

VLIV VYBRANÝCH ABIOTICKÝCH ADITIV NA BIOREMEDIACI ROPNÉHO ZNEČIŠTĚNÍ V PŮDĚ

*P. Kuráň, J. Trögl, J. Nováková, V. Pilařová, K. Pilařová, J. Ederer,
P. Dáňová, J. Pavlorková, R. Fryčák, S. Bošková, J. Kozler, F. Novák*

Třeboň, 17.10.2011

Úvod do problému

- Ropné látky (RoLa) - nejčastější organické polutanty ŽP
- Bioremediace - efektivní a k ŽP šetrný způsob dekontaminace
- RoLa vs. jiné organické polutanty – dobře biodegradovatelné, ale mnohdy velmi pomalu nebo vůbec



aktuální experimentální **vývoj prostředků** aditivně **zvyšujících účinnost bioremediace půdy** a jejich následné zavedení do praxe

- Prostředky - volná abiotická aditiva - huminové látky (HS), zeolity

Úvod do problému

- Přínos HS
 - nástroj na zvýšení biologické dostupnosti polutantu pro jednobuněčné degradéry
 - samostatný prostředek chemické konverze polutantu v méně toxický kontaminant
- Přínos zeolitů
 - prostředek ke zvýšení účinnosti bioremediace
 - a) nahrazením běžně používaných **suspensních kultur** biodegradérů jejich přirozeným **biofilmem**, vytvořeným po kolonizaci povrchu abiotické nosiče
 - b) v kombinaci s aplikací dalších aditiv

Úvod do problému

- Sledování účinnosti a průběhu biodegradace ropného znečištění
 - úbytek RoLa látek v průběhu času - suma nepolárních uhlovodíků C_{10} - C_{40} - přesná definice v ČSN EN ISO 14039
 - poměry pristan/ C_{17} , fytan/ C_{18}
 - TOC
- Hodnocení probíhajících biologických procesů
 - kvantifikace mikrobiální biomasy - stanovení fosfolipidových mastných kyselin
 - aktivita biomasy – respirace, aktivita dehydrogenáz

Úvod do problému

- Prezentovaný příspěvek

Testování vlivu přídatku HS a zeolitu jako abiotických aditiv na biodegradaci RoLa v půdě působením autochtonní mikroflóry i po augmentaci ropu degradujícího bakteriálního kmene

- Roční experiment, sada nádobových pokusů



Experimentální část

- Nádobové pokusy

Půda – hlinitopísčítá s významným podílem kamenů (síto, oka 1 cm) po havárii přepravní cisterny s MoNa

Inokulace - kmen *Pseudomonas fluorescens*, sbírka Mikrochem LKT, vstupní koncentraci $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$ CFU/g vlhké půdy

Kultivace - na minerálním médiu s přídavkem MoNa (jediný zdroj C a energie)

HS – 2 typy, alkalická extrakce z lignitu Mikulčice a oxyhumolitu z Duchcova, 3 koncentrační úrovně

Zeolit - velikost zrn 1,5- 2 mm, 10 % hmotn.

Poměr dusíku a fosforu v půdě - (N:P) byl přibližně 6:1

Vlhkost půdy - po založení nádobových pokusů přibližně 10 %



Experimentální část

- Nádobové pokusy
- Každý modul - jedna variantu experimentu v rámci jedné odběrové kampaně
- Celkem bylo navrženo 6 odběrových kampaní s frekvencí odběrů každé 2 měsíce

Výjimka - květen a červen 2010 - případný exponenciální pokles polutantů



Experimentální část

Označení	Popis modulu (varianty)
I	Půda z lokality
II	Půda z lokality + MO
III	Půda z lokality + MO + Lignit 50 mg/kg sušiny
IV	Půda z lokality + MO + Lignit 150 mg/kg sušiny
V	Půda z lokality + MO + Lignit 450 mg/kg sušiny
VI	Půda z lokality + MO + Oxyhumolit 50 mg/kg sušiny
VII	Půda z lokality + MO + Oxyhumolit 150 mg/kg sušiny
VIII	Půda z lokality + MO + Oxyhumolit 450 mg/kg sušiny
IX	Půda z lokality + MO na zeolitu + Lignit 50 mg/kg sušiny
X	Půda z lokality + MO na zeolitu + Lignit 150 mg/kg sušiny
XI	Půda z lokality + MO na zeolitu + Lignit 450 mg/kg sušiny
XII	Půda z lokality + MO na zeolitu + Oxyhumolit 50 mg/kg sušiny
XIII	Půda z lokality + MO na zeolitu + Oxyhumolit 150 mg/kg sušiny
XIV	Půda z lokality + MO na zeolitu + Oxyhumolit 450 mg/kg sušiny
XV	Půda z lokality + MO na zeolitu

Jak to vypadá v praxi ?



VÚAnCh
Ústí nad Labem



Jak to vypadá v praxi ?



Jak to vypadá v praxi ?



Jak to vypadá v praxi ?



VÚAnCh
Ústí nad Labem





Experimentální část

- Statistické zpracování

Software - MS Excel (Microsoft, USA), Statistica 6.0 (StatSoft USA), Origin Micro Cal (Origin, USA) a QCExpert (Trilobyte, ČR)

Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

Modelování úbytku koncentrace ropných látek

jednak kinetikou nultého řádu:
$$c = c_0 - k_0 t \quad (1)$$

jednak kinetikou prvního řádu:
$$c = c_k + (c_0 - c_k) \cdot e^{-\frac{t}{k_1}} \quad (2)$$

c - aktuální koncentrace látky v čase t ,

c_0, c_k - počáteční koncentrace resp. konečná koncentrace látky v čase $t \rightarrow \infty$,

k_0, k_1 - rychlostní konstanty 0. a 1.řádu



Experimentální část

- Statistické zpracování

Poločas poklesu (biodegradace) látky $t_{1/2}$

vypočítán z konstanty k_1 : $t_{1/2} = k_1 \cdot \ln 2$ (3)

Porovnání modelů

$$c = c_0 - k_0 t \quad (1)$$

$$c = c_k + (c_0 - c_k) \cdot e^{-\frac{t}{k_1}} \quad (2)$$

Nutná úprava rovnice (2) na 2-parametrovou

Řešení - naměřené koncentrace c_0 - ve všech modulech se statistický významně neodlišovali $\Rightarrow c_0 = \text{konst}$

Výsledky

- Obsah uhlovodíků C_{10} - C_{40}
- **Pokles** obsahu $C_{10} - C_{40}$ v průběhu experimentu u všech variant
- Většina modulů - měsíční prodleva v odbourávání → významnější pokles obsahu $C_{10} - C_{40}$ – mezi odběrovou kampaní 6-2010 a 8-2010
- Druhé body (kampaň 6-2010) u modulů s významnou prodlevou - obvykle silně vlivné při výpočtech regresních parametrů - v takovém případě vynechávány

Výsledky

- Poměr pristan/C₁₇, fytan/C₁₈
- indikující přeměnu nerozvětvených uhlovodíků na rozvětvené
- hodnota obou poměrů - rostoucí tendenci, maxima v srpnu (kampaň 8-2010), poté stagnace nebo i mírný pokles

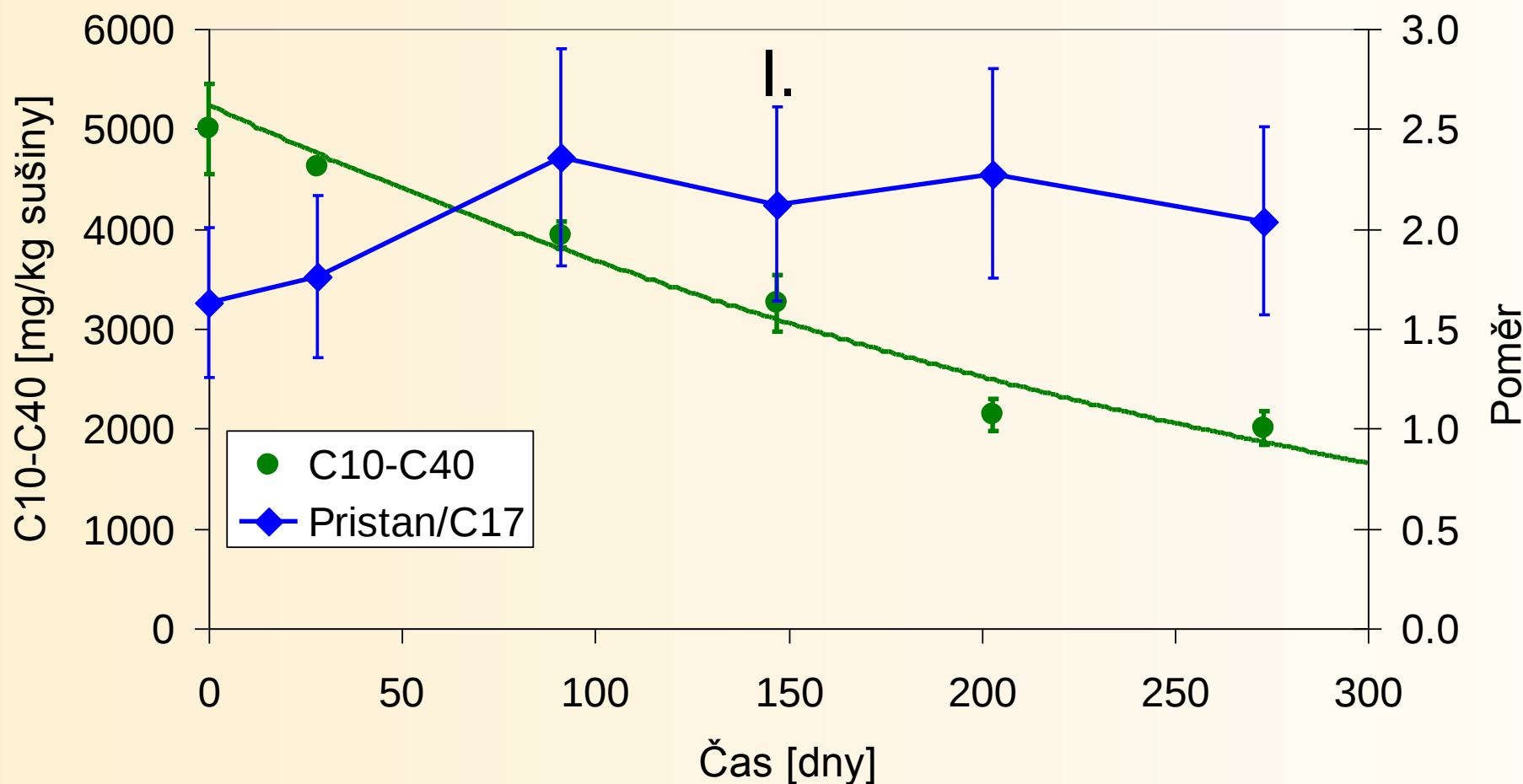
Modul II - stagnační fáze nebyla pozorována - data vykazovala rostoucí trend i v závěru experimentu

Modul XIII – dokonce pokles hodnoty poměru na počátečný stav v květnu 2010

- Rozdíly v prvních 3 měsících - zpravidla statisticky významné
- Snížení absolutního obsahu analytů (pristanu, fytanu, C₁₇ a C₁₈) prokazatelně u všech variant.

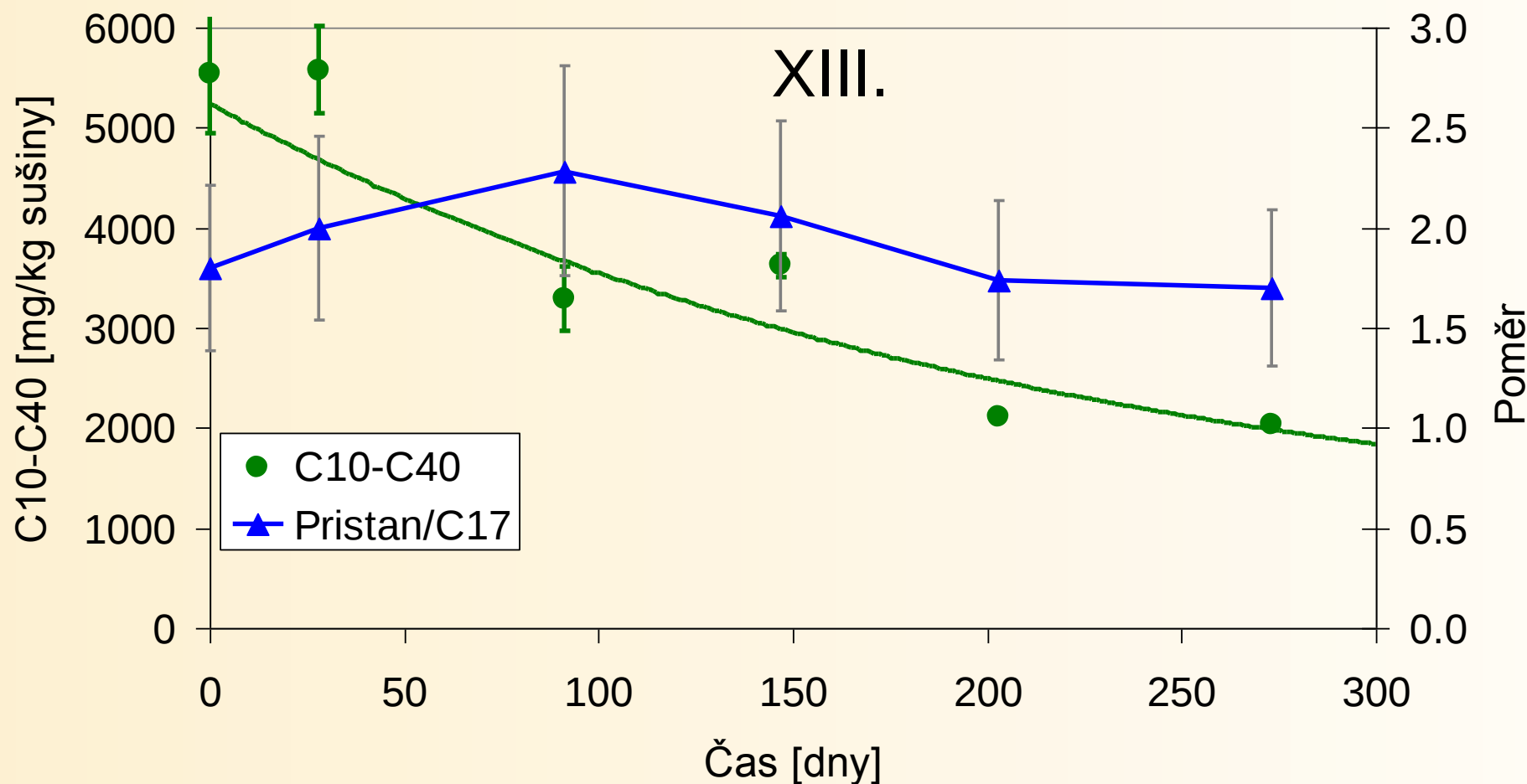


Výsledky a diskuze





Výsledky a diskuze



Výsledky

- Obsah TOC
- Mírná klesající tendence v jednotlivých modulech v časovém horizontu květen 2010 až únor 2011 - v rozsahu hodnot 4,06-2,97 % sušiny
- Výjimka - hodnoty TOC pro odběry 10-2010 – stejné jako výchozí hodnoty z května 2010 – anomálie - předmět dalšího zkoumání – chyba analytiky, chyba při odběrech

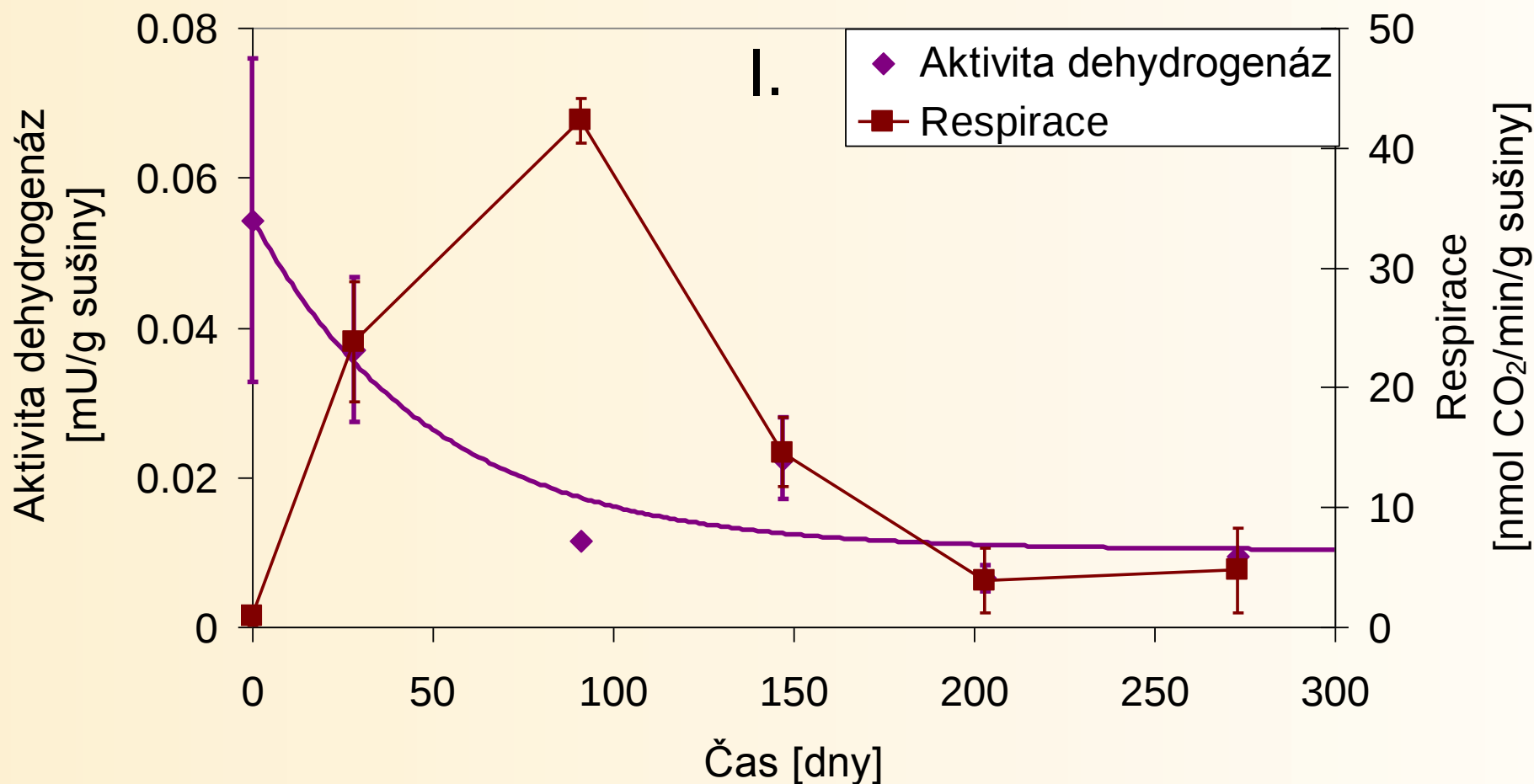
Výsledky

- Respirace a aktivita dehydrogenáz
- **Aktivita dehydrogenáz** - u všech variant obecně nejvyšší na začátku, následný pokles s časem exponenciálně v souladu s poklesem obsahu $C_{10} - C_{40}$

Aktivity - kopírovaly i prodlevy v odbourávání uhlovodíků
Mírná anomálie – 10-2010 - u většiny variant zaznamenány vyšší hodnoty aktivit oproti trendu poklesu

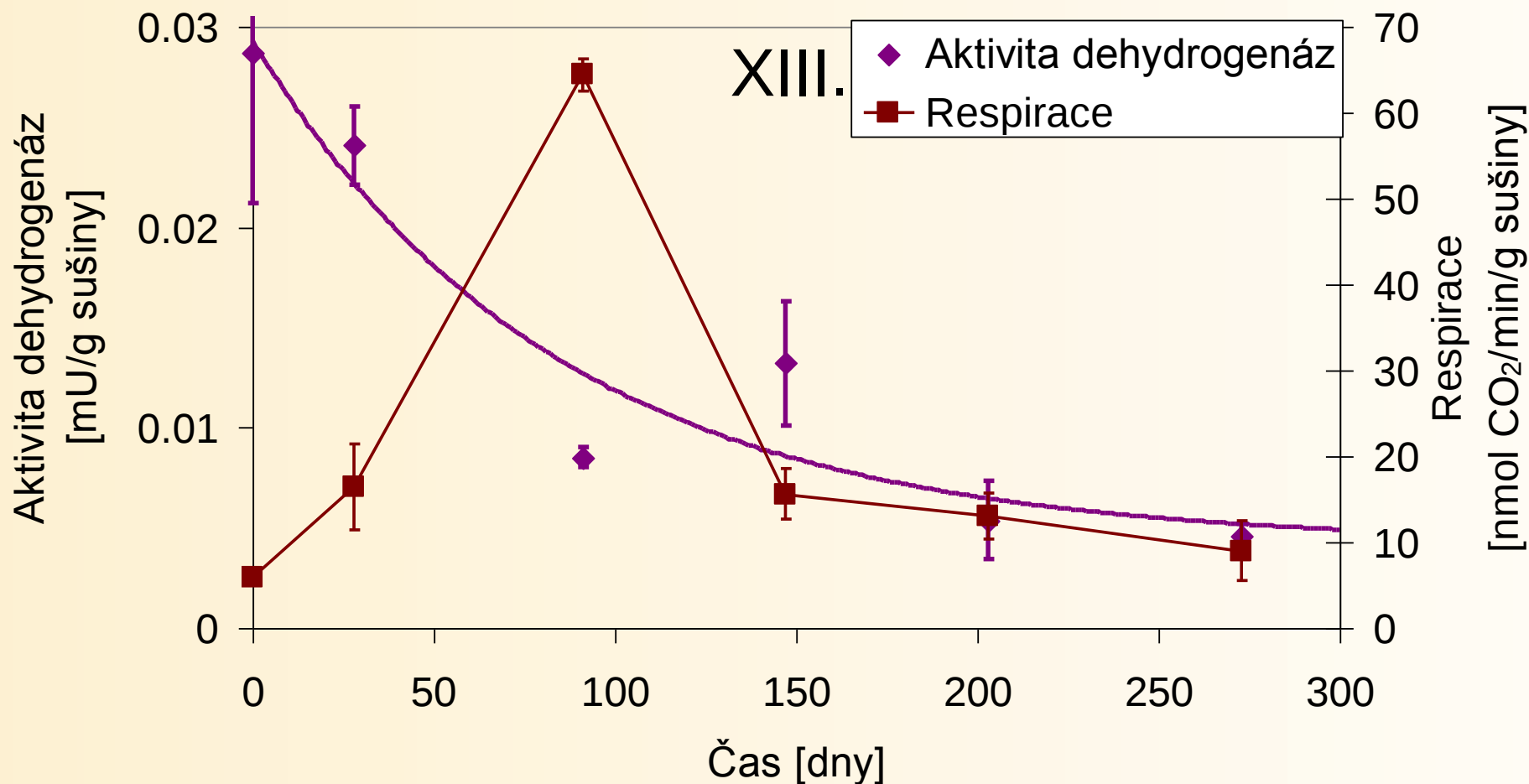
- **Respirace** - vyšší variabilita než u ostatních sledovaných analytických veličin
U většiny variant - vzestup a pokles aktivit respirace s maximem po 4 měsících od začátku experimentu – zaznamenán také nejvýznamnější pokles obsahu $C_{10} - C_{40}$

Výsledky





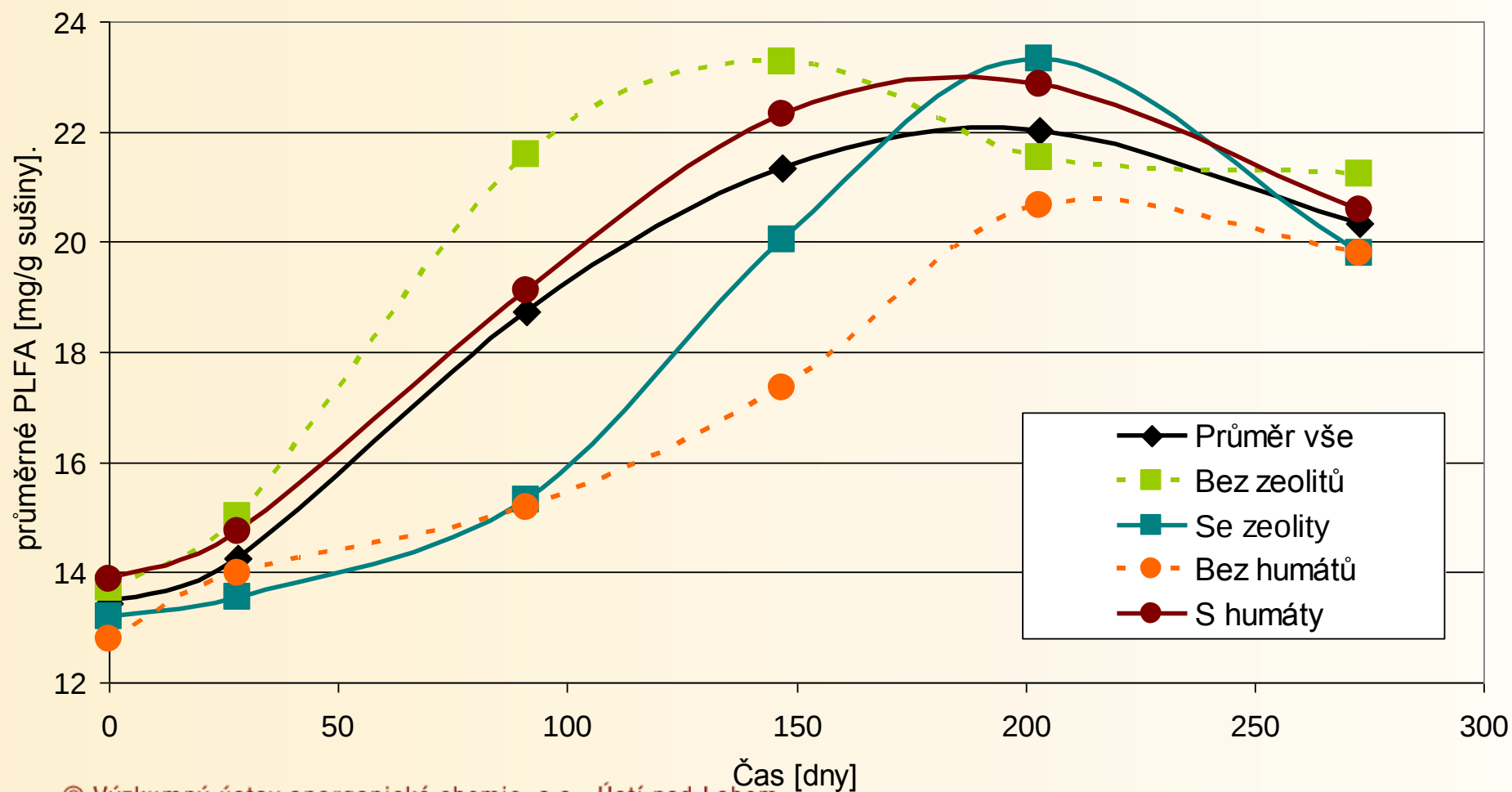
Výsledky



Výsledky

- Obsah fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)
- u všech variant statisticky významně stoupl -
z $13,5 \pm 2,2$ na $20,3 \pm 2,4$ mg PLFA / g sušiny
- Systematický vzestup - pozorován v prvních 7 měsících v
souladu s poklesem koncentrace uhlovodíků v půdě
- Poslední odběry (12-2010, 2-2011) - degradace zanedbatelná -
pozorován mírný pokles PLFA
- Moduly bez zeolitů a moduly s přidavkem HS –
rychlejší vzestup obsahu PLFA - maxima už po cca 5 měsících
Maxima ale nebyla vyšší než u variant bez zeolitů

Výsledky



Diskuze

- Vliv sledovaných abiotických aditiv na biodegradaci $C_{10} - C_{40}$
- Vliv přídatku HS
- Předpoklad
HS zlepší biologickou dostupnost polutantů - neprokázáno
Kontaminace u použité půdy - relativně čerstvá $\Rightarrow$ dobře biologicky dostupná $\Rightarrow$ pozitivní efekt HS neprojevil
- **Významný vliv HS** - zaznamenán u **mikrobiální biomasy !!!**
u modulů s HS přibývala mikrobiální biomasa (PLFA) rychleji než u variant bez nich
 $\Rightarrow$ **HS zlepšují mikroprostředí** pro půdní mikroorganismy

Diskuze

- Vliv sledovaných abiotických aditiv na biodegradaci C_{10} – C_{40}
- Vliv zeolitu

- V kombinaci s rostoucí koncentrací HS vede k poklesu $t_{1/2}$ - nejkratší hodnoty $t_{1/2}$ pro nejvyšší koncentraci HS 450 mg/kg sušiny

- Předpoklad I
Zeolity na sebe navážou přidanou mikroflóru za tvorby biofilmu a usnadní tak její přežití

Výsledky – moduly se zeolity pomalejší vzestup obsahu PLFA než moduly bez zeolitů

Proč ? – adsorpce autochtonní i augmentované mikroflóry na zeolit + nižší růstová rychlost bakterií v biofilmu.

Diskuze

- Vliv sledovaných abiotických aditiv na biodegradaci $C_{10} - C_{40}$
- Vliv zeolitu

- Předpoklad II

Přídavek zeolitu půdy nakypří a provzdušní

Výsledek - porovnání respiračních aktivit u srpnového (nejaktivnějšího) odběru tuto hypotézu nepotvrdilo - průměrná respirace u variant se zeolity i bez nich – srovnatelná

Z praktického hlediska - použitý přídavek zeolitů (10% hmotn.) zlehčil a výrazně usnadnil manipulaci i vizuální sledování homogenity

Diskuze

- Korelace sledovaných parametrů biodegradace
- Pro základní představu o jejich souvislosti s průběhem degradačního procesu
- Hlavní ukazatel průběhu biodegradace - pokles uhlovodíků C₁₀-C₄₀, **koreluje velmi dobře** jak s dalšími ukazateli, tak s aktivitou mikrobiálního společenstva
- Nevýznamná korelace s respirací - dána počáteční nízkou respirační aktivitou - z důvodu nedostatku půdního O₂
- Aktivity dehydrogenáz – korelují lépe - ukazatel obecného metabolismu (ne jen aerobního)



Výsledky a diskuze

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Čas		0,60	-0,16	-0,70	-0,64	-0,93	0,75	0,47	0,47
2. PLFA	0,60		0,09	-0,47	-0,19	-0,60	0,57	0,48	0,48
3. Respirace	-0,16	0,09		-0,08	-0,02	0,05	0,00	0,17	0,22
4. Dehydrogenázy	-0,70	-0,47	-0,08		0,62	0,70	-0,67	-0,60	-0,64
5. TOC	-0,64	-0,19	-0,02	0,62		0,57	-0,51	-0,24	-0,31
6. C ₁₀ -C ₄₀	-0,93	-0,60	0,05	0,70	0,57		-0,72	-0,53	-0,54
7. pH	0,75	0,57	0,00	-0,67	-0,51	-0,72		0,65	0,66
8. Pristan/C ₁₇	0,47	0,48	0,17	-0,60	-0,24	-0,53	0,65		0,98
9. Fytan/C ₁₈	0,47	0,48	0,22	-0,64	-0,31	-0,54	0,66	0,98	

Diskuze

- Kinetika biodegradace
- Porovnání úbytku $C_{10} - C_{40}$ v modulech II-XV s modulem I (kontrola) → biodegradace probíhá i bez zásahů
- Úbytek $C_{10} - C_{40}$ – možné oba modely - kinetika 0. i 1.řádu
- Hodnoty Akaikova kritéria (AIC) - pro vzájemné srovnávání regresních modelů → odlišnost kontrolních a ostatních vzorků
- Kontrola (modul I) - přesněji lze modelovat kinetikou 0. řádu
Ostatní moduly (II-XV) - lépe vyhovuje kinetika 1. řádu

Diskuze

- Kinetika biodegradace
- Vhodnější model kinetiky **0. řádu** - **limitujícím** elementem rychlosti procesu - **nedostatek** katalyzátoru = **mikroorganismů** schopných degradovat RoLa
- Vhodnější model kinetiky **1. řádu** - **limitujícím** elementem rychlosti procesu - **koncentrace substrátu** (RoLa)
↓
- **Příčina** - původní půdní mikroflóra - málo MO schopných odbourání RoLa $\Rightarrow$ inokulace biodegradačního kmene pomohla proces urychlit
- Potvrzeno i srovnáním $t_{1/2}$ - u většiny modulů významně kratší než u kontroly (výjimka - atypické rozptýlené moduly VII a XII).

Výsledky a diskuze

Modul	$t_{1/2}$ [dny]	r^2	Modul	$t_{1/2}$ [dny]	r^2	Modul	$t_{1/2}$ [dny]	r^2
I	236±109a	0,97	VI	142±32b	0,97	XI	79±19b	0,94
II	118±28b	0,96	VII	235±123a	0,92	XII	244±188a	0,87
III	121±48b	0,90	VIII	101±44b	0,83	XIII	146±82b	0,87
IV	128±43b	0,93	IX	89±28b	0,87	XIV	90±36b	0,87
V	138±42b	0,95	X	103±28b	0,95	XV	81±30b	0,88

Diskuze

- Vliv inokulace na tvorbu biomasy
 - „Neinokulovaná kontrola“
vs.
„Ostatní inokulované moduly“
 - Vysvětlení - inokulovaná koncentrace $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$ CFU/g vlhké půdy je relativně zanedbatelná vůči kvantitě přirozené mikroflóry
- stejný obsah PLFA

Nicméně podíl inokulovaných MO na odvedené biodegradační práci je významný



Augmentace vhodného biodegradačního kmene se ukazuje jako nejvýznamnější faktor biodegradace



Diskuze

- Poměr pristan/ C_{17} a fytan/ C_{18}
- **Rostoucí hodnota** obou poměrů - **biodegradace** skutečně **probíhá** přeměnou nerozvětvených uhlovodíků (n-alkány C_{17} , C_{18}) směrem k rozvětveným uhlovodíkům (pristan, fytan)
→ v souladu s klesajícím obsahem uhlovodíků C_{10} - C_{40}
- Výsledky TOC
- slabší korelace s úbytkem C_{10} - C_{40}
nízké respirační aktivity
klesající tendence TOC ve všech modulech
↓
- **Přeměny** jedné organické formy na jinou, v malé míře **mineralizace** na anorganické komponenty, část uhlovodíků využita bakteriemi jako **zásobní látky**, část na **tvorbu bakteriální biomasy**

Diskuze

- Půdní společenstvo v průběhu biodegradace
- Koncentrace PLFA - ve všech modulech 8-30 mg PLFA/g sušiny → srovnatelné s intenzivně obdělávanými zemědělskými půdami, loukami, ale nižší než u přirozených lesních půd
- Významný podíl **methyllinoleátu** (18:2) - biomarker eukaryotických mikroorganismů, naznačující podíl půdních hub
- Respirační aktivity + aktivity dehydrogenáz - řádově nižší než u nezasažených půd

⇒

přítomné ropné látky původní mikroflóru nezahubily, nicméně přirozené biologické procesy zpomalily,

degradačního procesu se účastnil menší podíl přítomných MO

Diskuze

- Půdní společenstvo v průběhu biodegradace
- Nejvyšší respirační aktivity v prostřední fázi experimentu (kampaň 8-2010 vs. systematický pokles aktivity dehydrogenáz
⇒
přirozený biodegradační proces - limitován nedostatkem kyslíku nebo nízkým obsahem počáteční půdní vlhkosti
- Tyto klíčové parametry byly při zakládání experimentu vylepšeny a mohly vlastní biodegradaci odstartovat

Závěr

- V sérii nádobových pokusů - testován vliv abiotických aditiv (HS, zeolitů) na biodegradaci MoNa po havárii
- Živá autochtonní biomasa - i po havária vysoká, MO málo aktivní
- Augmentace biodegradéru – proto jako nejvýznamnější zásah urychlující odbourávání ropných uhlovodíků
- Přídavky HS neměly statisticky průkazný vliv na rychlost biodegradace → pozitivní vliv na vývoj biomasy
- Přídavek zeolitu - pomalejší nárůst biomasy, neprokázány vyšší hodnoty respiračních aktivit po přídavku zeolitu → lepší manipulace s půdou, vizuální sledování homogenity při zakládání nádobových pokusů a pravidelné aeraci půdy

Poděkování

- Výzkum byl podpořen Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR (projekt FR-TI1/456) a spolufinancován firmou Mikrochem LKT s.r.o.

Diskuze

- Vliv sledovaných abiotických aditiv na biodegradaci $C_{10} - C_{40}$
- Vliv přídatku HS - na biodegradaci statisticky neprůkazný
- Všechny moduly s HS - významně rychlejší pokles obsahu $C_{10} - C_{40}$ ve srovnání s kontrolou, ale ne ve srovnání s inokulovanou variantou bez huminových látek (modul II)
- Moduly s HS i zeolitem (moduly IX-XIV) - zjištěny ještě kratší $t_{1/2}$ – ovšem statisticky neprůkazné
- HS z lignitu lepší ve srovnání s HS z oxyhumolitu Duchcov vzhledem ke kratšímu $t_{1/2}$ - srovnání ztíženo atypickými moduly VII a XII - značný rozptyl hodnot

Výsledky a diskuze

Modul	$t_{1/2}$ [dny]	r^2	Modul	$t_{1/2}$ [dny]	r^2	Modul	$t_{1/2}$ [dny]	r^2
I	236±109a	0,97	VI	142±32b	0,97	XI	79±19b	0,94
II	118±28b	0,96	VII	235±123a	0,92	XII	244±188a	0,87
III	121±48b	0,90	VIII	101±44b	0,83	XIII	146±82b	0,87
IV	128±43b	0,93	IX	89±28b	0,87	XIV	90±36b	0,87
V	138±42b	0,95	X	103±28b	0,95	XV	81±30b	0,88

Experimentální část

Souhrn hodnotících postupů pro sledování a charakterizaci biodegradace znečištění ropnými látkami, resp. uhlovodíky C₁₀-C₄₀.

Hodnotící postup	Pracoviště	Množství vzorku (g)
Stanovení uhlovodíků C₁₀-C₄₀	Separační metody, VÚAnCh	30
Stanovení^a poměrů C₁₇/pristan a C₁₈/fytan	Separační metody, VÚAnCh	0
Analýza fosfolipidů	Separační metody, VÚAnCh, UJEP	85
Stanovení respirace půdy	UJEP	5
Analýza aktivity dehydrogenáz	UJEP	5
Stanovení pH výluhu	Sál, VÚAnCh	300
Vlhkost	Sál, VÚAnCh	100
Popel ^b	Sál, VÚAnCh	0
Celkový organický dusík	Sál, VÚAnCh	40
TOC	VÚRV Chomutov	80
Prvková analýza makro-, mikroživin a těžkých kovů	RTG, VÚAnCh	5
Analýza celkového fosforu	ICP, VÚAnCh	10
Suma (g)		660

^a stanoveno spolu s obsahem C₁₀-C₄₀

^b dopočet z vlhkosti

Experimentální část

- Stanovení uhlovodíků v půdě
- Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem GC-FID
- Metoda – adaptovaná podle normy ČSN EN ISO 14039
Detailní popis - literatura (Kuráš et al 2011)



Experimentální část

- Hodnocení půdního mikrobiálního společenstva
Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) -
adaptovanou metodou - Zelles et al. 1992
Popis - ~10 g vzorku

Extrakce celkových lipidů MeOH:CHCl₃:fosfátový pufr (2:1:0,8),

SPE frakcionace po zahuštění – silikagelem,
nežádoucí frakce nepolárních a neutrálních lipidů - eluovány
CHCl₃, acetonem,
žádoucí frakce polárních lipidů - eluce methanolem

Methanolýza polárních lipidů - roztokem KOH v methanolu
analýza vzniklých FAME pomocí GC-MS



Experimentální část

- Hodnocení půdního mikrobiálního společenstva

Půdní respirace

stanovena titračně

Vzorek půdy (~1g) - inkubován v uzavřené skleněné láhvi při ~25°C

Absorpce vznikajícího CO₂ do roztoku NaOH

Titrace nezreagovaného CO₂ s HCl