

Bioremediace kontaminací způsobených ropnými uhlovodíky

Jiří Mikeš

EPS, s.r.o. V Pastouškách 205, 686 04 jiri.mikes@epsro.cz www.epsro.cz

Pozornost věnovaná spojení ropných látek v kontextu biologických dějů není čistě náhodná. Oblastí, kde se tato témata protínají, lze nalézt bezpočet. Již jen samotná participace biologické síly na utváření ložisek ropy sama o sobě vypovídá, že spojení biologie a ropy je velmi těsné. V praktické rovině si zasluhuje zdůraznit existenci takových typů látkových přeměn, v nichž ropné uhlovodíky figurují jako zdroj uhlíku a energie. Existence jak aerobní, tak anaerobní transformace těchto sloučenin byla, je a v neposlední řadě bude využívána v technologických aplikacích. Do této oblasti se shrnují jak technologie produkce biomasy na substrátech tvořených ropnými frakcemi, tak především využití mikroorganismů v rozkladu ropných látek přítomných v prostředí jako antropogenní kontaminace. V neposlední řadě se však sluší uvést, že existuje i rovina negativní, jíž je škodlivé působení mikrobiálních činitelů rezultující v zhoršování kvality výrobků z ropy a poškozování produktovou a rezervoárů (tzv. *biodeteriorace*). Již jen stopová přítomnost vody je spouštěčem biologických procesů, které rezultují např. v korozi tanků a zásobníků pohonných hmot. Převažují však aplikace užitečné a i zmíněný biodeteriorační účinek je možné překloupat do podoby cenného zdroje informací nejenom o omezení jeho vlivu, tak především do podoby technologického využití. Tento příspěvek je profilovým zmapováním současné situace v oblasti role biologického činitele ve světle ropných látek a životního prostředí.

Úvod a struktura příspěvku

Mikrobiální populace se v průběhu své evoluce adaptovaly na využití nepolárních látek jako svého substrátu pro uskutečnění fyziologických a metabolických aktivit. Substrátem se v obecné rovině rozumí zdroj využitelných látek, jejichž transformací získávají organismy uhlík, jež asimilují v rámci obnovy a rozvoje svých buněčných struktur, a energie, která saturuje potřeby spojené s jejich růstem a reprodukcí. Nepolární látky zahrnují široké spektrum chemických látek. Jako vhodného reprezentanta lze zvolit obecně lipid, jenž definičně představuje ester glycerolu a mastných kyselin. Nepolární řetězce mastných kyselin svou strukturální podobností s alifatickými uhlovodíky umožňují využití stejných enzymových nástrojů. Právě díky tomu představuje ropa i její průmyslově vyráběné produkty (benzín, kerosin, nafta, mazut) spektrum látek, jež je transformováno biologicky cestou ať již nechtěně (biokoroze nádrží pohonných hmot, produktovody), tak cíleně, bioremediace míst kontaminovaných těmito typy látek.

V první části příspěvku je definován objekt zájmu – ropa a petrochemické produkty, s důrazem na skutečnost, že tyto typy látek představují substrát pro mikrobiální populace, jinými slovy zdroj uhlíku a energie pro jejich fyziologické a metabolické projevy. Mikroorganismy, které jsou schopné ropné látky jako svůj substrát využívat, následně lze uchopit mimo jiné jako potenciální (bio)technologický nástroj pro řešení problémů spojených s kontaminací životního prostředí. Své uplatnění však nachází rovněž ve vlastní rafinérské technologii a v neposlední řadě je však nutné uvést i jejich úlohu negativní – poškozování zařízení výroby a distribuce, resp. snižování kvality petrochemických produktů. Efektivní využití poznatků o interakci mikroorganismu – ropa je

možné pouze tehdy, jsou-li známy limity biologické transformace ropných látek a také klíčové parametry, mezi které na prvním místě musí být označena tzv. biologická dostupnost (*bioavailability*) ropných uhlovodíků. Tuto teoretickou pasáž uzavírá stručné představení vědecké disciplíny, v anglosaském světě známé jako *petroleum microbiology*, ropná mikrobiologie. Druhá část příspěvku je věnovaná podstatě biologické přeměny ropných látek v technologickém kontextu. Aerobní a anaerobní biodegradace představují klíčový proces jak v dějích spojených s přirozenou atenuací, tak v oblasti inženýrsky koncipovaných zákroků (sanační inženýrství). Pasáž uzavírají ekonomické, metodické a legislativní aspekty bioremediace ropných látek a v závěrečném shrnutí jsou nastíněny perspektivy a možnosti vyplývající z vědeckého i technologického pokroku v této oblasti.

Ropa a petrochemické produkty

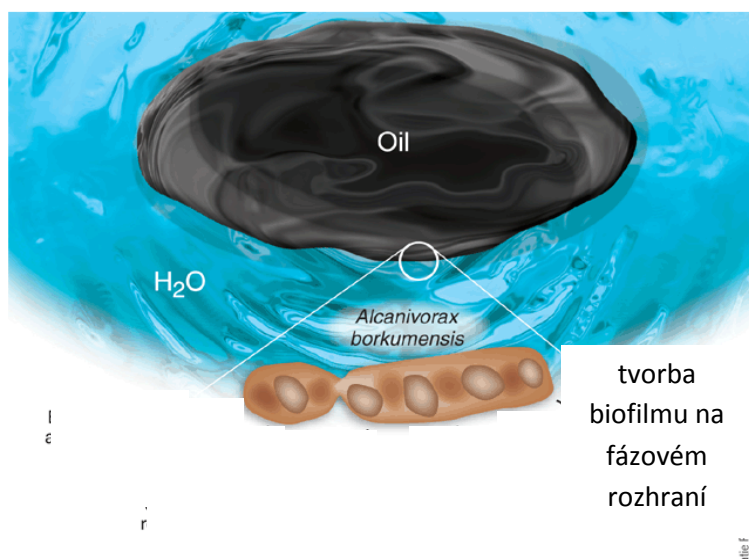
Odpověď na klíčovou otázku, proč ropa a produkty z ní vyrobené mohou sloužit jako substrát pro mikroorganismy, je skutečnost, že tyto látky v rámci mikrobiálního metabolismu představují zdroj uhlíku a energie. Jinými slovy, slouží jako zdroj (donor) elektronů, tedy jsou příkladem sloučenin v nižším oxidačním stupni a jejich oxidací se elektrony přesouvají na vhodné akceptory elektronů (např. kyslík, sírany, dusičnany) a uvedený tok elektronů je hnací silou energetického metabolismu buněk mikroorganismů disponujících těmito schopnostmi. Důležitým poznatkem je jejich strukturální podobnost s tuky (lipidy) a jinými přirozenými nepolárními látkami, vůči kterým si celá řada mikroorganismů v evolučním průběhu vytvořila vhodné enzymové nástroje, které jim umožňují zpracovávat tyto látky jako živinu. Ropa je komplexní směs uhlovodíků různé délky řetězce a doprovodných organokovových sloučenin, např. sloučenin vanadu a niklu. Variabilita složení a typů uhlovodíků propůjčuje různým typům ropy a jejich produktů specifické fyzikální vlastnosti, které se následně odrážejí v jejich uplatnění v roli růstového substrátu pro mikroorganismy. Složení uhlovodíků v mikroorganismy degradovaných vzorcích souvisí s dobou, po kterou byly ropné látky vystaveny prostředí. Na lokalitách s náhodným nebo neustále probíhajícím znečišťováním ropou (Obr. 1) budou degradace probíhat efektivněji než na neznečištěných plochách. V čistých ekosystémech mikrobiální společenství využívají méně než 0.1 % uhlovodíků, ale v ropou znečištěném prostředí mohou živé organismy využít uhlovodíky až ze 100 %. Souvisí to s fenoménem selekčního tlaku polutantu, díky kterému je možná adaptace populací na takto pozměněné podmínky.



Obr. 1 Ukázka dlouhodobě (ropnými i látkami) exponované lokality – ropné pole

Mikroorganismy degradující ropné uhlovodíky

Enzymatické vybavení pro přeměnu ropných látek v rámci mikrobiálního metabolismu lze nalézt jak u bakterií, tak u eukaryotních mikroorganismů (kvasinky, houby). Nejfrekventovanějšími bakteriemi schopnými využívat v rámci svého metabolismu ropu jsou zástupci rodu *Pseudomonas* a *Burkholderia*. Nicméně existuje celá řada dalších bakterií, které se zapojují do transformace petrochemických surovin a produktů. Velmi zajímavým zjištěním byla skutečnost, že dokonce dominujícím taxonem v oblastech trvalé expozice prostředí ropou nejsou bakterie, ale tzv. lipofilní kvasinky. Velmi známým zástupcem je *Yarrowia lipolytica*, nicméně existují i další kmeny, např. zástupci rodů *Rhodotorula* a *Debaryomyces*. Společným rysem mikroorganismů využívajících jako svou živinu ropu je jejich schopnost existovat na fázovém rozhraní, které vzniká v místech kontaktu ropné látky s vodným prostředím. Základním nástrojem, jenž se poté následně zapojuje i do procesů přenosu, transformace a zpracování v metabolismu, jsou biologické povrchově aktivní látky. Jejich prostřednictvím mohou mikroorganismy fázové rozhraní kolonizovat, rozrušovat a transformovat do podoby částic s vyšší rozpustností ve vodě a tedy i s vyšší pravděpodobností, že budou moci být zapojeny do mikrobiálního metabolismu. V přírodě se nacházejí druhy mikroorganismů s metabolickou funkcí degradace všech složek nacházejících se v ropě. Degradace ropy zahrnuje základní a následné reakce, ve kterých určité organismy mohou atakovat různé ropné složky. Meziprodukty jejich působení jsou později využívány dalšími skupinami organismů a degradovány dalšími procesy.



Obr. 2 Tvorba biofilmu na rozhraní ropa - voda

Biologická dostupnost ropných uhlovodíků

Předpokladem pro využívání ropných uhlovodíků v rámci mikrobiálního metabolismu je faktor biologické dostupnosti (*bioavailability*). Je ovlivněn celou řadou skutečností, mezi které spadá struktura příslušné molekuly uhlovodíku, jeho větvení, délka řetězce, popř. přítomnost aromatických struktur. Na základě analýzy současného stavu poznání byla vypracována obrysová pravidla, na jejichž základě může být proveden odhad míry úspěšnosti případného bioremediačního zákroku.

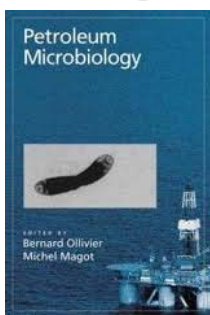
- preferovaným režimem degradace ropných látek je aerobní mechanismus

- ropné uhlovodíky s menší molekulovou hmotností se degradují
- zvyšující se molekulová hmotnost snižuje mobilitu, rozpustnost a
- těžší uhlovodíky se více vážou na horninové prostředí

Nasycené n-alkany jsou nejnáze odbouratelné sloučeniny a byla demonstrována degradace n-alkanů i s řetězcí delšími než C44. Nejnáze podléhají degradaci alkanů v rozpětí od C10 do C26. Hlavní mechanismus degradace n-alkanů spočívá v oxidaci, která odpovídá oxidaci alkoholů, aldehydů nebo funkčních skupin mastných kyselin. Rozvětvené alkanů v důsledku sterického efektu odolávají mikrobiálnímu ataku, nicméně nejsou vůči němu zcela perzistentní. Vysoce rozvětvené isoprenoidy alkanů, jako jsou pristan a phytan, které byly dříve považovány za rezistentní vůči biodegradaci, byly později shledány jako biologicky transformovatelné. Cykloalkany jsou naopak většinou vůči biodegradaci rezistentní.

Aromatické sloučeniny jsou rezistentnějšími vůči biodegradaci, některé nízkomolekulární aromáty jako je třeba naftalen, mohou být oxidovány postupně. Monoaromatické sloučeniny (ač pro řadu mikroorganismů toxické) mohou být oxidovány v případě, že mikrobiální činitel disponuje příslušnými enzymovými nástroji.

Petroleum microbiology (ropná mikrobiologie)



Specifickou subdisciplínou, která shromažďuje poznatky o mikrobiální interakci s ropou a jejími produkty, je ropná mikrobiologie. Ollivier a Magot publikovali v roce 2005 monografii *Petroleum Microbiology*¹, díky které lze získat velmi ucelený pohled na možnosti mikrobiální transformace ropných znečištění, nicméně rovněž pochopit úlohu těchto skupin mikroorganismů v progresivních petrochemických technologiích (mikroorganismy jako nástroje konverze ropy do podoby finálních produktů), dále úlohu těchto mikroorganismů v procesu těžby zbytkových ložisek a v neposlední řadě získat ucelenou představu o biodeterioračním působení mikroorganismů na rezervoáry a produktovody ropy a ropných výrobků.

Rozklad ropných látek biologickou cestou a technologická řešení

Není překvapením, že obdobně jako v případě jiných bioremediací existuje rozklad aerobní a rozklad probíhající za podmínek anoxických. Oba dva mechanismy se uplatňují jak v procesech přirozené atenuace, tak v inženýrských aplikacích – *in situ* zákrocích koncipovaných přímo na lokalitách zatížených ropným znečištěním, tak *ex situ* technologiemi, kdy je kontaminovaná matrice životního prostředí zpracovávána mimo postiženou lokalitu.

Aerobní biodegradace

Tento režim transformace ropných látek vykazuje nejvíce analogických znaků s metabolismem tuků a lipidů. Principem je sekvenční oxidace redukováné formy (ropný uhlovodíky) prostřednictvím specifických oxidas (enzymů katalyzujících konkrétní oxidační krok) přes alkohol, aldehyd a kyselinu, která se následně v rámci hlavního metabolismu zapojuje do tzv. Krebsova cyklu (stěžejní buněčný cyklus katabolického metabolismu). Tento popsáný proces používá zažité označení

¹ B. Ollivier, M. Magot: *Petroleum Microbiology*, ASM Press 2005

beta oxidace z důvodu, že tím atomem uhlíku, jenž je transformován, je druhý v pořadí od funkční skupiny. Tato terminologie je odvozena z oxidace mastných kyselin, které jsou vedle glycerolu klíčovou komponentou tuků a vykazují díky svým dlouhým uhlovodíkovým řetězcům největší paralelu s řetězci ropných uhlovodíků.

Anaerobní oxidace

Z energetické bilance vyplývá, že anaerobní metabolismus je v porovnání s metabolismem aerobním méně výhodným způsobem, organismus získá v absolutním vyjádření méně energie než ve srovnatelně probíhajícím aerobním procesu. Výhodu mají tzv. fakultativní mikroorganismy, které disponují oběma typy metabolismu a v momentě vyčerpání kyslíku jako zdroje elektronového akceptoru jsou schopné přepnout svou látkovou výměnu do režimu anoxického (např. kvasinky). Anaerobní mikroorganismy jsou odkázané výhradně na zisky vyplývající z jim ontogeneticky daného mechanismu, který mají ve svém portfoliu metabolických nástrojů. Anaerobní rozklad je principiálně podobný aerobnímu s tím rozdílem, že jako akceptor elektronu figurují látky typu dusičnany, železité a manganické ionty a sírany. V případě uhlovodíků ropného původu je možný i anaerobní radikálový mechanismus; v tomto případě musí mikroorganismus disponovat vhodnými nástroji, jež ho ochraňují před výrazně toxičtějšími radikálovými meziprodukty.

Přirozená atenuace

V prostředích, která jsou dlouhodobě exponována selekčním tlakem přítomného polutantu, ve kterých se vyskytují vhodné typy akceptorů elektronů a zejména jsou-li osídlena tzv. autochtonními mikroorganismy, se uplatňuje mechanismus přirozené atenuace. jedná se o nejméně invazivní biologický způsob transformace, nicméně jeho nevýhodu může být skutečnost, že vlastní proces odbourávání trvá výrazně delší dobu. Přirozená atenuace je velmi dobrým způsobem dočištění kontaminované lokality. Obecně představují informaci o přítomnosti přirozené atenuace ve studované lokalitě tzv. 3 linie důkazů:

1. koncentrace polutantu klesá ve směru proudění podzemní vody
2. snižuje se koncentrace akceptorů elektronů (sírany, dusičnany, Fe(III), Mn(IV))
3. je prokazatelná biologická aktivita

Způsobem, jak získávat informace o důkazech a kvantifikovat její průběh, je tzv. monitorovaná přirozená atenuace. Vzhledem k tomu, že autochtonní populace participující na přirozené atenuaci jsou mocným nástrojem transformace, lze vhodnou podporou těchto procesů dosáhnout efektivnějšího průběhu dílčích procesů. Podporu představuje dodávka vzduchu, nutrietů, zvýšení mobility polutantu apod.

Sanační inženýrství

Na úvod této pasáže je na místě podotknout, že klíčem k úspěchu využití biologických činitelů v rámci bioremediace je adaptovaný mikroorganismu. Z těchto důvodů představuje velikou výhodu přítomnost autochtonních populací na kontaminované lokalitě. V tomto případě se otevírá možnost provedení vhodného sanačního zákroku na bázi stimulace prostředí zdrojem nutrietů a zdrojem akceptorů elektronu (např. aerace). Není-li na lokalitě dostatečné množství mikrobiálních zástupců, lze využít technologii na bázi bioaugmentace, tzn. vnesení mikroorganismu disponujícím bioremediačním potenciálem a navozením podmínek, jež mu vyhovují pro uskutečňování

transformačních kroků. Z metod, používaných v rámci *in situ* designu sanačních zákroků na bázi bioremediace, se v případě ropných látek nejčastěji volí techniky spojené s dodávkou vzduchu (kyslíku) do prostředí. Jedná se o bioventing a biosparging. Bioventing je koncipovaný jako vtačování vzduchu do nesaturované zóny, čímž se zvyšuje koncentrace akceptoru elektronu (kyslík) a přítomné (nebo dodané) mikrobiální populace mohou transformovat ropný polutant do podoby vedoucí až k oxidu uhličitému. Smyslem biospargingu je vtačovat vzduch tak, aby se podpořilo stripování polutantů do nesaturované zóny, kde se může uplatnit biodegradční proces. Jiným způsobem, jak napomoci zvýšení biologické dostupnosti polutantu ropného původu, je aplikace povrchově aktivní látky (detergentu), čímž se zvýší jeho mobilita a možnost jeho biologického rozkladu. Velmi progresivním přístupem současnosti se ukazuje aplikace biologicky odbouratelných detergentů, čímž se eliminuje tzv. sekundární kontaminace prostředí, neboť synteticky vyráběné detergenty často disponují velmi dobrou perzistencí a setrvávají v prostředí.

Ex situ technologie nakládání s kontaminovanými matricemi s ropnými látkami mají společného jmenovatele v přemístění materiálu do systému zařízení, kde lze provádět jeho cílenou dekontaminaci. Nejčastěji jimi bývají dekontaminační plochy vybavené distribučními systémy pro rozvod nutrietů, vody, suspenzí biodegradčních populací (inokul) a vzduchu. Nabízí se využití techniky biopiling, kdy je kontaminovaná matrice vylehčena přidavkem biologického materiálu (např. drcená dřevní hmota), čímž se výrazně zvýší pravděpodobnost úspěchu dekontaminace. Osvědčuje se zejména u kompaktních typů znečištěných matric, jakými jsou jílovité zeminy nebo sedimenty.



Obr. 3 Halda vedená v režimu techniky biopiling, která je vhodná pro zpracování ropou znečištěných zemín

Jiným způsobem odstranění polutantu může být využití reaktorových systémů. V izolovaných systémech lze navodit podmínky vhodné pro biodegradaci a napomoci tak urychlit rozkladný proces. Výhodou těchto postupů je možnost regulace, k nedostatkům patří omezení spojená s velikostí zpracovávaného množství kontaminované matrice. Reaktorové systémy jsou klíčové pro přípravu suspenzí aplikovaných organismů, označují se jako bioreaktory.

Ekonomické, metodické a legislativní aspekty bioremediace ropných látek

Bioremediace lze obecně vnímat jako metody, které jsou nákladově výrazně levnější než metody abiotické. Nicméně existuje soubor omezení, které jsou limitem pro využití tohoto způsobu dekontaminace. V první řadě se jedná zejména o natolik vysokou koncentraci polutantu, že je vyvolána inhibice metabolických procesů. V tomto případě musí být přistoupeno k aplikaci nebiologických technologií. Jako velmi efektivní se v poslední době ukazuje kombinovaný přístup,

který je založený na propojení benefitů abiotických technologií a ve vhodném momentě se ku prospěchu ekonomiky procesu překlopí řešení ekologického problému do roviny biologického dočištění. Tyto přístupy se označují jako *train technologies*.

Legislativním omezením je aplikace geneticky modifikovaných organismů. V laboratorních podmínkách se v řadě případů podařilo zkonstruovat unikátní kmeny s vynikajícími vlastnostmi, nicméně se ukázalo, že jejich schopnost konfrontovat se s reálnou matricí je natolik slabá, že konstrukce technologií nemají smysl.

Metodologicky je poměrně zajímavou oblastí využití mikroorganismů jako markerových systémů, díky nimž je možné predikovat stav a situaci v kontaminovaném prostředí s výrazně nižšími náklady.

Perspektivy

Obecně lze konstatovat, že rozvoj efektivních bioremediací (nejenom ropných látek) bude velmi úzce souviset se schopnostmi poznávat skutečné poměry na kontaminovaných lokalitách z hlediska zastoupení mikrobiálních činitelů, které disponují schopností využívat polutant jako svůj zdroj uhlíku a energie. S ohledem na obrovskou skupinu tzv. nekultivovatelných organismů bývají současné metodologické nástroje prostředkem pro získání ne zcela objektivních informací o profilu přítomných mikroorganismů na lokalitě. Z těchto důvodů se očekává další intenzivní rozvoj biotechnologií v technické ochraně životního prostředí v momentě, kde se molekulární analytické techniky stanou ještě dostupnějšími širšímu spektru uživatelů.