



# Biodegradacja odpadów niebezpiecznych

## Biodegradation of hazardous pollutants

*Peter FEČKO*<sup>1)</sup>, *Eva PERTILE*<sup>2)</sup>, *Barbora LYČKOVÁ*<sup>3)</sup>, *Hana VOJTKOVA*<sup>4)</sup>,  
*Iva JANÁKOVÁ*<sup>5)</sup>, *Maciej TORA*<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> Prof. Ing., CSc, Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava – Poruba, Czech Republic; tel.: (+420\_ 597 323 575, e-mail: peter.fecko@vsb.cz

<sup>2)</sup> Mgr, Ph.D., Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava – Poruba, Czech Republic; tel.: (+420) 597 325 188; e-mail: eva.pertile@vsb.cz

<sup>3)</sup> Ing., Ph.D., Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava – Poruba, Czech Republic; tel.: (+420) 597 323 339; e-mail: barbora.lyckova@vsb.cz

<sup>4)</sup> Mgr., Ph.D., Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava – Poruba, Czech Republic; tel.: (+420) 597 323 541; e-mail: hana.vojtkova@vsb.cz

<sup>5)</sup> Ing., Ph.D., Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava – Poruba, Czech Republic; tel.: (+420) 597 323 541, e-mail: iva.janakova@vsb.cz

<sup>6)</sup> Mgr inż., Doktorant, Institute of Environmental Engineering, Faculty of Mining and Geology, VŠB – Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava – Poruba, Czech Republic

RECENZENCI: Doc. Ing., CSc., Františka MICHALÍKOVÁ; Dr inż. Ewa KISIELOWSKA

### Streszczenie

Celem projektu było przeprowadzenia badań laboratoryjnych rozkładu biologicznego próbek gleby zanieczyszczonych PAU, PCB i NEL ze składowiska odpadów niebezpiecznych w Pozdátku.

Do badań użyto czystych kultur bakteryjnych *Rhodococcus sp.* i *Pseudomonas putida*. Na podstawie wyników badań laboratoryjnych stwierdzono, że po jednym miesiącu ługowania bakteriami *Rhodococcus sp.* usunięto 73 % NEL, 73 % PAU i 14 % PCB. Po zastosowaniu czystej kultury *Pseudomonas putida* usunięto 96 % NEL, 89 % PAU i 14 % PCB.

### Summary

The objective of the project was a laboratory check of biodegradation of soil samples contaminated by PAU, PCB and NEL from the hazardous waste dump in the Pozdátky locality. For the laboratory check, pure bacterial cultures of *Rhodococcus sp.* and *Pseudomonas putida* have been used. It is apparent from the laboratory experiments results that after one-month bacterial leaching, applying the bacterium of *Rhodococcus sp.* there is a 73 % removal of NEL, a 73 % removal of PAU and a 14 % removal of PCB. Applying a pure culture of *Pseudomonas putida* there is a 96 % removal of NEL, a 89 % removal of PAU and a 14 % removal of PCB.

Słowa kluczowe: biodegradacja, odpady niebezpieczne, ługowanie bakteryjne

Keywords: biodegradation, hazardous pollutants, bacterial leaching

### Wprowadzenie

Działalność człowieka prowadzi do zanieczyszczenia naszej planety przez substancje organiczne i nieorganiczne. Zanieczyszczenia rozprzestrzeniają się i stanowią prawdziwą groźbę dla prawidłowego rozwoju ludzkości, zwierząt i roślin. Jedną z najbardziej groźnych grup substancji są wyprodukowane w latach 50-tych ubiegłego wieku w znacznych ilościach herbicydy, pestycydy, środki owadobójcze oraz odpady przemysłowe (kondensatory, transformatory, akumulatory).

Biodegradacja substancji biogenych obecnych w środowisku zachodzi od milionów lat dzięki rozwinętemu przez drobnoustroje naturalnym mechanizmom. Substancje ksenobiotyczne (syntetyczne) produkowane przez człowieka są obecne w środo-

### Introduction

Human activities lead to the contamination of our planet by organic and inorganic pollutants. The pollution is spreading and it represents a real threat to a healthy development of mankind, animals and plants. One of the most questionable is the group of persistent – exceptionally resistant substances which have been produced by man in significant amounts in the course of last 50 years in the form of herbicides, pesticides, insecticides, as well as they are present in many industrial products (e.g. capacitor, transformer or hydraulic charges).

For degradation of classical biogenic compounds, which have been present in the environment for millions of years, microorganisms have developed special mechanisms. Xenobiotics, i.e. synthetic substances produced by man, have been more abundant in the environment

wisku od kilku dziesięcioleci. Substancje te mogą być wykorzystywane przez drobnoustroje jako źródło węgla i energii [Brenner, 2003]. Sposób usunięcia przez mikroorganizmy obcych substancji ze środowiska zależy głównie od ich metabolizmu w łańcuchach troficznych (pokarmowych).

Procesy biotechnologiczne spotyka się w procesach wydobywania, przeróbki i przetwarzania surowców, w których wykorzystuje się mikroorganizmy do uzyskania produktów wzbogacania o wymaganą jakość. Zasadniczo, procesy biotechnologiczne rozwijają się naturalnie a ludzkość wykorzystuje nieświadomie ich produkty od początku historii. Biotechnologia obejmuje głównie mikrobiologię, biochemię i chemię.

Biodegradacja niebezpiecznych i szkodliwych substancji w środowisku jest metodą bardzo perspektywiczną. W metodach biologicznych złożone substancje niebezpieczne są kompleksowo rozkładane do związków prostszych za pomocą mikroorganizmów. Istotą biodegradacji jest zastosowanie selektywnie wyizolowanych ze środowiska mikroorganizmów zdolnych do przeprowadzenia rozkładu a następnie optymalizacja ilości pożywki (tak aby przyspieszyć wzrost wybranych drobnoustrojów, które rozkładają niebezpieczne substancje).

Wcześniej stosowane technologie oczyszczania były często bardzo kosztowne i uciążliwe dla środowiska. Obecnie obserwuje się tendencję do stosowania technologii tanich i przyjaznych dla środowiska. Jedną z perspektywicznych technologii jest oczyszczanie środowiska z wykorzystaniem mikroorganizmów i roślin [Páca, 2003].

Aktualnie technologie biodegradacji oraz biologiczne metody usuwania zanieczyszczeń są rozwijane intensywnie. Biodegradacja została po raz pierwszy zastosowana praktycznie podczas katastrofy tankowca Valdez Exxon. Od tego czasu technologie biodegradacji znalazły zastosowanie w większości krajów.

W Republice Czeskiej technika biodegradacji zaczęła się rozwijać od 1989 roku. Była to technologia biologicznego usuwania zanieczyszczeń gleby i wody zanieczyszczonych ropą i substancjami ropopochodnymi, zanieczyszczeniami smołowymi i fenolowymi oraz w celu usunięcia trwałych substancji organicznych (ksenobiotycznych). Od 2000 roku w Republice Czeskiej powstało kilka przedsiębiorstw zajmujących się tym zagadnieniem. Obecnie czeskie firmy uzyskują bardzo dobre wyniki, na poziomie światowym. Przykładowo rocznie oczyszcza się biologicznie setki ton gleby, zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, pochodzącej z różnych miejsc.

Zastosowanie technologii biologicznych powinno

only for a few decades. Nevertheless, microorganisms are able to use some of these compounds as the only sources of carbon and energy (Brenner). The fate and direct removal of extraneous substances from the environment mainly depends on their metabolism intermediated by enzyme systems of organisms forming trophic (food) chains.

Biotechnological processes include mining, dressing and processing methods, during which post reaching the desired qualitative changes of raw materials and refuse, they make use of microorganisms or products of their metabolic activity. Basically, nature develops these systems on her own, and unconsciously people have been using their products since the beginning of their history. Biotechnologies embrace mainly microbiological, biochemical and chemical knowledge.

Biodegradation of hazardous harmful substances in the environment embody significant prospective methods, when complex and ecologically unsound pollutants are decomposed into simpler substances by the action of microorganisms. The principle of biodegradation technologies is an optimization of nutrient ratios (to support the growth of selected microorganisms able to degrade the target contaminants) and an application of suitably selected isolated microorganism strains with relevant degradation abilities.

Previously suggested decontamination technologies were often very costly and severe to the environment. There is though a tendency to propose and apply procedures that are not only cheaper but also more natural. One of the prospective ways is a biological decontamination of the environment by means of microorganisms and plants (Páca).

Currently, biodegradation technologies, biological methods to remove a variety of pollutions are being improved in an intense way. Biodegradation technologies first proved practical on a wider scale during an oil spill of Exxon Valdez tanker. Since then they have been used more frequently in the majority of countries.

In the Czech Republic, this trend began to develop after 1989. These are mainly biodegradation technologies designed for the decontamination of soil and water contaminated by oil substances and their derivatives, for the decontamination of coal tar-phenol pollutions and last but not least for the decontamination of persistent organic pollutants (xenobiotics). Since 2000 a number of companies dealing with this issue have been active in the Czech Republic. Already now, some of them reach very good results and they make use of technologies on a worldwide level. For example, in the Czech Republic hundreds of tons of contaminated soils by oil substances are annually treated by the technologies of biological improvement in many decontamination sites.

The application of biological improvement tech-

mieć większe zastosowanie w stosunku do metod fizycznych i chemicznych, które pozwalają na usunięcie tylko części zanieczyszczeń. Ponadto, w niektórych przypadkach, metody biologiczne mniej szkodzą środowisku nawet w przypadkach dużej ilości zanieczyszczeń. Zaletą rozkładu biologicznego gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi jest fakt, że w trakcie biodegradacji nie powstają żadne odpady, które mogłyby zanieczyścić środowisko (produktami końcowymi są w ostatnim etapie dwutlenek węgla i woda).

Jednym z problemów występujących w trakcie stosowania technologii oczyszczania bazującej na metodach biologicznych w Republice Czeskiej są niewystarczające regulacje prawne, szczególnie w przypadku likwidacji starych składowisk. Obecnie biotechnologie pozostają w kompetencji Instytutu Zdrowia Republiki Czeskiej oraz Państwowego Zakładu Higieny w zakresie zawodowego bezpieczeństwa pracy i ochrony zdrowia społecznego.

W trakcie stosowania metod rozkładu biologicznego należy bezwarunkowo pamiętać, że jest to proces kompleksowy. Jego sukces lub niepowodzenie zależy od wielu czynników:

- chemicznych (typ zanieczyszczenia, odczyn pH, koncentracja makro i mikroelementów biogenych, zawartość wody, skład chemiczny substancji zanieczyszczającej, koncentracja roztworu pożywki itd.),
- mikrobiologicznych (aktywność mikrobiologiczna drobnoustrojów),
- fizycznych (temperatura, rozpuszczalność w wodzie, właściwości sorpcyjne).

Bez zewnętrznej ingerencji, szybkość naturalnego procesu rozkładu biologicznego w zanieczyszczonych terenach jest bardzo niska. Zastosowanie odpowiedniego przygotowania do zastosowania metody biodegradacji może powiększyć szybkość procesów biologicznych kilka razy.

### **Metody biodegradacji węglowodorów aromatycznych i poliaromatycznych**

Redukcja substancji organicznych przy pomocy drobnoustrojów stanowi część naturalnego cyklu obiegu węgla w naturze. Proces rozkładu biologicznego jest oparty na zdolnościach mikroflory, do wykorzystania występujących substancji szkodliwych jako źródła węgla i energii dla ich własnego wzrostu. Zdolność drobnoustrojów do degradacji węglowodorów była stwierdzona w 1895, kiedy opisano wzrost drożdży na parafinie.

Następnie, w 1969 Davies i inni opisali zdolność bakterii do wykorzystania metanu jako źródła węgla, a [Žebrák, 1997] udowodnił, że istnieją bakterie, które rozkładają wszystkie składniki ropy naftowej. W tym przypadku funkcjonują wszystkie organizmy zarówno organizmy prokariotyczne (bakterie i cyjanobakterie)

nologies should be preferred to physical and chemical methods as in principal they remove only the share of contamination in question. Moreover, in some cases, these methods harm the environment even more than the very pollution. The advantage of biodegradation of contaminated soils by oil substances is the fact that in the course of microbial degradation no waste materials polluting the environment are formed (the final products are carbon dioxide and water in the last stage).

One of the problems during the application of decontamination technologies based on biological methods in the CR are insufficient valid general rules and missing specific legislation in the aspect of removal of old ecological burdens. At present, biotechnologies fall under the State Health Institute of the CR and the State Hygiene Stations in terms of occupational safety and public health protection.

In the course of application of biodegradation methods it is necessary to keep in mind that it is a complex process. Their success or failure depend on the following factors:

- chemical (types of contaminant, pH medium, concentration of macro and microbiogenic elements, water content, chemical composition of the contaminated material, chemical composition and concentration of suitable nutrient solutions, etc.),
- microbiological (degradation activity of microorganisms),
- physical (temperature, water solubility, sorption onto solid particles).

Without external interference, the speed of a natural biodegradation process in the improved localities is very low. An appropriate improvement method may increase the speed of biological processes several times.

### **Ways of biodegradation of aromatic and polyaromatic hydrocarbons**

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

Later, the ability of bacteria to use methane as a source of carbon was discovered, and finally in 1969 Davis et. al. in (Žebrák) proved that there are bacteria degrading virtually all component parts of crude oil. Prokaryotes (bacteria and cyanobacteria) as well as eukaryotes (fungi including yeast fungus, algae and

jak również organizmy eukarotyczne (grzyby, drożdże, algi i protisty). W wielu przypadkach dodatkowo dużą rolę spełniają archaebakterie.

Zidentyfikowano ponad 200 gatunków drobnoustrojów zdolnych do biodegradacji węglowodorów. Są to kolejno w zależności od wagi: bakterie heterotroficzne, grzyby, bakterie aerobowe, aktinomycele, fototrofy i bakterie oligotroficzne. Największe zastosowanie mają bakterie rodzaju *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* i *Corynebacterium* [Masák, 1992]. Intensywne badania potwierdzają, że oprócz bakterii, można wykorzystywać inne drobnoustroje, np. grzyby i algi.

Zdolność do rozkładu biologicznego zależy od składu enzymatycznego poszczególnych typów bakterii. Skład enzymatyczny danej komórki jest określony przez jej potencjał genetyczny. Część genów kodujących enzymy odpowiedzialne za biodegradację znajduje się w DNA plazmidów. Plazmidy zwykle zawierają dodatkowe informacje, które nie są normalnie wykorzystywane przez komórkę, a ich utrata nie jest dla komórki letalna. W specjalnych okolicznościach może być to korzystne dla komórki. W takich warunkach kataboliczne plazmidy odgrywają ważną rolę gdyż pozwalają komórce wykorzystać niekonwencjonalne źródła energii.

Zasadniczo procesy biochemiczne, podczas których następuje rozkład węglowodorów, można podzielić na dwie podstawowe grupy, tj. procesy aerobowe (z dostępem do tlenu) i beztlenowe (anaerobowe). Ponieważ rozkład beztlenowy jest bardzo powolny, w praktyce wykorzystuje się głównie procesy aerobowe.

Benzen i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (dalej zwane PAU) mają wysoką ujemną energię rezonansu i dlatego są stabilne termodynamicznie, co ma wpływ na ich właściwości chemiczne. W praktyce zazwyczaj monitoruje się 16 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, które znajdują się na liście najważniejszych zanieczyszczeń opublikowanej przez US EPA. PAU znajdują się wśród zanieczyszczeń niebezpiecznych. Ich cząsteczki są utworzone z dwu lub większej ilości łańcuchów benzenu. Cząsteczki mają podstawienia (np. halogen-, sulfo-, amino-, nitro-) w łańcuchu benzenu, reaktywność w stosunku do tlenu spada i pierścienie stają się bardziej trwałe [Holoubek, 2000].

Mikroorganizmami, które powodują rozkład węglowodorów aromatycznych są bakterie typu: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacteria*, *Cyanobacter*, *Falvobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*.

### Charakterystyka bakterii *Pseudomonas putida*

Bakterie *Pseudomonas putida* są gram-ujemnymi bakteriami, chemoorganotroficznymi, aerobowymi. Nie-

protists) assert one selves in these cases. In addition, archaeobacteria play an important role in many cases.

More than 200 microorganism species capable of hydrocarbon degradation have been identified. They follow in the order of importance: heterotrophic bacteria, fungi, aerobic bacteria, actinomycetales, phototrophes and oligotrophic bacteria. The most applied bacteria fall under the genders of *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* and *Corynebacterium* [Masák]. Intense research in this area confirms that besides bacteria, other microorganisms, including fungi and algae, can be used.

The ability of biodegradation is given by enzymatic make-up of the individual bacterial genders. The enzymatic spectrum of a given cell is given by its genetic potential. A part of genes coding enzymes utilisable for biodegradation are found in the DNA of plasmids. Plasmids usually carry complement information which is not vital for the cell under normal circumstances and whose loss is not lethal to the cell. However, sometimes it can be an advantage in certain special conditions. In that respect, catabolic plasmids are very important as they permit their cells to use non-traditional sources of energy.

Basically, biochemical processes during which the decay of hydrocarbons occur, can be divided into two fundamental groups, i.e. aerobic processes taking place with the access of oxygen and anaerobic processes taking place without the access of oxygen. As the anaerobic degradation is very slow, mainly aerobic processes are used in practice.

Benzene and polycyclic polyaromatic hydrocarbons, hereinafter referred to as PAU, have a high negative resonance energy, and therefore they are thermodynamically very stable, which reflects in their chemical properties. In practice, usually 16 polycyclic aromatic hydrocarbons are monitored, which are on the list of priority pollutants of US EPA. PAUs range among persistent organic pollutants. Their molecules are formed by two or more condensed benzene nuclei. Bonding of other substituents (e.g. halogen-, sulfo-, amino-, nitro-) onto the benzene nucleus, the reactivity of the nucleus resonance structure towards oxygen falls considerably and the circle becomes more resistant to opening (Holoubek).

An overview of microorganisms degrading polyaromatic hydrocarbons: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacteria*, *Cyanobacter*, *Falvobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*.

### Characteristics of *Pseudomonas putida* bacteria

*Pseudomonas putida* bacteria are gram-negative, chemoorganotrophic, aerobic. Some species are fa-

które gatunki są chemolitotroficzne. Mają postać prostych lub zakrzywionych pałeczek. Ich wielkość mieści się pomiędzy 0.5 do 1.0  $\mu\text{m} \times 1.5\text{--}4.0 \mu\text{m}$ . Poruszają się dzięki jednej lub wielu wiciom umieszczonych polarnie. Występują pojedynczo lub w małych gronach lub łańcuchach. Rosną, w ściśle aerobowych warunkach, na zwykłych substratach na których tworzą nieregularnie duże kolonie produkujące rozpuszczalny w wodzie ekso-pigment (pyoktanina i fluoresceina), które przedostają się do atmosfery i barwią na kolor żółty albo błękitno-zielony.

Starsze kultury barwią na kolor ciemno-brązowy. Zakres temperatur wzrostu zawiera się w przedziale 0 do 42°C; optymalna temperatura wynosi 35°C. Aktywność enzymatyczna zależy od warunków środowiskowych, z których pojedyncze gatunki zostały wyizolowane. Bakterie wykorzystują niektóre cukry, z których tworzą kwasy, ale nie wydzielają gazu. Wiele gatunków utlenia glukozę do kwasu pirogronowego (glukonowego), 2-keto-pirogronowego i innych kwasów. Większość badanych gatunków redukuje azotany do azotynów. Występują jako saprofility w glebie i wodzie. Wykazują duże powinowactwo do gatunków *Vibrio* i *Xantomonas*. Łącznie jest ich około 29 gatunków. Na rysunku 1 przedstawiono bakterie *Pseudomonas putida*.

#### Charakterystyka bakterii *Rhodococcus* sp.

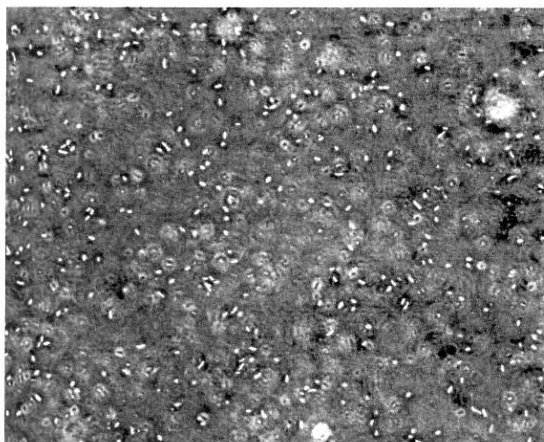
Są to bakterie gram-ujemne, chemoorganotroficzne, aerobowe. Komórki mają kształt kulisty, przeciętna wielkość komórek zawiera się pomiędzy 0.5 i 3.5  $\mu\text{m}$ . Występują indywidualnie lub grupują się w postaci nieregularnych gron, czasami w postaci tetraedru lub wiązki. Rosną w warunkach aerobowych na pospolitych substratach, w optymalnej temperaturze 25–35°C. Na substratach tworzą lśniące kolonie o wielkości 2–4  $\mu\text{m}$ . Wiele kolonii barwi na różne kolory (różowy, żółty, pomarańczowy).

cultivate chemolithotrophic. They are straight or curved rods. Their dimensions range between 0.5 and 1.0  $\mu\text{m} \times 1.5\text{--}4.0 \mu\text{m}$ . 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 dyes 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, out of which they form acids, but not gas. Many genders oxidize glucose into gluconic acid, 2-keto-gluconic and other acids. The majority of the studies genders reduce nitrates down to nitrites. They live saprophytically in soil and water. There appears a high affinity with the *Vibrio* and *Xantomonas* genders. In total, there are approximately 29 genders. Figure 1 shows *Pseudomonas putida* bacteria.

#### Characteristics of *Rhodococcus* sp bacteria

These are gram-negative, chemoorganotrophic, aerobic. The cells are of a spheroidal shape, the average size of the cells fluctuate between 0.5 and 3.5  $\mu\text{m}$ ; 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°C. On the substrates they form shiny colonies with the dimensions of 2–4  $\mu\text{m}$ . Many colonies precipitate pigments of various colours (pink, yellow,



Rys. 1  
Bakteria *Pseudomonas putida*

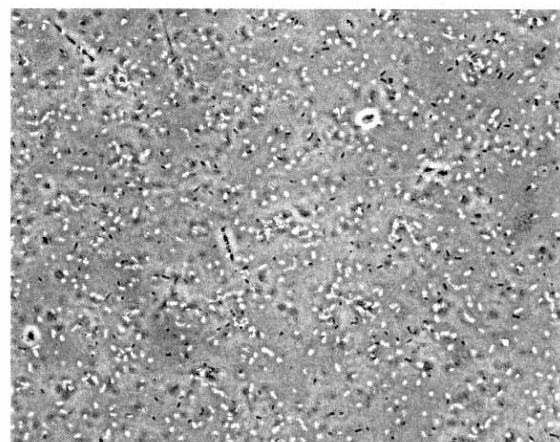
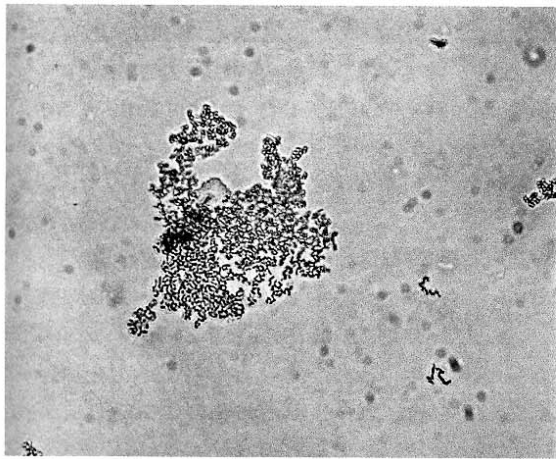


Fig. 1  
*Pseudomonas putida*



Rys. 2  
Bakterie *Rhodococcus sp.*

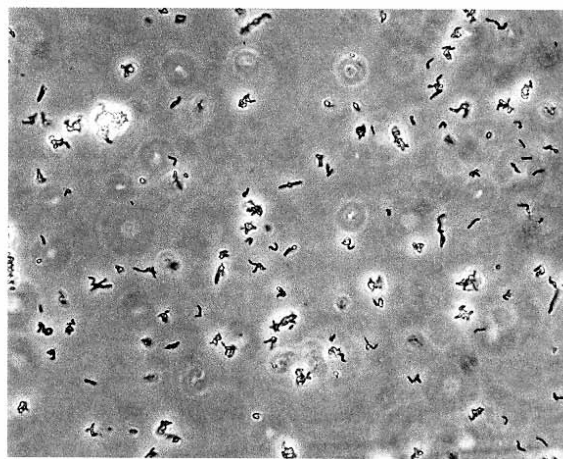


Fig. 2  
*Rhodococcus sp.*

W naturze, występują, jako saprofity. Na rysunku 2 przedstawiono bakterie *Rhodococcus sp.*

### Metodyka doświadczeń

Doświadczalny rozkład biologiczny wybranych szkodliwych substancji – PAU (Wielopierścieniowe Węglowodory Aromatyczne), PCB (PoliChlorowane Bifenyle) i NEL (Nierozpuszczalne Substancje Ekstrahowalne) – został przeprowadzony na próbce ziemi ze składowiska odpadów niebezpiecznych i komunalnych niedaleko miejscowości Pozďátky, rejon Třebíč. Ługowanie przeprowadzono przy pomocy wybranych mieszanych kultur bakterii *Pseudomonas putida* i *Rhodococcus sp.* Mikroorganizmy pochodziły z czeskich zasobów mikroorganizmów z Wydziału Nauk o Ziemi Uniwersytetu im. Masaryka w Brnie.

Do doświadczeń wykorzystano następujące pożywki:

- pożywka ciekła M1 (bulion wołowy, pepton, NaCl, woda destylowana, pH 7.2),
- pożywka ciekła M96 (pożywka mineralna z witaminami, pp123),
- pożywka ciekła M65 (pożywka mineralna dla chemolitotrofów H-3, pp 120).

Kontrola wzrostu bakterii i przybliżona ocena ich liczebności została przeprowadzona metodą mikroskopową. Wykorzystano mikroskop Karl Zeiss Jena „Amplival” i komorę Cyrus z rastrem dla oznaczania liczby bakterii. Powiększenia mikroskopu wynosiło od 400 (ocena ilości bakterii) do 1000 (obserwacja żywotności bakterii).

Po przeprowadzeniu ługowania oznaczono skład mineralogiczny próbek wykonując dyfrakcyjną analizę rentgenowską w laboratorium Instytutu Inżynierii Geologicznej w VŠB – Ostrava TU. Pomiar

(orange). In the nature, they occur as saprophytes. Bacteria *Rhodococcus sp.* are shown on Figure 2.

### Methods of the experimental work

The experimental biodegradation of the selected harmful substances – PAU (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon), PCB (Polychlorinated Biphenyls) and NEL (Insoluble Extractable Compounds) – took place with a soil sample from the hazardous waste dump and dump near Pozďátky, Třebíč district. It was carried out by means of selected mixed cultures of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus sp.* bacteria. 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, pp 123),
- liquid medium M65 (Mineral Medium for Chemolitotrophic H-3, pp 120).

The check of bacteria viability and an 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).

Post treatment, the mineralogical composition of the sample was determined by an X-ray diffraction analysis in the laboratory of the Institute of Geological Engineering at VŠB – TU Ostrava. The measurement

został przeprowadzony w zmodernizowanym, w pełni automatycznym dyfraktometrze URD-6 (Rich, Seifert-FPM, SRN). W badanych próbkach zidentyfikowano: kwarc, mikroklin, plagioklaz, chloryt, amfibol, biotyt, illit – montmorylonit.

Określenie zawartości NEL, PAU i PCB została przeprowadzone w akredytowanym laboratorium paliw, opadów i wody VÚHU, a.s. w Moście.

Eksperymenty laboratoryjne trwały maksymalnie 4 tygodnie. W pojedynczym doświadczeniu do zamkniętego pojemnika o pojemności 1 dm<sup>3</sup> dozowano 100 g ziemi 100 ml roztworu bakteryjnego i 500 ml pożywki. Napowietrzanie realizowano przy pomocy pompki akwaryjnej. Objętość roztworu uzupełniano wodą destylowaną. Próbkę dla analiz pobierano po upływie jednego i czterech tygodni ługowania.

### Wyniki rozkładu bakteryjnego

Stwierdzono, że w wyniku rozkładu bakteryjnego z wykorzystaniem czystych kultur bakteryjnych *Rhodococcus sp.* po jednym miesiącu ługowania usunięto 73% NEL, 73% PAU i 14% PCB. Wyniki zamieszczono w tablicy 1. W tabeli symbolem Σ PAU oznaczono sumę 15 węglowodorów poliaromatycznych. Stwierdzono, że zastosowanie kultury bakteryjnej *Rhodococcus sp.* jest odpowiednie dla degradacji PAU i NEL. Stopień rozkładu PCB jest bardzo niski.

Wyniki ługowania bakteryjnego przy pomocy czystych kultur bakterii *Pseudomonas putida* wykazały, że po jednym miesiącu ługowania można uzyskać stopień redukcji 96% NEL, 89% PAU i 14% PCB. Wyniki zostały zamieszczone w tablicy 2. W tabeli przez Σ PAU oznaczono sumę 15 węglowodorów poliaromatycznych. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że bakterie *Pseudomonas putida* rozkładają NEL i PCB, natomiast stopień rozkładu PAU jest niski.

Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że dla badanej próbki najlepsze wyniki bioogracji uzyskuje się stosując bakterie *Pseudomonas putida*.

was carried out using a modernized, fully-automated diffractometer URD-6 (Rich, Seifert-FPM, SRN). With the given sample, the following phases were identified: quartz, microcline, plagioclase, amphibole chlorite, biotite, illite – montmorillonite.

The determination of NEL, PAU and PCB was carried out in an accredited laboratory for fuels, waste and water of VÚHU, a.s. Most.

In total, the laboratory experiment lasted four weeks. 100 g of soil, 100 ml of bacterial solution and 500 ml of substrate were inserted into 1-litre containers which were following closed. Aeration 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.

### The results of bacterial biodegradation

It is apparent from the results of bacterial leaching using a pure bacterial culture of *Rhodococcus sp.* that after one-month leaching it is possible to remove 73% of NEL, 73% of PAU and 14% of PCB from the sample. The results are shown in Table 1. In the table Σ PAU represents 15 individual polyaromatic hydrocarbons. It is apparent that the application of this bacterial culture is suitable for the degradation of PAU and NEL. However, the degradation of PCB is very low.

The results of bacterial leaching applying a pure bacterial culture of *Pseudomonas putida* imply that after one-month leaching it is possible to remove 96% of NEL, 89% of PAU and 14% of PCB from the sample. The results are displayed in Table 2. In the table, Σ PAU represents 15 individual polyaromatic hydrocarbons. It is apparent from the acquired results that the application of this bacterial culture is suitable for the degradation of NEL and PCB, but the degradation of PAU is low.

The results imply that for the given sample the most suitable is the application of *Pseudomonas putida* bacteria with which the best biodegradation results have been acquired.

Tablica 1  
Stopień degradacji wybranych substancji niebezpiecznych za pomocą bakterii *Rhodococcus sp.* (wartości wyrażone w mg/kg suchej masy)

	NEL	Σ PAU	Σ 6 congeners PCB
Próbka wyjściowa Input	510	17,40	0,07
Jeden tydzień One week	180	10,55	0,06
Cztery tygodnie Four weeks	138	4,65	0,06

Table 1  
The course of degradation of the selected harmful substances by means of *Rhodococcus sp.* bacteria (values stated in mg/kg solid)

Tablica 2  
Stopień degradacji wybranych substancji niebezpiecznych  
za pomocą bakterii *Pseudomonas putida*  
(wartości wyrażone w mg/kg suchej masy)

Table 2  
The course of degradation of the selected harmful  
substances by means of *Pseudomonas putida* bacteria  
(values stated in mg/kg solid)

	NEL	Σ PAU	Σ 6 congeners PCB
Próbka wyjściowa Input	510	17,40	0,07
Jeden tydzień One week	135	6,05	0,06
Cztery tygodnie Four weeks	18	1,85	0,06

### Posumowanie

Celem badań było przeprowadzenie badań laboratoryjnych biodegradacji NEL, PAU i PCB z próbki gleby z kopalni Pozďátky. Uzyskane rezultaty wykazały, że dla badanych próbek najlepsze efekty biodegradacji uzyskano stosując kulturę bakteryjną *Pseudomonas putida*, efektywność degradacji PAU wyniosła 89% a dla NEL 96%. usunięcie PCB przy pomocy tych bakterii było nieskuteczne. Lepszy efekt biodegradacji można uzyskać w wyniku przedłużenia okresu rozkładu biologicznego lub zastosowanie modyfikowanych kultur bakteryjnych.

### Conclusion

The objective of the project was a laboratory check of biodegradation of NEL, PAU and PCB with a soil sample from the Pozďátky locality. The acquired results show that for the given sample it was more convenient to apply the bacterial culture of *Pseudomonas putida*, as the removal efficiency of PAU was 89% and of NEL it was 96%; though, for the removal of PCB these culture appears inefficient. Better results could be reached by prolonging the period of biodegradation or an application of adapted bacterial cultures.

### Literatura – References

1. Brenner, V.: *Biodegradace persistentních xenobiotik. Biodegradace VI*, pp. 45-47, Seč, 2003.
2. Holoubek, I. – Vokounová, Š. – Komprda, J.: *Perzistentní organické polutanty v atmosféře a půdách, tékání z půd. Ochrana ovzduší č. 3, Praha, 2000.*
3. Masák, J. et al.: *Speciální mikrobiální technologie. VŠCHT Lecture Notes*, 1992.
4. Páca, J. Suchá, V. Mikšanová, M. Stiborová, M.: *Enzymy kvasinky Candida tropicalis participující na biodegradaci fenolu. Biodegradace VI*, pp. 9-13, Seč, 2003.
5. Sezima, T.: *Biodegradace vybraných škodlivin v půdách a vodách. Doctoral Thesis, VŠB – TU Ostrava, 2003.*
6. Žebrák, R.: *Biotechnologické metody sanací kontaminovaných zemin a vod. Lecture of Biodegradace, spol. s r.o. Ostrava, 1997.*