

REDUKTIVNÍ DEHALOGENACE CHLOROVANÝCH ETENŮ – DISKUSE VÝSLEDKŮ TERÉNNÍCH, CHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝCH ANALÝZ TŘÍ VRTŮ Z OHNISKA KONTAMINACE ZE TŘÍ RŮZNÝCH LOKALIT

Monika Stavělová ¹⁾,

Iva Dolinová ²⁾, Roman Špánek ²⁾, Radek Heřmánek ³⁾, Maria
Brennerová ⁴⁾



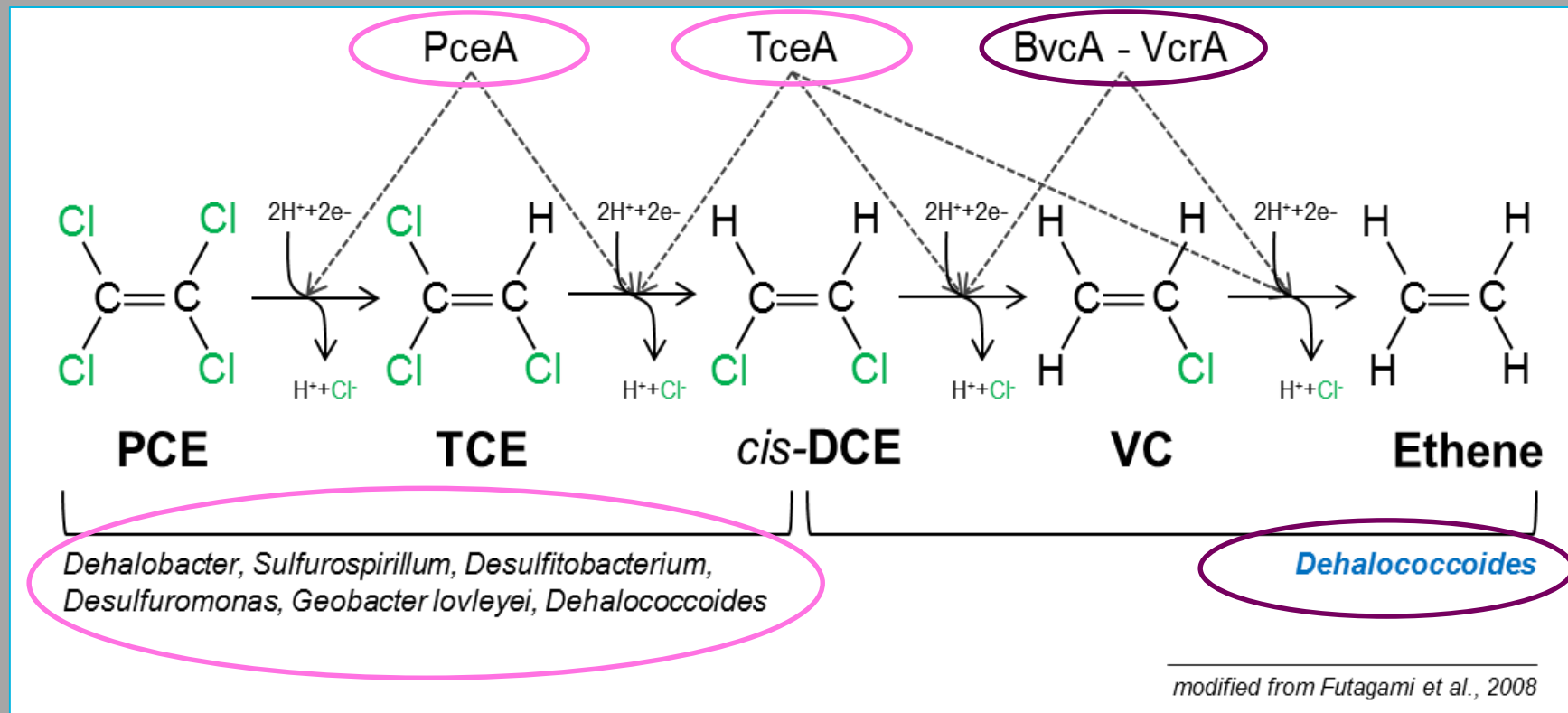
ERD - stručný teoretický souhrn

Enhanced reductive dehalogenation

Jen 3 snímky – opakování nikoho nezabije

Princip stimulané redukční dehalogenace (ERD)

Stimulace adaptované autochtonní mikroflóry se provádí přidavkem organického substrátu → transformace PCE, TCE na eten a etan



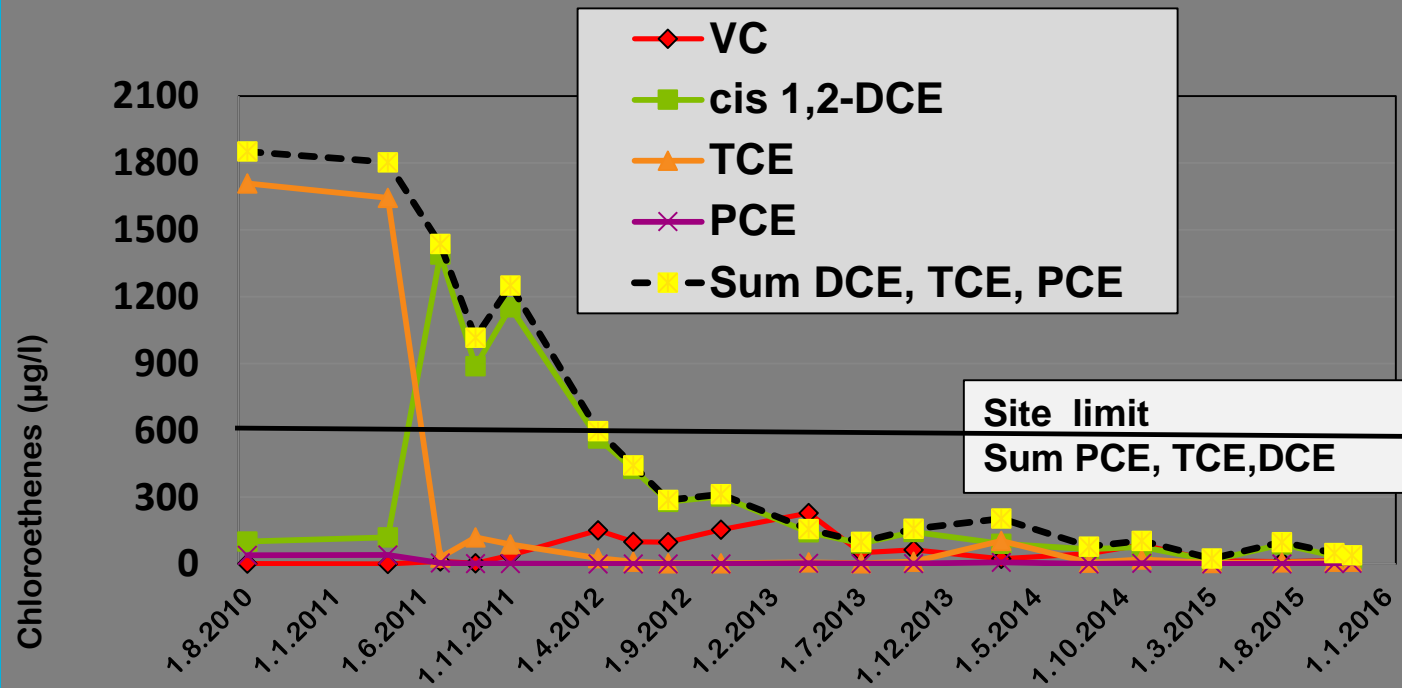
Technologické fáze ERD – dělení dle TECHTOOL

Fáze S1: PCE + TCE max

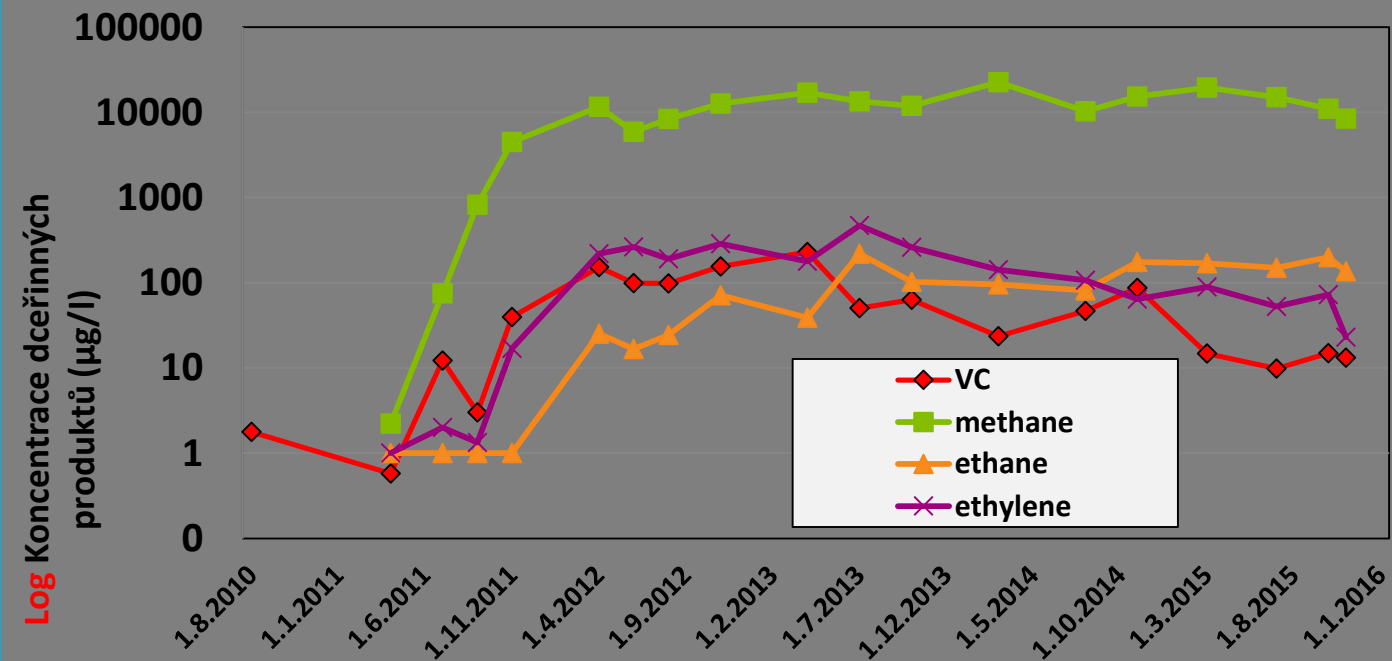
Fáze S2: cis 1,2 DCE max

Fáze S3: VC max

Fáze S4: eten + etan max



Typický příklad dobře fungující transformace CLE na lokalitě sanované metodou ERD – průměrné hodnoty z monitoringu 9 vrtů



Specifikace horninového prostředí dle redox potenciálu, mikrobiálního metabolismu a výskytu elektronových akceptorů

Specifikace horninového prostředí dle redox potenciálu, mikrobiálního metabolismu a výskytu elektronových akceptorů																
Silně redukční		Redukční		Anoxické		Oxické	Redox podmínky									
Anaerobní		Fakultativně anaerobní				Aerobní		Mikrobiální metabolismus								
-300		-200		-100		0		+100		+200		+300		+400 →		Redox potenciál E_H v mV (E_H - standardní vodíková elektroda; pH~7)
CO_2 ↓ CH_n		SO_4^{2-} ↓ $H_2S + S^{2-}$		Fe^{3+} ↓ Fe^{2+}		Mn^{4+} ↓ Mn^{2+}		NO_3^- ↓ NO_2^- ↓ N_2		O_2 ↓ H_2O		Typické redox reakce pro příslušnou oblast E_H				
Methanogenní bakterie <i>Methanothrix</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanobacter</i> <i>Dehalococcoides</i> <i>Dehalobacter</i>		Sulfátredukující bakterie <i>Sulfurospirillum</i> <i>Desulfitobacter</i> <i>Desulfovibrio</i>		Fe ³⁺ redukující bakterie <i>Geobacter</i> <i>Desulfuromonas</i>		Mn ⁴⁺ redukující bakterie		Denitrifikační bakterie <i>Thiobacillus denitrificans</i>		Aerobní bakterie <i>Pseudomonas</i> <i>Polaromonas</i>		Příklady zástupců aktivní mikroflory				

Konfigurace testu

- Tři vrty, každý z jiné lokality
- Všechny vrty lokalizovány v ohnisku kontaminace CLE
- Lokality byly hodnoceny za stejné časové období – tj. srovnatelné klimatické podmínky
- Na všech lokalitách aplikace organického substrátu v cca stejném termínu
- Porovnání průběhu ERD ze tří lokalit – terénních, chemických a molekulárně genetických analýz

Vyhodnocení výsledků ERD
v jednotlivých vrtech

TERÉNNÍ A CHEMICKÉ ANALÝZY

KHSANACE s.r.o.

AECOM

Vrt	Poznámka	Site	1. Odběr – JARO 2015		Aplikace syrovátky	2. Odběr – LÉTO 2015	
			Datum	Charakter		Datum	Charakter
A-1	Není aplikační vrt. Syrovátka aplikována proti směru proudění p.v.	I.	26.3.2015	Zpomalená konečná transformace CLE v důsledku nedostatku substrátu. Fáze eten MAX.	29.4.2015	1.6.2015	Akcelerace transformace CLE, produkce etenu 3x vyšší oproti 3/2015, mírný nedostatek org.C., fáze eten MAX.
NA-15	Aplikační vrt	II.	26.2.2015	Transformace CLE ve fázi cisDCE MAX - vysoká konc. Nedostatek org.C.	26.5.2015, 1,1 m3	14.7.2015	Akcelerace transformace CLE, produkce etenu 3x vyšší oproti 2/2015. Fáze eten MAX. org.C dostatek
HV-26	Aplikační vrt	III.	4.3.2015	Transformace CLE ve fázi cisDCE MAX - střední konc. Nedostatek org.C.	23.4.2015, 2,0 m3	21.7.2015	Téměř vysanováno, transformace CLE dobíhá, org.C nadbytek

Unit	WEL:	A-1	A-1	NA-15	NA-15	HV-26	HV-26
-	<i>sampling date</i>	26-3-2015	1-6-2015	26-2-2015	14-7-2015	4.3.2015	21.7.2015
µg/l	VC	784	235	563	485	154	7
µg/l	cis-1,2-DCE	515	318	1 830	99	352	11
µg/l	TCE	0,37	2,70	2,94	<0,5	0,59	<1
µg/l	PCE	0,76	5,60	1,28	<0,5	1,64	<1
µg/l	suma CIU (DCE, TCE, PCE)	1 309	566	2408	584	354	11
µg/l	methane	11 300	25 500	6 900	11 000	4 400	14 000
µg/l	ethane	<5	220	200	190	48	27
µg/l	ethylene	1 230	3 570	360	930	120	20
mg/l	H ₂ S + S ²⁻	0,16	0,18	0,095	0,118	0,104	0,342
mg/l	COD-Cr	26,10	50,20	36	227	12	283
mg/l	NO ₃ ⁻	1,10	1,30	<0,27	<3,32	<0,33	<0,27
mg/l	NO ₂ ⁻	0,04	< 0,01	0,186	<0,164	<0,0164	0,005
mg/l	PO ₄ ³⁻	< 0,3	< 0,03	<0,04	<0,04	1,12	8,61
mg/l	SO ₄ ²⁻	< 3	6,00	146	<0,5	89,70	21,00
mg/l	K	4,60	4,70	11,1	19	11,40	17,30
mg/l	Fe ²⁺	16,4	30,7	39,9	39,8	0,649	1,350
mg/l	Mn ²⁺	8,4	9,2	22	16,1	0,026	0,039
mg/l	NH ₄ ⁺ + NH ₃	2,3	3,8	4,48	19,60	3,13	7,98
-	pH	7,83	7,78	7,12	6,72	6,86	6,63
mg/l	dissolved O ₂	0,13	0,33	1,82	0,49	0,16	1,04
mV	Redox measured: E(AgCl)	-253	-247	-181	-174	-304	-100
mV	Redox recalculated: E(H)	-35	-28	37	42	-88	116

Terénní a chemické analýzy souhrn – AE, KH

1. Všechny vrty se nachází ve fázi sulfátové redukce/sulfátové respirace – prokázaný výskyt sulfanu a sulfidů
2. Redox potenciál odpovídá slabě redukčním/fakultativně anaerobním podmínkám
3. Acidobazické podmínky jsou u všech vrtů příznivé pro aktivitu *Dehalococoides* – slabě kyselé až slabě neutrální (min 6,63-max 7,83).
4. HV-26 je téměř čistý, aktivita dehalogenační mikroflory klesá, produkce etenu i etanu je minimální, nadbytek org. C i fosfátů.
5. A-1 a NA-15 transformace CLE stále probíhá, proces funguje optimálně, dominantní je koncentrace etenu a etanu nad koncentrací VC, cisDCE, TCE či PCE

Vyhodnocení výsledků ERD v jednotlivých vrtech

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ANALÝZY



Použité molekulárně-genetické analýzy

PCR a NGS

PCR

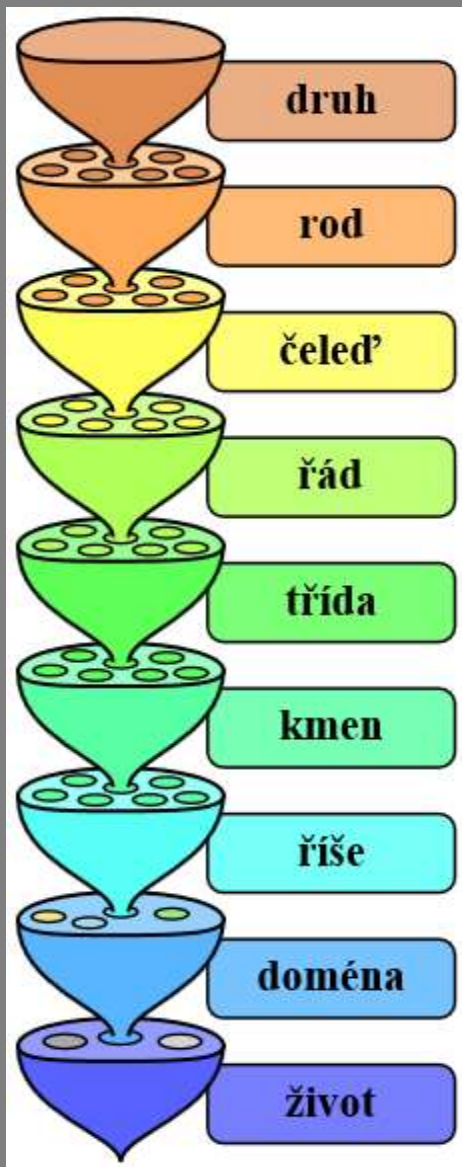
Polymerase Chain Reaction

- zkoumá vybrané úseky DNA
- V závislosti na použitých „primerech“, lze získat informace o přítomnosti konkrétních bakteriálních kmenů, detekovat skupiny bakterií s hledanou vlastností nebo testovat přítomnost funkčních genů

NGS

Next Generation Sequencing

- Metodika sekvenace druhé generace
- Umožňuje stanovit složení bakteriálních komunit
- Vlastní postup se skládá z tří hlavních kroků: přípravy knihovny, emulzní PCR a vlastní sekvenace. Následuje IT a statistické zpracování naměřených dat a jejich vyhodnocení
- TUL detekuje až úroveň Family/Čeď



Species

Dehalococcoides mccartyi, *Geobacter lovleyi*,
Dehalobacter restrictus, *Sulfurospirillum barnesii*,
Desulfitobacterium dehalogenans,
Desulfitobacterium chlororespirans

Genus

Dehalococcoides, *Geobacter*, *Dehalobacter*,
Sulfurospirillum, *Desulfitobacterium*,

Family

Dehalococcoidacea, *Geobacteraceae*, *Peptococcaceae*,
Campylobacteraceae



Order

Dehalococcoidales, *Desulfuromonadales*, *Clostridiales*,
Campylobacterales

Class

Dehalococcoides, *Deltaproteobacteria*, *Clostridia*,
Epsilonproteobacteria

Phylum

Chloroflexi, *Proteobacteria*, *Firmicutes*,

Kingdom

Bacteria

Příklad aktivní mikroflóry v procesu ERD pro interpretaci výsledků NGS analýzy

Obr.:Wikipedie, *Biological classification* L. Pengo

Výsledky PCR screeningu - MBÚ



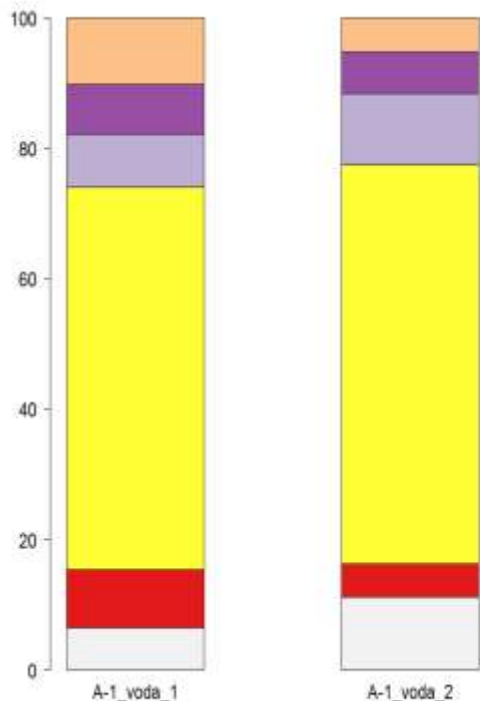
Vrt	Datum odběru	16S - DHC	nested 16S-DHC	16S - GEO	16S - DRE	bvcA	vcrA	<i>Sulfurospirillum</i>	<i>Desulfitobacterium</i>	SRB
A-1	26.3.2015	+	+	+	-	+++	+++	+++	+++	+++
A-1	1.6.2015	+	+	+/-	-	+++	+++	+++	+++	+++
NA-15	26.2.2015	+	+	-	-	++	-	++	+/-	++
NA-15	14.7.2015	+	+	++	-	+++	++	+++	++	+++
HV-26	4.3.2015	+	+	++	-	+++	++	++	+	++
HV-26	21.7.2015	+	+	+	-	++	++	++	+/-	++

A-1: stabilní aktivní mikroflóra neovlivněná přímou aplikací org. substrátu

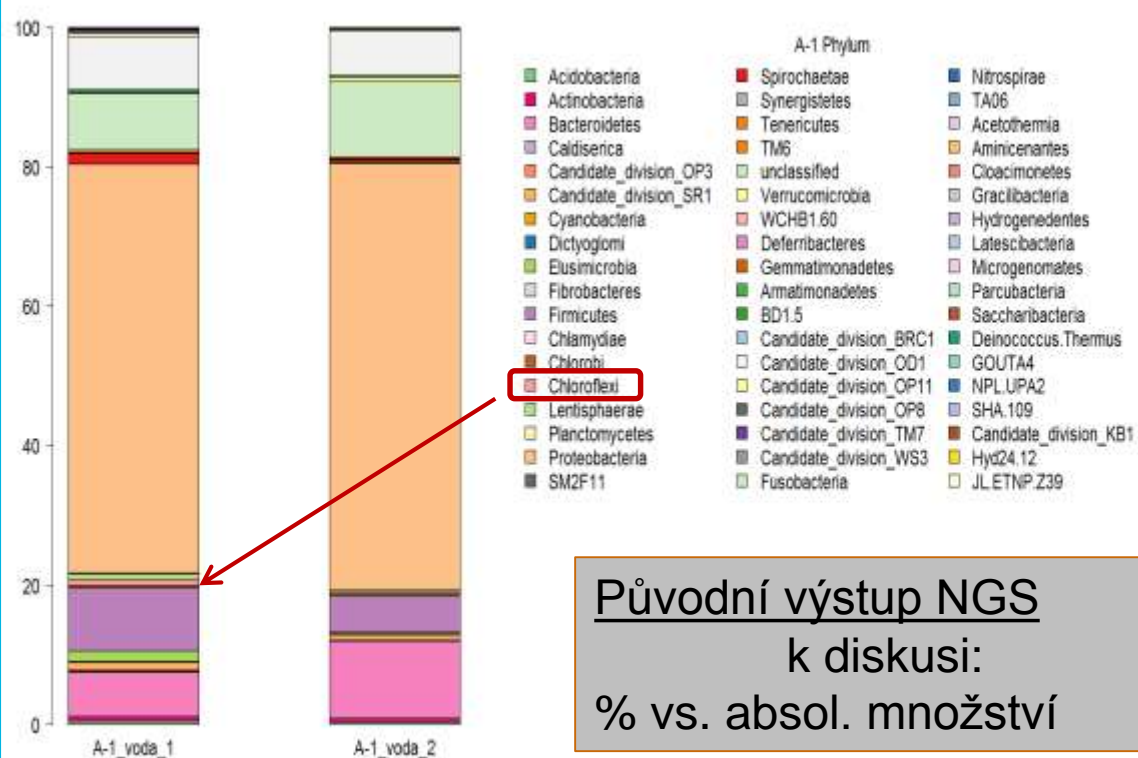
NA-15: intenzivní stimulace ERD po dodání org. C

HV-26: finální fáze sanace, útlum aktivity dehalogenační mikroflóry, návrat k přirozeným podmínkám lokality

Výsledky NGS – TUL: A-1, úroveň *phylum* = kmen



Zjednodušená forma NGS tak,
aby zachytila bakteriální
diverzitu týkající se pouze
dominantních taxonů



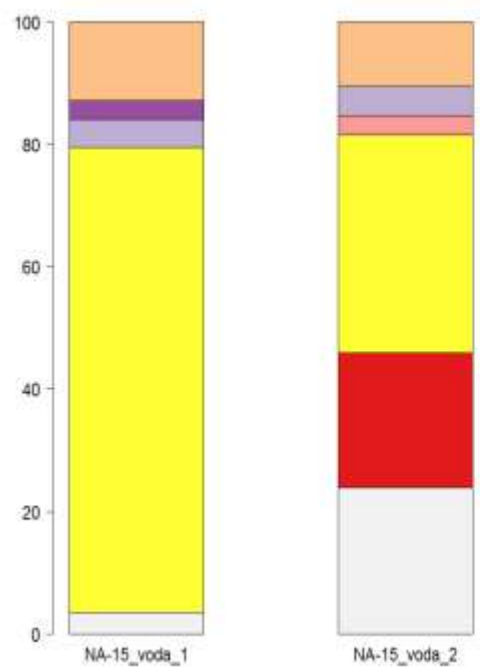
Dominantní:
Bacteroidetes – bílá
Firmicutes – červená
Proteobacteria - žlutá

Původní výstup NGS
k diskusi:
% vs. absol. množství

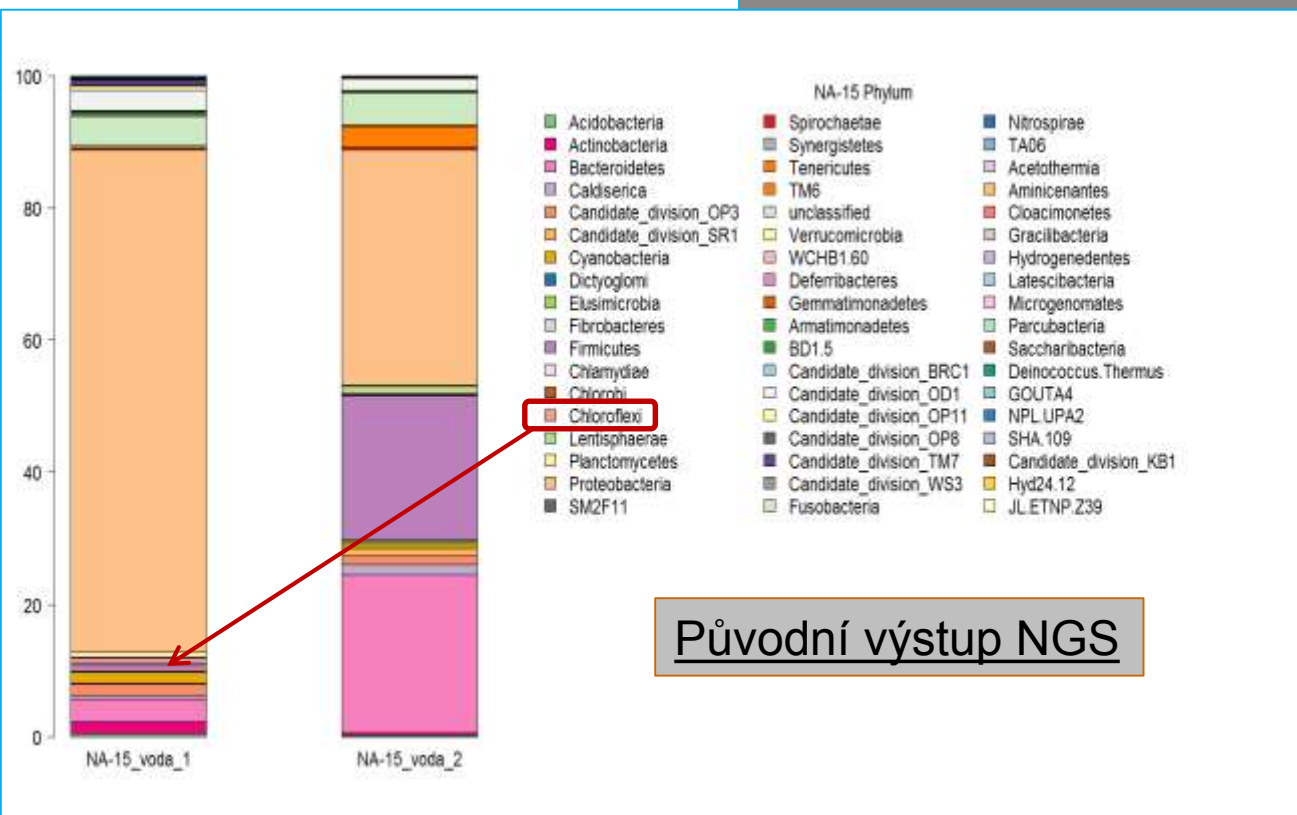
Výsledky NGS – TUL: NA-15, úroveň *phylum* = kmen



Zjednodušená forma NGS



- NA-15 Phylum
- Bacteroidetes
 - Firmicutes
 - Proteobacteria
 - Tenericutes
 - unclassified
 - Candidate_division_OD1
 - others

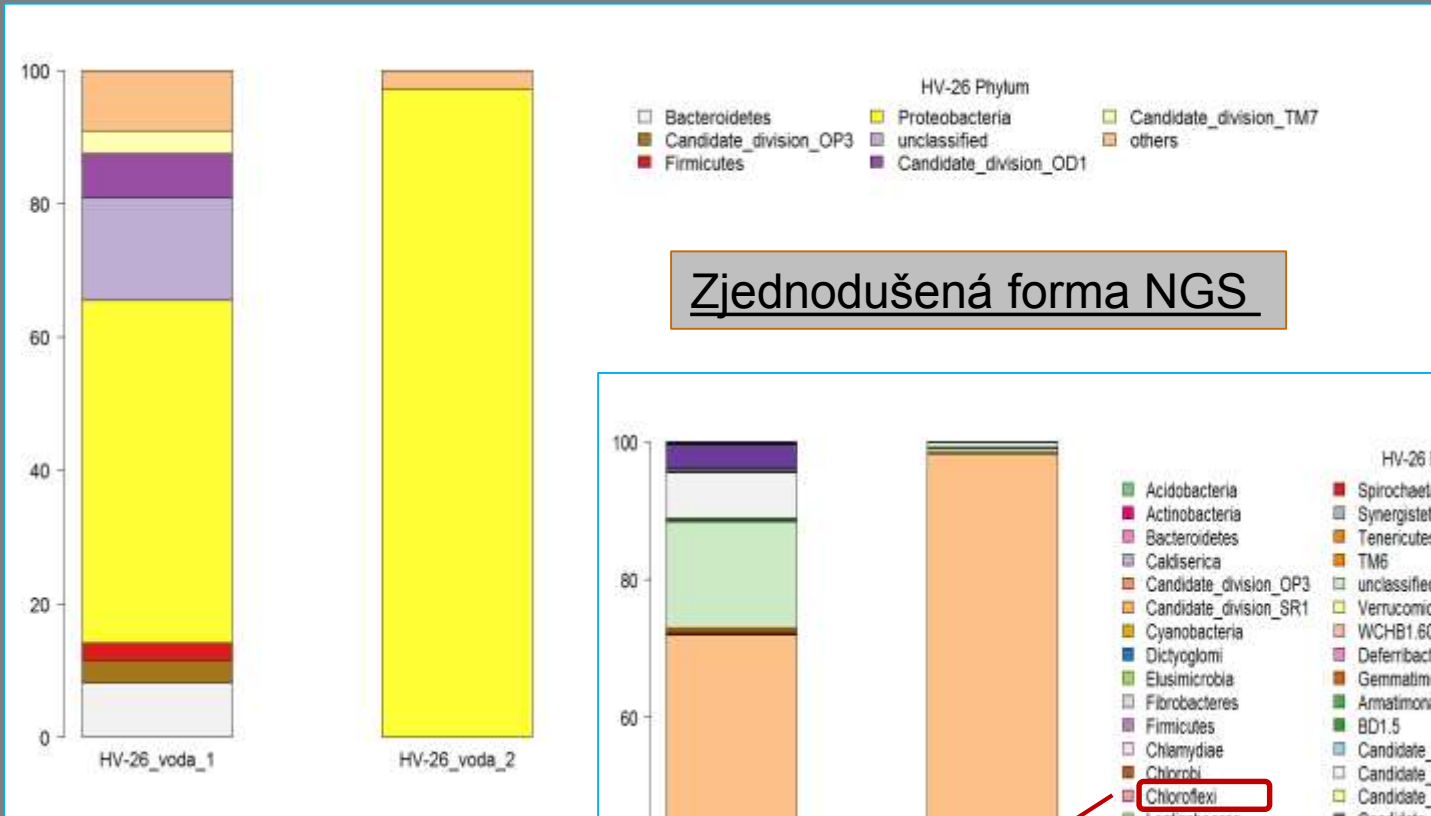


- NA-15 Phylum
- Acidobacteria
 - Actinobacteria
 - Bacteroidetes
 - Caldiseica
 - Candidate_division_OP3
 - Candidate_division_SR1
 - Cyanobacteria
 - Dictyoglomi
 - Elusimicrobia
 - Fibrobacteres
 - Firmicutes
 - Chlamydiae
 - Chloroflexi
 - Lentisphaerae
 - Planctomycetes
 - Proteobacteria
 - SM2F11
 - Spirochaetae
 - Synergistetes
 - Tenericutes
 - TM6
 - unclassified
 - Verrucomicrobia
 - WCHB1.60
 - Deferritobacteres
 - Gemmatimonadetes
 - Amnatimonadetes
 - BD1.5
 - Candidate_division_BRC1
 - Candidate_division_OD1
 - Candidate_division_OP11
 - Candidate_division_OP8
 - Candidate_division_TM7
 - Candidate_division_WS3
 - Fusobacteria
 - Nitrospirae
 - TA06
 - Acetothermia
 - Aminicenantes
 - Gracilbacteria
 - Cloacimonetes
 - Hydrogenedentes
 - Latescibacteria
 - Microgenomates
 - Parcubacteria
 - Saccharibacteria
 - Deinococcus_Thermus
 - GOUTA4
 - NPL_LUPA2
 - SHA_109
 - Candidate_division_KB1
 - Hyd24.12
 - JL_ETNP.Z39

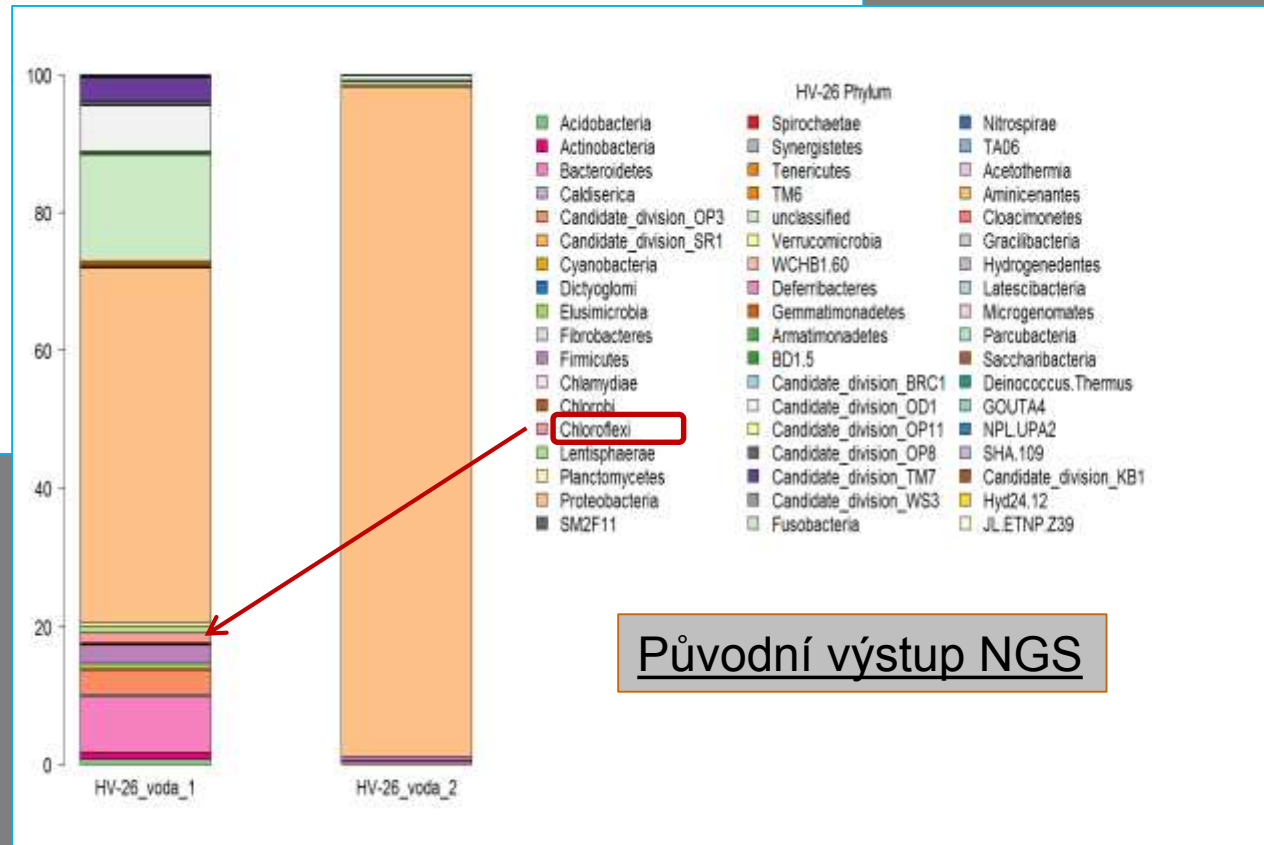
Původní výstup NGS

Dominantní:
Bacteroidetes – bílá
Firmicutes – červená
Proteobacteria - žlutá

Výsledky NGS – TUL: HV-26, úroveň *phylum* = kmen



Dominantní:
Bacteroidetes – bílá
Firmicutes – červená
Proteobacteria - žlutá



Výsledky NGS analýzy relevantní pro porovnání PCR screeningu ERD aktivní mikroflóry

CLE degradační konsorcium - hlavní zástupci	jaro 15			léto 15			NGS specifikace/zdroj
	A-1	NA-15	HV-26	A-1	NA-15	HV-26	
<i>Dehalococcoides</i>	0	0	0	0	0	0	Phylum: <i>Chloroflexi</i> , Class: <i>Dehalococcoidetes</i> Family: <i>Dehalococcoidaceae</i>
<i>Geobacter</i>	0	0	0	0	0	0	Phylum: <i>Proteobacteria</i> , Class: <i>Deltaproteobacteria</i> , Order: <i>Desulfuromonadales</i> , Family: <i>Geobacteraceae</i>
<i>Dehalobacter</i>	7	0	0	0	0	0	Phylum: <i>Firmicutes</i> , Class: <i>Clostridia</i> , Order: <i>Clostridiales</i> , Family: <i>Peptococcaceae</i>
<i>Sulfurospirillum</i>	256	4	20	0	192	0	Phylum: <i>Proteobacteria</i> , Class: <i>Epsilonproteobacteria</i> Order: <i>Campylobacterales</i> , Family: <i>Campylobacteraceae</i> Genus: <i>Sulfurospirillum</i>
<i>Desulfito bacterium</i>	0	0	0	0	0	0	Phylum: <i>Firmicutes</i> , Class: <i>Clostridia</i> , Order: <i>Clostridiales</i> Family: <i>Peptococcaceae</i>

Molekulárně genetické analýzy souhrn – MBÚ a TUL

1. PCR screening poskytuje dostatečnou informaci o průběhu a vývoji ERD procesu pro praktické sanační účely
2. NGS nelze považovat za nástroj vhodný k detekci specifické mikroflóry ERD procesu. Důvodem je jejich malý podíl v celkové bakteriální populaci (jediný rod ze zájmové skupiny CLE-konsorcia, který se dle výstupů NGS podařilo detekovat je *Sulfurospirillum*). To ovšem neznamená, že sledované mikroorganismy nejsou aktivní, výsledek jejich činnosti je prokázán dosahováním sanačních limitů na lokalitách s aplikací ERD

Závěr

1. Účinnost metody ERD byla prokázána na třech odlišných lokalitách ve stejném období = funguje a je vhodnou metodou pro sanaci CLE
2. Dle výsledků terénních a chemických analýz lze průběh ERD řídit – termín a množství aplikace substrátu
3. PCR screening je významným nástrojem pro kontrolu o stavu a vývoje specifické ERD mikroflóry pro řízení sanace
4. NGS analýza poskytuje obraz o stavu a vývoji celkové mikroflóry, pro sledování ERD mikroflóry pro praktické účely ji nelze doporučit

Děkujeme za pozornost

tým projektu TECHTOOL

