



AECOM

aquatest

EPFL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

EPS
biotechnologie

KHSANACE s.r.o.

TECHNICKÁ
UNIVERZITA
V LIBERCI

VODNÍ
ZDROJE
AKČNÍ SPOLEČNOST

MULTIDISCIPLINÁRNÍ HODNOCENÍ PRŮBĚHU REDUKTIVNÍ DEHALOGENACE CHLOROVANÝCH ETHYLÉNŮ

MULTIDISCIPLINARY EVALUATION REDUCTIVE DEHALOGENATION OF CHLORINATED ETHENES

Monika Stavělová¹⁾, Sonia-Estelle Tarnawski²⁾, Christof Holliger²⁾, Pierre Rossi²⁾,
Iva Sakmaryová³⁾, Jiří Mikeš⁴⁾, Maria Brennerová⁵⁾

¹⁾ AECOM CZ s.r.o., Troská 92, 171 00, Praha 7, e-mail: Monika.Stavelova@aecom.com

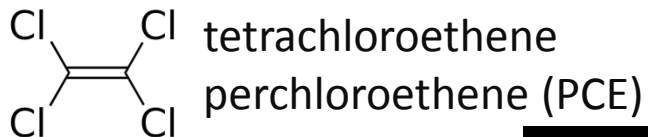
²⁾ École polytechnique fédérale de Lausanne, CH A1 374 (Bâtiment CH), Station 6, 1015 Lausanne

³⁾ Technická Univerzita v Liberci, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace
Studentská 2/1402, 461 17 Liberec

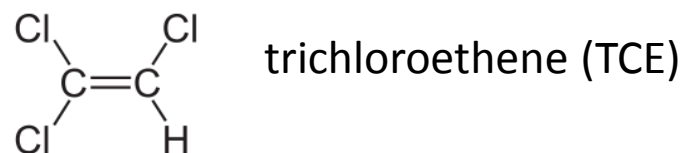
⁴⁾ EPS s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice

⁵⁾ Mikrobiologický ústav ČSAV, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Chlorované etheny (CE)



&



Polygrafický průmysl
(TCE)



Chemické čištění
Anestetikum
(TCE)



Odmašťování



Barvení textilií
(TCE)

➤ Celosvětově druhý nejrozšířenější kontaminant



The problem to be solved – coming from remediation companies' practice

Site with groundwater and soil contaminated by widely used degreasers (PCE, TCE)

1. Current method of the problem solution: Enhanced reductive dehalogenation (ERD)

- One of used remedial approach
- Managed in-situ anaerobic bioreactor - stimulation of active autochthonic microflora
- Organic substrate addition necessary
- transformation of PCE + TCE to non-toxic final products

perchloroethene (PCE) → trichloroethene (TCE) → cis1,2- dichloroethene (cis 1,2-DCE) → vinylchloride (VC) → ethene, ethane

2. Bottle neck of the ERD technique: “DCE stall”

- a cessation of the transformation resulting **accumulation of cis 1,2-DCE or carcinogenic VC**
- occurs only at some sites
- leads to significant increase of the remediation costs
- not determined reasons yet

3. Future method of the problem solution: **TECHTOOL** project

- **Multidisciplinary cooperation** (contaminated site characterization, field analysis, nanomaterials, chemical analysis, microbiology, molecular-genetic methods, statistical data evaluation)
- **a better insight into the process** of complex transformation of chlorinated ethenes
- Comprehensive **supporting degradation capacity** of the autochthonous microbial communities
- new approach towards **reducing the risk of the “DCE stall”**
- **minimizing financial losses** of the remediation companies

4. Material & Methods

- **Validation** of the new approach has to be based on a **large volume data evaluation**
- **Unified method** for site characterization, sampling, field measurement and site database-format is strictly adhered to by all partners
- **Investigated 8 sites** contaminated by chloroethenes

6 x ERD + 1 x nZVI (*nano-zero valent iron*) + **1 x MNA** (*monitored natural attenuation*)

AECOM – 4 sites, AQUATEST – 1 site, EPFL – 1 site

KHSANACE – 1 site, VODNI ZDROJE - 1 site

Strategie řešení projektu

AE, AQ,
KH, VZ

**Charakterizace lokalit
(databáze monitorování)**

**Molecular eco-genetic data
(přítomnost OHR potenciálu)**

MBU,
EPFL,
TUL

AQ,
TUL

**Nanovláknové samplery
(vzorkovací alternativa)**

**Anaerobní kultivace
(mikrobiální aktivita a diverzita)**

EPFL,
EPS

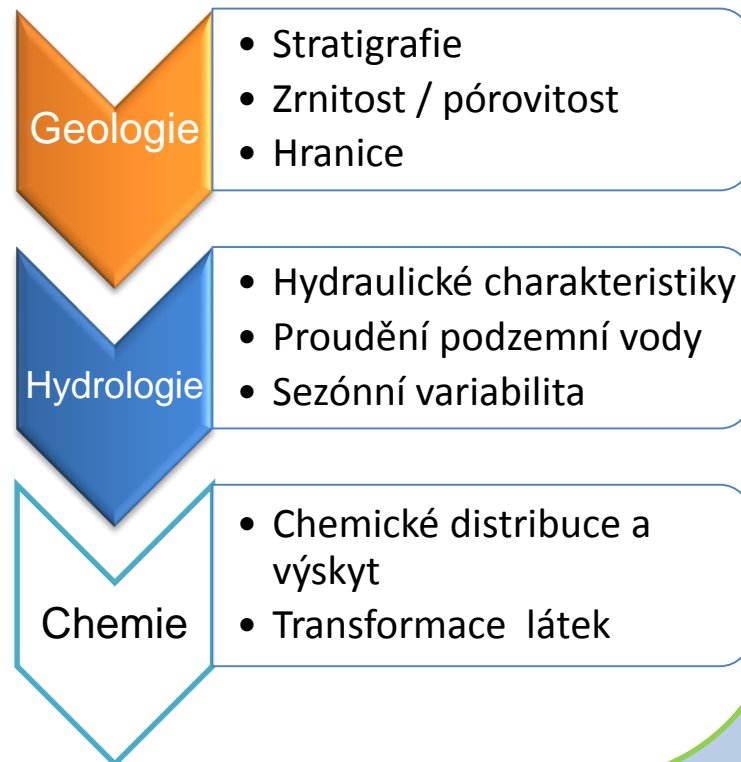
**Statistická analýza multivariabilních parametrů
vyvinuté v EPFL**

Pilotní testy

**Integrační technologie pro hodnocení a podporu úplného
odstranění chlorovaných etylénů z podzemní vody
(manuál pro remediační společnosti, směrnice pro kontrolní orgány)**

Charakterizace a monitorování lokalit

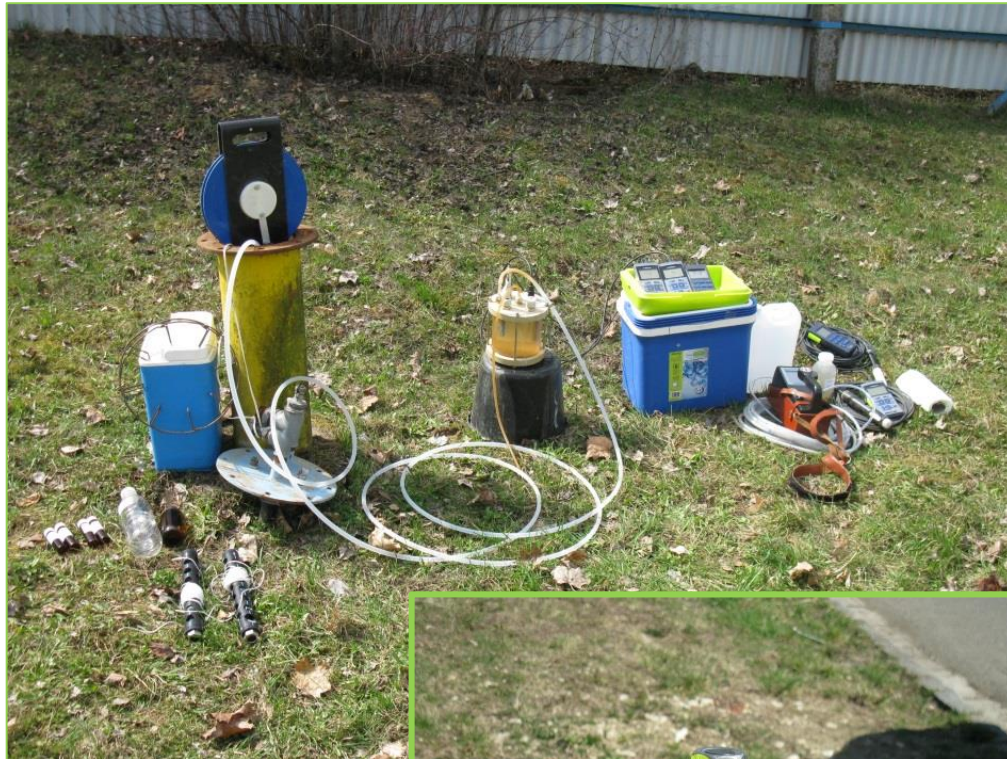
- Úplná charakterizace
- Standardizované a unifikované vzorkování
- Databázová matice – vybrané environmentální parametry



Sampling overview:

- contaminant & daughter products analysis
- electron-acceptors analysis
- hydrochemical parameters
- organic substrate content
- metabolic gases content
- nanosamplers
- samples for anaerobic cultivation
- samples for DNA isolation and molecular genetic analysis





Molekulárně-biologické nástroje

Mikro
biologie

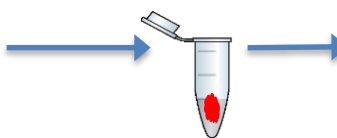
DNA extrakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR)



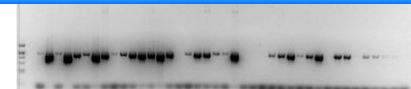
Maxwell™ 16 System
(Promega, USA)

Standardizovaná izolace z
vysokého počtu vzorků:
261 vzorků, 1083L, 8 lokalit



16S rRNA geny
+ fluorescentní primery

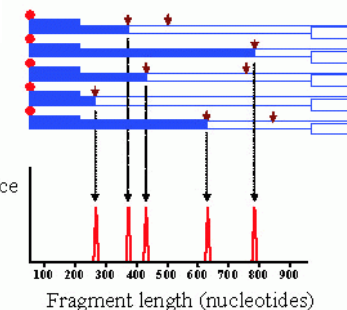
Detekce organohalid-respirujících bakterií
a katabolických genů (*vcrA*, *bvcA*)



Štěpení
restrikčními enzymy

Značené DNA
fragmenty

Separace
výsledných
produktů



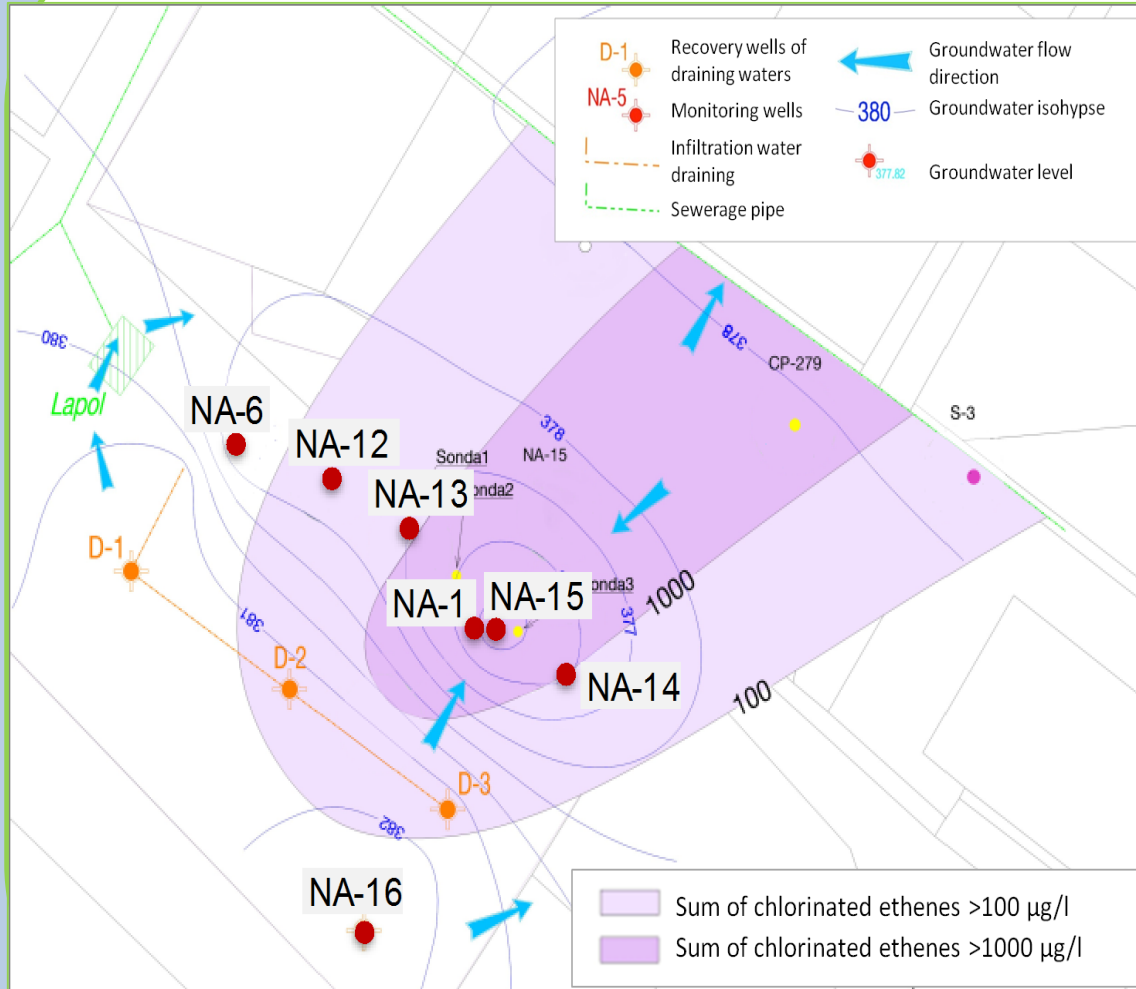
qPCR funkčních genů a
16S rRNA genů

T-RFLP fingerprinty

Modelová lokalita

- Šrotiště (20 x 45 m) v areálu průmyslového podniku
- Strojní výroba od r.1922
- Kontaminace PCE a ropnými látkami zjištěna v okolních studnách v r. 1998
- 2 komunikující zvodně – ověřeno fluoresceinem, hladina podzemní vody cca 2 m p.t.





| Site limits: | µg/l |
|--------------|------|
| Sum DCE | 200 |
| TCE | 85 |
| PCE | 350 |

| Cheese-whey application | | |
|-------------------------|-------------|--------------------------|
| | Date (M_YY) | volume (m ³) |
| 1. | 7-10 | 6,0 |
| 2. | 8-10 | 6,0 |
| 3 | 11-11 | 6,0 |
| 4 | 1-12 | 6,0 |
| 5 | 5-12 | 6,0 |
| 6 | 9-13 | 7,7 |
| Totally Applied | | 37,7 |

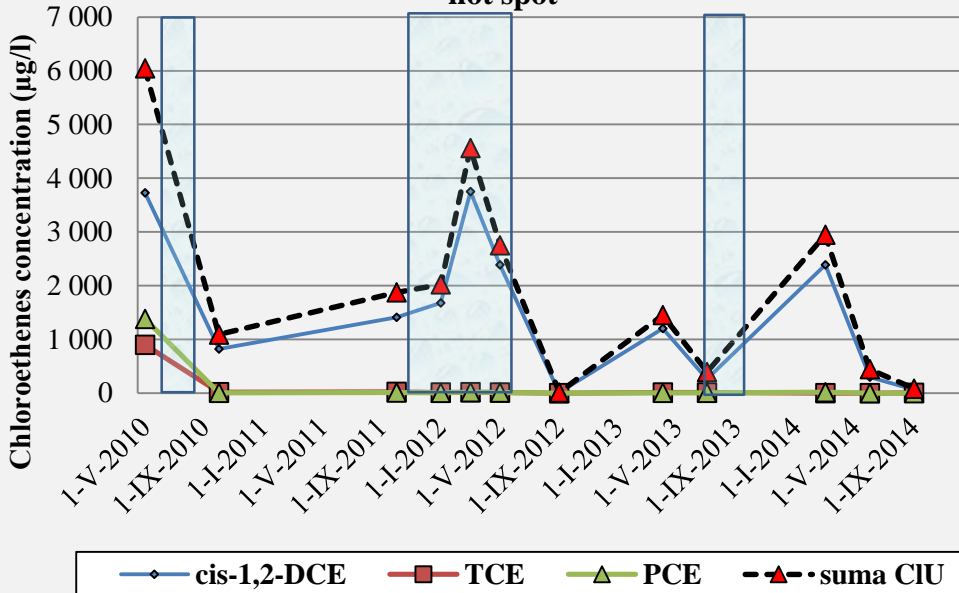


a temporary waste dump

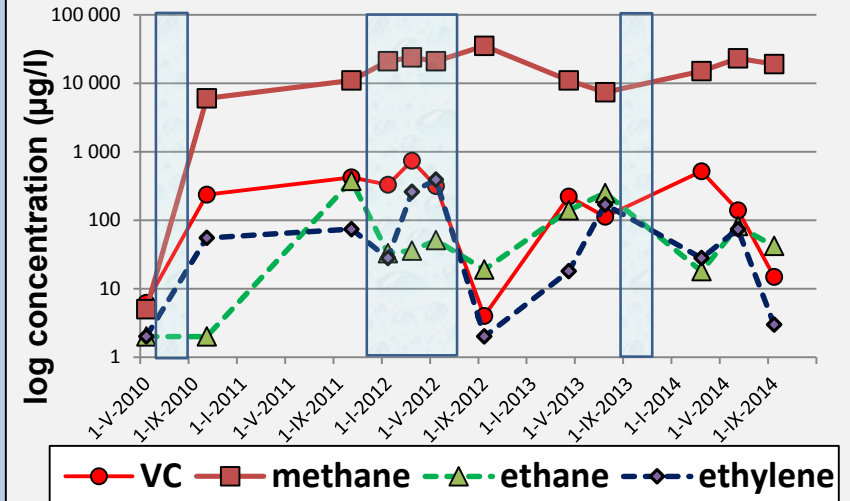


NA-1: the hot spot

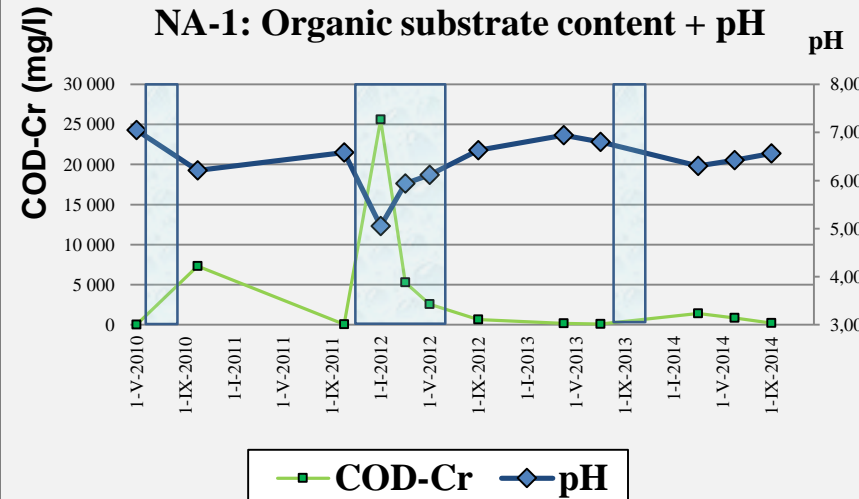
NA-1: Chloroethenes changing within the time hot spot



NA-1: Daughter products development

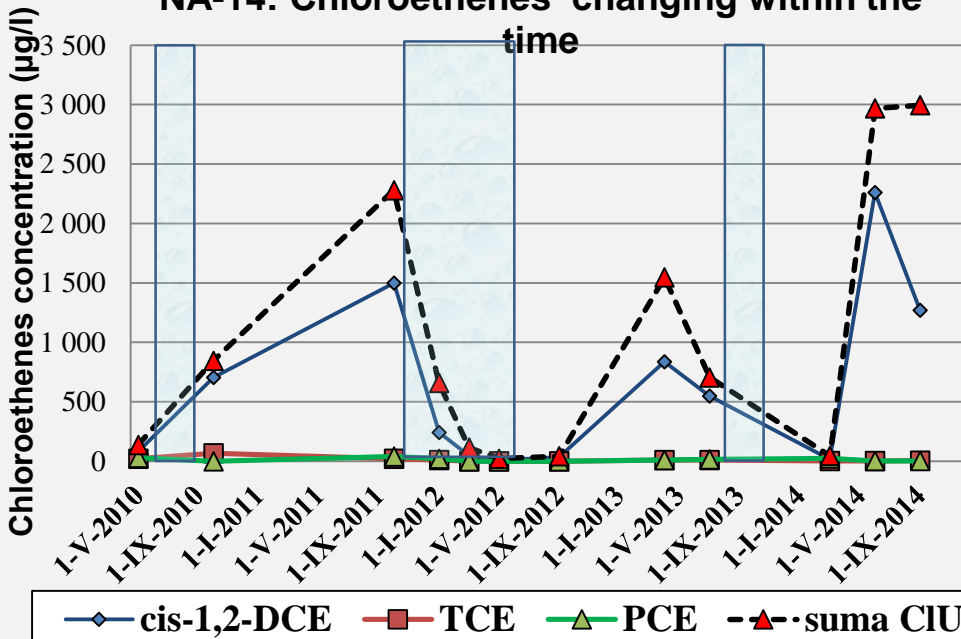


NA-1: Organic substrate content + pH

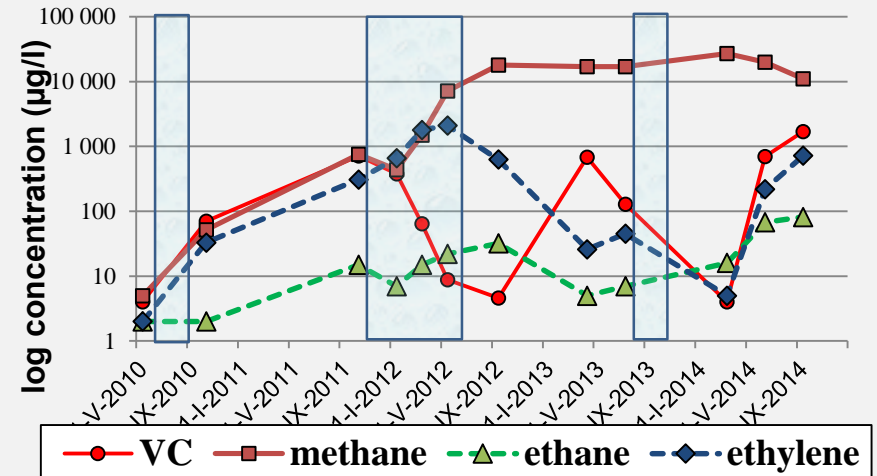


NA-14: the plume border

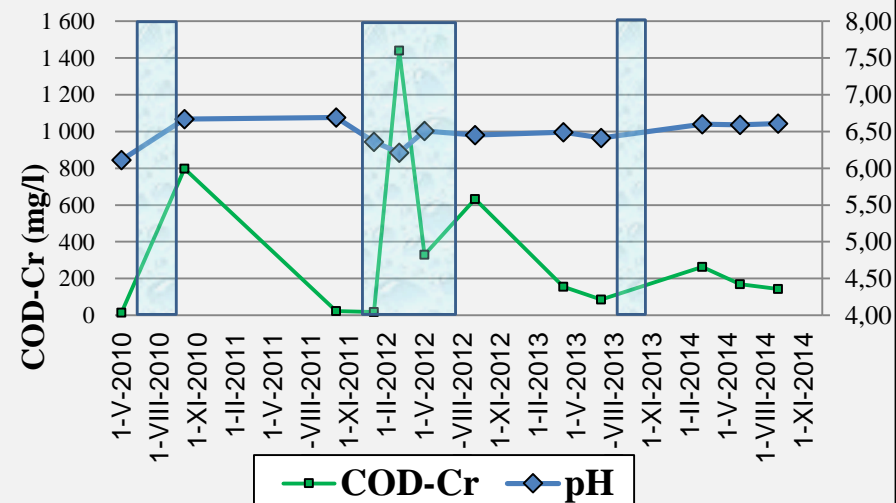
NA-14: Chloroethenes changing within the time



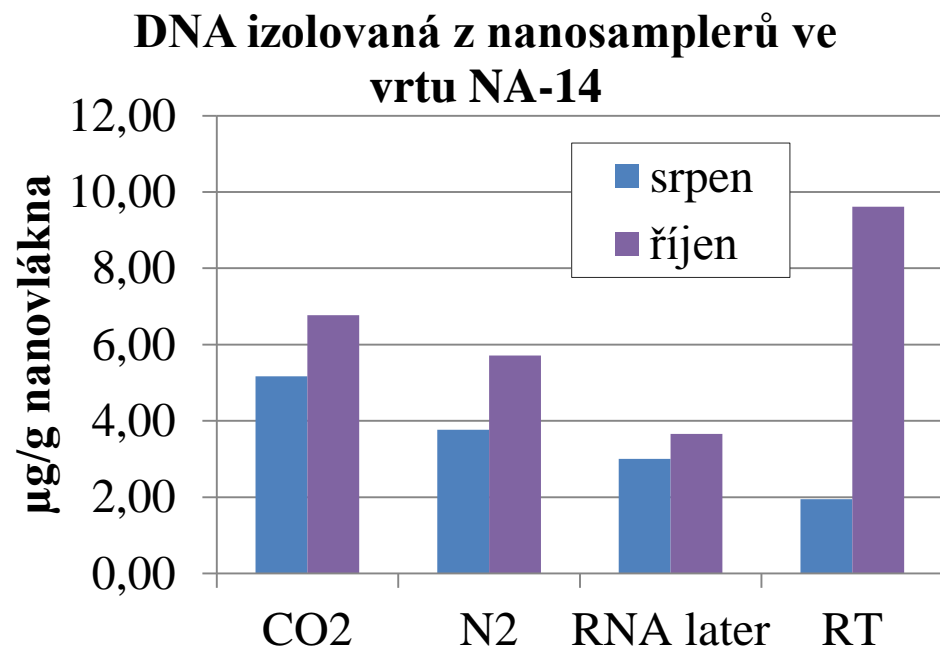
NA-14: Daughter products development



NA-14: Organic substrate content + pH



Nanosamplery – test stabilizace DNA při transportu (TUL)



- Instalace nanosamplery 04/2014
- Test z pěti vrtů na pěti různých lokalitách
- Pro výtěžek a kvalitu DNA zachycené na nanonosičích neměl způsob konzervace vzorku zásadní význam
- Více záleží na postupu při izolaci DNA z nanonosiče
- Prokázán trend v nárůstu biomasy během dvouměsíčního intervalu
- Z PCR z DNA z nanonosičů identifikovány *bvca*, *vcrA*, *Dehalococcoides* sp., i ostatní sledované skupiny mikroorganismů obdobně jako v izolátech z filtrované podzemní vody



Solid
CO₂



Liquid
N₂

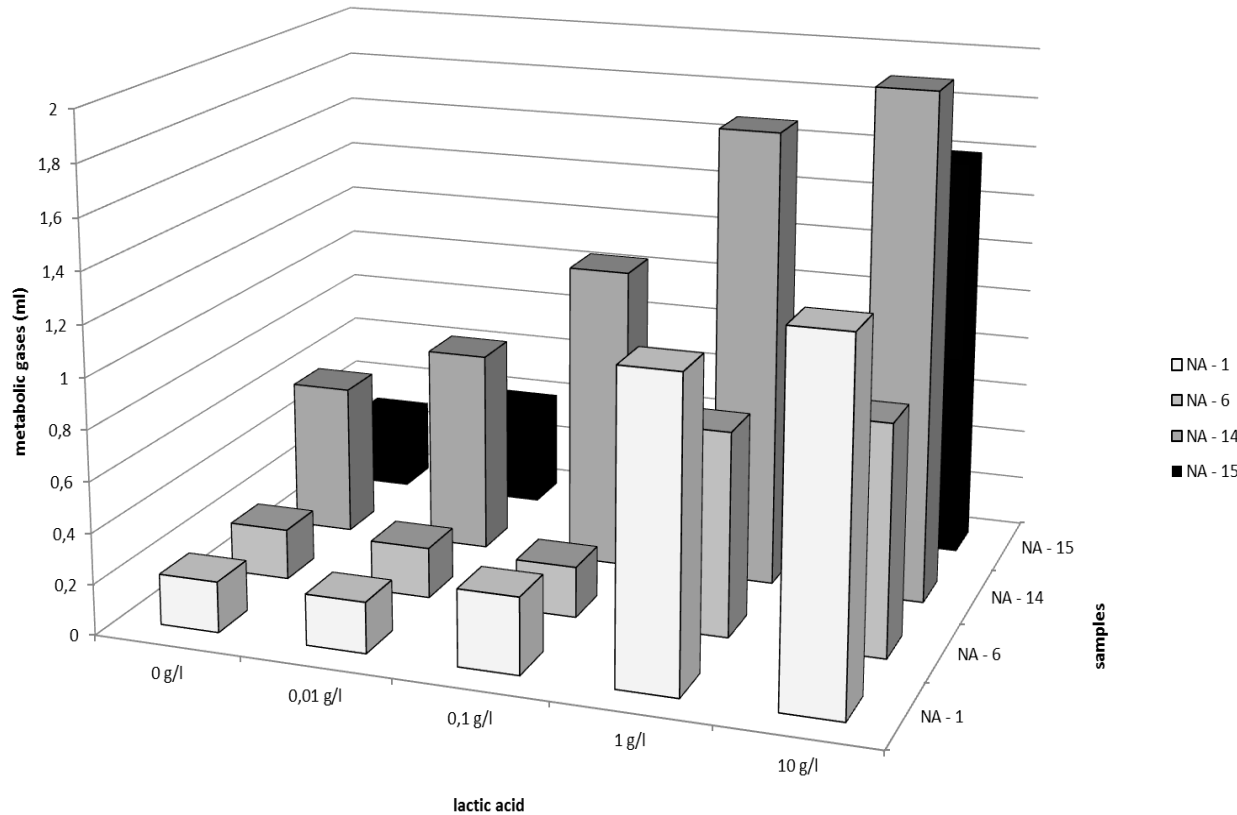
RNAlater



Cooling
box



Anaerobní kultivace (EPS)



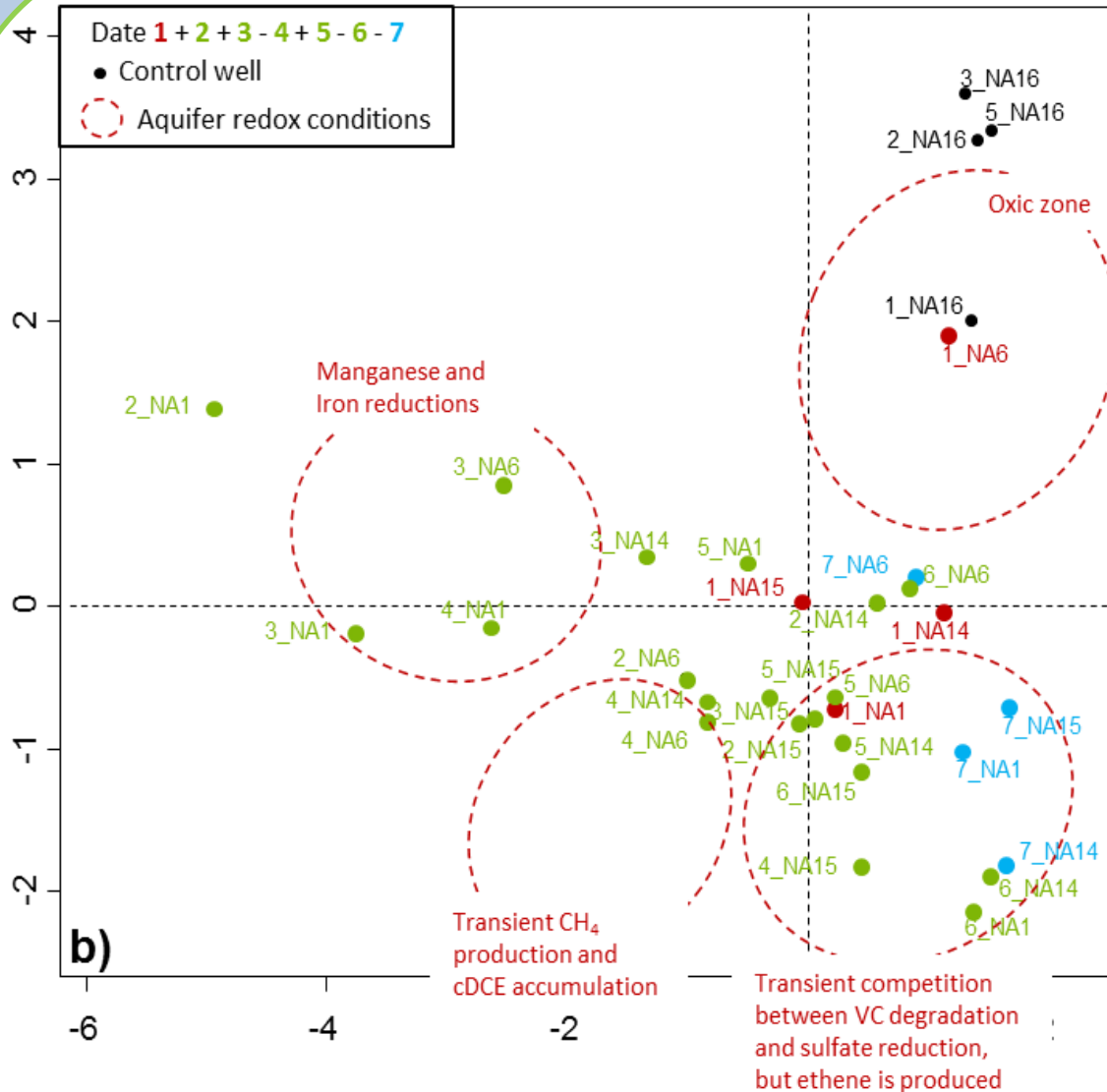
Respirační aktivita společenstev přítomných ve vrtech (= podzemní vodě) modelové lokality

- Porovnává se objem produkovaných plynů za anaerobních podmínek

| Rok | Vrt | Odběr | 16S - DHC nest ed | 16S- DHC | 16S - GEO | 16S - DRE | bvCA | vcRA | Sulfu rospi rillu m | Desu lfito bact eriu m | SRB |
|------|-------|------------|----------------------------|-------------|--------------|--------------|------|------|------------------------------|------------------------------------|-----|
| | NA-1 | 10.11.2011 | + | + | - | - | + | + | | | |
| | NA-6 | 10.11.2011 | +/- | + | - | - | + | + | | | |
| | NA-14 | 10.11.2011 | + | + | - | + | | | | | |
| | NA-15 | 10.11.2011 | +/- | - | - | - | - | - | | | |
| | NA-16 | 10.11.2011 | + | + | - | - | | | | | |
| 2012 | NA-1 | 09.01.2012 | + | - | - | - | - | - | | | |
| | NA-6 | 09.01.2012 | + | - | - | - | | | | | |
| | NA-14 | 09.01.2012 | +/- | + | - | - | | | | | |
| | NA-15 | 09.01.2012 | + | + | - | - | | | | | |
| | NA-16 | 09.01.2012 | + | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-1 | 13.03.2012 | + | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-6 | 13.03.2012 | + | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-14 | 13.03.2012 | + | + | - | - | | | | | |
| | NA-15 | 13.03.2012 | + | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-16 | 13.03.2012 | + | + | - | - | | | | | |
| | NA-1 | 11.05.2012 | - | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-6 | 11.05.2012 | + | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-14 | 11.05.2012 | + | + | - | - | - | - | | | |
| | NA-15 | 11.05.2012 | + | + | + | - | ++ | + | | | |
| | NA-1 | 06.09.2012 | +/- | + | - | - | | | | | |
| | NA-6 | 06.09.2012 | + | + | - | - | | | | | |
| | NA-14 | 06.09.2012 | + | + | + | - | - | - | | | |
| | NA-15 | 06.09.2012 | + | + | - | - | ++ | + | | | |
| | NA-16 | 06.09.2012 | + | + | - | - | | | | | |
| 2013 | NA-1 | 17.04.2013 | + | + | + | + | + | + | ++ | +/- | +++ |
| | NA-6 | 17.04.2013 | + | + | - | - | + | + | ++ | +/- | +++ |
| | NA-14 | 17.04.2013 | + | + | + | + | +/- | + | +++ | +/- | +++ |
| | NA-15 | 17.04.2013 | ++ | + | - | - | ++ | + | ++ | +/- | +++ |
| | NA-1 | 29.07.2013 | ++ | + | - | + | ++ | ++ | ++ | +/- | +++ |
| | NA-6 | 29.07.2013 | ++ | + | - | - | ++ | ++ | + | + | +++ |
| | NA-14 | 29.07.2013 | - | + | + | + | + | ++ | +++ | +/- | +++ |
| | NA-15 | 29.07.2013 | + | + | - | + | ++ | ++ | ++ | + | +++ |
| 2014 | NA-1 | 11.03.2014 | + | + | - | - | ++ | ++ | ++ | + | +++ |
| | NA-6 | 11.03.2014 | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | + | +++ |
| | NA-14 | 11.03.2014 | + | + | + | + | + | ++ | +++ | + | +++ |
| | NA-15 | 11.03.2014 | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | +++ |



Semikvantitativní
analýza
přítomnosti
mikroorganismů a
funkčních genů



MFA analýza změny kvality vody v jednotlivých vrtech v čase

Každý bod odpovídá těžišti čtyřmatic (*Terminal Electron Acceptors, Ostatní environmentální parametry, Výstupy z T-RFLP a Výstupy z PCR*). Každý bod obsahuje název vrtu (NA-X) a číslo odpovídající monitorovací kampani. Stav lokality na začátku sanace = **červené body**, stav během aktivní sanace = **zelené body**, **modré body** = rebounding, **černé body** = pozadový vrt NA-16 bez kontaminace

Závěr

Na příkladu konkrétní lokality sanované metodou ERD byly prezentovány dosavadní výsledky projektu Tectool:

- Molekulárně-genetická analýza DNA izolované z podzemní vody, identifikace klíčových mikroorganismů reduktivní dehalogenace včetně dvou vinylchlorid reduktáz (*vcrA* a *bvcA*)
- Využití nově vyvíjených nanosamplerů pro izolaci DNA + identifikace mikroorganismů ERD včetně *vcrA* a *bvcA*
- Představení modifikované metody anaerobní kultivace optimalizované pro provozní laboratoře
- Interpretace širokého souboru dat z monitoringu sanované lokality pomocí multivariabilní statistické analýzy: Multiple Factor Analysis (MFA). Tato metoda má velký interpretační potenciál, který se může stát silným nástrojem pro bioremediační praxi



AECOM

aquatest

EPFL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

EPS
biotechnologie

KHSANACE s.r.o.

TECHNICKÁ
UNIVERZITA
V LIBERCI

VODNÍ
ZDROJE
AKČNÍ SPOLEČNOST

Acknowledgement

This study was funded by Technological Agency of Czech Republic within the project **TECHTOOL No. TA02020534**.

Many thanks for the excellent cooperation on the project belong to T. Lederer (AQUATEST), R. Heřmánek (KH), P. Hlaváčová (VODNÍ ZDROJE).



AECOM

aquatest

EPFL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

EPS
biotechnologie

KHSANACE s.r.o.

TECHNICKÁ
UNIVERZITA
V LIBERCI

VODNÍ
ZDROJE
AKČNÍ SPOLEČNOST



Thank you for your attention