

HODNOCENÍ VÝVOJE REDUKTIVNÍ DEHALOGENACE CHLOROVANÝCH ETHYLÉNŮ *IN-SITU* KLASICKÝMI A VĚDECKÝMI METODAMI

Monika Stavělová ¹, Pierre Rossi ², Iva Sakmaryová ³,
Jiří Mikeš ⁴, Maria Brennerová ⁵

1) AECOM CZ s.r.o.,

2) *École polytechnique fédérale de Lausanne,*

3) *Technická Univerzita v Liberci, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace*

4) EPS s.r.o.

5) *Mikrobiologický ústav ČSAV*



ÚVOD

- ❖ Chlorované etylény jsou druhým nejčastějším kontaminantem horninového prostředí
- ❖ Dostatek praktických zkušeností se sanací (+/-)
- ❖ Stále nové metody sledování úspěšnosti/efektivity sanace (dominantní uplatnění VaV grantů)
- ❖ Obvyklý postup sanačních prací:
 1. *fyzikální metody* - odtěžba, P&T, air-sparging, venting, promývání,....
 2. *inovativní metody in-situ* – chem. oxidace, chem. redukce, reaktivní bariéry, biodegradace, - a hlavně různé kombinace

STIMULOVANÁ REDUKTIVNÍ DEHALOGENACE (ERD – ENHANCED REDUCTIVE DEHALOGENATION)

- ❖ Hlavní předmět prezentace
- ❖ Pozitivní a rychlé výsledky z praxe (pokud prostředí umožní tvorbu stabilního anaerobního reaktoru in-situ)

Výhody metody

- Levná (dle substrátu)
- Doba sanace 2-3 roky
- Rebounding obvykle pouze 1x
- Návrat k normálnímu stavu lokality do 1 roku po sanaci

Nevýhody metody

- Tvorba toxických meziproduktů
- Nebezpečí zastavení procesu na kumulaci cis-1,2DCE a VC
- Podzemní voda dočasně zapáchá

PROJEKT TECHTOOL (2012-2015)

- ❖ studuje detailně ERD
- ❖ propojení znalostí z oblasti výzkumu se znalostmi a potřebami společností ze sanační praxe
- ❖ tým: univerzity (2x), výzkumný ústav (1x), biotechnologické centrum (1x), sanační firmy (4x)
- ❖ holistický přístup → tvorba různorodých dat (terénní data, chemické analýzy, anaerobní kultivace, molekulárně-genetické analýzy)
- ❖ řeší metody statistického zpracování různorodých dat
- ❖ **CÍL: srozumitelně interpretovatelné výstupy použitých vědeckých metod pro účely sanační praxe**



AKTIVITY ON-SITE (AE, AQ, KH, VZ)

- ❖ 4 sanační firmy + 9 lokalit (bude sledováno 7-8)
- ❖ Unifikace všech činností a metodická přesnost pro všechny - postup odběru vzorků, úprava vzorků, rozsah terénních měření (stejný výrobce přístrojů) i chemických analýz (akreditované postupy)
- ❖ Unifikované databáze všech lokalit (xls, konkrétní políčko v databázi s údajem ke konkrétnímu parametru musí mít stejnou pozici v databázích ze všech lokalit)
- ❖ Preciznost (např. pro manipulaci se vzorky pro molekulárně – genetické analýzy)

STACIONÁRNÍ NANOSAMPLERY (TUL, AQ)

- ❖ nyní pro dostatek DNA pro jednu mol.-gen. anal. je třeba přefiltrovat 3-5 litrů jednoho vzorku podzemní vody
- ❖ nové řešení - inspirace ČOV: stacionární nanovláknenné nosiče
- ❖ definovaný velký specifický povrch (materiál, tvar a délka nanovláknna)
- ❖ optimalizace tvarů nanonosičů, patron a stabilizace on-site
- ❖ zanořeno celkem 26 ks (1-2 ks/vrt; 3–10 odběrů/sampler)



ANAEROBNÍ KULTIVACE (EPS, EPFL, MBU)

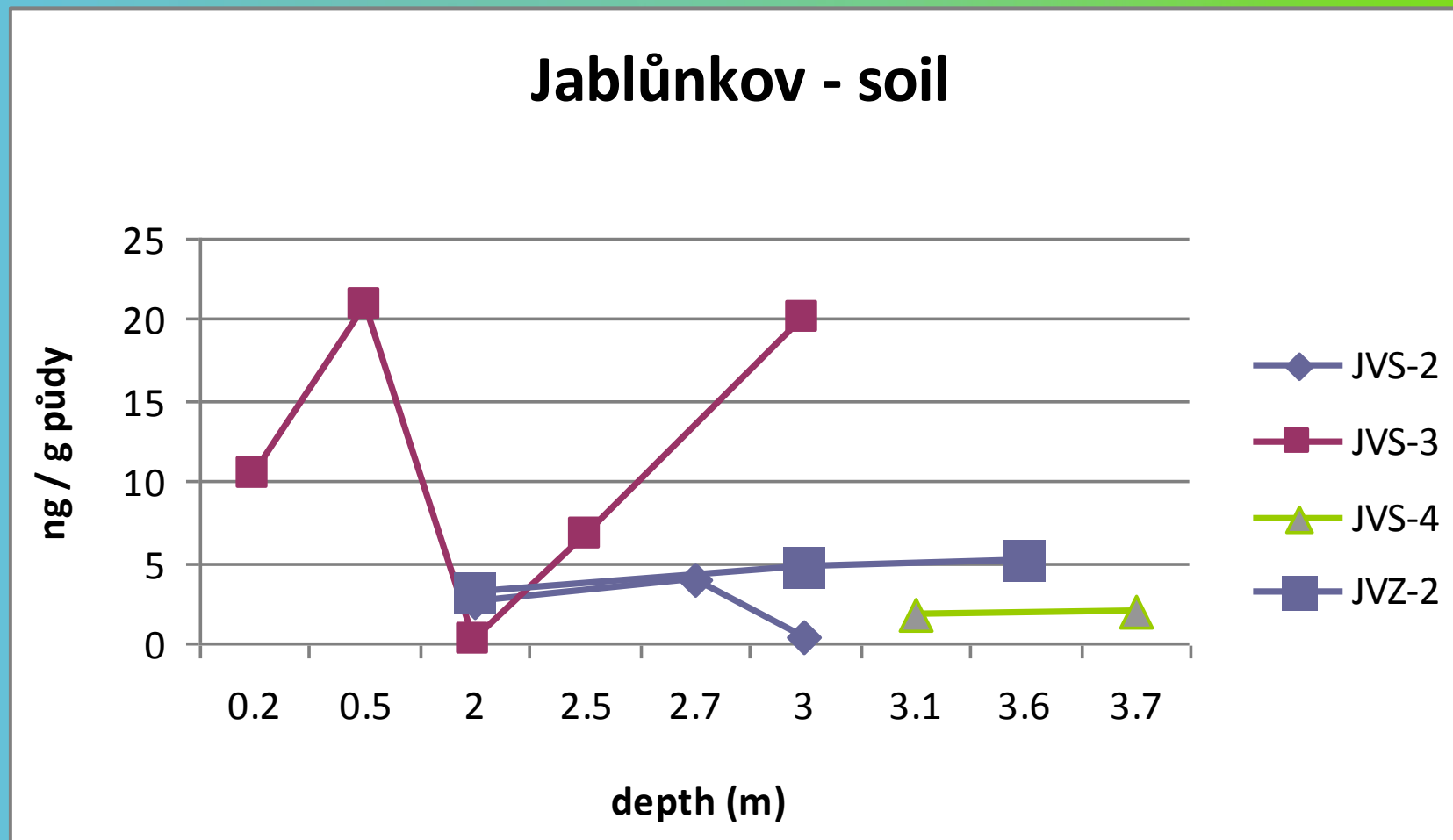
- ❖ v praxi stále oblíbené a používané, historicky srozumitelné
- ❖ levné
- ❖ omezením je „kultivovatelnost“ (odhady pro podzemní vodu < 1 %, pro zeminy 0,01-0,1%.
- ❖ holistický přístup k řešení – zahrnuty i kultivace
- ❖ záměr vyvinout kultivační metodu pro diagnostiku klíčových skupin kultivovatelných anaerobních bakterií aktivně se podílejících na ERD procesu (mohlo by se jednat o období „indikátorů fekálního znečištění“)
- ❖ dosud zkoumáno 13 vzorků zeminy, identifikováno 50-60 taxonomických jednotek
- ❖ posun metodiky - podzemní vody

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ANALÝZY (EPFL,MBU,TUL)

- ❖ Studují veškeré přítomné mikroorganismy ve vzorku dle izolované DNA (popř. RNA)
- ❖ Testování přítomnosti aktivních bakteriálních druhů a jejich funkčních genů zapojených do procesu ERD
- ❖ Základní testovací metodou je PCR (Polymerase Chain Reaction) umožňující zkoumat vybrané úseky DNA či RNA, klíčovým faktorem úspěch je výběr „primerů“
- ❖ Modifikace/zrychlení metody izolace DNA z environmentálních vzorků na Maxwell™ 16 System (Promega, Madison, USA) primárně určeném pro zpracování krevních a tkáňových vzorků - nyní 16 vzorků/2 hodiny, klasicky 8-10 vzorků/2 dny
- ❖ zpracováno 13 vzorků zeminy a 62 vzorků podzemní vody

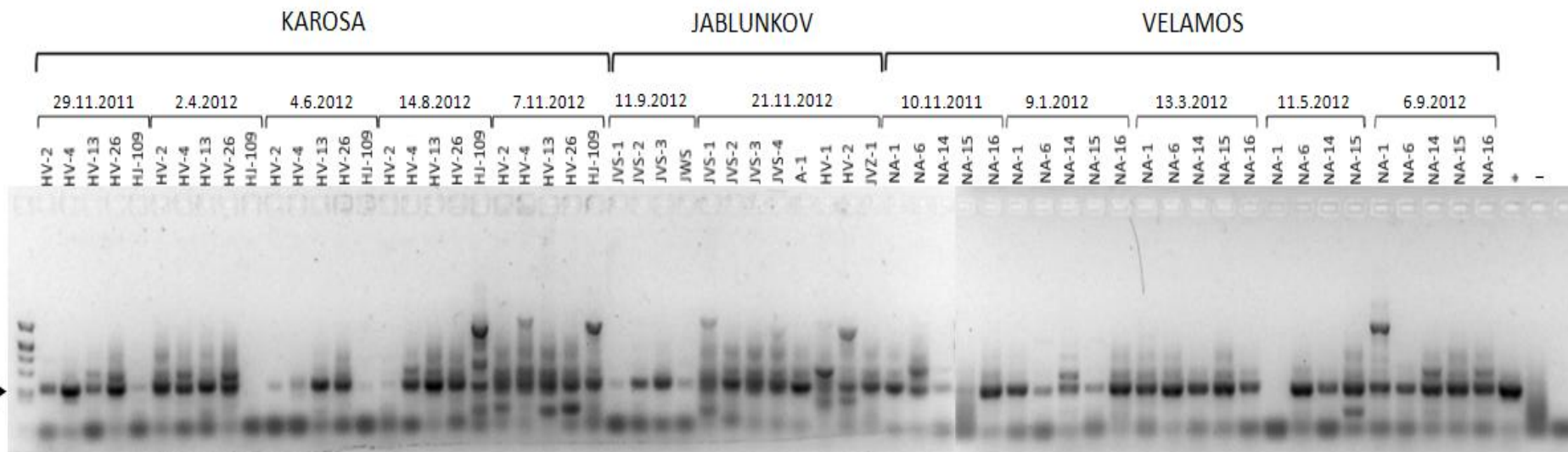
MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ANALÝZY – PŘÍKLADY VÝSTUPŮ

*Koncentrace DNA (výtěžek) ve vzorcích zeminy z vrtných
jader čtyř vrtů – stav před aplikací ERD*



MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ANALÝZY – PŘÍKLADY VÝSTUPŮ

PCR detekce 16S rRNA genu *Dehalococcoides sp.* pomocí primerů DHC883F, DHC1152R (Adrian et al., 2007); amplifikační produkt 270 bp je označen šipkou



Příklad sumárního hodnocení realizovaných PCR detekcí bakteriálních kmenů (prvních pět sloupců) – Dehalococcoides ,Geobacter ,Dehalobacter - a funkčních genů (poslední dva sloupce) bvcA a vcrA přítomných ve vzorcích podzemní vody, o kterých je známo, že jsou aktivní v procesu transformace cis-1,2DCE na ethylen

Vrt	Datum odběru	16S - Eub	16S - DHC	Nested 16S- DHC	16S - GEO	16S - DRE	bvcA	vcrA
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	+	+	+	-	-		

STATISTICKÉ ANALÝZY (EPFL)

- ❖ Umožní efektivnější využití různorodých dat
- ❖ Očekávaným výsledkem je identifikace klíčových parametrů (z terénních, laboratorních a molekulárně-genetických dat) pro ERD a ocenění jejich vlivu na průběh celého procesu *in-situ*
- ❖ volně šiřitelný softwar R (programovací jazyk a softwarové prostředí pro statistické výpočty a grafiku)
- ❖ dosud testovány tři typy grafických zpracování na základě Wardovy metody a klastrové analýzy
- ❖ zpracovány první výstupy unifikovaných databází terénních a laboratorních dat (využito 22 parametrů z celkového počtu 36 sledovaných)

STATISTICKÉ ANALÝZY (EPFL)

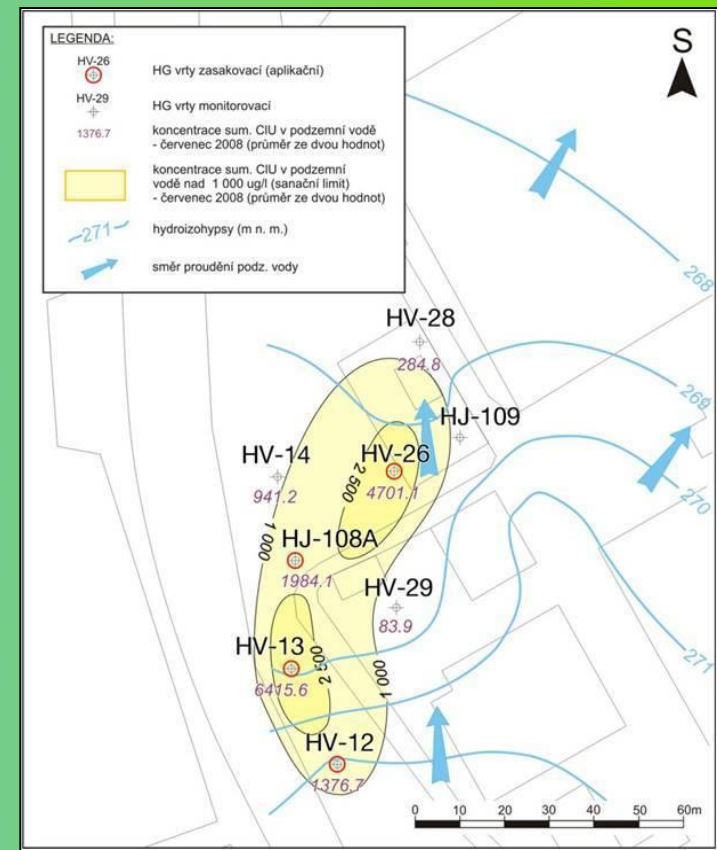
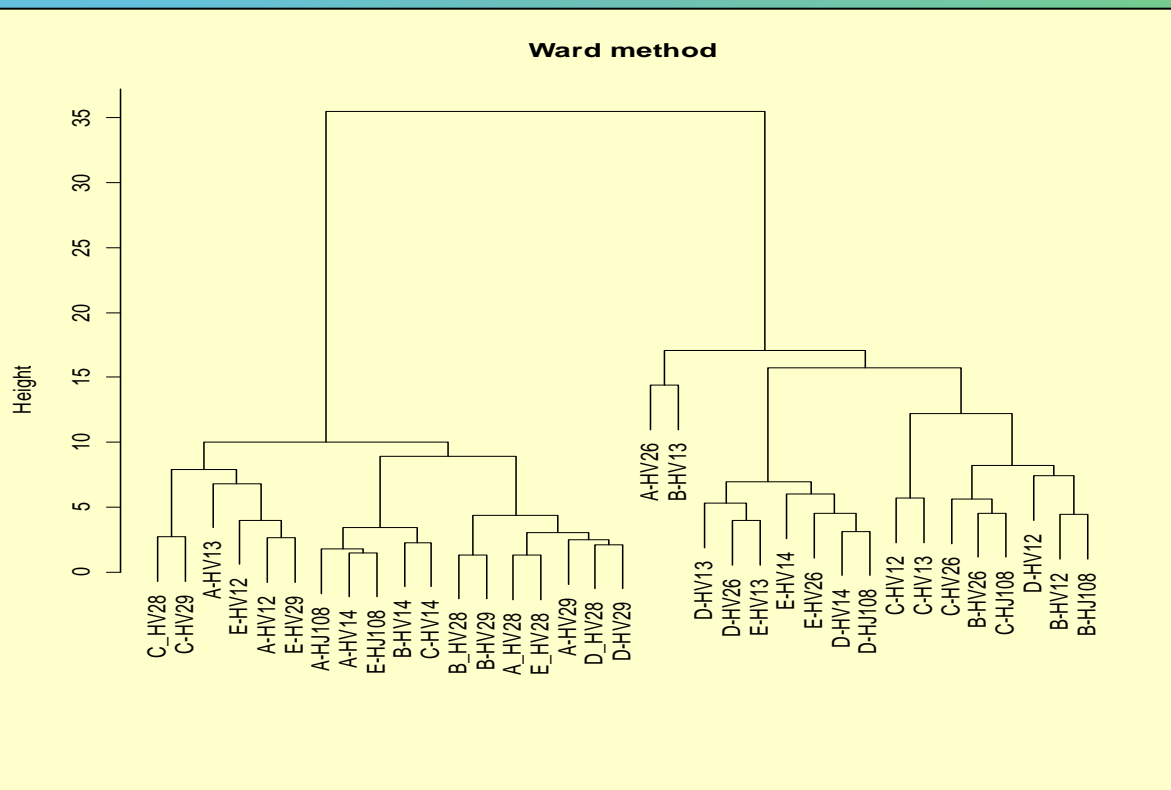
❖ Dva přístupy ke zpracování statistických výstupů:

a) statistická analýza kompletních dat z jedné lokality (změny parametrů v čase)

b) statistická analýza dat z více lokalit podle životního cyklu lokality (před sanačním zásahem, po druhé aplikaci substrátu, po ukončení ERD)

NÁSLEDUJÍ PŘÍKLADY VÝSTUPŮ STATISTICKÉ ANALÝZY

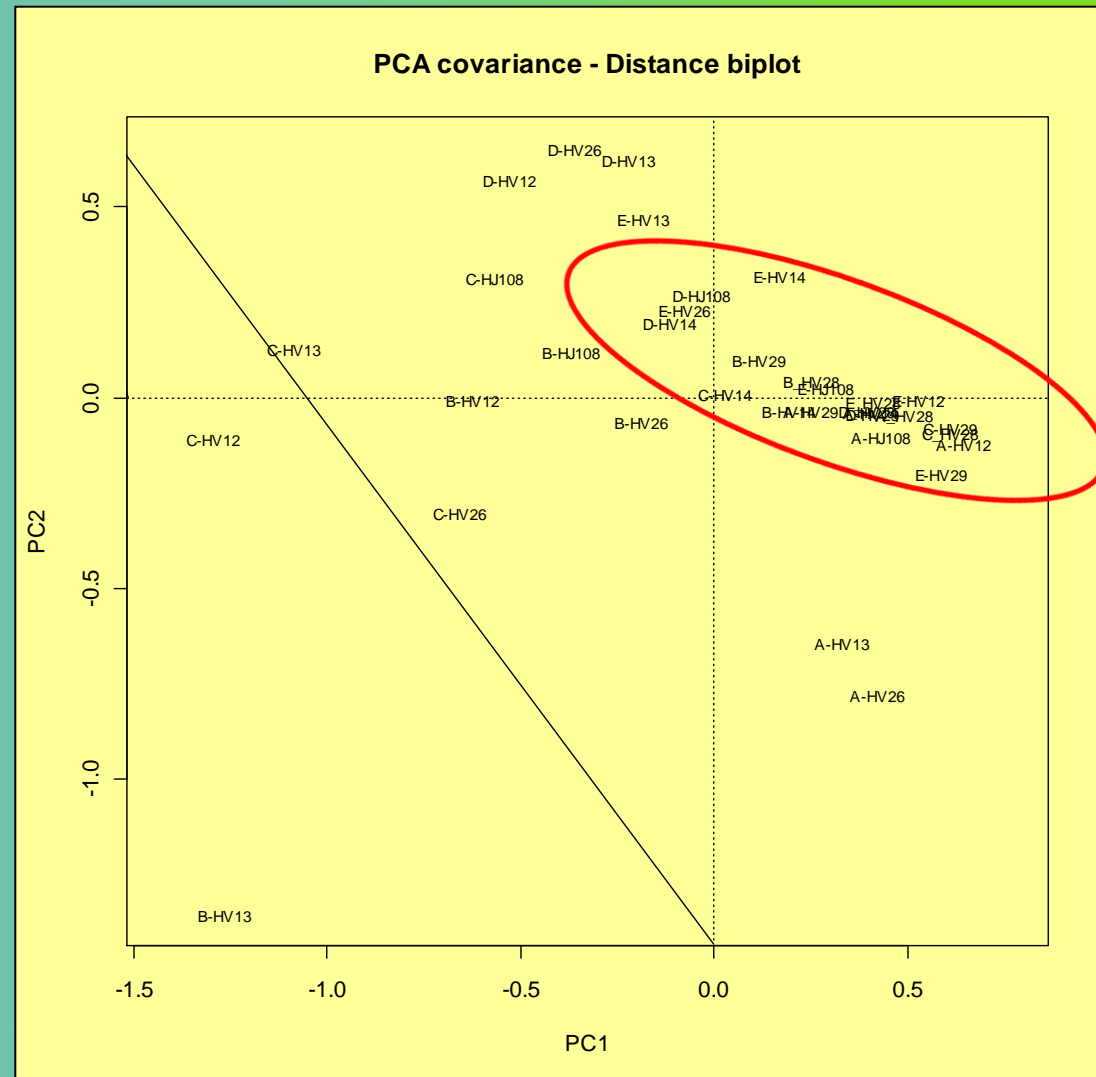
- před první aplikací substrátu (= syrovátky)
- po 2. aplikaci syrovátky (HV-26 téměř ukončena přeměna TCE na cis-1,2DCE)
- po 4. aplikaci syrovátky (HV-26 max. koncentrace cis-1,2DCE)
- 7 měsíců po poslední aplikaci syrovátky, dosažen sanační limit suma CIU (HV-26 významný pokles cis-1,2 DCE, vys.produkce VC a ethylenu)
- 15 měsíců po poslední aplikaci syrovátky, návrat k přirozeným podmínkám lokality (HV-26 nejnižší koncentrace cis-1,2DCE, významný pokles VC, vymizení ethylénu)



KLASTROVÁ ANALÝZA

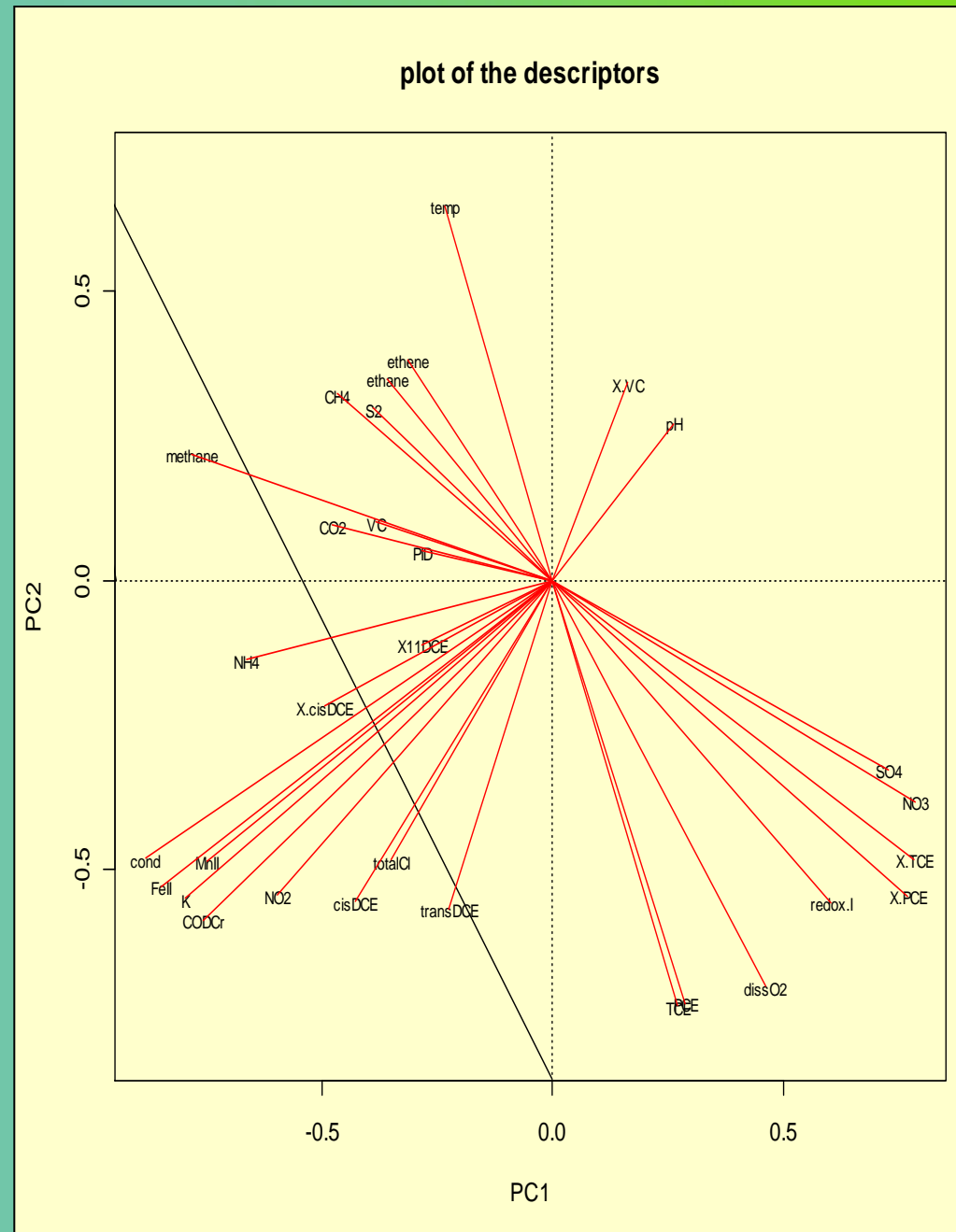
Elipsa vymezuje shluk bodů obdobných vlastností, čisté a méně kontaminované vrty před první aplikací syrovátky a vrty po ukončení pilotního testu a návratu lokality k přirozeným podmínkám

Tento typ výstupu lze potenciálně využít jako přínosný důkaz kvality sanačních prací

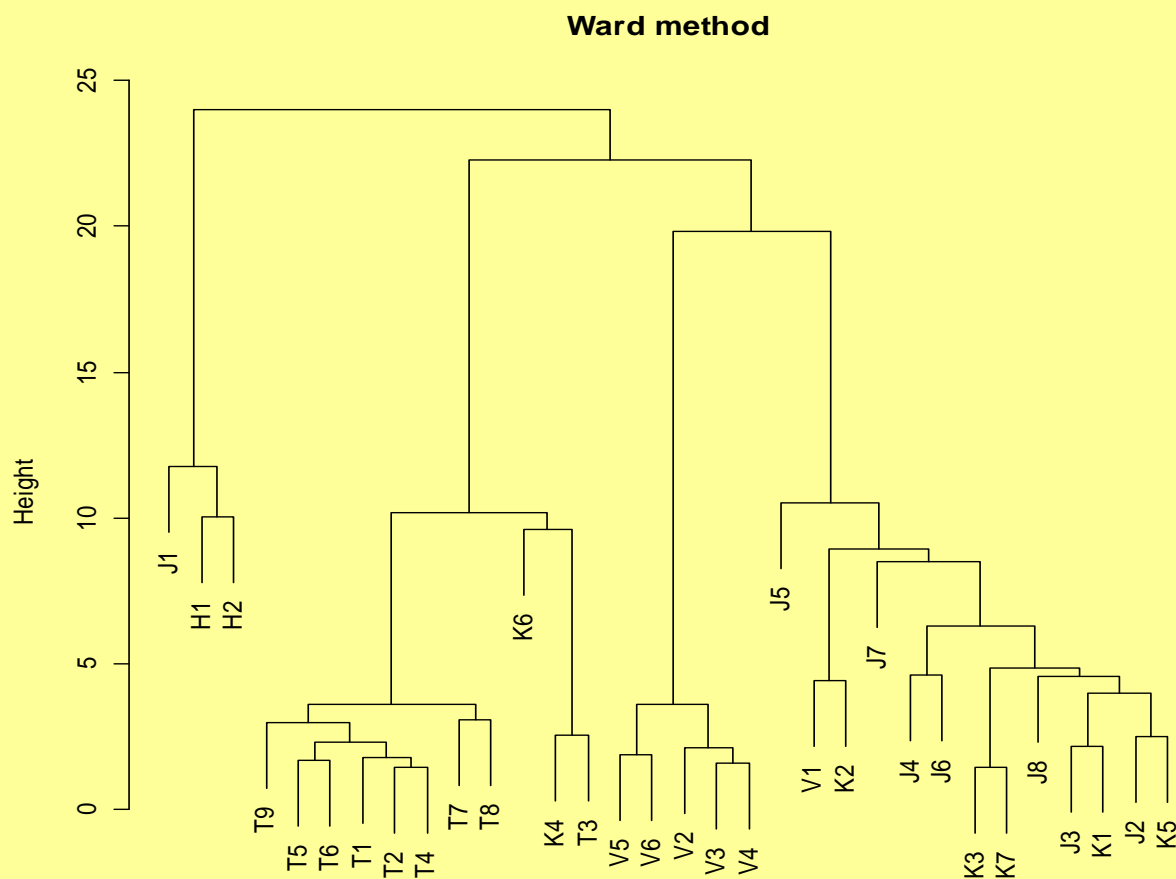


Vektorový graf - vývoj sledovaných parametrů během ERD na jedné lokalitě

Každý parametr = samostatný vektor. Délka vektoru je přímo úměrná intenzitě jeho vlivu na aktuální stav lokality. Souhlasný směr orientace = vztah přímé úměry. Nesouhlasný směr orientace = vztah nepřímé úměry. Je-li úhel mezi vektory blízký 90° , mezi parametry není žádný vztah.



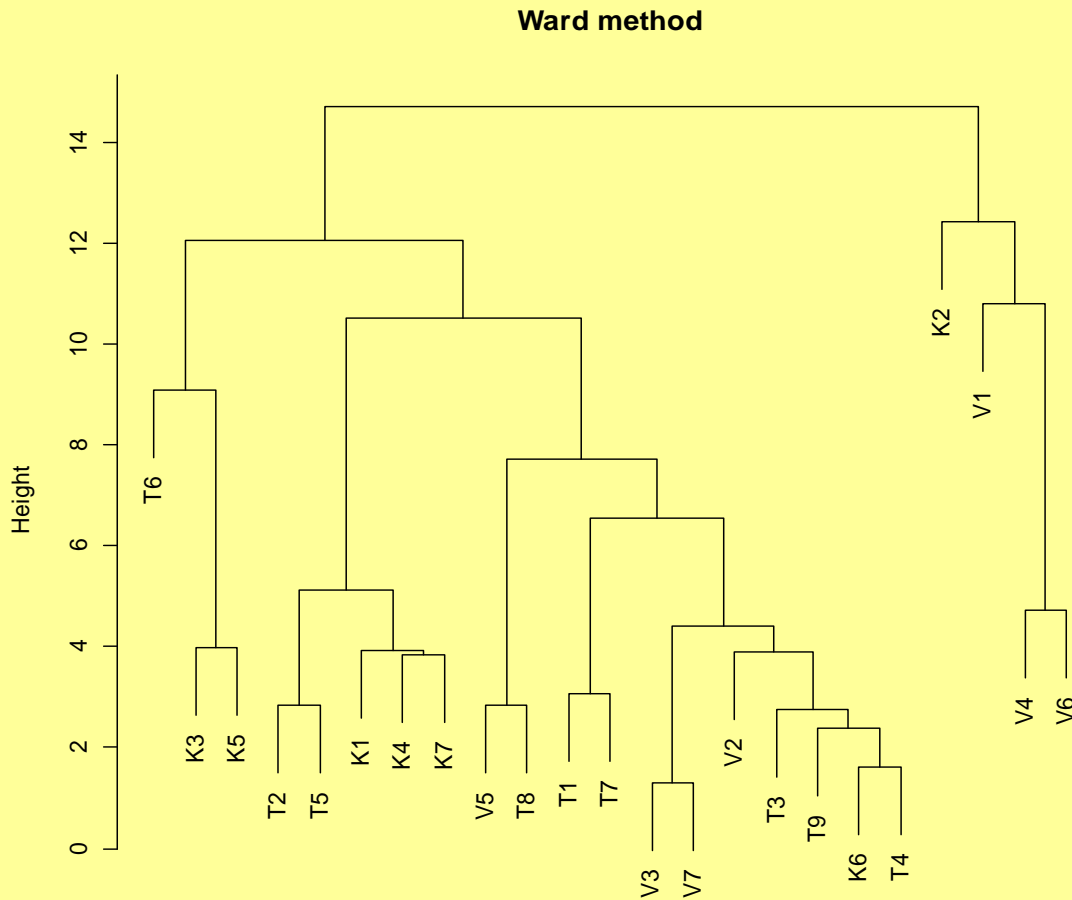
VÍCE LOKALIT VE STEJNÉ FÁZI SANACE



Výchozí stav lokality před sanačním zásahem

Porovnání stavu
pěti lokalit (K + T +
V + J + H)
kontaminovaných
chlorovanými
ethylény před první
aplikací
organického
substrátu

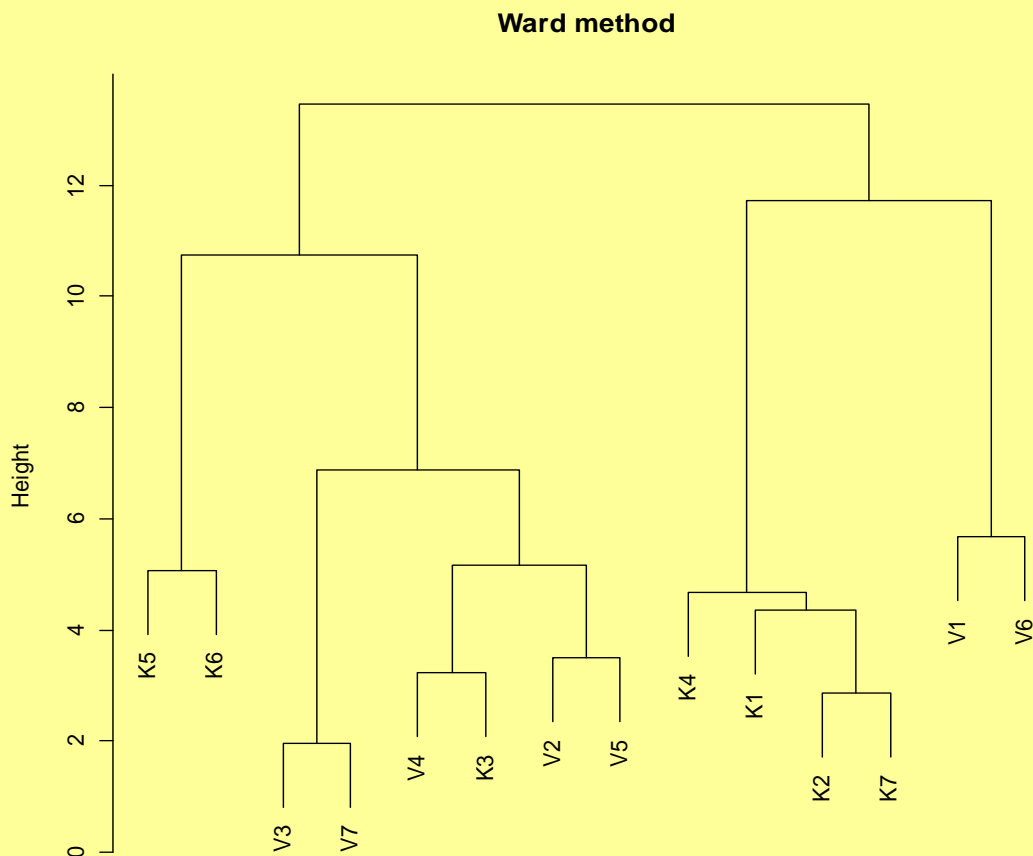
VÍCE LOKALIT VE STEJNÉ FÁZI SANACE



Stav po druhé aplikaci substrátu, tj. transformce většiny primární kontaminace PCE a TCE na cis-1,2DCE.

Porovnání stavu tří lokalit kontaminovaných chlorovanými ethylény (K + V + T)

VÍCE LOKALIT VE STEJNÉ FÁZI SANACE



Stav po ukončení aplikace substrátu, návrat k přirozeným podmínkám lokality

V této fázi výrazně klesá koncentrace cis-1,2DCE a VC, vyskytují se relativně vysoké koncentrace ethylénu . Porovnání stavu dvou lokalit (K a V) kontaminovaných chlorovanými ethylény

ZÁVĚR

- ❖ Cílem výzkumného projektu je vyvinout nový nástroj pro hodnocení a řízení ERD chlorovaných etylénů *in-situ*
- ❖ Metodou zkoumání je holistický přístup, kdy moderními statistickými metodami jsou společně hodnocena data z terénních, chemických, kultivačních a molekulárně-genetických analýz
- ❖ Maximální důraz je kladen na srozumitelně interpretovatelné výstupy použitých vědeckých metod pro účely sanační praxe

TECHTOOL



PODĚKOVÁNÍ

- ❖ Tento výzkum je spolufinancován TAČR v rámci programu ALFA, projekt TECHTOOL, č. TA02020534
- ❖ Pro vznik článku byly využity podklady a data i od dalších partnerů projektu neuvedených mezi spoluautory článku za AQUATEST, a.s. T. Lederer, za EPFL Sonia Tarnawski a Christof Holliger, za KHSanace s.r.o. R. Heřmánek, za MBÚ M.Pravečková, V.Reimannová a za VODNÍ ZDROJE, a.s. Pavλίna Hlaváčová.

DĚKUJI ZA POZORNOST

TECHTROL

