

AEROBNÍ MIKROORGANISMY UMOŽŇUJÍCÍ BIOREMEDIACI PŮDNÍ MATRICE KONTAMINOVANÉ TCE, DCE

M. Minařík, M. Sotolářová¹, J. Masák², A. Čejková², M. Pohludka², M. Siglová², V. Jirků²,

1) EPS, spol. s r.o., Hutník 1403, Veselí nad Moravou, e-mail: eps@epssro.cz

2) Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Technická 5, Praha 6,

Chlorované uhlovodíky jsou vysoce toxické a obtížně odbouratelné polutanty. Mezi nejrozšířenější kontaminanty této skupiny patří chlorovaná rozpouštědla, pesticidy a v neposlední řadě polychlorované bifenyly. Jejich perzistence (schopnost zůstat v prostředí po dlouhou dobu beze změny) v prostředí, je způsobena jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi a chemickou strukturou.

Jednou z možností odstraňování těchto polutantů (halogenovaných organických látek - HOL) je biodegradace, která je v tomto případě výrazně závislá na rozvětvení uhlovodíkového řetězce a hydrofobicitě. Pojem biodegradace je vyhrazen té biochemické aktivitě mikroorganismů, která podmiňuje degradaci materiálů a látek znečišťujících životní prostředí, a to v produkty méně toxické nebo produkty, které mohou být použity jako základní živiny jiných organismů¹⁵. Představuje významnou technologii při odstraňování organických látek ze životního prostředí. Základní součástí technologií je izolace vhodných kmenů bakterií, které jsou vybaveny schopností degradace sledované látky¹.

Účinnost biodegradace halogenovaných organických látek (HOL) je závislá na klíčových vlastnostech všech zúčastněných prvků, tj. enzymovém vybavení mikroorganismu, fyzikálně-chemické povaze polutantu a v neposlední řadě také na biotických a abiotických podmínkách vnějšího prostředí². V současné době je životní prostředí znečištěno celou řadou chemikálií. Proto technologie zaměřené na bioremediaci HOL mohou kompletně degradovat všechny přítomné polutanty, tedy i ty nehalogenované. Aerobní a anaerobní bakterie, popř. dvoustupňový proces sestávající z anaerobní dehalogenace látky vyskytující se ve vysokém oxidačním stupni a aerobní degradace vzniklých meziproductů, jsou schopny velice efektivně odstranit odpady obsahující směs chlorovaných organických látek². Určité riziko hromadění intermediátů (některé jsou velmi toxické) při takto složitém procesu vždy existuje (zejména u anaerobní degradace). Z tohoto důvodu bylo hlavním cílem nalezení a ověření takových kmenů a technologie, kde by akumulace intermediátů byla minimalizována.

Existují čtyři hlavní typy reakcí, kterými jsou bakterie schopny rozštěpit vazbu C-Cl:

- Oxidace
- Redukce
- Substitute - např. hydrolytická
- Eliminace

Jsou popsány tři hlavní metabolické dráhy, pomocí kterých dochází k odbourávání HOL:

- Začlenění do centrálního metabolismu
- HOL je finálním akceptorem elektronů
- Kometabolismem

ad 1) Začleněním molekuly polutantu do centrálního metabolismu rozumíme úpravu jeho chemické struktury adekvátní metabolickou reakcí a zapojení této molekuly do již existující metabolické dráhy. Příkladem mohou být methylotrofní a methanotrofní bakterie².

ad 2) Byly nalezeny a prostudovány některé mikroorganismy, které jsou schopny redukovat HOL za současné produkce ATP. Příkladem může být redukce 3-chlorbenzoátu na benzoát u *Desulfomonile tidjei*, či reduktivní dechlorace tetrachlorethenu na 1,2-dichloroethen u *Dehalobacter restrictus*².

ad 3) Bakterie, mající ve svém enzymatickém vybavení široké spektrum katabolických enzymů, mohou transformovat HOL bez jejich zapojení do metabolismu energie či uhlíku. Tento proces se nazývá kometabolismus.

Tetrachlorethen je vysoce perzistentní³ a současně velice rozšířeným kontaminantem spodních vod a půd. V aerobních podmínkách je degradace nemožná, jelikož tetrachlorethen se vyskytuje ve vysokém oxidačním stupni a tudíž nepodléhá oxidaci⁴. V anaerobních podmínkách PCE může být reduktivně dechlorován. Bylo nalezeno nejméně patnáct organismů z rozdílných metabolických skupin, které jsou schopny za anaerobních podmínek metabolizovat PCE⁴. Pomocí těchto mikroorganismů pak PCE může být úplně dechlorován na neškodné produkty jako je ethen, ethan, oxid uhličitý a chlor. Problémem této degradace je však fakt, že dochází k akumulaci meziproductů jako je především cis-1,2-dichlorethen, trichlorethen a vinylchlorid, které jsou více toxické, než samotný PCE⁵. Řešením tohoto problému byla dvoustupňová biodegradace PCE, kdy v prvním kroku v anaerobních podmínkách dochází k reduktivní dechloraci PCE za vzniku méně chlorovaných ethenů a v kroku druhém při aerobních podmínkách k biodegradaci toxických intermediátů.

Trichlorethen (TCE) je rovněž jako tetrachlorethen kontaminantem spodních vod a půd³. Methanotrofní bakterie, které jsou schopny degradovat TCE a to kometabolismem²¹ mají ve svém enzymovém vybavení monooxygenasy (MMO)⁶. Tyto mikroorganismy syntetizující MMO, které mají široký rozsah substrátové aktivity, kompletně degradují TCE. V přírodě také probíhá anaerobní biodegradace TCE pomocí anaerobních bakterií², avšak dochází ke vzniku vysoce toxického vinylchloridu. Proto tento způsob detoxikace nenašel své uplatnění.

Životní činnost mikroorganismů, jejich vývoj i veškeré aktivity jsou závislé na fyzikálních, chemických a biologických faktorech^{7,8}. Aby se mohly mikroorganismy rozmnožovat, musí být v prostředí jak dostatečné množství látek pro syntézu buněčné hmoty a dostatečné množství zdroje využitelné energie, tak i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se značně přizpůsobovat vnějším podmínkám změnou enzymového vybavení svých buněk⁷.

Rozsah vnějších podmínek, ve kterých jsou mikroorganismy schopny růst a disponovat enzymovou aktivitou nutnou pro proces biodegradace, jsou rodově značně rozdílné. Mezi nejdůležitější faktory vnějšího prostředí, ovlivňující činnost mikroorganismů je bezesporu kvalita nutrientů a jejich dostupnost pro mikroorganismy, dále teplota, pH, iontová síla, přítomnost toxinů, přítomnost kyslíku a také hydrostatický tlak^{7,9}.

Živiny z prostředí musí pokrývat veškeré požadavky mikroorganismů na energii a na stavební kameny pro syntézu buněčné hmoty. Přítomnost uhlovodíků v prostředí, které obsahuje málo anorganických živin, znamená vysoký poměr C:N a C:P, což nepříznivě ovlivňuje mikrobiální růst. Vhodného poměru C:N:P se dosahuje přidáním asimilovatelného zdroje těchto prvků⁷.

Živné prostředí musí obsahovat dostatečné množství vody, neboť veškeré reakce probíhající v živých organismech vyžadují vodné prostředí a určitou vodní aktivitu. Vodní aktivita umožňující jak rozmnožování tak průběh biodegradace se pohybuje v rozmezí 0,99-0,93⁷.

Teplota prostředí do značné míry determinuje skladbu mikrobiální populace v otevřeném biologickém systému. V přírodě, kde dochází ke změnám ročních období a potažmo i ke změnám teplot, dochází v závislosti na teplotě také ke zvyšování či snižování mikrobiální aktivity. Většina biodegradčních procesů probíhá při teplotách vhodných pro mezofilní a psychofilní kmeny.

Růst mikroorganismů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat jen v určitém rozmezí pH. Většina bakterií roste v kyselém či slabě alkalickém prostředí⁷.

Mikroorganismy se značně liší svým vztahem ke kyslíku, a proto také vyžadují různý oxidačně-redukční potenciál. Aerobní mikroorganismy vyžadují přítomnost rozpuštěného kyslíku, a tedy pozitivní oxidačně-redukční potenciál. Rozpustnost kyslíku v kapalinách je poměrně nízká a klesá se stoupající teplotou. Proto je nutné při submerzním pěstování aerobních mikroorganismů v kultivačních nádobách přivádět stlačený vzduch ke dnu a zajišťovat dokonalé rozptýlení v jemné bublinky v celém objemu kultivačního prostředí. V důsledku aerobního metabolismu a spotřeby kyslíku rychle klesá oxidačně-redukční potenciál kultivačního prostředí, a proto musí provzdušňování probíhat nepřetržitě⁷.

V případě biologických procesů se musí uvažovat minimální koncentrace substrátu, pod jejíž hladinou už degradace neprobíhá. Tato koncentrace je dána hladinou nutnou pro indukci enzymů, spotřebou energie na maintenance účely apod. Při odbourávání polutantů kometabolismem se využívá enzymové nespecifity a proto je nutné primární („růstový“) substrát udržovat při minimální koncentraci a polutant v co nejvyšší koncentraci. Polutant se však musí stále udržovat pod letální koncentrací.

Testované aerobní mikrobiální kmeny *Rhodococcus erythropolis*, *Xanthobacter autotrophicus* a *Sphingomonas paucimobilis* jsou vybaveny enzymovou aktivitou umožňující dehalogenaci alifatických a aromatických halogenovaných uhlovodíků¹⁰. Pro ověření možnosti aplikace uvedených mikroorganismů v rámci vývoje bioremediačních technologií byl sledován vliv podmínek vnějšího prostředí na jejich reprodukční aktivitu a aktivitu enzymů klíčových pro dechloraci. Žádný z kmenů není schopen využívat PCE, TCE a *trans*-DCE jako jediný zdroj uhlíku a energie.

V našem případě aplikace výše uvedených mikrobiálních kmenů probíhá biodegradace halogenovaných organických látek kometabolismem tzn., že samotné znečištění (TCE, DCE) neslouží jako primární zdroj uhlíku a energie pro tyto mikroorganismy. Aplikované mikroorganismy mají ve svém enzymatickém vybavení široké spektrum katabolických enzymů, kterými transformují halogenované organické látky aniž je přímo využijí jako zdroj uhlíku či energie.

Byl sledován vliv polutantu na růst mikroorganismů a zjištění jejich letálních koncentrací v podmínkách aerobních. Podle výsledků růstových křivek sledovaných mikroorganismů je možno konstatovat, že mezi těmito mikroorganismy jsou difference. *Rhodococcus erythropolis* má výrazně kratší lag fázi (12 hod) oproti *Xanthobacter autotrophicus* (32 hod) a *Sphingomonas paucimobilis* (32 hod) a to o dvacet hodin, nicméně celkový nárůst biomasy ve stacionární fázi růstu je u všech kmenů srovnatelný. Nasycené roztoky PCE a TCE na sledované kmeny nepůsobí toxicky a výrazně neovlivňují jejich růst, pouze u kmene *Sphingomonas paucimobilis* je lag fáze v přítomnosti polutantu o dvacet hodin delší než kultivace bez přítomnosti polutantu.

Dále byl sledován vliv statické kultivace v podmínkách aerobních a anaerobních. Růst u sledovaných bakterií je jak v přítomnosti polutantu, tak v jeho nepřítomnosti v anaerobních statických kultivacích méně intenzivní než u kultivací statických aerobních, nicméně všechny tři bakterie jsou schopny růstu v nasyceném roztoku PCE, TCE i tDCE, pouze *Sphingomonas paucimobilis* v nasyceném roztoku tDCE neroste. U všech kultivací nebyl vizuálně pozorovatelný rozdíl nárůstu biomasy po sedmi dnech a po šestnácti dnech.

Sledována byla také závislost růstu mikroorganismů na kvalitě a kvantitě substrátu. Největší nárůst biomasy byl zaznamenán na melase a glukose, naopak nejhorší na methanolu. Zajímavé jsou růstové křivky, kde v případě kultivace na syrovátce, methanolu a ethanolu byl zaznamenán růst rovnoměrný v čase a není patrný přechod ani do exponenciální, ani do stacionární fáze růstu. U těchto substrátů byl největší nárůst při koncentraci 1 g/l. Při srovnání všech tří bakterií je možno konstatovat, že nejlepší nárůsty byly zaznamenány na glukose a na melase. Tento výsledek se dal očekávat, jelikož glukosa je nejnázveji využitelným zdrojem uhlíku a energie a melasa kromě snadno využitelného zdroje uhlíku a energie (sacharosa) obsahuje také různé aminokyseliny a jiné růstové faktory, které pozitivně ovlivňují růst. Nicméně všechny tři bakterie jsou schopny růstu na všech sledovaných růstových

substrátech, kdy minimální koncentrace jednotlivých substrátů se pohybují u glukosy cca 0,6 g.l⁻¹, u melasy cca 1,1 g.l⁻¹, u surovátky cca 0,6 g.l⁻¹, u methanolu cca 1,5 g.l⁻¹ a u ethanolu cca 0,6 g.l⁻¹.

Zpravidla k neoptimálnějšímu růstu testovaných kmenů dochází při teplotě 23°C na testovaných polutantech, při 13°C dochází zpravidla k významnějšímu zpomalení růstu, při 8°C je růst již nevýznamný.

U všech sledovaných mikroorganismů se pro průběh biodegradace optimální pH od 4 do 8. Tato skutečnost dává možnost maximálního využití enzymatického aparátu sledovaných bakterií pro detoxikaci půd, jelikož pH půdy je ideální pro biodegradaci TCE a její vysoká pufrací kapacita toto pH udržuje i přes vznik kyselých metabolitů při rozmnožování a růstu bakterií, které v laboratorních kultivacích sníží pH až na hodnotu 2 a v tomto prostředí dochází k inhibici růstu.

Kromě vhodného C-zdroje vyžadují testované kmeny pouze základní minerální nutrienty. Vhodného poměru C:N:P se dosahuje přidáním asimilovatelného zdroje těchto prvků.

Ačkoli použité mikroorganismy preferují aerobní prostředí, jsou schopné tolerovat i anoxické podmínky. Prokázalo se, že v přítomnosti primárního zdroje uhlíku a energie (např. 1 g l⁻¹ glukosy) je dechlorace TCE obecnou vlastností sledovaných mikrobiálních kmenů ve výše uvedeném rozpětí podmínek vnějšího prostředí.

Při sledování biodegradace TCE v průběhu růstu bylo zjištěno, že po 48 h kultivaci *R. erythropolis* v mediu saturovaném TCE došlo k uvolnění 8,3 mg l⁻¹ Cl⁻. Za předpokladu, že došlo ke 100 % dechloraci, to odpovídá 10,3 mg l⁻¹ TCE. Proces dechlorace pomocí *X. autotrophicus* nebo *S. paucimobilis* probíhal s určitou dobou lagu (asi 30 h). Obdobné hladiny uvolněných Cl⁻ bylo dosaženo po 96 h kultivace.

ZÁVĚR:

1. TCE, PCE a tDCE nemá v metabolismu bakterií *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Xanthobacter autotrophicus* funkci růstového substrátu.
2. TCE a PCE v aerobním třepaném i statickém systému zásadně neovlivňuje růst sledovaných bakterií a tudíž lze tyto bakterie exponovat nasyceným roztokem těchto polutantů. tDCE nepůsobí letálně na bakterie na *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas paucimobilis*, avšak *Xanthobacter autotrophicus* v prostředí tDCE není schopen růstu. Při anaerobní statické kultivaci jsou bakterie schopny růstu v nasyceném roztoku PCE, TCE i tDCE, pouze *Sphingomonas paucimobilis* v nasyceném roztoku tDCE neroste.
3. Byly nalezeny ideální podmínky (primární substrát, teplota a pH) pro růst bakterie *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Xanthobacter autotrophicus*.
4. Byla optimalizována spektrofotometrická metoda na detekci uvolněných chloridů z polutantu během biodegradace.
5. Všechny sledované bakterie jsou schopny degradovat TCE v aerobním systému, přičemž jejich degradační schopnost je podobná a probíhá v průběhu celé růstové křivky, maximální koncentrace chloridů uvolněných z TCE je 13,1 mg/l. Průběh biodegradace je u všech sledovaných bakterií ovlivněn teplotou, pH, růstovým substrátem a třepáním. Po půl ročním vystavování bakterií nasyceným roztokům TCE nedošlo ke změně biodegradační aktivity.

Na základě těchto výsledků byla vyvinuta nová technologie, která využívá aktivity konkrétních kontaminant degradujících alochtonních mikroorganismů (*Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Xanthobacter autotrophicus*) ke konverzi kontaminujících látek vedoucích k úplné mineralizaci kontaminantů na anorganické látky. Jedná se o nepatogenní, netoxické, otestované mikroaerofilní kmeny, které dokáží halogenované uhlovodíky rozkládat cestou kometabolismu.

Vícestupňovým kultivačním procesem je připraveno inokulum, které je dále aplikováno do sanovaných prostorů. Technologie je aplikována v těch případech, kdy nelze dostatečně efektivně stimulovat aktivní autochtonní mikrobiotu např. tam, kde lze jen obtížně udržovat vhodné podmínky

pro autochtonní mikroflóru nebo tam, kde existuje určitá fatální limitace pro autochtonní mikroflóru nebo tato mikroflóra nemá dostatečný potenciál dostatečně rychle odstranit přítomné znečištění na lokalitě. Součástí technologie je samozřejmě monitorování a odstraňování limitace bioremediačního procesu nedostatkem primárního zdroje uhlíku a energie, kyslíku nebo základních nutrientů apod.

Při aplikaci této technologie s mikroaerobními kmeny je při degradaci TCE, DCE minimalizována tvorba intermediátů jako např. vinylchloridu. Tuto technologii je možno kombinovat také ostatními technologiemi jako sanační čerpání, chemická oxidace (aplikace jen v centru znečištění s PCE), propustné bariéry s Fe^0 (docílení takové koncentrace polutantu, kterou již dále snižuje instalovaná bariéra).

Použitá literatura:

1. *Biodegradace organických kontaminantů*. [online]. Datum publikování 5.1.1997. Datum poslední revize 1.2.2004 [citováno dne 6.3.2004]. <<http://www.mikrochem.cz/pages/biodegradace.htm>>
2. Alexander, M.: *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, London, 1999.
3. Fogel, M. M., Taddeo, A.R., Fogel S.: Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture, *Appl Environ Microbiol.*, 51. 720–724 (1986).
4. Damborský, J.: Tetrachlorethene-Dehalogenating Bacteria, *Folia Microbiol.* 44, 247-249 (1999).
5. Gerritse, J., Kloetstra, G., Borger, A.: Complete degradation of tetrachlorethene in coupled anoxic and oxic chemostats. 1999.
6. Neilson, A.H.: The biodegradation of halogenated organic compounds, *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 445-452 (1990).
7. Šilhánková, L. : *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*, 2.vyd. Academia Praha, 1995.
8. *Environmental growth conditions* [online]. [Citováno dne 23.2.2004]. <<http://xoomer.virgilio.it/medicine/growthconditions.html>>
9. Peterson, C.: *Aerobic Degradation of Trichlorethylene* 1999 [online]. Datum publikování a poslední revize 5.4.1999 [citováno dne 6.3.2004]. <<http://class.et.byu.edu/ce540/termpaper/1999-W/petersonc.pdf>>