–1995.
17. O. V. Enick, M. M. Moore, Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment, *Environ. Impact Asses.* **27** (2007) 707–729, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eiar.2007.01.001>.
18. M. Gros, M. Petrović, D. Barcelo, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta* **70** (2006) 678–690, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>.
19. J. Radjenovic, M. Petrovic, D. Barcelo, Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 1365–1377, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0883-6>.
20. H. Gauthier, V. Yargeau, D. G. Cooper, Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism, *Sci. Total Environ.* **408** (2010) 1701–1706, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.012>.
21. C. S. Karigar, S. S. Rao, Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review, *Enzyme Res.* **2011** (2011) 1–11, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/805187>.
22. A. M. Maszenan, Y. Liu, W. J. Ng, Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules, *Biotechnol. Adv.* **29** (2011) 111–123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.09.004>.
23. E. H. Günes, Y. Günes, I. Talinli, Toxicity evaluation of industrial and land base sources in a river basin, *Desalination* **226** (2008) 348–356, <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.02.116>.
24. M. Farre, D. Asperger, L. Kantiani, S. Gonzalez, M. Petrovic, D. Barcelo, Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*, *Anal. Bioanal. Chem.* **390** (2008) 1999–2007, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1779-9>.
25. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 80/13.
26. M. Vuković, F. Briški, M. Matošić, I. Mijatović, Analysis of the activated sludge process in an MBR under starvation conditions, *Chem. Eng. Technol.* **29**, (2006) 357–363, <http://dx.doi.org/10.1002/ceat.200500314>.
27. G. Bitton, *Wastewater microbiology*, John Wiley & Sons, New York, 2005, <http://dx.doi.org/10.1002/0471717967>.
28. G. Nakhla, V. Liu, A. Bassi, Kinetic modeling of aerobic biodegradation of high oil and grease rendering wastewater, *Biores. Technol.* **97** (2006) 131–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.003>.
29. S. Tsuneda, J. Aurelenia, T. Morise, A. Hirata, Dynamic modeling and simulation of a three-phase fluidized bed batch process for wastewater treatment, *Process Biochem.* **38** (2002) 599–604, [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00184-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00184-X).
30. F. Carta-Escobar, J. Pereda-Marin, P. Alvarez-Mateos, Aerobic purification of dairy wastewater in continuous regime Part II: Kinetic study of the organic matter removal in two reactor configurations, *Biochem. Eng. J.* **22** (2005) 117–124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.009>.
31. M. Tobajas, E. Garcia-Calvo, Comparison of analysis methods for determination of the kinetic parameters in batch cultures, *World J. Microb. Biotechnol.* **16** (2000) 845–851, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008971708358>.
32. F. Mohammad, A. Jamrah, Evaluation of biokinetic parameters for pharmaceutical wastewater using aerobic oxidation, *Dirasat Eng. Sci.* **35** (2008) 17–25.
33. Y. Wu, T. Li, L. Yang, Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: A review, *Bioresource Technol.* **107** (2012) 10–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.088>.

EXTENDED ABSTRACT

Bioremediation Kinetics of Pharmaceutical Industrial Effluent

Monika Šabić,^a Marija Vuković Domanovac,^{a*}
Zvezdana Findrik Blažević,^a and Ernest Meštrović^b

In recent years, concerns about the occurrence and fate of pharmaceuticals that could be present in water and wastewater has gained increasing attention. With the public's enhanced awareness of eco-safety, environmentally benign methods based on microorganisms have become more accepted methods of removing pollutants from aquatic systems. This study investigates bioremediation of pharmaceutical wastewater from pharmaceutical company Pliva Hrvatska d.o.o., using activated sludge and bioaugmented activated sludge with isolated mixed bacterial culture. The experiments were conducted in a batch reactor in submerged conditions, at initial concentration of organic matter in pharmaceutical wastewater, expressed as COD, 5.01 g dm⁻³ and different initial concentrations of activated sludge, which ranged from 1.16 to 3.54 g dm⁻³. During the experiments, the COD, pH, concentrations of dissolved oxygen and biomass were monitored. Microscopic analyses were performed to monitor the quality of activated sludge. Before starting with the bioremediation in the batch reactor, toxicity of the pharmaceutical wastewater was determined by toxicity test using bacteria *Vibrio fischeri*.

The obtained results showed that the effective concentration of the pharmaceutical wastewater was EC₅₀ = 17 % and toxicity impact index was TI₅₀ = 5.9, meaning that the untreated pharmaceutical industrial effluent must not be discharged into the environment before treatment.

The results of the pharmaceutical wastewater bioremediation process in the batch reactor are presented in Table 1. The ratio γ_{Xv}/γ_X maintained high values throughout all experiments and ranged from 0.90 and 0.95, suggesting that the concentrations of biomass remained unchanged during the experiments. The important kinetic parameters required for performance of the biological removal process, namely μ_{max} , K_s , K_i , Y and k_d were calculated from batch experiments (Table 2).

Figs. 1 and 2 show the experimental results of changes in concentrations of substrate $\gamma_{S0} = 5.01$ g dm⁻³ for different initial concentrations of activated sludge in comparison to Endo-Haldane model. Changes in concentrations of activated sludge during four days of experiments P1 and P2 are presented in Figs. 4 and 5, respectively. These results suggest that the bioremediation process is well described by the selected model.

Process efficiency of pharmaceutical wastewater treatment was approximately 64.8 % (Fig. 3), while in experiment P2 with bioaugmented activated sludge (Fig. 2), the same efficiency was obtained 24 hours earlier than in experiment P1 (Fig. 1).

Microscopic examination of the activated sludge (Fig. 6) showed that bioaugmentation has no effect on formation of the flocs, but increases efficiency of the bioremediation in a way that the pharmaceutical wastewater treatment is faster and more efficient with bioaugmented activated sludge (Table 3, Fig. 2).

Keywords

Kinetics, bioremediation, bioaugmentation, wastewater, pharmaceuticals

^a University of Zagreb
Faculty of Chemical Engineering
and Technology
Marulićev trg 19
10 000 Zagreb, Croatia

^b Pliva Hrvatska d.o.o.
Prilaz baruna Filipovića 25
10 000 Zagreb, Croatia

Original scientific paper
Received March 21, 2014
Accepted May 21, 2014