

**Titlul proiectului : BIOTEHNOLOGII DE REMEDIERE SI BIOCONTROL A SOLURILOR SI APELOR CONTAMINATE CU IONI RADIOACTIVI UTILIZAND SISTEME MICROBIENE LIBERE SI IMOBILIZATE IN SCOPUL PREINTAMPINARII DEZASTRELOR ECOLOGICE**

**Director de proiect:** Dr.ing. Gheorghe CRUTU

**Contractor:** INCDMRR – ICPMRR Bucuresti

Contract nr. 983 / 2009 (Proiect P-291)

Programul de cercetare: IDEI

**Autoritatea contractanta:** CNCSIS - UEFISCSU Bucuresti

Durata proiectului : mai 2009 – oct. 2011

**Scopul proiectului:**

Scopul proiectului consta in elaborarea unor tehnologii ecologice, de epurare a apelor si de decontaminare a solurilor poluate cu ioni radioactivi, prin biosolubilizare.

Originalitatea proiectului consta in elaborarea unei tehnologii predictive si de control al efectelor factorilor de mediu asupra microbiotei din apele si solurile contaminate cu ioni radioactivi utilizand modalitati de calcul matematic, in scopul evaluarii rentabilitatii aplicarii acestor biotehnologii. De asemenea vor fi elaborate si tehnologii aplicative inovative, cum ar fi utilizarea unei instalatii (bioreactorului) la scara pilot in cadrul procesului de biosorbție .

**Obiectivele proiectului:**

1. Studiul documentar al biotehnologiilor utilizate pentru remedierea mediului poluat cu ioni radioactivi si prelevarea de probe din siturile contaminate din zona Banat in vederea studiului microbiotei indigene;
2. Determinarea factorilor care conduc la degradarea siturilor contaminate si identificarea, caracterizarea, selectionarea, izolarea de sisteme microbiene pentru depoluarea mediului;
3. Implicatiile practice ale sistemelor microbiene in biotehnologiile propuse
4. Experimente de laborator. Analize fizice, chimice, microbiologice ale apei si solurilor poluate cu radionuclizi si ioni radioactivi; prelucrarea statistica a datelor;
5. Experimentarea tehnologiei metodelor neconventionale la faza pilot, pe baza rezultatelor obtinute la faza de laborator;
6. Demonstrarea functionabilitatii, utilitatii si eficientei biotehnologiei elaborate;
7. Implementare managementului mediului. Indicatii practice si studii de caz (programe de mediu) privind implementarea sistemului de managementul mediului;
8. Diseminarea pe scara larga a informatiilor obtinute.

**Rezultate parțiale :**

Principalele surse de deseuri cu impact asupra mediului sunt:

- efluentii rezultati in procesele miniere, care contin elemente radioactive peste nivelul maxim admisibil;
- rocile aterile provenite din extractie;
- minereu neindustrial slab radioactiv, cu continut de uraniu (0,01 – 0,05 %) stocat in siturile miniere;
- “cozile” de la activitatea de procesare, stocate in iazuri de decantare de la Feldioara;

-deseuri metalice si lemnoase contaminate radioactiv in timpul exploatarii si procesarii minereului;

-arealele de lucrari miniere in exploatare incheiate, unde au ramas halde de steril;

-pulberile de minereu sau de concentrat de uraniu antrenate de curentii de aer din zonele de manipulare sau prelucrare a acestora.

Gestiunea deseurilor industriale produse consta in valorificare (reciclare), stocare, depozitare finala, incinerare. Ponderea acestor optiuni este in medie aproximativ aceeasi in fiecare an:

- depozitare 81,0%
- valorificare 15,0%
- stocare temporara 3,3%
- incinerare 0,7%.

Probele de sol si apa sunt prelevate din zona Banat, Perimetrul Ciudanovita si perimetrul Lisava, ce cuprinde zacamintele: Dobrei Nord, Dobrei Sud si Natra.

In urma analizelor efectuate in laboratoarele institutului au rezultat urmatoarele valori:

- pH-ul probelor de apa este cuprins intre 6,41 si 8,18, tabelul nr. 1;

pH-ul probe apa Tabel nr.1

Proba	pH
Lisava 1	7,99
Lisava 2	8,18
Lisava 3	7,44
Lisava 4	7,03
Lisava 5	8,04
Apa 1 – 100 m pr. Jitin	7,36
Apa 2 paraias care provine de la exploatare	7,87
Apa 3 – gura galeriei G4	6,41
Ciudanovita - aval statie epurare	7,57
Ciudanovita - amonte statie epurare	7,67

- analize spectrometrie gamma, tabelul nr.2;

Spectrometrie Gamma

Tabel nr.2

Nr. crt.	Proba	Cod pus pe etichete	Ra <sup>226</sup> Bq/kg	Th <sup>232</sup> ppm	K <sup>40</sup> %	Coeficientul de emanare %
1	Ciudanovita 1	Sol	48,35	5,89	2,36	42,4
2	Ciudanovita 2	Sol	146,3	10,73	2,52	12,8
3	Ciudanovita 3	Sol	253,7	9,98	3,00	9,2
4	Ciudanovita 4	Sol	203,5	8,19	1,21	14,0
5	Lisava L1	Sol	148,7	4,75	1,42	39,2
6	Lisava L2	Sol	137,7	12,18	1,88	10,6
7	Lisava L3	Sol	146,3	8,48	1,87	20,0

### Screeningul sistemelor microbiene:

Microorganismele utilizate in bioremediere trebuie sa :

- sa provin din natura , de preferinta din situsul poluat supus bioremediere
- sa nu fie rezultatul unor procese de manipulare
- sa nu fie patogene sau toxice

- sa manifeste flexibilitate metabolica
- sa posede echipament enzimatic adecvat
- sa se dezvolte pe seama agentului poluant disparand odata cu mineralizarea acestuia
- sa se integreze in conditiile naturale ale habitatului, fara sa afecteze echilibrul biologic
- sa nu produca efecte nedorite care sa contravina legislatiilor si normelor de protectie a mediului

Utilizarea microorganismelor prin metoda biologica-utilizarea biomaselor imobilizate in retinerea uraniului si metalelor grele, reprezinta o cale eficienta si usor de aplicat, ce permite recircularea si re folosirea biosorbentului.

*Geobacter metallireducens* este primul microorganism care are capacitatea interna de a detecta metalele si, mai mult, de a se deplasa catre ele cu ajutorul flagelilor, care ii cresc spontan in cazul in care sesizeaza prezenta unei surse de hrana. De fapt, bacteria nu elimina uraniul ci il face sa treaca de la o forma solubila la una insolubila, deci acest metal nu se mai poate infiltra in panza freatica. Microorganismele din genul *Geobacter* se dezvoltă foarte bine in medii ostile sau poluate, pe care le detoxifiaza.

Bacteriile sulfat-reducatoare (*Desulfovibrionaceae*), reprezinta o categorie speciala de microorganisme utilizate pentru indepartarea din apele poluate de suprafata si subterane a sulfatilor si ionilor metalici. Bacteriile sulfat-reducatoare sunt larg raspandite in natura, dar cu deosebire in zacamintele de minereuri metalifere, dezvoltandu-se atat in conditii aerobe cat si anaerobe.

Tulpina de *Trichoderma sp.* fiind cea mai activa in preluarea ionilor de uraniu si molibden din apele contaminate, conform etapelor de screening efectuate. Fungii solubilizeaza metalele prin excretia acizilor organici ce sunt in plus folositori in cresterea solubilitatii si a reducerii toxicitatii ionilor metalelor grele la valori neutre ale pH-ului.

Studiul de fata urmareste efectuarea unor teste de laborator pentru :

- *Obtinerea biomasei aditivata cu polimeri*

Pentru acest set de experimentari am preparat doua tipuri de biomasa, notate A si B, carora le-am ajustat valoarea pH-ului la 10 folosind solutie de NaOH. Dupa imobilizare in polimer, biomasa A a fost suspendata in solutie de NaOH 3% (200g biomasa la 1 l solutie), dupa care a fost tratata termic.

Metoda de imobilizare in ambele cazuri a fost aceeaasi si a constat din suspendarea biomaselor in apa deionizata (15% solid/lichid), dupa care a fost omogenizata cu polietilenamina 33% si glutaraldehida 25%. Se obtine astfel o pasta foarte vascoasa care se extrudeaza si se usuca la 60 - 65°C timp de 24 h, dupa care prin mojarare si sitare se obtin granulele de biomasa imobilizata.

- *Biosorbția metalelor grele utilizand biomaselor imobilizate*

Biomasele preparate anterior s-au folosit in studiul retinerii dintr-un efluent industrial a ionilor de Cr, Fe, Pb si Cu. 0,1 g particule de biomasa au fost suspendate in 100 ml efluent. Capacitatea de adsorbție a fost calculata cu formula:

$$M = (C_i - C_f) V_{sol.}/m_B$$

unde:

M - cantitatea de metal adsorbit (mg/g biomasa)

C<sub>i</sub> - concentratia initiala a metalului in solutie (mg/l)

C<sub>f</sub> - concentratia finala a metalului in solutie(mg/l)

V<sub>sol</sub> - volumul solutiei(l)

M<sub>B</sub> - cantitatea de biomasa uscata (g)

Rezultatele experimentarilor sunt prezentate in tabelul urmator.

*- Imobilizarea pe gel si materiale poroase*

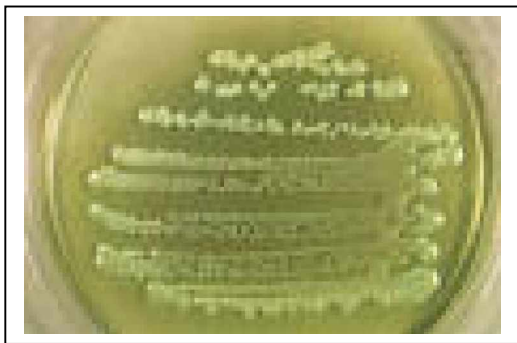
Imobilizarea microorganismelor pe geluri a fost folosita cu succes in studiile de laborator. Gelul cu biomasa incorporata se obtine prin adaugarea unui polimer in suspensia de celule. Produsul obtinut se sintetizeaza si este apoi folosit ca umplutura in coloane cromatografice. Metalele grele sunt adsorbite la trecerea efluentului prin coloana, iar desorbtiia si recuperarea acestora se face prin spalare cu HCl.

*Imobilizarea pe materiale poroase reprezinta o metoda imbunatatita de imobilizare bacteriana, deoarece procesul de difuzie in acest caz este mai rapid si poate fi controlat prin alegerea porozitatii optime a materialului.*

*Ca materiale suport in aceasta metoda se folosesc de regula spume de poliester. Materialul este taiat in discuri de dimensiuni relativ mici si se scufunda in mediul de cultura continand biomasa viabila. Celulele bacteriene se multiplica si ocupa zonele poroase ale pieselor de poliester. Metoda a dat rezultate satisfacatoare in special aplicata pe efluenti uraniferi.*

• ***Izolarea, purificarea si selectarea unor microorganisme cu capacitati biodegradative.*** Tehnica de lucru a fost foarte laborioasa si a implicat urmatoarele etape:

- (1) Efectuarea de suspensii dilutii de sol  $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ;
- (2) Insamantarea dilutiilor realizate pe medii de cultura solide pentru obtinerea de colonii izolate ;
- (3) Replicarea coloniilor izolate si pastrarea lor pe medii minerale solide in care unica sursa de carbon a fost reprezentata de uraniu si metalele grele (0,5%);
- (4) Observarea zilnica a dezvoltarii microorganismelor insamantate pe substrat. Astfel s-au obtinut colonii microbiene care s-au dezvoltat intr-un mediu ce continea ca unica sursa de carbon metale si uraniu



**Fig.nr.2 .Colonii de Pseudomonas sp. izolate**      **Fig.nr.3. Aspect microscopic al tulpinii**

- Concluzii:**
- microorganismele selectate apartin bacteriilor;
  - coloniile sunt rotunde, lucioase si colorate galben-fluorescent;
  - sunt forme bacilare (fig.2) si sunt Gram-negative.

• ***Adaptarea microorganismelor selectate, in conditii de laborator.*** Pentru aceasta a fost necesara cultivarea microorganismelor selectate in fermentatie submersa, la nivel de flacon cu capacitate de 500 ml, in care s-au introdus 100 ml mediu mineral de cultura si o cantitate de metale grele si radioactive 0.5 %.



Fig.nr.4. Adaptare microorganismelor în condiții de laborator

### Cap. 8- Ecologia și managementul sistemelor microbiene în ingineria ecologică

Lucrarea prezintă unele aspecte privind utilizarea biotehnologiilor în ingineria ecologică, modelarea ecologică și managementul ecologic, ce permit obținerea unor rezultate consistente în problemele de protecție a mediului. Dezvoltarea tehnologică a secolului XX a determinat o creștere economică puternică, însă a lăsat pe un plan secundar protecția mediului înconjurător, echilibrul ecologic al planetei suferind grave deteriorări și ajungându-se astfel să fie periclitată însăși existența vieții pe Pământ.

Într-o manieră rapidă, putem defini biotehnologiile ca fiind un ansamblu de tehnici și cunoștințe legate de utilizarea viului în procesele de producție, ca rezultat al progreselor recente ale biologiei moleculare.

Biotehnologiile mediului oferă beneficiile utilizării unor combinații de microorganisme selectate pentru capacitățile lor sinergice de a îmbunătăți calitatea apei, solului și a aerului.

Ultimele cercetări în domeniul biotehnicilor mediului oferă informații extrem de interesante asupra comportamentului microorganismelor, deschizând perspective noi în utilizarea acestora pentru protecția mediului. Astfel, s-a constatat faptul că purificarea apei este realizată în cea mai mare parte de către comunități de bacterii, nu doar de către o singură specie.

Spre deosebire de alte domenii ale biotehnologiei, în care ingineria genetică joacă un rol important în crearea de noi structuri vii, principala preocupare a *biotehnologiei mediului este aceea de a asigura integrarea noilor structuri biologice create în sistemul ecologic, fără a-i altera echilibrul.*

Tehnicile de imobilizare a structurilor microbiene și de cultivare a acestora sunt utilizate în biotehnologiile mediului cu aceeași pondere ca în procesele farmaceutice, diferențele constând în modalitățile de adaptare a tehnicilor pentru obținerea unui raport eficiență/cost optim pentru utilizatori.

***Cercetările sunt în derulare.***