

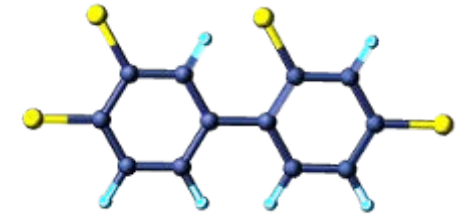
BIOREMEDIÁČNÉ TECHNOLOGIE: Biostimulácia a Bioaugmentácia



Katarína Dercová, Katarína Lászlová,
Hana Dudášová, Slavomíra Murínová,
Juraj Škarba, Marta Balaščáková
Ústav biotechnológie FCHPT STU
Bratislava



Znečistené územia, Štrbské pleso 2014



OBSAH PREZENTÁCIE

- Bioremediačné technológie – hierarchia prístupov
- Biostimulácia a bioaugmentácia: potenciálne a perspektívne stratégie bioremediácie; ako zaistiť úspešnosť týchto procesov
- Výsledky bioremediácie PCB-kontaminovaných sedimentov použitím prístupu biostimulácie a/alebo bioaugmentácie
- Závery

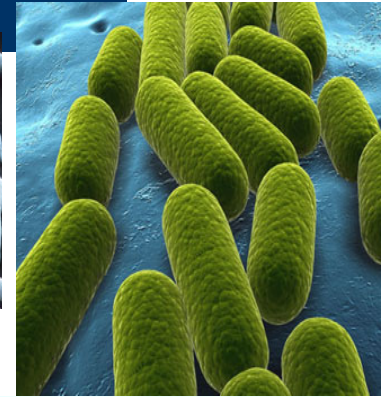
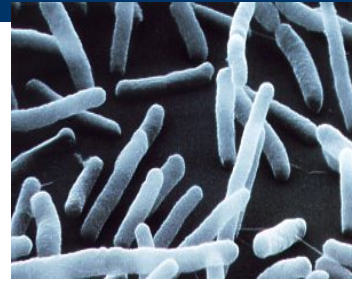
Hlavní aktéři bioremediace: bakterie, vláknité
huby, rostliny, enzymy, gény, plazmidy

bakterie BIO-REMEDIÁČIA

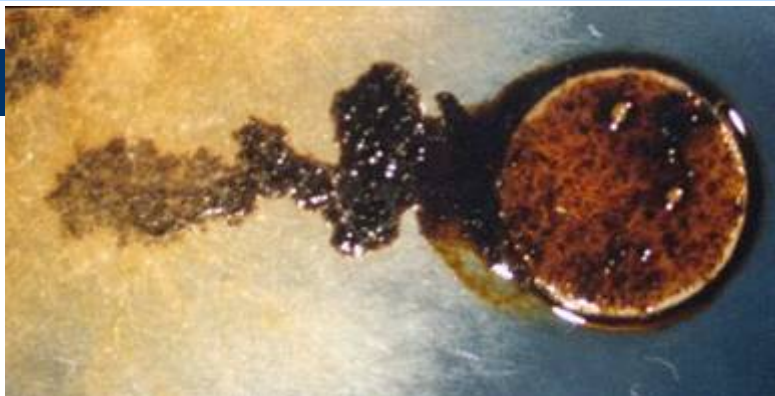


rastliny FYTO-REMEDIÁČIA

huby MYKO-REMEDIÁČIA



Aplikácia mykoremediácií pri ropných haváriách
– Mexický záliv – BP
- Amazónia - Equádor



Dekontaminácia ropných lagún v Equádore – projekt podporený US EPA

FYTOREMEDIÁCIA

Fytodekontaminácia:

- fytoextrakcia
- fytodegradácia

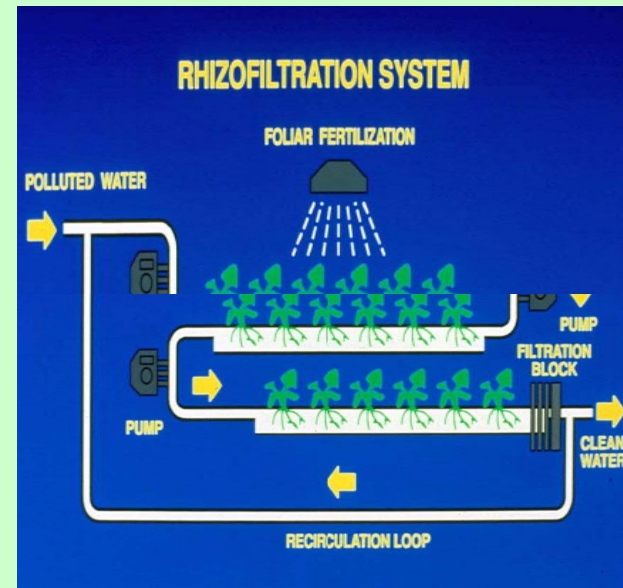
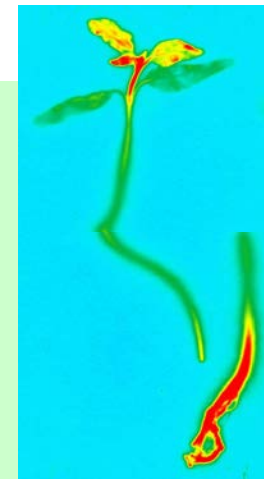
Fytostabilizácia

Fytovolatilizácia

RHIZOREMEDIÁCIA

Rhizofiltrácia

Rhizodegradácia



Hierarchia *in situ* prístupov bioremediačných technológií



Odlišnosť:

- typov kontaminantov a ich distribúcie
- podmienok týkajúcich sa špecifického miesta
- legislatívy



1. **MONITOROVANÁ PRIRODZENÁ ATENUÁCIA (MNA, PASÍVNA)**

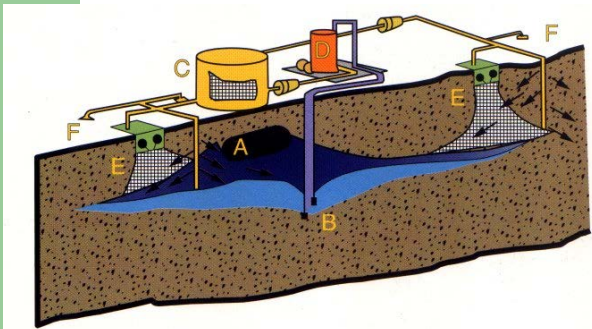
Spočíva na predpoklade, že na danom kontaminovanom území existuje prirodzená populácia mikroorganizmov a za vhodných environmentálnych podmienok degradácia prebieha a je kontinuálna.

2. **PODPOROVANÁ (ASISTOVANÁ) BIOREMEDIÁCIA**

PODPOROVANÁ BIOREMEDIÁCIA

Biostimulácia (nutrienty, induktory)

Bioaugmentácia (inokulácia mikroorganizmami)



BIOSTIMULÁCIA

Aplikovaná, ak sa **degradujúca populácia** síce **vyskytuje v kontaminovanej zóne**, ale **živiny** a ďalšie podmienky sú **nedostatočné pre mikrobiálnu aktivitu**.

Biostimulácia je akcelerovaná:

prídavkom živín, rastových faktorov, induktorov, (bio)surfaktantov, a/alebo fyzikálnymi procesmi (vzdušnenie, ohrev a extrakcia parou)

BIOAUGMENTÁCIA



Prídavok exogénnych organizmov s požadovanými katabolickými schopnosťami do kontaminovaného prostredia za účelom zvýšenia degradácie cieleného kontaminantu.

- **Použitie - ak prirodzená atenuácia alebo biostimulácia sú nevhodné alebo nefungujú.**

Bioaugmentácia je aplikovaná ak:

- kompetentné **degradujúce mikroorganizmy nie sú prítomné** medzi prirodzenou populáciou, príp. ich množstvo je nedostatočné
- je síce **prítomný dostatok prirodzenej populácie**, ale je snahou **zvýšiť rýchlosť** alebo skrátiť čas remediácie

Prístupy bioaugmentácie

Posilnenie kontaminovanej zóny je možné uskutočniť viacerými prístupmi:

- **individuálnymi kmeňmi**
- **mikrobiálnym konzorciom**
- **imobilizovanými bunkami**
- **geneticky modifikovanými organizmami (GMO)**
- **genetickými mobilnými elementami (GEM)**

Imobilizácia mikroorganizmov

- Vnesenie imobilizovaných buniek mikroorganizmov do kontaminovanej pôdy poskytuje ochranu od nepriaznivých enviropodmienok (nevhodné pH, prítomnosť toxických látok), znižuje kompetíciu s prirodzenou mikroflórou, zvyšuje biologickú stabilitu buniek a plazmidov.
- Pre účely imobilizácie sú používané **prírodné aj syntetické nosiče:**
- **Prírodné:** dextran, agar, agaróza, alginát, chitosan polyakrylamidy a k-karragenan.
- **Syntetické:** poly(karbamoyl)sulfonát, polyakrylamid, polyvinylalkohol.
- Limitácie: pomalá difúzia molekúl substrátu do guľčiek nosiča (napr. PVA gélu) - koreluje s interakciami medzi negatívne nabitou bakteriálnou membránou a pozitívne nabitým povrchom nosiča.

Výhody a limitácie bioaugmentácie

Výhody:

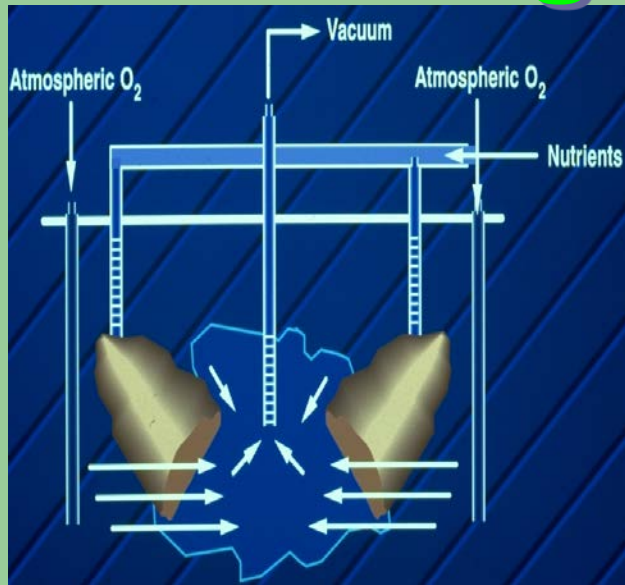
- + Jedinečné vlastnosti určitých bakteriálnych kmeňov, expresia požadovaných enzýmov
- + Poznanie ich metabolizmu
- + Možnosť monitoringu

Limitácie:

- Schopnosť prežívať za reálnych podmienok
- Nutná podpora prídavkom živín
- Ekologická kompetícia

APLIKÁCIA BIOSTIMULÁCIE A BIOAUGMENTÁCIE

Bioventing Biosparging PRB



ZAMERANIE VÝSKUMU

1. Bakteriálne degradéry

Izolácia a identifikácia mikroorganizmov s PCB-degradačnou aktivitou z kontaminovaných pôd a

sedimentov

3. Zhodnotenie

ekotoxicity
genotoxicity
sedimentov

Adaptačné mechanizmy –

účinnok PCB na fluiditu bunkovej membrány bakteriálnych degradérov

POPs
(PCB)

Biodegradácia

Bioremediácia

2. Charakterizácia

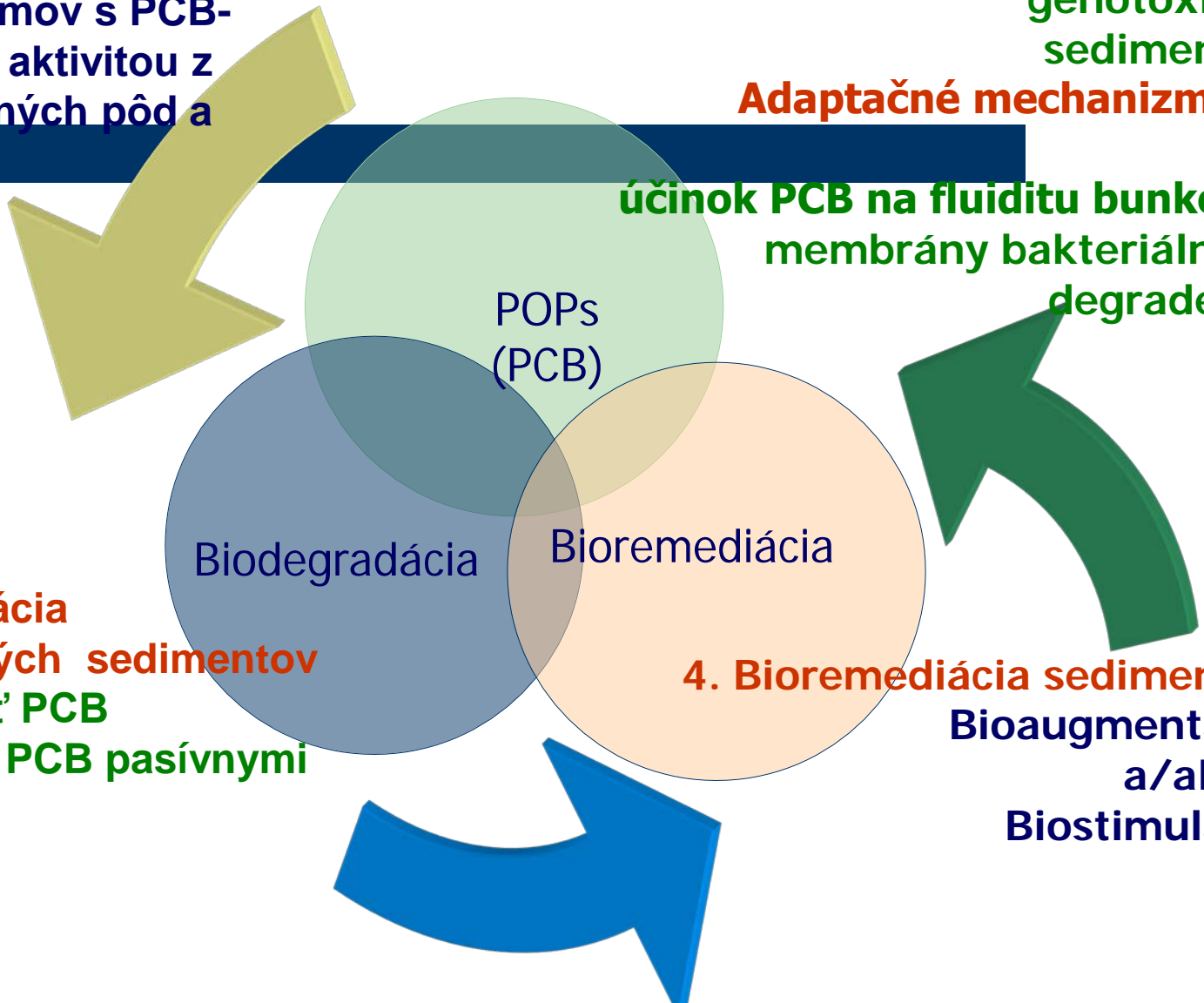
kontaminovaných sedimentov

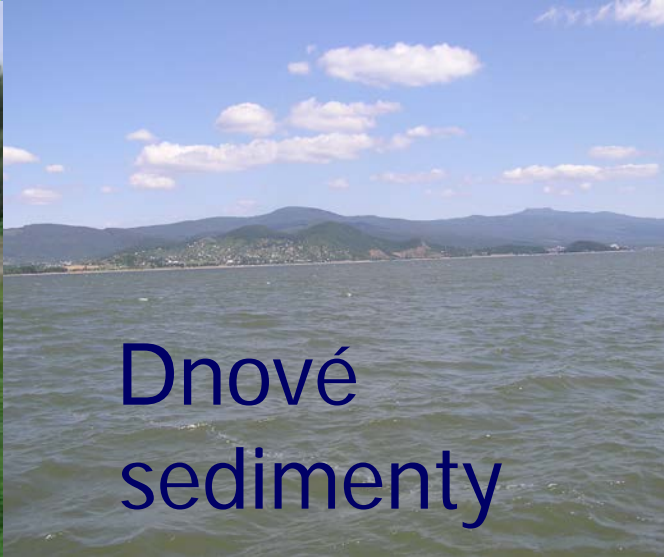
Biodostupnosť PCB

Monitorovanie PCB pasívnymi vzorkovačmi

4. Bioremediácia sedimentov

Bioaugmentácia
a/alebo
Biostimulácia





Dnové sedimenty

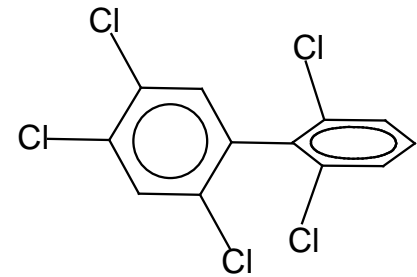
- základná, integrálna a dynamická súčasť hydrologického systému
- konečným rezervoárom veľkého počtu chemických a biologických kontaminantov – v dôsledku hydrofóbných vlastností – bioakumulácia, sekvestrácia
- vstup kontaminantov do potravného reťazca - potenciálne ekologické a zdravotné riziká

Aktuálne otázky bioremediácie

- Vhodnejšia bioaugmentácia alebo biostimulácia?
- Bioaugmentácia: individuálne superkmene alebo mikrobiálne konzorciá?
- Biostimulácia: N, P, O₂, induktory, (bio)surfaktanty?



CIELE PRÁCE



Štúdium podporovanej bioremediácie sedimentov dlhodobo kontaminovaných PCB v mikrokozme prístupom:

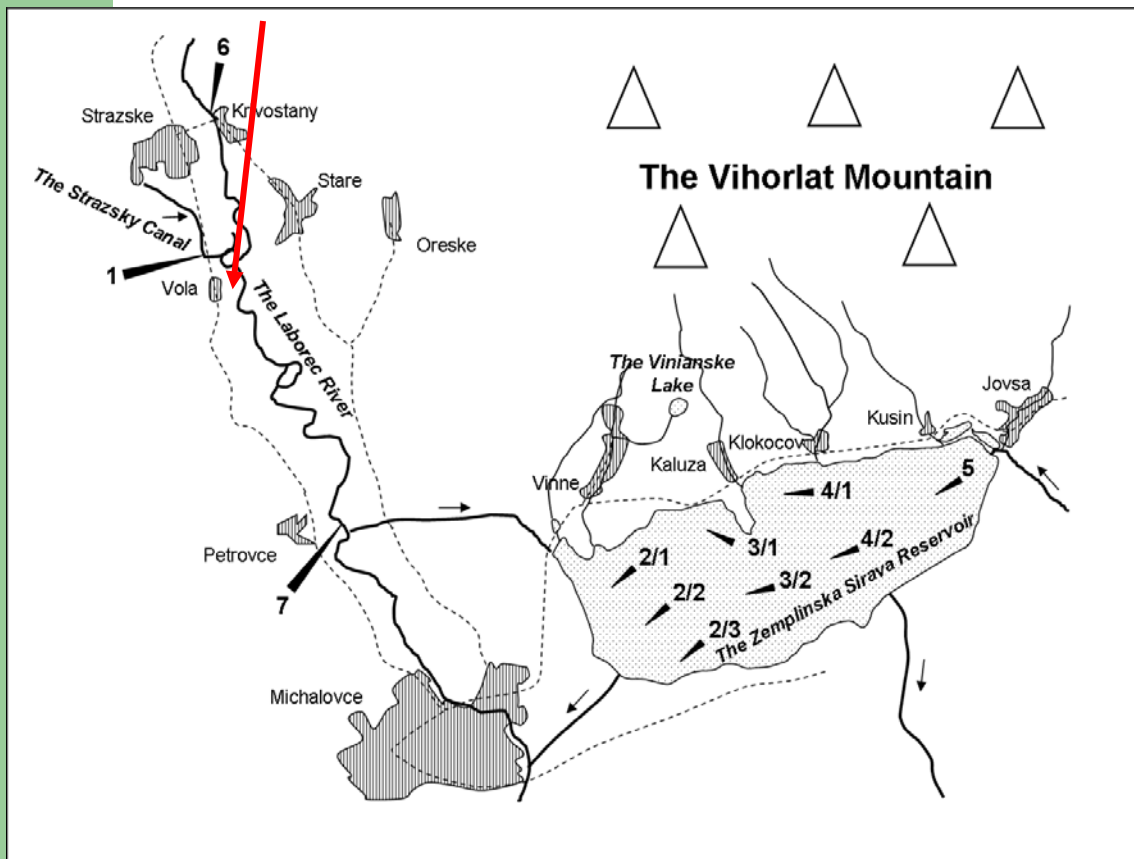
1. **bioaugmentácia (prídavok jednotlivých bakteriálnych kmeňov a vytvorených bakteriálnych konzorcií)**
 2. **biostimulácia (prídavok N, P, O₂ a induktorov, surfaktanty)**
 3. **kombinovanej bioaugmentácie a biostimulácie**
- zhodnotenie **kolonizácie** inokulovaných mikroorganizmov
 - stanovenie **ekotoxicity sedimentov** po bioremediácii s využitím biotestu na štandardných vodných rastlinách *Lemna minor*



Kontaminovaná lokalita



Strážsky kanál (SK) – zdroj PCB



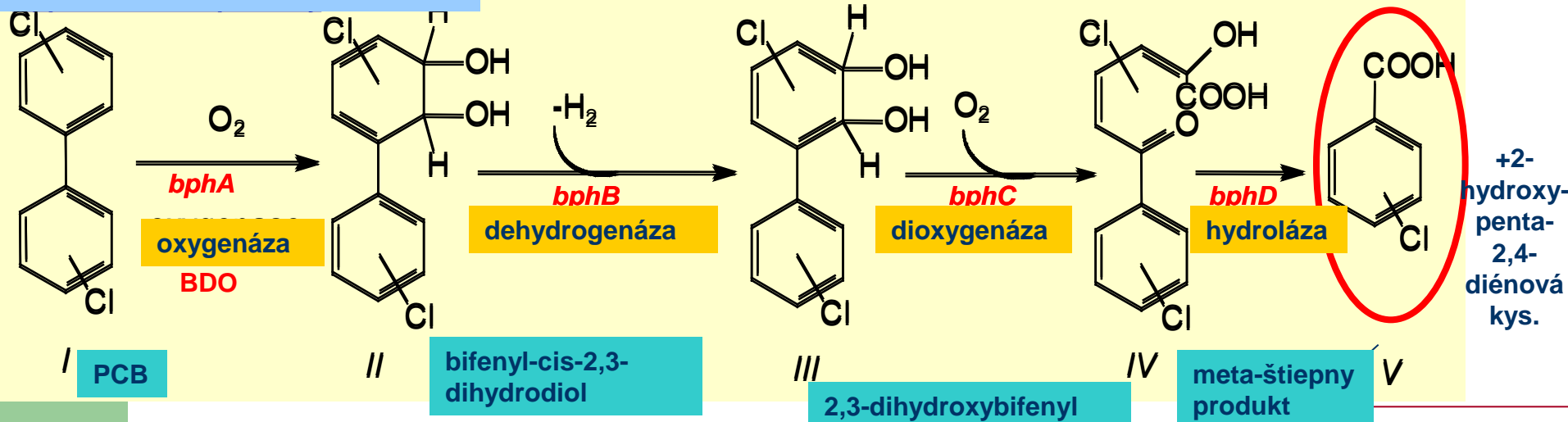
1 – 5 g PCB/kg such. sed.



Vzorkovač (UWITEC Corp., Austria)

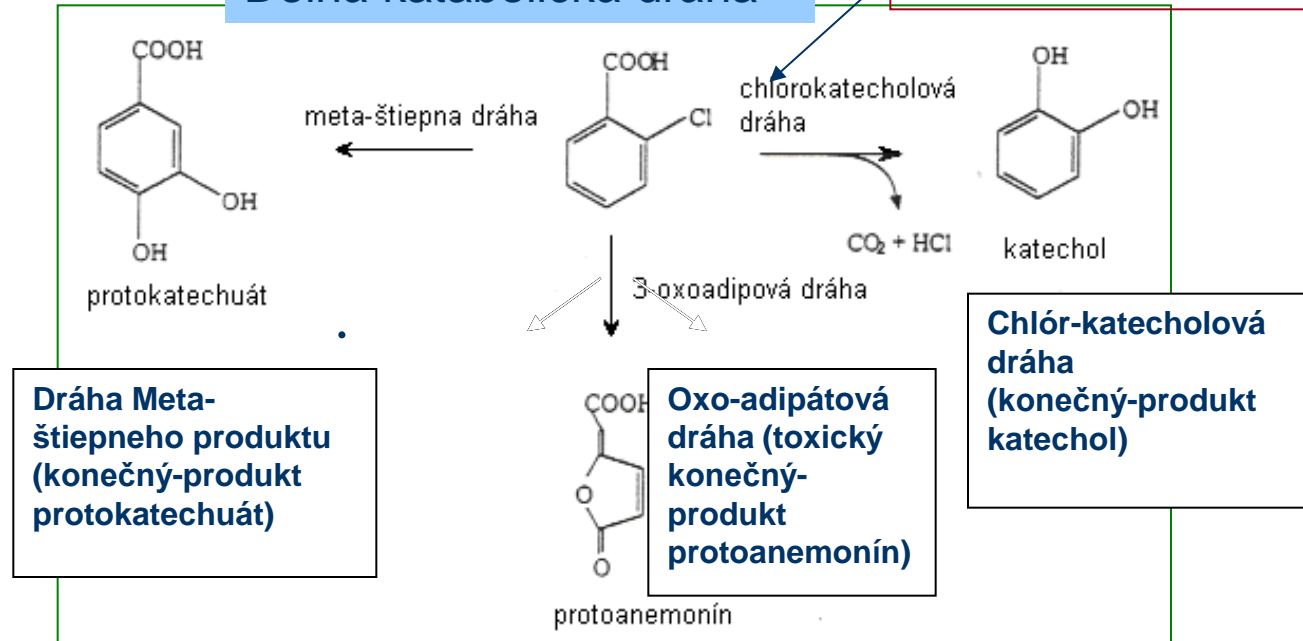
BIODEGRADÁCIA PCB

Horná katabolická dráha



Aké MO potrebujeme?

Dolná katabolická dráha





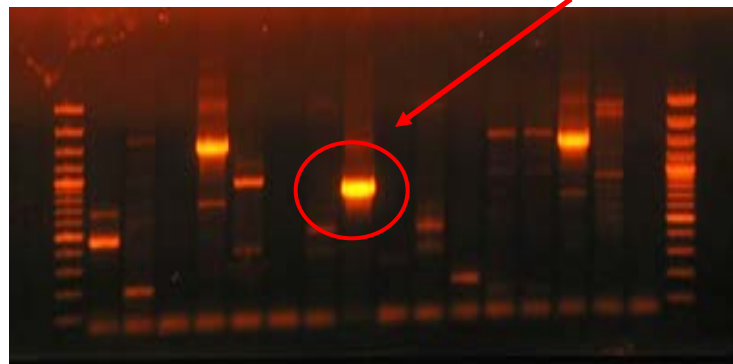
Izolácia a identifikácia bakteriálnych degradérov

Izolácia mikroorganizmov z kontaminovaných sedimentov kultivačnou metódou „enrichment“ - prídavok daného kontaminantu (PCB)

Identifikácia mikroorganizmov na základe sekvencie génu 16S rRNA

Microbacterium oleivorans,
Brevibacterium sp.,
Pseudomonas mandelii,
Pseudomonas aeruginosa
Ochrobactrum sp.,
Achromobacter sp.

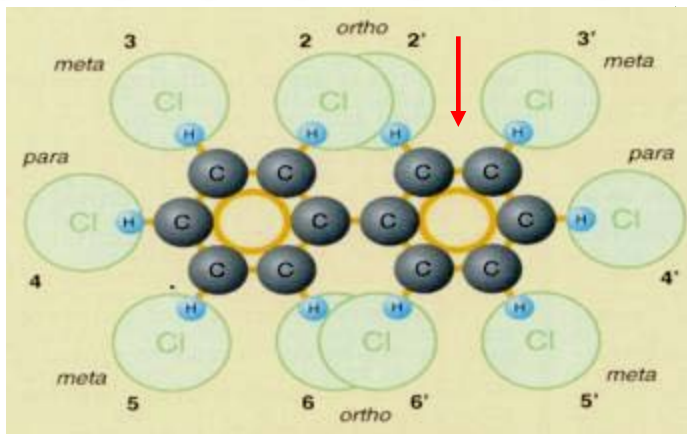
Stenotrophomonas maltophilia,
Ochrobactrum anthropi,
Rhodococcus sp.,
Stenotrophomonas sp.,
Starkeya novella,
Achromobacter xylosoxidans (*bphA1*-gén)



Detekcia *bph* génu PCR metódou – elektroforetický záznam u *A. xylosoxidans*

(Dudášová a kol., J. Basic Microbiol. 2014)

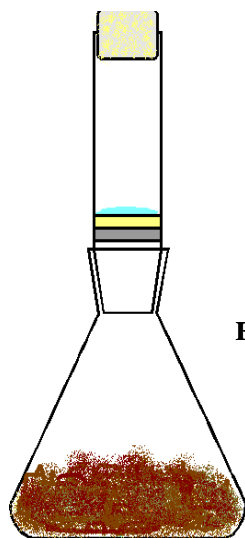
Polychlórované bifenyly - PCB



- Substituční deriváty bifenyly (komerčná zmes Delor 103)
- Počet chlórův 1 – 10
orto, meta a para
- 209 možných kongenérův teoreticky
- **Indikátorové kongenéry:**
PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180

Názov	Štruktúrny vzorec
PCB 28 (2,4,4'-trichlórbifenyly)	
PCB 52 (2,2',5,5'-tetrachlórbifenyly)	
PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentachlórbifenyly)	
PCB 118 (2,3',4,4',5'-pentachlórbifenyly)	
PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-hexachlórbifenyly)	
PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlórbifenyly)	
PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlórbifenyly)	

Analýza PCB



vatová zátka

sklená kolóna

adsorbent SILIPOR C18

sklená fritá

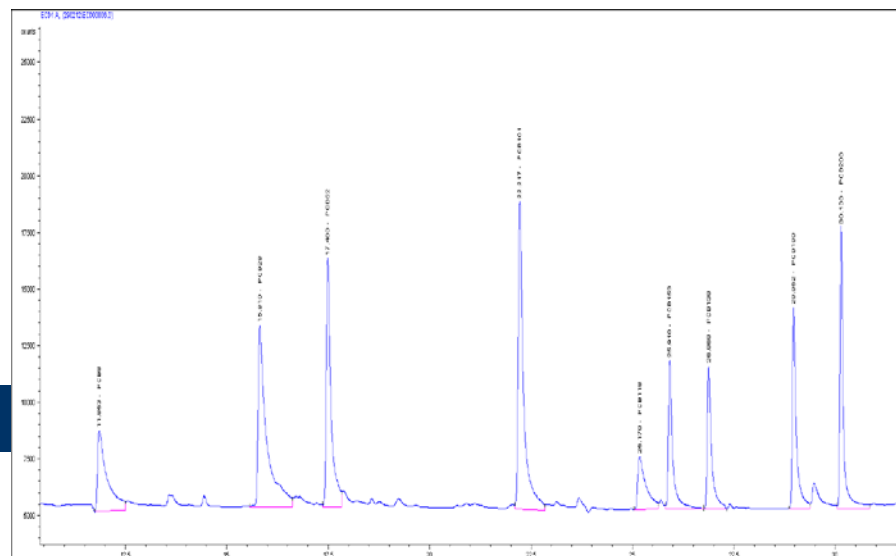
so zábrusom
Erlenmeyerova banka

sediment

Aparatúra: Dercová a kol., 1996;

Účinnosť extrakcie,
biodegradácia:

Murínová a kol., 2014



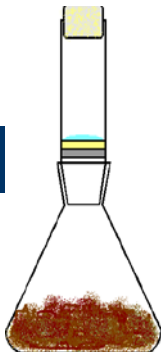
Chromatogram štandardnej zmesi 6 indikátorových a 3 vybraných kongenéro PCB.

Hmotnostné zastúpenie kongenéro PCB v sedimente

Kongenéry PCB	mg PCB/kg sedimentu (2008)	mg PCB/kg sedimentu (2009)
PCB8	2,5411	0,6596
PCB28	8,1641	4,5039
PCB53	5,3359	6,7713
PCB101	5,0333	4,3426
PCB118	12,2370	11,5394
PCB153	8,5851	8,7793
PCB138	6,3418	7,2692
PCB180	6,3924	6,0336
PCB203	1,8670	1,6651
Spolu	56,4977	51,5640

Metodika experimentov

Sediment
+ minimálne minerálne médium
+ prídavky:



Bioaugmentácia

- Individuálne kmene 1 g.l⁻¹
- Vytvorené konzorciá

Biostimulácia

- Brečtanové listy – prír. terpény
- Borovicové ihličie – prír. terpény
- Syntetické terpény
- N, P, O₂



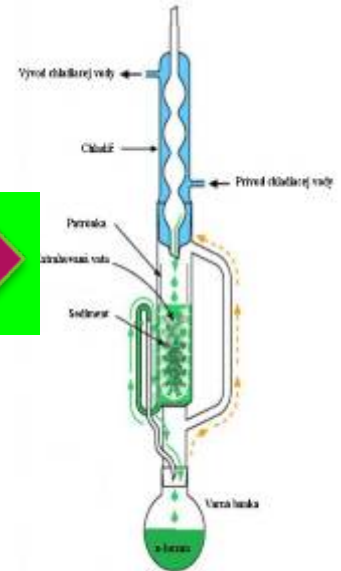
Vzorkovanie
sedimentu zo
Strážskeho kanála
(Uwitec, Austria)



Vyhodnotenie
(% degradácie,
kolonizácia,
ekotoxická)



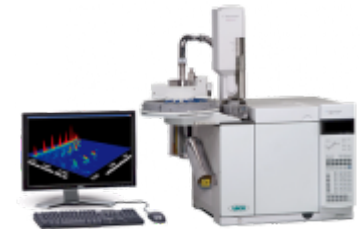
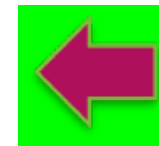
Centrifugácia



Soxhletova extrakcia



**Kultivačné podmienky: 21 dní,
stacionárna kultivácia, 28°C,
tma, občasné premiešavanie**

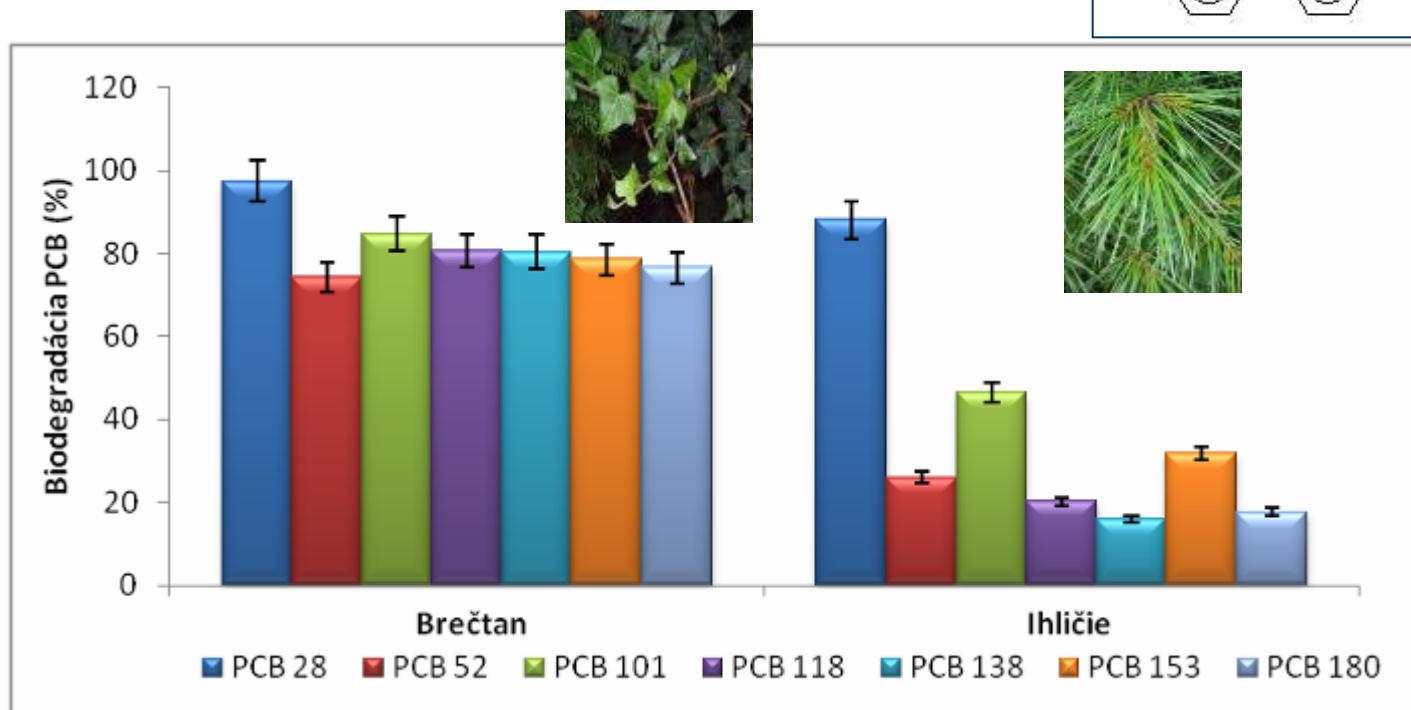
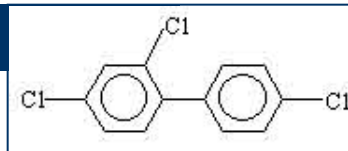


Analýza GC ECD

VÝSLEDKY

Biostimulácia – prídavok induktorov

- Prídavok **brečtanových listov** – vyššia biodegradácia ako prídavok **borovicového ihličia**; Kongenér **PCB 28** – najvyššia biodegradácia

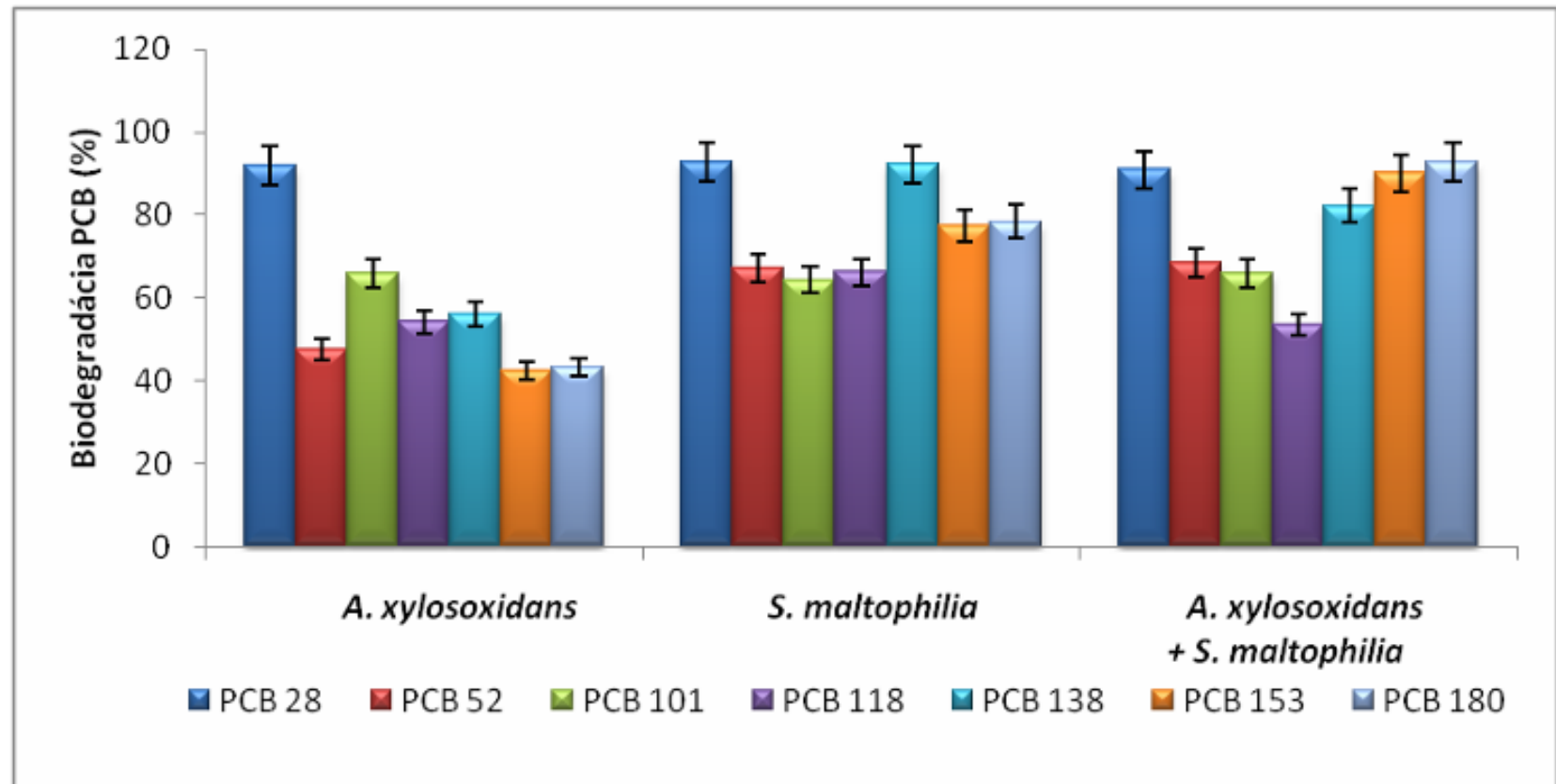


Dudášová a kol., IBB, 2012; Dercová a kol., Fres. Environ. Bull., 2003; Tandlich a kol., Chemosphere, 2001

Bioaugmentácia - kmeň vs. konzorcium

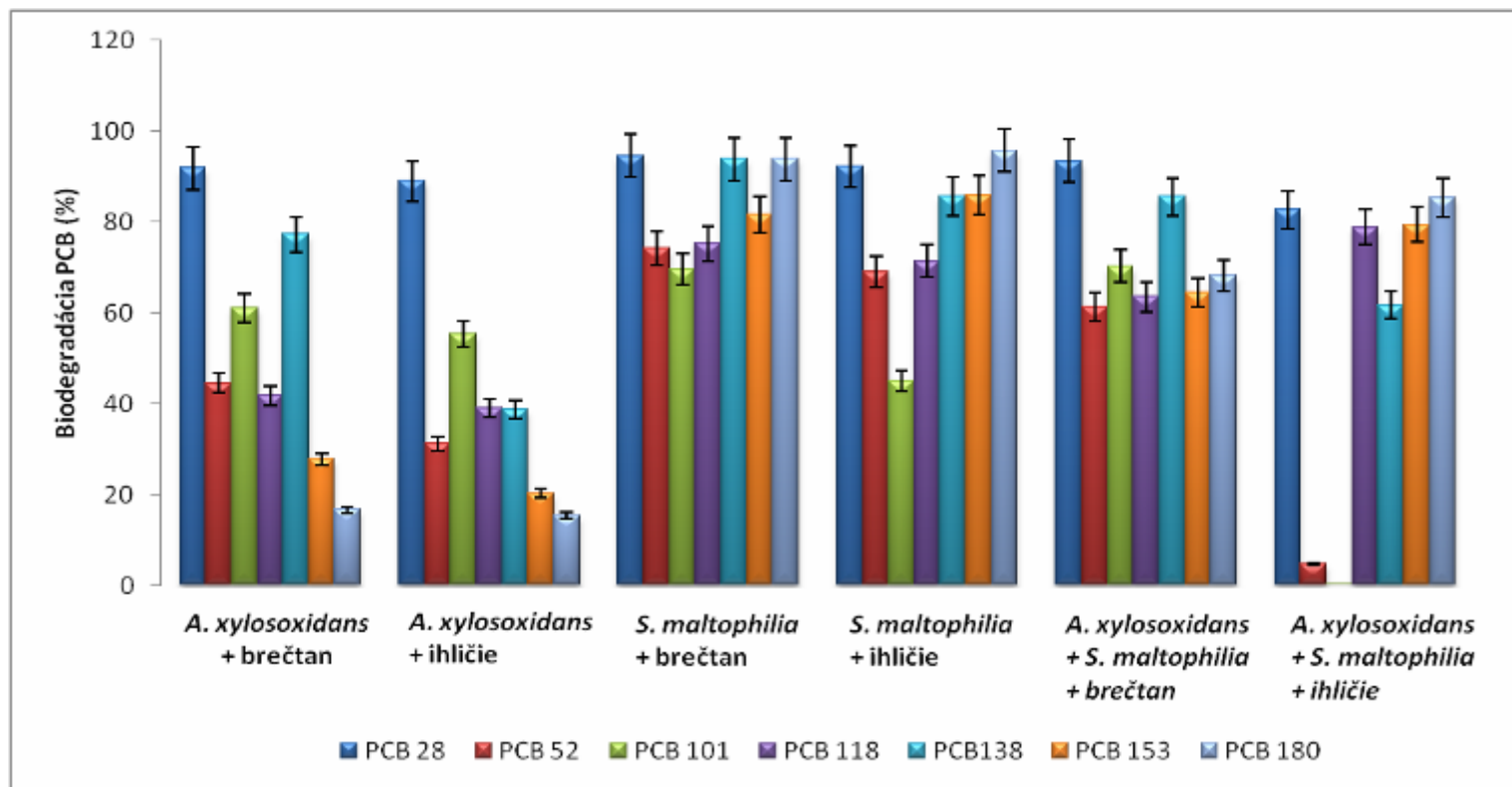
Kmeň *Stenotrophomonas maltophilia* (*bph* gén plazmid) – vyššia biodegradácia ako v prítomnosti *Achromobacter xylosoxidans* (*bph* gén-chromozomálna DNA)

Konzorcium – zvýšená biodegradácia vyššie chlórovaných kongenéroov PCB 153 a 180



Kombinovaná biostimulácia a bioaugmentácia

Prídavok baktérie *S. maltophilia* (+ brečtan) – eliminácia kongenéroov PCB **vyššia** ako vo vzorkách s prídavkom baktérie *A. xylooxidans*; **brečtan** vhodnejší induktor biodegradácie ako **ihličie**



EKOTOXICITA SEDIMENTOV

Lemna minor



Kontrola

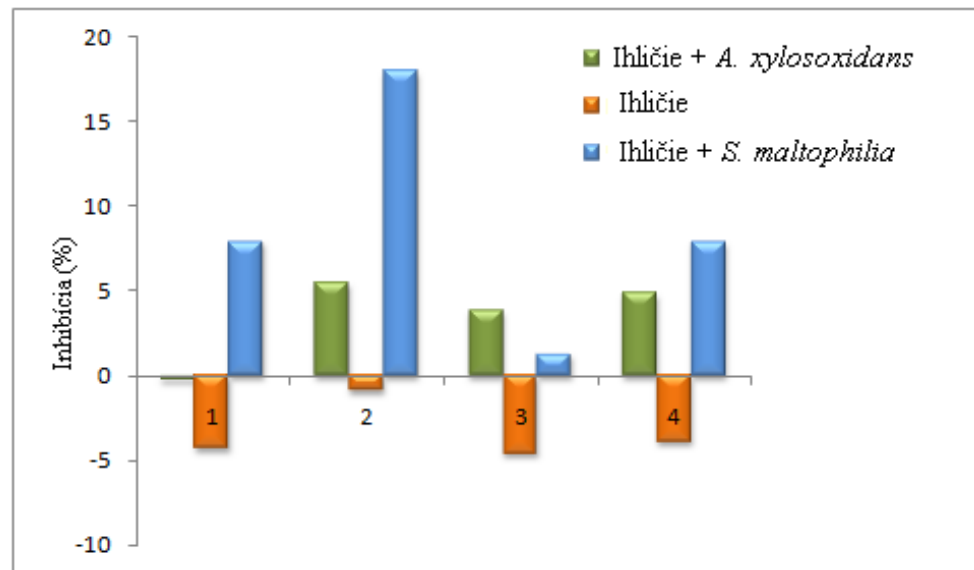
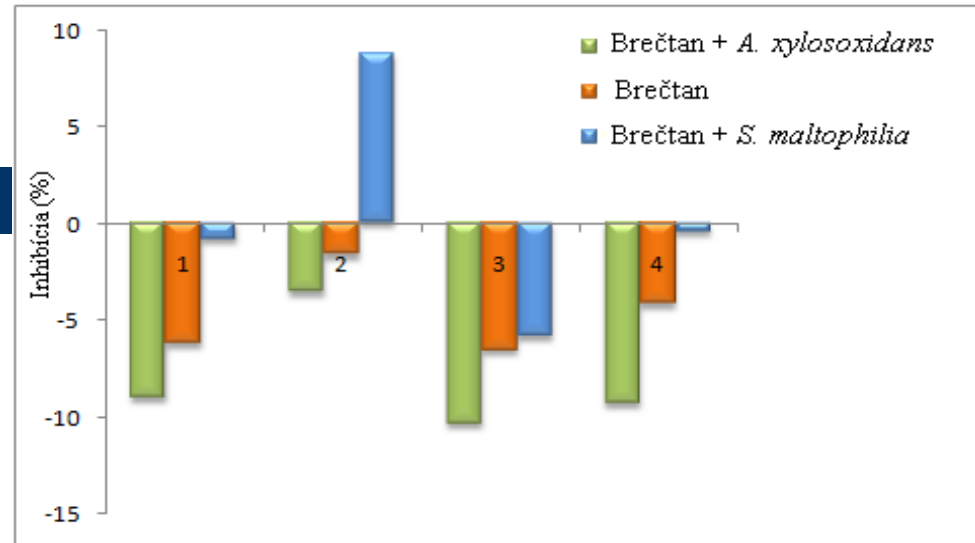
Strážsky kanál

Frondy (zelené lístky) stanovené po 0, 2, 4, a 7 dňoch použitím LEMNASCAN analyzátora. Výpočet I_r a I_a – inhibícia rastovej rýchlosti a plochy frondov.

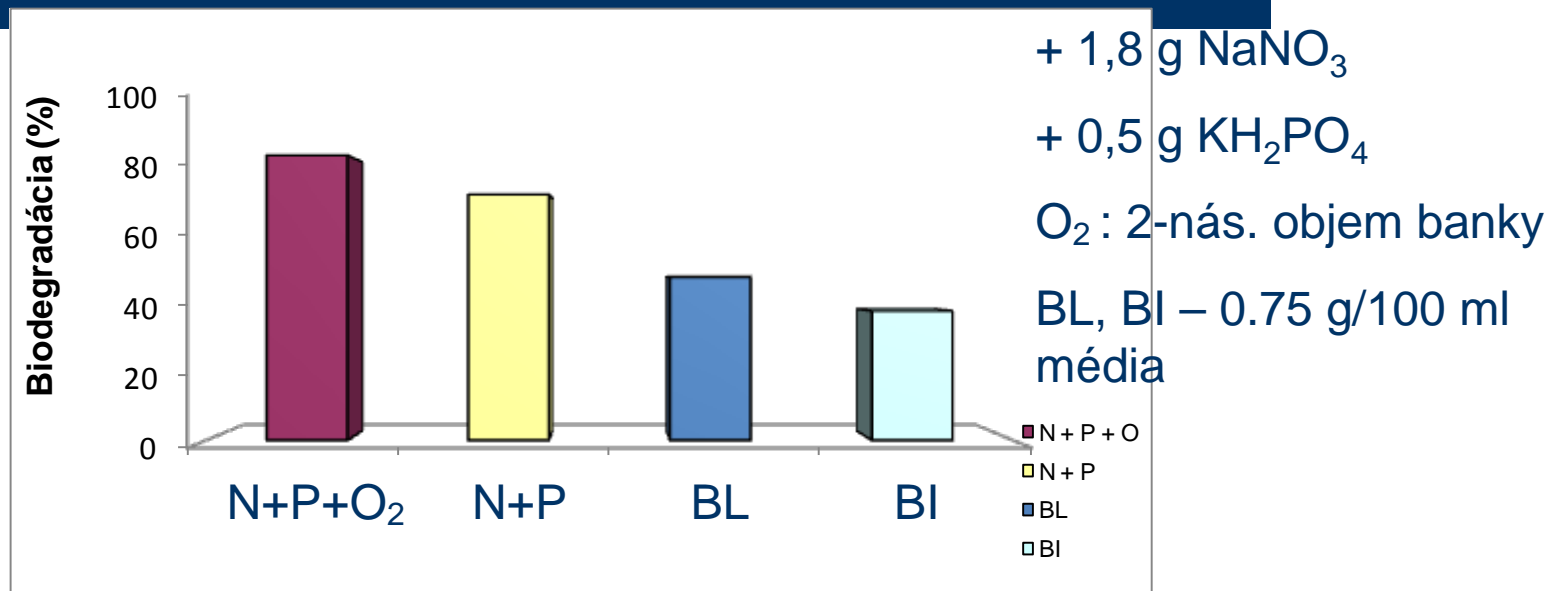
Dercová et al., Int. Biodeter. Biodegr. 2009

TOXICITA SEDIMENTOV PO BIOREMEDIÁCIÍ

- Sediment s prídavkom **brečtanových listov** v kombinácii s baktériami *A. xylooxidans* alebo *S. maltophilia* - **stimulácia** rastliny *L. minor* – netoxický účinok.
- Sediment s prídavkom **ihličia** v kombinácii s baktériami *A. xylooxidans* alebo *S. maltophilia* - **inhibícia** rastu rastliny *L. minor* – toxický účinok.



Biostimulácia - prídavok N, P, O₂



Degradácia 7 kongenéroov PCB (28, 52, 101, 118, 152, 138, 180) metódou **biostimulácie prirodzenej mikroflóry s prídavkom dusíka fosforu a kyslíka (N + P + O₂), dusíka a fosforu (N + P), nasekaných brečtanových listov (BL) a borovicového ihličia (BI).**

Stacionárna degradácia prebiehala 21 dní pri 28°C v tme s občasným premiešaním, v prípade zvýšeného množstva kyslíka na rotačnej trepačke pri 180 (ot/min).

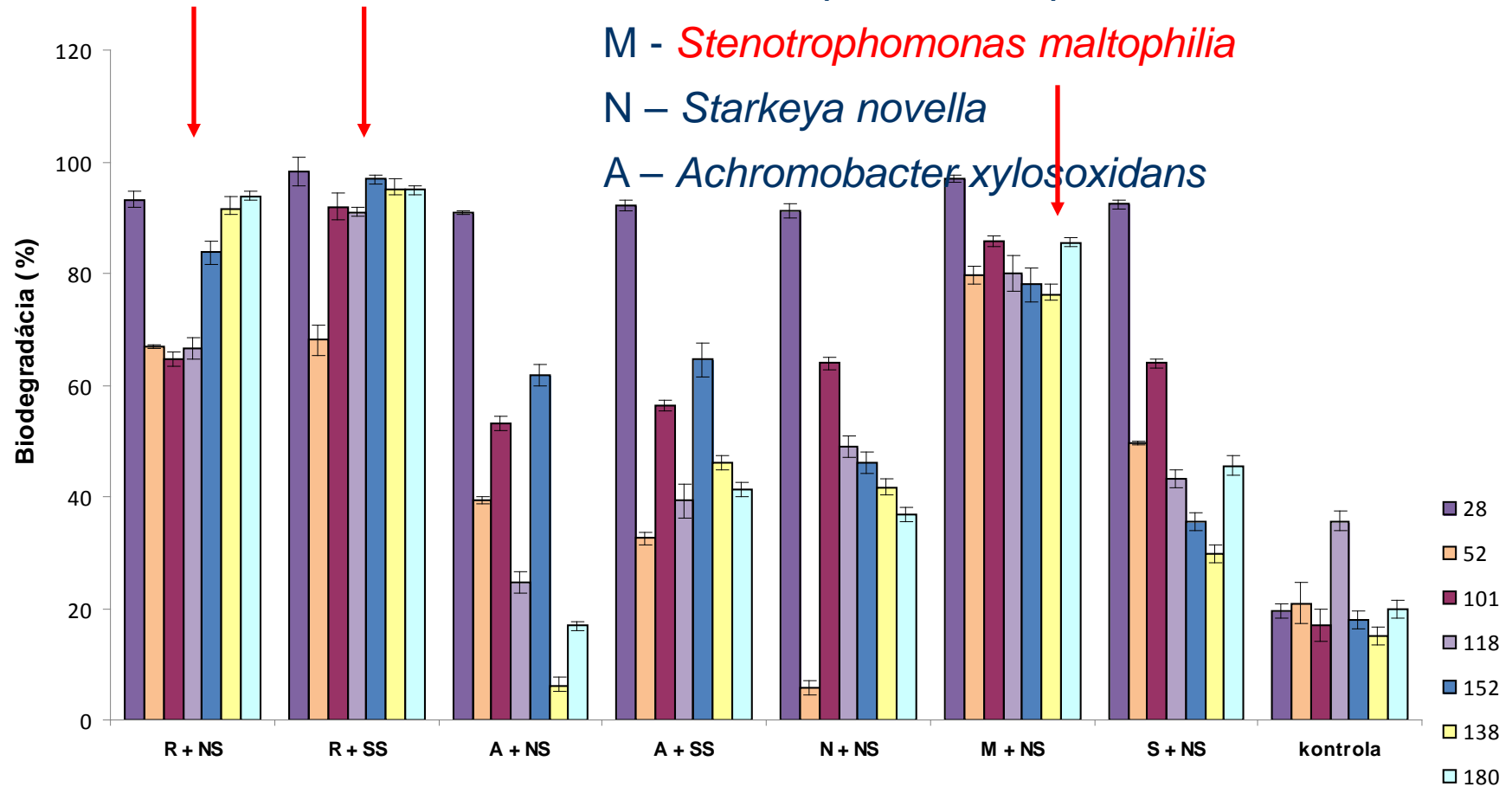
R - *Rhodococcus sp.*

S - *Stenotrophomonas sp.*

M - *Stenotrophomonas maltophilia*

N – *Starkeya novella*

A – *Achromobacter xylosoxidans*



Biodegradácia 7 kongenénov PCB (28, 52, 101, 118, 152, 138, 180) po pridaní jednotlivých **kmeňov. S-sterilný, N-nesterilný sediment.** Degradácia prebiehala 21 dní v stacionárnej polohe pri 28°C v tme s občasným premiešaním. Sediment: 20 g s MM médiom. Koncentrácia inokula: 1 g.l⁻¹.

Bioaugmentácia jednotlivými kmeňmi

Pridaný kmeň	Sediment	Biomasa CFU.ml ⁻¹ x 10 ⁸		Biodegradácia (%)
		0. deň	22. deň	
<i>Rhodococcus sp.</i>	Suchý-nesterilný	120	120	70,68 ± 5,57
<i>Rhodococcus sp.</i>	Suchý-sterilný	120	130	87,39 ± 1,62
<i>A. xylooxidans</i>	Suchý-nesterilný	23	18	30,93 ± 1,81
<i>A. xylooxidans</i>	Suchý-sterilný	53	52	32,21 ± 4,19
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Suchý-nesterilný	43	33	41,36 ± 0,72
<i>Starkyea novella</i>	Suchý-nesterilný	60	32	44,19 ± 0,72
<i>S. maltophilia</i>	Suchý-nesterilný	120	110	60,81 ± 0,88

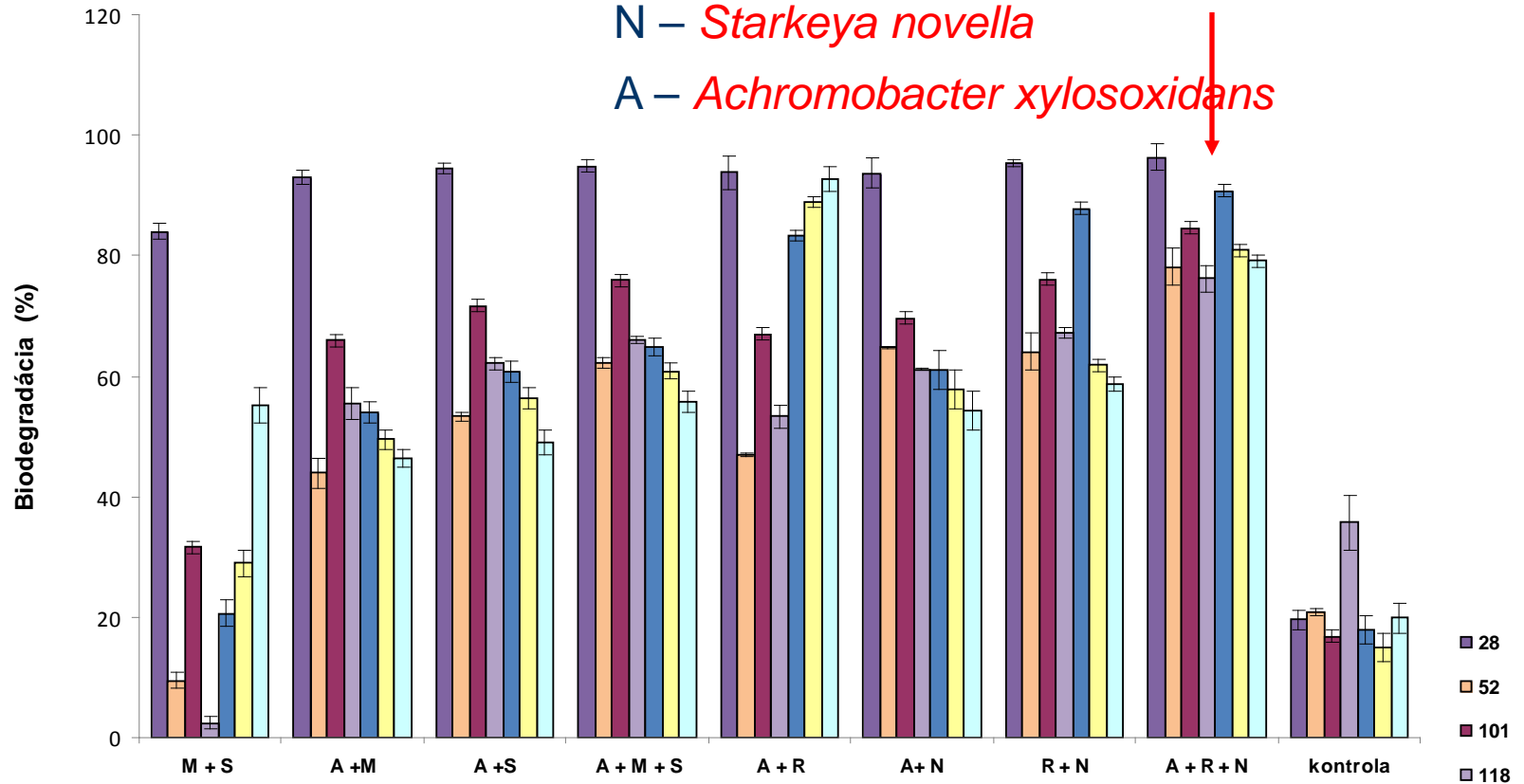
R - *Rhodococcus sp.*

S - *Stenotrophomonas sp.*

M – *Stenotrophomonas maltophilia*

N – *Starkeya novella*

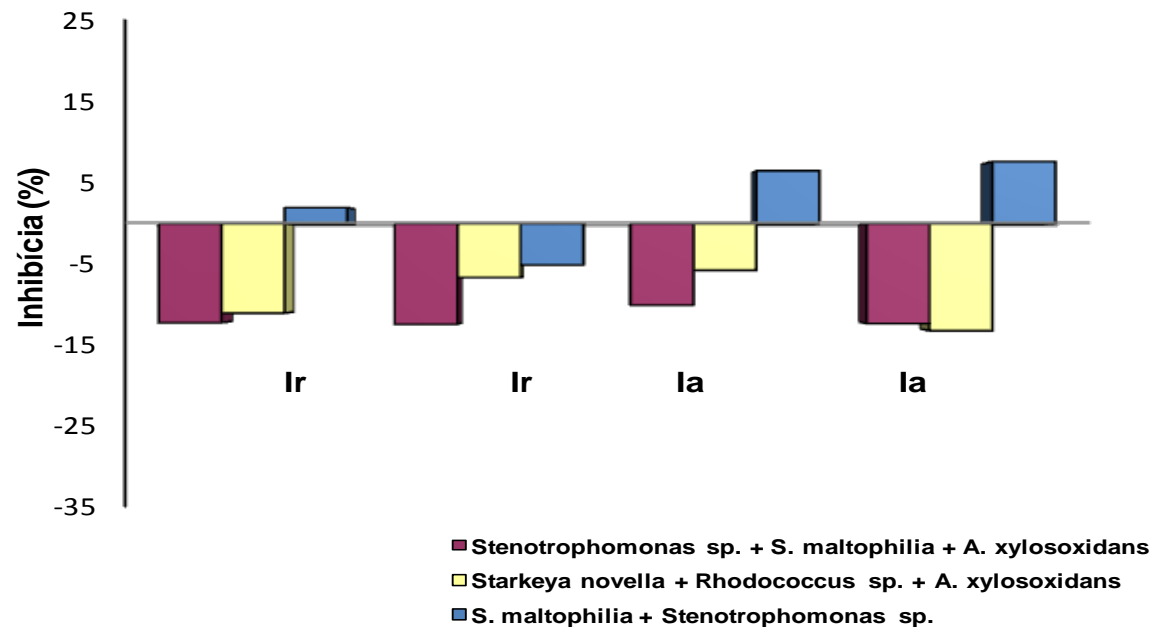
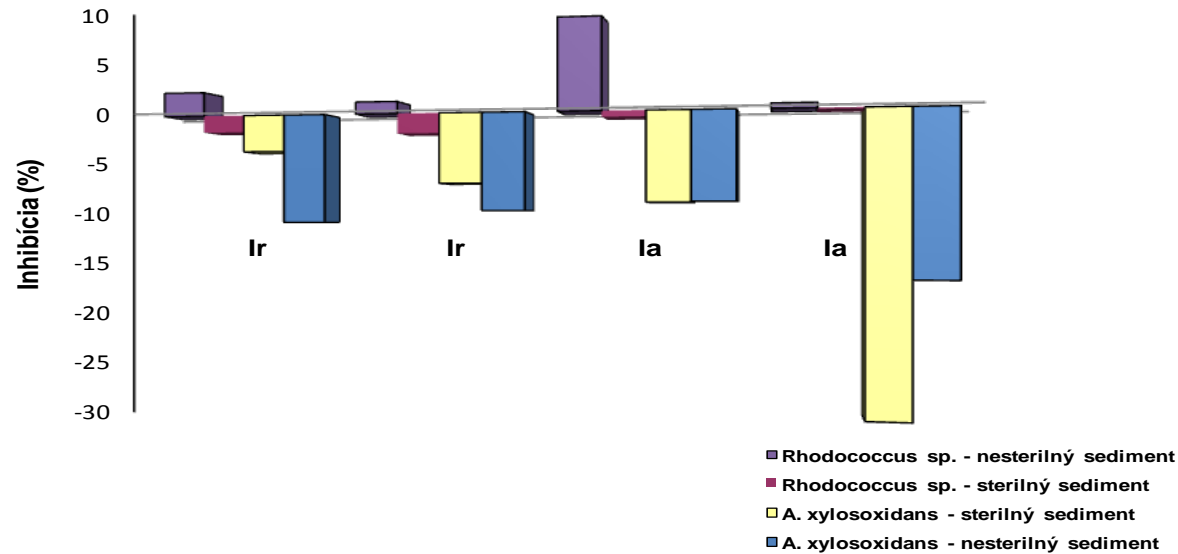
A – *Achromobacter xylosoxidans*



Bioremediácia vytvorenými bakteriálnymi **konzorciami** z jednotlivých kmeňov. 20 g sterilného sedimentu, 0.5 g.l⁻¹ biomasy každého kmeňa, resp. 0,33 g.l⁻¹.

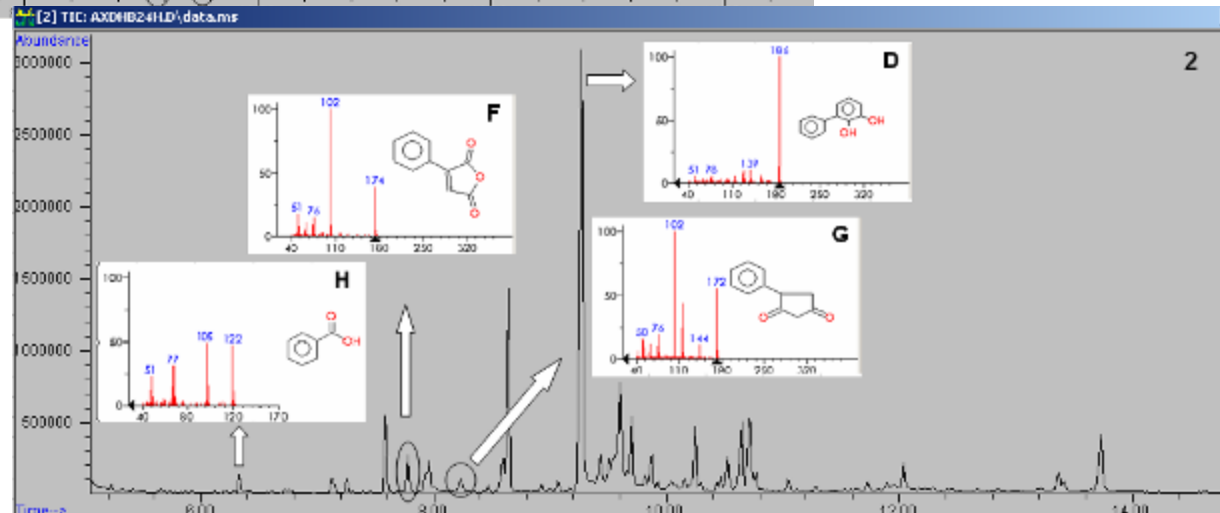
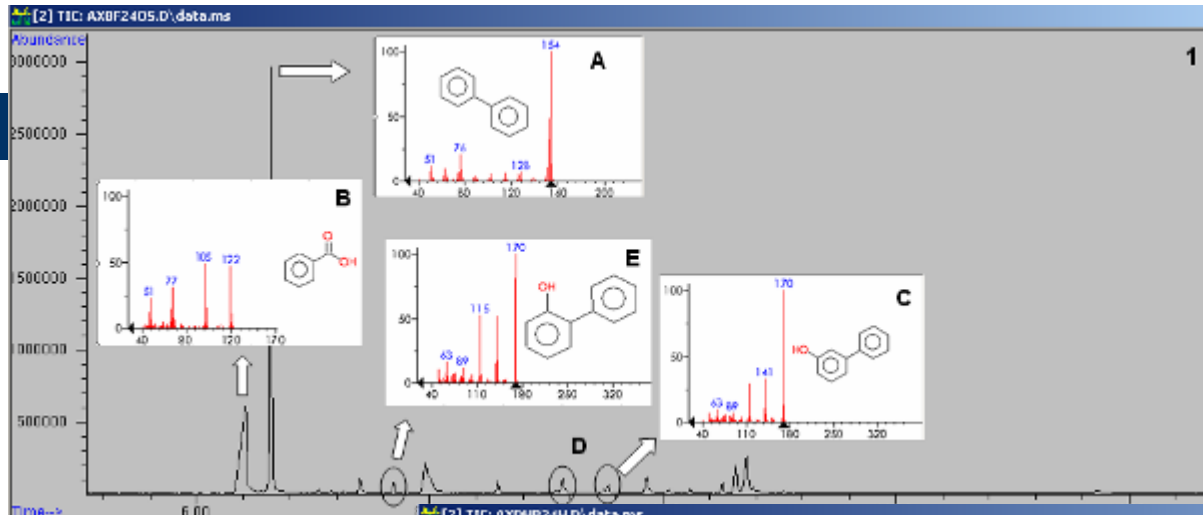
Bioaugmentácia bakteriálnymi konzorciami

Kmeň	Sediment	Biomasa CFU.ml ⁻¹ x 10 ⁻⁸		Biodegradácia PCB (%)
		0. deň	21. deň	
<i>A.xylosoxidans</i> <i>Rhodococcus</i> sp.	Suchý sterilný	40	13	65,76 ± 1,17
<i>A. xylosoxidans</i> <i>Starkeya novella</i>	Suchý sterilný	120	26	59,30 ± 1,17
<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Starkeya novella</i>	Suchý sterilný	8	35	67,58 ± 1,1
<i>A. xylosoxidans</i> <i>Rhodococcus</i> sp. <i>Starkeya novella</i>	Suchý sterilný	17	120	76,87 ± 0,67
<i>S. maltophilia</i> <i>Stenotrophomona</i> s sp.	Suchý sterilný	80	34	5,74 ± 0,92
<i>A. xylosoxidans</i> <i>S. maltophilia</i>	Suchý sterilný	90	6	53,11 ± 1,33
<i>A. xylosoxidans</i> <i>Stenotrophomona</i> s sp.	Suchý sterilný	59	23	59,00 ± 1,84
<i>A. xylosoxidans</i> <i>S. maltophilia</i> <i>Stenotrophomona</i> s sp.	Suchý sterilný	50	22	63,12 ± 1,21



Ekotoxická - sa po bioremediácii neprejavila negatívne voči *Lemna minor* – pozorovaná stimulácia rastu

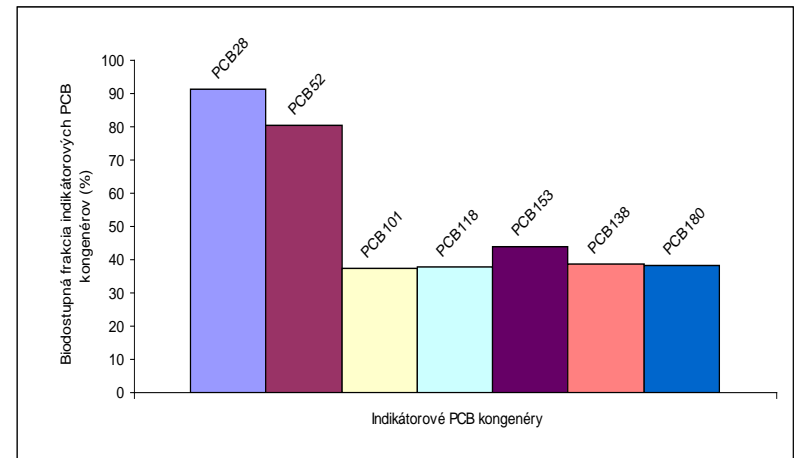
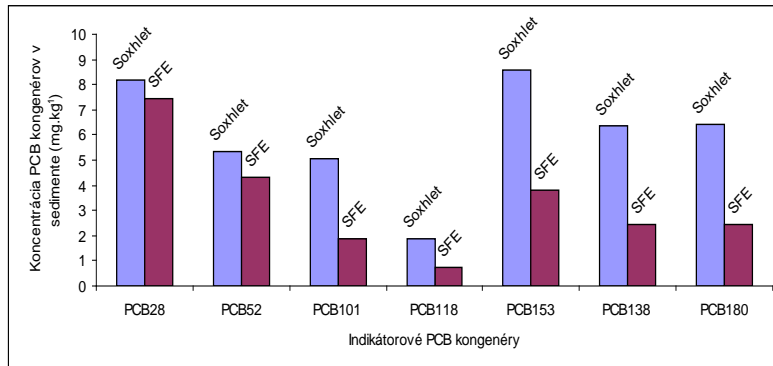
DEGRADAČNÉ PRODUKTY



Degradačné produkty môžu byť niekedy toxickejšie ako materská zložčenina, keďže sú viac rozpustné vo vode a tým biodostupnejšie – ekotoxikologické post-remediačné hodnotenie potrebné



BIODOSTUPNOSŤ PCB



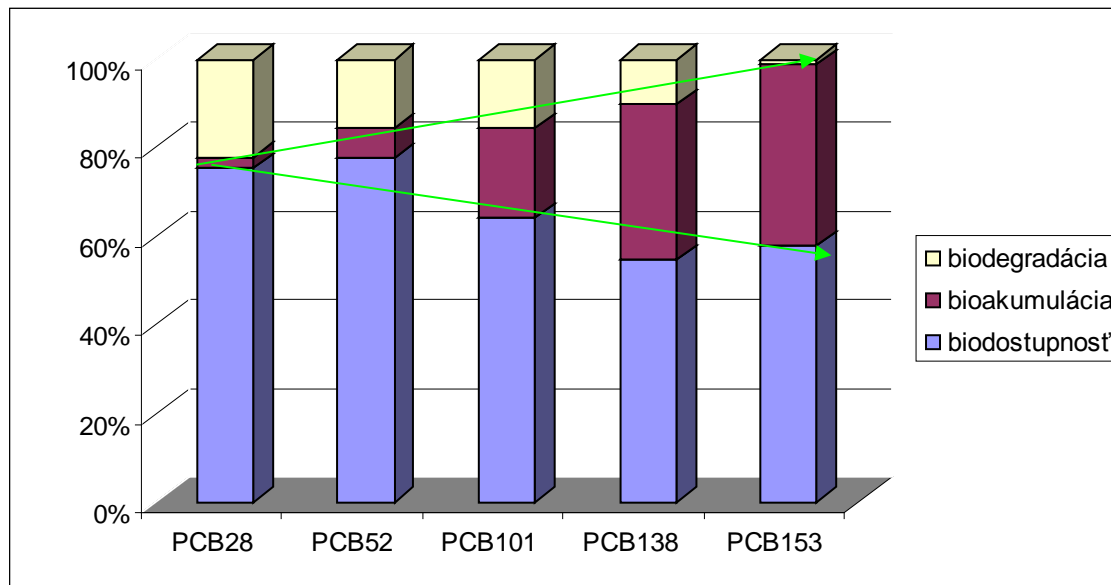
Porovnanie koncentrácií indikátorových kongenéro PCB získaných Soxhletovou extrakciou (SE) a superkritickou fluidnou extrakciou (SFE).

Biodostupná frakcia SFE/Soxhlet (%) indikátorových PCB kongenéro v sedimente zo Strážskeho kanála.

Bio-dostupnosť

Bio-akumulácia

Bio-degradácia



Biodostupnosť: meraná v spolupráci s MU Brno (2012)

Bioakumulácia: dáta prevzaté z Brázová et al.: Tissue-specific distribution in fish (2012)

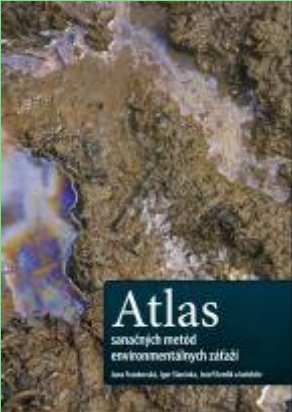
Biodegradácia: pre bakteriálny kmeň *S. maltophilia*



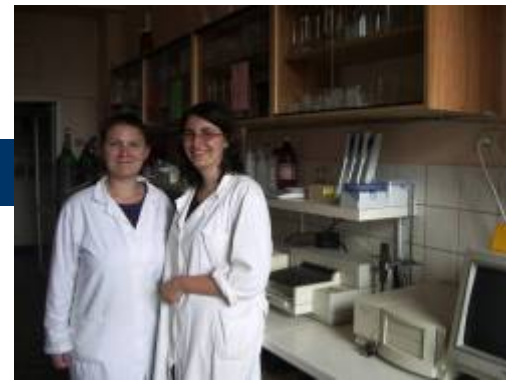
ZÁVERY

1. V kontaminovaných sedimentoch sú **prítomné adaptované autochtónne kmene s PCB-degradačnou aktivitou.**
2. Prídavok **živín a induktorov zvýšil** degradačnú schopnosť mikroorganizmov prirodzene sa vyskytujúcich v sedimentoch.
3. Prídavok **baktérií** s požadovanou schopnosťou **zvýšil** biodegradáciu PCB (najvhodnejšia *Rhodococcus* sp.); prídavkom mikrobiálnych **konzorcií** sa zvýšila degradácia **vyššie chlórovaných kongenéro** PCB (najvhodnejšie konzorcium *A. xylosoxidans*, *Rhodococcus* sp. a *Starkeya novella*).
4. **Toxicita sedimentov s podporovanou bioremediáciou** bola výrazne **nižšia** ako sedimentov bez bioremediácie.

Ďakujem za pozornosť!



Práca bola realizovaná
s finančnou podporou projektu
VEGA 1/0734/12



PodĎakovanie:
Ing. Hana Dudášová, PhD.
Ing. Slavomíra Murínová
Ing. Katarína Lászlóvá
Juraj Škarba

***Reálne skúsenosti s bioremediačnými technológiami
pomáhajú lepšie definovať ich limitácie,
ale aj rozšíriť ich aplikácie.***

Princípy a procesy, ktoré sú základom bioremediačných technologických postupov aplikovaných pre ťažké a toxické kovy – kontaminanty ŽP

- 1. Biosorpcia a bioakumulácia
- 2. Bioredukcia
- 3. Biooxidácia
- 4. Biomineralizácia a biokryštalizácia
- 5. Biometylácia, bioalkylácia; Biovolatilizácia