

Akamulacija i biorazgradnja perklorata u okolišu

Gunčević, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:163270>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Kristina Gunčević

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

AKUMULACIJA I BIORAZGRADNJA PERKLORATA U OKOLIŠU

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentorica rada: prof. dr. sc. Tajana Begović

Zagreb, 2020. godine

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Tajana Begović

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Porijeklo perklorata u okolišu	2
2.2. Porijeklo perklorat reducirajućih bakterija.....	5
2.2.1. Filogenetička pozadina perklorat reducirajućih bakterija	5
2.2.2. Svojstva perklorat reducirajućih bakterija	6
2.2.3. Mehanizam redukcije perklorata.....	7
2.3. Kinetika redukcije perklorata kod perklorat reducirajućih bakterija	8
2.3.1. Rast PRB-a i kinetika redukcije perkloratnog aniona	9
2.3.2. Utjecaj nitratnog aniona na redukciju ClO_4^-	12
2.3.3. Utjecaj kisika na redukciju ClO_4^-	13
2.3.4. Utjecaj sulfatnog aniona na redukciju ClO_4^-	14
2.3.5. Utjecaj kloratnog aniona na redukciju ClO_4^-	15
2.4. Primjena perklorat reducirajućih bakterija za pročišćavanje vode	16
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	19

§ Sažetak

Prema porijeklu spojeve u okolišu koji sadrže perkloratni anion (ClO_4^-) možemo podijeliti na prirodne i antropogene. U sušnim i polusušnim područjima perklorati nastaju prirodnim procesima u atmosferi. Zahvaljujući širokoj primjeni ovih soli velike količine perklorata se sintetiziraju. Perklorati se uvelike koriste u industriji i sastojak su umjetnih gnojiva. Nemarno odlaganje industrijskog otpada te pretjerana primjena u poljoprivredne svrhe dovele su do povećanog nakupljanja perklorata u prirodi.

Velike koncentracije perklorata u okolišu uzrokovale su prilagodbu mikroorganizama koji su razvili mehanizme za redukciju perklorata. Radi se o perklorat reducirajućim bakterijama (PRB). Mehanizam redukcije događa se u prisustvu dva enzima: perklorat reduktaze i klorit dismutaze. Njihovom se aktivnošću štetni perklorat razgrađuje do kisika (O_2) i kloridnog aniona (Cl^-). Rast i aktivnost PRB-a ovisi o uvjetima okoliša u kojemu se nalaze. Optimalna vrijednost temperature, pH i saliniteta nužne su za normalnu metaboličku aktivnost PRB-a. Za aktivnost je bitna dovoljna dostupnost elektron donora (acetat, etanol, vodik). U realnim uvjetima okoliša za PRB glavnu prepreku u razgradnji perklorata predstavlja prisutnost drugih elektron akceptora poput nitratnog aniona (NO_3^-), kisika (O_2), sulfatnog aniona (SO_4^{2-}) i kloratnog aniona (ClO_3^-). Oni mogu usporiti rad perklorat reduktaze (poput NO_3^-), inaktivirati ju (O_2 , SO_4^{2-}) ili uzrokovati kompetitivnu inhibiciju (ClO_3^-).

Danas postoje metode kojima se nastoji smanjiti koncentracija perklorata u okolišu. Glavni medij rasprostranjivanja perklorata je voda, stoga su postojeće metode usmjerene na smanjenje koncentracije perklorata u vodenim površinama. Metode za pročišćavanje se mogu podijeliti na fizikalno-kemijske metode i na biološke metode. Primjena PRB-a ubraja se u biološke metode i zasniva se na sposobnosti PRB-a da reduciraju perkloratni anion do kloridnog aniona.

§ 1. UVOD

Razvoj naprednijih analitičkih metoda devedesetih godina prošlog stoljeća osvijestio je problem povećane koncentracije perkloratnog aniona (ClO_4^-) u okolišu. Povećane koncentracije zamijećene su u površinskim i podzemnim vodama, ali i u mnogim prehrambenim proizvodima. Najveće koncentracije perklorata otkrivene su u tkivu voća i povrća te u mlijeku i mliječnim proizvodima.^{1,2} Povećani unos perklorata u ljudski organizam utječe na unos joda putem štitne žlijezde remeteći rad natrij-jod simportera. Jod je bitan za sintezu hormona štitnjače te njegov manjak može dovesti do hipotireoze zbog čega je perklorat u povećanim koncentracijama posebno štetan za novorođenčad i djecu, ali i za odrasle. Stoga su u pojedinim državama određene maksimalne dozvoljene količine dnevnog unosa perklorata. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) odredila je maksimalni preporučeni dnevni unos od $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase² dok je u SAD-u agencija za zaštitu okoliša (US EPA) predložila preporučenu dnevnu dozu do najviše $0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase što odgovara koncentraciji od $15 \mu\text{g cm}^{-3}$ u vodi za piće.¹

Do danas je predloženo više metoda za uklanjanje perklorata iz okoliša. One su uglavnom usmjerene na smanjivanje količine perklorata u industrijskim otpadnim vodama te prema smanjenju udjela perklorata u gnojivima i poljoprivrednim površinama. Metode se dijele na fizikalno-kemijske među koje spadaju specifična i nespecifična ionska izmjena, membranska filtracija, adsorpcija aktivnim ugljenom i katalitička redukcija, te biološke metode u koje se ubrajaju fitoremedijacija i biološka redukcija.¹

Prisutnost perklorata u okolišu uzrokovala je prilagodbu mikroorganizama na perklorat. S vremenom ti su mikroorganizmi razvili mehanizam pomoću kojeg mogu iskoristiti perklorat za staničnu respiraciju. Koji su to izvori i uzroci prisustva perklorata u tlu i vodama, na koji način ti mikroorganizmi razgrađuju perklorat u okolišu, te kako na koji način uvjeti okoliša u kojima se nalaze utječu na njihov rast i aktivnost? Cilj ovoga rada je dati odgovore na ta pitanja. U ovom radu bit će predstavljena Monodova jednadžba, matematički model kojim je opisana kinetika rasta bakterijske biomase, kinetika redukcije perkloratnog aniona te kompetitivna inhibicija kloratnog aniona. Na kraju će biti izložen osvrt na primjenu perklorat reducirajućih bakterija (PRB) u svrhu uklanjanja perkloratnog aniona iz vodenih površina.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Porijeklo perklorata u okolišu

Izvore perklorata u okolišu možemo podijeliti na prirodne i antropogene. Perklorat nastao prirodnim putem u okolišu akumulira se uglavnom u sušnim i polusušnim područjima koja ne podržavaju ili u manjoj mjeri podržavaju biološku aktivnost mikroorganizama i biljaka koje imaju mogućnost bioredukcije tj. fitoremedijacije perklorata. Veće su koncentracije perklorata pronađene u području Čilea, Velike nizine u SAD-u, Boliviji, Antarktici, južnoj Africi, Kini, Ujedinjenim Arapskim Emiratima i Kanadi.^{1,3} Perklorat se uglavnom može pronaći uz prirodne depozite minerala nitrata, tu se ističu depoziti na području Čileanske pustinje Atacama, te uz depozite potaše (kalijev karbonat, K_2CO_3) i minerala koji sadrže fosfor.^{1,3} Ispitivanja količine perkloratnog aniona u uzorcima tla s područja Atacame pokazala su prisustvo perklorata u rasponu od 0 do 5,7 g perkloratnog aniona po kg uzorka tla. Uzorci tla s područja Novog Meksika pokazali su udio perklorata u rasponu od 0,025 do 3,7 g kg^{-1} , a uzorci tla s područja Bolivije udio perkloratnog aniona u rasponu od 0,5 do 1,7 g kg^{-1} .¹

Prirodni procesi koji vode nastanku perklorata odvijaju se u stratosferi reakcijama oksidacije kloro-oksoaniona ozonom i reakcijom foto-oksidacije djelovanjem UV zračenja. Tako nastali perklorat iz atmosfere dolazi na površinu tla suhim taloženjem (atmosferskim aerosolima i plinovima te eolskim procesima) i mokrim taloženjem (otopljen u kapljicama vlage). Zahvaljujući tim procesima perklorat se može pronaći u različitim okolišima barem u tragovima. Njegov maseni udio u tlu i podzemnim vodama varira na različitim lokacijama od 10^{-1} do $10^6 \mu g \text{ kg}^{-1}$.³ Laboratorijskim eksperimentima uspješno su izvedene kemijske reakcije za koje je bilo pretpostavljeno da vode do nastanka perkloratnog aniona u stratosferi. Oksidacija kloridnog aniona (Cl^-) i kloro-oksoaniona ozonom, uz iznimku kloratnog aniona (ClO_3^-) koji ne ulazi u reakciju s ozonom, te foto-oksidacija hipokloritnog aniona (OCl^-) i kloritnog aniona (ClO_2^-). Perklorat je također dobiven reakcijom radikala $ClO\cdot$ sa sumpornom kiselinom (H_2SO_4). Pokazalo se da je količina dobivenog perkloratnog povezana s oksidacijskim brojem klorova atoma. Vrste s višim oksidacijskim brojem klorova atoma imale su veće iskorištenje. Tako je dobiveno iskorištenje od 2,7% do 0,5% za oksidaciju ClO_2^-/ClO_2 , dok je oksidacijom $OCl^-/HOCl$ dobiveno iskorištenje od 0,02 do 0,005%.⁴ Reakcija kloridnog aniona i ozona, čak i kada su u reakciji prisutni u većim koncentracijama,

vrlo je spora ($v \approx 20 \cdot 10^{-9} \text{ mM min}^{-1}$)⁴ što se pozitivno odražava na očuvanje ozonskog omotača Zemlje s obzirom na prisutnost ozona i kloridnog aniona u atmosferi.⁵

Soli perklorata imaju široku primjenu u ljudskim djelatnostima. Primjenjuju se sintetički dobivene soli od kojih je najčešća amonijev perklorat (NH_4ClO_4).⁶ Amonijev se perklorat u velikoj mjeri primjenjuje kao oksidacijsko sredstvo u industriji oružja te je jedan od glavnih sastojaka u proizvodnji raketa i projektila s čvrstim pogonom. Osim toga, perklorat se koristi u proizvodnji baterija, vatrometa, eksploziva, farmaceutskih proizvoda, šibica itd.^{6,7} Takva široka primjena u industriji pridonijela je rasprostranjivanju perklorata u okoliš. Nemarno odlaganje tvorničkog otpada i otpadnih voda, osobito u prošlosti dok nisu postojale odgovarajuće mjere regulacije, dovele su do povećanja koncentracije ClO_4^- u tlu, a osobito u podzemnim vodama. Poseban problem predstavlja prisustvo perklorata u dušičnim gnojivima koja se koriste u poljoprivredne svrhe. Tu se obično ističe proizvodnja gnojiva u Čileu koja je aktivna još od 19. stoljeća zbog bogatih depozita nitrata uz koji se pojavljuje i perklorat. Postojale su poveznice između povećane koncentracije perklorata u SAD-u s uvezenim gnojivom iz Čilea, no one su osporene u današnje vrijeme s obzirom da čileanska gnojiva čine manji dio na tržištu gnojiva u SAD-u. Maseni udio perklorata pronađen u gnojivima koja se koriste u Europskoj uniji, a čije porijeklo nije čileansko iznosi do $2,3 \text{ g kg}^{-1}$.¹ Bez obzira na porijeklo, dušična gnojiva značajan su izvor perklorata.

Uz upotrebu voda kontaminiranih perkloratom za navodnjavanje poljoprivrednih površina ili za stočarstvo, dušična su gnojiva prva poveznica s njegovim prisustvom u prehrambenim proizvodima. Voće i povrće te mlijeko i mliječni proizvodi navode se kao namirnice u kojima su zabilježene značajne koncentracije perklorata. Perklorat se u biljkama akumulira u korijenju i listovima, stoga su najveće koncentracije zabilježene u biljkama poput salate, rotkvice, repe itd. Prisutan je, u nešto manjoj mjeri, u plodovima biljaka. Tako se može naći u voću poput marelica, malina, grožđa i grejpa pa je prisustvo perkloratnog aniona pronađeno i u pićima. Čajevi i drugo osušeno bilje kao i začini također su istaknuti po udjelu perkloratnog aniona u njima. Uz to treba spomenuti i prisustvo perklorata u mlijeku i mliječnim proizvodima te u mliječnim formulama za djecu.^{1,2} Gore navedene kategorije hrane i pića smatraju se glavnim poveznicama s prisustvom perklorata u ljudskom organizmu. Perklorat se spremno apsorbira iz probavnog trakta i prenosi u ostale dijelove organizma, a osobito se akumulira u štitnjači. Već kratkoročna izloženost prehrambenim proizvodima s većim udjelom perklorata može rezultirati dnevnim unosom od $0,40 - 2,3 \text{ } \mu\text{g}$ perklorata po

kilogramu tjelesne mase za pripadnike mlađe populacije (novorođenčad i djecu) te dnevnim unosom od 0,26 – 1,3 µg perklorata po kilogramu tjelesne mase za pripadnike starije populacije.² Kao što je već spomenuto, perkloratni anion negativno utječe na funkciju štitnjače. Perklorat remeti normalan unos joda i normalnu proizvodnju hormona štitnjače trijodtironina (T3), tiroksina (T4) i tireotropina (TSH).¹ Normalna funkcija štitnjače posebno je bitna za novorođenčad, jer u suprotnom može doći do nepotpunog neurološkog razvoja djeteta, mentalnih bolesti ili problema sa sluhom. Kod odraslih se kao posljedica nepravilnog rada štitne žlijezde, kao ozbiljnija posljedica na zdravlje ističe hipotireoza. No, poremećeni unos joda u organizam i u manjoj mjeri možda dovesti do razvoja multinodularne toksične guše ili do razvoja hipertireoze.²

U koliko je mjeri perklorat rasprostranjen u okolišu posljedica prirodnih procesa, a koliko ljudske aktivnosti može se razlučiti izotopnom analizom. Uspoređujući udjele izotopa klora ^{36}Cl i ^{37}Cl , kao i izotopa kisika ^{16}O i ^{17}O može se zaključiti o porijeklu perklorata.¹ Pri tome treba imati na umu čimbenike poput starosti tla, prisustva izvora perklorata u blizini mjesta uzorkovanja te ljudske aktivnosti na području uzorkovanja. Usporedbom izotopnog sastava prirodnog perklorata dobivenog iz uzoraka tla i/ili vode s izotopnim sastavom sintetiziranog perklorata pokazalo se kako je udio izotopa ^{37}Cl znatno veći u uzorku sintetiziranog perklorata, dok je udio izotopa ^{36}Cl i izotopa ^{17}O više prisutan u prirodnom perkloratu. S obzirom na to da su izotopi ^{36}Cl i ^{17}O u velikoj mjeri prisutni u atmosferi, to je potvrda prirodnog porijekla perklorata u atmosferskim reakcijama. S druge strane, izotopni sastav klora u uzorku tla može nešto reći i o starosti ispitivanog tla. Tla velike starosti, od nekoliko milijuna godina, imat će malen udio i izotopa ^{36}Cl i izotopa ^{37}Cl . Objašnjenje toga je što je tako velik vremenski period nekoliko puta veći od vremena poluraspada ^{36}Cl .¹

Na temelju gore iznesenih podataka o perkloratu se može zaključiti da je stabilan kemijski spoj koji opstaje na tlu kao i u vodi. Perkloratni anion sastoji se od klorova atoma tetraedarski koordinirana s četiri atoma kisika. Njegova veličina i mali naboj rezultiraju malim afinitetom za katione stoga njegove soli lako disociraju u vodi. To rezultira velikom mobilnošću perklorata u vodenim medijima. Perklorat je prilično stabilan zahvaljujući tetraedarskom rasporedu kisikovih atoma u prostoru koji otežavaju direktni napad na klorov atom. Stoga, iako je jako oksidacijsko sredstvo, perklorat će u većini okolišnih uvjeta ostati nepromijenjen. Ta stabilnost posljedica je visoke energije aktivacije (120 kJ mol^{-1}). Koliko će

se zadržati na tlu ili drugim površinama ovisi o prisustvu vode ili oborina na tom području s obzirom na manju sposobnost adsorpcije perklorata.

2.2. Porijeklo perklorat reducirajućih bakterija

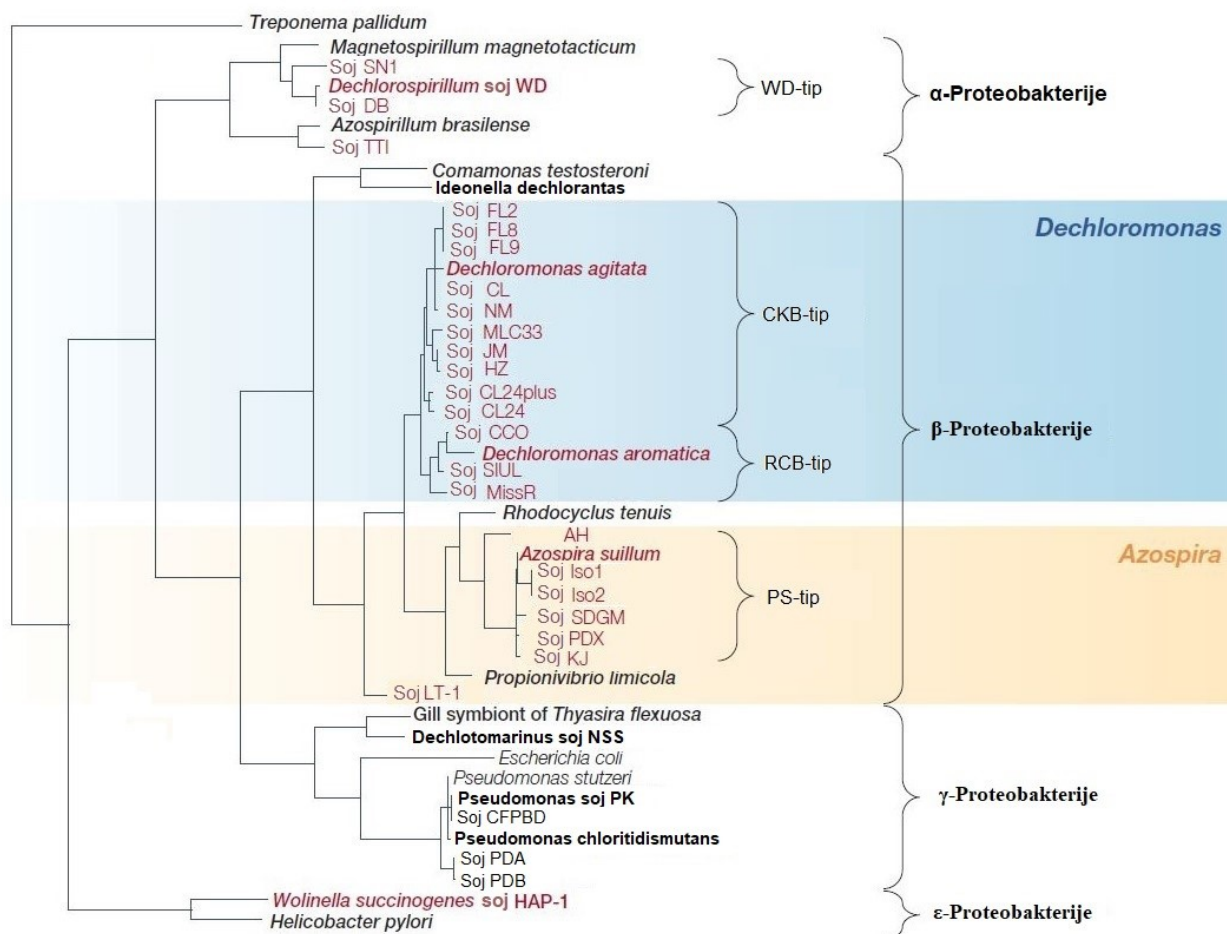
Rasprostranjenost perklorata u okolišu, osobito u područjima gdje je perklorat prisutan u većim koncentracijama, dovela su do prirodnog razvoja mikroorganizama koji ga mogu reducirati metaboličkim procesima. Prva otkrića takvih organizama dogodila su se još početkom 20. stoljeća. Tada je redukcija perklorata pripisana mikroorganizmima koji reduciraju nitrat s obzirom na to da mnoge takve bakterije mogu reducirati i perklorat. S vremenom je ta ideja odbačena te je potvrđeno postojanje zasebnog bakterijskog roda koji reducira perklorat prilikom stanične respiracije.

2.2.1. Filogenetička pozadina perklorat reducirajućih bakterija

Mogućnost redukcije perkloratnog aniona povezana je s bakterijskim rodом Proteobakterija. Tako se perklorat reducirajuće bakterije mogu pronaći raspoređene po gotovo svim razredima Proteobakterija što ukazuje na njihovu raznolikost. Najviše PRB-a koje se mogu pronaći u prirodi pripada razredu β -proteobakterija gdje se ističu vrste *Dechloromonas* i *Azospira*. Raznolikost PRB-a istaknuta je na fenotipskoj i na genotipskoj razini. Pojedine bakterijske vrste razlikuju se prema organizaciji i transkripcijskom smjeru gena uključenih u redukciju perkloratnog aniona. Osobito je promjenjiv, među različitim bakterijskim vrstama, organizacijski smještaj gena *cld* koji kodira klorit dismutazu.⁶ Klorit dismutaza vrlo je važan enzim u ukupnom mehanizmu redukcije perkloratnog aniona. Više o enzimu klorit dismutazi nalazi se niže u tekstu.

Unutar pojedinih razreda postoji daljnja podjela prema specifičnom slijedu nukleotida unutar male podjedinice ribosomske RNA (16S rRNA). Tako se vrsta *Dechloromonas* dijeli na CKB- tip i RCB-tip, a *Azospira* na PS-tip. Slika 1. prikazuje genetsko stablo Proteobakterija s istaknutim razredima koji uključuju perklorat reducirajuće bakterije i podjelu prema slijedu nukleotida unutar pojedinog razreda. Mogućnost razlikovanja specifičnog slijeda nukleotida na 16S rRNA omogućuje raspoznavanje pojedine bakterijske vrste u analiziranim uzorcima. To je bitno u slučajevima gdje je potrebno poznavati količinu i vitalnost PRB-a. U bioreaktorima koji se primjenjuju za uklanjanje visokih koncentracija

perklorata u površinskim vodama ili u poljoprivredi, gdje je bitno ispitati prisutnost i zdravlje PRB-a kako bi se regulirala prisutnost perklorata u poljoprivrednim proizvodima.⁶



Slika 1. Genetsko stablo Proteobakterija s podjelom na razrede koje uključuju perklorat reducirajuće bakterije (ispisane crvenim slovima na slici) te prikazom podjele razreda α-Proteobakterija i β-Proteobakterija prema slijedu nukleotida na 16S rRNA. Preuzeto i prilagođeno prema ref.6

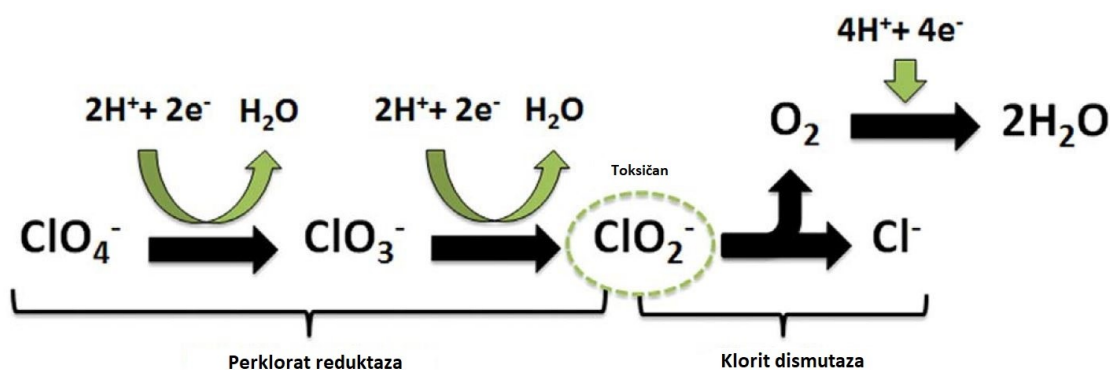
2.2.2. Svojstva perklorat reducirajućih bakterija

Perklorat reducirajuće bakterije široko su rasprostranjene vrste prisutne u različitim okolišima koje se gotovo uvijek mogu naći u uzorcima tla ili vode korištenima za analizu na prisustvo perklorata. Organizmi su koji ne zahtijevaju mnogo, no molibden je ključan element u metaboličkom putu za redukciju perklorata. Osim njega, za rast PRB-a i redukciju perklorata bitni su i željezo te selenij. PRB su anaerobni organizmi, uz iznimku malog broja mikroaerobnih vrsta (*W. succinogenes* HAP-1).⁷ Pokazuju metaboličku aktivnost u medijima u kojima je pH-vrijednost u rasponu od 5,0 do 9,0 pri čemu je značajnija aktivnost pri pH od

6,0 do 8,0, a najveća brzina redukcije pri pH 7,0.^{8,9} Što se tiče temperature, aktivnost PRB-a povećava se s njenim porastom te je najveća u temperaturnom rasponu od 28° do 37°C.⁸ Veće temperature vode do smanjenja aktivnosti. Salinitet također utječe na aktivnost PRB-a. Umjereno smanjenje metaboličke aktivnosti uzrokuje salinitet manji od 1%. Salinitet veći od 4% potpuno inhibira aktivnost PRB-a. U morskim sredinama mogu se naći mikroorganizmi koji, prilagođeni na veće koncentracije soli, i dalje imaju sposobnost reducirati perklorat. Primjer toga su mikrobni konzorciji koji su u uzorcima u kojima je salinitet 7,5% zadržali perklorat reducirajuću aktivnost.¹ Kao donor elektrona PRB obično koriste organske spojeve poput acetata, alkohola ili karboksilnih kiselina, a neke imaju mogućnost upotrebe vodika. Koji će elektron donor biti korišten ovisi o soju PRB-a i svojstvima okoliša u kojima se nalazi.

2.2.3. Mehanizam redukcije perklorata

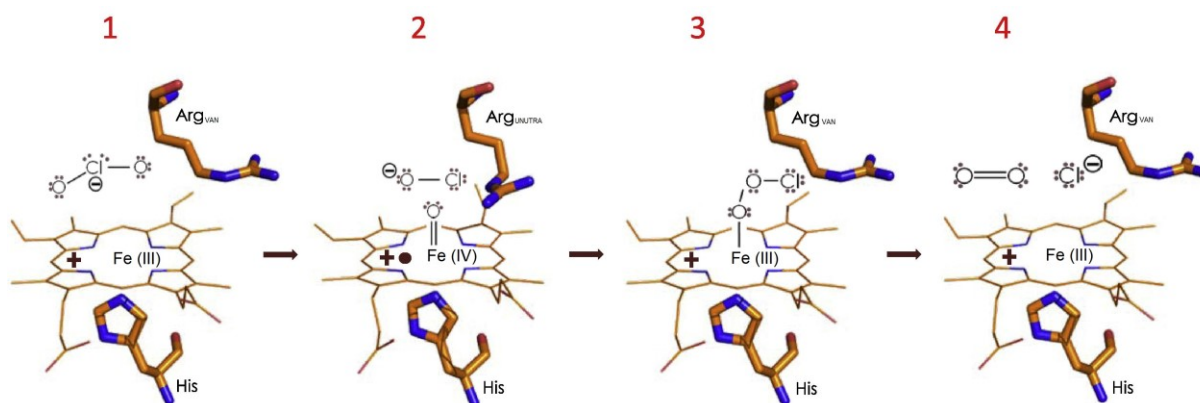
Redukcija perklorata u PRB-a odvija se uz djelovanje dva enzima smještena u periplazmatskom prostoru PRB-a. Periplazmatski prostor karakterističan je za Gram-negativne bakterije i predstavlja prostor između vanjske i unutarnje stanične membrane. Prvi enzim je **perklorat reduktaza**. To je molekula obično heterodimerne ili heterotrimerne konfiguracije α, β i/ili γ podjedinica, ovisno o pojedinoj vrsti bakterija. U svojoj strukturi sadrži kofaktore željezo, selenij te molibden. Najvažniji od njih je molibden bez kojega perklorat reduktaza ne bi mogla biti aktivna.^{6,10} Perklorat reduktaza katalizira redukciju perkloratnog aniona ClO_4^- do kloritnog aniona ClO_2^- u dva koraka (slika 2.). Prvim korakom ClO_4^- se reducira do kloratnog aniona ClO_3^- nakon čega slijedi drugi korak kojim se prevodi do kloritnog aniona ClO_2^- . Svaki korak se odvija uz utrošak dva elektrona i oslobađanje jedne molekule vode. Kloritni anion je toksičan i može biti oksidiran u kloridni anion Cl^- uz oslobađanje kisika O_2 , koji se zatim reducira u vodu H_2O uz potrošnju 4 elektrona i 4 protona.



Slika 2. Reakcijski put redukcije perkloratnog aniona u perklorat reducirajućim bakterijama preko dva enzima, perklorat reduktaze i klorit dismutaze, do nastanka kloridnog iona i kisika.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema ref. 1

Redukcija se zatim nastavlja pomoću drugog enzima **klorit dismutaze**. To je također periplazmatski enzim, homotetramerne konfiguracije, molekulske mase 120 Da. Aktivno mjesto klorit dismutaze predstavlja šupljina s prostetičkom skupinom hema b. Van prstena sa skupinom hema b nalazi se molekula arginina čiji pozitivno nabijeni bočni ogranak igra bitnu ulogu u katalitičkom procesu.^{6,10} Klorit dismutaza katalizira pretvorbu kloritnog aniona ClO_2^- do kloridnog aniona Cl^- i molekule kisika O_2 (slika 3.). Mogućnost stvaranja dvostruke kovalentne veze u molekuli kisika ističe klorit dismutazu kao jedan od rijetkih sustava sa sposobnošću provedbe takve reakcije.



Slika 3. Pretpostavljeni mehanizam prevođenja kloritnog aniona ClO_2^- do kloridnog aniona Cl^- i kisika O_2 djelovanjem enzima klorit dismutaze. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema ref. 10

2.3. Kinetika redukcije perklorata kod perklorat reducirajućih bakterija

Rast perklorat reducirajućih bakterija, kako je ranije spomenuto, ovisi o okruženju u kojem se nalaze. U prirodi, svojstva medija u kojem se PRB nalaze, dostupnost elektron donora i prisustvo različitih elektron akceptora, određuju učinkovitost i opstanak tih mikroorganizama. U realnim uvjetima gdje PRB opstaju glavnu zapreku u njihovoj učinkovitosti predstavljaju drugi elektron akceptori. Najčešće su to nitratni anion NO_3^- , molekularni kisik O_2 ili sulfatni anion SO_4^{2-} , s obzirom da se u prirodi uglavnom nalaze zajedno s perkloratnim anionom. Osim navedenog, međuprodukt redukcije perklorata, kloratni anion, može dovesti do kompetitivne inhibicije kod nekih PRB. Postoje vrste PRB koje mogu koristiti i mangan (IV) kao akceptor elektrona, no to su iznimni slučajevi.⁷ Proces perkloratnog aniona kao i ostalih

elektron akceptora energetski su povoljne reakcije⁷ te je među njima dokazana kompetitivna inhibicija kod određenih PRB-a.

2.3.1. Rast PRB-a i kinetika redukcije perkloratnog aniona

Mikrobna biorazgradnja složen je katalitički proces koji ovisi o fizikalnim, kemijskim i biološkim čimbenicima okoliša u kojemu je smještena promatrana mikrobna populacija. Opis tih procesa nije jednostavan te se pojednostavljuje opisivanjem pojedinih dijelova ukupnog procesa matematičkim modelima. Monodova jednačba jedan je od takvih matematičkih modela koji opisuje rast mikroorganizama povezujući specifičnu brzinu rasta biomase s koncentracijom graničnog supstrata¹¹ :

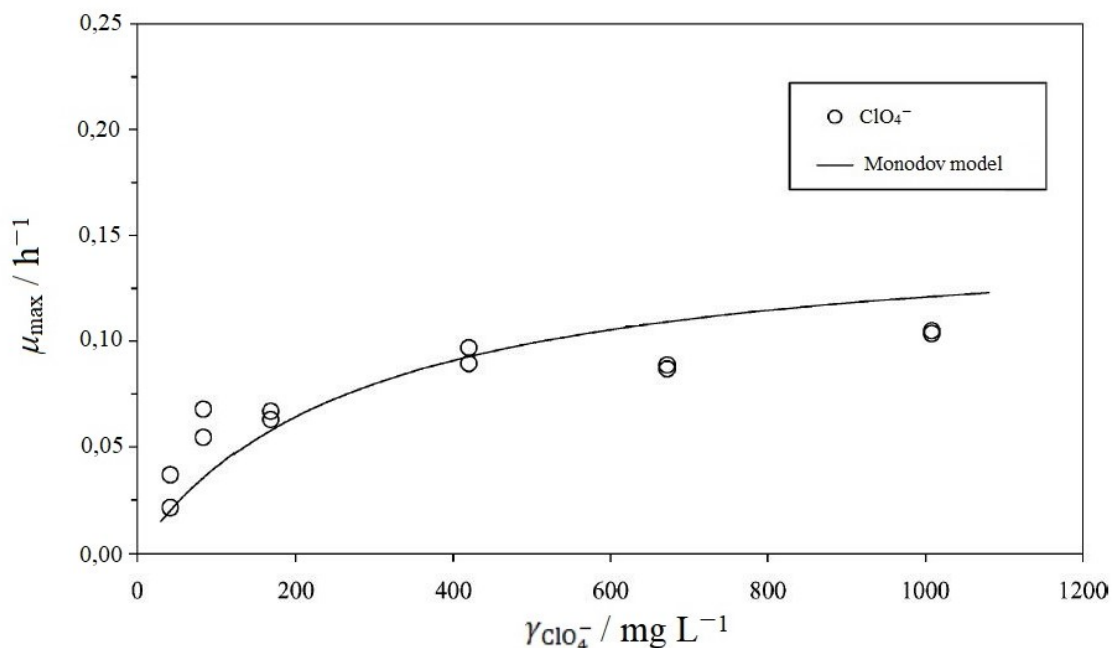
$$\mu = \mu_{\max} \frac{\gamma_S}{\gamma_S + K_S} \quad \#(1)$$

gdje je μ specifična brzina rasta biomase (h^{-1}), $\mu_{\max}$ maksimalna specifična brzina rasta biomase (h^{-1}), γ_S masena koncentracija graničnog supstrata (mg L^{-1}) i K_S konstanta zasićenja graničnim supstratom (mg L^{-1}). Konstanta zasićenja graničnim supstratom definirana je kao koncentracija graničnog supstrata pri polovini maksimalne specifične brzine rasta biomase.

Istraživanja heterotrofnih i miješanih PRB-a pokazala su kako se rast bakterija odvija istovremeno s razgradnjom perklorata. Laboratorijski eksperimenti u kojima su osigurane optimalne količine acetata kao elektron donora i perkloratnog aniona kao elektron akceptora (perkloratni anion je ujedno i granični supstrat) pokazala su da se brzina rasta PRB-a može opisati Monodovom jednačbom⁹ :

$$v_X = \frac{d\gamma_X}{dt} = \mu_{\max} \left[\frac{\gamma_{\text{ClO}_4^-}}{\gamma_{\text{ClO}_4^-} + K_S} \right] \gamma_X - b\gamma_X \quad \#(2)$$

gdje γ_X predstavlja masenu koncentraciju PRB-a (mg L^{-1}), t vrijeme (h), a $\gamma_{\text{ClO}_4^-}$ masenu koncentraciju perkloratnog aniona (mg L^{-1}). Umnožak $b \cdot \gamma_X$ predstavlja brzinu odumiranja bakterija, gdje je b konstanta odumiranja bakterija (h^{-1}). Na slici 4. može se vidjeti kako eksperimentalni podaci za rast bakterijske vrste *A. suillum JPLRND* slijede krivulju određenu Monodovom jednačbom.



Slika 4. Prikaz eksperimentalno dobivenih vrijednosti maksimalne specifične brzine rasta bakterijske vrste *A. suillum JPLRND* u ovisnosti o početnoj koncentraciji perklorata i krivulje određene Monodovom jednačbom. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 12

Rast PRB-a povezan je s potrošnjom tj. redukcijom perkloratnog aniona, brzinu redukcije perklorata opisuje slijedeća jednačba⁹ :

$$v_{\text{Clo}_4^-} = \frac{d\gamma_{\text{Clo}_4^-}}{dt} = -q_{\text{max}} \left[\frac{\gamma_{\text{Clo}_4^-}}{\gamma_{\text{Clo}_4^-} + K_S} \right] \gamma_X \quad \#(3)$$

negativni predznak ukazuje na smanjenje koncentracije perkloratnog aniona (slika 5. a), a oblik krivulje ovisnosti $v_{\text{Clo}_4^-}$ o $\gamma_{\text{Clo}_4^-}$ govori o povezanosti s Monodovom jednačbom (slika 5. b). Veličina q_{max} maksimalna je specifična brzina potrošnje supstrata (h^{-1}) te je povezana s maksimalnom specifičnom brzinom rasta biomase (μ_{max}) preko izraza⁹ :

$$\mu_{\text{max}} = q_{\text{max}} Y_{\text{max}} + b$$

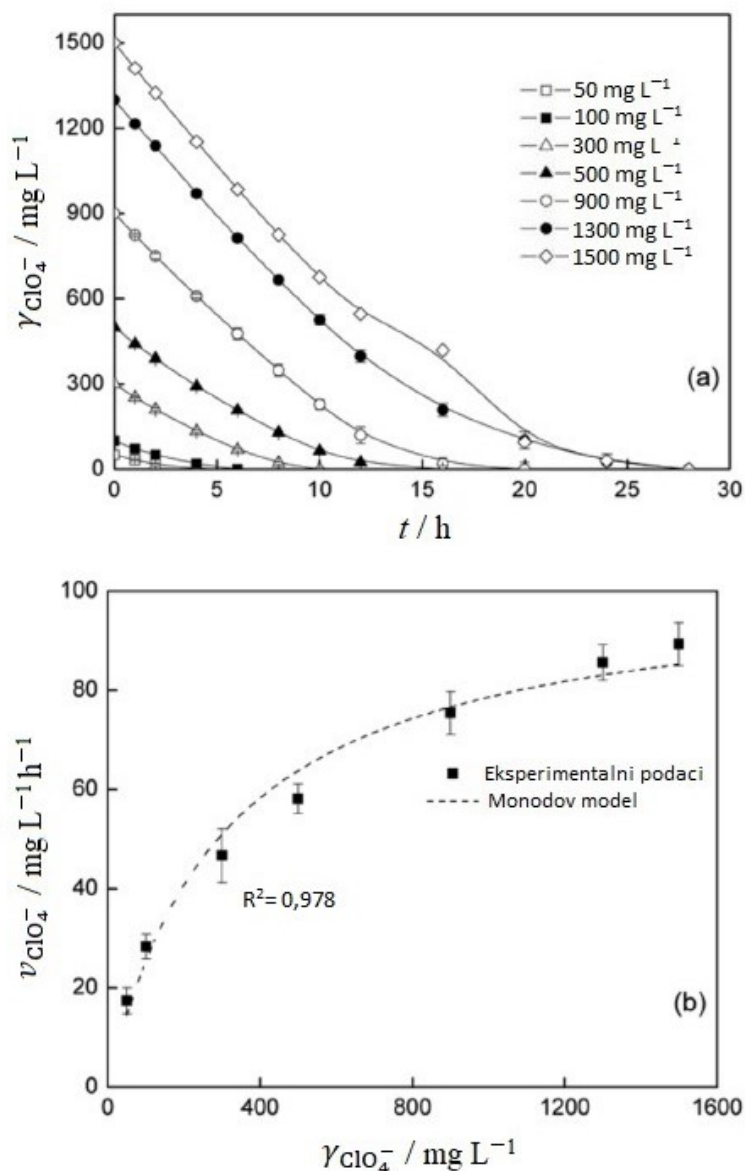
Maksimalna količina bakterija dobivena rastom uz perklorat kao supstrat (Y_{max}) biti će konstantna vrijednost dobivena uz pretpostavku znatno veće koncentracije supstrata (perkloratnog aniona) od vrijednosti konstante zasićenja K_S ⁹ :

$$Y_{\text{max}} = \left(\frac{\mu_{\text{max}}}{q_{\text{max}}} \right) \left(1 - \frac{b}{\mu_{\text{max}}} \right) \quad \#(4)$$

Općenito, vrijednost Y ovisi o koncentraciji biomase i o koncentraciji supstrata. Iz tog odnosa, uzimajući vrijednost Y kao konstantnu ($Y_{\max}$), može se dobiti matematički izraz koji opisuje ovisnost koncentracije biomase o koncentraciji dostupnog perklorata⁹:

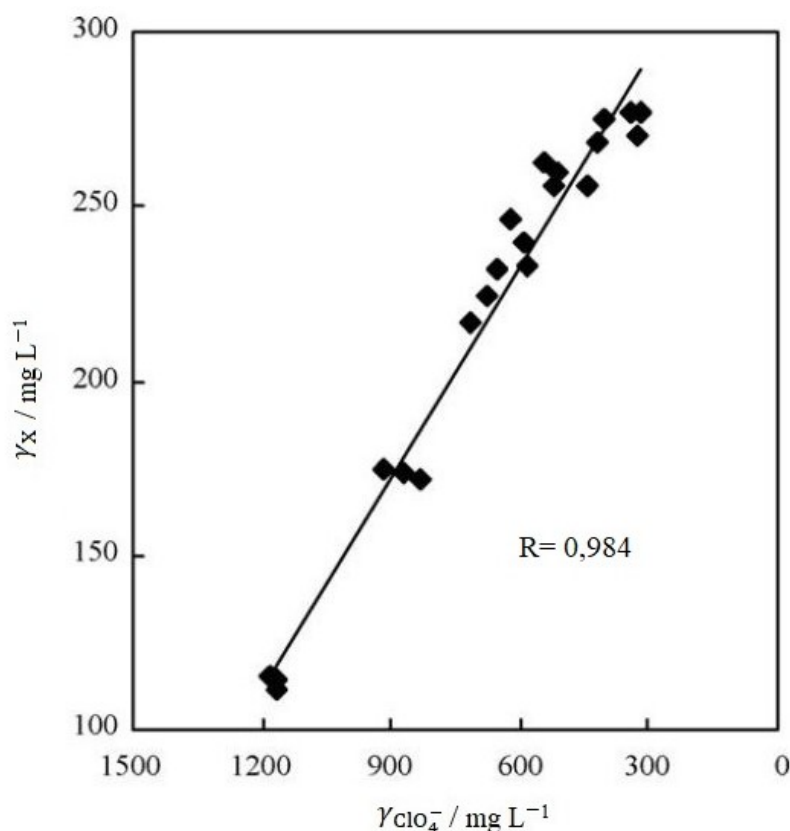
$$\gamma_X = \gamma_{X,0} + \gamma_{\text{ClO}_4^-,0} Y_{\max} - Y_{\max} \gamma_{\text{ClO}_4^-} \quad \#(5)$$

gdje je $\gamma_{X,0}$ početna vrijednost masene koncentracije PRB-a, a $\gamma_{\text{ClO}_4^-,0}$ početna vrijednost masene koncentracije perkloratnog aniona.



Slika 5. Ovisnost masene koncentracije perklorata o vremenu redukcije za različite početne koncentracije perklorata (a), eksperimentalne vrijednosti brzine potrošnje perklorata u ovisnosti o početnoj koncentraciji perklorata i usporedba s Monodovim modelom (b) Preuzeto i prilagođeno prema ref. 8

Slika 6. prikazuje kako eksperimentalno dobivene vrijednosti koncentracije biomase u ovisnosti o početnoj koncentraciji perkloratnog aniona slijede pravac opisan jednačicom (5).



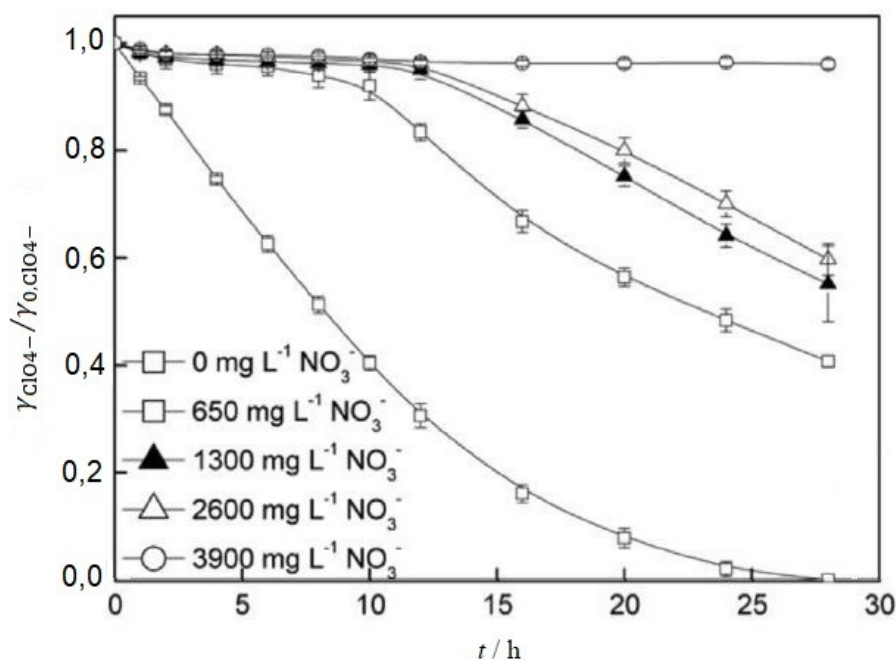
Slika 6. Ovisnost masene koncentracije biomase o početnoj masenoj koncentraciji perklorata.

Preuzeto i prilagođeno iz ref. 9

2.3.2. Utjecaj nitratnog aniona na redukciju ClO_4^-

Prva istraživanja redukcije perklorata povezana su s redukcijom nitrata. Postojale su pretpostavke o zajedničkom enzimu, nitrat reduktazi, koji sudjeluje i u redukciji nitratnog aniona i u redukciji perkloratnog aniona. U prilog tome išlo je opažanje da je u smjesi ta dva elektron akceptora nitratni anion uzrokovao smanjenje brzine redukcije perklorata. Danas je znanje o utjecaju nitratnog aniona na PRB prošireno. Kako će nitratni anion utjecati na redukciju perkloratnog aniona ovisi o pojedinoj bakterijskoj vrsti. Većina PRB-a ima sposobnost djelomične ili potpune denitrifikacije nitratnog aniona. Kod bakterija iz bakterijskog soja *Dechloromonas agitata* djelomično se reducira nitratni anion do nitritnog aniona NO_2^- i to djelovanjem perklorat reduktaze.⁶ Neke bakterije poput onih iz soja *perclace* imaju razvijene odvojene metaboličke puteve za reakcije redukcije perkloratnog aniona i denitrifikaciju.⁶ Inhibicija nitratnim ionom nije pravilo, postoje bakterije koje mogu

istovremeno reducirati i jedan i drugi elektron akceptor. Inhibicija se očituje usporavanjem aktivnosti perklorat reduktaze dok koncentracije nitratnog aniona ne postanu dovoljno niske da bi se mogla aktivirati. Istraživanjima na skupu miješanih perklorat reducirajućih bakterija je to i zamijećeno.⁸ U oba slučaja nitratni anion reduciran je prije perkloratnog iz čega bi se moglo zaključiti da je on preferirani elektron akceptor. Vrijeme zaustavljanja perklorat reduktaze ovisi o količini dodanog nitratnog iona i odvija se unutar 28 sati od dodatka nitrata,⁸ kao što je prikazano na slici 7. Na slici 7. može se uočiti kako koncentracija nitratnog aniona upola manja od one prisutnog perkloratnog aniona ($\gamma_{\text{ClO}_4^-} = 1300 \text{ mg L}^{-1}$) može usporiti njegovu razgradnju i do 50%.⁸ Uzrok smanjenoj aktivnosti perklorat reduktaze, osobito uz velike koncentracije nitratnog aniona, može biti posljedica i potrošnje prisutnog elektron donora.

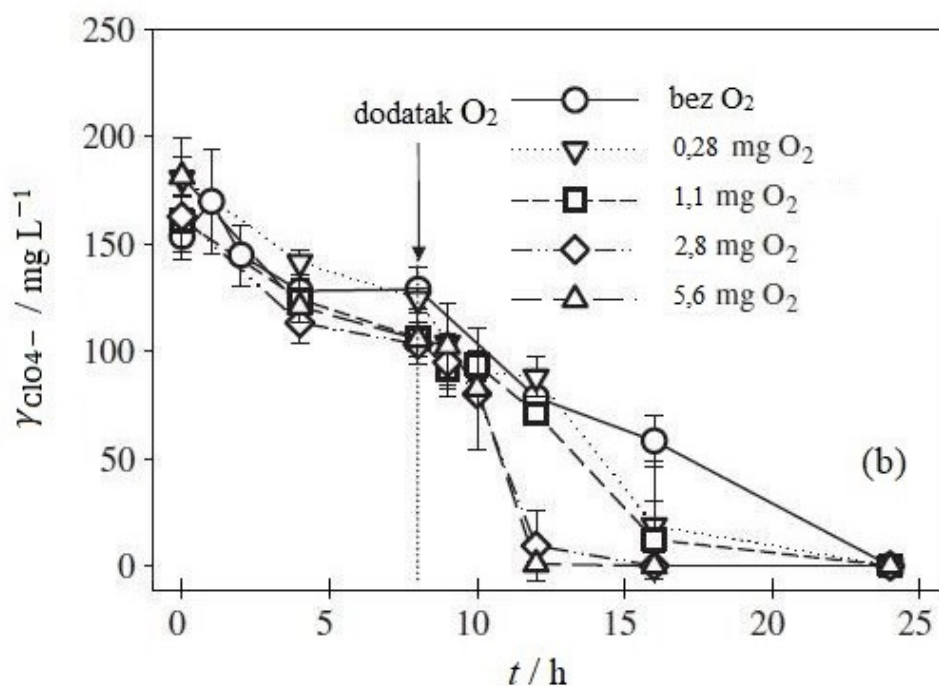


Slika 7. Promjena prosječne masene koncentracije perkloratnog aniona u vremenu s obzirom na dodanu količinu nitratnog aniona. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 8

2.3.3. Utjecaj kisika na redukciju ClO_4^-

Perklorat reducirajuće bakterije u pravilu su anaerobni organizmi. Kisik ima inhibicijsko djelovanje na aktivnost perklorat reduktaze te ometa djelovanje klorit dismutaze.¹⁴ S energetskog stajališta kisik je najpoželjniji elektron akceptor za bakterije s obzirom na to da je energetski povoljniji i od nitratnog i od perkloratnog aniona. Koristeći kisik kao elektron akceptor PRB mogu postići povećanje biomase u rasponu 0,27 – 0,46 mg suhe biomase po

mg konzumiranog elektron donora, rastom na perkloratnom anionu 0,24 – 0,50 mg po mg konzumiranog elektron donora.¹² Inhibicijsko djelovanje na PRB ne očituje se trenutno. Dovoljno velike koncentracije kisika će postupno, kroz period od nekoliko sati inhibirati redukciju perklorata (slika 8.). Točan razlog tomu još nije poznat, no ponuđeno je objašnjenje prema kojima je postupna inhibicija očekivana. Budući da je jedan od produkata redukcije perkloratnog aniona molekularni kisik, određena otpornost na njega je očekivana. Također, veće količine kisika uzrokovat će pojačani rast bakterija čime će se pojačano iskorištavati dostupni elektron akceptori pa tako i prisutan perklorat.

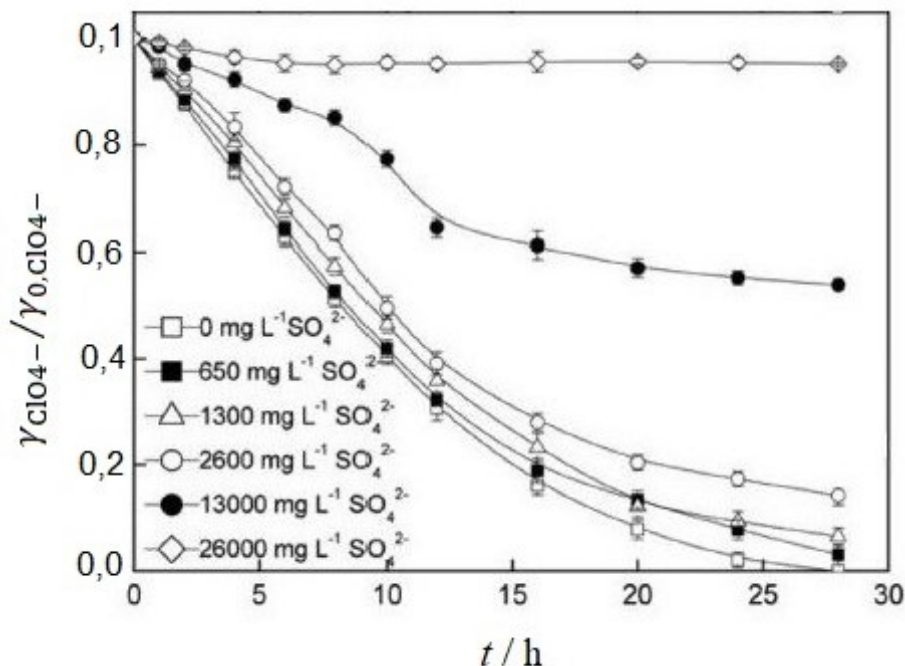


Slika 8.: Promjena koncentracije perklorata tijekom redukcije u smjesi PRB-a prije dodatka kisika (prvih osam sati) i nakon dodatka kisika (nakon osmog sata). Preuzeto i prilagođeno prema ref. 14

2.3.4. Utjecaj sulfatnog aniona na redukciju ClO_4^-

Za razliku od nitratnog aniona i kisika, redukcija sulfatnog aniona manje je energetski povoljna od redukcije perkloratnog aniona, stoga sulfatni anion nije poželjniji izbor elektron donora za PRB. Slično kao i za kisik, inhibiciju perkloratnog aniona uzrokovat će tek koncentracije sulfatnog aniona nekoliko puta veće od koncentracije prisutnog perklorata. Na slici 9. može se vidjeti kako je redukcija perkloratnog aniona značajnije inhibirana tek dodatkom 1,3 g L^{-1} sulfatnog aniona, a potpuna inhibicija je postignuta dodatkom sulfatnog

aniona dvostruko veće koncentracije. Točan mehanizam redukcije nije u potpunosti poznat, no zna se da nije nalik inhibiciji nitratnim anionom jer nema ponovnog pokretanja perklorat reduktaze nakon što je jednom inhibirana. Jedno od objašnjenja je smanjenje metaboličke aktivnosti PRB-a u sredinama s visokim koncentracijama sulfatnog aniona s obzirom da su visoke koncentracije sulfatnog aniona povezane s povećanim salinitetom tih sredina.



Slika 9. Prosječna koncentracija perkloratnog aniona tijekom redukcije PR bakterijama uz različite koncentracije sulfatnog aniona. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 8

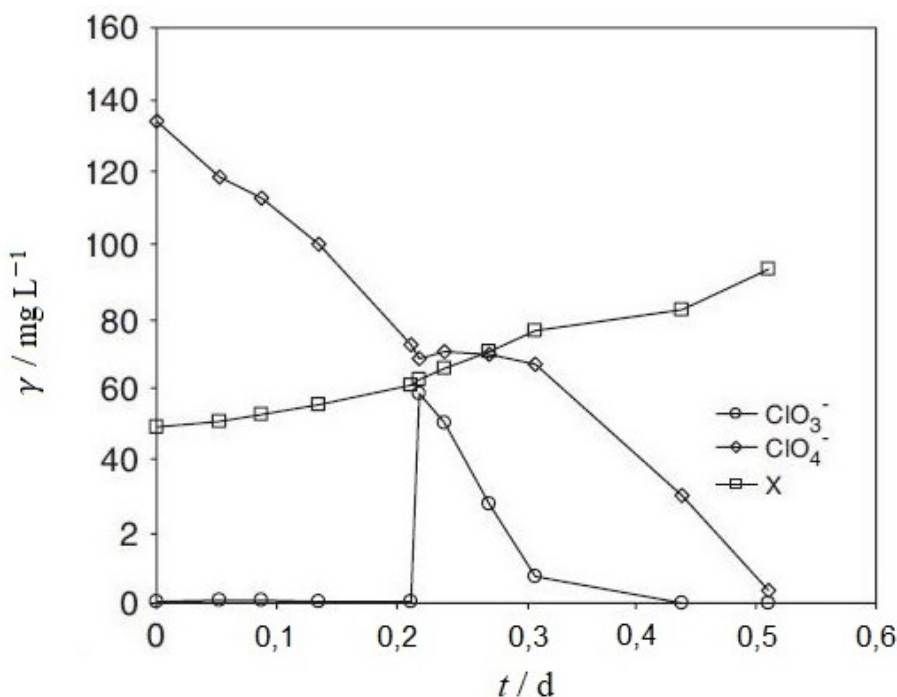
2.3.5. Utjecaj kloratnog aniona na redukciju ClO_4^-

Postoje vrste PRB-a kod kojih je zabilježena akumulacija kloratnog aniona. Do akumulacije dolazi tijekom prvog koraka u redukciji perkloratnog aniona kojeg katalizira enzim perklorat reduktaza. S obzirom da je utvrđeno kako sve PRB mogu reducirati i kloratni anion, njegova akumulacija može dovesti do kompetitivne inhibicije za aktivno mjesto perklorat reduktaze.^{7,15} Većina PRB-a akumulira klorat u nekoj mjeri. Značajnija akumulacija zabilježena je za miješane bakterijske kulture uzgojene na nitratnom i perkloratnom anionu¹⁵ te za bakterijske kulture *Dechloromonas* sp. *PCI*¹⁵ i *Dechlorosoma* sp. *HCAP-C*¹³. Jedno od mogućih objašnjenja ove pojave je genetska modifikacija na genu perklorat reduktaze odgovornom za kodiranje aktivnog mjesta za redukciju perklorata i klorata.¹³

Maksimalna količina kloratnog aniona akumulirana u PRB-a iznosi oko 20 – 24% početne količine perkloratnog aniona. Uzimajući u obzir kompetitivnu inhibiciju, brzina potrošnje perklorata dana je jednačom¹³:

$$\frac{d\gamma_{\text{ClO}_4^-}}{dt} = -q_{\text{max,ClO}_4^-} \frac{\gamma_{\text{ClO}_4^-}}{\gamma_{\text{ClO}_4^-} + K_{\text{ClO}_4^-} (1 + (\gamma_{\text{ClO}_3^-} / K_{\text{ClO}_3^-}))} \gamma_X \quad (4)$$

gdje je $\gamma_{\text{ClO}_4^-}$ masena koncentracija perklorata (mg L^{-1}), $\gamma_{\text{ClO}_3^-}$ koncentracija kloratnog aniona (mg L^{-1}), t je vrijeme (dan), γ_X je koncentracija biomase (mg L^{-1}), $q_{\text{max,ClO}_4^-}$ maksimalna brzina potrošnje perklorata (dan^{-1}), $K_{\text{ClO}_4^-}$ je konstanta zasićenja perkloratom (mg L^{-1}), $K_{\text{ClO}_3^-}$ je konstanta zasićenja kloratom (mg L^{-1}). Na slici 10. prikazano je kako dodatak kloratnog aniona usporava redukciju perkloratnog aniona i kako ta inhibicija traje sve dok koncentracija perklorata ne dosegne malu vrijednost (oko 1 mg L^{-1}).¹⁵



Slika 10. Redukcija perklorata prije dodatka kloratnog aniona i inhibirana redukcija perklorata nakon dodatka kloratnog aniona uz prikaz ovisnosti koncentracije biomase (X) o vremenu.

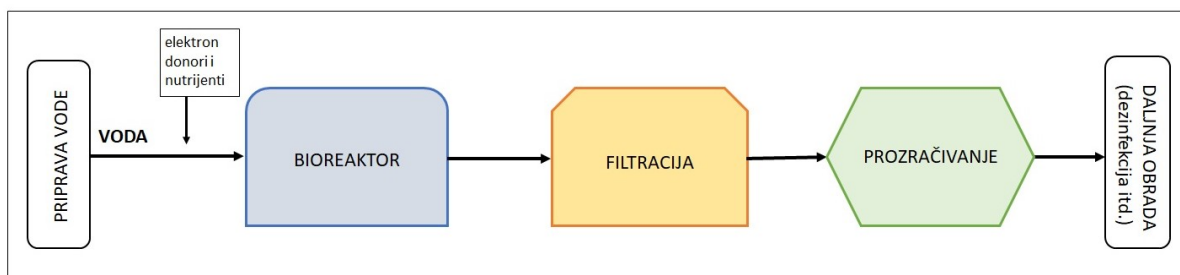
Preuzeto i prilagođeno prema ref. 15

2.4. Primjena perklorat reducirajućih bakterija za pročišćavanje vode

Perklorat je, kako je već spomenuto u radu, rasprostranjen u ljudskom okruženju od podzemnih do otpadnih voda, od poljoprivrednih površina do prehrambenih proizvoda. Njegova prisutnost problem je za ljudsko zdravlje, ali i za zdravlje drugih živih organizama. Stjecanje novih saznanja o svojstvima perklorata omogućilo je razvoj metoda kojima bi se

mogla regulirati njegova koncentracija u okolišu. Glavni je medij prijenosa perkloratnog aniona u okoliš voda, stoga se koncentracija perklorata u okolišu pokušava regulirati metodama za pročišćavanje vode. Metode se mogu podijeliti na fizikalno-kemijske (specifična i nespecifična ionska izmjena, membranska filtracija, adsorpcija aktivnim ugljenom i katalitička redukcija) i na biološke metode (fitoremedijacija i biološka redukcija).¹ Većina se navedenih metoda temelji na sakupljanju ciljanog spoja iz medija koji se obrađuje. Kod tih metoda nužan je dodatan korak u procesu pročišćavanja vode kojim će se skupljeni koncentrirani otpad pravilno obraditi i/ili odložiti. S druge su strane metode koje se temelje na kemijskoj redukciji kojom se ciljani spoj prevodi do oblika koji nije štetan za okoliš. Katalitička redukcija i biološka redukcija pripadaju drugoj skupini.

Biološka redukcija uključuje *ex situ* bioremedijaciju, *in situ* bioremedijaciju i prirodnu bioredukciju perkloratnog aniona. *Ex situ* i *in situ* bioremedijacija provode se upotrebom reaktora s nepomičnim slojem biofilma, upotrebom reaktora s pomičnim slojem biofilma i reaktora s membranskim biofilmom.⁵ Pročišćavanje voda od perklorata podrazumijeva upotrebu biofilma od PRB-a. Kako bi PRB mogle reducirati perkloratni anion potreban je dodatak dovoljne količine elektron donora i nutrijenata za rast. Unutrašnjost reaktora potrebno je održavati u anaerobnoj atmosferi kako bi PRB mogle provoditi kemijsku redukciju perklorata. Nakon redukcije, slijedi filtracija vode kroz filter od aktivnog ugljena ili pijeska kako bi se uklonio prisutan organski materijal. Konačni je korak prozračivanje pročišćene vode radi ponovnog uvođenja kisika.¹⁶ Slika 11. shematski prikazuje opisani proces.



Slika 11. Shematski prikaz procesa uklanjanja perklorata iz vode koji uključuje prolazak vode kroz bioreaktor u anaerobnoj atmosferi, filtraciju te prozračivanje.

Glavni problem u izvođenju metoda biološke redukcije je prisustvo drugih elektron akceptora u procesuiranoj vodi. Problem obično predstavlja prisustvo nitratnog aniona ili otopljenog kisika. Što je više elektron akceptora s kojima se susreću PRB, time se znatno povećava potreba za elektron donorima. Negativan utjecaj na okoliš, točnije emisija ugljikova

dioksida i povećani rizik od nastanka karcinoma zbog uporabe teških metala povezani su s proizvodnjom elektron donora korištenih u bioreaktorima.¹⁶ Od trenutno korištenih elektron donora najmanji učinak na zdravlje i okoliš ima vodik. Biološka redukcija upotrebom autotrofnih bakterija uz vodik kao elektron donor pokazala se ekološki najodrživijom metodom. Drugi bitan problem povezan s povećanom potrošnjom elektron akceptora i elektron donora je povećani rast biomase u bioreaktorima.⁵ Povećani rast biomase stvara problem jer vodi do začepeljivanja filtera čime se smanjuje učinkovitost pri uklanjanju perkloratnog aniona. Time je povećana potreba za čišćenjem filtera, što ujedno povećava ukupni trošak za održavanje normalne funkcije bioreaktora.

Metode biološke redukcije pokazale su se učinkovitima u tretiranju onečišćenja perkloratnim anionom u vodenim površinama na većoj razini poput industrijski otpadnih voda. Za primjenu na vodenim površinama dubine manje od 15 m pokazala se pogodnom primjena *in situ* bioremedijacije.⁵ Općenito se metode biološke redukcije smatraju najpogodnijima s ekološkog stajališta. Unatoč tome, postoji strah javnosti od primjene mikroorganizama za pročišćavanje vode zbog potencijalnog uvođenja patogena. Niti jedna od postojećih metoda za pročišćavanje vodenih površina ne može postići potpuno uklanjanje perkloratnog aniona. Nova rješenja za poboljšanjem postojećih metoda se kontinuirano ispituju. Kombiniranje različitih metoda, poput metoda ionske izmjene s metodama biološke redukcije, pokazalo se učinkovitijim. Problem metoda ionske izmjene je potreba za odlaganjem i/ili obradom punila korištenih u ionskim izmjenjivačima, što povećava ukupan trošak. Kombiniranjem s metodama biološke redukcije, taj se korak može ubrzati, a time se ujedno smanjuje ukupni trošak provedbe i to do 20%.^{5,16}

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. Vega, R. Nerenberg, I. T. Vargasa, *Environ. Res.*, **164** (2018) 316–326.
2. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), 2014. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of perchlorate in food, in particular fruits and vegetables. (datum pristupa 02. lipnja 2020.)
<http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3869>.
3. W. A. Jackson, J.K. Böhlke, B. J. Andraski, L. Fahlquist, L. Bexfield, F. D. Eckardt, J. B. Gates, A. F. Davila, C. P. McKay, B. Rao, R. Sevanthi, S. Rajagopalan, N. Estrada, N. Sturchio, P. B. Hatzinger, T. A. Anderson, G. Orris, J. Betancourt, D. Stonestrom, C. Latorre, Y. Li, G. J. Harvey, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **164** (2015) 502–522.
4. B. Rao, T. A. Anderson, A. Redder, W. A. Jackson, *Environ. Sci. Technol.*, **44** (2010) 2961–2967.
5. L. Ye, H. You, J. Yao, H. Su, *Desalination*, **289** (2012) 1–12.
6. J. D. Coates, L. A. Achenbach, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2** (2004) 569–580.
7. J. Xu, Y. Song, B. Min, L. Steinberg, B. E. Logan, *Environ. Eng. Sci.*, **20** (2003) 405–422.
8. Y. Zhu, N. Gao, W. Chu, S. Wang, J. Xu, *Chemosphere*, **148** (2016) 188–194.
9. C. Wang, L. Lippincott, X. Menga, *J. Hazard. Mater.*, **153** (2008) 663–669.
10. I. Schaffner, S. Hofbauer, M. Krutzler, K. F. Pirker, P. G. Furtmüller, C. Obinger, *Arch. Biochem. Biophys.*, **574** (2015) 18–26.
11. M. Vuković, I. Ćosić, K. Kolačko, F. Briški, *Kem. Ind.*, **61** (2012) 417–425.
12. Y. H. Farhan, P. B. Hatzinger, *Biorem. J.*, **13** (2009) 65–78.
13. M. Dudley, A. Salamone, R. Nerenberg, *Water Res.*, **42** (2008) 2403–2410.
14. J. D. Shrout, G. F. Parkin, *Water Res.*, **40** (2006) 1191–1199.
15. R. Nerenberg, Y. Kawagoshi, B. E. Rittmann, *Water Res.*, **40** (2006) 3290–3296.
16. J. K. Choe, M. H. Mehnert, J. S. Guest, T. J. Strathmann, C. J. Werth, *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 4644–4652.