

BIODEGRADAČNÍ PŘEMĚNY CHLOROVANÝCH ALIFATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

MARKĚTA ŠPANĚLOVÁ

Ústav chemie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Marketa.Hrebikova@vscht.cz

Došlo dne 6.III.2000

Klíčová slova: biodegradace, trichlorethylen, tetrachlorethylen, methanogenní bakterie, dechlorace

Obsah

1. Úvod
2. Biodegradace chlorovaných uhlovodíků
 - 2.1. Aerobní biodegradace
 - 2.2. Anaerobní biodegradace
 - 2.2.1. Transformace za podmínek redukce Fe(III)
 - 2.2.2. Biodegradace za podmínek redukce síranů
 - 2.2.3. Biodegradace za methanogenních podmínek
3. Závěr

1. Úvod

Chlorované alifatické uhlovodíky se řadí v souvislosti se svým rozsáhlým průmyslovým použitím k prioritním kontaminantům životního prostředí. Tyto látky představují běžné kontaminanty podzemních vod a tvoří významnou součást nebezpečných odpadů a skládkových výluhů. V různých formách odpadů se z této skupiny vyskytují nejčastěji chlorované methany, chlorované ethany a chlorované etheny.

Chlorované methany se používají jako extrakční a chladicí činidla, rozpouštědla při výrobě plastů, k výrobě tetraethylolova atd. Chlorované ethany slouží jako surovina k výrobě vinylchloridu (VC), tri- a tetrachlorethylenu, jako chladicí činidla, insekticidy atd. Chlorované etheny se používají k odmašťování kovů, jako extrakční činidla v cukrovarnictví a živočišné výrobě, jako rozpouštědla a výchozí látky v chemických výrobcích.

Z průmyslového a komunálního odpadu se tyto látky dostávají do různých složek životního prostředí. V běžné skládce komunálního odpadu byl odhadnut¹ následující obsah těchto sloučenin: dichlormethan (DCM) přibližně 100 mg/kg, trichlorethen (TCE) přibližně 28 mg/kg, tetrachlorethen (PCE) přibližně 55 mg/kg a 1,1,1-trichlorethan (TCA) přibližně 52 mg/kg.

Chlorované alifatické uhlovodíky se řadí k látkám, které jen pomalu a obtížně podstupují biologickou transformaci. Obecně jsou tyto látky odolné k aerobní biodegradaci a snáze se přeměňují za anaerobních podmínek.

2. Biodegradace chlorovaných uhlovodíků

2.1. Aerobní biodegradace

Principem biodegradčního procesu je za aerobních podmínek ve většině případů kometabolismus. Jde o transformaci sloučenin, které neposkytují uhlík a energii pro růst mikroorganismů za současného využití jiné sloučeniny v roli primárního substrátu. V přirozeném půdním nebo skládkovém prostředí byla aerobní bio-oxidace podporována přítomností methanu. Ve vzorku sedimentu obohaceném methanem byla za těchto podmínek pozorována degradace TCE, DCE a VC (cit.²). Speitel a Closmann³ prokázali degradaci 1,2-DCA, TCE a trichlormethanu (TCM) ve vzorcích půd vystavených působení směsi methan/vzduch. Zvláště intenzívně byla sledována degradace karcinogenního VC, který se ukázal za těchto podmínek odbouratelný. VC byl s vysokou účinností degradován v biofilmovém reaktoru⁴ při teplotě 20 až 35 °C v koncentraci 1,8 až 9,6 mg.l⁻¹. Za biodegradaci byly v tomto případě odpovědné methanotrofní mikroorganismy využívající methan jako primární substrát a produkující enzym methanmonoxygenasu, který katalyzuje vlastní přeměnu chlorované sloučeniny.

Laboratorní experimenty zabývající se aerobní a fakultativně aerobní degradací vedly k izolaci čistých kultur schopných využít chlorované alkeny jako zdroj uhlíku a energie. Logan⁵ uvádí, že kmen druhu *Pseudomonas putida* je schopen za anaerobních podmínek degradovat chlorované alkeny na alkeny obsahující o dva atomy chloru méně. Za aerobních podmínek byly detegovány produkty oxidační i redukční reakce.

Sharma a McCarty⁶ izolovali z kontaminované půdy bakterie schopné provádět dechloraci PCE na (Z)-DCE. Podle svých charakteristik byly mikroorganismy zařazeny k rodu *Enterobacteriaceae*. Jde o rychle rostoucí kmen, označený MS-1, optimálně rostoucí při pH 7 a teplotě 37 °C. Mikroorganismus byl schopen dechlorovat PCE za aerobních i anaerobních podmínek, bez přítomnosti termodynamicky výhodných akceptorů elektronů jako je NO₃⁻. Ve stejných podmínkách byl testován i známý kmen *Enterobacter agglomerans*, velmi podobný kmenu MS-1, který rovněž dechloroval PCE na (Z)-DCE.

2.2. Anaerobní biodegradace

Anaerobní degradace nižších chlorovaných uhlovodíků se jeví jako nejdůležitější způsob jejich transformace v životním prostředí. Anaerobní rozklad zahrnuje obecně konverzi organických sloučenin na methan, oxid uhličitý a jiné anorganické produkty. Tento proces je realizován konsorciem mikroorganismů, které se podle zjednodušeného modelu skládá z acidogenních bakterií transformujících komplexní organické sloučeniny na nižší nasycené karboxylové kyseliny, oxid uhličitý a vodík a methanogenních bakterií, které konvertují kyselinu octovou, oxid uhličitý a vodík na methan. Z hlediska biodegradace kontaminantů v životním prostředí spočívá výhoda

těchto systémů především v dobré rozpustnosti živin ve vodě. Provedené laboratorní testy ukázaly, že anaerobní systémy jsou schopny při stejném množství přidaného donoru elektronů rozložit řádově vyšší množství kontaminantu než systémy aerobní, u kterých je aktivita mikroorganismů omezena rozpustností kyslíku.

Výzkum transformace chlorovaných uhlovodíků se nejčastěji provádí s ohledem na konkrétní kontaminované prostředí. V přírodě představují anaerobní prostředí například podzemní vody, říční sedimenty, půda, skládky odpadů, tedy oblasti často zasažené kontaminací vlivem lidské činnosti. Pro bližší charakteristiku anaerobního prostředí je možné použít typ probíhajícího redoxního děje. Základními redoxními ději v tomto prostředí jsou redukce dusičnanů, redukce Fe(III), redukce síranů a methanogeneze (uvedené sloučeniny představují konečné akceptory elektronů).

2.2.1. Transformace za podmínek redukce Fe(III)

Bradley a Chapelle⁷ sledovali mineralizaci VC v sedimentech za anaerobních podmínek s přidavkem vody a Fe-EDTA. Zjistili, že přidavek komplexu železa podpořil rychlou mineralizaci 15 až 34 % VC na CO₂. Dechlorace byla přitom srovnatelná s dechlorací za aerobních podmínek. Podobně byla popsána transformace tetrachlormethanu na trichlormethan⁸. V přítomnosti Fe(III) ve formě citrátu rychlost dechlorace trojnásobně vzrostla a navíc došlo k transformaci na dichlormethan. Bylo zjištěno, že transformace obtížně rozložitelných kontaminantů je podpořena přítomností silného oxidačního činidla. Účinnost procesu může být zvýšena, pokud je železo Fe(III) v mikrobiologicky dostupné formě, např. ve formě komplexů s organickými ligandy⁹.

2.2.2. Biodegradace za podmínek redukce síranů

Sulfát-redukující podmínky představují velmi rozšířený typ anaerobního prostředí. Bagley a Gossett¹⁰ pozorovali v sulfát-redukující směsné kultuře degradaci PCE za vzniku TCE, (Z)-DCE a stechiometrického množství sulfidů. Freedman a kol.¹¹ popsali dechloraci CT na TCM a DCM stejným typem kultury. Významný krok představovala izolace dechloračního mikroorganismu *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 z anaerobního kalu¹². Tento nový druh sulfát-redukující bakterie může získávat energii pouze prostřednictvím přenosu elektronů na 3-chlorbenzoát a v době svého objevení se jednalo o jediný mikroorganismus, který používal redukční dechloraci jako nový typ anaerobní respirace¹³. Důležité je, že paralelně s redukcí 3-chlorbenzoátu je tento kmen schopen degradovat PCE (cit.^{14,15}).

2.2.3. Biodegradace za methanogenních podmínek

Methanogenní bakterie se v přírodě účastní poslední fáze degradace organické hmoty. Vzhledem k substrátové specifitě jsou závislé na jiných bakteriálních skupinách, zvláště na mikroorganismech produkujících vodík. Typickým prostředím, ve kterém se methanogenní podmínky rozvíjejí je skládka komunálních odpadů. Johansson a kol.¹⁶ prokázali schopnost mikroorganismů v anaerobní části skládky transformovat PCE za vzniku TCE a DCE za použití vzorků odpadu rozpuštěných ve fosfátovém pufru. V jiném experimentu byla ve skládko-

vém výluhu na pískové matrici pozorována degradace CT, TCA, TCE a PCE (cit.¹⁷). Christensen a kol.^{18,19} sledovali biodegradaci chlorovaných alifatických uhlovodíků na skládce komunálního odpadu. Zjistili, že TCA a tetrachlormethan byly v kapalně fázi degradovány ze 70 až 90 % po 50 dnech, zatímco rozklad PCE probíhal mnohem pomaleji. Z uvedených výsledků vyplývá, že během poslední fáze skládkového procesu probíhají s velkou pravděpodobností přeměny všech nižších chlorovaných uhlovodíků s výjimkou VC, který je přístupný k aerobní degradaci.

Úlohu methanogenů při biodegradaci DCM ve směsné anaerobní kultuře studovali Freedman a Gossett^{20,21}. Za podmínek aktivní methanogeneze byl DCM odbouráván za vzniku stechiometrického množství methanu. DCM byl však odbouráván i v případě, kdy byla methanogeneze inhibována přidavkem specifického inhibitoru bromethansulfonové kyseliny, a to za vzniku kyseliny octové. Dechlorace tudíž probíhá v methanogenních podmínkách, ale je pravděpodobně zprostředkována některým z acetogenních mikroorganismů. Významnou roli mohou hrát v tomto procesu i abiotické faktory prostředí²². Tetrachlormethan byl granulovaným methanogenním kalem rostoucím na methanolu degradován až na methylchlorid, přičemž v autoklávaných vzorcích byla pozorována stejně rychlá degradace na trichlormethan. Specifickou inaktivací vitamínu B12 dechlorace v paralelně připravených abiotických vzorcích značně poklesla, což potvrzuje redukční účinek této sloučeniny.

Biodegradaci PCE v koloně s pevnou fází za ustálených methanogenních podmínek dokumentovali Vogel a McCarty²³. PCE byl sekvenčně dechlorován na TCE, DCE, VC a stopy CO₂ z počáteční koncentrace 300 μg.l⁻¹ na 5 μg.l⁻¹. Rovněž anaerobní kal z čistírny odpadních vod má velkou dechlorační schopnost²⁴. Přidavkem specifického inhibitoru methanogeneze se však dechlorace PCE snížila z původních 80 % na 35 %. Podobný účinek inhibitoru methanogeneze na dechlorační proces byl dokumentován v řadě studií²⁵⁻²⁷. Fathpure^{14,28} odvozuje úlohu methanogenů ze spotřeby některých typických methanogenních substrátů jako je methanol, vodík a mravenčan, které směsné methanogenní kultury využívají, stejně jako z inhibice procesu po inhibici methanogeneze.

Testování dechlorační schopnosti čistých methanogenních kmenů ukázalo, že methanogenní bakterie jsou schopny degradace PCE a TCE, ale ve výrazně nižší míře než směsná kultura²⁵. Není tedy vyloučeno, že inhibice methanogeneze vede k inaktivaci jiných mikroorganismů, které se na dechloraci podílí, např. akumulací methanogenních substrátů.

Je zřejmé, že směsná anaerobní kultura je pro dechloraci chlorovaných uhlovodíků zvláště vhodná. V tomto prostředí se odehrávají vzájemné interakce mezi jednotlivými mikrobiálními společenstvy, které vytvářejí podmínky pro vývoj jednotlivých kultur a prováděpodobně i pro vlastní dechlorační proces. Přítomnost fermentačních mikroorganismů ve směsné methanogenní kultuře^{29,30} podpořila degradaci TCE na VC ve srovnání se směsnou methanogenní kulturou na specifickém médiu, která nevykázala žádnou přeměnu TCE. V jiném případě³¹ bylo úplné dechlorace PCE dosaženo kombinací dvou typů inokula – říčního sedimentu a anaerobního granulovaného kalu. Za použití směsné kultury vyvinuté z granulovaného kalu byla pozorována pouze částečná a pomalá dechlorace. Transformace chlorovaných ethenů by-

la pozorována ve směsné kultuře vyvinuté ze sedimentů³² a z nekontaminované i dlouhodobě kontaminované půdy³³.

Ve směsných kulturách adaptovaných na PCE byla pozorována biodegradace vysokých koncentrací tohoto kontaminantu^{34,35}. Zvyšování koncentrace PCE přitom často způsobilo úbytek až zastavení produkce methanu a tím i změnu zastoupení mikroorganismů. Stupeň dechlorace PCE se však i při vysoké koncentraci pohyboval kolem 80 %.

Pro přesnou charakteristiku biodegradačního procesu a podmínek, za kterých k němu dochází je však žádoucí identifikovat příslušný mikroorganismus, který je za dechloraci odpovědný. Dosud bylo publikováno pouze několik prací, které se zabývají dechlorační schopností čistých kultur. Fathepure¹⁴ testoval schopnost vybraných čistých kmenů běžně se vyskytujících v prostředí biodegradace chlorovaných uhlovodíků (kmeny rodu *Methanosarcina*, *Methanotrix*, druhu *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium* a kmen DCB-1). Značnou dechloraci PCE vykázaly kmeny DCB-1, *Methanosarcina* sp. a *Methanosarcina mazei*. Významná je zvláště dechlorační schopnost kmenů rodu *Methanosarcina*, protože tyto mikroorganismy se běžně vyskytují v methanogenním prostředí. Je tedy zřejmé, že na dechloraci se mohou podílet samotné methanogenní bakterie. V jiné práci³⁶ vykázaly bakterie *Methanosarcina* sp. kmen DCM výraznou dechloraci PCE na TCE, přičemž byla pozorována jasná závislost této dechlorace na spotřebě methanogenního substrátu, methanolu.

V nedávné době byly popsány čisté kultury dvou striktně anaerobních mikroorganismů, které spojují redukční dechloraci se svým růstem^{13,37}. Jde o kmeny druhu *Dehalospirillum multivorans* a *Dehalobacter restrictus*, které využívají chlorované etheny jako konečné akceptory elektronů. Kmen řadící se k druhu *Dehalobacter restrictus* využíval vodík jako donor elektronů a podle elektronové bilance představovala oxidace vodíku a dehalogenace TCE společně redoxní proces, při němž byla generována veškerá potřebná energie³⁸.

Maymó-Gatell³⁹ izoloval ze směsné kultury dechlorující PCE čistý kmen prozatímne nazvaný *Dehalococcoides ethenogenes* kmen 195, který vykazoval růst pouze v přítomnosti PCE a vodíku. Dechlorace PCE probíhala s účinností vyšší než 90 % na VC a ethylen, přičemž degradace VC nastoupila až po úplném odstranění PCE ze systému.

3. Závěr

Biodegradační přeměny chlorovaných alifatických uhlovodíků v prostředí jejich častého výskytu se ukázaly jako pravděpodobné, a to zvláště za anaerobních vysoce redukčních podmínek. Takové prostředí představují zejména skládky komunálního odpadu v methanogenní fázi rozkladného procesu. Vzhledem k nebezpečným vlastnostem uvedených kontaminantů, zvláště vinylchloridu, který byl identifikován ve skládkovém plynu, a s přihlédnutím k probíhající sanaci starých skládkových těles představuje výzkum biodegradace těchto látek vysoce aktuální problém.

LITERATURA

- Christensen T. H., Cossu R., Stegmann R.: *Landfilling of Waste: Biogas*. E&FN Spon, London 1996.
- Fogel M. M., Taddeo A. R., Fogel S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 720 (1986).
- Speitel G. E., Closmann F. B.: *ASCE Environ. Eng. Speciality Conference, July 10–12 (1989)*.
- Nelson B. Y., Jewell W. J.: *J. Environ. Eng.* 119, 890 (1993).
- Logan M. S. P., Newman L. M.: *Biodegradation* 4, 39 (1993).
- Sharma P. K., McCarty P. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 761 (1996).
- Bradley P. M., Chapelle F. H.: *Environ. Sci. Technol.* 30, 2084 (1996).
- Petrovskis E. A., Vogel T. M., Saffarini D. A., v knize: *Bioremediation of Chlorinated Solvents* (Hinchee R. E., ed.), str. 6. Battelle Press, Columbus 1995.
- Lovely D. R., Woodward J. C., Chapelle F. H.: *Nature* 370, 128 (1994).
- Bagley D. M., Gossett J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2511 (1990).
- Freedman D. L., Lasecki M., Hashsham S., v knize: *Bioremediation of Chlorinated Solvents* (Hinchee R. E., ed.), str. 123, Battelle Press, Columbus 1995.
- Shelton D. R., Tiedje J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 840 (1984).
- Holliger Ch., Schraa G., Stams A. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2991 (1993).
- Fathepure B. Z., Nengu J. P., Boyd S. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2671 (1987).
- Fathepure B. Z., Tiedje J. M.: *Environ. Sci. Technol.* 28, 746 (1994).
- Johansson E., Ejlertsson J., Karlsson A.: *4. International Landfill Symposium, Sardinia 2.–6.10.1995*. Proceedings str. 143.
- Kromann A., Ludvigsen L., Christensen T. H.: *4. International Landfill Symposium, Sardinia 2.–6.10.1995*. Proceedings str. 136.
- Christensen T. H., Albrechtsen H. J., Kromann A.: *4. International Landfill Symposium, Sardinia 1993*.
- Deipser A., Stegmann R.: *6. International Landfill Symposium, Cagliari 13.–17.10.1997*. Proceedings str. 207.
- Freedman D. L., Gossett J. M., v knize: *On-Site Bioreclamation* (Hinchee E., Olfenbuttel R. F., ed.), str. 539. 1991.
- Freedman D. L., Gossett J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2847 (1991).
- Van Eekert M. H., Veiga M. C., Field J. A., v knize: *Bioremediation of Chlorinated Solvents* (Hinchee R. E., ed.), str. 139. Battelle Press, Columbus 1995.
- Vogel T. M., McCarty P. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1080 (1985).
- Farthepure B. Z., Boyd S. A.: *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 149 (1988).
- Freedman D. L., Gossett J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2144 (1989).
- Farthepure B. Z., Boyd S. A.: *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 149 (1988).
- DiStefano T. D., Gossett J. M., Zinder S. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3622 (1992).
- Farthepure B. Z., Boyd S. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2976 (1988).
- Baek N. H., Jaffé P. R.: *J. Environ. Qual.* 18, 515 (1989).

30. Baek N. H., Jaffé P. R., Shingal N.: *J. Environ. Sci. Health, Part A* 25, 987 (1990).
31. Bruin W. P., Kotterman J. J., Posthumus M. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1996 (1992).
32. Barrio-Lage G., Parsons F. Z., Nassar R. S.: *Environ. Sci. Technol.* 20, 96 (1986).
33. Nofsker C., Watwood M. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 424 (1997).
34. DiStefano T. D., Gossett J. M., Zinder, S. H.: *Appl. Env. Microbiol.* 57, 2287 (1991).
35. Tandoi V., DiStefano T. D., Bowser P. A.: *Environ. Sci. Technol.* 28, 973 (1994).
36. Farthepure B. Z., Boyd S. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2976 (1988).
37. Scholz-Muramatsu H., Neumann A., Messmer M.: *Arch. Microbiol* 163, 48 (1995).
38. Wild A., Hermann R., Leisinger T.: *Biodegradation* 7, 507 (1996).
39. Maymó-Gatell X., Chien Y., Gossett J. M.: *Science* 276, 1568 (1997).

M. Španělová (*Department of Environment Protection, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Biodegradation Transformations of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons**

The review summarizes the present knowledge of biodegradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons in environment. Transformation of these compounds by aerobic, facultative aerobic and anaerobic microorganisms in mixed and pure cultures is discussed. The anaerobic biodegradation under methanogenic conditions was shown to be a successful pathway for dechlorination of the compounds.