

## AEROBNÍ BIODEGRADACE odstraňující TCE, DCE AEROBIC BIODEGRADATION REMOVING TCE, DCE

Miroslav Minařík<sup>1)</sup>, Markéta Sotolářová<sup>1)</sup>, Martina Siglová<sup>2)</sup>, Jan Masák<sup>2)</sup>

1) EPS, s.r.o., Hutník 1403, CZ-69801 Veselí nad Moravou, e-mail: [eps@epssro.cz](mailto:eps@epssro.cz)

2) VŠCHT, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Technická 5, CZ-16628 Praha 6

**Abstrakt:** Chlorinated hydrocarbons can be removed by various technologies – reductive dehalogenation, reactive walls or oxidation. Aerobic biodegradation of TCE, DCE by special microaerophilic bacteria is a developed remedial technology able to covert pollution by chlorinated hydrocarbons to water, carbon dioxide and  $Cl^-$  and can be controlled.

Odstraňování ropných látek a jejich derivátů je možné různými technologiemi. Jejich bioremediace je již velmi dobře teoreticky, i prakticky zvládnuta a mnohokrát ověřena. Dalším nejrozšířenějším polutantem jsou však **chlorované uhlovodíky** (halogenované organické látky – HOL), které jsou vysoce toxické a obtížně odbouratelné. Jsou těžší než voda a proto se akumulují na bázi kolektoru. Do této skupiny patří chlorovaná rozpouštědla, pesticidy, polychlorované bifenyly apod.

Tyto HOL byly dosud odstraňovány reduktivní dehalogenací (technologie při níž hrozí tvorba a akumulace intermediátů včetně velmi toxických např. vinylchloridu, je relativně dlouhodobá), chemickou oxidací (technologie při níž se prostředí výrazně mění - oxiduje a desinfikuje s tvorbou solí a oxidů např. Mn, je relativně krátkodobá), propustných reaktivních bariér s náplní např.  $Fe^0$  (technologie závislá na vstupní koncentraci HOL, obtížně říditelná, je relativně dlouhodobá a stavebně náročná).

Důstojnou alternativou nebo doplněním dříve aplikovaných technologií je aerobní biodegradace trichlorethenu (TCE), dichlorethenu (DCE). Biodegradací je myšlena biochemická aktivita mikroorganismů, která podmiňuje rozklad polutantů v produkty méně toxické nebo produkty, které mohou být využity jinými organismy jako základní nutrienty. Účinnost biodegradace HOL je závislá na klíčových vlastnostech všech zúčastněných prvků, tj. enzymovém vybavení mikroorganismu, fyzikálně-chemické povaze polutantu a v poslední řadě také na biotických a abiotických podmínkách vnějšího prostředí.

Technologie aerobní biodegradace TCE, DCE byla vyvíjena, testována a schválena s mikroaerofilními kmeny *Rhodococcus erythropolis*, *Xanthobacter autotrophicus* a *Sphingomonas paucimobilis*, které jsou vybaveny enzymovou aktivitou umožňující dehalogenaci alifatických a aromatických halogenovaných uhlovodíků. 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. Mezi nejdůležitější faktory vnějšího prostředí, ovlivňující činnost mikroorganismů patří bezesporu kvalita nutrientů, primárního příp. sekundárního substrátu a jejich dostupnost pro mikroorganismy, dále přítomnost kyslíku, teplota, pH, iontová síla, vlhkost, přítomnost toxinů. Pro ověření možností aplikace uvedených mikroorganismů v rámci vývoje bioremediační technologie EPS-CLU byl sledován vliv podmínek vnějšího prostředí na jejich reprodukční aktivitu a aktivitu enzymů klíčových pro dehalogenaci. Žádný z kmenů není dosud schopen využívat PCE, TCE a *trans*-DCE jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Byl sledován vliv koncentrace TCE, DCE na růst mikroorganismů v aerobních podmínkách. Podle výsledků růstových křivek sledovaných mikroorganismů je možno konstatovat, že mezi těmito mikroorganismy jsou diference. *R. erythropolis* má výrazně kratší lag fázi (12 hod) oproti *X. autotrophicus* (30 hod) a *S. paucimobilis* (30 hod), 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.

Při sledování biodegradace TCE v průběhu růstu bylo zjištěno, že po 48 h kultivaci *R. erythropolis* v mediu saturovaném TCE došlo k uvolnění  $8,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cl}^-$ . Za předpokladu, že došlo ke 100 % dehalogenaci, to odpovídá  $13,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ TCE}$ . Proces dehalogenace pomocí *X. autotrophicus* nebo *S. paucimobilis* probíhal s určitou dobou lagu (asi 30 h). Obdobné hladiny uvolněných  $\text{Cl}^-$  iontů bylo dosaženo po 96 hod kultivace.

Byl sledován vliv statické kultivace v podmínkách aerobních a anaerobních. Růst u sledovaných bakterií je jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti polutantu v anaerobních statických kultivacích méně intenzivní než u aerobních statických kultivací. Všechny tři bakterie jsou schopny růstu v nasyceném roztoku PCE, TCE i tDCE (s výjimkou u tDCE, kde neroste *Sphingomonas paucimobilis*). Tyto mikroorganismy optimálně rostou při nízké koncentraci rozpuštěného kyslíku (pozitivním oxidačně-redukčním potenciálu), jsou však schopné tolerovat i anoxické podmínky.

Byla sledována závislost růstu mikroorganismů na kvalitě a kvantitě substrátu. Testované mikroorganismy mají ve svém enzymatickém vybavení široké spektrum katabolických enzymů, kterými transformují HOL tkz. kometabolismem. Polutanty (TCE, tDCE) dosud neslouží těmto mikroorganismům jako primární zdroj uhlíku a energie. Aplikuje se proto zatím minimálně potřebná koncentrace („růstového“) substrátu. Tato minimální koncentrace je nutná pro indukci enzymů, spotřebu energie apod. Zajímavé byly růstové křivky, kde v případě kultivace na syrovátce, methanolu a ethanolu byl zaznamenán růst rovnoměrný v čase a nebyl patrný přechod ani do exponenciální, ani do stacionární fáze růstu. Nejvyšší reprodukční aktivita mikroorganismů byla zaznamenána na glukose a na melase. Tento výsledek se dal očekávat, jelikož glukosa je nejnázneji 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. Všechny tři bakterie jsou schopny růstu na všech testovaných růstových substrátech. Minimální koncentrace byly u glukosy cca  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ , u melasy cca  $1,1 \text{ g.l}^{-1}$ , u syrovátky cca  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ , u methanolu cca  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  a u ethanolu cca  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ .

Byl sledován vliv teploty na růst testovaných kmenů na TCE, DCE. Při teplotě  $23^\circ\text{C}$  docházelo k rovnoměrnému růstu, při  $13^\circ\text{C}$  začínalo být patrné zpomalení růstu, při  $8^\circ\text{C}$  byl růst mikroorganismů výrazně zpomalený.

Byl sledován vliv vodíkových iontů (pH), který výrazně ovlivňuje růst mikroorganismů i jejich biochemickou činnost. U sledovaných mikroorganismů se pro průběh biodegradace jeví jako optimální poměrně široké rozmezí pH od 4 do 8. Tato skutečnost dává možnost maximálního využití enzymatického aparátu sledovaných bakterií při reálných sanacích.

## ZÁVĚRY:

- PCE, TCE a tDCE nemá v metabolismu bakterií *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Xanthobacter autotrophicus* zatím funkci růstového substrátu.
- PCE, TCE a tDCE v aerobním třepaném i statickém systému zásadně neovlivňuje růst sledovaných bakterií a tudíž lze tyto bakterie exponovat nasyceným roztokům HOL.
- Byly nalezeny ideální podmínky (primární substrát, teplota, kyslík a pH) pro růst bakterie *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Xanthobacter autotrophicus*.
- Všechny sledované bakterie jsou schopny degradovat TCE, tDCE 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<sup>-1</sup>.

Na základě těchto výsledků byla vyvinuta nová technologie, která využívá 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 alifatické a aromatické chlorované uhlovodíky z životního prostředí odstraňovat bez tvorby a akumulace intermediátů např. vinylchloridu.

Touto technologií EPS-CLU je možno nahradit dřívější technologie odstraňování TCE, DCE nebo ji kombinovat s těmito technologiemi, protože pak v kombinaci se sanačním čerpáním může synergicky akcelerovat odstraňování HOL a výrazně zkracovat dobu sanace, u reduktivní dehalogenace může odstraňovat hromadící se DCE, vinylchloridu, u chemické oxidace může minimalizovat negativní dopady tvorby oxidů a solí Mn a minimalizovat narušení přirozeného společenstva organismů, u propustných bariér s náplní např. Fe<sup>0</sup> může trvale snížit koncentrace polutantu tak, aby zbytková koncentrace polutantu vstupujícího do reaktivní bariéry byla bezpečně odbourána.

Víceúrovňovým kultivačním procesem se připravuje inokulum, které je dále aplikováno do sanovaných prostorů konkrétní lokality. Testované mikroorganismy je tedy možno kultivovat a stimulovat a dosáhnout tak poměrně zajímavých biodegradačních rychlostí. Součástí technologie je samozřejmě detailní monitorování procesu biodegradace a odstraňování limitace bioremediačního procesu nedostatkem primárního zdroje uhlíku, energie, kyslíku nebo základních nutrientů apod.

Výhodou této technologie (EPS-CLU) aerobní degradace TCE, DCE je, že je možno celý biodegradační proces výrazně řídit.

