



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# NÁPRAVA EKOLOGICKÝCH ŠKOD

## 3. ČÁST

Omezující faktory pro biologickou remediaci  
Mikroorganismy pro bioremediaci

VÍT MATĚJŮ  
ENVISAN-GEM, a.s.  
Biotechnologická divize, Radiová 7,  
102 31 PRAHA 10  
envisan@grbox.cz



# O ČEM TO BUDE ?

1. Faktory ovlivňující biologickou dostupnost polutantů, transport do buňky
2. Podpora přenosu hmoty, biosurfaktanty, biodegradovatelnost polutantů, biodegradace, biotransformace
3. Mikroorganismy pro sanaci – kvasinky, dřevokazné houby, bakterie





# BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST POLUTANTŮ

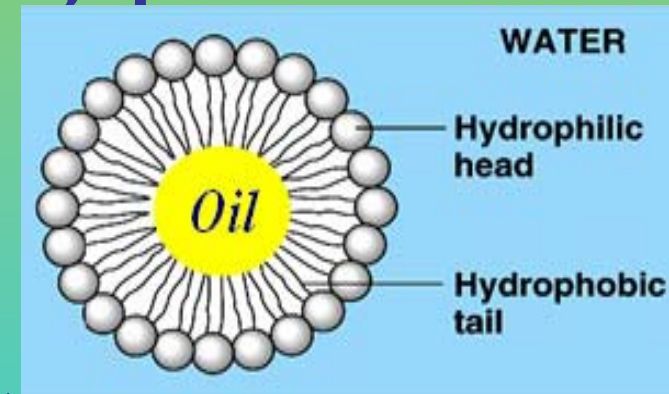
Biologická rozložitelnost polutantu závisí na:

- Struktúře a náboji molekuly
- Polaritě
- Rozpustnosti ve vodě
- Stupni zvětrání
- Biologické dostupnosti
- Enzymatickém vybavení mikroorganismu
- Transportu do buňky (přenosu hmoty)



# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

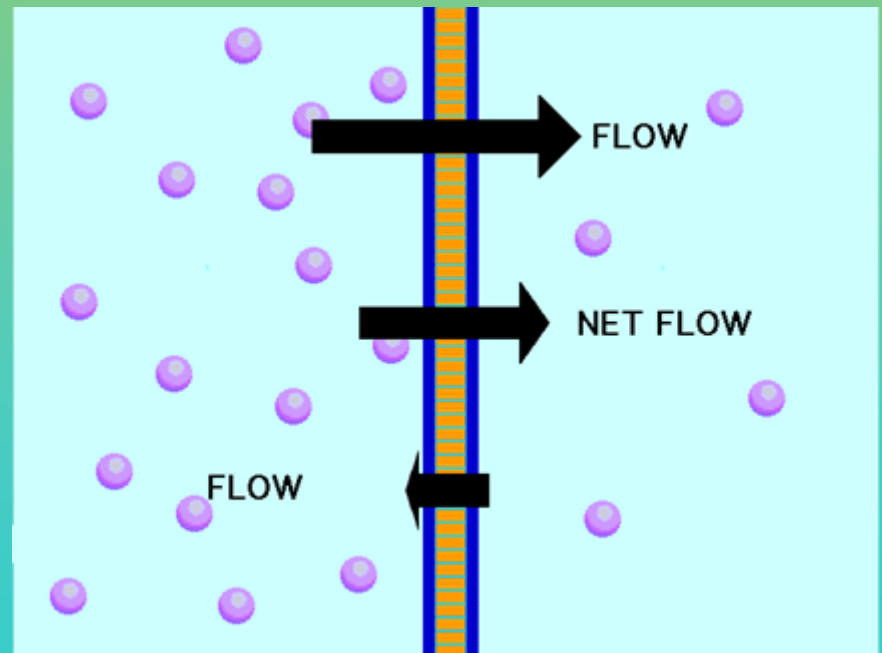
- Bakterie nevytvářejí exoenzymy pro rozklad polutantů
- Rozklad probíhá v buňce
- Molekuly se do buňky dostávají přes buněčnou membránu
- Transport do buňky je:
  - aktivní (přenašeče)
  - pasivní (např. difúze)



# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

- PASIVNÍ TRANSPORT – DIFÚZE

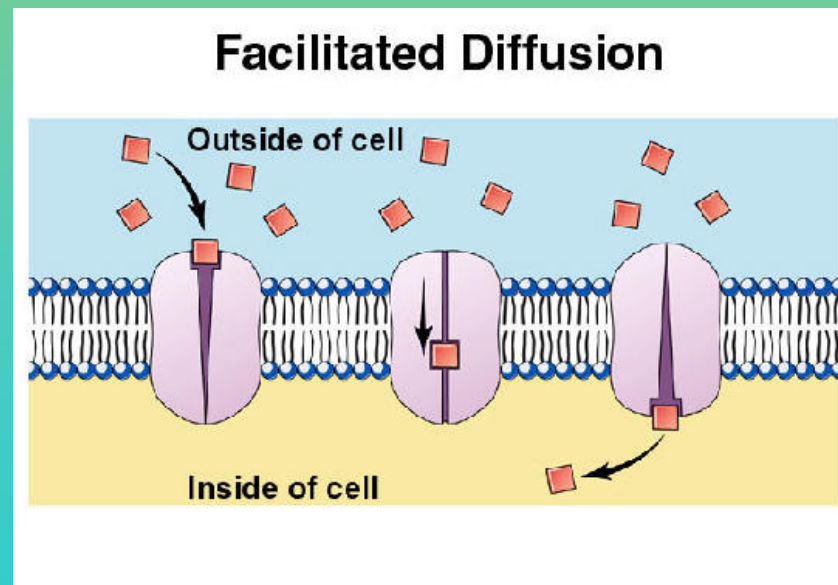
není třeba energie, je to pohyb molekul z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací látky



# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

- PASIVNÍ TRANSPORT – PODPOROVANÁ DIFÚZE

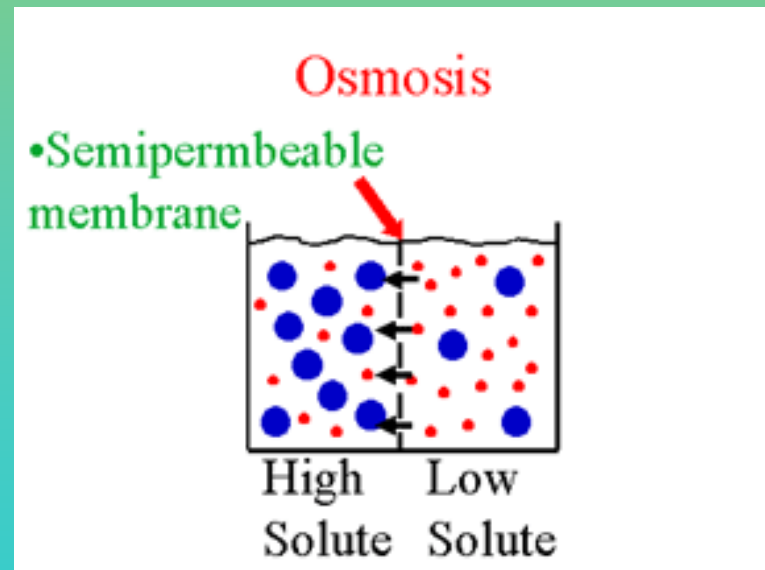
Není třeba ATP, ale musí být přítomna přenosová bílkovina, která zprostředkovává přenos z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací



# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

- PASIVNÍ TRANSPORT – OSMÓZA

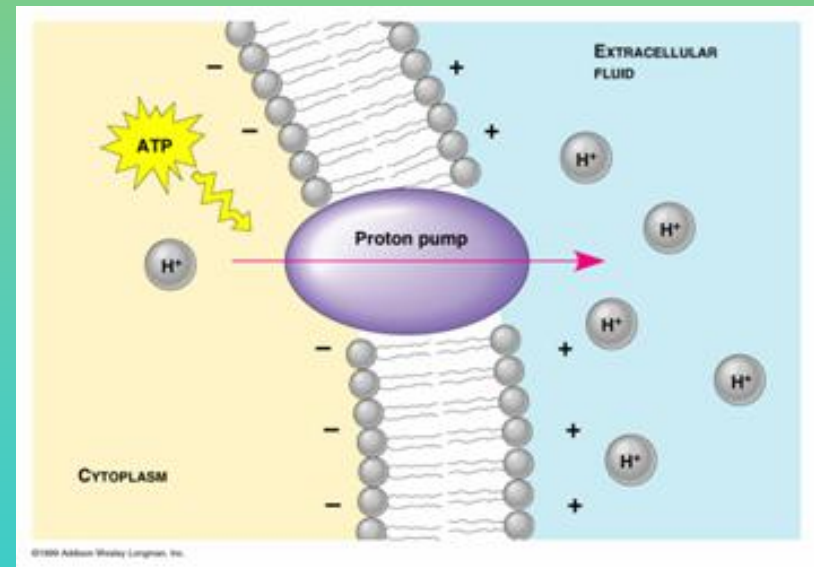
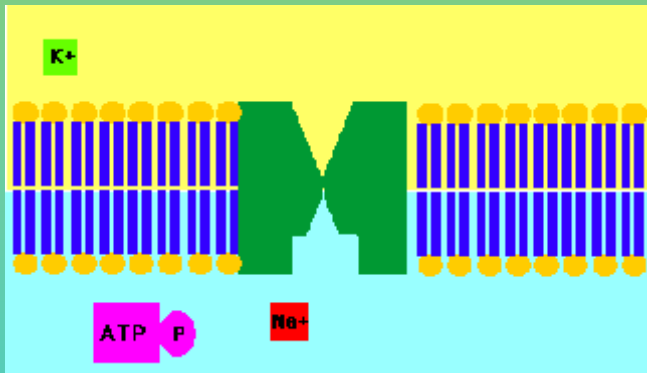
Pohyb vody (červené tečky) polopropustnou membránou do místa s vyšší koncentrací rozpuštěných látek (modré tečky)



# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

- AKTIVNÍ TRANSPORT

Pro aktivní transport je třeba energie (např. ve formě ATP)

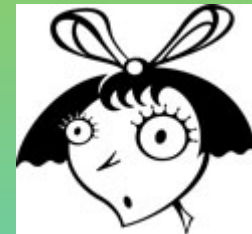
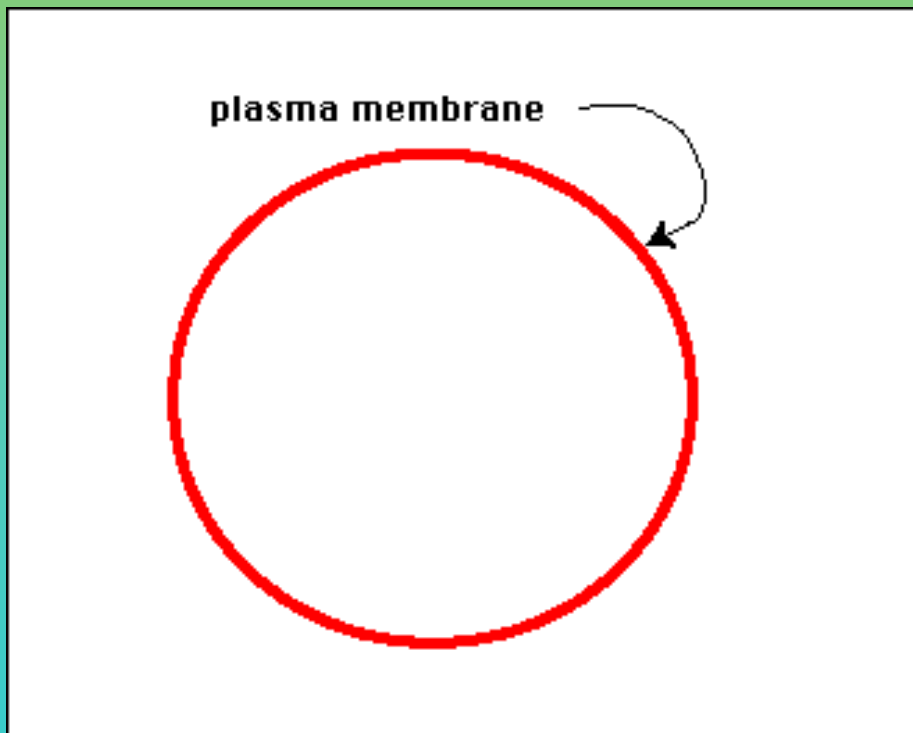




# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

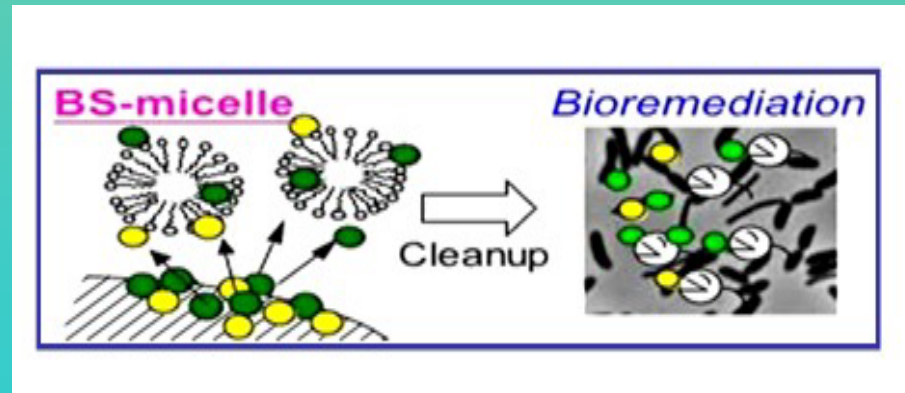
- AKTIVNÍ TRANSPORT - ENDOCYTOSA

Při tomto způsobu transportu vnesená látka neprochází buněčnou membránou

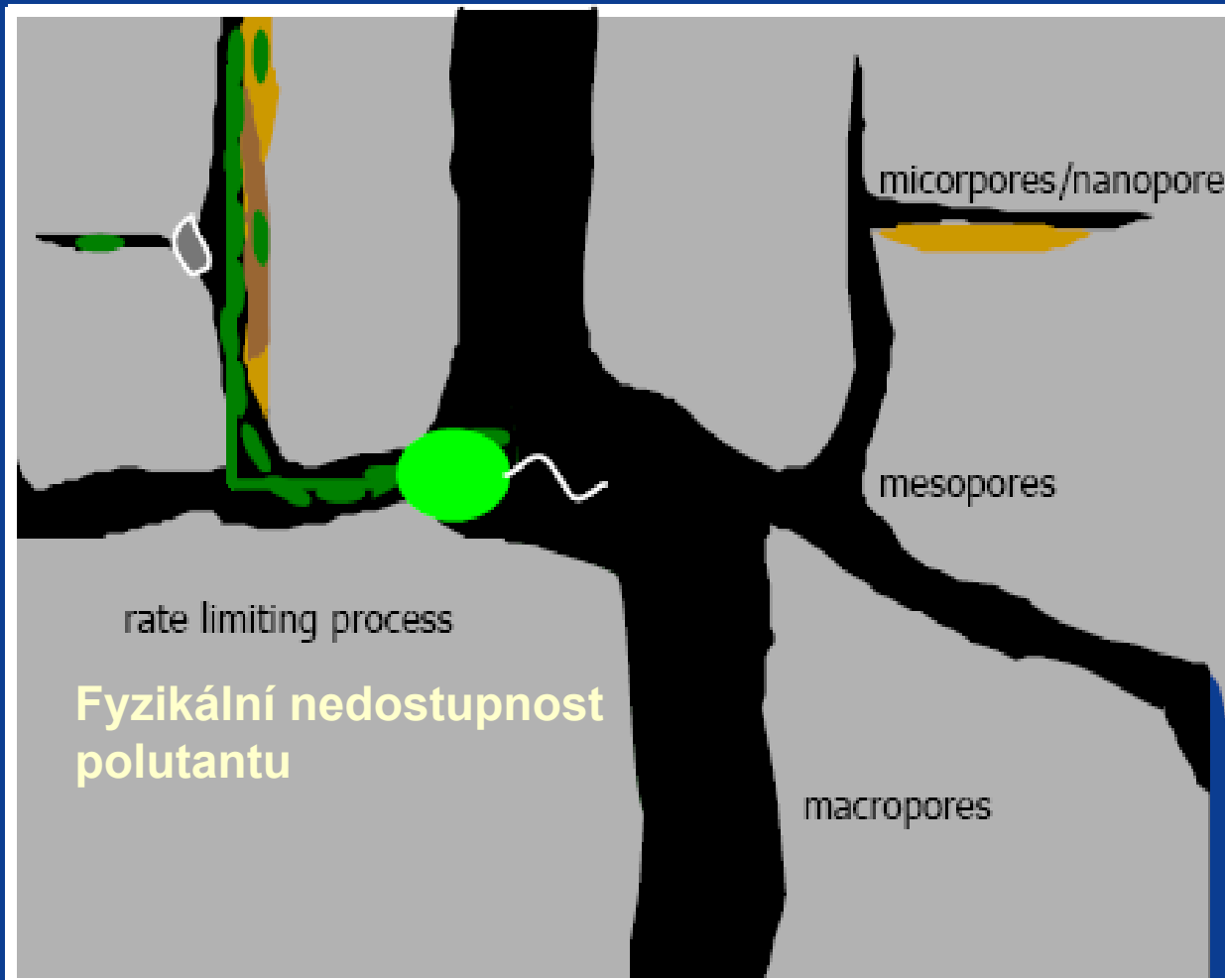


# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)

- Rychlost přenosu hmoty do buňky je z hlediska rychlosti biodegradace určujícím krokem, protože je nejpomalejší.
- U nepolárních sloučenin bakterie podporuje transport tvorbou povrchově aktivních látek (biosurfaktanty), které konjugují s molekulami polutantu a vytvářejí polární konjugovaný komplex, usnadňující přenos do buňky.



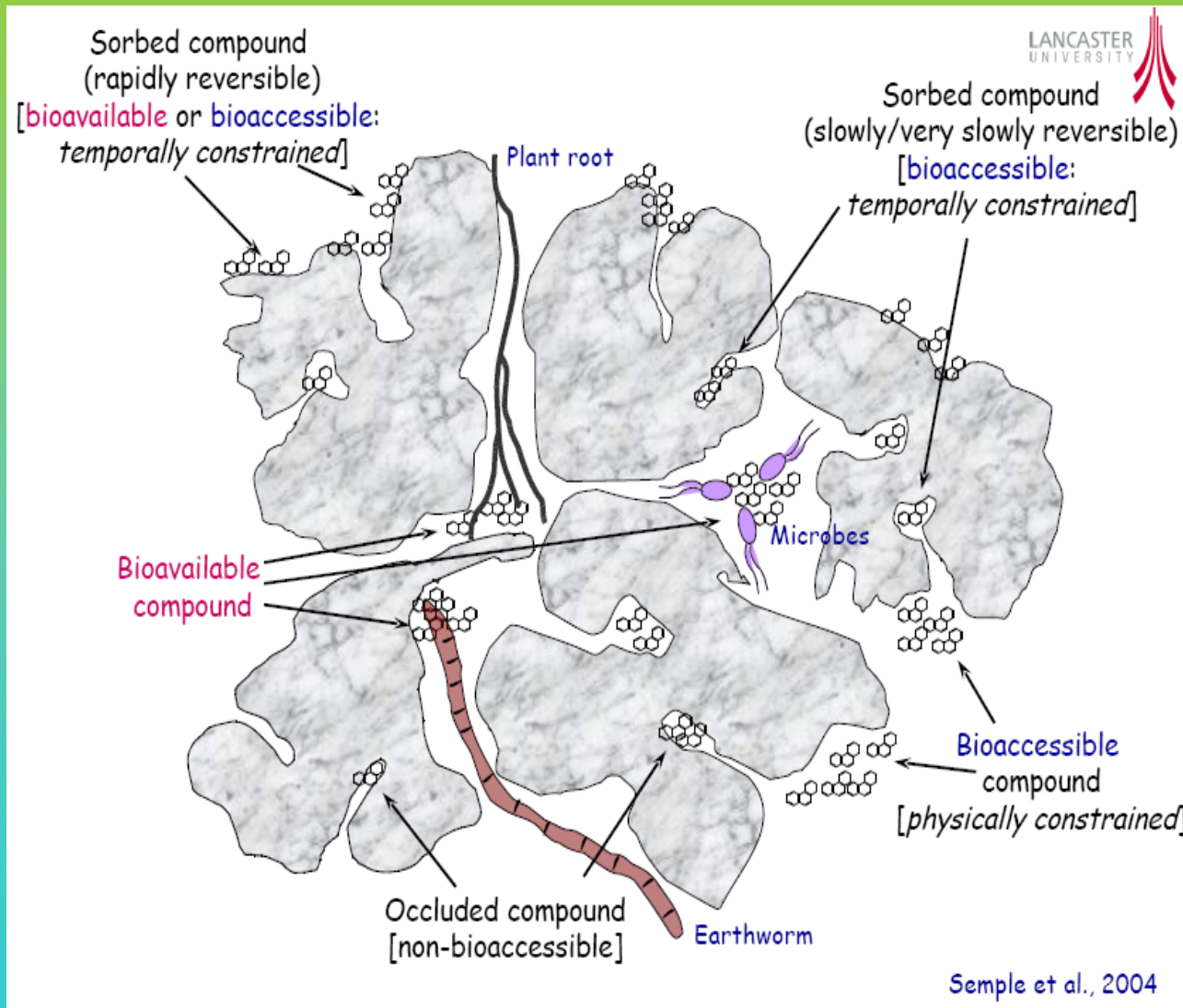
# TRANSPORT DO BUŇKY (PŘENOS HMOTY)



- |              |                   |                     |      |
|--------------|-------------------|---------------------|------|
| soil pores   | mineral particles | oxides, carbonates  | PAHs |
| flexible SOM | condensed SOM     | combustion residues |      |



# BIODOSTUPNOST POLUTANTU

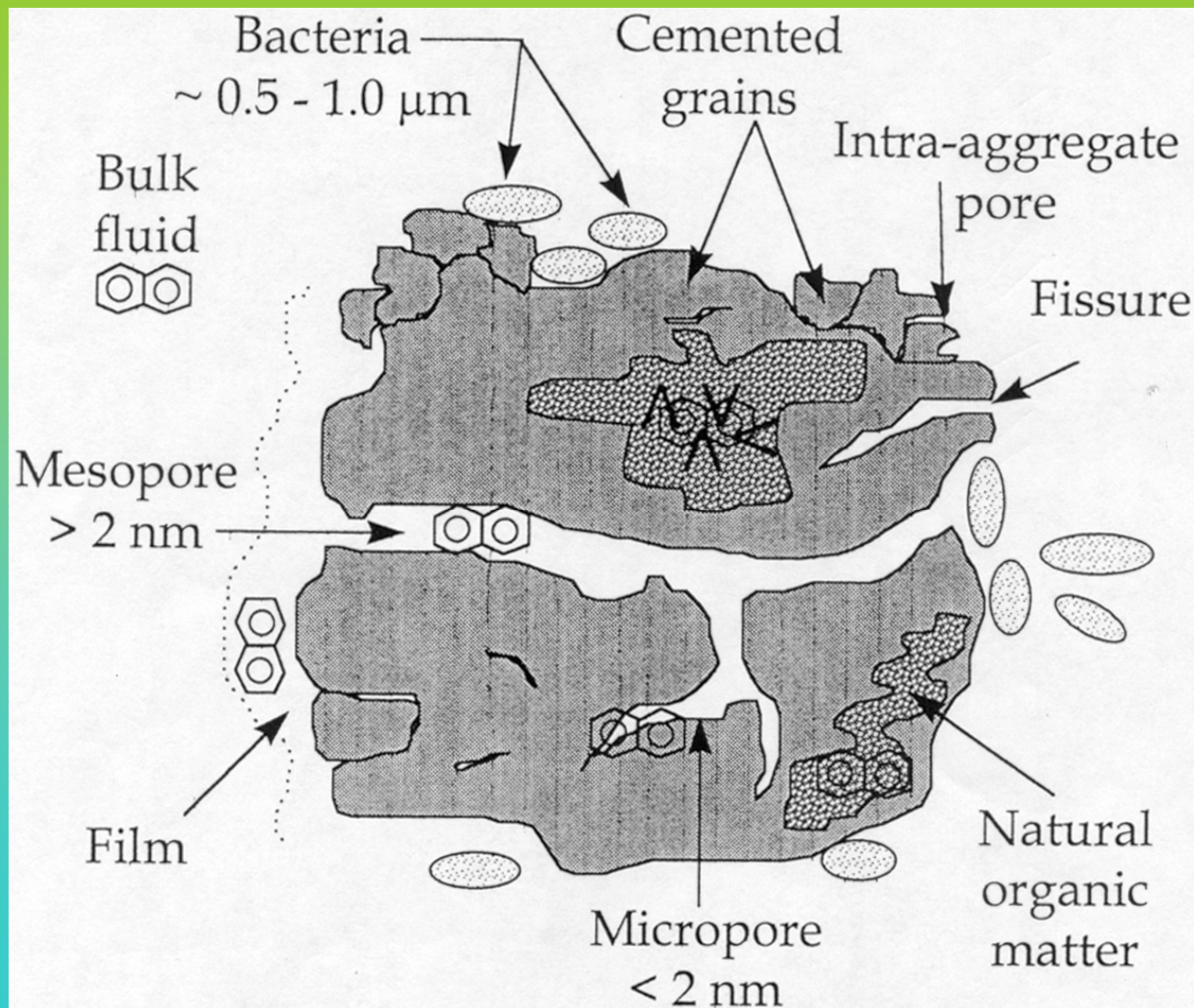


# VĚTRÁNÍ (STARNUTÍ) POLUTANTU

Na stárnutí polutantů a snižování dostupnosti se podílí:

- Sorpce na pevné částice půdy (jíl)
- Sorpce na organické látky v půdě (huminové látky)
- Difúze do mikropórů a makropórů
- Odpar těkavých složek
- Úbytek dobře odbouratelných složek znečištění

# VĚTRÁNÍ (STARNUTÍ) POLUTANTU

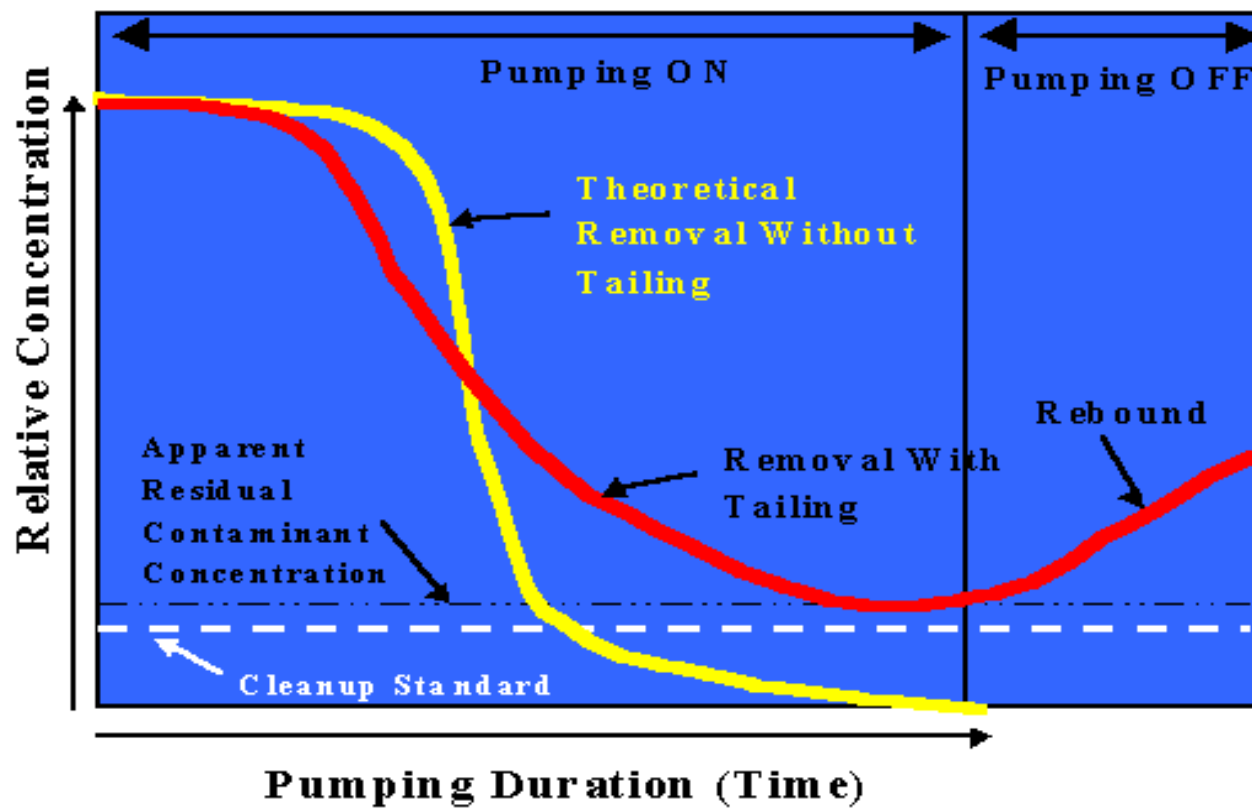


# VĚTRÁNÍ (STARNUTÍ) POLUTANTU

1. v systémech s jedním polutantem: dochází při zvyšování kontaktního času mezi polutantem a půdou ke snižování biologické dostupnosti a odbouratelnosti
2. v systémech s více polutanty přítomnost dalších látek zpomaluje stárnutí a zvyšuje biologickou dostupnost polutantu
3. Sorbované molekuly jsou nejčastěji důvodem „reboundingu“

# REBOUNDDING

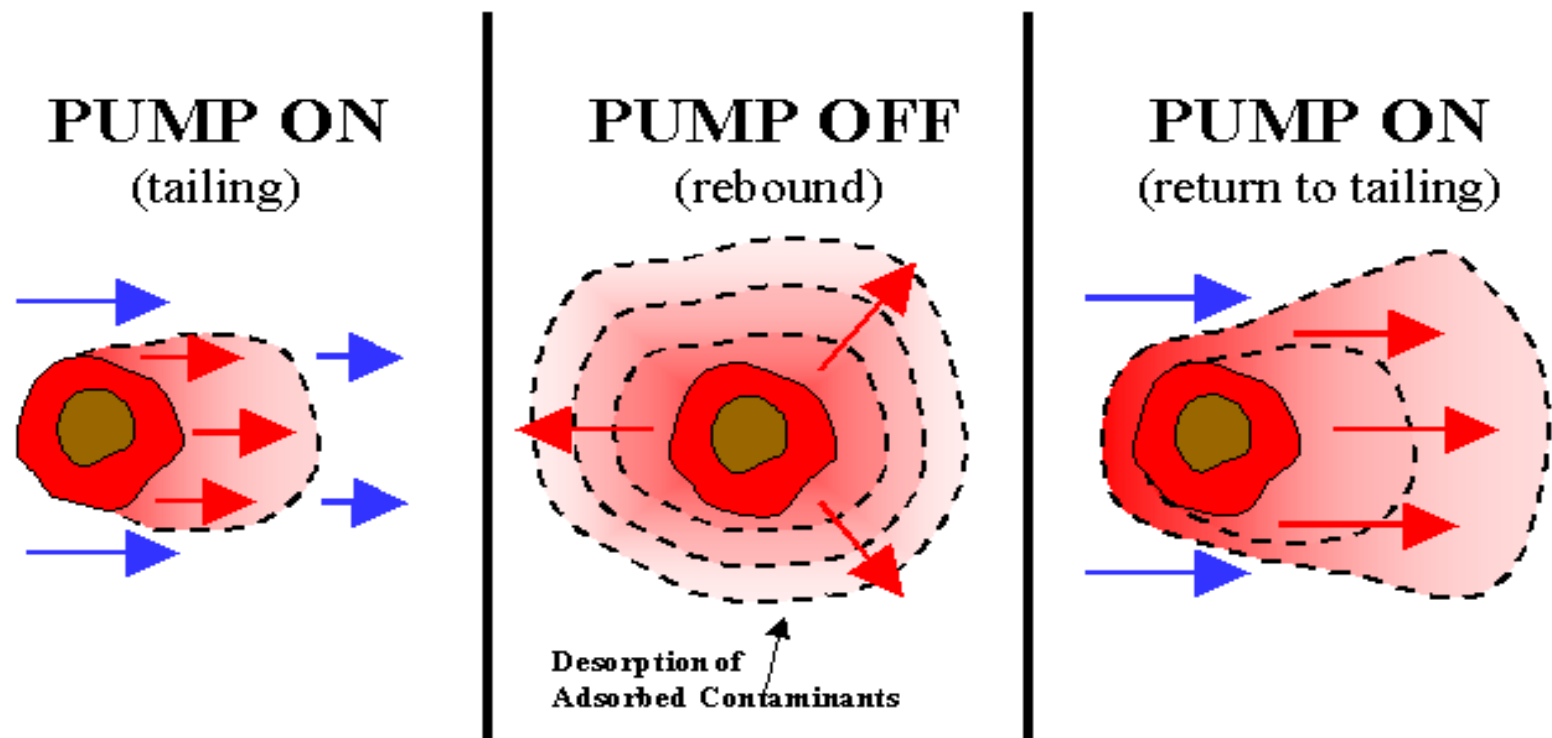
## Tailing and Rebound Effects





# REBOUNING

## Tailing and Rebound Effects



# POLARITA MOLEKULY

Hydrofóbní molekuly:

- silná sorpce na pevné částice horninového prostředí a v organickém podílu
- rozpouštějí se v nepolárních látkách přítomných v prostředí (ropné uhlovodíky)
- transport do buňky je možný pouze pokud jsou rozpuštěné ve vodě

**NEZBYTNÁ PODPORA PŘENOSU HMOTY**

# MAKROSKOPICKÉ PARAMETRY MOLEKULY

Mezi nejčastěji používané makroskopické parametry

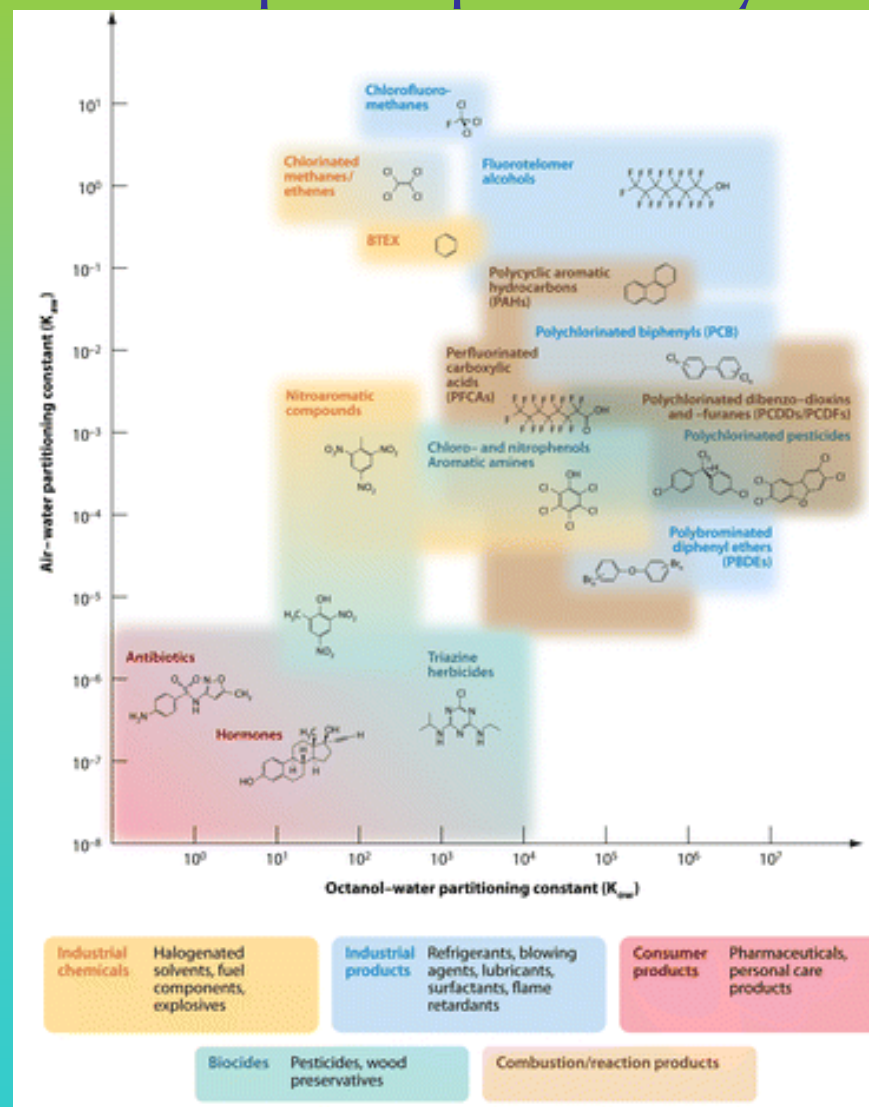
k popisu molekul patří:

- stupeň hydrofobicity
- rozdělovací koeficient polutantu oktanol-voda
- doba zdržení při HPLC

Zvyšování rozdělovacího koeficientu oktanol-voda

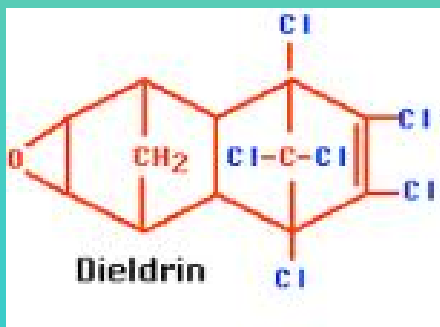
v některých případech vede ke snížování

rychlosti biodegradace



# STRUKTURA MOLEKULY

- Adice halogenového iontu, nitroso skupiny, CN, sulfátu, halogenu či methylu k jednoduchému aromatickému uhlovodíku, mastné kyselině či jiné molekule podstatně zhoršuje biologickou rozložitelnost
- adice hydroxylové, karboxylové či amidické skupiny stimuluje biodegradovatelnost

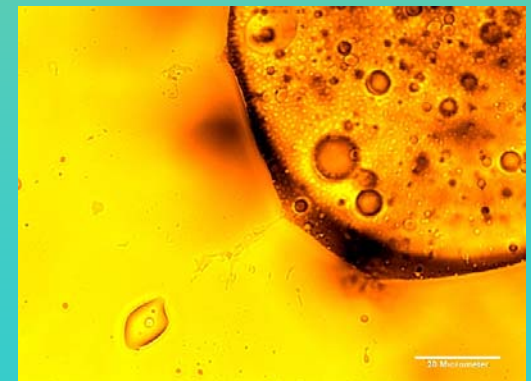


rozložitelnost klesá se stoupající  
alkylací a halogenací původní látky  
**Chybí enzymy pro rozklad**

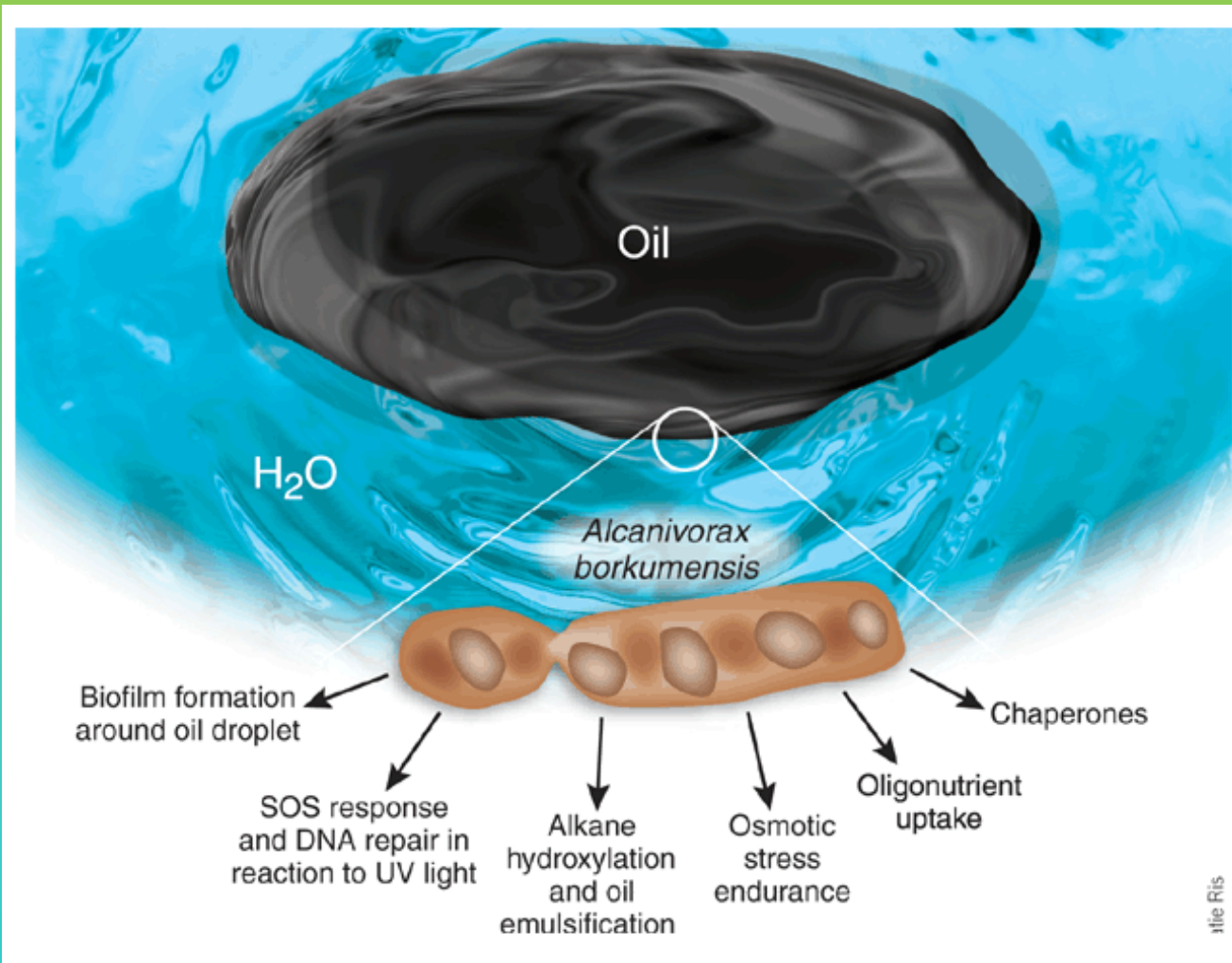
# PODPORA PŘENOSU HMOTY

Vlastnosti bakterií podporující přenos hmoty:

- tvorba biologických povrchově aktivních látek a jejich exkrece do prostředí
- vznik struktur na povrchu buňky, které podporují emulgaci hydrofobních molekul polutantu
- systém příjmu s vysokou afinitou k polutantu
- zvýšená adheze buněk k pevnému nebo kapalnému substrátu



# BIOFILM



# BIODEGRADOVATELNOST POLUTANTŮ

- Podle biologické rozložitelnosti lze polutanty seřadit podle snižující se biologické rozložitelnosti: jednoduché alifatické uhlovodíky, paliva > monoaromatické uhlovodíky > alkoholy, estery > nitrobenzeny, ethery > chlorované uhlovodíky > polycyklické aromatické uhlovodíky > pesticidy.

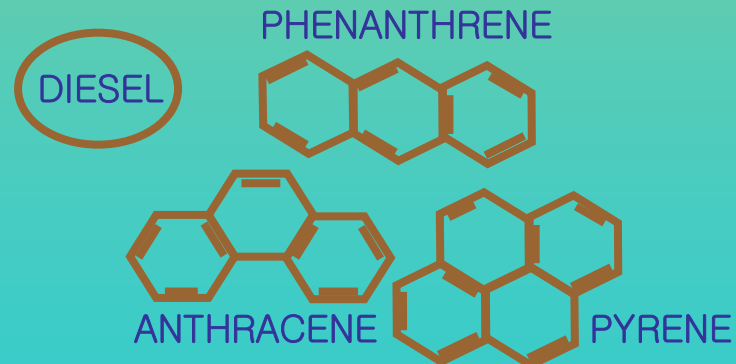
## *n*-Alkany:

- Nejsnáze molekuly C<sub>10</sub> až C<sub>16</sub>
- C<sub>1</sub> až C<sub>4</sub> jsou plynné, rozkládají je jen vysoce specializované bakterie
- C<sub>5</sub> až C<sub>9</sub> jsou pro většinu mikroorganismů toxické

# PODPORA PŘENOSU HMOTY

Zpřístupnění molekul polutantů pro buňky:

- Přídavkem neionogenní povrchově aktivní látky (NPAL)
- Částečná chemická oxidace





# PODPORA PŘENOSU HMOTY

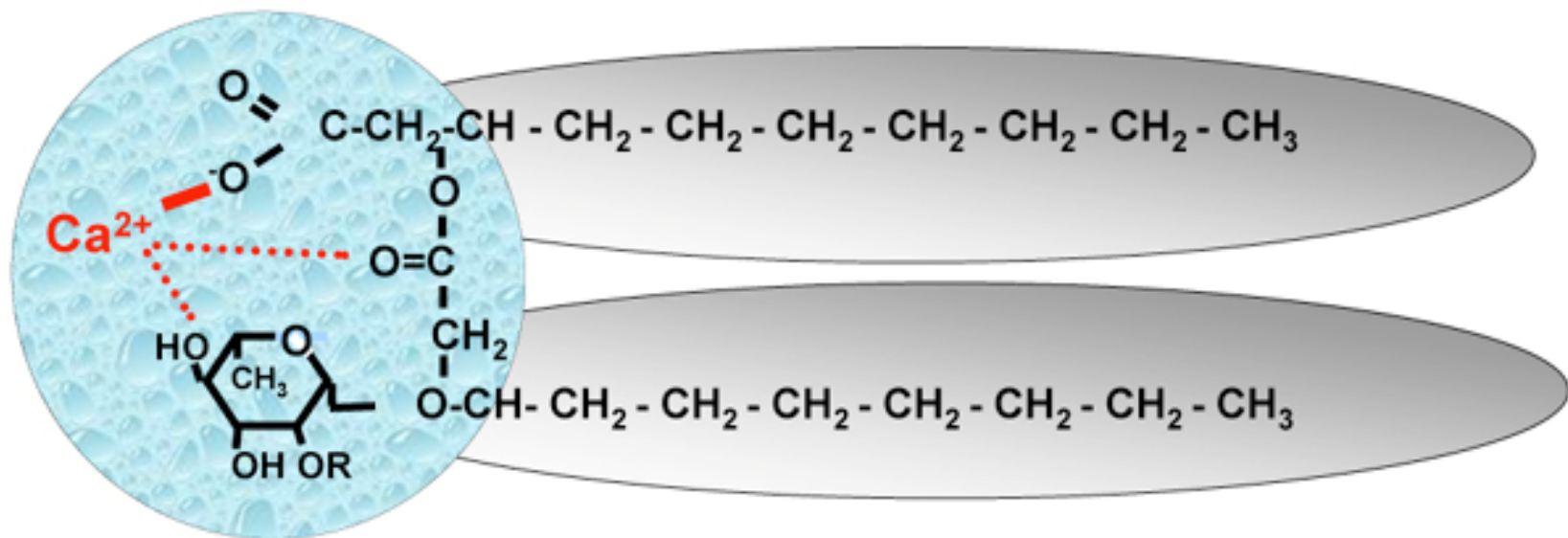
- Ohřev horninového prostředí (odporové ohřívání, vhánění páry.....)



- Uvolnění sorpčních vazeb molekul polutantů ultrazvukem
- Podpora tvorby biosurfaktantů

# PODPORA PŘENOSU HMOTY – TVORBA BIOSURFAKTANTŮ

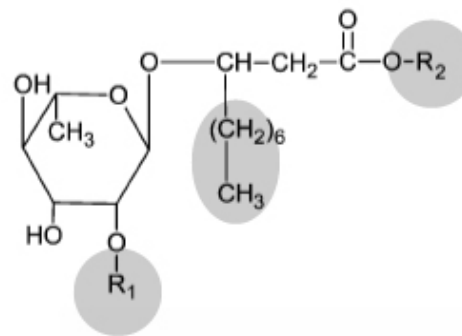
The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* produces a nontoxic, degradable biosurfactant (detergent) called rhamnolipid



Courtesy Raina M. Maier

# BIOSURFAKTANTY

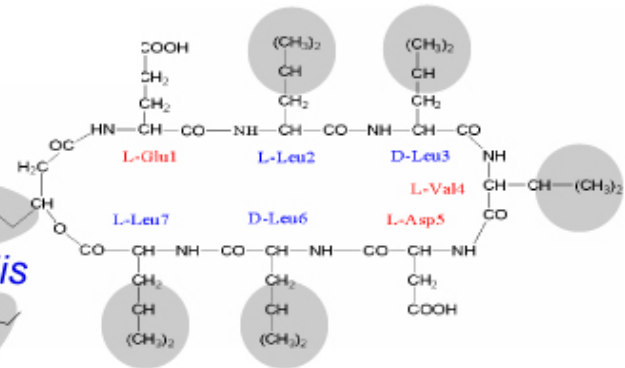
**Glycolipids**  
rhamnolipids,  
sophorolipids,  
trehalolipids



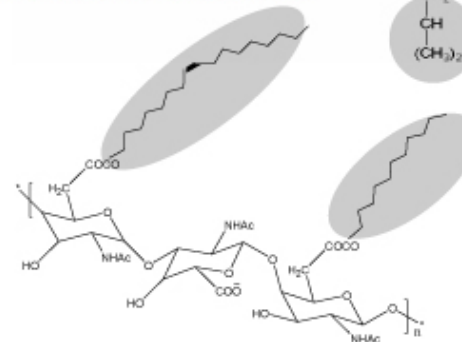
rhamnolipid  
from *Pseudomonas* sp.

**Lipopeptides**  
surfactin,  
iturin,  
fengycin

surfactin  
from *Bacillus subtilis*



**Polymeric surfactants**



bioemulsan  
from *Acinobacter* sp.

Other surface active biomolecules in natural and man-made use, especially in food products

**Phospholipids**

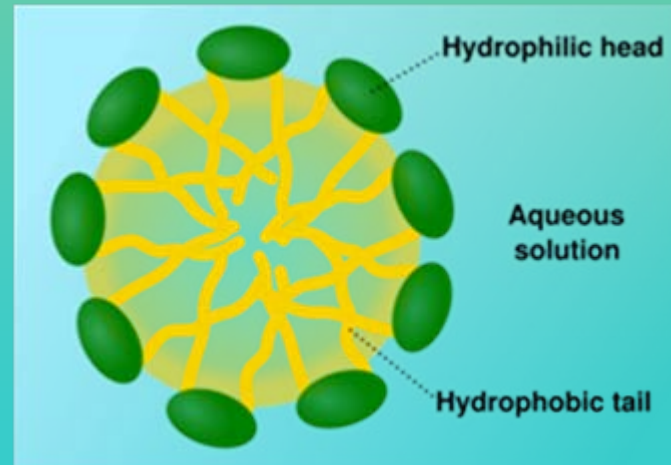
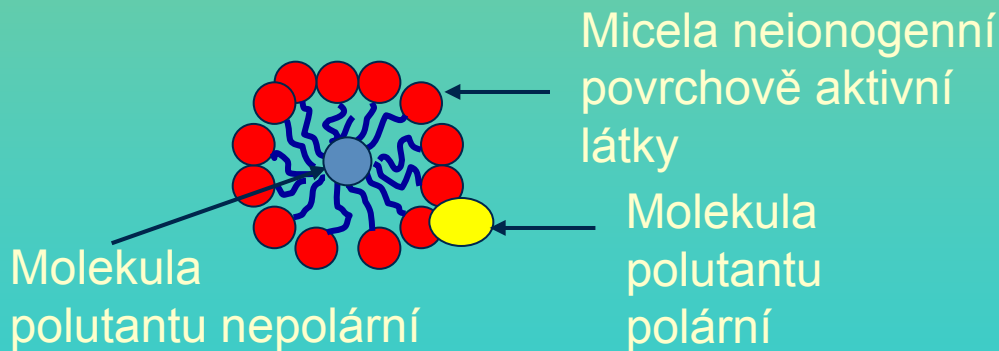
e.g. lecithin

**Proteins**

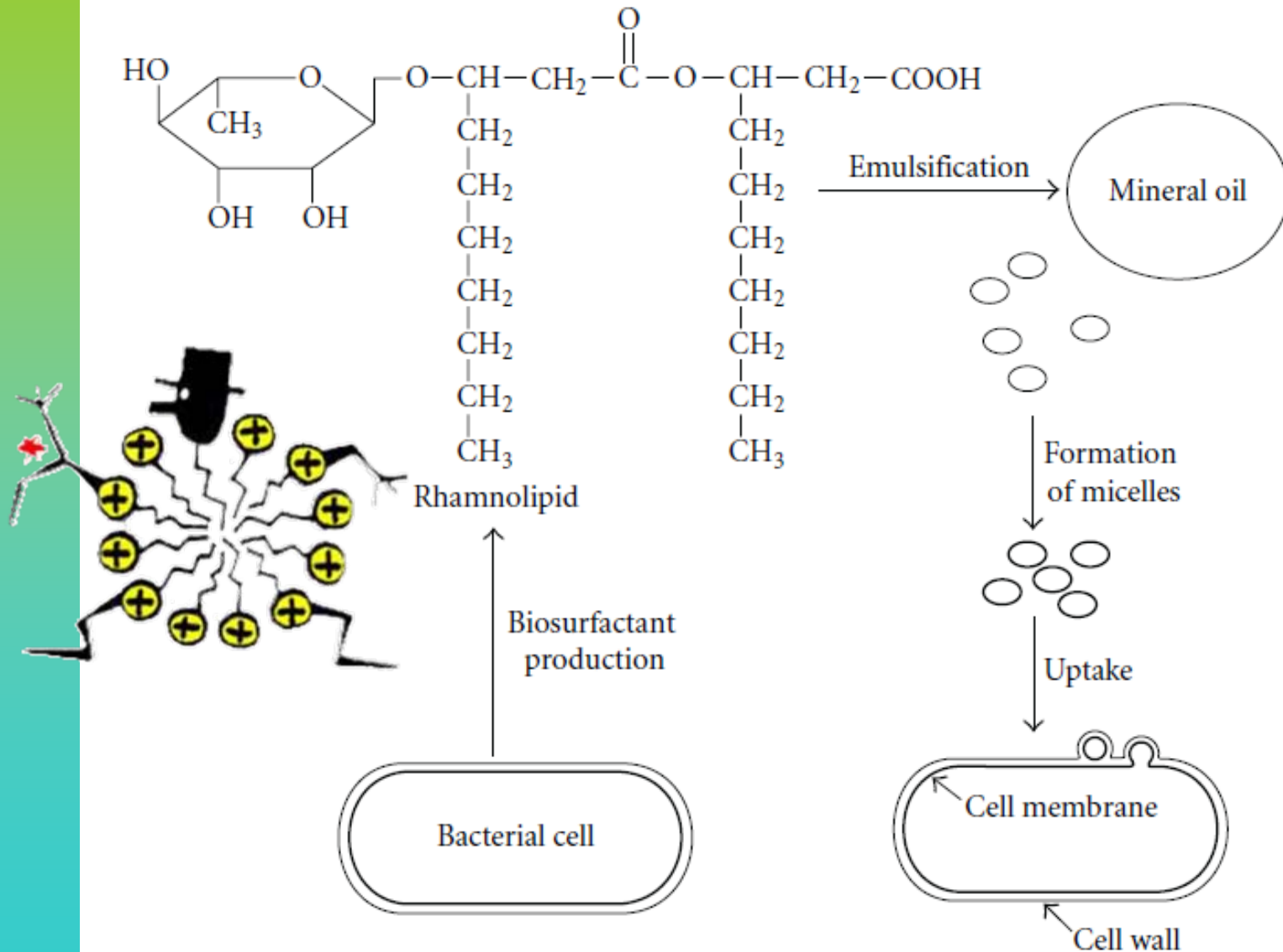
e.g. b-casein

# BIOSURFAKTANTY

- Všechny bakterie, které jsou schopné využívat nepolární substráty, mají schopnost biosurfaktant vytvářet a uvolňovat do prostředí
- Bez biosurfaktantu by nebyly schopné dopravit substrát do buňky



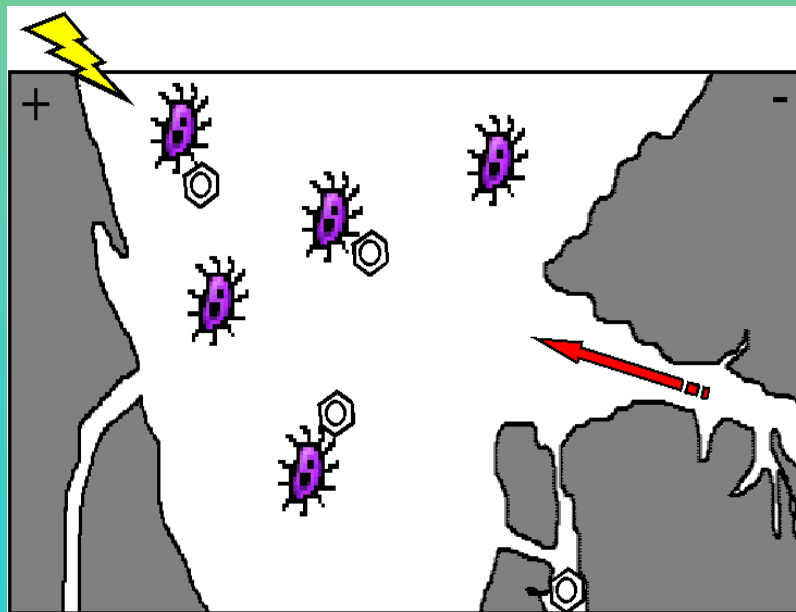
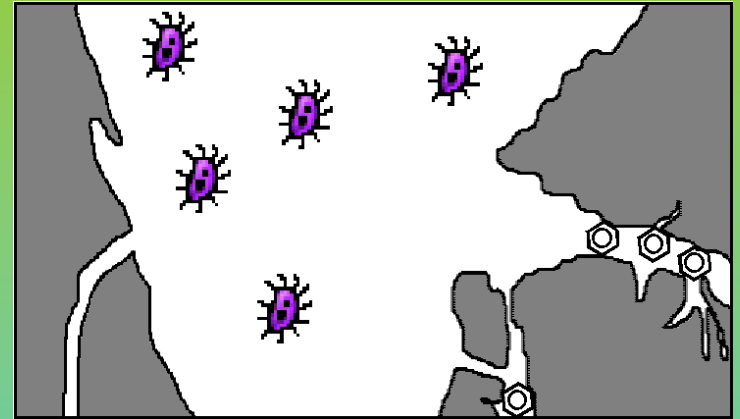
# BIOSURFAKTANTY



# OMEZUJÍCÍ FAKTORY PRO BIODEGRADACI

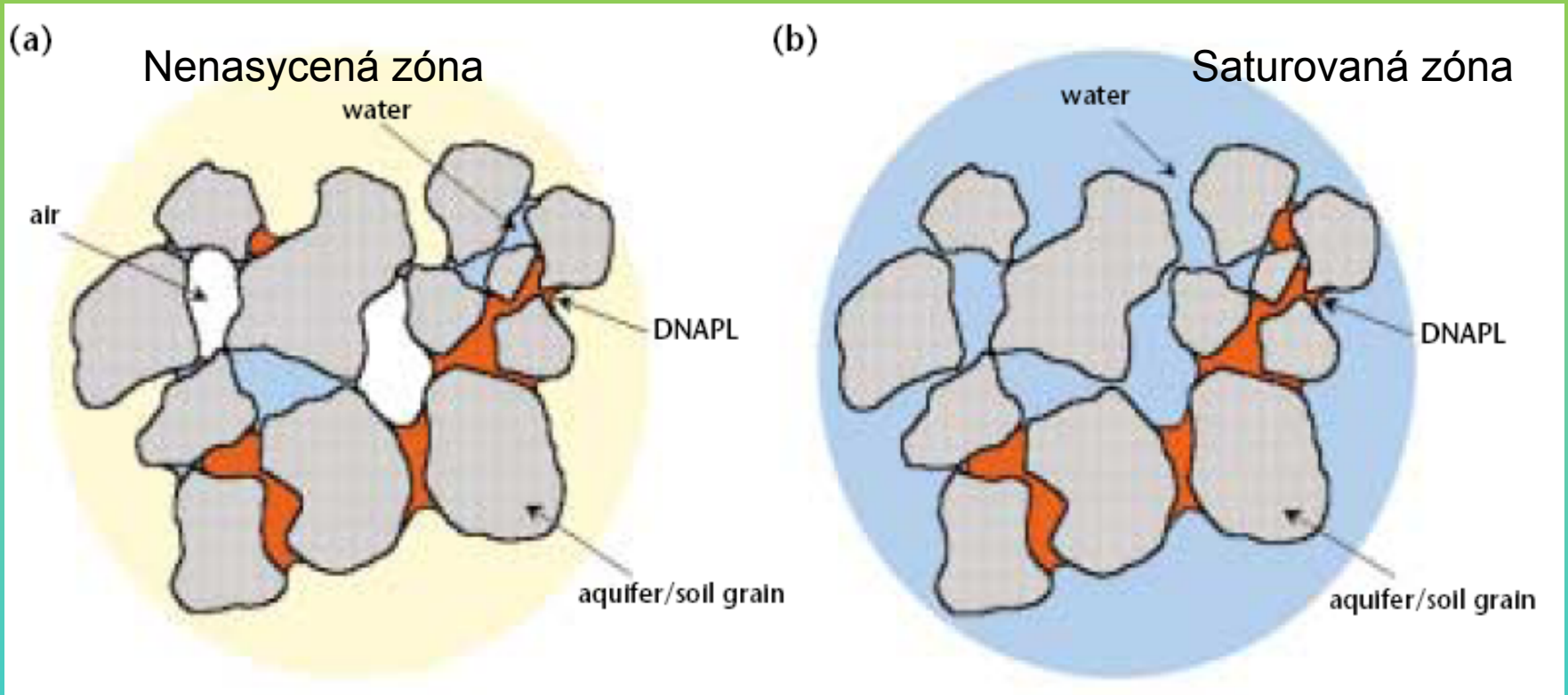
- Přenos hmoty do buňky
- Dostupnost molekul polutantu pro mikroorganismy (sorpce, rozpustnost)
- Enzymatický aparát mikroorganismů
- Tvorba toxických metabolitů
- Inhibiční podmínky v prostředí (toxicita polutantů, pH, teplota, nedostatek vlhkosti, nedostatek finálních akceptorů elektronů, limitace makro a mikrobiotickými prvky .....
- Neschopnost odbourávat některé polutanty vedle sebe (např. toluen a chlorbenzen)

# PODPORA VYMYTÍM



Vymytí povrchově  
aktivní látkou

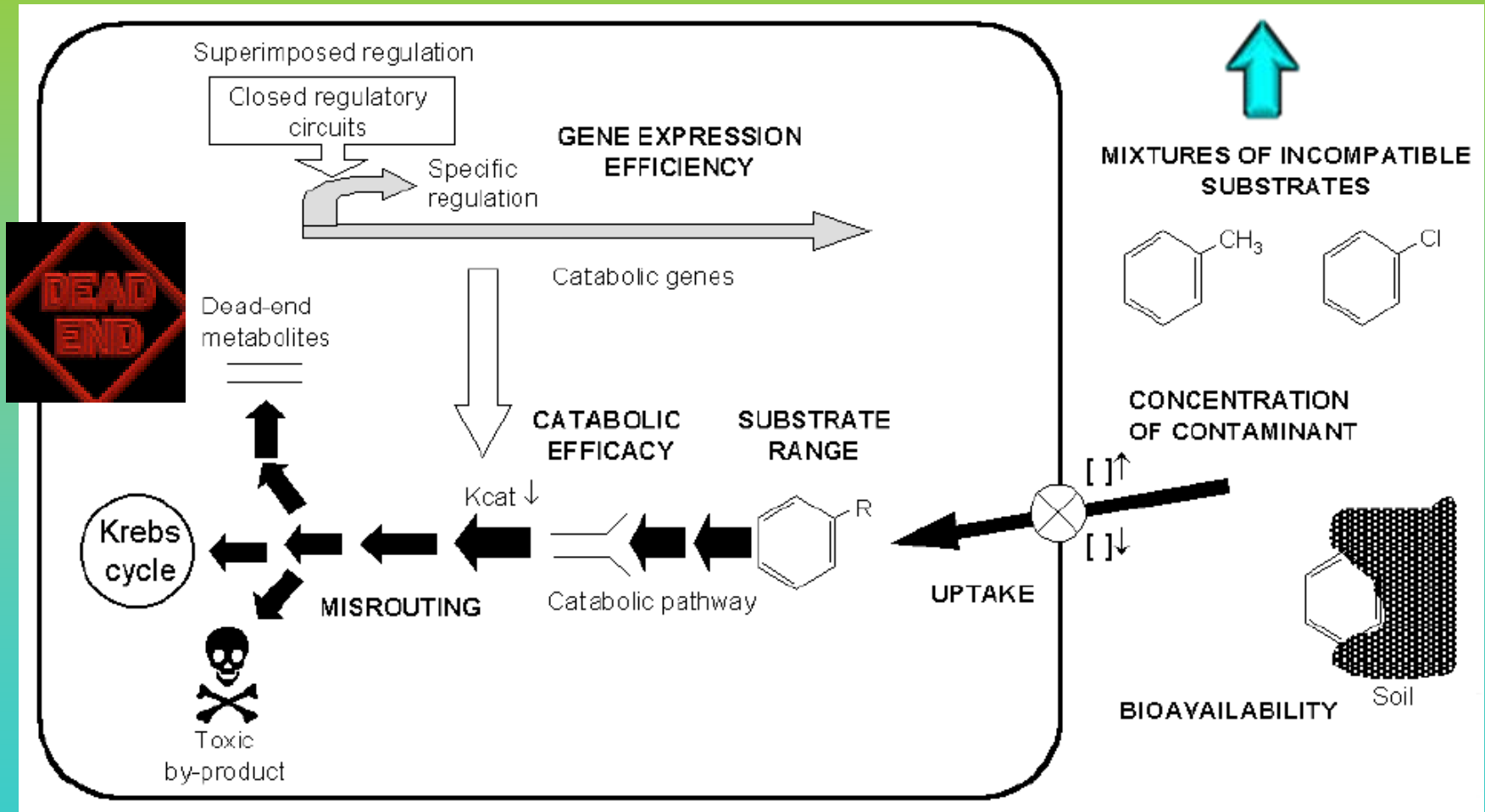
# ROZDĚLENÍ ZBYTKOVÉHO ZNEČIŠTĚNÍ



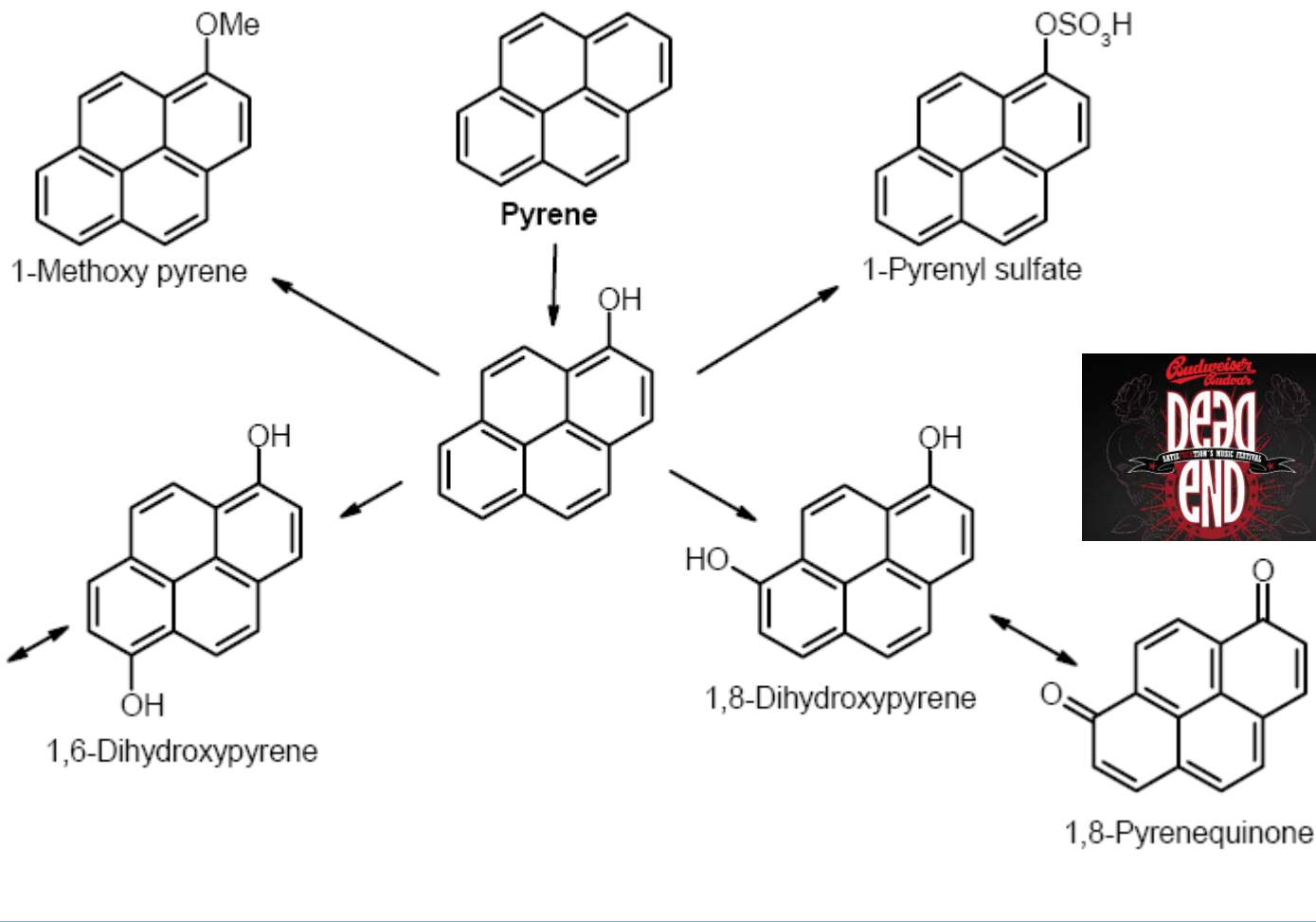


# SOUHRN OMEZUJÍCÍCH FAKTORŮ

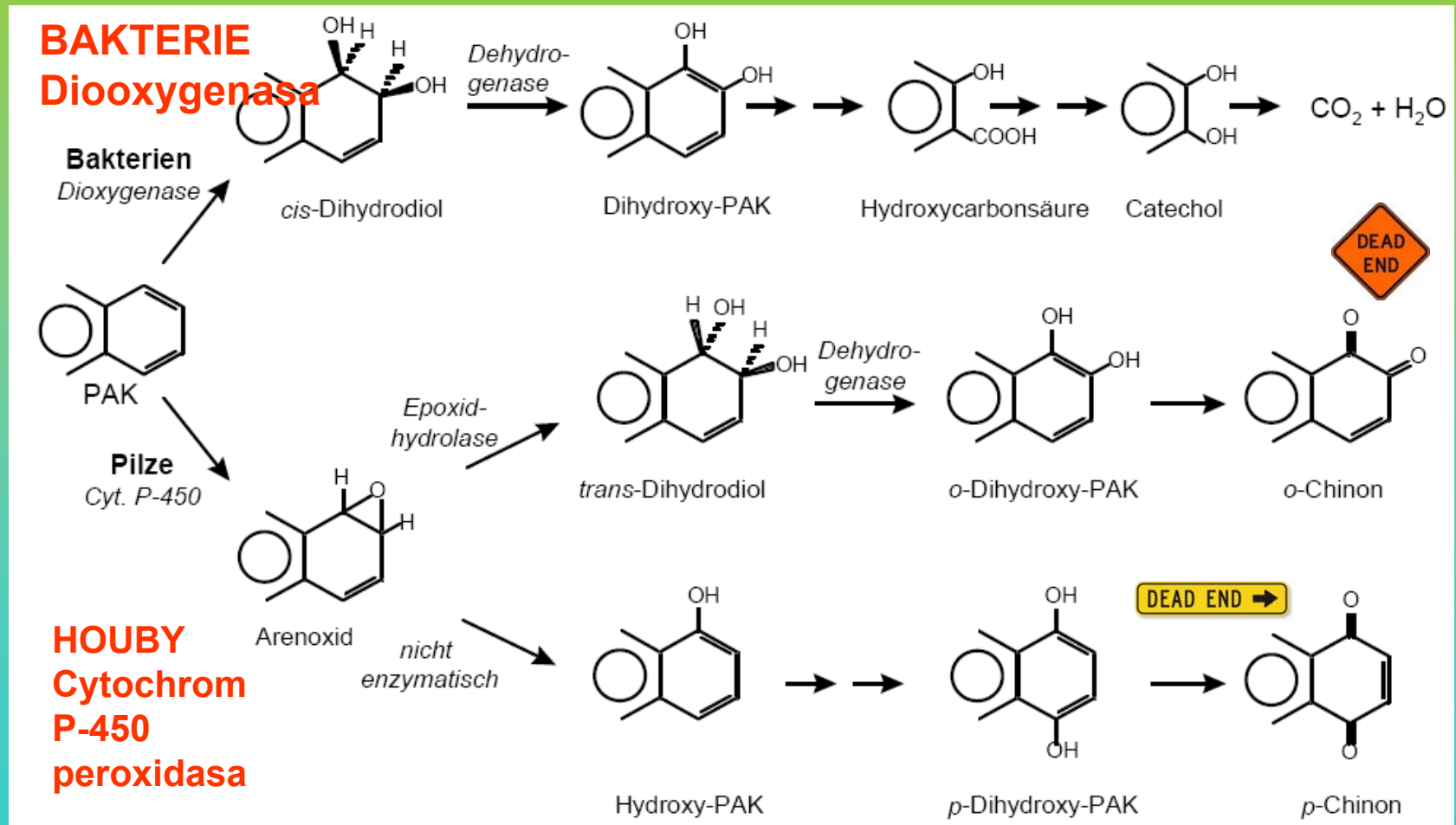
Galaktosa a glukosa  
pro *E. coli*



# DEAD-END PRODUKTY PYRENU - HOUBY



# ODBOURÁVÁNÍ POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



# DŮSLEDKY TVORBY DEAD-END PRODUKTŮ



## 1. **PROBLÉM**

- Stanovení PAU po extrakci nepolárními rozpouštědly
- Biotransformační produkty jsou polární – nestanoví se, nastává pokles koncentrace PAU - HURÁÁÁÁ !!!
- Skutečnost

Biotransformační produkty a dead-end produkty jsou ve vodě mnohem rozpustnější a tedy mobilnější, jsou však často i toxičtější než původní PAU, takže zemina se sníženou koncentrací PAU po biodegradaci je z hlediska životního prostředí mnohem škodlivější, má podstatně vyšší ekotoxicitu a genotoxicitu

# DŮSLEDKY TVORBY DEAD-END PRODUKTŮ

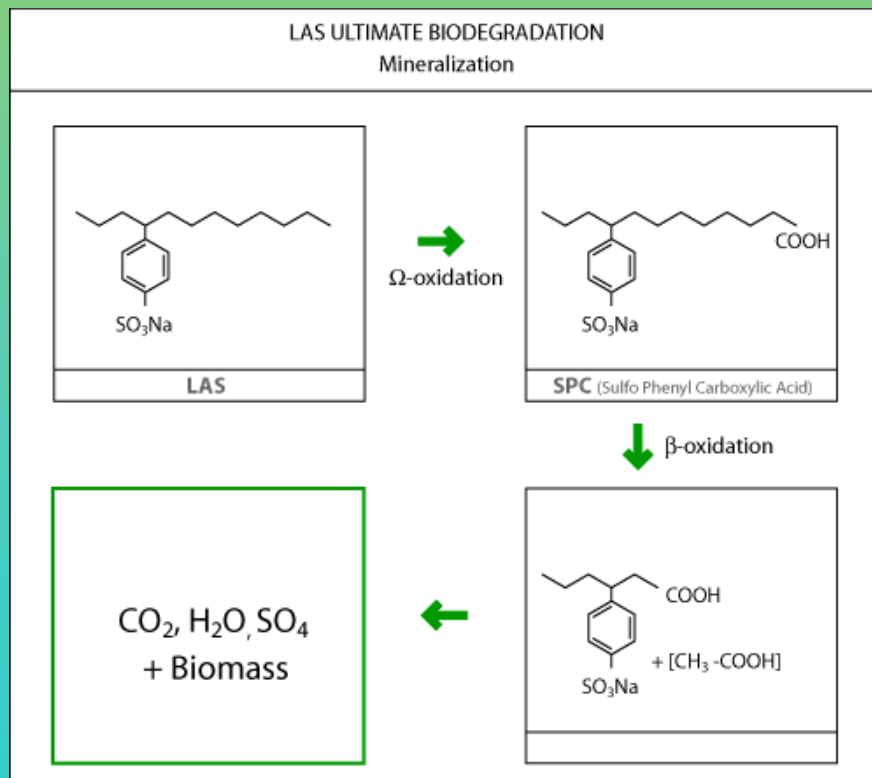


## 2. PROBLÉM

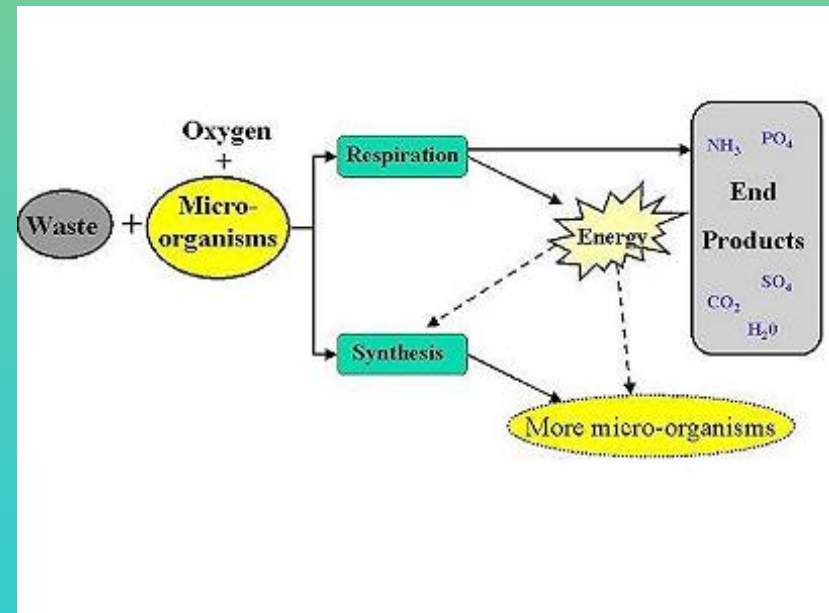
- Heterocyklické sloučeniny podléhají rovněž biotransformaci – vznikají toxičtější produkty
- Pentachlorfenol tvoří v technické směsi jen 30 až 35 %, jsou tedy přítomny další kongenery – ale ty se nesledují (analyticky)
- Vedlejší produkt z chlorace fenolu – polychlorované dioxiny!!!!

# BIOTRANSFORMACE MÍSTO BIODEGRADACE

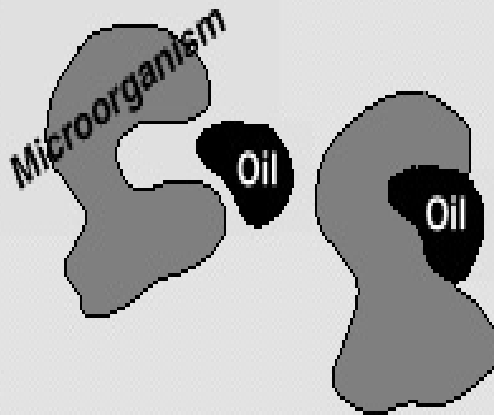
- Často se stává, že rozklad polutantu není totální (nenastává mineralizace)



Lineární  
alkylsulfonáty



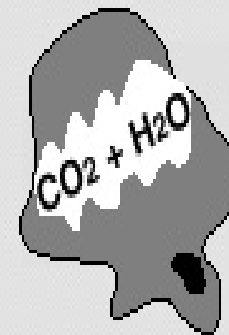
# BIOTRANSFORMACE MÍSTO BIODEGRADACE



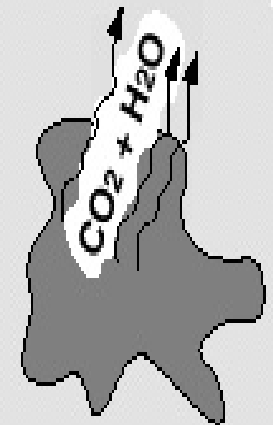
Microorganisms eat oil  
or other organic  
contaminant



Microorganisms digest oil and  
convert it to carbon dioxide (CO<sub>2</sub>)  
and water (H<sub>2</sub>O)



Microorganisms  
give off CO<sub>2</sub> and  
H<sub>2</sub>O

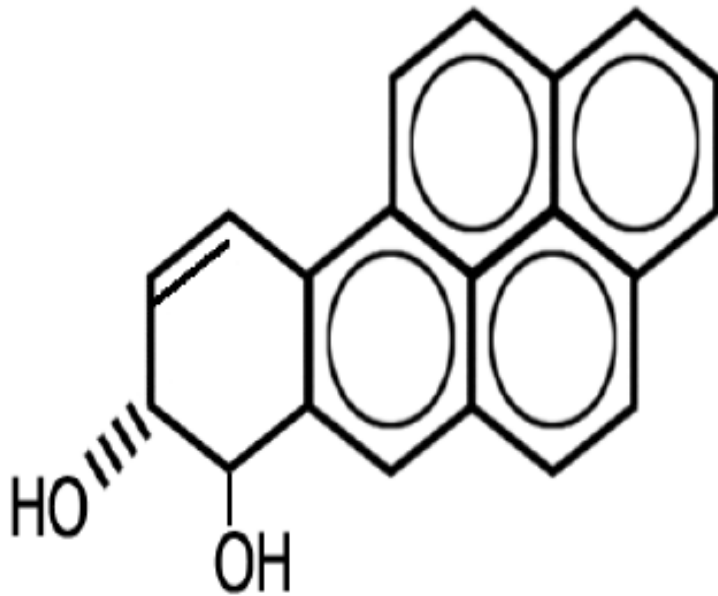


# BIOTRANSFORMACE MÍSTO BIODEGRADACE

- Nedochozí k rozkladu až na  $H_2O$ ,  $CO_2$ , k tvorbě biomasy a energie.
- Dochází jen k biotransformaci molekul polutantu na nové sloučeniny, které jsou buď dead-end produkty, nebo nemohou být dále rozkládány vzhledem k podmínkám v prostředí
- Tyto meziprodukty mohou mít mnohem nepříznivější vlastnosti pro životní prostředí než původní polutanty

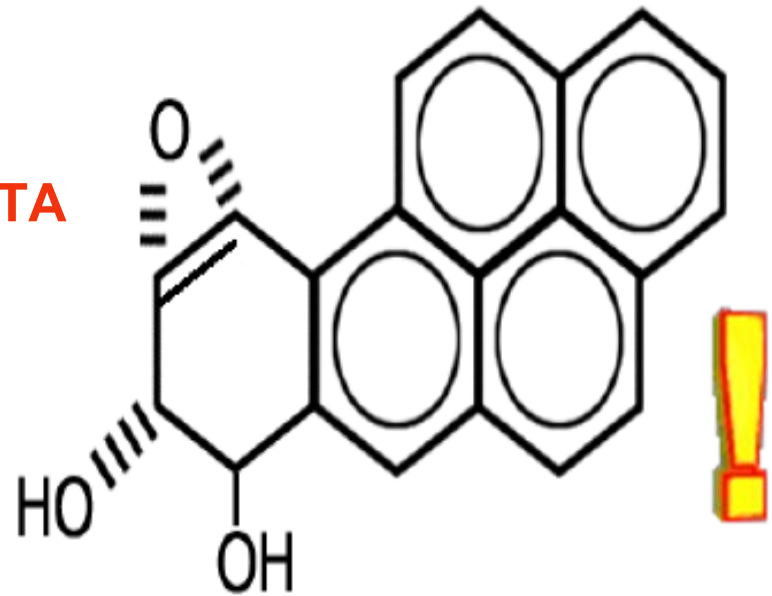


# BIOTRANSFORMACE MÍSTO BIODEGRADACE



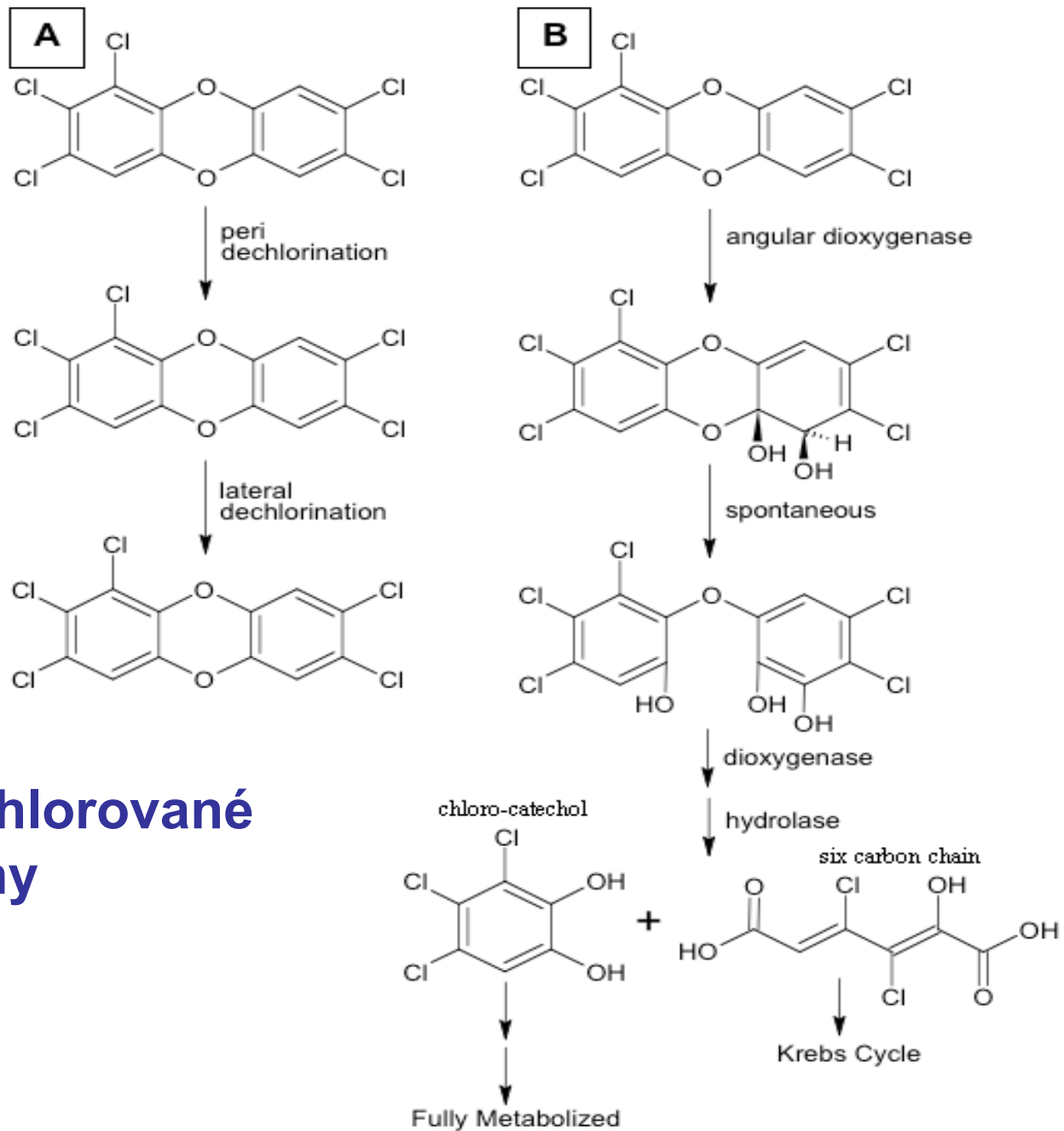
*Benzo[a]pyrene  
7,8-dihydrodiol*

TOXICITA



*Benzo[a]pyrene 7,8-  
dihydrodiol-9,10-epoxide*

# Polychlorované dioxiny



# BIOTRANSFORMACE MÍSTO BIODEGRADACE

Biotransformace může způsobit:

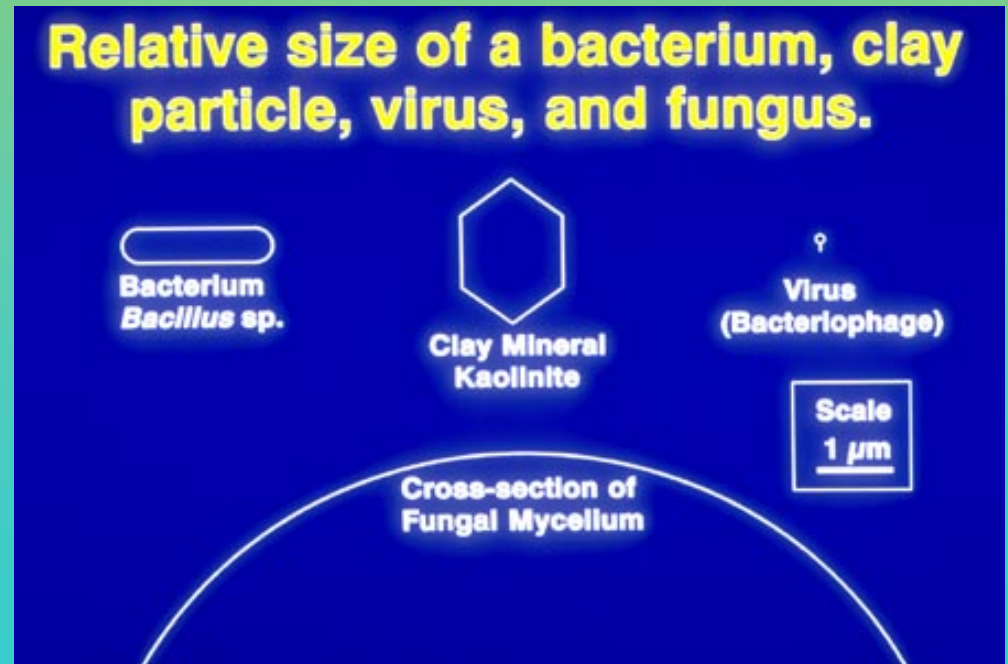
1. Vyšší toxicitu
2. Endokrinní disrupci
3. Mutagenitu
4. Další negativní vlastnosti podle druhu vzniklého metabolitu
5. Zvýšit polaritu a mobilitu v horninovém prostředí

# MIKROORGANISMY

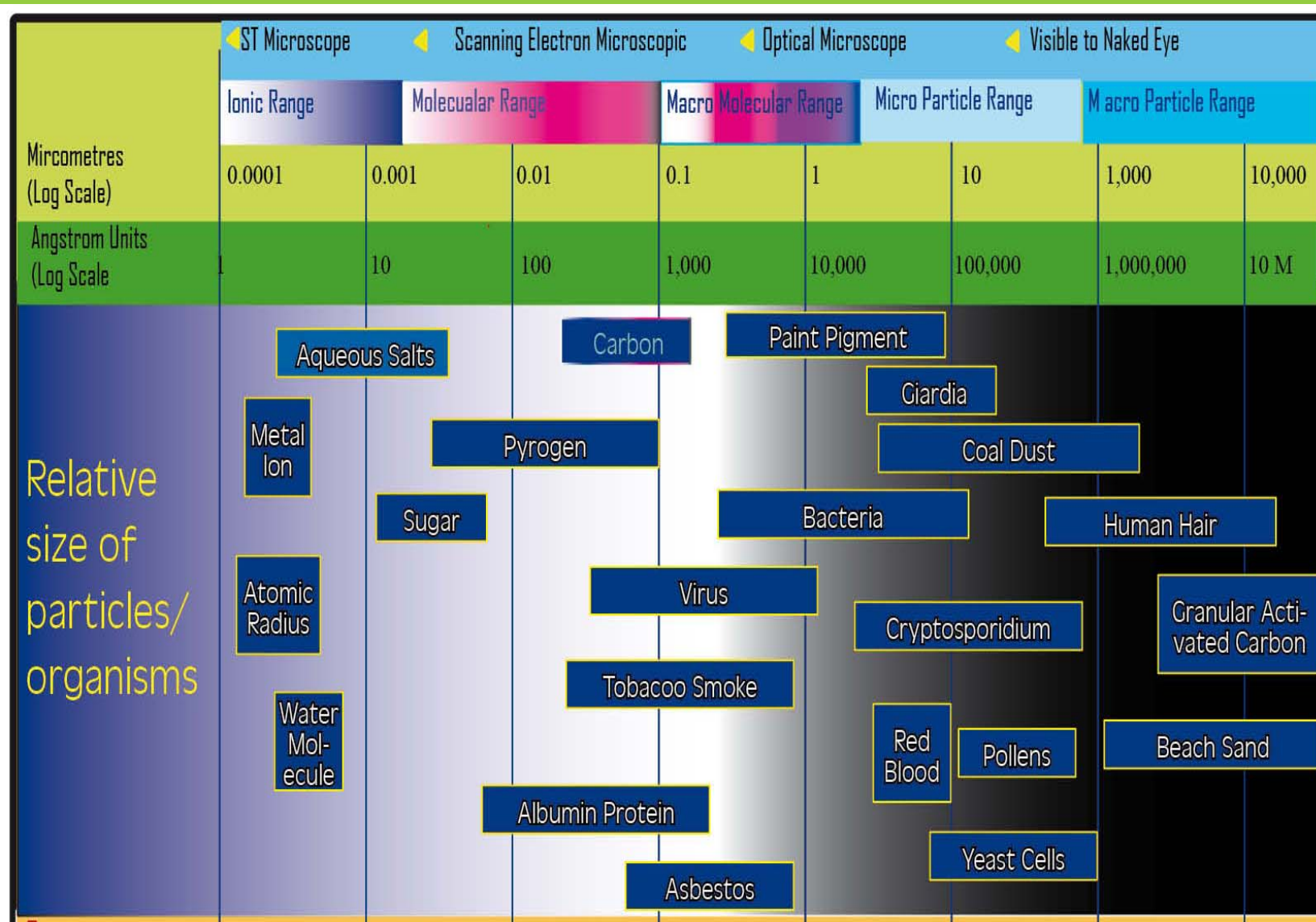


# MIKROORGANISMY

- Bakterie
- Kvasinky
- Dřevokazné houby
- Plísně
- Cyanobakterie

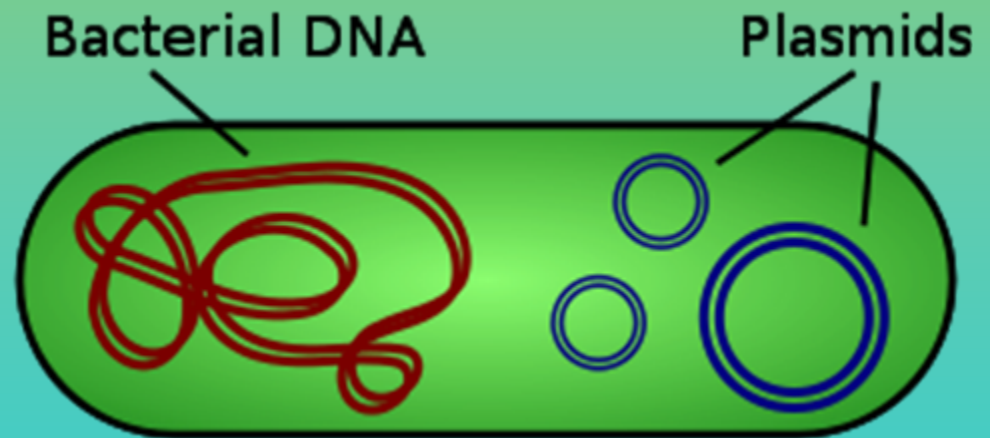
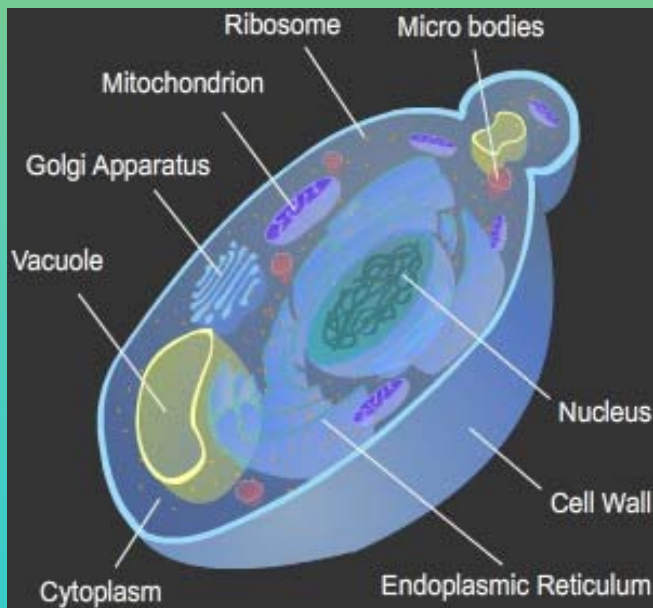


# VELIKOST MIKROORGANISMŮ



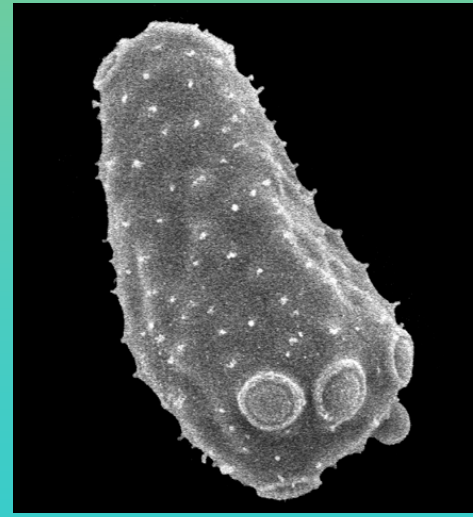
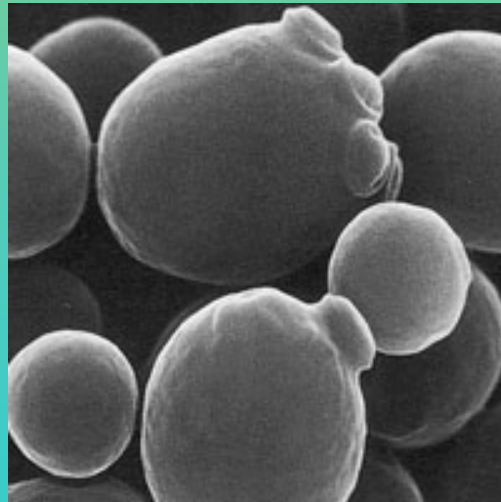
# MIKROORGANISMY

- Bakterie – prokaryontní
- Kvasinky, nižší houby, řasy – eukaryontní



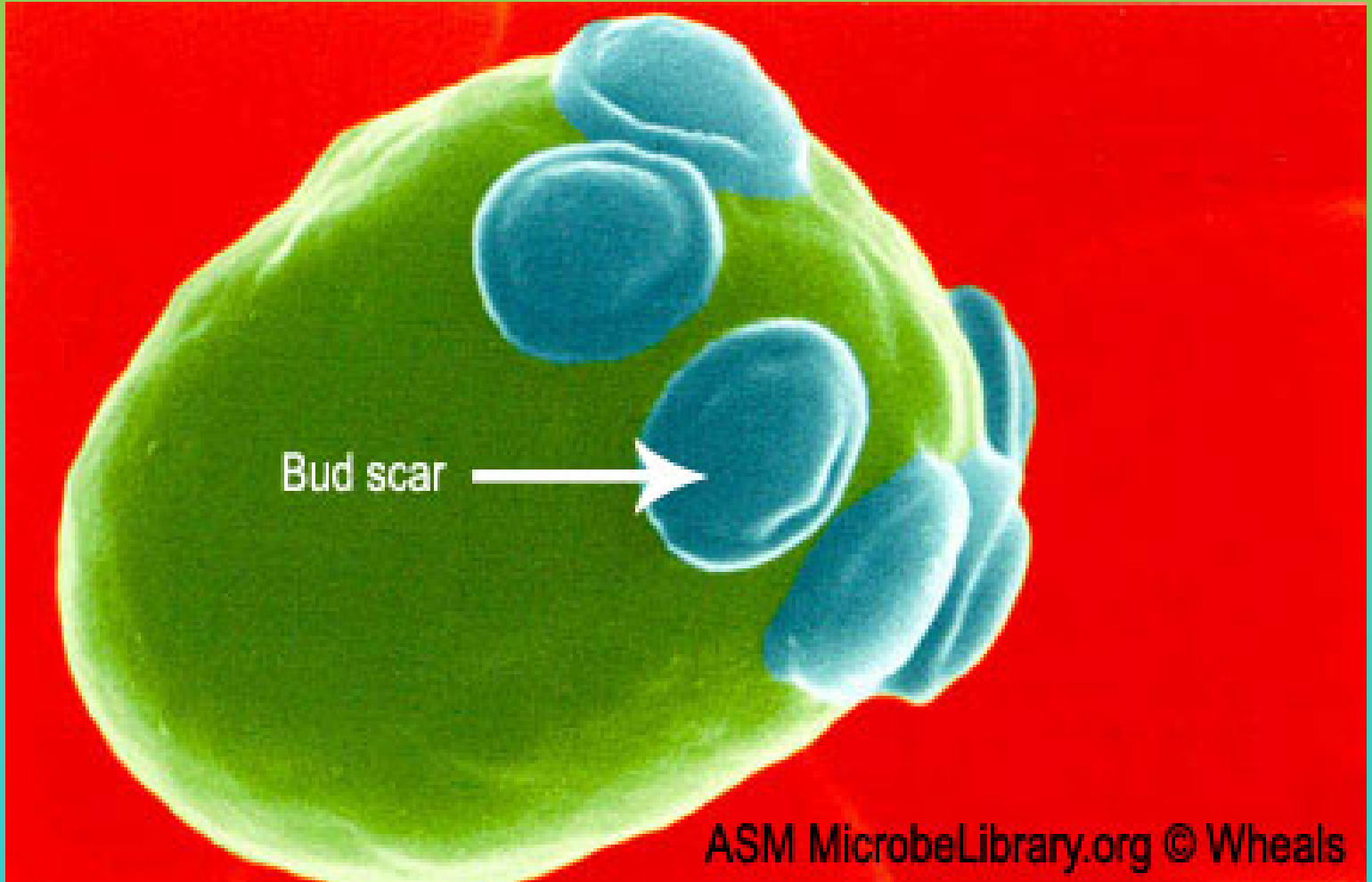
# MIKROORGANISMY

- Kvasinky – prakticky se využívají v jediné aplikaci a to při čištění odpadních vod obsahujících fenoly



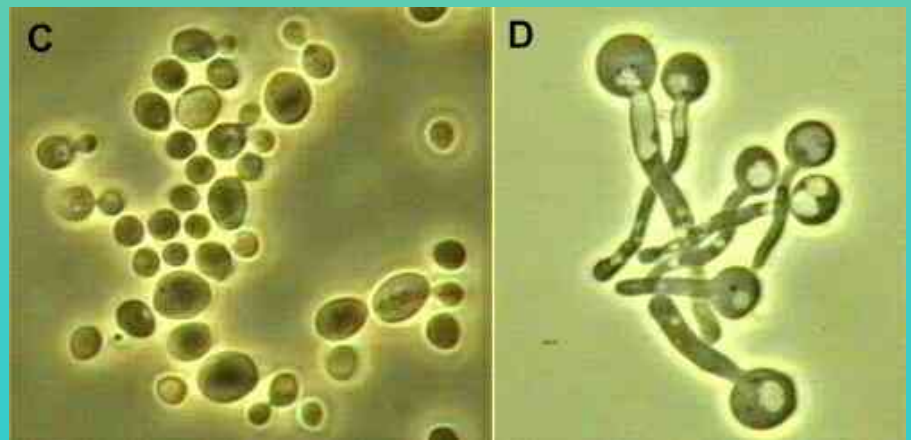


# KVASINKA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*



# MIKROORGANISMY

- Kvasinky jsou schopné využívat uhlovodíky jako substrát
- Historicky se vyráběly tzv. single cell proteiny – kvasinky např. *Candida lipolytica*, substrát *n*-hexan.



# MIKROORGANISMY

- Nižší houby – především dřevokazné
  - i) Působící bílou hnilobu dřeva (white-rot-fungi)
  - ii) Působící hnědou hnilobu dřeva (brown-rot-fungi)

EXTRACELULÁRNÍ ENZYMY 

Snažší degradace polutantů – není třeba transport do buňky

# MIKROORGANISMY

- Dřevokazné houby působící hnědou hnilobu – enzymy celulasy – degradace celulosy – zůstává lignin
- Dřevokazné houby působící bílou hnilobu – enzymy peroxidasy – degradace ligninu – zůstává celuloza

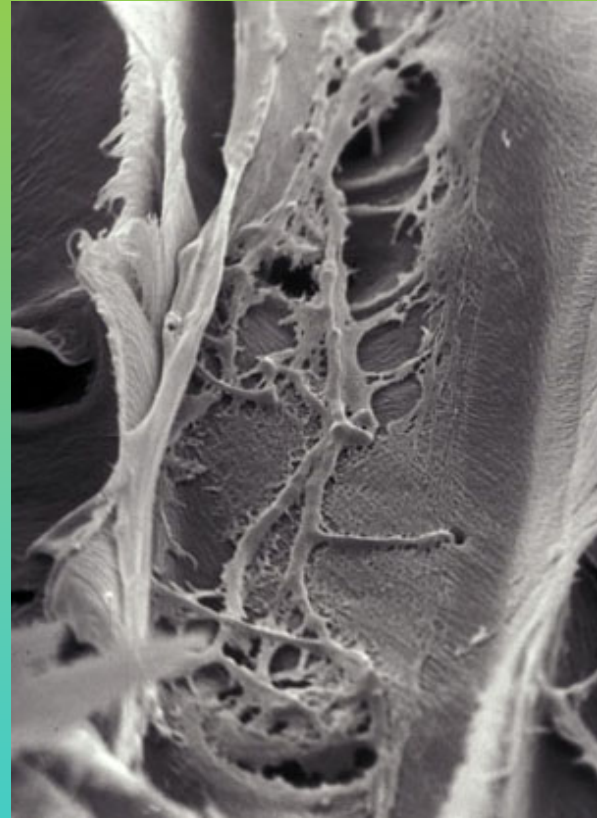
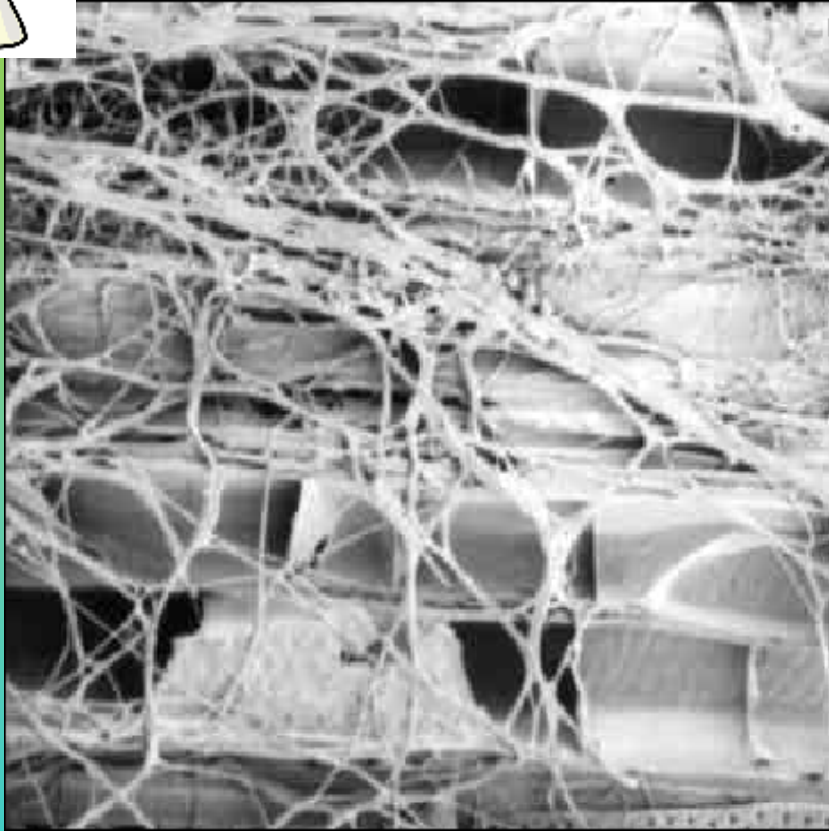
# BÍLÁ A HNĚDÁ HNILOBA



# HOUBY – JAK BY TO MĚLO FUNGOVAT



# HOUBY – JAK BY TO MĚLO FUNGOVAT



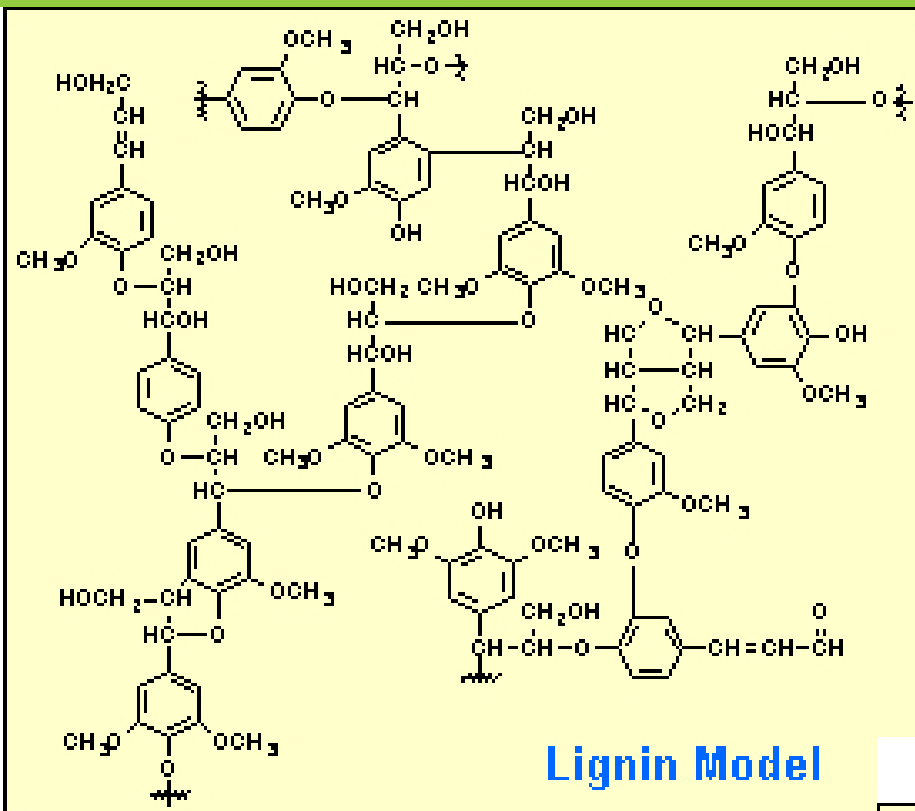
# DŘEVOKAZNÉ HOUBY - BIOREMEDIACE

- Tvorba exoenzymů – peroxidas – zrychlení biodegradace PAU – podobné ligninu, eliminace transportu do buňky
- Problém: kolonizace ošetřované půdy
- Veliké množství inokula – vysoká cena
- Tvorba dead-end produktů, výsledek horší než očekávání – spíše žádný

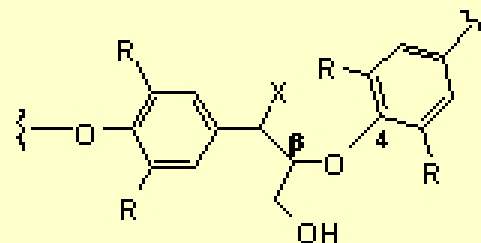




# MODEL MOLEKULY LIGNINU



## Most Abundant Lignin Unit



R = H, OCH<sub>3</sub>  
X = H, OH, OAr



# DŘEVOKAZNÉ HOUBY – BIOREMEDIACE DALŠÍ PROBLÉM – ODBOURÁVÁNÍ PAU

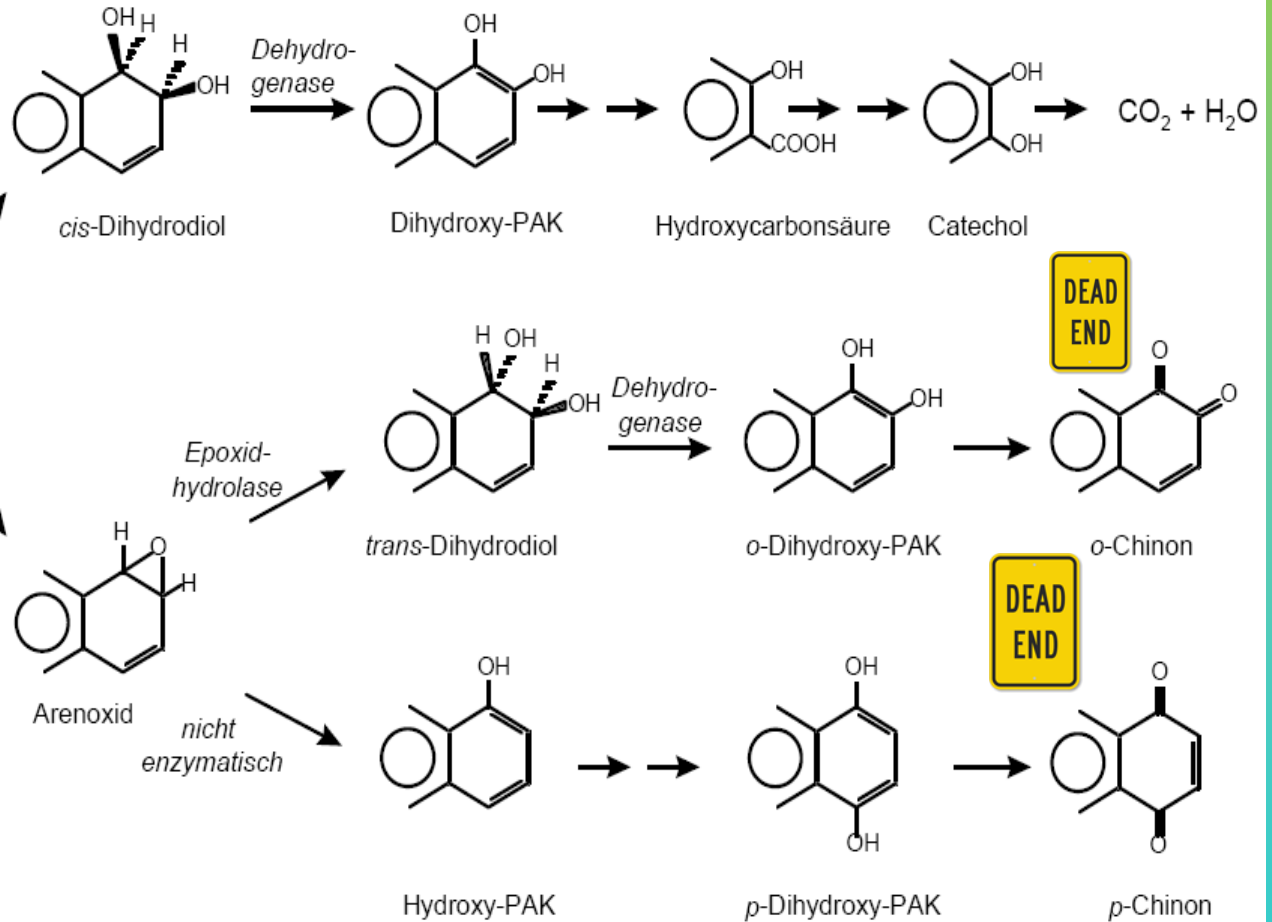


**BAKTERIE**  
**Dioxygenasa**

**Bakterien**  
*Dioxygenase*

**Pilze**  
*Cyt. P-450*

**HOUBY**  
**Cyt P-450**  
**Peroxidasy**





# POKUSY O PRAKTICKÉ VYUŽITÍ DŘEVOKAZNÝCH HUB PRO BIOREMEDIACI

- Earthfax Engineering, Dr. Lamar, Utah, USA
- ATE, česká pobočka, Dr. T.M. Vogel, původní technologie francouzská



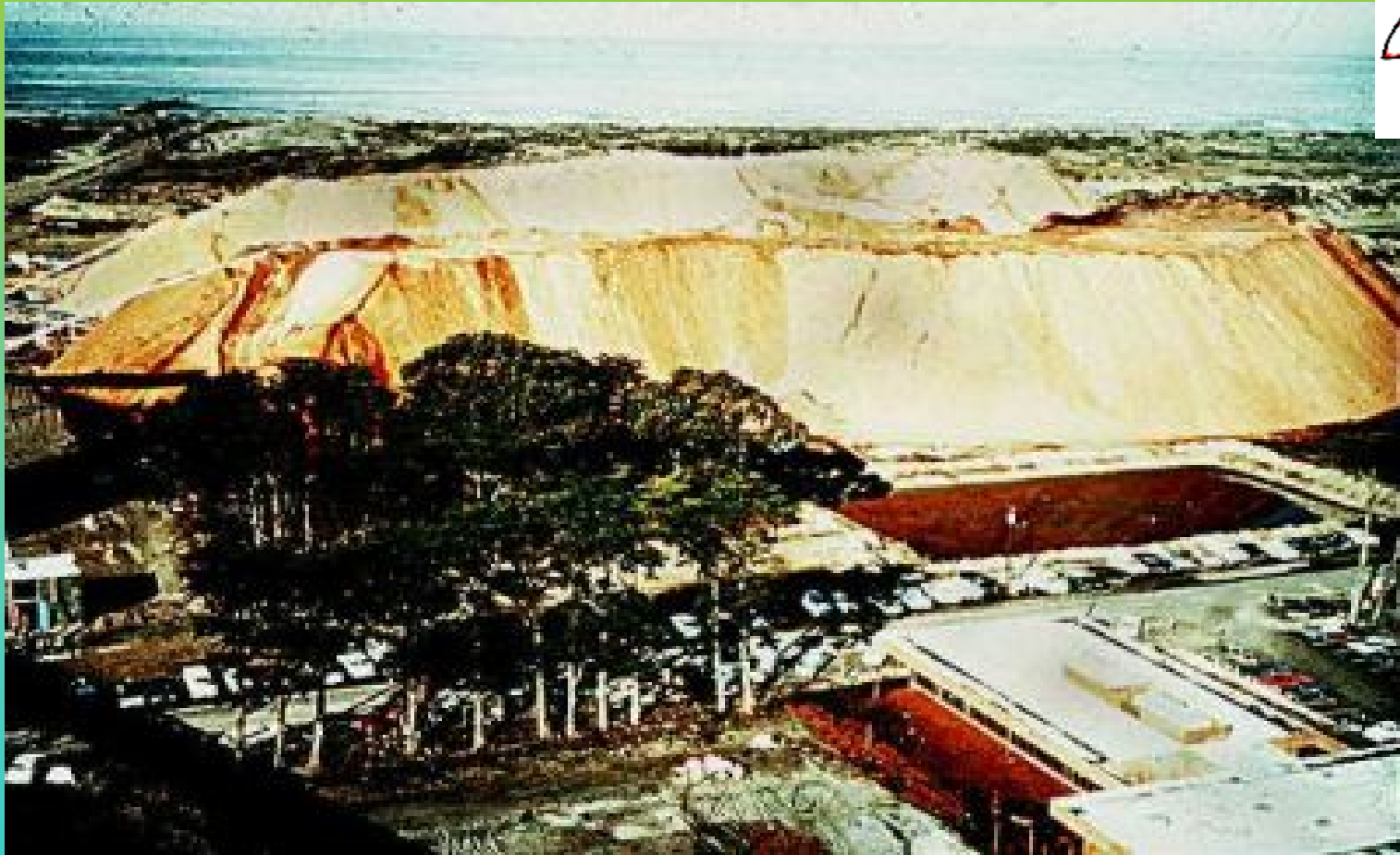
# POUŽITÍ HUB, KTERÉ FUNGUJE



**BIOPULPING**



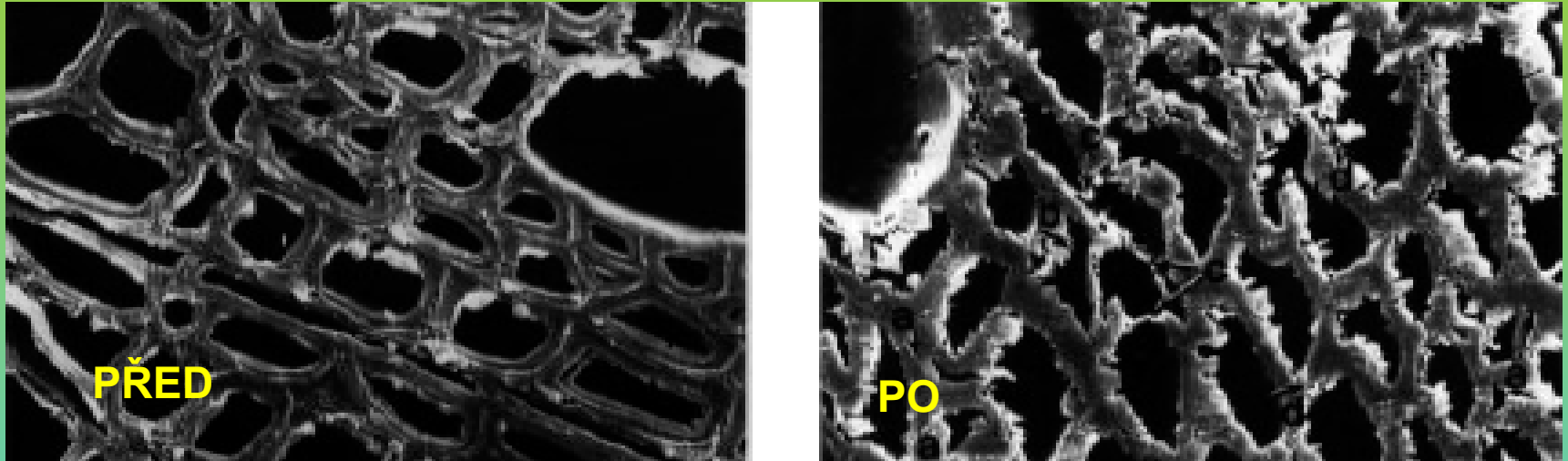
# POUŽITÍ HUB, KTERÉ FUNGUJE



# POUŽITÍ HUB, KTERÉ FUNGUJE



# BIOPULPING



- Úspora cca \$ 10 na 1 tunu celulosy + úspora 30 % energie
- Návratnost investice už za 3 roky !!!!

# OTÁZKY ?





DĚKUJI

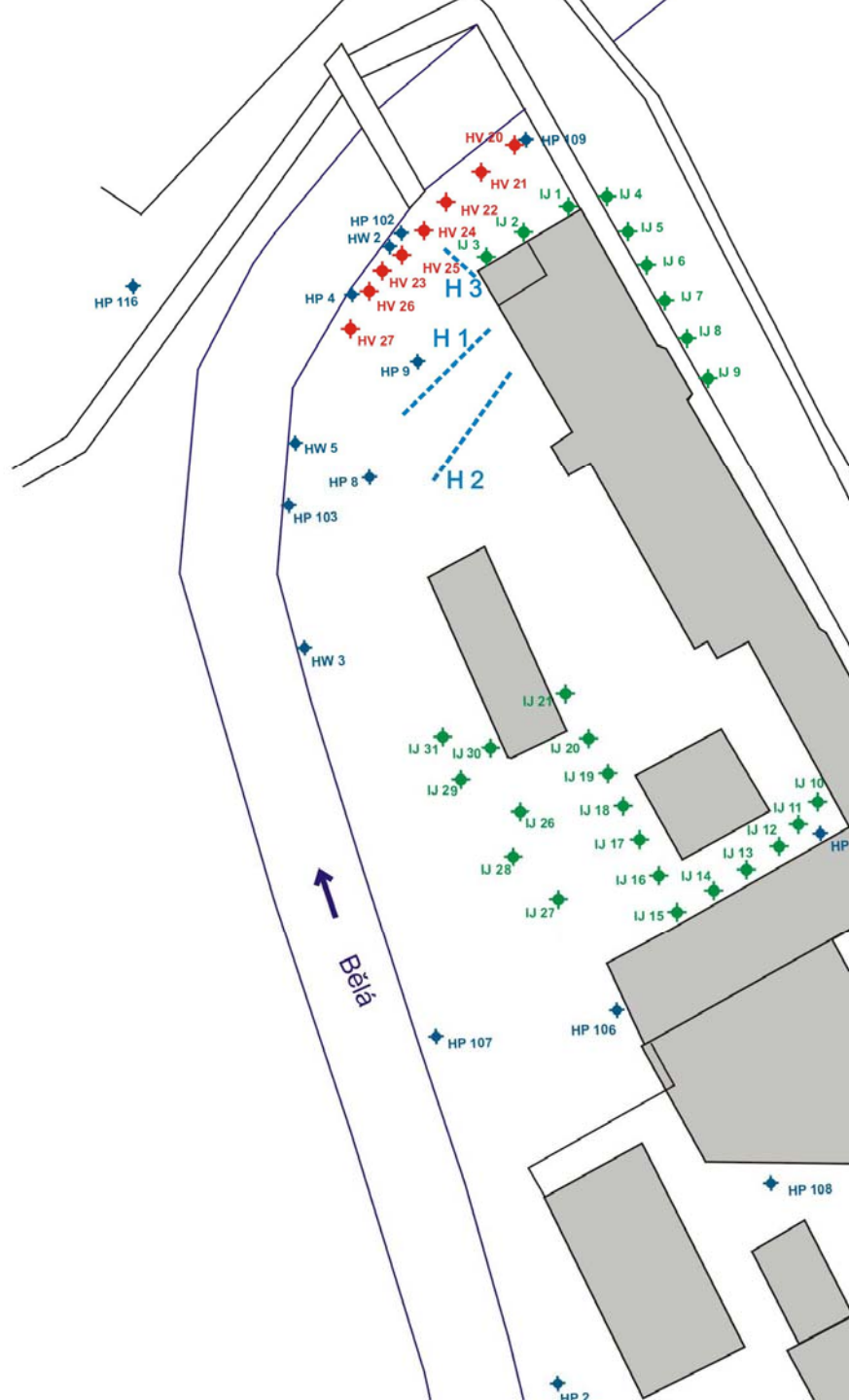
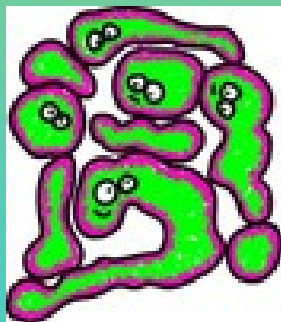
VÁM ZA

POZORNOST!



# EXKURZE 3.11.2011

## ALFATEX MÓDA, PELHŘIMOV, KŘEMEŠNICKÁ ULICE



# KONTAMINACE

Především chlorované ethyleny:  
perchlorethylen (PCE) a trichlorethylen  
(TCE)

Transformační produkty (1,2-c-DCE a VC)  
jen ve velmi omezené míře

Podmínky ve zvodni nebyly příznivé pro  
průběh reduktivní dehalogenace

# POSTUP REMEDIACE

- Odtěžení nejvíce kontaminovaných zemin tam, kde to bylo možné.
- Sanační čerpání + vytvoření hydraulické bariéry
- Úprava podmínek ve zvodni – podpora biologické reduktivní dehalogenace
- Změna podmínek na oxické při hromadění 1,2-c-DCE (IJ-26, IJ-29 až 31)