

Seminar CEEEX – ERPISA

14 decembrie 2006

Metode neconventionale de reducere a unor contaminanti prezenti in medii naturale



Academia Română

Institutul de Biologie București

Centrul de Microbiologie

COLECTIVUL DE CERCETARE:

Dr. Mugur Ștefănescu CS III – Responsabil proiect

Dr. Anca Voicu CS I

Dr. Mihaela Marilena Lăzăroaie CS

Maria Neagu - Contabil Șef

Ana Dinu Asistent I

Daniela Mielu Asistent III

Partener în cadrul Proiectului de Cercetare “*Evaluarea și remedierea poluării istorice a stratelor acvifere prin tehnologii neconvenționale*” ERPISA

OBIECTIVELE PROIECTULUI DE CERCETARE

- Studiul documentar al tehnologiilor microbiene de remediere.
- Prelevarea probelor din siturile contaminate și studiul microbiotei indigene.
- Izolarea și selectarea microorganismelor hidrocarbon-oxidante; estimarea potențialului degradativ al contaminanților petrolieri.
- Studii privind capacitatea de biosinteză a unor metaboliți cu rol în optimizarea biodisponibilității și conversiei contaminanților petrolieri.
- Experimente de simulare în laborator privind atenuarea gradului de poluare, utilizând microorganisme hidrocarbon-oxidante performante.
- Elaborarea protocolului de lucru al biotehnologiei propuse, în vederea aplicațiilor *in situ*.

REMEDIEREA MEDIILOR CONTAMINATE CU HIDROCARBURI

- principalele aspecte abordate -

Habitate poluate cu reziduuri petroliere



- Ape reziduale din industria petrolieră
- Șlamuri petroliere
- Soluri și sedimente din schele și parcuri petroliere
- Ape de suprafață
- Acvifere din județul Prahova
- Apă de mare zona Constanța

- **IZOLAREA DE TULPINI MICROBIENE HIDROCARBON-OXIDANTE**
- **METODĂ RAPIDĂ DE SCREENING A MICROORGANISMELOR HIDROCARBON-OXIDANTE**
- **CARACTERIZAREA TULPINILOR BACTERIENE HIDROCARBON-OXIDANTE**
- **OBȚINEREA DE COMPUȘI TENSIOACTIVI BACTERIENI**
- **TOLERANȚA UNOR TULPINI BACTERIENE HIDROCARBON-OXIDANTE LA DIFERITE TIPURI DE HIDROCARBURI, INCLUSIV BTX**
- **REZISTENȚA TULPINILOR BACTERIENE HIDROCARBON-OXIDANTE LA DIFERITE TIPURI DE ANTIBIOTICE**
- **STUDIUL RESPIRAȚIEI CELULARE ÎN PREZENȚA HIDROCARBURILOR**
- **SELECTAREA DE TULPINI BACTERIENE HIDROCARBON-OXIDANTE HALOTOLERANTE**
- **GRADUL DE HIDROFOBICITATE AL SUPRAFEȚELOR CELULARE ÎN PREZENȚA DIFERITELOR TIPURI DE HIDROCARBURI**

- **ROLUL SINERGISMULUI MICROBIAN ÎN DEGRADAREA ȚIȚEIULUI BRUT**
- **STIMULAREA ACTIVITĂȚII BACTERIILOR HIDROCARBON-OXIDANTE PRIN ADAOS DE NUTRIENȚI**
- **STIMULAREA BIODEGRADĂRII ȚIȚEIULUI BRUT PRIN ÎMBUNĂTĂȚIREA TRANSFERULUI DE MASĂ AL CĂNTĂMINANTULUI**
-
- **INFLUENȚA NATURII ȘI CONCENTRAȚIEI SUBSTRATULUI PETROLIER ASUPRA BIODEGRADĂRII ACESTUIA**
- **DINAMICA ACTIVITĂȚII DEHIDROGENAZICE ÎN CURSUL BIODEGRADĂRII ȚIȚEIULUI BRUT**
- **STUDII DE MICROSCOPIE ELECTRONICĂ PENTRU EVIDENȚIEREA MODIFICĂRILOR STRUCTURALE INDUSE DE HIDROCARBUŢI BACTERIILOR HIDROCARBON-OXIDANTE**
- **EXPERIMENTE DE LABORATOR DE SIMULARE A PROCESULUI DE BIOREMEDIERE A SOLULUI POLUAT CU ȚIȚEI BRUT ȘI ȘLAM PETROLIER**
- **EXPERIMENTE DE BIOREMEDIERE A SOLULUI POLUAT CU ȘLAM PETROLIER DIN PARCURI PETROLIERE**

BIOREMEDIEREA = BIOTEHNOLOGIA MEDIULUI POLUAT, BIOREMEDIATION, ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY

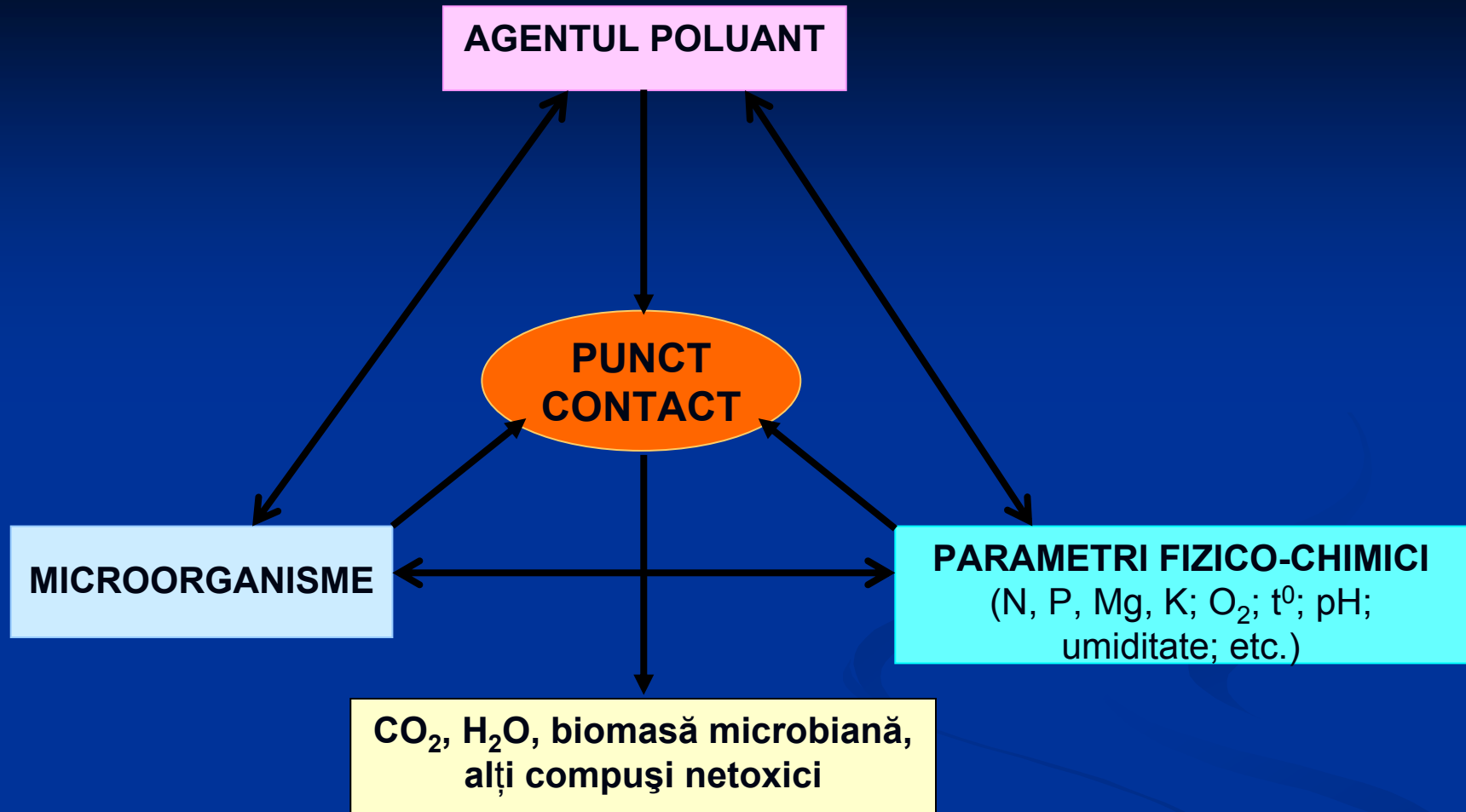


DEFINIȚIE:

- Eliminarea cu ajutorul microorganismelor a poluanților din mediu → transformarea poluanților toxici în compuși netoxici, fără afectarea mediului.

MICROORGANISME UTILIZATE ÎN BIOREMEDIERE:

- Să provină din natură, de preferință din situsul poluat supus bioremedierii.
- Să nu fie rezultatul unor activități de manipulare genetică.
- Să nu fie patogene sau toxice.
- Să manifeste flexibilitate metabolică.
- Să posede echipament enzimatic adecvat.
- Să se dezvolte pe seama agentului poluant, dispărând odată cu mineralizarea totală a acestuia.
- Să se integreze în condițiile naturale ale habitatului, fără să afecteze echilibrul biologic.
- Să nu producă efecte nedorite care să contravină legislațiilor și normelor de protecție a mediului.



Elementele implicate în procesul de bioremediere (“triunghiul bioremedierii”)

PRINCIPALELE CATEGORII DE AGENȚI POLUANȚI DEVERSAȚI ÎN MEDIU

COMPUȘI ANORGANICI

COMPUȘI ORGANICI

COMPUȘI REACTIVI

Metale volatile
Metale nevolatile
Azbest
Materiale radioactive
Cianuri anorganice

Halogenați volatili (H VOCs)
Halogenați semivolatili (H SVOCs)
Nehalogenați volatili (NH VOCs)
Nehalogenați semivolatili (NH SVOCs)
HIDROCARBURI
Pesticide
Bifenili policlorurați (PCBs)
Dioxine, furani
Cianuri organice

Oxidanti
Reducători

ETAPELE IMPLEMENTĂRII BIOTEHNOLOGIILOR ADECVATE DE REMEDIERE A MEDIULUI POLUAT

Descrierea sitului poluat

Caracterizarea mediului

- fizică
- chimică
- geologică
- climatică
- microbiologică
- vegetație, etc.

Evaluarea gradului de risc

- identificarea surselor de (hazard) poluare
- identificarea căilor de poluare și a țintelor de poluare
- evaluarea probabilității consecințelor (înalță, medie, scăzută, neglijabilă)
- evaluarea magnitudinii consecințelor (severă, moderată, blândă, neglijabilă)

BIOREMEDIEREA MEDIULUI POLUAT CU HIDROCARBURI

BIOREMEDIEREA INTRINSECĂ
(bioremedierea pasivă, atenuare naturală)

- Biodegradare
- Evaporare
- Sorbție
- Degradare chimică (fotooxidare, autooxidare)
- Dispersie
- Dizolvare

BIOREMEDIEREA STIMULATĂ

- IN SITU
- EX SITU

Parametri optimizați:

- aport O_2
- nutrienți
 - macroelemente (N, P)
 - microelemente (S, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Na, Co, Cu, Mo, Zn)
- raport echilibrat C:N:P și C:S
- co-metaboliți
- microorganisme hidrocarbon-oxidante

MICROORGANISME HIDROCARBON-OXIDANTE

BACTERII:

Achromobacter, Acinetobacter, Actinomyces, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas, Spirillum, Vibrio

CIANOBACTERII:

Anabaena, Nostoc, Oscillatoria

LEVURI:

Candida, Rhodotorula, Saccharomyces

FUNGI FILAMENTOSI:

Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Graphium, Trichoderma, Paecilomyces

ALGE:

Amphora, Chlorella, Chlamydomonas, Dunaliella, Porphyridium, Ulva

CARACTERISTICI FIZIOLOGICE ALE MICROORGANISMELOR HIDROCARBON-OXIDANTE

- Adeziunea celulelor microbiene la suprafețe hidrofobe
- Sinteza de compuși tensioactivi cu proprietăți emulsionante
- Sisteme de transport a hidrocarburilor prin membranele celulelor
- Utilizarea hidrocarburilor ca unică sursă de C și energie, în mod selectiv:
 1. n-parafine (n-alcani)
 2. izoparafine (izoalcani)
 3. aromatice mononucleare
 4. cicloparafine (cicloalcani, naftene)
 5. aromatice polinucleare (PAHs)
 6. asfaltene

BIODEGRADAREA HIDROCARBURILOR

Donori de electroni = hidrocarburi

Reacții enzimatiche

- oxigenaze
- dehidrogenaze
- hidrolaze

Acceptori de electroni

Calea aerobă:

$O_2 \rightarrow CO_2, H_2O, \text{biomasă}$

Calea anaerobă:

$NO_3, NO_2, Fe^{3+}, Mn^{4+}, SO_4^{2-},$
 $CO_2 \rightarrow N_2, Fe^{2+}, Mn^{2+}, S^{2-}, CH_4$

FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ BIOREMEDIEREA MEDIILOR POLUATE CU REZIDUURI PETROLIERE

FACTORI FIZICI

- caracteristicile mediului poluat (permeabilitate, porozitate, granulozitate, etc.)
- prezența O₂
- umiditate
- temperatură
- pH, Eh
- aderența poluantului la particulele de sol sau sedimente

FACTORI CHIMICI

- natura și concentrația poluantului
- gradul de toxicitate al poluantului
- concentrația compușilor toxici
- solubilitatea poluantului (>1000 mg/l)
- bioaccesibilitatea poluantului
- prezența sau absența unui co-substrat
- salinitatea mediului
- prezența nutrienților accesibili
- conținutul organic din mediu
- biodegradabilitatea poluantului (BOD/COD>0,1)

FACTORI BIOLOGICI

- densitatea microorganismelor indigene capabile să degradeze poluantul

PROCESE MOLECULARE ȘI BIOCHIMICE DE ADAPTARE A MICROORGANISMELOR LA AGENȚI POLUANȚI (inclusiv xenobiotici)

- ✓ Inducerea sistemelor enzimatiche specifice substratului
- ✓ Dezvoltarea unei subpopulații specifice
- ✓ Selecția de mutante
- ✓ Mecanisme genetice de apărare

TEHNOLOGII DE BIOREMEDIERE

BIOREMEDIEREA SOLULUI

IN SITU:

- Bioaugmentare (enhanced bioremediation)
- Land treatment
- Co-metabolism
- Bioslurry
- Bioventilare (bioventing)
- Biosparging
- Biofiltrare
- Stimulare cu agenți tensioactivi
- Fitoremediere

EX SITU:

- Bioreactoare
- Land farming
- Bioslurry
- Biopile
- Composting (static / agitare mecanică)

BIOREMEDIEREA APELOR SUBTERANE

IN SITU:

- Bioaugmentare (enhanced bioremediation)
- Bioventilare (bioventing)
- Barbotare cu aer
- Biofiltrare
- Biosparging
- Co-metabolism
- Stimulare cu agenți tensioactivi
- Bariere permeabile / impermeabile

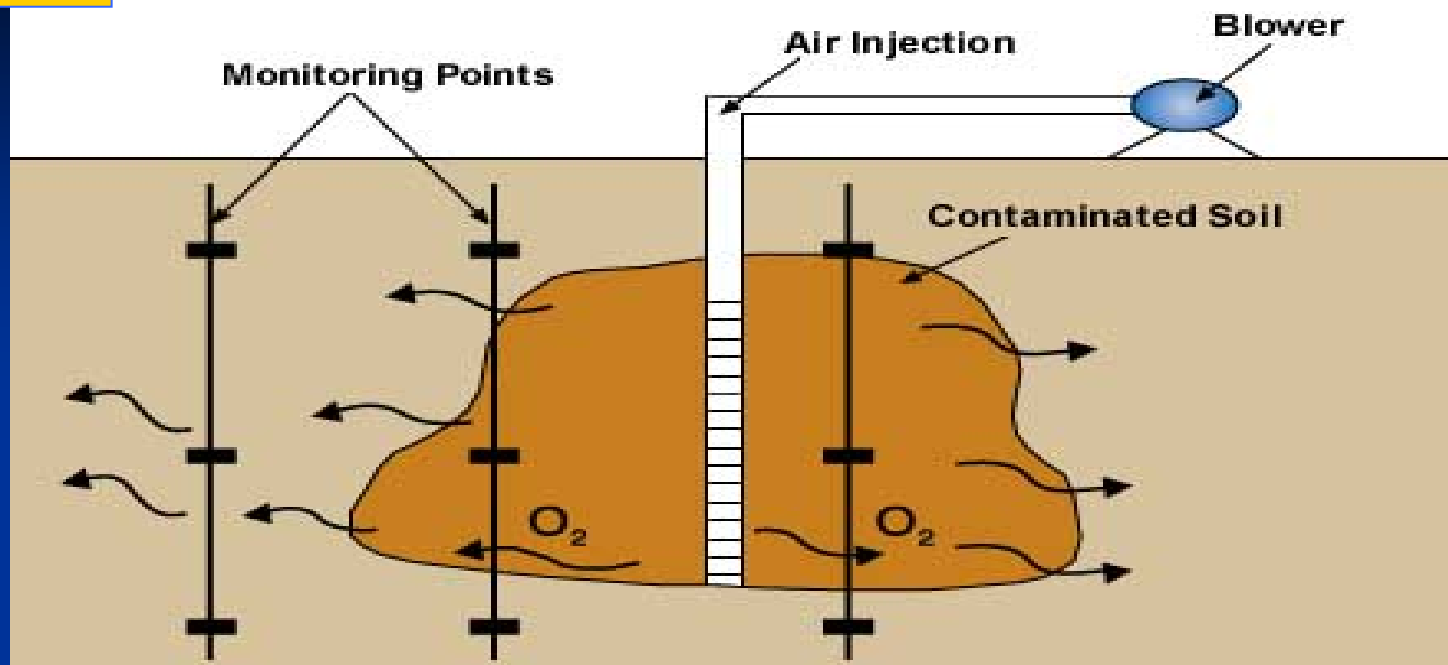
EX SITU:

- Bioreactoare

BIOREMEDIEREA MEDIULUI MARIN

- Bioaugmentare
- Stimulare cu agenți tensioactivi
- Utilizare de resturi vegetale adsorbante

TYPICAL BIOVENTING SYSTEM



Biotehnologie bazată pe stimularea procesului de degradare a contaminanților din sol prin injectarea de aer atmosferic, nutrienți (azot și fosfor)

Destinată decontaminării IN SITU a POL_s (petroleum, oils and lubricants)

FACTORI LIMITANȚI:

- Slabă aerare a solului
- Saturare cu apă a solului
- Procente reduse de nutrienți (azot și fosfor)
- Biodegradare aerobă redusă, prin cometabolism sau anaerobioză
- Temperatura scăzută

BIOREMEDIEREA SOLURILOR CONTAMINATE PRIN INJEȚIE DE APĂ OXIGENATĂ



Aplicată în situri cu poluare constantă și în pânza de apă freatică

CONTAMINANȚI

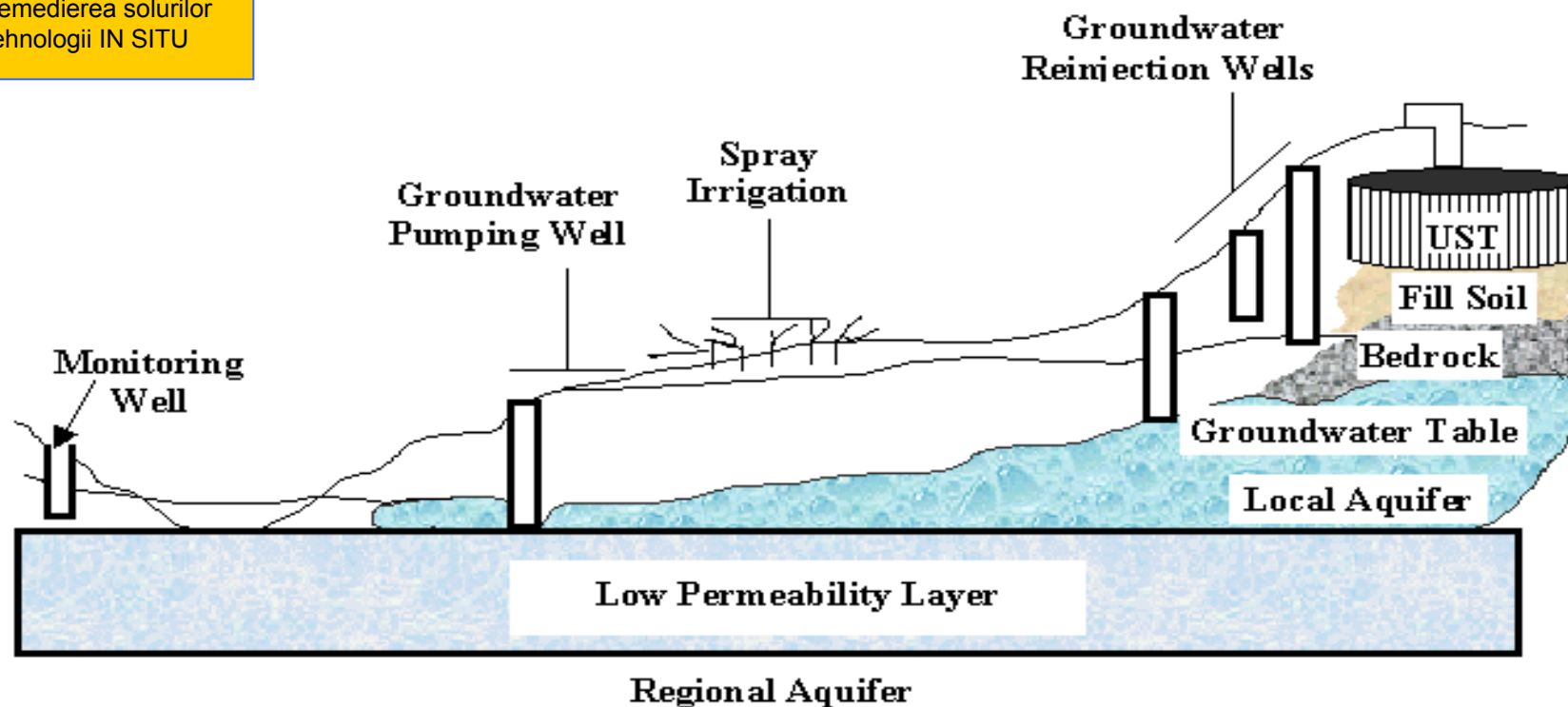
- Hidrocarburi petroliere
- BTEX
- MTBE
- VOCs
- Compuși halogenați
- Ioni metalici

EFECTE

- Stimularea microbiotei existente
- Creșterea vitezei de bioremediere prin circulația apei în sol
- Metabolizarea aerobă a contaminanților, declorurarea acestora, imobilizarea IN SITU a metalelor dizolvate, prin aportul de O₂

ENHANCED BIOREMEDIATION (BIOSTIMULARE, BIOAUGMENTARE)

Bioremedierea solurilor
Tehnologii IN SITU



Biotehnologie de creștere a ratei de biodegradare a solului contaminat, prin aport de nutrienți și oxigen, dizolvați în apă de injecție. Activitatea microbiană este stimulată prin circulația apei, suplimentată cu inocul

Proces aerob sau anaerob

CONTAMINANȚI

- PAH_s
- SVOC_s
- BTEX
- pesticide

LAND FARMING

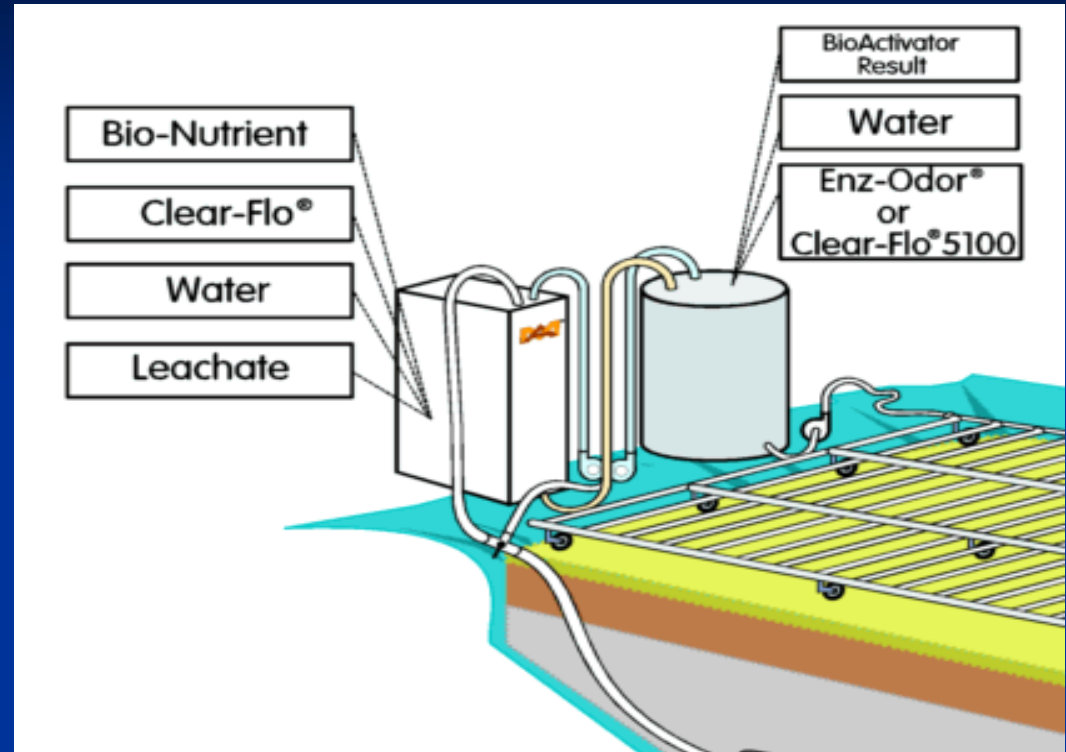
Bioremedierea solurilor
Tehnologii EX SITU

Excavare, etalare pe o platformă ce permite colectarea fluidelor de drenaj, amestecare



Monitorizare

Tratament întrerupt în sezonul rece



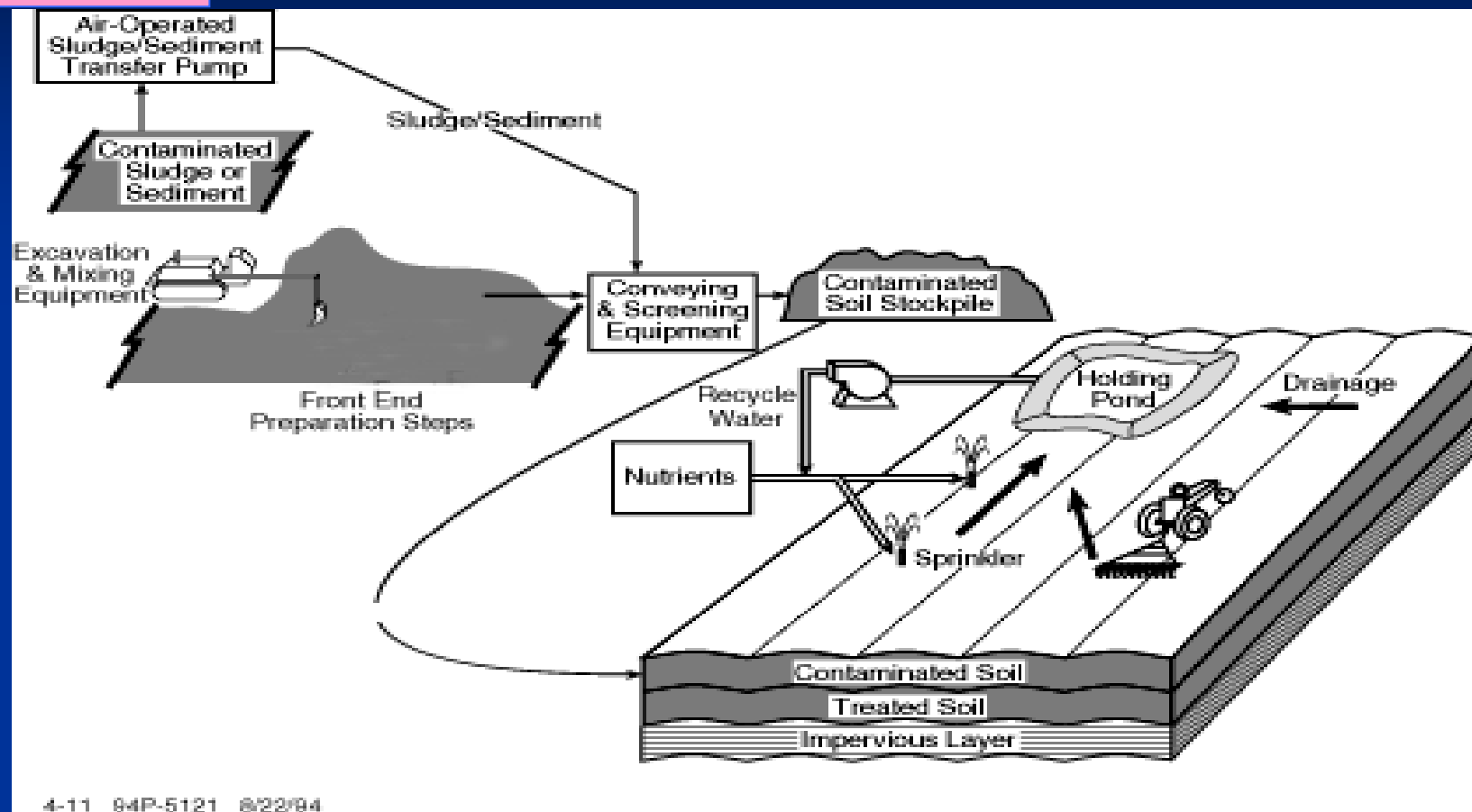
Tehnologie de remediere EX SITU a solului contaminat, prin umezire, aerare, aport de nutrienți și agenți de gonflare, pentru favorizarea aerării și circulației fluidelor, în vederea creșterii ratei de degradare microbiene a contaminanților

CONTAMINANȚI

SVOC_S
VOC_S
PAH_S
HO
NHO
P

BIOPILES

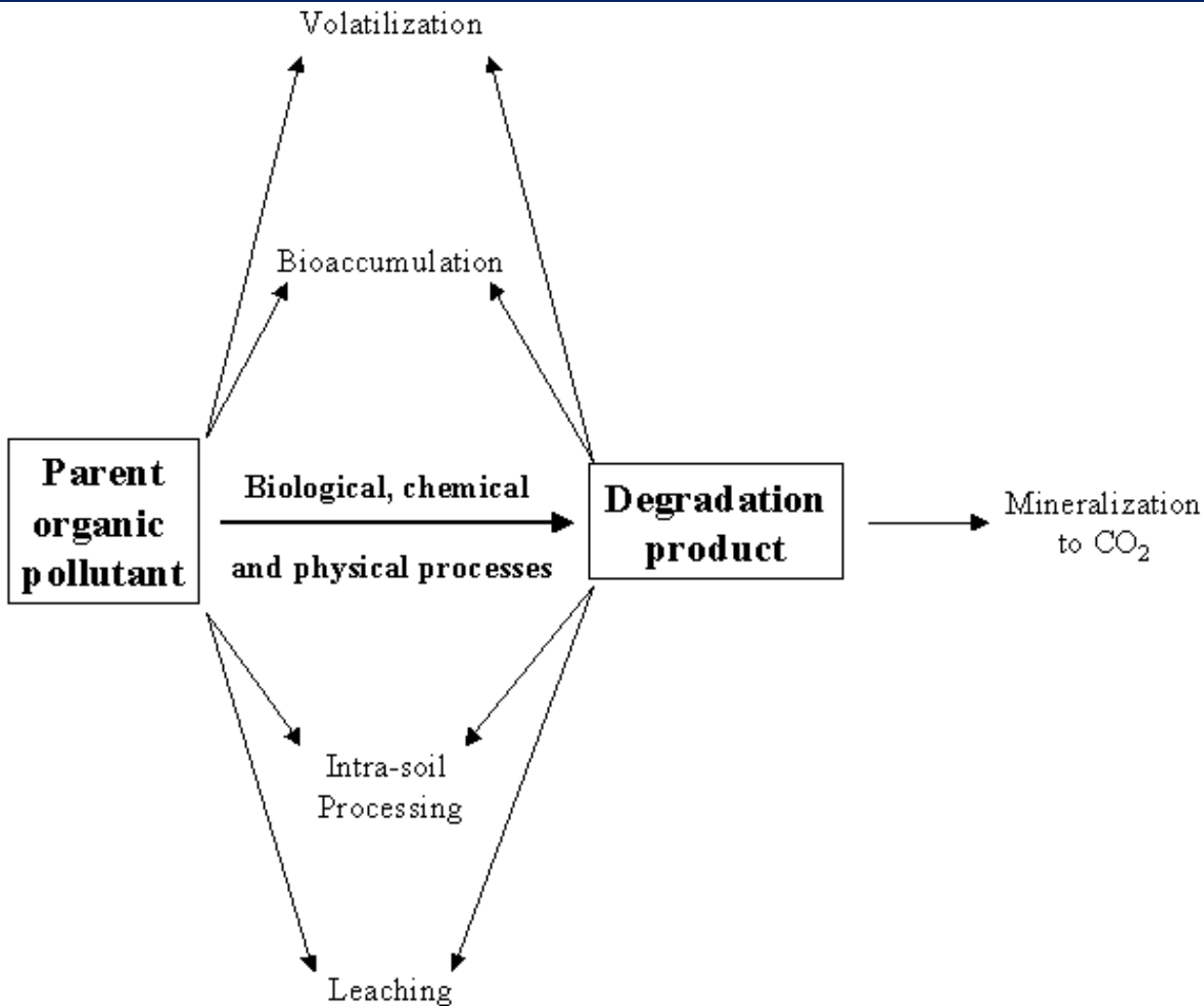
Bioremedierea solurilor
Tehnologii EX SITU



Biotehnologie derivată din metoda Land Farming, bazată pe ridicarea solului contaminat în movile de câțiva metri înălțime, asigurându-se aerarea și umiditatea + aportul de nutrienți. Contaminanții sunt reduși la CO_2 și H_2O , în interval de 3-6 luni

COMPOSTING

Bioremedierea solurilor
Tehnologii EX SITU

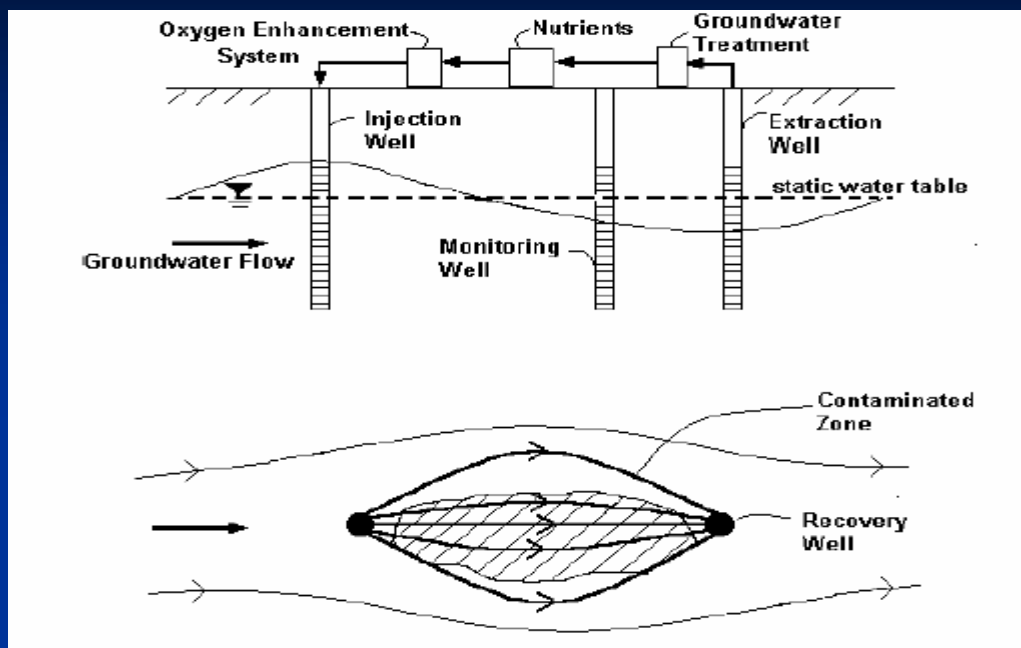


Biotehnologie care comparativ Land Farming-ului necesită condiții termofile (55-60 °C) ce favorizează activitățile bio-degradative. Solul poluat cu contaminanți biodegradabili este aditivat cu agenți de gonflare de tipul: paielor, fânului, pănușelor de porumb, care permit buna circulație a apei și a aerului, elemente indispensabile metabolismului microbial aerob.

TIPURI DE TEHNOLOGII

- **STATIC PILE COMPOSTING**
Movilele sunt aerate prin suflante sau pompe
- **MECHANICALLY AGITATED IN VESSEL COMPOSTING**
solul contaminat este plasat în utilaje care realizează amestecarea și aerarea
- **WINDROW COMPOSTING**
plasare în movile lungi, amestecate periodic cu utilaje specifice

BIOREMEDIEREA APELOR SUBTERANE



- **Tratamente aerobe (oxygen respiration)**
 - reducerea hidrocarburilor petroliere contaminante alifatic (Hexan) și aromatice (Benzen, Naftalen)
 - Tehnologii: *Direct sparging of air*
Injection well oxygen
Saturarea cu apă cu un volum ridicat de aer sau oxigen
Adiția de apă oxigenată
- **Tratamente anoxice (nitrat respiration)**
- **Tratamente anaerobe (non-oxygen respiration)**
- **Tratamente co-metabolice**
Contaminanți: solvenți clorurați

Tehnologiile de depoluare a solurilor (Bioventing) acționează și asupra decontaminării apelor subterane

TRATAREA APELOR SUBTERANE În sistem recirculare

↓
Sonde de extracție

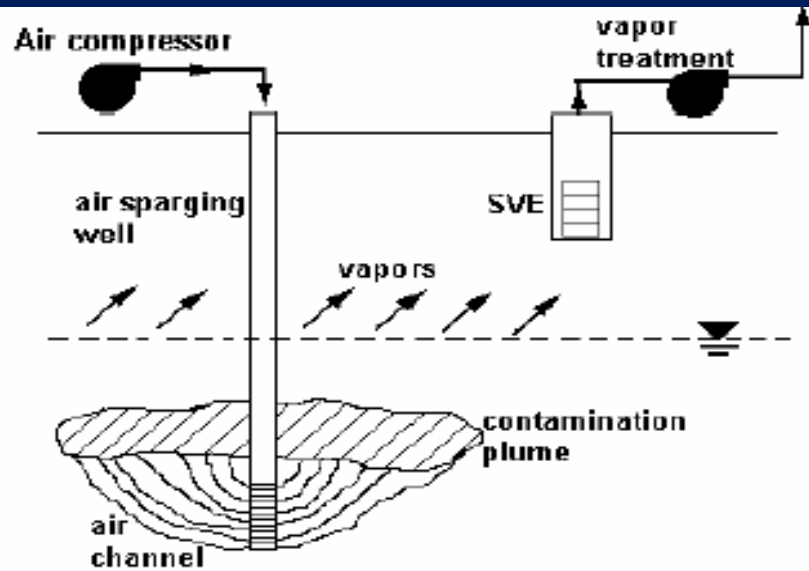
↓
Tratarea microbiană, la suprafață, prin adăos de nutrienți și oxigen în apele extrase

↓
Deversarea apelor decontaminate în ape de suprafață

PARAMETRI

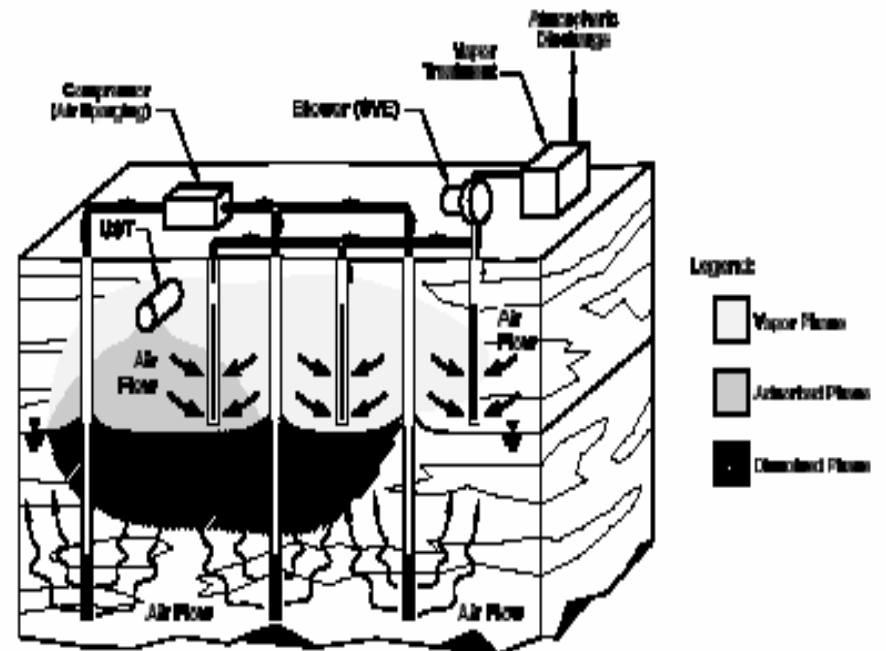
- Conductivitatea hidraulică a acviferului
- Biodegradabilitatea contaminanților
- Microbiota indigenă

AIR SPARGING BIOREMEDIATION (IN SITU AIR STRIPPING; IN SITU VOLATILIZATION)



Tehnologie IN SITU de reducere a
constituenților volatili ai contaminanților
petrolieri adsorbiți în sol și dizolvați în
apa subterană

Injecția de aer în subteran favorizează
volatilizarea contaminanților



GLOSAR

(termeni biotehnologici cu utilizare frecventa)

- **Adverse effect** reduced chemical or ecological status
- **Benthic** living in, on or closely associated with aquatic sediment at some life stage
- **Bioassay** laboratory or field experiment, in which a lower species is exposed to whole sediment, or its pore contaminants are available in such a quantity that it causes a toxic effect to this test species (Brils *et al.*, 1997)
- **Bioavailable** available to living organisms
- **Biota** living organisms
- **Bioturbation** resuspension of settled sediment due to activity of biota
- **Capping** covering of contaminated sediment with clean sediment
- **Ecological status** expression of the quality of the structure and functioning of aquatic ecosystems associated with surface water
- **EQS** Environmental Quality Standard
- **Groundwater** all water which is below the surface of the ground in the saturation zone and in direct contact with the ground or subsoil

- **Hazard** set of inherent properties of a contaminant which makes it capable of causing adverse effect (van Leeuwen and Hermens, 1995)
- **HOC** Hydrophobic Organic Compounds
- **Hyporheic** saturated sediment zone, under and laterally adjacent to freshwater bodies where there is active exchange between ground water and surface water (Palmer *et al.*, 2000)
- **Impact** an observable, adverse effect
- **Management** a set of continuous interventions in order to achieve sustainability
- **Model ecosystem** intermediate sized system, such as a dug-out pond or *in situ* enclosure, that can be replicated and manipulated to test both structural and functional parameters, representative for ecosystem (Touart, 1994)
- **PAH** Polycycling Aromatic Hydrocarbon (hazardous compound)
- **PCB** Polychlorinated Byphenyle (hazardous compound)
- **Pelagic** living in the water column
- **Pollution** the direct or indirect introduction, as a result of human activity, of substances or heat into the air, water or land which may be harmful to human health or the quality of aquatic ecosystems or terrestrial ecosystems directly depending on aquatic ecosystem, which result in damage to material property, or interfere with amenities and other legitimate uses of environment
- **POP** Persistent Organic Polutant (hazardous compound)
- **Risk** the probability of an adverse effect from a given exposure to a contaminant (van Leeuwen and Hermens, 1995)

- **Sediment** suspended or deposited solids, of mineral as well as organic nature, acting as a main component of a matrix, which has been, or is susceptible to be transported by water
- **TIE** Toxicity Identification Evaluation
- **Toxic effect** reduced functioning of an organism, with mortality being the most drastic expression of that, due to exposure to a contaminant
- **Triad approach** the simultaneous observation of the three complementary components: hazard assessment through chemical analysis, risk assessment through sediment laboratory or field assays and impact assessment through a field inventory of the benthic community
- **TSS** Total Suspended Solids
- **Wetlands** areas of marsh, fen, peatland or water, whether natural or artificial, permanent or temporary, with water that is static or flowing, fresh, brackish or salt including areas of marine water the depth of which at low tide does not exceed six meters. Wetland may incorporate riparian and coastal zones adjacent to the wetland and islands or bodies of marine water deeper than six meters at low tide lying within the wetlands