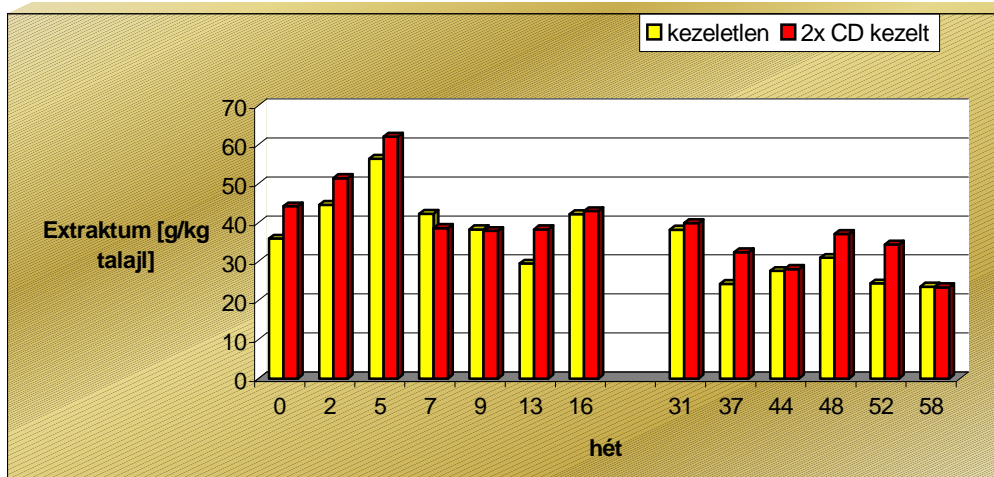


Nehezen bontható szénhidrogének biodegradációja és remediációja

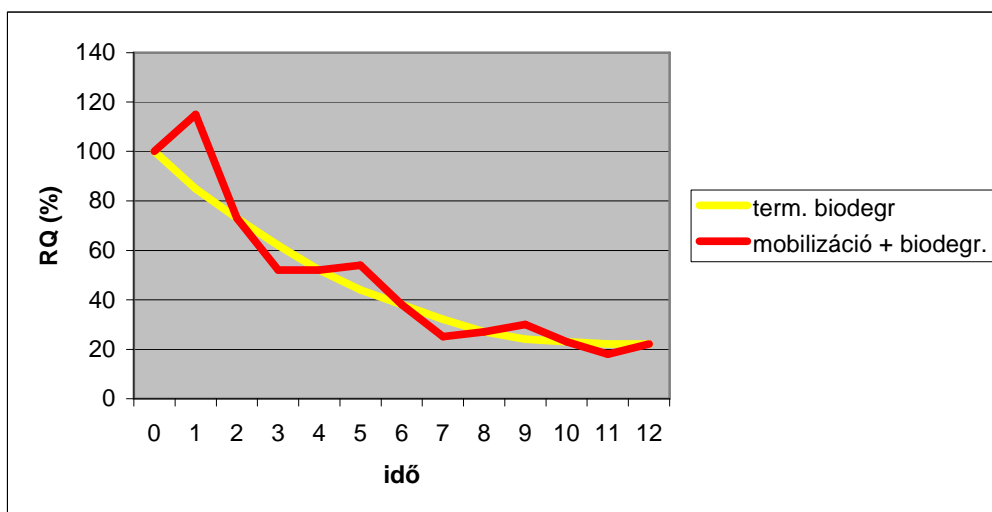
Gruiz Katalin

Egy igen toxikus fáradt-olajjal szennyezett dunaújvárosi talaj *ex situ*, szabadföldi remediálása során periodikus bontási folyamatot tapasztaltunk, amikor a talaj humuszanyagaihoz kötődő szerves szennyezőanyag feltáródása és hozzáférhetővé válása hetekkel megelőzte a biodegradációt, így átmeneti szervesanyag-tartalom növekedést (gravimetriás meghatározással) okozott a talajban (ld. 19. ábra: 1–5; 13.–16. és 44–48. hét).



19. ábra: Az extraktumtartalom periodikus változása a remediáció során

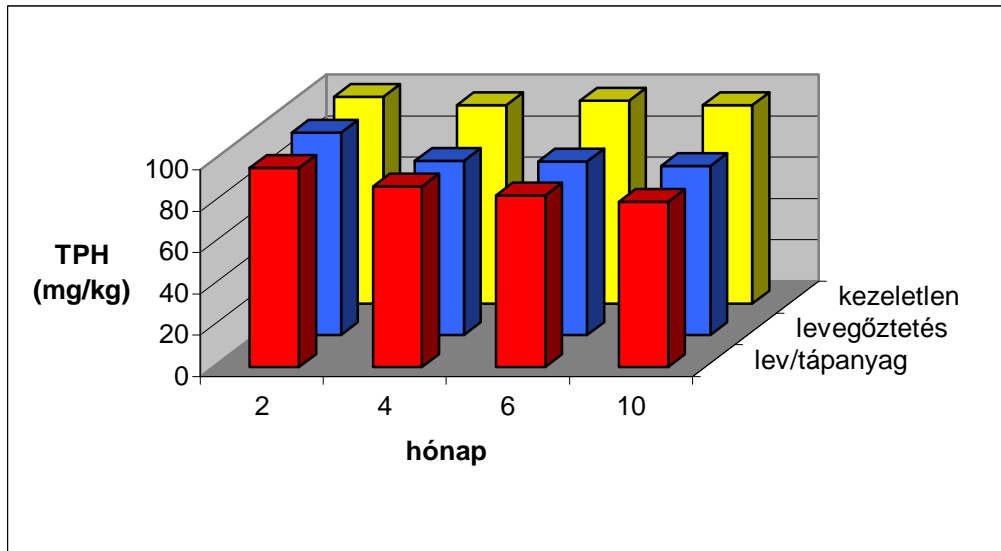
Ez az átmeneti növekedés több ízben is bekövetkezett a közel egy éves kísérlet során, melynek magyarázata, az, hogy a talajban kialakult mikroorganizmus-közösség által hasznosítható szénhidrogének elfogyása utáni maradék biodegradációjához egy újabb adaptációs periódus volt szükséges, vagyis a talaj biodegradáló közösségének ismételt adaptáción kellett átesnie, hogy az egyre nehezebben bontható maradékkal megbirkózzon, eközben viszont a szerves szennyezőanyag feltáródása, mobilizálódása tovább folytatódott.



20 ábra: A kockázati profil alakulása ciklikus mobilizáció és degradáció esetén

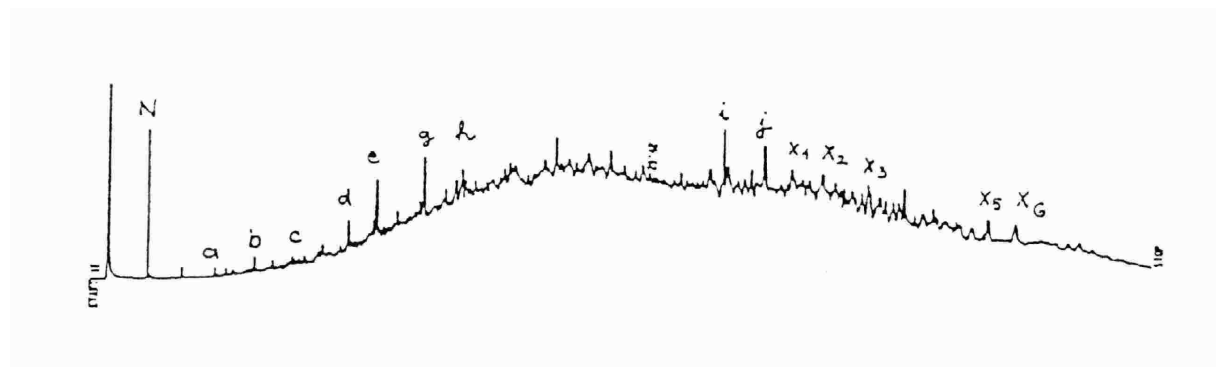
5.7. A spontán bomlás is kerülhet zsákutcába

Több évtizedes talajszennyeződésre leltünk a tatabányai bányaudvaron. A kavicsos feltöltés 60 000 mg/kg koncentrációban tartalmazott extrahálható olajat. A bioremediációs kísérletekben 10 hét alatt csak maximum. 20 százalékos bontást tudtunk elérni (21. ábra).



21. ábra: Tökéletlen spontán biodegradáció után visszamaradt szennyezett talaj bioremediációja laboratóriumi kísérletekben

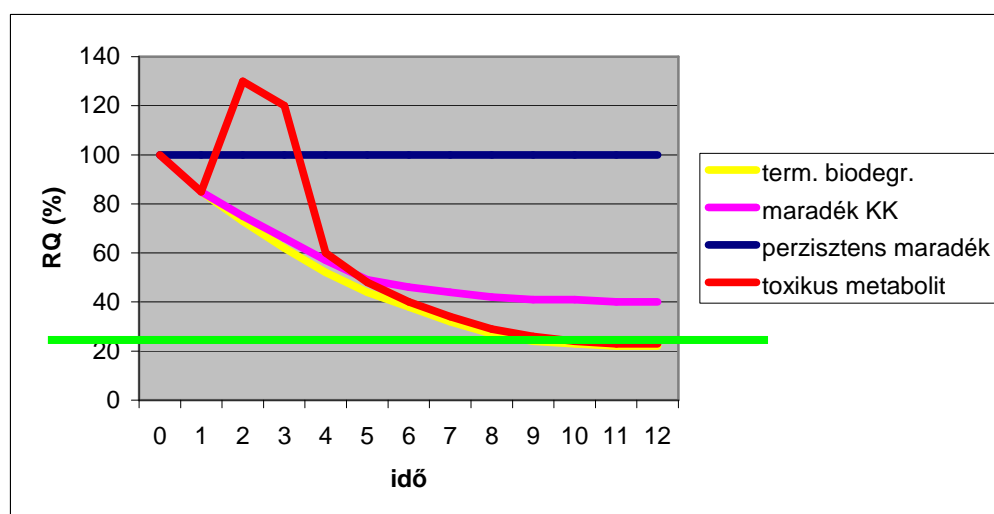
A vizsgált talaj rossz minőségű élőhely volt a mikroorganizmusok számára, a szénhidrogénbontó mikroorganizmusok száma kicsi. A gázkromatográfiával meghatározott szénhidrogén összetétel adta a magyarázatot a lassú biodegradációra: a talajt szennyező szénhidrogén fűtőolaj+pakura tökéletlen biodegradációjának maradéka.



22. ábra: A tökéletlen biodegradáció maradékának gázkromatogramja: a biodegradálhatóak hiányoznak

A spontán lezajlott biodegradáció során a könnyen bontható normál paraffinok elfogytak és visszamaradtak a pakurára jellemző perzisztens szénhidrogén-komponensek, melyek bontásához a rossz környezeti adottságok miatt nem tudott adaptálódni a talaj mikroflórája.

A 23. ábrán néhány tipikus kockázati profilt mutatunk be, melyek eltérnek az ideálistól.



- Biodegradálható szennyezőanyag, csökkenő KK
- Toxikus metabolit, átmenetileg megnőtt KK
- Limitált vagy korlátozott bidegradáció
- Perzisztens szennyezőanyag
- Elfogadható kockázati szint

23. ábra: Átmenetileg megnövekedett és maradék környezeti kockázat (KK) profilja

A nehezen bontható vagy bonthatatlan maradékot eredményező természetes folyamatok tapasztalataink szerint elég gyakoriak, de ezeken helyesen megválasztott technológiával, tápanyagpótlással vagy szervesanyag kiegészítéssel lehet segíteni.

Egy másik gyakori jelenség a toxikus közti vagy végtermékek képződése a biodegradáció során. Ennek megfelelő kockázati profilt mutat a piros görbe a 23. ábrán.

A leggyakoribb toxikus metabolitokról összefoglalást készítettünk a célból, hogy felhívjuk a figyelmet, hogy ezen szennyezőanyagok előfordulása esetén különös figyelmet kell szentelni ezek monitorozására és keletkezésük visszaszorítására.

Toxikus metabolitok keletkezése

A mikrobiológiai átalakító tevékenység gyakran a kiindulási anyagnál lényegesen kockázatosabb metabolitokat eredményez. Ez mind *in situ*, mind *ex situ* körülmények között előfordulhat. A toxikus, karcinogén, mutagén, és egyéb hatások (neurotoxikus, fitotoxikus, antimikrobás) mellett megváltozhat a szennyezőanyag kötődése, vagyis a hozzáférhetősége, a vízzoldhatósága, illékonyasága, mobilitása és gyakran a perzisztenciája. Megváltozhat a toxicitás spektruma is.

Néhány gyakrabban előforduló előnytelen átalakulást sorolunk a következőkben fel. Az itt felsorolt szennyezőanyagok és anyag típusok esetében különös gondot kell fordítani a biotechnológusnak a technológia ellenőrzésére és olyan kontrollált technológia-vezetésére, mely lehetőség szerint kiküszöböli a kockázatos metabolitok képződését.

- Triklóretilénből vinilklorid

- Triklóretilénből klorálhidrát (2,2,2-triklóracetaldehid), mely toxikus, mutagén és alkohollal együtt fogyasztva eszméletlenséget okoz
- Szekunder aminokból nitrózaminok, melyek toxikusak, mutagének és teratogének már igen kis koncentrációkban is.
- Trimetilaminból dimetilamin
- Szekunder aminok nitrítással N-nitrozó aminokká alakulnak
- Epoxidok képződése, pl. aldrinból dieldrin
- Foszfotionátok átalakulása foszfáttá
- Fenoxi-alkán-savak átalakulása fenoxi ecetsavvá
- Paration és dimetoát kénjének helyettesítése oxigénnel
- 6-(2,4-doklórfenoxi)hexanoic-sav átalakulása 2,4-DB-vé ill. 2,4-D-vé
- Tioéterek oxidációja szulfoxidokká és szulfonokká
- Nonilfenol polietoxilát átalakulása 4-nonilfenollá
- Észterek hidrolízise
- Peroxidáció: 3,4,5- és 2,4,5-triklórfenolból 2,3,7,8-tetraklór-p-dibenzodioxin (TCDD)
- Dimerizáció: 3,4-diklóranilinből 3,4,3',4'-tetraklór-azobenzol.
- Pirénből 1,6- és 1,8-dihidroxipirén, mely magasabbrendűekre is toxikus
- O-metilézés: pl. klórgvajakolt eredményez, mely halakra erősen toxikus termék
- Higanyból metilhigany, kadmiumból, arzénből (monometilarzin, dimetilarzin, arzin, metilarzon-sav, dimetilarzinsav, trimetilarzin) illékony metilezett termékek, ónból metilált ón keletkezik
- Demetilézés, pl. difenamidból 2,2-difenilacetamid
- Anaerob mikrobiológiai átalakulások: RDXből (robbanószer) dimetilhidrazin.

A technológiának képesnek kell lennie a jó irányba terelni az átalakulást, ill. megakadályozni a biokémiai időzített bomba aktiválódását.

Előfordulhat az is, hogy stimuláló hatású metabolit keletkezik, ezekkel ebben az összeállításban nem foglalkozunk.

5.8. A természetes bontóképesség korlátai

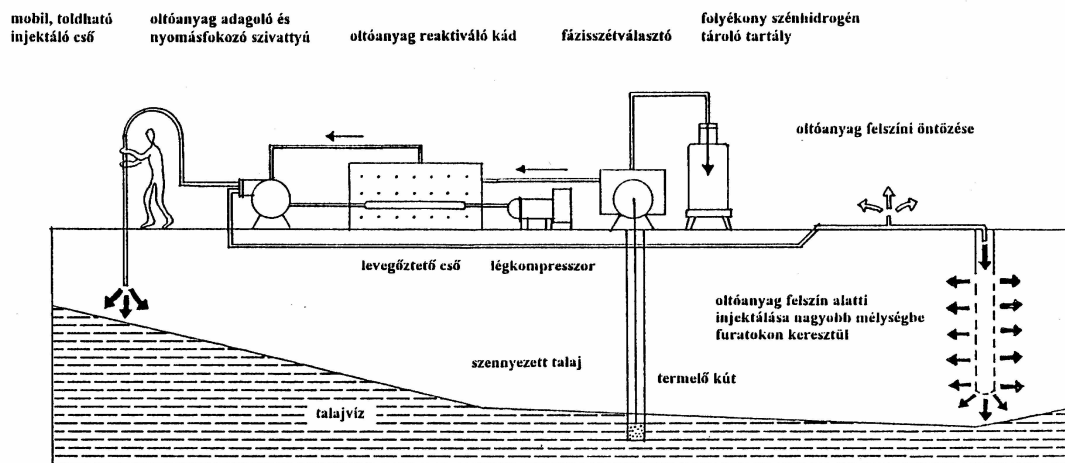
Egy hejőcsabai transzformátorállomáson PCB-t nem tartalmazó TO-40-es transzformátorraljával inhomogéne (maximum 78 000 mg/kg koncentrációban) szennyezett talaj *in situ* kezelését végeztük, a felszíntől 1,2 méteres mélységig, telítetlen talajban. A talajlazítás (levegőellátás) és a tápanyag-adagolás hatására aktiválódott a mikroflóra és az olajtartalom kezdetben rohamosan csökkent, majd megállt. A 78 000 mg/kg maximális érték pl. 5300 mg/kg értékre csökkent a talaj fellazított és átlevégtetett részében. Ez a maradék nagyon lassan degradálódott tovább. Ehhez járult, hogy helyenként a felszín alatt 1-2 méter mélységben, keményre összetapadt levegő és tápanyag számára áthatolhatatlan agyagrögökben az olajtartalom továbbra is 13–20 000 mg/kg értéken maradt és nem csökkent. A teljes területre, különösen pedig ezekbe a csomókba mikroaerofil (kevés levegő jelenlétében is működő) mikroorganizmusokból álló oltóanyagot fecskendeztünk.

Az oltóanyag talajba injektálását mutatja 24. ábra. Az élő mikroorganizmusokat tartalmazó sejtuszpenziót kézi injektálással vagy perforált csöveken, víznyerő vagy levegőztető kutakon keresztül történő beszívárogatással lehet a talajba juttatni.

A vendég-mikroorganizmusok további fél év leforgása alatt a legszennyezettebb részek és a kemény csomók olajtartalmát 900 mg/kg érték alá csökkentették (5. táblázat).

5. táblázat: Transzformátorolajjal szennyezett talaj remediálása két lépésben

Minta jele	Kiindulási extraktumtartalom (mg/kg)	Saját mikroflóra 6 hónap elteltével (mg/kg)	Mikroaerofil oltóanyag 6 hónap elteltével (mg/kg)
I	3 200	500	80
II	6 600	600	100
III	10 000	800	250
Olajos rögök	Nincs adat	13 000–20 000	880
VI	25 000	4 000	90
VII	28 000	19 000	90
T1	78 000	5 300	600
T1,2	25 000	7 300	890



24.

ábra: Mikrobiális oltóanyag injektálása felszínről illetve kutakon át történő beszivárogtatása

5.9. Mikrobiális oltóanyag alkalmazása biodegradáció intenzifikálására

A fenti példából is kitűnik, hogy a talaj mikroflórája nem képes minden esetben tökéletesen adaptálódni a szennyezőanyaghoz, ha a talaj adottságai nem megfelelőek nem tud megbirkózni a számára idegen szennyezőanyaggal. Ilyenkor bonthatatlan maradék marad vissza a talajban, állandósítva a talaj környezeti kockázatát.

Az oltóanyagok alkalmazása rengeteg kérdést és megoldandó problémát vet fel, elsősorban azért, mert nem ismerjük az ép, alkalmazkodni képes talaj mikroflóráját sem, akkor hogyan tudnánk eldönteni, hogy a kiegészítésül hozzátett mikroorganizmusok hogyan befolyásolják a talajban élő közösséget.

Annyi bizonyos, hogy a talaj mikroflóráját vizsgálva csak a mikroorganizmusok igen kis hányadát tudjuk effektíve megtalálni, kimutatni, izolálni, a sejtek nagyobb része rejtve marad a kutatók elől, a ma létező technikák nem teszik lehetővé a talajmikroflóra teljes összetettségének feltárását.

Nagyon valószínű, hogy a minor komponenseknek igen fontos szerepük van a kiegyensúlyozott közösségekben, ezt támasztják alá a néhány mikroorganizmusból álló, izolált tenyészetekből előállított mikrobakészítmények sikertelen alkalmazásai is.

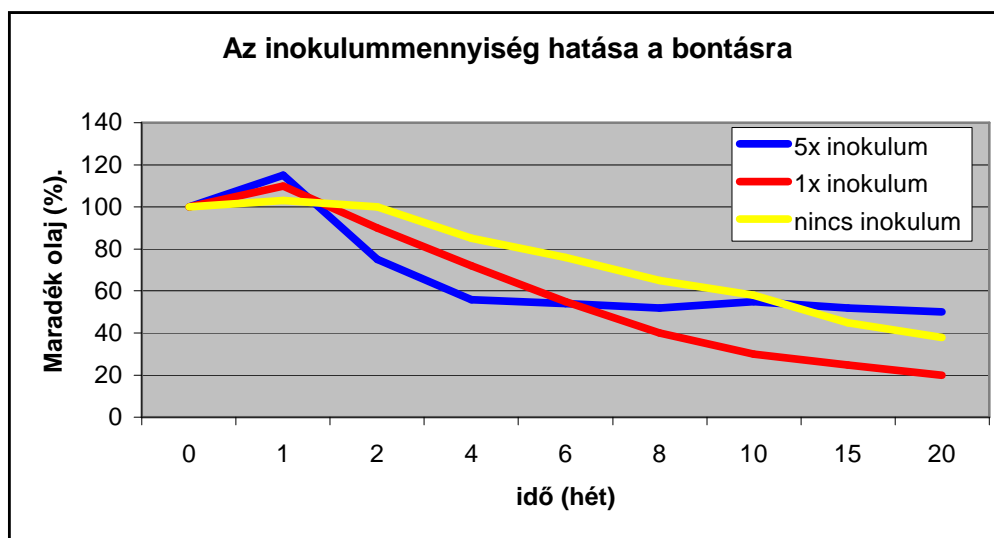
Azt már régóta tudjuk, hogy laboratóriumi, vagy esetleg génmanipulált törzseknek nem sok esélyük van a túlélésre a környezetben, így a talajban. Az összetett szennyezőanyagokhoz szükséges összetett közösségek kialakulását megismerve, az is bebizonyosodott, hogy néhány, pl. 3–5 különféle baktérium keveréke nem képes megbirkózni több száz komponensből álló kőolajszármazékokkal, amelyek még nem is tartoznak a nehezen bontható szennyezőanyagok közé, lévén, hogy nem xenobiotikumok, hanem természetes eredetűek.

Laboratóriumi kísérletekkel egyértelműen bizonyítható, hogy a jól működő, megfelelően adaptálódott talajmikroflórát oltóanyaggal tovább javítani nem lehet. Lehet viszont tápanyagokkal, levegővel, szervesanyagpótlással, trágyázással, stb.

Az is bebizonyosodott, hogy vannak olyan xenobiotikumok, melyek bontására alkalmas törzsek létrejöttének igen kicsi a valószínűsége, tehát azok betelepítése megoldhatja bizonyos xenobiotikumok biodegradációját, pl. kometabolizmussal.

A talajhoz adott mikrobiális oltóanyag árthat is a kiegyensúlyozottan működő helyi mikroflórának, amennyiben elfogyaszthatja a szennyezőanyag könnyen biodegradálható komponenseit, és meghagyja a nehezen biodegradálhatóakat vagy toxikusakat, melyek feldúsulás után egy olyan szituációt eredményeznek, melyben a helyi adaptálódott mikroflóra nem tud elbánni a maradékkal.

Egy példával illusztrálom az oltóanyag-alkalmazás direkt hatását a bontásra és a maradékra. A kiegyensúlyozott, de lassú biodegradáció gyorsítására helyspecifikus oltóanyagot készítettünk. Az optimális inokulummennyiség meghatározása érdekében több, különböző inokulum-koncentráció alkalmazását is kipróbáltuk laboratóriumi kísérletben. A 25. ábrán a bontás sebességére és a maradék mennyiségére gyakorolt hatást láthatjuk optimális inokulumkoncentráció (1x) és annak 5-szöröse esetében.



25. ábra: Mesterséges oltóanyag különböző mennyiségeinek hatása a biodegradációra

A 25. ábrán összegzett eredményekből láthatjuk, hogy még a gondosan összeállított, a szennyezett helyszínről izolált, mesterségesen felszaporított és a szennyezett talajba visszaadagolt oltóanyag (1x) is csak 20 %-kal volt képes megjavítani a biodegradáció hatékonyságát. Az oltóanyag 5x-ös mennyisége viszont kimondottan hátráltatta a biodegradációt, felborította a kiegyensúlyozottan működő közösség egyensúlyát, elfogyasztotta a könnyen biodegradálható komponenseket, meghagyta viszont a számára bonthatatlan, ellenállóbb összetevőket, ezzel tulajdonképpen egy nehezebben biodegradálható keveréket eredményezve, amely az eredeti mennyiség több mint 50 %-ának bonthatatlanságát eredményezte. Ezzel szemben a mindössze 1x inokulum mennyiség alkalmazása az eredeti

olaj 80 %-ának bontását biztosította, a kezeletlen pedig, hosszabb idő elteltével ugyan (az ábrán már nem látható), de szintén több, mint 80 % bontására volt képes.

Ugyanakkor a kezdeti bontási sebesség nagymértékben megnőtt az 5x mennyiség alkalmazása esetén, 2 hét elteltével az 5x-össel kezelt talaj ott tartott, ahol az 1x-es inokulummal kezelt 4 hét, a kezeletlen pedig 8 hét elteltével. Ezen a kezdeti sebességnövelő effektuson – melyet valószínűleg a tenzideket képző mikrobák vagy a kereskedelmi termékbe kevert tenzidek (!) okoznak – alapul ezeknek a termékeknek a piacképessége, helyesebben eladhatósága.

Természetesen nem szabad kimondani előítéltszerűen azt, hogy sohasem segíthetnek a mesterségesen előállított mikroorganizmusok, de valószínűleg csak igen ritkán van valóban átütő hatásuk és alkalmazásuk szakértő megfontolást igényel, különben csak felesleges költség, kidobott pénz.

Összefoglalásul saját tapasztalataink alapján adok egy összefoglalást a remediációs célú talajoltóanyagok alkalmazásával kapcsolatban:

Oltóanyagok alkalmazásának feltételei, előnyei, alkalmazási módjuk

- Az oltóanyagok minden esetben területspecifikusnak és/vagy szennyező-anyagspecifikusnak kell lennie. Nincs általános érvényű, mindenre alkalmas oltóanyag.
- Meg kell különböztetni a biodegradáció céljára kifejlesztett és mobilizálásra alkalmas oltóanyagokat és ezek adekvát alkalmazását.
- Meg kell különböztetni a mikroorganizmusokat az egyéb, az oltóanyagba kevert adalékoktól, tenzidektől, tápanyag-kiegészítőktől, stb. Ne tulajdonítsuk a sejtek hatásának a műtrágyák vagy felületaktív adalékok hatását.
- Csak akkor alkalmazzunk mesterségesen előállított mikroorganizmus tenyészetet, ha a talaj saját mikroflórája nem képes és nem tehető képessé – a körülmények optimálásával – a szennyezőanyag vagy a keverék bontására, például, ha a toxikus szennyezőanyag hatására elpusztult vagy teljesen gátolt a működése.
- Akkor alkalmazzuk, ha perzisztens, bonthatatlan, speciális biokémiai feltételeket kívánó, nehezen bontható szennyezőanyag biodegradációját akarjuk megoldani.
- Ha speciális enzimeket és ennek megfelelően speciális géneket igénylő bontási folyamatot kell igénybe vennünk.
- Ha a bontás kometabolizmussal történik és ehhez megfelelő mikrobák még nem alakultak ki a szennyezett talajban.
- Ha szennyezőanyag jelenléte vagy egyéb okból megváltozott körülmények miatt a helyi mikroflóra adaptálódására nagyon hosszú időt kellene várni.

A kívülről bevitt mikroorganizmusokkal nem csak az a baj, hogy maguk nem maradnak a talaj „dzsungelében” életképesek és működőképesek, hanem az is, hogy felboríthatják a talajban élő közösség finom egyensúlyát, hiszen

- versengeni fognak a talaj saját mikroflórájával a táplálékért,
- versengeni fognak a talaj saját mikroflórájával a szennyezőanyagért,
- gátolhatják azokat antibiotikumok vagy más gátlószerek termelésével,
- a laboratóriumban szaporított mikroorganizmusok dús táptalajokhoz vannak szokva, „elkényeztetettek” és „hízásra hajlamosak”, emiatt a rendelkezésre álló keverék-szubsztrátból – amely nem más, mint a keverék szennyezőanyag – kiszelektálják a könnyen bontható finom falatokat, ennek következményeképpen

- ellenállóbb, nehezebben bontható összetételű maradékot fognak eredményezni.
- Összességében megzavarják a talaj saját, lassan adaptálódott mikroflórájának harmonikus működését.

5.10. Mesterségesen előállított enzimek alkalmazása a remediáció hatékonyságának növelésére

Az oltóanyag kérdéshez hasonló, sokat vitatott probléma az enzimek alkalmazása talajremediációra.

Ahhoz, hogy a kérdést helyesen értelmezzük és megfelelően orientálódjunk, azt kell tudnunk, hogy a talajban hogyan, mi módon vannak jelen és milyen szerepet játszanak az enzimek általában.

A talajban alapvetően kétféle módon kötött és működő enzim van:

1. élő sejtekben vagy
2. talajkolloidokhoz kötve.

A talajkolloidokhoz kötött enzimek is élő sejtekből származnak, vagy

1. exoenzimek, melyeket eleve kibocsátásra és sejten kívüli működésre szánnak a sejtek, vagy
2. elpusztult sejtekből kiszabadult enzimek.

Az enzimek túlélése és működőképessége a talajban függ az enzim és a talaj tulajdonságaitól, egyes enzimek akár évekig is működőképesek maradhatnak.

Az enzimek szubsztrátspecifikussága a másik alapvető dolog, ami meghatározza működésüket, aktivitásukat egy-egy szennyezőanyag bontásával kapcsolatban. Egy-egy szénhidrogén bontására több tucat enzim jelenlétére és kiegyensúlyozott működésére van szükség a talajban, sejten belül és kívül. A kőolajszármazékokban található szénlánc-hosszúság, elágazás, telítetlenség, gyűrűszám, stb. szerinti vegyületsorozatok tagjainak bontásához enzimek sorozata szükséges, hiszen a szubsztráthoz való kapcsolódásuk térbeli molekulaszerkezetüktől függ, térbeli komplementaritáson alapul. Tehát más monooxigenáz, dioxigenáz, hidroláz, stb. szükséges egy rövid, egyenesláncú alifás, egy hosszabb elágazó és egy gyűrűs molekulához.

Mindezek megértése után elképzelhető, hogy egy keverék szennyezőanyag bontásához szükséges enzimek készítmény bonyolultsága túl nagy ahhoz, hogy ezt mesterségesen tudjuk előállítani, hacsak nem ugyanazzal a szennyezőanyaggal táplált talajban élő mikrobaközösség vagy más, a szénhidrogéneket bontani képes élőlény, pl. gilisztatenyészet (?) alakította ki azt. A mikrobaközösség által termelt enzimek esetében a kinyerés és a koncentráció okoz gondot, a gilisztatenyészet alkalmazása pedig kétséges, mert sem a szakirodalomban nem található bizonyíték arra, hogy a giliszták metabolizálnák a kőolajszármazékokat, sem a gyakorlati kipróbálás nem hozott pozitív eredményt a szénhidrogén-biodegradációban.

Általános stimuláló hatás mindig várható persze az ilyen készítményektől, ha más miatt nem, akkor a fehérje és egyéb tápanyagtartalom miatt, de ez nem több, mint bármelyik szerves trágya vagy műtrágya hatása.

Az enzimek alkalmazásával kapcsolatban is érvényes az, amit a mikrobiális oltóanyagoknál hangsúlyoztunk: nincs mindenható enzim. Nem várható komoly hatás mesterségesen előállított enzimektől keverék szennyezőanyagok esetében, viszont egyes xenobiotikumok bontásában lehet szerepük, hiszen pl. egyetlen nehezen bontható vagy toxikus xenobiotikum bontásához szükséges néhány enzim megismerhető, azonosítható, előállítható és ha még azt is biztosítjuk, hogy aktivitásukat megőrizték a talajban (a rögzítéshez szükséges kötőhely térjen el az aktív centrumtól), akkor sikeres talajoltó enzim előállítását mondhatunk a magunkénak..

5.11. Összefoglalás a szerves szennyezőanyagokkal szennyezett telítetlen talaj természetes folyamatairól és azok környezeti kockázatairól (KK)

A háromfázisú talajban lejátszódó természetes folyamatok közül a mobilizálódás és a biodegradáció alapvető fontosságúak a talaj saját mikrobiológiai aktivitásán alapuló bioremediációs technológiákban (ENA, *in situ* bioremediáció). A mobilizáció és a biodegradáció sebessége és minősége ugyanakkor alapvetően meghatározza a bioremediációs technológia sikerét, kockázatát és költségét.

A példaként tárgyalt esettanulmányok alapján összefoglalom a tipikus folyamatokat és azok eredményeképpen létrejövő kockázati szituációt, melyet a tanulmányban bemutatott kockázati profil jellemez (12).

Az itt felsorolt esetek kimondottan a többé-kevésbé biodegradálható szerves szennyezőanyagokkal végzett kísérleteken alapulnak, de az ezekből következő elvek általános érvényűek, és akár szervesetlen szennyezőanyagokra, akár fitoremediációra vagy fitoextrakcióra is érvényesek, ahogy azt a szervesetlen szennyezőanyagokkal foglalkozó következő fejezetben fogjuk látni.

FOLYAMAT	EREDMÉNY
1. Kiegyensúlyozott biodegradáció	Csökkent KK
2. Részleges vagy szelektív biodegradáció	Perzisztens maradék,, maradék KK
3. Toxikus köztitermék	Átmenetileg megnőtt KK
4. Limitált biológiai hozzáférhetőség	Késleltetett biodegradáció, később csökkenő KK
5. Aszinkron mobilizáció és biodegradáció	Átmenetileg megnövekedett KK
6. Hozzáférhetőség növelés	Megnövekedett mobilitás, intenzívebb biodegradáció, átmenetileg megnőtt, végül csökkent KK
7. Általános biológiai aktivitás növelés	Megnövekedett mobilitás, intenzívebb biodegradáció, humuszszerűtés, mállási folyamatok, degradációs aktivitás, átmeneti KK növekedés, de végül csökkent KK.