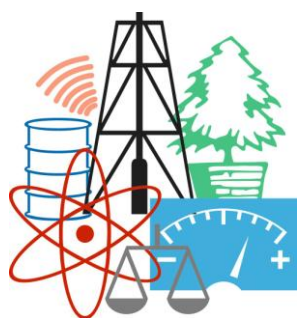


WASTE FORUM



RECENZOVANÝ ČASOPIS PRO VÝSLEDKY VÝZKUMU A VÝVOJE
PRO ODPADOVÉ HOSPODÁŘSTVÍ

ROČNÍK 2014

číslo 1
strana 1 – 44

Patron čísla

**Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Ústav chemie ochrany prostředí**

© České ekologické manažerské centrum 2014

Použití biosurfaktantu pro sanační promývání zemin kontaminovaných pesticidy

Marek ŠÍR, Zuzana HONZAJKOVÁ, Lucie KOCHÁNKOVÁ ¹⁾, Kristina TURNVALDOVÁ, Juraj GRÍGEL, Jiří MIKEŠ, Miroslav MINAŘÍK ²⁾

¹⁾ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: sirm@vscht.cz

²⁾ EPS, s. r. o., V Pastouškách 205, 68604, Kunovice, e-mail: kristina.turnvaldova@epssro.cz

Abstrakt

Příspěvek se týká popisu solubilizačních vlastností biosurfaktantu produkovaného kvasinkou *Yarrowia lipolytica*. Tento biosurfaktant byl izolován z produkčního média extrakcí do etylacetátu. Modelové solubilizační testy prokázaly solubilizaci hexachlorcyklohexanu v roztoku biosurfaktantu o koncentraci $c = 100 - 500 \text{ mg/l}$ s prakticky konstantním hmotnostním solubilizačním poměrem $13,5 \text{ mg/g}$. V daném koncentračním rozmezí došlo k nárůstu rozpustnosti HCH o přibližně 100%. Dále bylo testováno sanační promývání tří typů zemin s rozdílným obsahem organického uhlíku uměle kontaminovaných technickým HCH. Promývací roztok obsahoval 1000 mg/l biosurfaktantu. Pro všechny zeminy byl stanoven účinný hmotnostní poměr biosurfaktant/zemina nad 25 g/kg v důsledku sorpce biosurfaktantu na zeminu.

Klíčová slova: Biosurfaktant, kvasinka, sanační promývání, solubilizace, pesticidy, hexachlorcyklohexan

Úvod

Biosurfaktanty zahrnují širokou skupinu látek převážně z řad glykolipidů, lipopeptidů, fosfolipidů, mastných kyselin a dalších látek lipidové povahy produkovaných řadou mikroorganismů, např. bakteriemi nebo kvasinkami (Rahman, 2008).

Pokud jsou biosurfaktanty testovány pro sanační aplikaci, jedná se většinou o rhamnolipidy produkované bakteriemi. Jako příklad lze uvést solubilizační testy v modelovém systému, kde zástupce nepolárních látek tvořily toluen, etylbenzen a butylbenzen (McGray, 2001) nebo testy solubilizace ropných látek (Lai, 2009). V prvním případě se jednalo pouze o modelové testy roztoku biosurfaktantu s nepolární látkou, ve druhém případě byl sledován i vliv horninového prostředí. Na solubilizační vlastnosti biosurfaktantů má významný vliv složení a hodnota pH solubilizačního roztoku. Nejlepších vlastností je dosahováno obvykle při neutrální hodnotě pH a při nízké koncentraci solí v roztoku (Abouseoud, 2010). V kombinaci se sanačním promýváním dochází i ke stimulaci přirozených biodegradačních procesů, a tím pádem k rychlejšímu odstranění kontaminantů ropného původu ze zeminy. (Shin, 2006). Také bylo prokázáno, že přírůstek bakteriálního surfaktantu urychluje odstranění hexachlorcyklohexanu z půdy pomocí fytořemediace (Beccera, 2013).

V oblasti přímé solubilizace chlorovaných uhlovodíků lze uvést testy solubilizace tetrachloretylenu pomocí bakteriálního surfaktantu rhamnolipidu (Clifford, 2007). V další studii byla zkoumána solubilizace jednotlivých izomerů hexachlorcyklohexanu pomocí bakteriálního surfaktantu produkovaného *Pseudomonas aeruginosa* WH-2, nicméně pouze v blízkém okolí jeho kritické micelární koncentrace (Sharma, 2009).

V tomto příspěvku je popsána solubilizace technického hexachlorcyklohexanu (HCH) pomocí roztoku biosurfaktantu produkovaného kvasinkou *Yarrowia lipolytica* a dále je popsáno vsádkové sanační promývání tří typů zemin kontaminovaných hexachlorcyklohexanem.

Metodika

Producentem biosurfaktantu (BS) byla kvasinka *Yarrowia lipolytica*. Izolace a purifikace biosurfaktantu byla provedena následovně. Surové produkční médium bylo vystaveno působení ultrazvuku v ultrazvukové lázni PS04000A (NOTUS-POWERSONIC, s. r. o.) po dobu 15 minut. Následně byl tento roztok převeden do dělicí nálevky a třikrát extrahován etylacetátem v objemovém poměru 3:1. Etylacetát byl odpařen na rotační vakuové odparce RVO 64 a produkt promyt hexanem p. a. (Lach-Ner, s. r. o.).

Povrchové napětí bylo měřeno pomocí školního tenziometru K6 (Kruss GmbH) Du Noüyho metodou odtrhování prstence. Pro měření povrchového napětí byl použit roztok biosurfaktantu dané koncentrace o objemu $V = 20$ ml. Kritická micelární koncentrace (KMK) byla stanovena metodou měření povrchového napětí. Minimální povrchové napětí (MPN) bylo určeno z grafu závislosti povrchového napětí na koncentraci.

Testy solubilizace hexachlorcyklohexanu v modelovém systému voda-biosurfaktant-HCH probíhaly následovně. Byla připravena solubilizační řada roztoků biosurfaktantu v koncentračním rozmezí 0 – 500 mg/l. Dále byla připravena řada zábrusových baněk o objemu $V = 25$ ml, do kterých byl navážen nadbytek HCH vzhledem k jeho rozpustnosti ve vodě. Do baněk byl přidán solubilizační roztok a baňky byly umístěny na orbitální třepačku a ponechány třepat 48 hodin rychlostí 100 ot/min. Po 48 hodinách třepání se roztoky nechaly sedimentovat po dobu 24 hodin. Poté byla stanovena koncentrace HCH ve vodné fázi.

Testy sanačního promývání v systému voda-biosurfaktant-HCH-zemina probíhaly následovně. Byly vybrány tři typy zemin s rozdílným obsahem organického uhlíku (A – jíl z potoka, B – písek a C – zemina z pole). Tyto zeminy byly uměle kontaminovány přebytkem HCH vzhledem k jeho rozpustnosti ve vodě. Poté byla připravena řada zábrusových baněk o objemu $V = 25$ ml s odváženou zeminou o hmotnosti $m = 0,1 - 5$ g. Do baněk bylo přidáno 25 ml roztoku biosurfaktantu o koncentraci c (BS) = 1000 mg/l a baňky byly umístěny na orbitální třepačku a ponechány třepat 48 hodin rychlostí 100 ot/min. Po 48 hodinách třepání se roztoky nechaly sedimentovat po dobu 24 hodin. Poté byla stanovena koncentrace HCH ve vodné fázi.

Pro testy byl použit technický HCH, který je směsí izomerů – alfa (přibližně 65 – 70 %), beta (6 – 8 %), gama (12 – 15 %), delta (2 – 5 %), ostatní isomery tvoří přibližně 5 – 10 %. Ve vzorcích byl stanoven celkový obsah všech izomerů jako koncentrace HCH podle následujícího postupu. Roztok s rozpuštěným (nebo solubilizovaným) HCH o objemu $V = 10$ ml byl odpipetován do zábrusové baňky o objemu $V = 25$ ml. Po přidání 5 ml hexanu se roztok extrahoval intenzivním třepáním po dobu 15 minut. Po oddělení fází se stanovila koncentrace HCH v organickém extraktu, která se přepočítala na koncentraci HCH ve vodě (roztoku surfaktantu). Pro stanovení HCH byl použit plynový chromatograf HP 5890 vybavený kapilární kolonou HP – 5MS (délka 60 metrů, stacionární fáze 5 % diphenyl a 95 % dimethylsiloxan) a detektorem elektronového záchytu.

Výsledky

Kritická micelární koncentrace (KMK) produkovaného biosurfaktantu byla stanovena z průsečíku regresních přímek daných rovnicemi: $y = -1,294x + 72,46$ a $y = -0,103x + 58,33$. Minimální povrchové napětí (MPN) bylo určeno pro koncentrační rozmezí c (BS) = 0 – 1000 mg/l. Popis biosurfaktantu je uveden v následující tabulce.

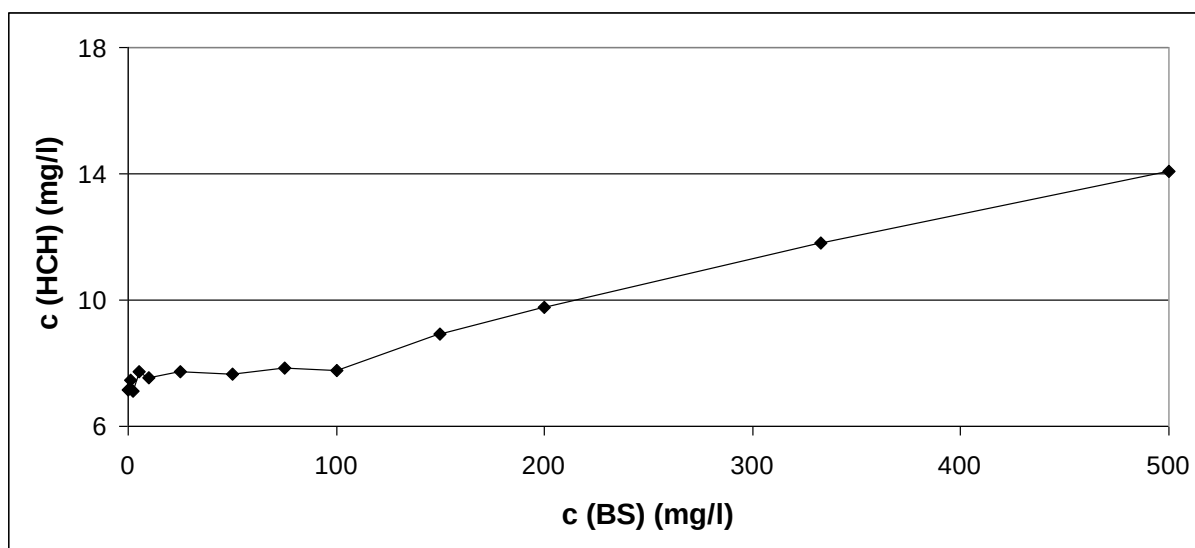
Tabulka 1: Charakteristika produkovaného biosurfaktantu.

Producent	Kritická micelární koncentrace	Minimální povrchové napětí	Popis
	(mg/l)	(mN/m)	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	63	42	bílý prášek

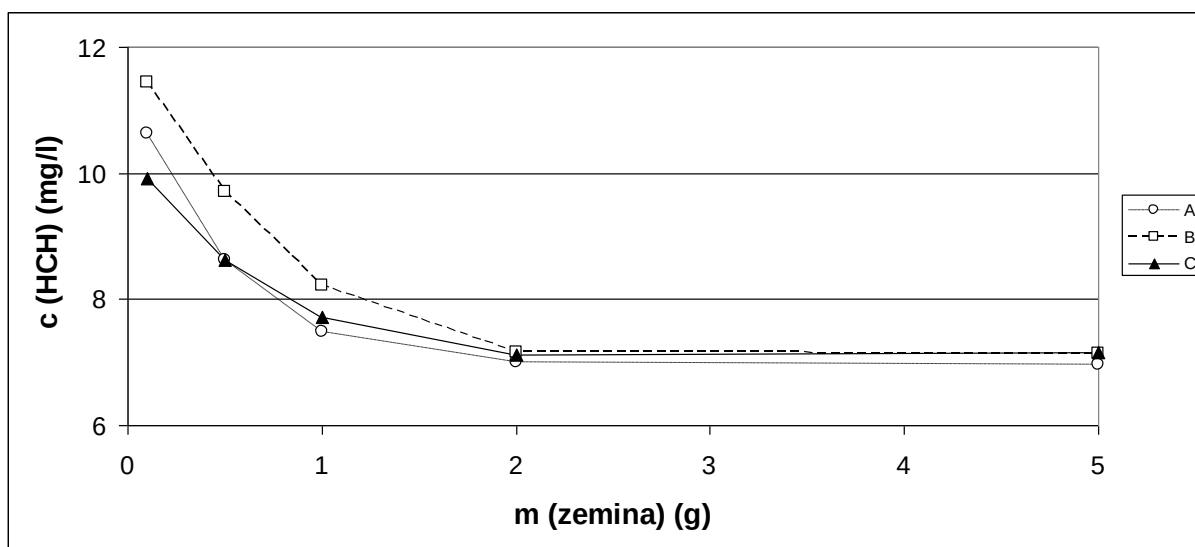
Tabulka 2: Charakteristika použitých zemin.

Zemina	Obsah organického uhlíku (TOC)	Popis
	(%)	
A	1,25	jíl z potoka
B	0,1	písek
C	3,6	zemina z pole

Následující grafy uvádějí výsledky modelových solubilizačních testů, ve kterých byl sledován systém voda-biosurfaktant-kontaminant a testů, které se týkaly vsádkového promývání kontaminovaných zemin v systému voda-biosurfaktant-kontaminant-zemina.



Obrázek 1: Závislost koncentrace HCH v modelovém solubilizačním roztoku na koncentraci biosurfaktantu.



Obrázek 2: Závislost koncentrace HCH v promývacím roztoku o $V = 25$ ml a $c(\text{BS}) = 1000$ mg/l na hmotnosti promývané zeminy.

Diskuse

Biosurfaktant produkovaný kvasinkou *Yarrowia lipolytica* byl uvedeným postupem izolován z produkčního média a byly zkoumány jeho vlastnosti v koncentračním rozmezí 0 – 1000 mg/l. Jeho KMK = 63 mg/l, což je výrazně nižší hodnota, než uvádí ostatní autoři (KMK = 500 mg/l) (Amaral, 2006). Hodnota minimální povrchového napětí byla MPN = 42. Amaral uvádí rovněž tuto hodnotu vyšší, konkrétně MPN = 50 mN/m. Pro porovnání lze uvést hodnoty KMK a MPN obdobného biosurfaktantu produkovaného kvasinkou *Candida bombicola*. Autoři uvádějí hodnoty KMK = 34,15 mg/l a MPN = 59,43 mN/m (Daverey, 2009). V další studii uvádějí autoři hodnoty nižší, přičemž biosurfaktant byl připraven za stejných podmínek. Konkrétní hodnoty byly KMK = 27,17 mg/l a MPN = 34,18 mN/m (Daverey, 2010).

Produkovaný biosurfaktant vykazoval solubilizační vlastnosti vůči HCH při nadkritické micelární koncentraci. V koncentračním rozmezí 100 – 500 mg/l došlo k nárůstu rozpustnosti HCH o přibližně 100 %. V daném rozmezí byl nárůst rozpustnosti lineární, přičemž hmotnostní solubilizační poměr (poměr hmotnosti solubilizovaného HCH ku hmotnosti surfaktantu v roztoku) byl 13,5 mg/g.

Testy zaměřené na promývání zemin kontaminovaných HCH prokázaly, že účinný hmotnostní poměr biosurfaktant/zemina je přibližně 25 g/kg. Při sanačním promývání dochází zároveň k sorpci biosurfaktantu na zeminu a zároveň k přechodu kontaminantu (popř. dalších složek zeminy) do promývacího roztoku. Při vyšších dávkách zeminy (přibližně nad 2 g zeminy na 25 ml promývacího roztoku) je patrné, že dochází k sorpci prakticky veškerého biosurfaktantu. Koncentrace HCH v promývacím roztoku tak odpovídá přibližně rozpustnosti HCH v čisté vodě, a to $c = 7,3 \text{ mg/l}$ (25 °C) (Mackay, 2006).

Závěr

Biosurfaktant produkovaný kvasinkou *Yarrowia lipolytica* je vhodným kandidátem pro použití v oblasti sanačního promývání zemin kontaminovaných pesticidy. Modelovými testy byla prokázána schopnost biosurfaktantu zvyšovat rozpustnost hexachlorcyklohexanu v systému voda-biosurfaktant-HCH přímo úměrně s rostoucí koncentrací biosurfaktantu. Hmotnostní solubilizační poměr hexachlorcyklohexan/biosurfaktant byl 13,5 mg/g pro dané koncentrační rozmezí biosurfaktantu ($c = 100 - 500 \text{ mg/l}$).

Z hlediska sanačního promývání byly testovány tři zeminy s rozdílným obsahem organického uhlíku, které byly uměle kontaminovány technickým hexachlorcyklohexanem. Pro všechny zeminy byl stanoven účinný hmotnostní poměr biosurfaktant/zemina nad 25 g/kg v důsledku sorpce biosurfaktantu na zeminu.

Poděkování

Tento příspěvek byl vytvořen s finanční podporou TA ČR, projekt TA01020482.

Literatura

Abouseoud M., Yataghene A., Amrane A., Maachi R. 2010. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphtalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Hazardous Materials 180, pp. 131 – 136

Amaral P.F.F., Silva J.M., Lehocky M., Barros-Timmons A.M.V., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P. 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry 41, pp. 1894 – 1898

Beccera-Castro C., Kidd P.S., Rodriguez-Garrido B., Monterroso C., Santo-Ucha P., Prieto-Fernandez A. 2013. Phytoremediation of hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated soils using *Cytisus striatus* and bacterial inoculants in soils with distinct organic matter content. Environmental Pollution 178, pp. 202 – 210

Clifford J.S., Ioannidis M.A., Legge R.L. 2007. Enhanced aqueous solubilization of tetrachloroethylene by a rhamnolipid biosurfactant. Journal of Colloid and Interface Science 305, pp. 361 – 365

Daverey A., Pakshirajan K. 2009. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied biochemistry and biotechnology* 158, pp. 663 – 674

Daverey A., Pakshirajan K. 2010. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79, pp. 246 – 253

Lai C.C., Huang Y.C. HongWei Y., Chang J.S. 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 167, pp. 609 – 614

Mackay D., Shiu W.Y., Ma K.C., Lee S.C. 2006. Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Taylor and Francis, Boca Raton

McCray J.E., Bai G., Maier R.M., Brusseau M.L. 2001. Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures. *Journal of Contaminant Hydrology* 48, pp. 45 – 68

Rahman P.K.S.M., Gapke E. 2008. Production, characterisation and application of biosurfactant-review. *Biotechnology* 7, pp. 360 – 370

Sharma S., Singh P., Raj M., Chadha B.S., Saini H.S. 2009. Aqueous phase partitioning of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* WH-2. *Journal of Hazardous Materials* 171, pp. 1178 – 1182

Shin K.H., Kim K.W. Ahn Y. 2006. Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process. *Journal of Hazardous Materials* B137, pp. 1831 – 1837

Use of biosurfactant for washing of soils contaminated by pesticides

Marek ŠÍR, Zuzana HONZAJKOVÁ, Lucie KOCHÁNKOVÁ ¹⁾, Kristina TURNVALDOVÁ, Juraj GRÍGEL, Jiří MIKEŠ, Miroslav MINAŘÍK ²⁾

¹⁾ Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Environmental Technology, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic, e-mail: sirm@vscht.cz

²⁾ EPS, s. r. o., V Pastouškách 205, 68604, Kunovice, Czech Republic, e-mail: kristina.turnvaldova@epssro.cz

Abstract

*This paper deals with solubilization properties of biosurfactant produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Biosurfactant was isolated by extraction into ethylacetate. Solubilization tests demonstrated that hexachlorocyclohexane solubility in biosurfactant solution at a concentration range of 100 – 500 mg/l was enhanced by 100%. The mass solubilization ration between hexachlorocyclohexane and biosurfactant reached 13,5 mg/g. Soil washing of three types of soils with different content of organic carbon was tested. Soils were artificially contaminated with technical HCH. The washing solution contained 1000 mg/l of biosurfactant. Effective mass ration of biosurfactant/soil was above 25 g/kg for tested soils.*

Keywords: Biosurfactant, yeast, remediation, soil washing, solubilization, pesticides, hexachlorocyclohexane