

AEROBNÍ KOMETABOLIZMUS ODSTRAŇUJÍCÍ TCE, DCE

AEROBIC COMETABOLISM REMOVING TCE, DCE

Miroslav Minařík¹, Markéta Sotolářová¹, Želmíra Greifová¹

1) EPS, s.r.o., Hutník 1403, CZ-69801 Veselí nad Moravou, e-mail: eps@epsro.cz

2) INPOS Slovakia, s.r.o., Lazany 259, SK-97211 Lazany pri Prievidzi

Abstract: Chlorinated hydrocarbons can be removed by various technologies – reductive dehalogenation, reactive walls or oxidation. Aerobic cometabolism 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.

Key words: aerobic cometabolism of TCE, DCE

Klíčová slova: aerobní kometabolizmus TCE, DCE

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.

Bioremediace chlorovaných rozpouštědel (TCE, PCE) byla velice úspěšná v anaerobních podmínkách – reduktivní dehalogenace. Nicméně tento úspěch byl limitován tvorbou a akumulací DCE a VC (toxické, karcinogenní látky). Také udržet anaerobní podmínky po celou dobu je velice složité a z tohoto důvodu je velice komplikované celý proces odborně řídit a kontrolovat. Další úspěšná technologie schopná odstranit HOL je chemická oxidace (technologie při níž se prostředí výrazně mění - oxiduje a desinfikuje s tvorbou solí a oxidů např. Mn, je relativně krátkodobá) a propustné reaktivní bariéry s náplní např. Fe^0 (technologie závislá na vstupní koncentraci HOL, obtížně říditelná, je relativně dlouhodobá a stavebně náročná).

Inovační technologií, která je schopná rozložit znečištění trichlorethenu (TCE) a dichlorethenu DCE, je aerobní kometabolizmus. Tato technologie využívá zdokonalený mikrobiální kometabolizmus TCE, DCE, který rozloží tyto látky na látky anorganické. Kometabolizmus chlorovaných rozpouštědel monooxygenázou (enzym) byl demonstrován na TCE a DCE.

Technologie aerobního degradace 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. Mikroorganismy byly izolovány ze znečištěné půdy, kde se přirozeně vyskytující organizmy adaptovaly a vyvinula se jejich schopnost kometabolizovat polutanty. 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 možnosti 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.

Životní činnost mikroorganismů, jejich vývoj i veškeré aktivity jsou závislé na fyzikálních, chemických a biologických faktorech (Šilhánková, 1995). 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 buněk (Šilhánková, 1995).

Mezi nejdůležitější faktory vnějšího prostředí, ovlivňující činnost mikroorganismů patří bezesporu (Šilhánková, 1995):

1. kvantita a kvalita polutantu,
2. kvalita substrátu,
3. přítomnost kyslíku,

4. kvalita nutriëntů a jejich dostupnost pro mikroorganismy,
5. teplota,
6. pH, iontová síla,
7. přítomnost toxinů a také hydrostatický tlak.

ad 1) 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 Cl^- iontů bylo dosaženo po 96 hod kultivace.

ad 2) 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.

ad 3) 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 nejnázeji 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. Koncentrace primárního substrátu je závislá na koncentraci mikroorganismů schopných degradovat přítomné znečištění.

ad 4) Kromě vhodného C-zdroje vyžadují testované kmeny pouze základní minerální nutrienty. Vhodného poměru C:N:P se dosahuje přidáním asimilovatelného zdroje těchto prvků. 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 prvků.

ad 5) Byl sledován vliv teploty na růst testovaných kmenů na TCE, DCE. Při teplotě 23°C docházelo k rovnoměrnému růstu, při 13°C začínalo být patrné zpomalení růstu, při 8°C byl růst mikroorganismů výrazně zpomalený.

ad 6) 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⁻¹.

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 akcelarovat 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. Fe⁰ může trvale snížit koncentrace polutantu tak, aby zbytková koncentrace polutantu vstupujícího do reaktivní bariéry byla bezpečně odbourána.

Výhody bioremediace TCE, DCE jsou právě v aerobní procesu – koncentrace kyslíku v horninovém prostředí je dostatečná, aby proběhl aerobní kometabolismus (při nedostatku se kyslík dotuje úplně stejně jako při biodegradaci ropných uhlovodíků). Primární substrát a bakteriální roztok je dodáván do horninového prostředí v roztoku s nízkou viskozitou aplikačními objekty (sondy, vrty, případně infiltrační rýhy). Nespornou výhodou této technologie (EPS-CLU) aerobní degradace TCE, DCE je, že je možno celý biodegradační proces výrazně řídit.

LITERATURA:

1. 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).
2. Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.L.: Transformations of halogenated aliphatic compounds, *Appl Environ Microbiol.*, 21, 722-732 (1987).
3. Neilson, A.H.: The biodegradation of halogenated organic compounds, *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 445-452 (1990).
4. Jirků, V. : *Moderní biotechnologie a bioekologie I*, VŠCHT, Praha, 1991
5. Monticello, D.J., Bakker, D., Finnerty, W.R.: Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 49. 756-765 (1985).
6. Alexander, M.: *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, London, 1999.
7. Damborský, J.: Tetrachlorethene-Dehalogenating Bacteria, *Folia Microbiol.* 44, 247-249 (1999).
8. Gerritse, J., Kloetstra, G., Borger, A.: Complete degradation of tetrachlorethene in coupled anoxic and oxic chemostats. 1999.
9. Bumpus, J.A., Aust, S.D.: Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Environ Microbiol.*, 53. 2001–2008 (1987).
10. Šilhánková, L. : *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*, 2.vyd. Academia Praha, 1995.
11. Middleditch, B.S., Leeps, P.S.K. : Patent US 5369031, 29.11.1994.
12. Bonnet-Smits, E.M., Robertson, L.A., Van Dijken, J.P., Senior, E., Kuenen, J.G.: *J.Gen.Mikrobiol.*. 134. 2281-2289 (1998).
13. Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2.vyd. Praha, Academia 1999.
14. Zall, D.M., Fischer, D., Garner, M.Q.: Photometric Determination of Chlorides in Water, *Anal. Chem.*, 28. 1665-1668 (1956).
15. Volka, K.: *Analytická chemie II*, VŠCHT Praha 1997.
16. Brown, S.D., Muralidhara, S., Bruckner, J.V. and all: Trace level determination of trichloroethylene from liver, lung and kidney tissues by gas chromatography–magnetic sector mass spectrometry, *J. Chromatography B.* 783. 319–325 (2003).

biotechnologie