

PILOTNÍ TEST BIOREMEDIACE FTALÁTŮ *IN SITU*

Mgr. Jiří Kamas 1), Ing. Jiří Mikeš 1), Ing. Miroslav Minařík 2), RNDr. Alena Polenková 3)

- 1) EPS, s.r.o. (V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice) email: eps@epsro.cz
- 2) EPS biodegradácie, s.r.o., P.O.BOX 138, 909 01 Skalica
- 3) GEOTest, a.s. Šmahova 1244/112, 627 00 Brno

ABSTRAKT

V průběhu osmi měsíců byl realizován *in situ* pilotní test za účelem ověření účinnosti technologie EPS-FT (technologie pro bioremediaci ftalátů). Prioritním kontaminantem byl DEHP (di-ethylhexylphthalate) v podzemní vodě dosahující koncentrace jednotek mg/l.

Pilotní test byl zaměřen na saturovanou zónu a probíhal po dobu 8 měsíců. Technologie EPS-FT využívá synergické kombinace sanačních metod zahrnující sanační čerpání, promývání, air sparging a podporovanou bioremediaci. Do horninového prostředí byl systémem aplikačních objektů injektován roztok základních nutrientů (zejména N a P) a inokulum mikroorganismů degradujících předmětný polutant (*Rhodococcus erythropolis*).

Během pilotního testu byl prováděn rozsáhlý monitoring. V saturované zóně byly sledovány hydrochemické parametry (teplota, konduktivita, pH, ORP_H, rozpuštěný kyslík), mikrobiologické parametry (koncentrace heterotrofních a degradujících mikroorganismů, respirační testy) a chemismus vod (ZCHR, koncentrace DEHP a DBP (di-butyl phthalate) a nutrientů).

Specifické podmínky lokality (absence volné fáze C-zdroje) vedly k provedení laboratorních testů, jejichž cílem bylo nalezení alternativního C-zdroje a popsání přípravy inokula v laboratorních i terénních podmínkách včetně vyvinutí vhodné metodiky stanovení DMO (degradujících mikroorganismů), jejíž klasické pojetí nebylo možné při daných podmínkách použít.

ÚVOD

V poslední době jsou látky ze skupiny ftalátů předmětem intenzivního studia a to hlavně ve smyslu jejich bioremediace v různých typech prostředí za odlišných geochemických podmínek (Liang a kol. 2008). Při odstraňování ftalátů z kontaminovaných půd, kalů, povrchových i podzemních vod hrají biologické metody sanace hlavní roli, přičemž abiotické metody často selhávají. Obecně lze proces bioremediace ftalátů popsat takto: 1) s rostoucí délkou postranního řetězce dochází ke snížení biodegradability (Xia a kol. 2004) 2) anaerobní degradace ftalátů je několikanásobně pomalejší než aerobní degradace (Staples a kol. 1997) 3) primární biologický rozklad ftalátů se řídí kinetikou prvního řádu (Gavala a kol. 2003) a 4) vysoká koncentrace ftalátů nebo jejich metabolitů inhibují jejich vlastní biodegradaci (Liang a kol. 2008)

Prioritním kontaminantem lokality je di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), taktéž označovaný jako dioctyl phthalate (DOP) CAS: 117-81-7. Ftaláty jsou tvořeny benzenovým jádrem se dvěma karboxylovými skupinami a postranním řetězcem tvořeným nejčastěji alkylovými zbytky navázanými na karboxylovou skupinu esterovou vazbou. Délka postranního řetězce dodává molekule míru nepolárního charakteru, což ovlivňuje jeho chemické vlastnosti a chování v horninovém prostředí. Organolepticky se jedná o průhlednou, organickou látku s konzistencí rostlinného oleje. Čistá fáze DEHP je bez zápachu, velmi slabě rozpustná ve vodě (0,003 – 1,3 mg/l), spadající do kategorie polutantů LNAPs ($\rho = 0,984$) se schopností tvořit koloidy. S rostoucím množstvím koloidů dochází k vyšší rozpustnosti DEHP ve vodě. DEHP má velkou afinitu k sorpci na organickou hmotu. Hodnota Log K_{ow} se pohybuje od 7,5 do 9,6 (Gavala a kol 2003) a dochází tak ke zkoncentrování látky

v sedimentech a horninové matrix oproti transportnímu mediu představující povrchovou či podzemní vodu (Scholz a kol. 1997)

Proces biodegradace DEHP byl popsán v různých systémech např. v odpadních kalech (Roslev a kol. 1998, Chang a kol. 2007), v říčních a jezerních sedimentech (Azarova a kol. 2003), povrchových vodách (Hashizume a kol. 2002), kontaminovaných půdách, povrchových i podzemních vodách a to za anaerobních i aerobních podmínek (např. Chen a kol. 2007; Cheung a kol. 2007; Choi a kol. 2005; Cheng a kol. 2000; El-Hadj a kol. 2006, Hashizume a kol. 2002, Gu a kol. 2005).

Mikroorganismy, které poměrně dobře rozkládají ftaláty, jsou buď aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie. Mezi čisté kultury, u nichž bylo prokázáno, že rozkládají různé formy ftalátů patří např. *Sphingomonas* (α -Proteobacteria), *Comamonas* (β -Proteobacteria), *Pseudomonas* (γ -Proteobacteria), stejně jako *Arthrobacter* a *Rhodococcus*. Nicméně ve velké většině případů jsou estery kyseliny ftalové degradovány smíšenými mikrobiálními populacemi, typicky přítomnými v prostředí (Gu a kol. 2005). Další laboratorní i reálné *in situ* testy bioremediace DEHP byly prováděny za využití bakterií např. *Bacillus subtilis* – (Quan a kol. 2005); *Pseudomonas Putida* – (Feng a kol. 2004), *Mycobacterium sp.* (Nakamiya a kol. 2005) nebo hub např. *Fusarium oxysporum* (Kim a kol. 2003).

Siglová a kol. (2009) popisuje vyvinutí bioremediační technologie založené na biodegradaci ftalátů pomocí bakteriálního kmene *Rhodococcus erythropolis*. Tento kmen byl úspěšně testován laboratorním způsobem nejprve na jednoduchém typu ftalátu DEP (di-ethyl phthalate). Následně byl proveden laboratorní test biodegradability ftalátů s delším uhlovodíkovým řetězcem DEHP a DBP. Studie využívala stejného kmene bakterií označení Ft-3 a byla provedena na vzorcích podzemní vody ze shodné lokality. V průběhu testu nedošlo k pozorovatelnému nárůstu koncentrace HMO (heterotrofních mikroorganismů) ani DO (optické hustoty), nicméně došlo k odbourání až 96% přítomného DEHP (DBP nebyl přítomen). Tento průběh lze dílčím způsobem vysvětlit takovým typem metabolismu, jenž není těsně spřáhnutý s růstem a reprodukcí, popř. nelze vyloučit ani kometabolickou platformu degradace. Na základě těchto výsledků byla navržena realizace pilotního testu technologie přímo na lokalitě.

POPIS LOKALITY

Charakteristika lokality

Geologický profil v prostoru sanace byl ovlivněn při výstavbě areálu. Svrchní 2 m profilu tvoří antropogenní navážky hlinito-písčitého charakteru, kvartér je přítomen v mocnosti 6 m ve formě pestře zbarvených hrubozrnných písčitých štěrků, které nasedají na terciér tvořený prachovitými ulehlými písky s propláskky zelenošedého laminovaného vápnného jílu. V zájmovém území převládá průlinová propustnost, hladina podzemní vody je mírně napjatá a nachází se v hloubce 2,0 až 3,5 m pod terémem.

Kontaminace

Jediným zdrojem znečištění v předmětné lokalitě byl havarijný únik z cisterny obsahující ftaláty. Přes v minulosti realizované dílčí sanační práce (sanační čerpání a promývání) přetrvávala v podzemní vodě kontaminace ftaláty, zejména bis-ethylhexyl-ftalátem (DEHP).

Charakteristickým opakovaným jevem byl výskyt volné fáze ftalátů na hladině p.v. a vysoká koncentrace DEHP v podzemní vodě v řádu až jednotek mg/l na malém prostoru cca 10 x 20 m. Po zahájení sanačního čerpání docházelo k poklesu koncentrace ftalátů až pod mez detekce. Po ukončení čerpání docházelo ke znovu objevení filmu ftalátů na hladině p.v. (rebouding) a nárůstu koncentrací DEHP v podzemní vodě.

Celkem bylo od začátku sanačních prací odstraněno cca 300 l kontaminantu. V následujícím období byla volná fáze ftalátů (film) pozorována pouze ojediněle na vrtu situovaném v médtě zdroje kontaminace. Koncentrace DEHP kolísala v rozmezí X – X000 µg/l.

METODIKA (Popis použitých sanačních technologií)

V laboratořích společnosti EPS, s.r.o. byl v letech 2007 – 2009 prováděn vývoj nové technologie na biodegradaci ftalátů, který vedl ke schválení nové bioremediační technologie EPS-FT.

Technologie EPS-FT využívá nejen dominantní bakteriální kmen *Rhodococcus erythropolis*, ale také synergické kombinace sanačních metod zahrnující sanační čerpání, promývání, air sparging a podporovanou bioremediaci během níž jsou do horninového prostředí injektovány roztoky základních nutrientů (N a P).

Sanační čerpání

Sanační čerpání bylo během pilotního testu realizováno ve dvou variantách 1) čerpání na okraji sanovaného prostoru a promývání nesaturované zóny systémem mělkých sond, 2) čerpání v centru znečištění s konstantním snížením hladiny p.v. o 10 – 20 cm a promýváním nesaturované zóny v sanovaném prostoru po předchozím přečištění vod (gravitačně-sorpční odlučovač).

Promývání

Promývání bylo realizováno systémem 9 ks mělkých aplikačních sond do 2 m p.t s perforací 1,7 – 2 m p.t. tj. v hloubkovém profilu výskytu kontaminace. K promývání byla použita přečištěná voda z čerpaných vrtů. V úvodu prací bylo promývání intenzifikováno přidavkem PAL (REO 801).

Air sparging

Air sparging byl prováděn systémem 9 ks air spargingových sond do hloubky 5 m p.t. s perforací 4,7 - 4,9 m p.t rozmístěných v pravidelné síti 3x3 m. Vzduch byl vháněn do těchto sond dmychadlem o výkonu cca 1,6 m³/min., množství vháněného vzduchu do jednotlivých sond bylo upravováno kulovými ventily.

Podporovaná bioremediace

Horninové prostředí bylo saturováno základními nutrienty (zejména N a P) formou zředěných roztoků NP-solu a síranu amonného. Aplikace byly uzpůsobovány výsledkům monitoringu. Příprava biologického roztoku probíhala na lokalitě v air-liftových bioreaktorech o objemu 1 a 4 m³. Nutrienty a biologický roztok byly do prostředí začerpávány aplikačním čerpadlem skrze systém mělkých a air spargingových sond.

Monitoring

V nesaturované zóně byla sledována koncentrace respiračních plynů CO₂ a O₂ na třech respiračních sondách (průměr 1/2“, hloubka 1,7 m, perforace 1,6 – 1,7 m, přístrojem Anagas CD98 do ustálení hodnot). Dvě sondy byly umístěny v bioremediačním poli, jedna sonda byla umístěna mimo sanovanou oblast k monitoringu pozadí.

V saturované zóně byly sledovány hydrochemické parametry (teplota, konduktivita, pH, ORP_H, rozpuštěný kyslík) při měření v průtočné cele (EJKELKAMP) terénními přístroji a sondami fy. WTW. Dlouhodobé sledování kolísání hladiny p.v., teploty a konduktivity vody bylo realizováno dataloggery řady Levellogger Gold fy. Solinst. Mikrobiologické parametry - koncentrace heterotrofních a degradujících mikroorganismů, respirační testy probíhaly v laboratořích EPS dle metodiky US EPA, v den odběru vzorku. Laboratorní rozbory podzemních vod (ZCHR, koncentrace DEHP, DBP a nutrientů) byly prováděny v akreditovaných laboratořích GEOTest, a.s.

Laboratorní zkoušky inokula

Vzhledem ke specifičnosti a nedostatku primárního kontaminantu bylo nutné vytvořit modifikovanou metodiku přípravy a monitoringu kvality připravovaného inokula. Tyto kroky byly provedeny v laboratořích EPS. Jejich cílem bylo 1) nalézt náhradní C-zdroj pro přípravu inokula v laboratorním a technickém stupni, 2) nalézt optimalizaci dávkování nutrientů k přípravě inokula a 3) vytvořit modifikovanou metodiku stanovení počtu degradujících mikroorganismů.

VÝSLEDKY

Laboratorní výsledky

Náhradní C- zdroj – metodika stanovení DMO

Při absenci C-zdroje (DEHP) pro mikrobiologické stanovení DMO ve vzorku byl tento druh analýz prováděn na miskách s půdami vyvařenými ze sterilní kontaminované vody z lokality (koncentrace DEHP 4890 $\mu\text{g/l}$, koncentrace DEHP je stabilní při procesu sterilizace). Na daném druhu media docházelo k nárůstům mikroorganismů inokula *Rhodococcus erythropolis*. Další zkoušené náhrady C-zdroje - jednodušší ftaláty (DEP) nedosahovaly požadovaných výsledků.

Náhradní C-zdroj – příprava inokula

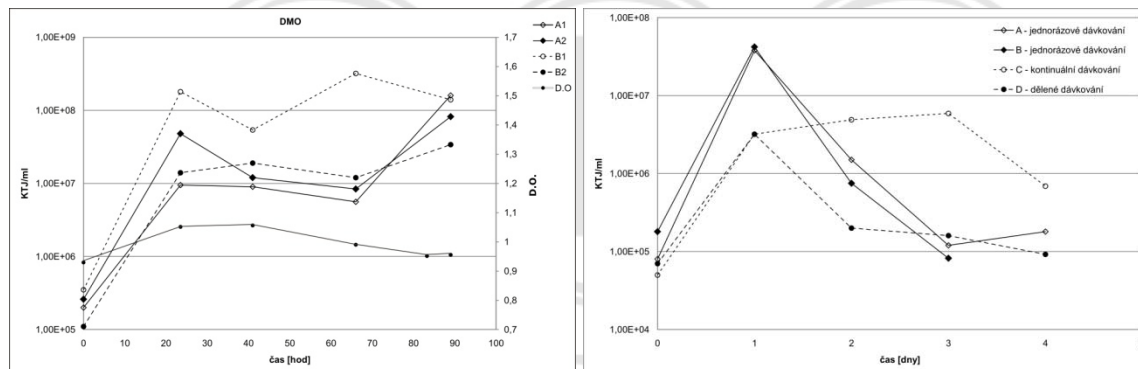
Jako C-zdroj byl při přípravě inokula v laboratorních i terénních podmínkách používán ftalát přítomný v podzemní vodě z lokality. Jako doplněk byla do reaktorů přidávána sacharosa a PAL - přípravek REO 801. Vhodnost směsi byla ověřena kontrolou koncentrace HMO, DMO a kontrolou mikrobiologického složení společenstva. Bakterie *Rhodococcus erythropolis* tvořila 60% přítomných mikroorganismů.

Na obrázku č. 1 je vidět průběh optické density (DO) a koncentrace DMO ve čtyřech laboratorních vzorcích inokula v čase t. Ve srovnání s maximem DO se vrchol koncentrace DMO opoždí cca o 70 hodin. Z výsledků je patrné, že po aplikaci sacharózy a nutrientů dochází nejprve k očekávanému rozvoji populace HMO, zatímco u DMO k tomu dochází až s časovým odstupem cca 2-3 dnů. Dále byl na inokulu B1 proveden test s cílem pozorovat vliv rozdílného dávkování nutrientů a C-zdroje na rozvoj populace HMO. Při porovnání výsledků pro jednorázové a pro postupné dávkování směsi do inokula vyšlo nejlépe kontinuální dávkování, kdy v inokulu nastával plynulý nárůst koncentrace HMO – viz obr. č. 2.

Terénní výsledky

Volná fáze ftalátů

V úvodu sanačních prací (květen – červen 2010) se na vrtu HV-1 nacházela na hladině p.v. vrstva ftalátů o mocnosti cca 1 mm. Po zahájení sanačního čerpání a promývání (vodou i PAL) došlo k postupnému vymizení souvislé volné fáze ftalátů až k její celkové ztrátě v měsíci září 2010. V dalším průběhu nebyl pozorován výskyt souvislé vrstvy ftalátů na hladině p.v. ani po přerušení sanačního čerpání.



Obr. č. 1 Průběh DO a koncentrace DMO v inokulu

Obr. č. 2 Průběh koncentrace HMO v inokulu při testu způsobu dávkování nutričních a C-zdroje

Hydrochemické parametry

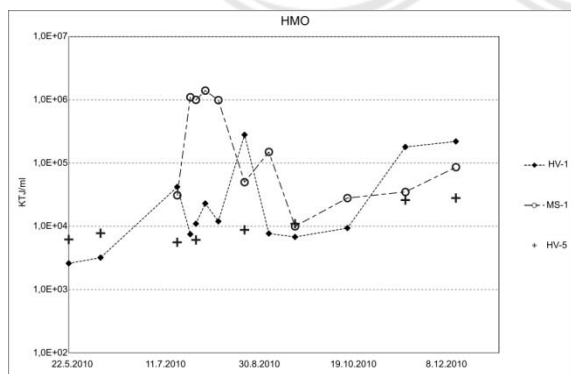
Po zahájení aktivních bioremediačních prací – air sparging došlo k nárůstu koncentrace kyslíku v podzemní vodě. Do té doby docházelo na vrtu HV-1 ke spotřebě kyslíku patrně v důsledku probíhající atenuace (0,1 mg/l ve vrtu HV-1, pozadí 1 mg/l). Koncentrace O₂ v podzemní vodě se v průběhu pilotního testu pohybovala v rozmezí 2 – 8,5 mg/l. Úbytek kyslíku byl pozorován ve vrtu HV-5 ve směru proudění p.v..

Po aplikacích nutričních a inokula se v sanovaném prostředí zvyšovala hodnota konduktivity cca o 50%. Průběh konduktivity indikoval přítomnost a míru úbytku nutričních v horninovém prostředí po aplikaci.

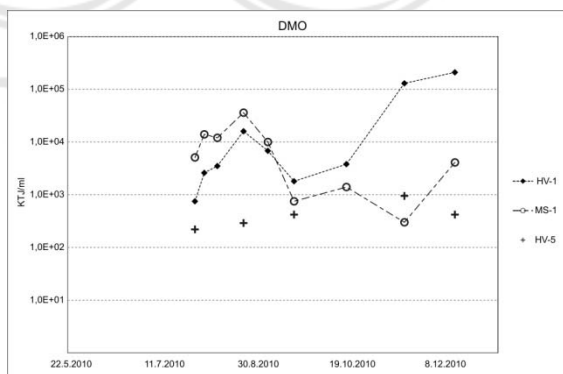
Hodnota pH se pohybovala v rozmezí 6 – 8, s dočasnými nárůsty po aplikaci inokula a nutričních. Oxidačně redukční potenciál ORP_H se po zahájení air spargingu zvýšil z průměrné hodnoty 220 mV na 320 mV.

Přirozená koncentrace základních nutričních v podzemní vodě ve formě NH₄⁺ a PO₄³⁻ se vyskytovala v koncentracích < 0,1 mg/l. V průběhu sanace byla v podzemní vodě udržována průměrná koncentrace NH₄⁺ 10 mg/l. Koncentrace PO₄³⁻ potom v průměru 2 mg/l. Po aplikacích nutričních docházelo v prostředí k výraznému ředění a rychlému poklesu koncentrace aplikovaných látek.

Před zahájením prací na lokalitě se v prostředí pohybovala koncentrace HMO v řádu 10³ KTJ/ml. Koncentrace DMO v úvodu testu nebyla stanovena z výše uvedených důvodů (absence volné fáze ftalátů). V průběhu prací došlo ve 2. a 3. měsíci bioremediace k nárůstu koncentrace HMO o 2 až 3 řády oproti úvodnímu stavu. Podobný vývoj byl v 2. a 3. měsíci zachycen i u DMO, kdy došlo k nárůstu koncentrace až k hodnotám v řádu 10⁴ KTJ/ml. V měsíci září 2010 došlo k poklesu hodnot všech mikrobiologických parametrů. K dalšímu rozvoji mikrobiologické populace došlo v zimním období, kdy DMO tvořily ve vrtu HV-1 až 90% kultivovatelných HMO viz obr. č. 3 a č. 4.



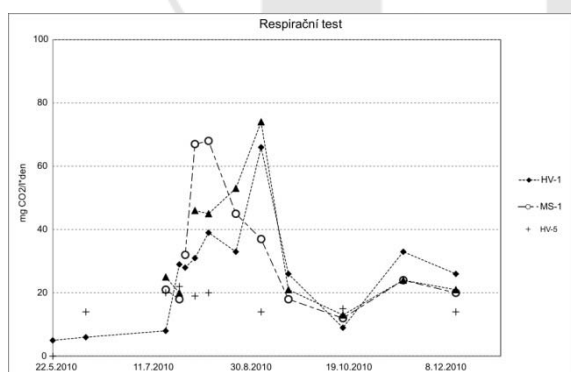
Obr. č. 3 Průběh koncentrace HMO v podzemní vodě



Obr. č. 4 Průběh koncentrace DMO v podzemní vodě

O fyziologickém stavu mikrobiologické populace vypovídaly výsledky laboratorních respiračních testů (Spencer, 2004). V období výrazného rozvoje mikrobiologické populace HMO i DMO dosahovala respirační aktivita hodnot až 68 mg CO₂/l.den⁻¹. V sanovaném prostoru byla respirační aktivita oproti pozadovým hodnotám (vrt HV-5) vyšší až 3x (viz obr. č. 5).

Tab. č.1 Koncentrace DEHP v podzemní vodě



	DEHP [µg/l]				
	HV-1	HV-5	MS-1	HV-2	MS-2
Pozice vrtu vůči znečištění	centrum	15 m po směru	centrum	10 m proti směru	5 m po směru
8. 6. 2010	4 890	178	1950		
17. 8. 2010	197	3,3	2,7	2	

20. 9. 2010	<1			
18. 10. 2010	14		1,5	2,7
18. 11. 2010	462		1,1	
5. 1. 2011	1,5		<1	28
Limit Σ Ftalátu 1 000 $\mu\text{g/l}$				

Obr. č. 5 Průběh respirační aktivity MO v p.v. (laboratorní respirační test)

V úvodu sanačních prací se v podzemní vodě v zájmovém prostoru vrtu HV-1 pohybovala koncentrace DEHP v rozmezí 1950 až 4890 $\mu\text{g/l}$. Ve vrtu HV-5 (ve směru proudění p.v.) dosahovala koncentrace hodnot 178 $\mu\text{g/l}$. Na nátoku ve vrtu HV-2 koncentrace DEHP činila 2,0 $\mu\text{g/l}$. Koncentrace DBF se v monitorovacích vrtech po celou dobu sanace pohybovala v koncentraci <10 $\mu\text{g/l}$. V období intenzivního rozvoje mikrobiologické populace došlo k prudkému poklesu koncentrace DEHP. V měsíci září a říjnu 2010 se koncentrace DEHP pohybovala v rozmezí 1 – 14 $\mu\text{g/l}$. Na základě těchto výsledků bylo přerušeno sanační čerpání a v následujícím odběru byla ve vrtu HV-1 zjištěna koncentrace 416 $\mu\text{g/l}$, přičemž ve vrtu MS-1 byla koncentrace DEHP stále 1,1 $\mu\text{g/l}$. V průběhu a závěru sanačních prací byl splněn sanační limit viz tabulka č. 1.

DISKUZE

Vzhledem k tomu, že aplikované roztoky (nutrienty, inokulum a PAL) byly skrze mělké infiltrační sondy v přímém kontaktu s polutantem zachyceným v nesaturované zóně, popřípadě v zóně saturované (skrze air sparingové sondy), a při intenzivním promývání a konstantním snižování hladiny podzemní vody na vrtu HV-1 nedošlo k uvolnění volné fáze ftalátů, lze usuzovat na to, že mobilní fáze byla předchozím sanačním zásahem odstraněna. Podzemní voda byla proto spíše trvale dotována pomalu se uvolňující kontaminací ftalátů pevně vázanou v horninové matrix díky vysokému K_{ow} a udržováním rovnovážné koncentrace mezi pevnou a kapalnou složkou prostředí.

Vývoj koncentrace DEHP v podzemní vodě byl velmi podobný dříve popisovanému průběhu koncentrace DEHP, kdy během předchozích sanačních prací (bez aplikace biologického činitele) rychle vymizela volná fáze produktu a koncentrace rozpuštěných ftalátů splňovala sanační limit. Během pilotního testu došlo k intenzivnímu rozvoji mikrobiologické populace v podzemní vodě v okolí vrtu HV-1. Tento vývoj byl potvrzen výsledky laboratorních respiračních testů. Kmen *Rhodococcus erythropolis* v bioreaktorech na lokalitě tvořil cca 60% přítomných HMO. Použití alternativního C-zdroje v podobě snadno dostupné sacharosy tak nevedla k negativnímu ovlivnění složení mikrobiologické populace připravovaných inokul ve prospěch nedegradujících mikroorganismů.

V laboratorním testu (Siglova a kol. 2009) byla pozorována biodegradační rychlost ftalátu (DEHP) 35,3 $\mu\text{g/l.den}^{-1}$. V období rozvoje mikrobiologické populace na lokalitě byl pro DEHP sledován úbytek v rychlosti až 68 $\mu\text{g/l.den}^{-1}$, což je výsledek téměř dvojnásobný. Na druhou stranu nelze tento výsledek považovat pouze za důsledek samotného procesu biodegradace, nýbrž celého souboru činností (sanačního čerpání, promývání, ředění, air sparingu, zvýšení dostupnosti ftalátů).

V důsledku poklesu koncentrace ftalátů - dostupného C-zdroje v podzemní vodě, došlo k omezení průběhu bioremediace, což následně vedlo k poklesu koncentrace HMO, DMO i respirační aktivity. Podobný pokles byl pozorován i v bioreaktorech, kde byla využívána kontaminovaná voda z lokality.

ZÁVĚR

V rámci pilotního testu bioremediační technologie EPS-FT bylo řešeno široké spektrum dílčích laboratorních i terénních úkonů, které vedly k ověření funkčnosti a účinnosti bioremediační technologie. V rámci realizovaných prací byla ověřena schopnost kmene *Rhodococcus erythropolis* rozkládat DEHP.

V průběhu bioremediace byly v prostředí navozeny vhodné podmínky pro průběh aktivní bioremediace (dodávka terminálního akceptoru elektronů – kyslík, dodávka nutrientů a aplikace

alochtonních mikroorganismů *Rhodococcus erythropolis*). Tyto práce vedly k výraznému rozvoji mikrobiologické populace v sanovaném prostoru, jak bylo potvrzeno několika nepřímými parametry bioremediace – nárůstem koncentrace HMO, DMO a respiračními testy.

V důsledku činnosti aplikované technologie, probíhajících fyzikálních, chemických a mikrobiologických procesů došlo k poklesu koncentrace DEHP v podzemní vodě a byl splněn sanační limit 1 000 µg/l Σ ftalátů.

Posouzení účinnosti provedeného sanačního zásahu bude možno provést s časovým odstupem po realizaci postsanančního monitoringu. V průběhu prací se testovaná technologie však osvědčila a potvrdila se schopnost kmene *Rhodococcus erythropolis* rozkládat i složitější ftaláty, např. na této lokalitě přítomné DEHP.

Použitá literatura

- [1] AZAROVA, I.N., PARFENOVA, V.V., BARAM, G.I., TERKINA, I.A., PAVLOVA, O.N., SUSLOVA, M.I. (2003) Degradation of bis(2-ethylhexyl)phthalate by microorganisms of water and sediments of the Selenga river and Baikal Lake under experimental conditions. Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia. ina@lin.irk.ru
- [2] CHANG, B.V., WANG TH, YUAN SY (2007) Biodegradation of four phthalate esters in sludge. Chemosphere 69:1116–1123
- [3] CHEN, J.A., LI, X., LI, J., CAO, J., QIU, Z.Q., ZHAO, Q., XU, C., SHU, W.Q. (2007) Degradation of environmental endocrine disruptor di-2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Microbacterium* sp strain CQ0110Y. Appl Microbiol Biotechnol 74:676–682
- [4] CHENG, H.F., CHEN, S.Y., LIN, J.G. (2000) Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate in sewage sludge. Water Sci Technol 41:1–6
- [5] CHEUNG, J.K.H., LAM, R.K.W., SHI, M.Y., GU, J.D. (2007) Environmental fate of endocrine-disrupting dimethyl phthalate esters (DMPE) under sulfate-reducing condition. Sci Total Environ 381:126–133
- [6] CHOI, K.Y., KIM, D., SUL, W.J., CHAE, J.C., ZYLSTRA, G.J., KIM, Y.M., KIM, E. (2005) Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp strain DK17. FEMS Microbiol Lett 252:207–213
- [7] EL-HADJ, T.B., DOSTA, J., MATA-ALVAREZ, J. (2006) Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. Water Sci Technol 53:99–107
- [8] FENG, Z., CUI, K.Y., LI, X.D., FU, J.A., SHENG, G.Y. (2004) Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescens* FS1. Process Biochem 39:1125–1129
- [9] HASHIZUME, K., NANYA, J., TODA, C., YASUI, T., NAGANO, H., KOJIMA, N. (2002) Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. Biol Pharm Bull 25:209–214
- [10] GAVALA, H.N., ALATRISTE-MONDRAGON, F., IRANPOUR, R., AHRING, B.K. (2003) Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. Chemosphere 52:673–682
- [11] GU, J.D., LI, J., WANG, Y. (2005) Biochemical pathway and degradation of phthalate ester isomers by bacteria. Water Sci Technol 52:241–248
- [12] KIM, Y.H., LEE, J., MOON, S.H. (2003) Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp pisi cutinase. Appl Microbiol Biotechnol 63:75–80
- [13] LIANG, D. W., ZHANG, T., FANG H. P., HE J. (2008) Phthalates biodegradation in the environment Appl Microbiol Biotechnol (2008) 80:183–198 DOI 10.1007/s00253-008-1548-5

- [14] NAKAMIYA, K., HASHIMOTO, S., ITO, H., EDMONDS, J.S., YASUHARA, A., MORITA, M. (2005) Microbial treatment of bis (2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride with isolated bacteria. *J Biosci Bioeng* 99:115–119
- [15] QUAN, C.S., LIU, Q., TIAN, W.J., KIKUCHI, J., FAN, S.D. (2005) Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66(6):702-10. Epub 2004 Oct 23.
- [16] ROSLEV, P., MADSEN, P. L., THYME, J. B., HENRIKSEN K. (1998) Degradation of Phthalate and Di-(2-Ethylhexyl)phthalate by Indigenous and Inoculated Microorganisms in Sludge-Amended Soil Applied and Environmental Microbiology, December 1998, p. 4711-4719, Vol. 64, No. 12
- [17] SCHOLZ, N., DIEFENBACH, R., RADEMACHER, I., LINNEMANN, D. (1997) Biodegradation of DEHP, DBP, and DINP: Poorly Water Soluble and Widely Used Phthalate Plasticizers *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Volume 58, Number 4, 527-534, DOI: 10.1007/s001289900367
- [18] SIGLOVÁ, M., MIKEŠ, J., PIŠTĚK, V., MINAŘÍK, M. (2009) Bioremediace polutantů ze skupiny endokrinních disruptorů – Vývoj technologie od laboratoře po reálnou aplikaci. *Sborník Sanační technologie 2009*, Uherské Hradiště.
- [19] SPENCER JFT (2004): *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*, Humana Press
- [20] STAPLES CA, PETERSON DR, PARKERTON TF, ADAMS WJ (1997) The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 35:667–749
- [21] XIA F, ZHENG PZQ, FENG X (2004) Relationship between quantitative structure and biodegradability for phthalic acid ester compounds. *J Zhejiang Univ (Agri Life Sci)* 30:141–146

