

# A NOVEL BIOAUGMENTATION APPROACH IN BIODEGRADATION OF ORGANIC POLLUTANTS IN CONTAMINATED SOIL

## NOVÝ ZPŮSOB BIOAUGMENTACE PŘI BIODEGRADACI ORGANICKÝCH POLUTANTŮ V KONTAMINOVANÉ ZEMINĚ

**Ondřej Lhotský<sup>1)</sup>, Alena Filipová<sup>2,3)</sup>, Petra Innemanová<sup>1)</sup>, Radka Velebová<sup>1)</sup>, Tomáš Cajthaml<sup>2)</sup>**

1) Dekonta a.s., Volutová 2523, 158 00 Praha 5, Czech Republic, e-mail: lhotsky@dekonta.cz

2) Institute of Microbiology, ASCR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Republic

3) Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

### Abstract:

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) belong among organic compounds that accumulate in the environment mainly resulting from human activities. Because of their potentially negative effects on human health, methods of their removal from the environment are intensively studied. In this work, a biodegradation method of bioaugmentation based on sequential stepwise mixing of inoculated soil with non inoculated soil was used. The subject of this work was an application of a bacterial consortium on a real contaminated (7399 mg.kg<sup>-1</sup> of PAHs) soil. 8 bacterial strains isolated from other contaminated sites were inoculated. DNA was isolated from the samples during the inoculation process and the degradation of PAHs was monitored after 4 months. The degradation reached 70% in the real contaminated soil during the second step of the inoculation. The adaptation of the bacterial strain was evaluated using the DGGE method detecting 16S rDNA from the soil samples and from the pure bacterial cultures. Due to low selectivity of the DGGE method, a technique of 454 sequenation was applied. The highest abilities of adaptation were found for *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas putida*.

### Keywords:

Bioaugmentation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), contaminated soil, biodegradation, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

### Abstrakt:

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) patří mezi organické látky, které se kumulují v životním prostředí, a to především v důsledku lidské činnosti. Z důvodu jejich potenciálně škodlivých účinků na lidské zdraví se stále hledají možnosti, jak tyto látky z prostředí odstranit. V této práci byla k degradaci kontaminované zeminy použita metoda bioaugmentace, spočívající ve víceúrovňovém, následném mísení inokulované zeminy s neinokulovanou. Předmětem této práce byla aplikace bakteriálního konsorcia do reálně kontaminované zeminy s vysokou koncentrací PAU (7399 mg.kg<sup>-1</sup>). Bylo inokulováno 8 bakteriálních kmenů izolovaných z podobně kontaminovaných lokalit. V průběhu inokulace byla ze vzorků zemin izolována DNA a po 4 měsících stanovena míra degradace přítomných PAU. V II. stupni inokulace byla stanovena až 70% degradace celkového množství PAU. Úspěšnost adaptace vnesených bakterií byla hodnocena metodou DGGE (denaturační gradientové elektroforesy) na základě porovnání 16S rDNA ze vzorků zemin a čistých bakteriálních kultur. Z důvodu nedostatečné selektivnosti metody byla také použita metoda 454 sekvenace. V reálně kontaminované zemině vykazovaly schopnost adaptace *Acinetobacter calcoaceticus* a *Pseudomonas putida*.

### Klíčová slova:

Bioaugmentace, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), kontaminovaná zemina, biodegradace, denaturační gradientová gelová elektroforesa (DGGE)

### Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) patří mezi organické látky, které se kumulují v životním prostředí, a to především v důsledku lidské činnosti. Z důvodu jejich potenciálně škodlivých účinků na

lidské zdraví se stále hledají možnosti, jak tyto látky z prostředí odstranit. Odstranění PAU z prostředí je nesnadné a ne vždy proveditelné. Ačkoli tyto látky mohou podléhat adsorpci, volatilizaci, fotolýze a chemické degradaci, mikrobiální degradace je hlavním procesem jejich degradace (Yuan *et al.*, 2001). Bioaugmentace je technologický postup zahrnující cílené vnesení mikrobiální populace v podobě tzv. biopreparátu (inokula) do prostředí sanačního zákroku s cílem obohacení zeminy o mikrobiální zástupce se schopností degradovat přítomný polutant (Scullion, 2006). V současné době se inokulace a aplikace mikrobiálního preparátu na sanovanou zeminu provádí krokovým namnožením kultur v kapalném médiu v bioreaktorech do potřebného objemu inokula k sanované zemině. Předmětem této studie je zachování selekčního tlaku bez finančně a technologicky náročných velkoobjemových kultur mikrobiální kultury v nadprahovém množství polutantu a zároveň urychlení bioremediačního procesu. Podstata studie spočívá ve vnesení mikrobiální kultury do zeminy kontaminované polycyklickými aromatickými uhlovodíky metodou víceúrovňové inokulace. Přítomnost alochtonních biodegradčních bakteriálních kmenů novou metodou inokulace byla potvrzena na základě provedených biodegradčních testů a stanovení úbytku koncentrace kontaminantu. K detekci vnesených bakteriálních kmenů byla použita denaturační gradientová gelová elektroforesa (DGGE) a 454 sekvenace.

## **Materiál a metody**

### ***Zemina***

Reálně kontaminovaná zemina z průmyslové oblasti Jihočeské plynárenské, a.s. v Českých Budějovicích. Stanovená vstupní koncentrace sumy 18 PAU (16 PAU podle US EPA, 1-methylnaftalen, 2-methylnaftalen) byla 7399 mg·kg<sup>-1</sup>. Zemina byla sušena při laboratorní teplotě, homogenizována a přeseta sítím s velikostí ok 2 mm.

### ***Bakteriální konsorcium***

K inokulaci byly použity bakteriální kmeny získané izolací ze vzorků zemín z lokalit kontaminovaných ropnými uhlovodíky a PAU. Bakteriální izoláty poskytla společnost Dekonta. Dle identifikace CMM 2007 se jedná o tyto kmeny (v závorce je uvedeno značení zavedené společností Dekonta): *Arthrobacter protophormiae* (PM1), *Bacillus megaterium* (PM2), *Psychrobacter* sp. (PM3/2), *Pseudomonas fluorescens* (6), *Pseudomonas veronii* (145), *Acinetobacter calcoaceticus* (147), *Pseudomonas putida* (161), *Pseudomonas stutzeri* (171).

### ***Aplikace bakteriálního inokula***

Zemina byla navážena do plastových boxů po 100 g (základní inokulum), 200 g, 500 g a 1000 g. Nejdříve bylo založeno základní inokulum zvlhčením zeminy, obohacením hnojivem NPK o koncentraci 3 g·kg<sup>-1</sup> zeminy a přidáním 10 ml·kg<sup>-1</sup> zeminy bakteriální směsi napěstované v masopeptonovém bujónu (1·10<sup>9</sup> CFU·ml<sup>-1</sup>). Takto upravená zemina byla kultivována v termostatu při teplotě 22 °C za stálého vlhčení a přístupu vzduchu. Bakteriální nárůst byl kvantitativně hodnocen výsevem na plotny (DEV Nutrient agar, Merck) do dosažení bakteriálního osídlení 1·10<sup>6</sup> - 1·10<sup>9</sup> CFU·g<sup>-1</sup>zeminy (10 dnů). Poté byl proveden I. stupeň inokulace přenosem 10 g mikrobiálně obohacené zeminy do 200 g, 500 g a 1000 g neinokulované vlhčené kontaminované zeminy, vždy ve dvou paralelách pro oba typy zemín. Následovala kultivace za totožných podmínek. V tomto případě bylo dosaženo požadovaného osídlení za 16 dnů. Poté byl stejným způsobem proveden II. stupeň, a to přenosem 10 g zeminy z I. stupně do výchozí neinokulované zeminy. Před každým přenosem byla zemina odebrána a uchována pro pozdější izolaci DNA. V průběhu celého experimentu, který byl ukončen po 4 měsících odběrem vzorků na stanovení degradace přítomných polutantů, byly zeminy pravidelně vlhčeny a míchány. Kontrolní vzorek byl v průběhu celého experimentu zvlhčován, míchán a kultivován za stejných podmínek jako ostatní vzorky.

### ***Extrakce PAU***

K extrakci celkového množství 18 PAU byl použit extraktor ASE 200 (Dionex, USA). Extrakce probíhala za teploty 150 °C, tlaku 10,3 MP a pomocí rozpouštědel hexan:aceton (3:1, v/v). Po extrakci byl ze vzorku nejprve odpařen (40 kPa, 30 °C) pomocí rotační vakuové odparky aceton, poté bylo ke vzorku přidáno 15 ml ethylacetátu a následně byl odpařen těkavější hexan (25 kPa, 35 °C). Před analýzou HPLC byly vzorky 10krát zředěny acetonitrilem.

### **Analyza HPLC**

Ke stanovení 18 PAU byl použit kapalinový chromatograf Waters 2695 s DAD detektorem Waters 2996 a sériovým fluorescenčním detektorem Waters 2475. Látky byly separovány na koloně LiChrospher PAH (5  $\mu\text{m}$ ) o délce 250 mm při teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$ . Pro analýzu byla použita gradientová eluce. Mobilní fáze obsahovala směs rozpouštědel methanol:acetonitril (1:1, v/v) (A) a deionizovanou vodu (B). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Program začal isokraticky 6 min. při použití 66 % (A). Poté se poměry měnily lineárně do 100 % (A) ve 23 min. a opět následoval isokratický krok 20 min. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 254 nm, kde vykazuje většina PAU absorpci. Jednotlivé PAU byly identifikovány na základě charakteristických UV spekter, která byla měřena v rozsahu 210-400 nm. Pro kvantifikaci acenaftenu byla zvolena vlnová délka 230 nm. Ke kvantitativnímu vyhodnocení zbývajících PAU byl použit citlivější a selektivnější fluorescenční detektor. Jednotlivé píky byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů s příslušnými standardy.

### **Denaturační gradientová elektroforesa (DGGE)**

DNA získaná izolací pomocí komerčního kitu NucleoSpin Soil (Macherey-nagel) byla použita k amplifikaci bakteriálního úseku 16S rDNA pomocí primerů 984GCf (obsahující GC-svorku) a 1378r (Wagner *et al.*, 2009). Přítomnost vnesených bakterií ve vzorcích zemin byla zjišťována porovnáním s DNA úseky z čistých bakteriálních kultur. Vzorky DNA byly separovány v polyarylamidovém gelu s gradientem denaturačních činidel (močovina o koncentraci 7  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 40% formamid) 60 % a 35 % při teplotě 60  $^{\circ}\text{C}$  a napětí 80 V po dobu 20 hodin. Gely byly vyhodnocovány v programu BioNumerics 7.0 (Applied Maths, USA).

### **454 sekvenace**

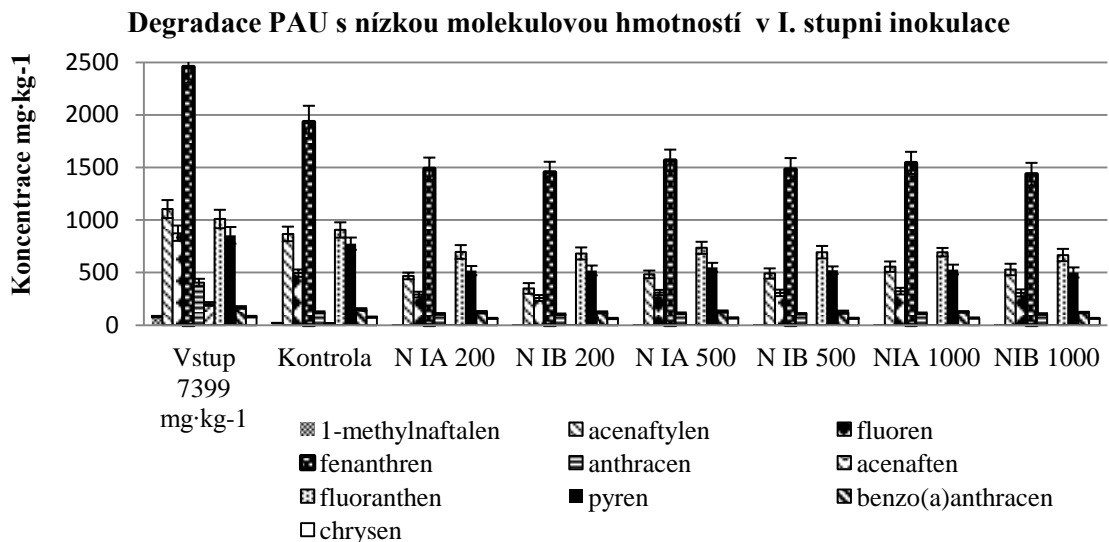
Tato metoda sloužila k porovnání analyzovaných sekvencí (vzorky zemin) s referenčními (sekvence čistých bakteriálních kultur). Přítomnost dané bakterie byla stanovena na základě míry shody s referenční sekvencí vyšší než 97 %.

### **Výsledky a diskuse**

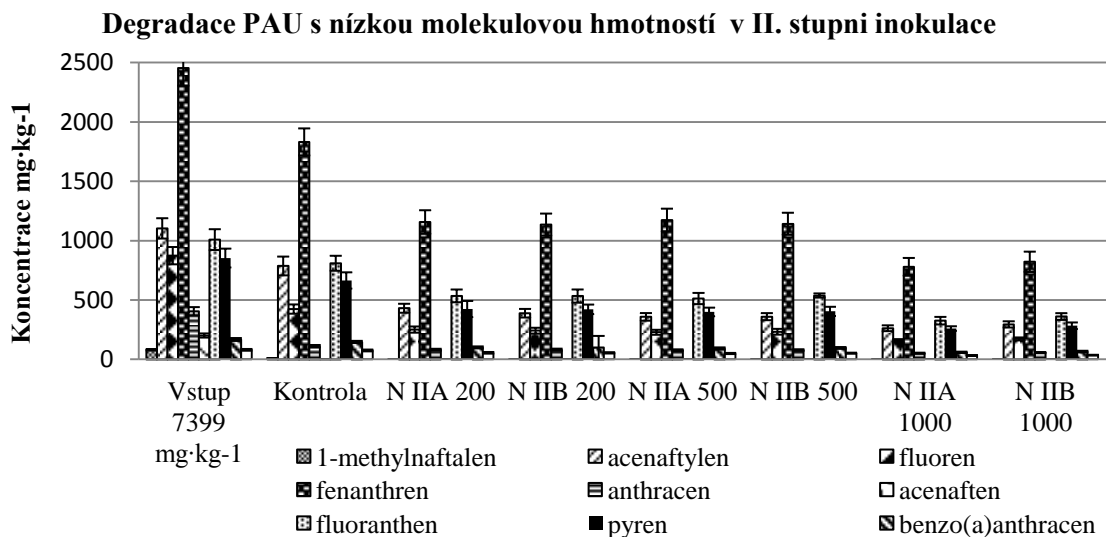
Při sledování efektivity vneseného inokula stanovením degradace přítomných PAU, byl v I. stupni inokulace zaznamenán po 4 měsících především úbytek PAU s nízkou molekulovou hmotností (2, 3 a 4 aromatické kruhy), které v tomto typu zeminy převažovaly (obr. 1). K největšímu úbytku došlo v případě 1-methylnaftalenu. Jeho 100% pokles je pravděpodobně důsledkem volatilizace, k čemuž přispívá nízká molekulová hmotnost a vstupní koncentrace této sloučeniny. K úplnému odstranění došlo také v případě acenaftenu, a to jak v zeminách s vnesenými bakteriálními kmeny, tak v kontrolním vzorku. V důsledku pravidelného zvlhčování, přístupu kyslíku a obohacení živinami (hnojivo NPK) došlo zřejmě ke stimulaci autochtonní mikrobiální populace. Tento jev byl zaznamenán u všech přítomných sloučenin. Nejmenší podíl přirozené mikrobiální populace na degradaci byl detekován u pyrenu, jehož stanovený úbytek v kontrolním vzorku činil 9 % a v ostatních variantách inokulovaných vzorků se tato hodnota pohybovala okolo 40 % výstupní koncentrace.

V II. stupni inokulace reálně kontaminované zeminy (obr. 2) byla také výrazně podpořena autochtonní mikroflóra. V tomto případě jsou ale znatelné rozdíly v jednotlivých variantách použitého poměru inokula k neaktivované zemině. Největší míra degradace všech přítomných PAU byla zaznamenána u nejvyššího ředění inokula. To by mohlo v případě praktického využití znamenat nižší náklady a snazší proveditelnost bioaugmentace. U nejvyššího ředění inokula došlo k minimálnímu snížení o 55 % ze vstupní koncentrace jednotlivých stanovených nízkomolekulárních PAU.

V poskytnuté reálně kontaminované zemině byly přítomny v nižších koncentracích také PAU s vysokou molekulovou hmotností. Tyto látky jsou méně degradovatelné z důvodu jejich nízké rozpustnosti a biodostupnosti. Podíl přirozeně se vyskytujících mikroorganismů na jejich degradaci nebyl tak výrazný jako u PAU s nízkou molekulovou hmotností.



**Obr. 1:** Graf degradace PAU s nízkou molekulovou hmotností v I. stupni inokulace kontaminované zeminy po 4 měsících.



**Obr. 2:** Graf degradace PAU s nízkou molekulovou hmotností v II. stupni inokulace kontaminované zeminy po 4 měsících.

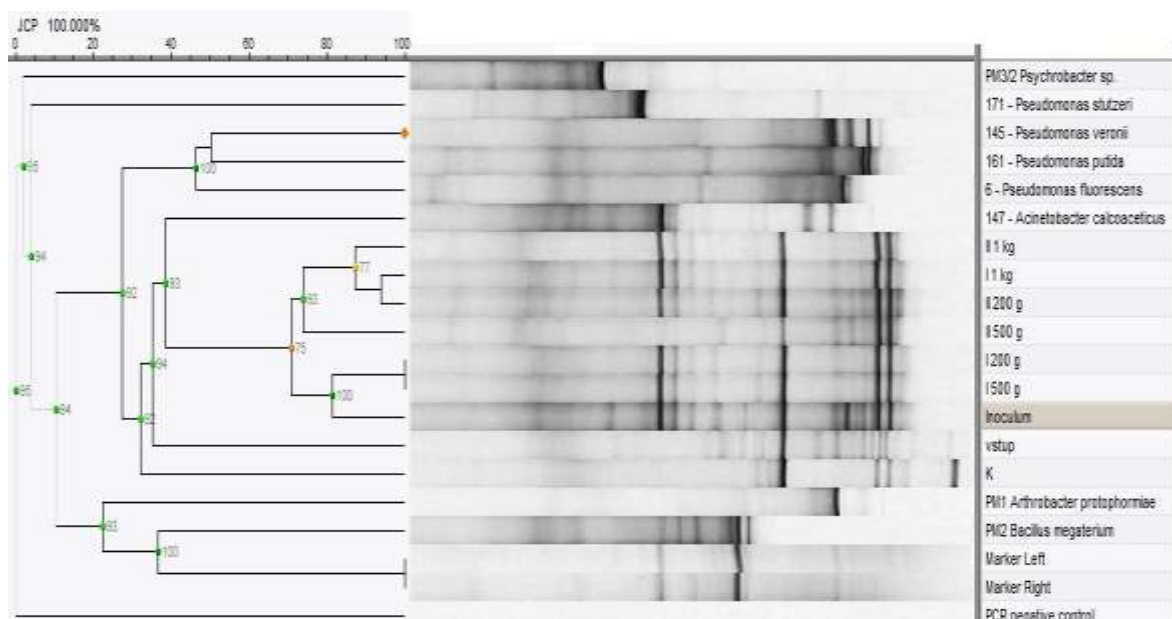
I přes dlouhodobé vystavení vysokým koncentracím těchto polutantů neprokázaly přítomné mikroorganismy schopnost tyto látky dostatečně transformovat pouze pomocí stimulace. Tato zemina je příkladem toho, že v některých případech je vnesení exogenního biologického činitele přínosem.

Za časový úsek 4 měsíce byly schopny stimulované autochtonní mikroorganismy degradovat 25-30 %. Naopak Li *et al.* (2009) dosáhli vnesením kombinovaného inokula hub a bakterií 40% degradace přítomných PAU, nicméně autochtonní mikroorganismy dosáhly stejného výsledku, pouze za delší časový úsek přítomných PAU. Ve vzorcích zemín obohacených o bakteriální izoláty byla stanovena celková degradace všech měřených PAU v I. stupni inokulace okolo 50 % a v II. stupni inokulace dosahovala až 70 % (tab. 1). Významnějších úbytků koncentrace dosáhli Jacques *et al.* (2008) při degradaci anthracenu, fenanthrenu a pyrenu v kontaminované zemině, při použití inokula hub a bakterií, a to 99 %. V rámci testování vhodného množství inokula pro poloprovozní a provozní testy byla shledána nejefektivnější varianta 1:100, tedy v případě této práce přidání 10 g inokulované zeminy do 1000 g neinokulované. Naopak v důsledku malého množství inokula Silva *et al.* (2009) po

3 měsících nezaznamenali pozitivní vliv na míru degradace PAU v žádné z variací použitých kosorcií. Naopak přítomná mikrobiální mikroflóra v lesní zemině degradovala přítomní PAU ve větší míře.

**Tab. 1:** Degradace celkového množství PAU v [%] za 4 měsíce v I. a II. stupni inokulace v reálně kontaminované zemině

Suma degradace PAU [%]	
Kontrola I	25,6 ± 2,0
N IA 200	47,6 ± 3,8
N IB 200	50,4 ± 4,3
N IA 500	44,8 ± 3,3
N IB 500	47,1 ± 3,8
N IA 1000	45,0 ± 3,4
N IB 1000	48,0 ± 4,1
Kontrola II	32,2 ± 2,6
N IIA 200	57,5 ± 5,8
N IIB 200	58,5 ± 7,0
N IIA 500	59,5 ± 5,2
N IIB 500	59,3 ± 4,6
N IIA 1000	72,9 ± 6,7
N IIB 1000	70,7 ± 6,6



**Obr. 3:** Dendrogram získaný na základě DGGE gelu po separaci vzorků 16S rDNA z kontaminované zeminy po zpracování v programu BioNumerics 7.0 (Applied Maths, USA). Na horizontální ose je uveden koeficient podobnosti v [%] a na vertikální ose jsou vyneseny vzorky.

Gely z denaturační gradientové elektroforesy byly vyhodnoceny metodou shlukové (klastrové) analýzy pomocí programu BioNumerics 7.0 (Applied Maths, USA). Podobnost, či odlišnost jednotlivých skupin vzorků (klastrů) na základě bakteriální 16S rDNA je vizualizována pomocí dendrogramu. Z dendrogramu (obr. 3) je patrná odlišnost vstupní zeminy a kontroly neobohacené o bakteriální izoláty od jednotlivých vzorků zemin. Tato skutečnost potvrzuje přímnost vnesených bakteriálních izolátů a zároveň schopnost adaptace těchto kmenů na přítomné podmínky. Schopnost

adaptace vykazuje především vnesený bakteriální kmen *Acinetobacter calcoaceticus*, jehož přítomnost byla zaznamenána pouze u inokulovaných zemin. Pomocí klastrové analýzy byla prokázána také vysoká podobnost variabilních úseků 16S rDNA u bakterií rodu *Pseudomonas*, která zároveň znemožňuje odlišení kmenů *P. putida* od *P. veronii*, které jsou pravděpodobně v inokulované i vstupní zemině přítomné. V těchto zeminách se také pravděpodobně vyskytují *P. fluorescens*, *P. stutzeri* a *Arthrobacter protophormiae*, jejichž přítomnost nebyla zaznamenána v kontrole. Přítomnost bakterií *Psychrobacter* sp. a *Bacillus megaterium* nebyla zaznamenána v žádném ze vzorků.

Metoda DGGE se ukázala jako nedostačující pro odlišení všech použitých bakteriálních kmenů. Pro stanovení přítomnosti jednotlivých kmenů byla dále použita 454 sekvenace. Touto metodou byla potvrzena přítomnost bakterií *Acinetobacter calcoaceticus* a *Pseudomonas putida*. Metodou DGGE nedošlo k odlišení tohoto kmene od *P. veronii*. Vzorky získané z nejvyššího ředění inokula v II. stupni inokulace obsahovaly všechny vnesené bakteriální kmeny, kromě bakterií *Psychrobacter* sp., *Pseudomonas veronii* a *Bacillus megaterium*. V této variantě byla také zaznamenána nejvyšší míra degradace přítomných PAU.

### **Závěr**

Při použití nové metody vícestupňové inokulace kontaminované zeminy poskytnutými bakteriálními preparáty bylo dosaženo za časový úsek 4 měsíce degradace až 70 % přítomných PAU. Stimulací autochtonních mikroorganismů došlo ke snížení o 25-30 % z celkového množství PAU. Z 8 vnesených bakteriálních kmenů vykazovaly schopnost adaptace především *Acinetobacter calcoaceticus* a *Pseudomonas putida*. V rámci testování vhodného množství inokula pro poloprovozní a provozní testy byla shledána nejefektivnější varianta 1:100, v které byly detekovány navíc také bakterie *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* a *Arthrobacter protophormiae*.

### **Poděkování**

Tato práce byla finančně podpořena Technologickou agenturou ČR, projekt číslo TA01020106.

### **Literatura:**

- Jacques R. J. S., Okeke B. C., Bento F. M., Teixeira A. S., Peralba M. C. R., Camargo F. A. O. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Biosource Technology 99, pp. 2637-2643.
- Li X., Lin X., Li P., Liu W., Ma F., Chukwuka K. S. 2009. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. J. Hazard. Mater. 172, pp. 601-605.
- Silva I. S., Santos E. C., Menezes C. R., Faria A. F., Franciscon E., Grossman M., Durrant L. R. 2009. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. Biosource Technology 100, pp. 4669-4675.
- Scullion J. 2006. Remediating polluted soils. Naturwissenschaften 93, 51-65.
- Wagner A. O., Malin C., Illmer P. 2009. Application of denaturing high-performance liquid chromatography in microbial ecology: fermentor sludge, compost and soil community profiling. Appl. Environ. Microb. 75, pp.956-964.
- Yu S. H., Le L., Wong Y. S., Tam N. F. Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Environmental International 31, pp.149-154.
- Yuan S. Y., Chang J. S., Yen J. H., Chang B. V. 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. Chemosphere 43, 273-278.