

Gabriela LYČKOVÁ * , Radmila KUČEROVÁ ** , Peter FEČKO * , Iva PEČTOVÁ ******

BIODEGRADATION OF PAHS, PCBS AND PHC IN SEDIMENTS
FROM ČERNÝ PŘÍKOP (CZECH REPUBLIC)

BIODEGRADACE PAU, PCB A NEL VE VZORKU SEDIMENTŮ
Z ČERNÉHO PŘÍKOPU (ČESKÁ REPUBLIKA)

Abstract

The thesis deals with the issue of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and petroleum hydrocarbons in the sediments sample from Černý příkop. The sediments of Černý příkop constitute an important environmental load for the territory of Ostrava City. The sediment differs from ordinary soil matters by its high content of natural organic substances; the TOC content is 37 %, to which the PAHs and PCBs primarily adsorb. Standard species of pure bacterial cultures of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus* sp. were used for the biodegradation. Regardless of the high efficiency of degradation of the monitored pollutants, the limit values, specified by the decree no. 294/2005 Coll. on conditions of storage of waste on dumps and its use on terrain surface, were not achieved. The conclusions and possible proposals of measures were elaborated as a basis for further long-term monitoring.

Abstrakt

Práce se zabývá biodegradací polycyklických aromatických uhlovodíků, polychlorovaných bifenyly a nepolárních extrahovatelných látek ve vzorku sedimentů z Černého příkopu. Sedimenty Černého příkopu představují významnou ekologickou zátěž na území města Ostravy. Od běžných zemin se sediment liší vysokým obsahem přirozených organických látek, obsah TOC je 37 %, na které se PAU a PCB primárně adsorbují. Pro biodegradaci byly použity standardní druhy čistých bakteriálních kultur *Pseudomonas putida* a *Rhodococcus* sp. I přes vysokou účinnost odbourávání sledovaných polutantů nebylo dosaženo limitních hodnot stanovených vyhláškou č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu. Závěry a případné návrhy opatření byly zpracovány jako podklad pro další dlouhodobá sledování.

Key words: organic pollutants, contamination, biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, petroleum hydrocarbons

1 INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons belong to widely spread pollutants. Many of them show genotoxic characteristics. For their ability to persist in the environment for long and for their serious effects on health (manifesting toxic, carcinogenic and mutagenic properties) they are considered typical representatives of persistent organic pollutants (POPs). They have an extreme ability to bind onto solid sorbents or particles and in living organisms (bioaccumulation). The dominant concentrations of PAHs in the environment come from human activities, especially the combustion of fossil fuels. They chiefly get into the atmosphere during the production of energy, waste combustion, from traffic, from coke production and also from smoking (Kučílek, 1994).

Other representatives of persistent organic substances are the polychlorinated biphenyls, which have been manufactured since 1929 as chemical substances for industrial use. After having identified negative impacts on people's health, in 1984 their production was forbidden in the former Czechoslovakia (in Chemko Strážské in Slovakia). However, until 1989 they were used as raw materials for manufacturing of other products. To the date they are to be found mainly in transformers and condensers and they are probably the most difficult substance in wastes. PCBs are also formed as unintentional by-products in a number of industrial productions (e.g. chemical production of various chlorine compounds, etc.). They are very stable, chlorine-organic substances, almost water insoluble but they combine with fats (Davis, 1998).

VŠB-TU Ostrava, ul. 17. listopadu 15, Ostrava-Poruba, 708 33, * Ing, e-mail: gabriela.lyckova@vsb.cz, ** doc.Dr.Ing., e-mail: radmila.kucerova@vsb.cz, *** prof. Ing. CSc., e-mail: peter.fecko@vsb.cz, **** Ing. Ph.D.

Petroleum hydrocarbons (PHC) – extractable, non-polar substances or oil substances. They include a wide group of mainly non-polar hydrocarbons, originating from mineral oils, diesel oil, petrol and other oil substances. Oil contamination of all kinds is significant nowadays.

With regard to low solubility of PAHs in water and ability to adsorb onto small particles of organic substances, the concentration of PAHs in sediments increases considerably. The sorption of PAHs in sediments depends on the organic carbon content (Raclavská, 2003). Determination of organic carbon is unsubstitutable in assessing biological decomposability of organic substances (Pitter, 1999).

This study was focused on assessment of the ability of biodegradation of the above-mentioned pollutants, which are contained in the sediments of Černý příkop in large quantities.

The stream of Černý příkop is situated in the district of the city of Ostrava, the municipality of Mariánské Hory, Moravská Ostrava and Přívoz. Černý příkop is an artificial drainage channel built in 1952 for draining of the construction site of the new Jan Šverma Coking Plant in Mariánské Hory.

This locality is one of the most polluted in Ostrava; it is being polluted by the Jan Šverma Coking Plant, BorsodChem MCHZ, ÚČOV (waste water treatment plant) and other companies in the territory in question all the way to its outlet into the Odra River.

Černý příkop drains the industrial wastewater from several plants in the surroundings and from the Central Waste Water Treatment Plant of Ostrava City in the Odra River. The main source of PAHs in the water and consequently in the sediments of Černý příkop is the Jan Šverma Coking Plant.

Černý příkop sediments are significant ecological burden in the area of the City of Ostrava. They are contaminated by a range of organic pollutants that have never been exactly identified.

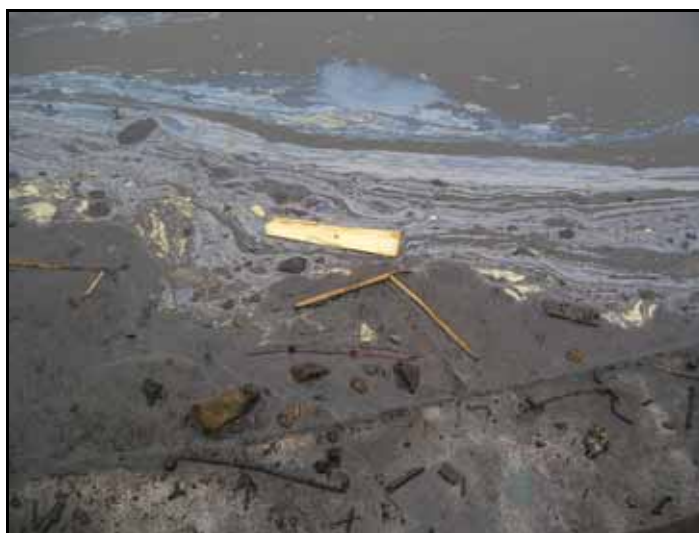


Fig. 1. Pollution of the Černý příkop locality, 2006

One of the possibilities of decontamination with concurrent preservation of the sediment properties consists in biodegradation.

2 POTENTIAL BIODEGRADATION OF PAHS, PCBS AND PHC

Biodegradation of these hazardous pollutants in the environment counts for significant prospective methods, which by means of microorganisms decompose complicated pollutants that are harmful to the environment into simpler substances (harmless ones). The principle of biodegradation technologies consists in optimization of nutrient ratios (in order to support the growth of selected microorganisms capable of degradation of the target contaminants) and application of suitably selected isolated strains of microorganisms with relevant degradation capabilities.

The decomposition of organic substances by means of microorganisms makes part of the natural carbon cycle in nature. The process of biodegradation is based on the ability of microflora to use the present pollutants as the source of carbon and energy for its own growth. The ability of microorganisms to degrade hydrocarbons has been known since 1895, when the growth of yeast on paraffin was described by Miyoshin.

Over 200 microorganism species have been identified that are able to degrade hydrocarbons; the order of their importance is as follows: heterotrophic bacteria, fungi, aerobic bacteria, actinomyces, phototrophs and oligotrophic bacteria. The most applied bacteria are of *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* and *Corynebacterium* genera (Masák, 1992). An intense research in this area has confirmed that apart from bacteria, also other microorganisms including fungi and algae can be applied.

Polyaromatic hydrocarbons are usually biologically degradable in the soil system. The polyaromatic hydrocarbons with lower molecular weight are degraded much faster than polyaromates with higher molecular weight, which are generally labelled as carcinogenic. The main requirement is that the decomposition process be complete, i.e. final decomposition to CO₂ and H₂O. The decomposition process may develop intermediate products containing dihydrodiols, phenols, aren oxides etc., which are toxic, mutagenic, carcinogenic or teratogenic substances. Moreover, the originated products are often more soluble than the original substances, which increases the risk of their harmful effects. The biodegradation of PAHs with two or three benzene rings is more intensive than that of PAHs with four or five benzene rings. PAHs with six benzene rings are very resistant. The rising molecular weight is associated with decreasing ability of their biological decomposition and prolonged time of their degradation. Raclavská holds that PAHs with two benzene rings are degraded within ten days, PAHs with three benzene rings within 100 days and PAHs with multiple rings even 5 months (Raclavská, 1998).

One of the potential removal methods of PCBs from ecosystems is their microbial degradation by means of selected microorganisms that are able to degrade PCBs under aerobic or anaerobic conditions into less hydrophobic products, or decompose them into the final products of CO₂, chlorine and water. PCB-degrading microorganisms are quite abundant in nature, the most applicable bacteria rank among the genera of *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* (Fečko, 2004).

The ability of bacteria to degrade PCBs is focused mainly on low-chlorinated congeners. Higher-chlorinated congeners can be considered resistant to biodegradation. The decomposability of the individual PCBs congeners depends on the number of atoms of chlorine in molecule; the degradation decreases with increasing number of atoms in the molecule. Apart from the number of chlorine atoms in molecule it depends also on their position in the biphenyl molecule (Rábl, 1992). The congeners with 2 chlorine atoms in ortho positions are extremely resistant, PCBs containing unsubstituted ring generally degrade faster than congeners substituted on both nuclei, less chlorinated nucleus is degraded at first (Salava et al., 2004).

Characteristics of used bacteria

Standard species of pure bacterial cultures of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus sp.* were used for the biodegradation in this study. The following sections contain their brief characteristics.

Characteristics of *Pseudomonas* bacteria

Pseudomonas putida bacteria are gram-negative, chemoorganotrophic, aerobe obligate, and aerobically respiratory metabolisms. Some species are facultative chemolithotrophic. They are straight or curved rods. Their dimensions range between 0.5 and 1.0 µm x 1.5 – 4.0 µm. They move by one or more polar-located flagella. They are arranged mainly individually or in small clusters or chains. They grow under strict aerobic conditions in common substrates, on which they form irregularly large colonies producing water-soluble exopigment (pyocyanine and fluoresceine), which diffuse into the atmosphere and dye it yellow or blue-green. Older cultures dye dark brown. The temperature range of their growth is 0 – 42 °C; the optimum temperature is 35 °C. The enzymatic activity is dependent on ecological conditions out of which the individual genders were isolated. They make use of some sugars, of which they form acids, but not gas. Many genera oxidize glucose into gluconic acid, 2-keto-gluconic and other acids. The majority of the studies genera reduce nitrates down to nitrites. They live saprophytically in soil and water. There appears a high affinity with the *Vibrio* and *Xantomonas* genera. In total, there are approximately 29 genera (Sezima, 2003).

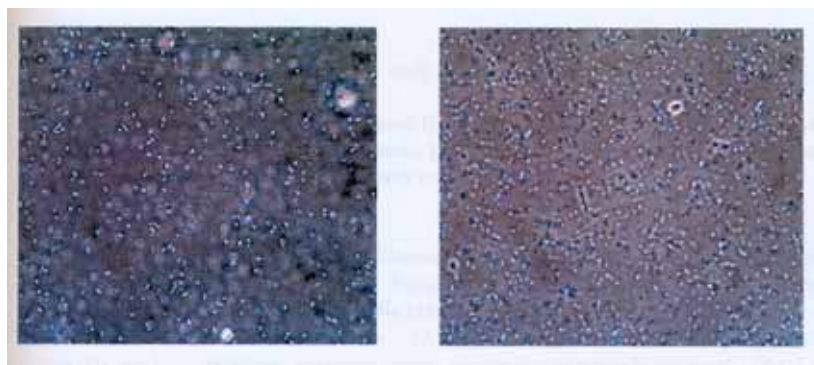


Fig. 2. *Pseudomonas putida* bacteria

Characteristics of *Rhodococcus* bacteria

These are gram-negative, chemoorganotrophic, aerobe obligate, and aerobically respiratory metabolisms. The cells are of a spheroid shape, the average size of the cells fluctuates between 0.5 and 3.5 μm ; they appear individually or two and more cells aggregate into irregular clusters, sometimes tetrads or bundles. They grow under aerobic conditions in common substrates, under the optimum temperature of 25 – 35 $^{\circ}\text{C}$. On the substrates they form shiny colonies with the dimensions of 2 – 4 μm . Many colonies precipitate pigments of various colours (pink, yellow, orange). In the nature, they occur as saprophytes (Sezima, 2003).

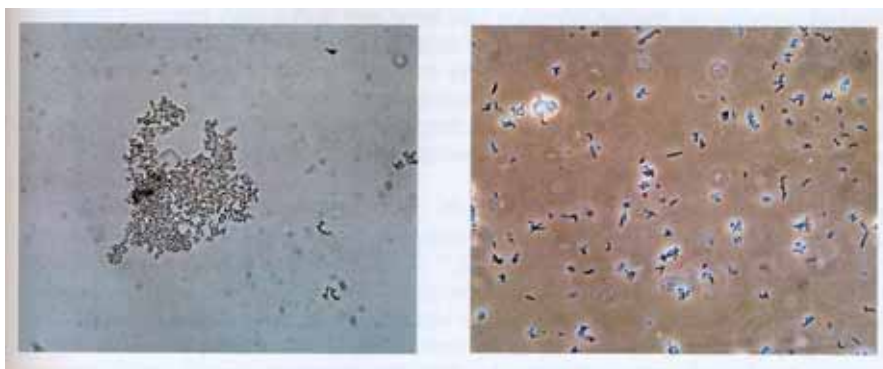


Fig. 3. *Rhodococcus* sp. bacteria

3 EXPERIMENTAL WORK METHODOLOGY

The experimental biodegradation of the selected harmful substances – PAHs, PCBs and PHC- took place with sediment samples from Černý příkop.



Fig. 4. Sampling place, Černý příkop, 2006

In this locality, 2 samples of sediments were taken, labelled as the Šverma sample and the Hráz sample. Biodegradation was carried out by means of the bacteria of *Pseudomonas putida* (Figure no. 2) and *Rhodococcus sp.* (Figure no. 3). **These microorganism cultures were acquired from the Czech collection of microorganisms** with the Natural Science Faculty at the Masaryk University in Brno.

In the course of the cultivation works the following media were made use of:

- liquid medium M1 (Beef extract Broth, Peptone, NaCl, distilled water, pH 7.2),
- liquid medium M96 (Mineral Medium with Vitamins, Media, Bacteria),

The check of bacteria viability and approximate determination of their number is done by means of a microscope. For this task we used the Carl Zeiss Jena “Amplival“ microscope and Cyrus I cell with a raster for reading the number of bacteria. The enlargement ratio of the microscope ranged from 400 (reading the number of bacteria) up to 1000-fold enlargement (observation of bacteria viability).

The determination of PHC, PAHs (anthracene, benzo(a)anthracene, benzo(b)phluorathene, benzo(k)phluorathene, benzo(a)pyrene, benzo(ghi)perylene, phenanthrene, phluorathene, chrysene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, naphthalene, pyrene) **and PCBs** (congeners No. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) was carried out in an accredited laboratory for fuels, waste and water of VÚHU, a.s. Most.

In total, **the laboratory experiment** took four weeks, individual experiments were provided concurrently. 100 g of sediment, 100 ml of bacterial solution and 500 ml of substrate were inserted into 1-litre glass containers (reactor) which were subsequently closed. Aeration (aerobic conditions) was secured by means of aquarium pumps. The required volume was gradually filled with distilled water. Samples for analyses were taken after one and four weeks.

4 RESULTS AND DISCUSSION

Revitalization of Černý příkop will be performed by mucking of sediments and with subsequently optimally selected decontamination technology. With regard to the fact that up to 50 % of total Σ PAHs is formed by biodegradable PAHs, which is apparent from the figure no. 5, the possibility of using biodegradation was verified. In order to be able to reuse the decontaminated sediment for terrain adjustments and reclamation the Σ PAHs must meet the requirements specified in table no. 10.1. (the highest permissible concentrations of pollutants in dry matter of waste) of Annex no. 10 (requirements for content of pollutants in waste used on terrain surface) of the decree no. 294/2005 Coll., on conditions of storage of wastes on dumps and their use on terrain surface. The values for

Σ PAHs (anthracene, benzo(a)anthracene, benzo(b)phluorathene, benzo(k)phluorathene, benzo(a)pyrene, benzo(ghi)perylene, phenanthrene, phluorathene, chrysene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, naphthalene, pyrene), should not exceed the limit value of 6 mg/kg of dry matter in case of sum of the individual PCB congeners (congeners No. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) it should not exceed the limit value of 0.2 mg/kg of dry matter. The specified values of PAHs, PCBs and PHC were determined in the output sample and after the first and the fourth week of biodegradation.

The figure no. 5 and no. 6 gives an overview of percentage share of the individual PAHs.

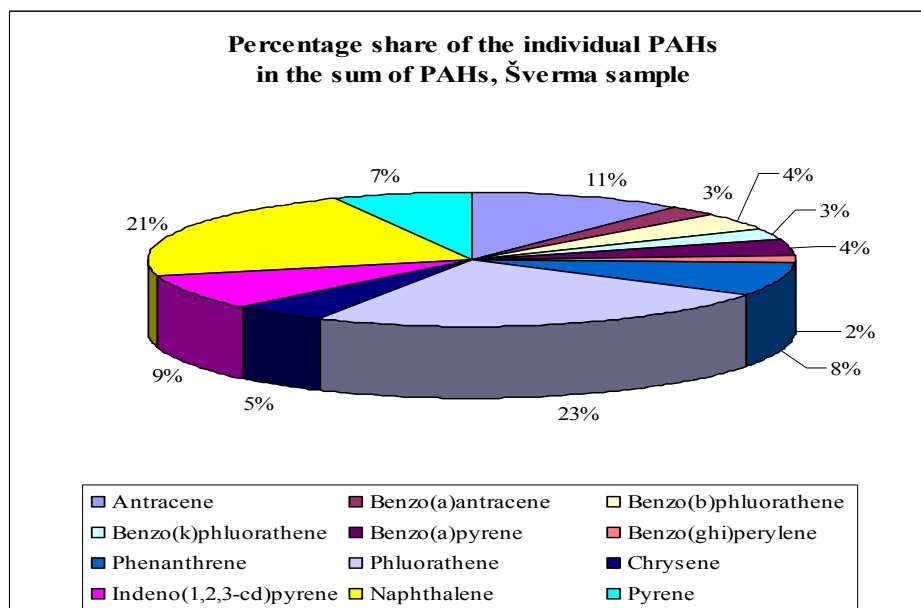


Fig. 5. Percentage share of the individual PAHs in the sum of PAHs, Šverma sample

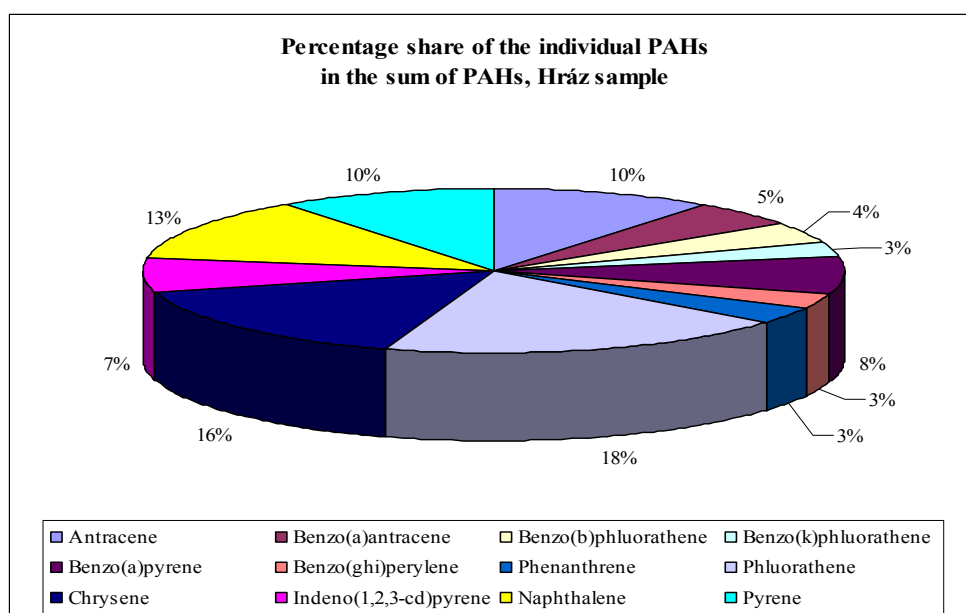


Fig. 6. Percentage share of the individual PAHs in the sum of PAHs, Hráz sample

If we compare the percentage share of polyaromatic hydrocarbons by the number conjugated benzene rings in both formulae it is clear that the highest contents in the sediments are those of phluorathene (23 % in the Šverma sample, 18 % in the Hráz sample). The Šverma sample further shows higher contents of naphthalene (21 %), the third most significant is anthracene (11 %) of the Σ PAHs. The Hráz sample further shows higher contents of chrysene (16 %), and the third most significant is naphthalene (13 %) of the Σ PAHs.

The comparison of percent share of analytes in both samples implies that Šverma sample has better properties in terms of biodegradation.

Results of bacterial biodegradation

The results of bacterial leaching applying a pure bacterial culture of *Rhodococcus sp.* imply that after one-month leaching it is possible to remove 96 % of PHC, 90 % of PAHs and 50 % of PCBs from the **sample Šverma**. The results are shown in Table no. 1. It is apparent from the acquired results that the application of this bacterial culture is suitable for the degradation of PHC and PAHs. The elimination of PCBs is lower.

Table no. 1: Process in degradation of selected pollutants depending on time by means of *Rhodococcus* sp. bacteria (Šverma sample)

	PHC	Σ PAHs	Σ 7 congeners of PCB
	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter
Input	3850	735	0,222
Week	400	157,8	0,178
4 weeks	160	70,2	0,110

As for the **Hráz sample**, after one-month leaching it was possible to remove 70 % of PHC, 75 % of PAHs and 27 % of PCBs from the sample. The results are displayed in Table no. 2. The acquired results imply that the application of the above-mentioned bacterial culture is suitable for the degradation of PAHs. It degrades PHC but the result values with PCBs are lower.

Table no. 2: Process in degradation of selected pollutants depending on time by means of *Rhodococcus* sp. bacteria (Hráz sample)

	PHC	Σ PAHs	Σ 7 congeners of PCB
	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter
Input	1850	419,3	0,436
Week	650	234,4	0,373
4 weeks	550	107	0,318

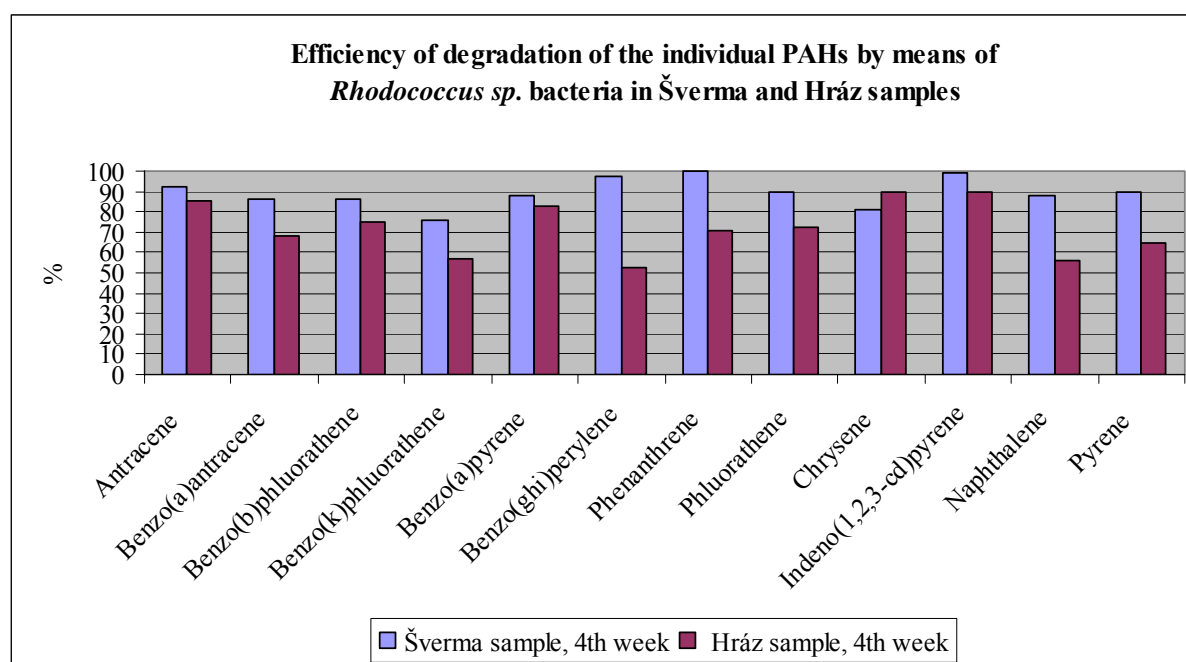


Fig. 7. Efficiency of degradation of the individual PAHs by means of *Rhodococcus* sp. bacteria in Šverma and Hráz samples

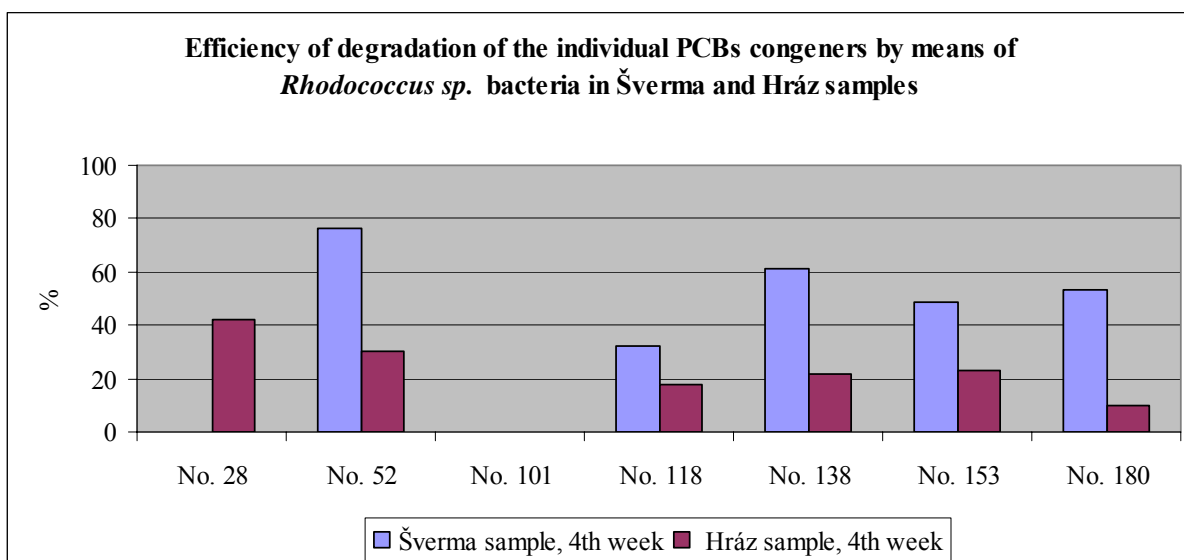


Fig. 8. Efficiency of degradation of the individual PCBs congeners by means of *Rhodococcus sp.* bacteria in Šverma and Hráz samples

The results of bacterial leaching applying a pure bacterial culture of *Pseudomonas putida* imply that after one-month leaching it is possible to remove 51 % of PHC, 77 % of PAHs and 57 % of PCBs from the **Šverma sample**. The results are shown in Table no. 3. It is apparent from the obtained results that the application of this bacterial culture is suitable for the degradation of PAHs. However, the elimination of PHC and PCBs is lower.

Table no. 3: Process in degradation of selected pollutants depending on time by means of *Pseudomonas putida* bacteria (sample Šverma)

	PHC	Σ PAHs	Σ 7 congeners of PCB
	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter
Input	3850	735	0,222
Week	3750	461	0,154
4 weeks	1900	167,4	0,095

As for the **Hráz sample**, after one-month leaching it was possible to remove 85 % of PHC, 65 % of PAHs and 45 % of PCBs. The results are displayed in Table no. 4. It is apparent from the results that the application of the bacterial culture is suitable for the degradation of PHC and PCBs. The result values with PAHs are lower.

Table no. 4: Process in degradation of selected pollutants depending on time by means of *Pseudomonas putida* bacteria (Hráz sample)

	PHC	Σ PAHs	Σ 7 congeners of PCB
	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter	mg/kg of dry matter
Vstup	1850	419,3	0,436
Týden	360	219,2	0,348
4 týdny	280	147,6	0,241

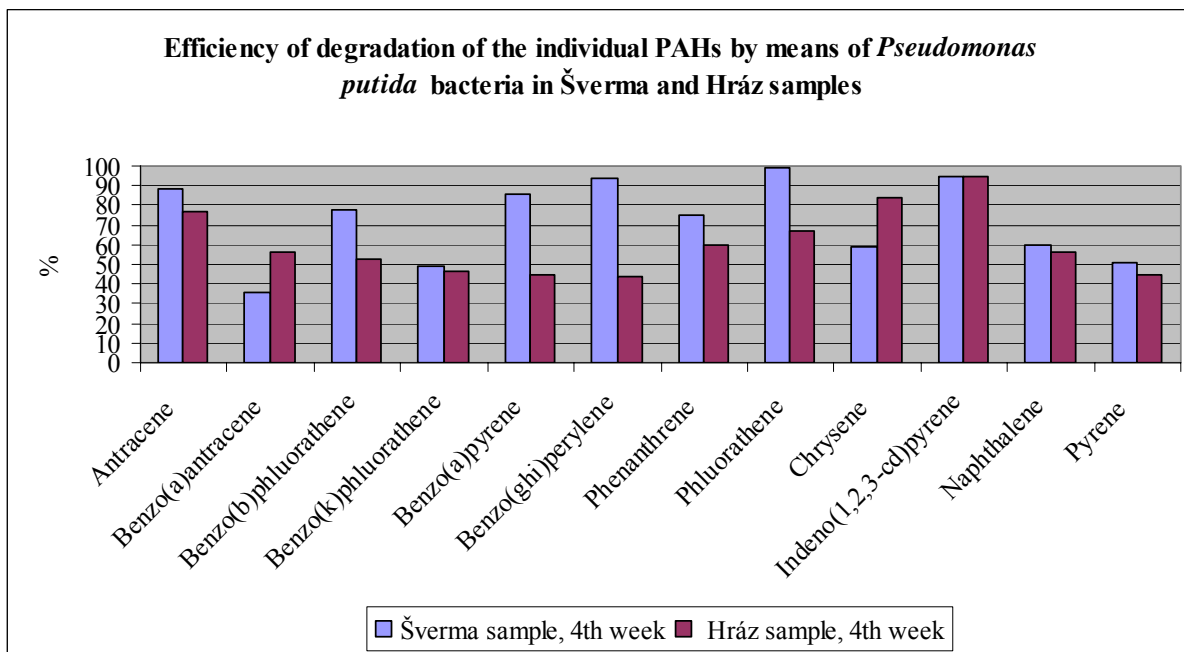


Fig. 9. Efficiency of degradation of the individual PAHs by means of *Pseudomonas putida* bacteria in Šverma and Hráz samples

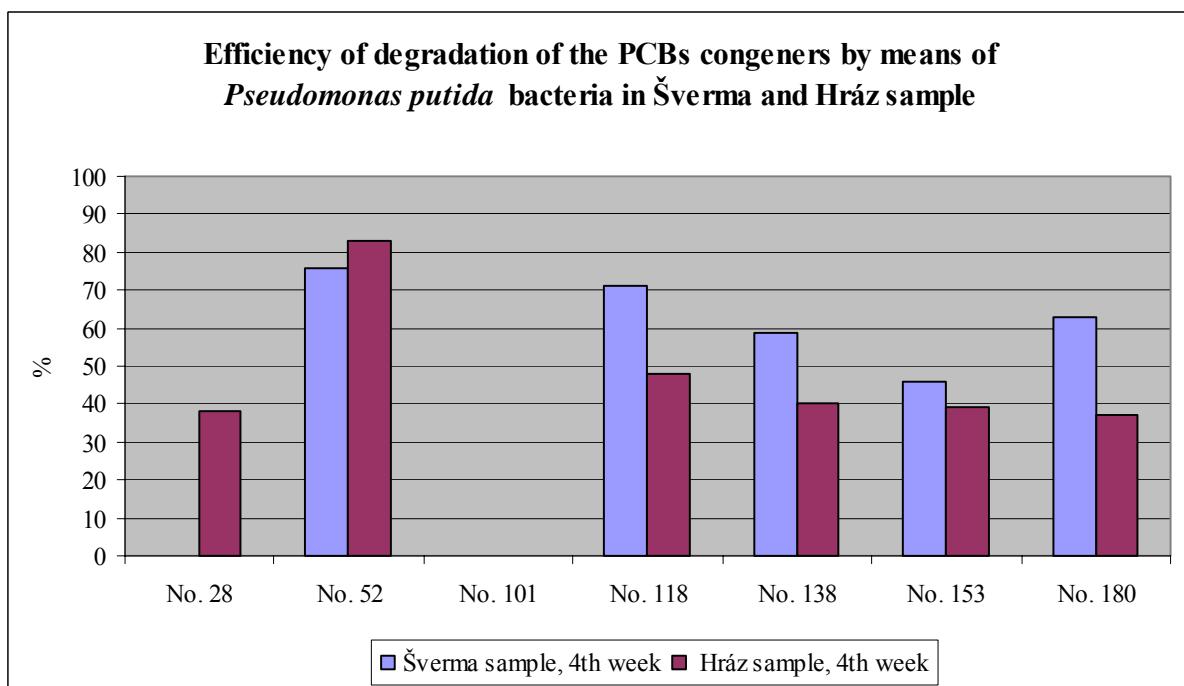


Fig. 10. Efficiency of degradation of the PCBs congeners by means of *Pseudomonas putida* bacteria in Šverma and Hráz samples

The following charts show a comparison of the efficiency of biodegradation by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria. The charts no. 11 and 12 compare the efficiency of biodegradation of the individual analytes of Σ PAHs and individual congeners of Σ PCBs in the Šverma sample and the charts no. 13 and 14 compare the efficiency of biodegradation of the individual analytes of Σ PAHs and individual congeners of Σ PCBs in the Hráz sample.

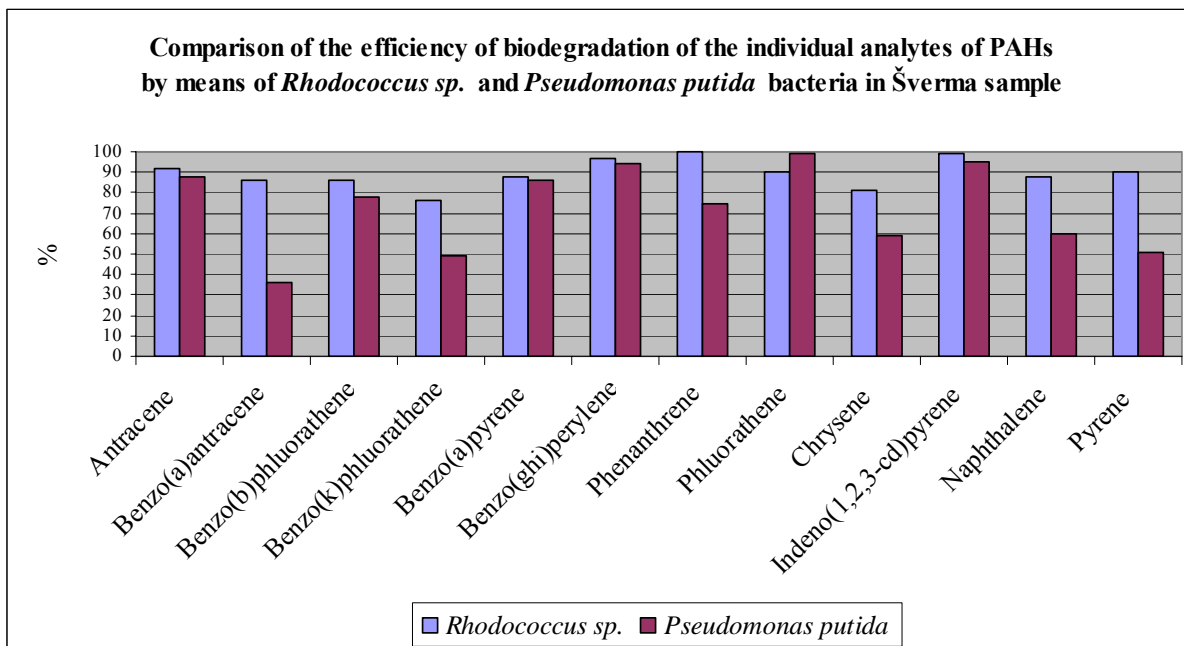


Fig. 11. Comparison of the efficiency of biodegradation of the individual analytes of the Σ PAHs by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria in Šverma sample

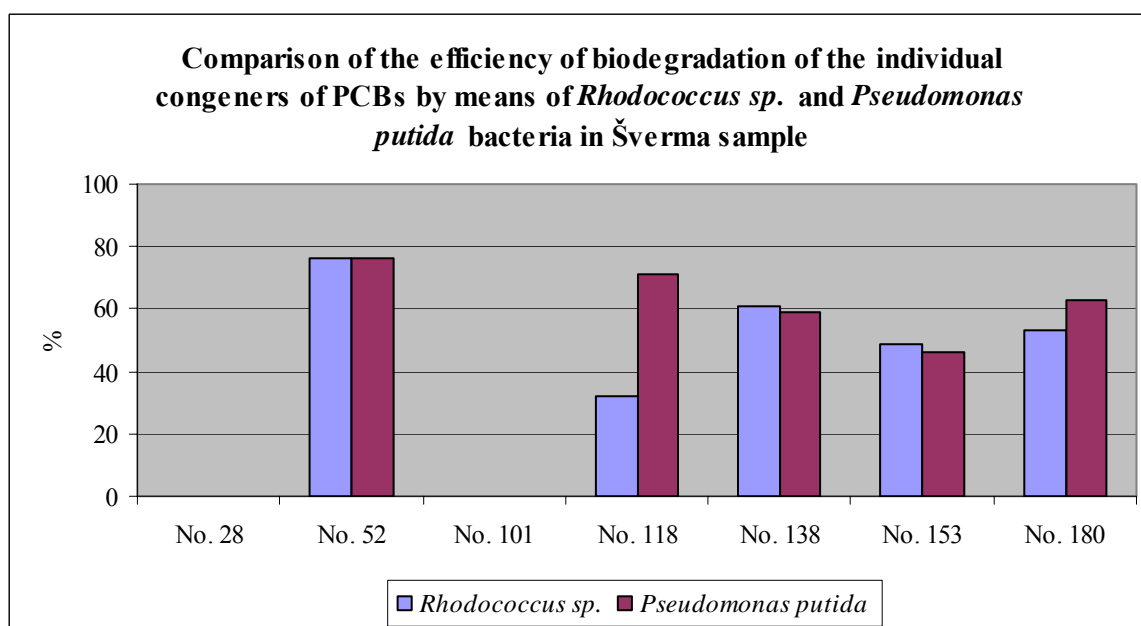


Fig. 12. Comparison of the efficiency of biodegradation of the individual congeners of Σ PCBs by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria in Šverma sample

The chart no. 11 implies that the degradation of the individual analytes of Σ PAHs in the Šverma sample is better done with the *Rhodococcus sp.* culture, which was more efficient in degradation of all the individual analytes apart from phluorathene; in this case the efficiency of degradation of the individual bacteria differed by 9 %. The efficiency of degradation of the individual congeners of Σ PCBs was significantly different; the *Rhodococcus sp.* bacteria were more efficient for degradation of congeners no. 52, 138, 153. In congeners no. 118 and 180 the *Pseudomonas putida* bacteria were more efficient. It was impossible to degrade the congeners no. 28 and 101 even with *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida*; the degradation efficiency was in this case equal to zero.

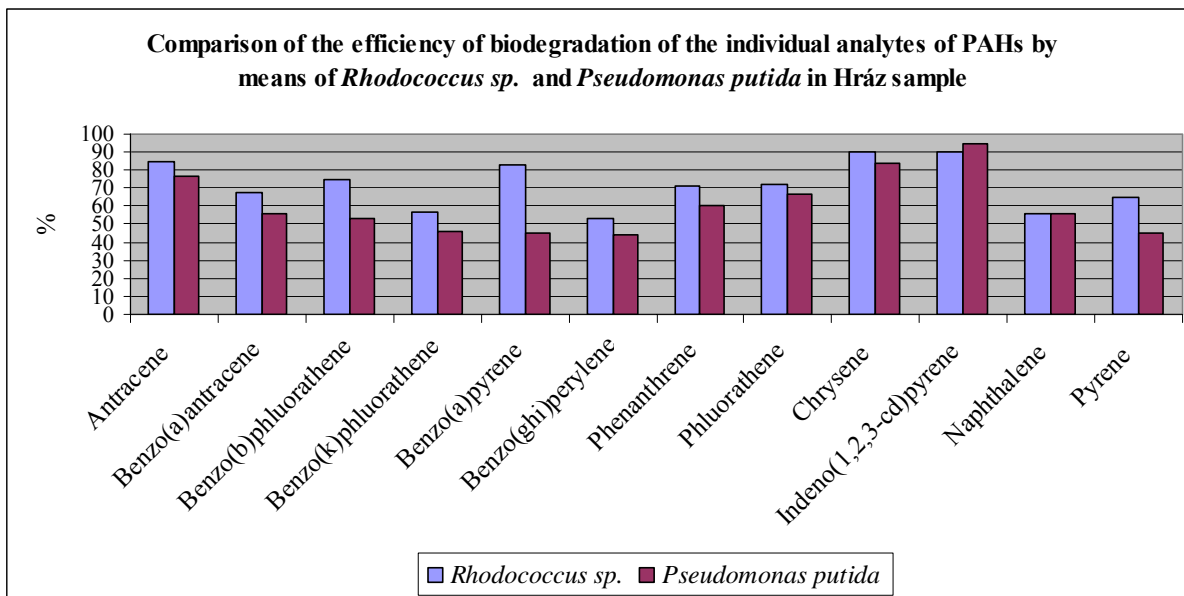


Fig. 13. Comparison of the efficiency of biodegradation of the individual analytes of Σ PAHs by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* in Hráz sample

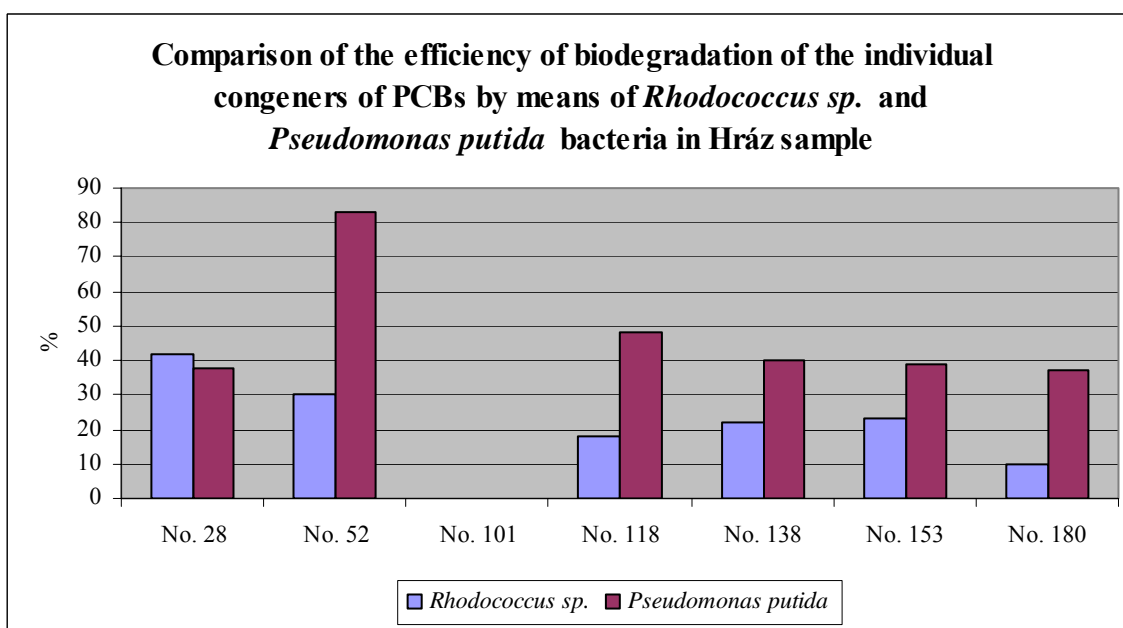


Fig. 14. Comparison of the efficiency of biodegradation of the individual congeners of Σ PCBs by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria in Hráz sample

The degradation of the individual analytes of Σ PAHs in the Hráz sample was the most efficient with the bacterial culture *Rhodococcus sp.* (with the exception of indeno(1,2,3-cd)pyrene analyte; the efficiency of degradation of the individual bacteria differed by 5 %, in case of naphthalene the efficiency of both bacteria was identical), as shown in the chart no. 13. The chart no. 14 implies that the degradation of the individual congeners of Σ PCBs is more efficient with bacterial culture *Pseudomonas putida*, with an exception of congener no. 28, in which the degradation efficiency is by 4 % better with *Rhodococcus sp.* bacteria. The congener no. 101 in this case failed to be degraded, the efficiency was zero, both using the *Rhodococcus sp.* and with *Pseudomonas putida* bacterial cultures.

CONCLUSION

The objective of the paper was a laboratory check of biodegradation of PHC, PAHs and PCBs from sediments from the Černý příkop locality. In this stage of the research, the biodegradation proved effective by applying pure bacterial cultures of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus sp.* as some organic substances were eliminated even in 100% (especially phenanthrene by bacteria *Rhodococcus sp.*, Šverma sample).

The chart no. 15 shows the efficiency of biodegradation of PAHs, PCBs and PHC by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria.

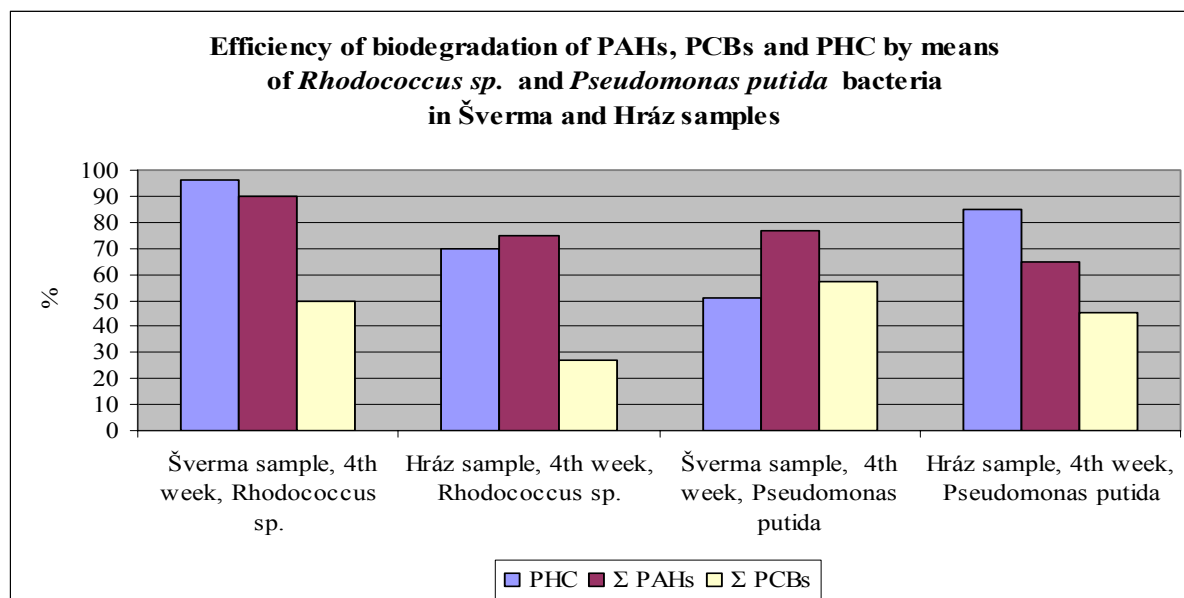


Fig. 15. Efficiency of biodegradation of PAHs, PCBs and PHC by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria in Šverma and Hráz samples.

As the chart shows, the acquired results imply that the bacterial culture of *Pseudomonas putida* is more convenient for degradation PCBs and the bacterial culture *Rhodococcus sp.* is more convenient for degradation PAHs and PHC. It was affirmed for the Hráz sample and for the Šverma sample as well.

The laboratory results imply that the degradation of the individual analytes of PAHs was different. In case of the highest share of the individual analytes of ΣPAHs in Šverma sample, which is shown in figure no. 5, the efficiency of degradation of fluoranthene was the highest (99 %) with the bacteria *Pseudomonas putida*. As per the Hráz sample, phluorathene with the highest percent share was degraded with 72 % degradation efficiency by means of *Rhodococcus sp.* bacteria.

In the next phase of the research, it is necessary to target the elimination of particular PAHs especially the elimination of benzo(a)pyrene, one of the most serious PAHs, which occurs in very high concentrations in Černý příkop sediments. In the frame of the PCBs monitoring, it is necessary to focus on the elimination of particular congeners, especially the congener No. 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl) since the elimination of these congeners was not successful and the biodegradation effect was 0 % in this case, i.e. for the Hráz sample and for the Šverma sample as well, applying pure bacterial cultures of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus sp.* as well.

It is possible to conclude that in spite of the possible biodegradation both in the Šverma sample and in the Hráz sample the limit Σ PAHs values specified in table no. 10.1. (the highest permissible concentrations of pollutants in dry matter of waste) of Annex no. 10 (requirements for content of pollutants in waste used on terrain surface) of the decree no. 294/2005 Coll., on conditions of storage of wastes on dumps and their use on terrain surface, were not achieved. The achieved results of biodegradation imply that the only problem indicator is ΣPAHs, which exceeds the limit value of 6 mg/kg approximately twenty times (the value range from 70.2 to 167.4 mg/kg in dry matter). In the ΣPCBs indicator the limit value of 0.2 mg/kg was achieved in Šverma sample by means of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* bacteria, the limit concentrations were exceeded only slightly.

Better results could be reached by prolonging the biodegradation time or by application of an adapted bacterial culture, or possibly by adjustment of optimum conditions during the biodegradation process.

ACKNOWLEDGMENTS

The author of the paper would like to thank to the Technical University of Ostrava, Faculty of Mining and Geology for the support.

Project originated from financial support of internal doctoral grant IGS 2101/546.

REFERENCES

- [1] KUŽÍLEK V.: Polycyklické aromatické uhlovodíky v hydrosféře, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka v Praze, Praha, 1994
- [2] DAVIS M.L., Cornwell D.A.: Introduction to Environmental Engineering, The McGraw-Hill Companies, Inc., USA, 1998
- [3] MASÁK J. at al.: Speciální mikrobiální technologie, VŠCHT, Praha, 1992
- [4] RACLAVSKÁ H.: Znečištění zemin a metody jejich dekontaminace, VŠB-TU Ostrava, 1998
- [5] FECKO P. at al.: Environmentální biotechnologie, VŠB-TU Ostrava, 2004
- [6] SALAVA et. al.: Výzkum a pilotní ověřování sanačních technologií a způsobů průzkumným postupů při odstraňování starých ekologických zátěží, VaV/730/2/03, dílčí zpráva za III. kvartál r. 2004, Ekosystem spol. s.r.o., Praha, 2004
- [7] SEZIMA T.: Biodegradace vybraných škodlivin v půdách a vodách, doktorská disertační práce, VŠB-TU Ostrava, 2003
- [8] RABL V.: Polychlorované bifenyly – výroba, složení, vlastnosti, Sborník referátů – Polychlorované bifenyly, Praha, 1992
- [9] Vyhláška č. 294/2005 Sb., “o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu”, příloha č. 10: požadavky na obsah škodlivin v odpadech využívaných na povrchu terénu.
- [10] RACLAVKA H.: Polyaromatické uhlovodíky (PAU) v sedimentech z OKR. In: Iniciece přirozených ekosystémů poddolované krajiny pro process obnovy území Karvinska, VŠB-TU Ostrava, dílčí úkol 3, 2003
- [11] PITTER P.: Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 1999

RESUMÉ

Úvod

Tato práce se zabývá biodegradací polycyklických aromatických uhlovodíků, polychlorovaných bifenyly a nepolárních extrahovatelných látek ve vzorku sedimentů z Černého příkopu. Sedimenty Černého příkopu představují významnou ekologickou zátěž na území města Ostravy. Od běžných zemin se sediment liší vysokým obsahem přirozených organických látek, obsah TOC je 37%, na které se PAU a PCB primárně adsorbují. Pro biodegradaci byly použity standardní druhy čistých bakteriálních kultur *Pseudomonas putida* a *Rhodococcus sp.* Závěry a případné návrhy opatření byly zpracovány jako podklad pro další dlouhodobá sledování.

Sedimenty Černého příkopu představují aktuální problém, kdy může být činností bakterií velmi výrazně inhibována přítomnost organických sloučenin, případně inhibována vysoká koncentrace jednotlivých POPs. Jednou z možností dekontaminace při současném zachování schopnosti sedimentu je biodegradace. Biodegradace nebezpečných škodlivých látek v životním prostředí představuje významné perspektivní metody, kdy jsou složité a ekologicky závadné polutanty působením mikroorganismů rozkládány na látky jednodušší, nezávadné. Principem biodegradačních technologií je optimalizace živinových poměrů (pro podporu růstu vybraných mikroorganismů schopných degradovat cílové kontaminanty) a aplikace vhodně vybraných izolovaných kmenů mikroorganismů s příslušnou degradační schopností.

Pro biodegradaci byly použity standardní druhy čistých bakteriálních kultur *Pseudomonas putida* (baktérie *Pseudomonas* jsou gramnegativní, chemoorganotrofní, obligátně aerobní, metabolismus mají aerobně respirační, tvoří přímé nebo zakřivené křivky, pohybují se jedním nebo více polárně umístěnými bičíky, jsou uspořádány převážně jednotlivě nebo v malých shlucích nebo řetězcích) a *Rhodococcus sp.* (jedná se o

grampozitivní, chemoorganotrofní, obligátně aerobní bakterie s metabolismem aerobně respiračním, buňky mají kulovitý tvar vyskytují se jednotlivě, nebo se seskupují po 2 a více buňkách do nepravidelných shluků, někdy též tetrad nebo balíčků).

Experimentální biodegradace proběhla na vybraných polutantech nacházejících se v sedimentech Černého příkopu. Jedná se zejména o tyto polutanty: *polycyklické aromatické uhlovodíky* (jsou zdravotně závadné, projevují toxické, karcinogenní a mutagenní vlastnosti, mají výraznou schopnost se vázat na pevných sorbentech nebo částicích a mají vysokou schopnost bioakumulace), *polychlorované bifenyly* (jedná se o velice stabilní chloorganické látky, téměř se nerozpouštějí ve vodě, zato se vážou na tuky, jsou nejproblematičtější látkou v odpadech), *látky extrahovatelné nepochlornými* (neboli látky ropné – zahrnují rozsáhlou skupinu převážně nepochlorných uhlovodíků, pocházejících z minerálních olejů, motorové nafty, benzínu a jiných ropných látek).

Sedimenty Černého příkopu představují významnou ekologickou zátěž na území města Ostravy. Jsou kontaminovány širokou škálou organických polutantů, které nebyly nikdy přesně identifikovány.

Tato studie byla zaměřena na posouzení schopnosti biodegradace výše uvedených polutantů, které se v sedimentech Černého příkopu vyskytují ve velkém množství.

Černý příkop se nachází na území města Ostravy, jedná se o umělou vodoteč, která byla vybudována v roce 1952 pro odvodnění staveniště nové koksovny Jan Šverma v Mariánských Horách. Tato lokalita patří mezi jednu z nejvíce znečištěných na území města Ostravy, lokalita je neúnosně znečišťována Koksovnu Jana Švermy, BorsodChem MCHZ, ÚČOV a řadou dalších podniků v daném teritoriu až po jeho ústí do řeky Odry. Území je nadále dotčeno stavbou dálnice D 47. Černý příkop odvádí průmyslové odpadní vody z několika závodů v okolí a z Ústřední čistírny odpadních vod města Ostravy do řeky Odry. Hlavním zdrojem PAU ve vodách a následně sedimentech Černého příkopu je Koksovna Šverma. Sedimenty Černého příkopu představují významnou ekologickou zátěž na území města Ostravy. Jsou kontaminovány širokou škálou organických polutantů, které nebyly nikdy přesně identifikovány.

Revitalizace Černého příkopu se bude provádět odtěžením sedimentů a následnou optimálně zvolenou dekontaminační technologií. Vzhledem k tomu, že až 50 % z celkové Σ PAU tvoří snadno biodegradovatelné PAU, jak je patrné z obrázku č. 5, byla ověřována možnost použití biodegradace. Aby mohl být dekontaminovaný sediment znova použit při úpravě terénu a rekultivaci musí Σ PAU splnit požadavky stanovené v tabulce č. 10.1 (nejvýše přípustné koncentrace škodlivin v sušině dopadů) přílohy č. 10 (požadavky na obsah škodlivin v odpadech využívaných na povrchu terénu) vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu. Hodnoty pro Σ PAU (antracen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranthén, benzo(k)fluoranthén, benzo(a)pyren, benzo(ghi)perylene, fenantren, fluoranthén, chrysen, indeno(1,2,3-cd)pyren, naftalen, pyren), by neměly být větší než limitní hodnota 6 mg/kg sušiny, v případě sumy jednotlivých kongenerů PCB (kongenery č. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) by neměla přesáhnout limitní hodnotu 0,2 mg/kg sušiny. Uvedené hodnoty PAU, PCB a NEL byly stanovené ve vstupním vzorku a po 1. a 4. týdnu biodegradace.

Metodika experimentálních prací

Experimentální biodegradace vybraných škodlivin – PAU, PCB a NEL proběhla na vzorcích sedimentu Černého příkopu.

Na této lokalitě byly odebrány 2 vzorky sedimentu ze dvou odběrových míst, popsané jako vzorek Šverma a Hráz. Biodegradace proběhla za pomoci bakterií *Pseudomonas putida* (obr. č. 2) a *Rhodococcus sp.* (obr. č. 3). Tyto kultury mikroorganismů byly získány v České sbírce mikroorganismů působící při PřF MU v Brně. V průběhu kultivačních prací byla použita tři druhy média: tekuté médium M1, M96. Kontrola životaschopnosti bakterií a orientační stanovení jejich celkového počtu se provádí mikroskopováním. Pro tuto práci byl použit mikroskop Carl Zeiss Jena „Amplival“ a Cyrus I, komůrka s rastrem na odečet počtu bakterií.

Stanovení NEL, Σ PAU (antracen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranthén, benzo(k)fluoranthén, benzo(a)pyren, benzo(ghi)perylene, fenantren, fluoranthén, chrysen, indeno(1,2,3-cd)pyren, naftalen, pyren) a Σ PCB (kongenery č. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) bylo provedeno v akreditované laboratoři paliv, odpadů a vod VÚHU, a.s. Most.

Laboratorní experiment trval celkem čtyři týdny, jednotlivé pokusy byly prováděny paralelně. Do reaktorů (1 l skleněných lahví) bylo vpraveno 100 g sedimentu, 100 ml bakteriálního roztoku a 500 ml živného média. Láhve byly uzavřeny. Pomocí akvarijních čerpadel bylo zajišťováno provzdušňování (aerobní podmínky). Potřebný objem byl doplňován destilovanou vodou. Vzorky k analýzám byly odebrány po jednom a čtyřech týdnech.

Výsledky bakteriální biodegradace

Z výsledků bakteriálního loužení s čistou bakteriální kulturou *Rhodococcus sp.* vyplynulo, že po měsíci loužení je možné ze vzorku Šverma odstranit 96 % NEL, 90 % PAU a 50 % PCB. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z dosažených výsledků je zřejmé, že aplikace této bakteriální kultury je vhodná pro degradaci NEL a PAU. Odbourání PCB je nižší.

V případě vzorku Hráz, bylo po měsíci loužení možné ze vzorku odstranit 70 % NEL, 75 % PAU a 27 % PCB. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2. Z dosažených výsledků je zřejmé, že aplikace této bakteriální kultury je vhodná pro degradaci PAU. Odbourává NEL a PCB je nižší.

Z výsledků bakteriálního loužení s čistou bakteriální kulturou *Pseudomonas putida* vyplynulo, že po měsíci loužení je možné ze vzorku Šverma odstranit 51 % NEL, 77 % PAU a 57 % PCB. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3. Z dosažených výsledků je patrné, že aplikace této bakteriální kultury je vhodná pro degradaci PAU. Odstranění NEL a PCB je ale v tomto případě nižší.

V případě vzorku Hráz, bylo po měsíci loužení možné ze vzorku odstranit 85 % NEL, 65 % PAU a 45 % PCB. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4. Z dosažených výsledků je zřejmé, že aplikace této bakteriální kultury je vhodná pro degradaci NEL a PCB. Odbourávání PAU je nižší.

Závěr

Cílem práce bylo laboratorní ověření biodegradace NEL, PAU a PCB ze vzorků sedimentu z lokality Černý příkop. V této fázi výzkumu se osvědčila biodegradace pomocí čistých bakteriálních kultur *Pseudomonas putida* a *Rhodococcus sp.*, kdy došlo k odbourávání některých organických látek až o 100 % (a to zejména fenantranu a to u vzorku Šverma za pomoci bakterií *Rhodococcus sp.*).

Jak je z grafu č. 15 patrné, z dosažených výsledků vyplynulo, že bakteriální kultura *Rhodococcus sp.* je výhodná při odbourávání PAU a NEL, a bakteriální kultura *Pseudomonas putida* je výhodnější pro odbourávání PCB. Toto se potvrdilo jak u vzorku Hráz tak i u vzorku Šverma.

Z laboratorních výsledků vyplývá, že odbourávání jednotlivých analytů PAU bylo odlišné. V případě největšího zastoupení jednotlivých analytů Σ PAU u vzorku Šverma, jak uvádí obrázek č. 5, účinnost odbourání fluoranthenu byla nejvyšší (99%) pomocí bakterií *Pseudomonas putida*. V případě vzorku Hráz byl fluoranthén s největším procentuálním zastoupením odbourán se 72% účinností biodegradace pomocí bakterií *Rhodococcus sp.*

V další etapě je nutné se zaměřit na odbourávání jednotlivých PAU, zejména na benzo(a)pyren, který se v sedimentech Černého příkopu vyskytuje ve velmi vysokých koncentracích a patří mezi nejzávažnější PAU. U sledování PCB je nutné se zaměřit na odbourávání jednotlivých kongenerů a to zejména kongeneru č. 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorbifenylyl), jelikož se nepodařilo tento kongener odbourat a účinnost biodegradace v tomto případě byla 0% (jak za pomoci bakteriální kultury *Pseudomonas putida* tak za pomoci *Rhodococcus sp.*) a to jak u vzorku Šverma tak i u vzorku Hráz.

Závěrem je nutné konstatovat, že i přes možnou biodegradaci jak u vzorku Šverma, tak u vzorku Hráz, nebylo dosaženo u hodnot Σ PAU limitní hodnoty stanovené v tabulce č. 10.1 (nejvýše přípustné koncentrace škodlivin v sušině odpadů) přílohy č. 10 (požadavky na obsah škodlivin v odpadech využívaných na povrchu terénu) vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu. Z dosažených výsledků biodegradace je zřejmé, že jediným problémovým ukazatelem je zejména Σ PAU, která převyšuje limitní hodnotu 6 mg/kg cca dvacetinásobně (hodnoty se pohybují od 70,2 až do 167,4 mg/kg v sušině). V případě ukazatele Σ PCB byla limitní hodnota 0,2 mg/kg dosažena u vzorku Šverma pomocí bakterií *Rhodococcus sp.* a *Pseudomonas putida*, u vzorku Hráz byla limitní koncentrace překročena jen minimálně.

Ke zlepšení výsledků by mohlo dojít prodloužením doby biodegradace, aplikací adaptovaných bakteriálních kultur, popř. upravením optimálních podmínek během biodegradace.

Reviewer: doc.Ing.Helena Raclavská, CSc. - VŠB-TU Ostrava

Ing. Luděk Trdlica - Výzkumný ústav vodohospodářský, Ostrava