

Katsuya OHNO<sup>1,2\*</sup>, Hiroyuki TANAKA<sup>3</sup>,  
Kohei NAKAMURA<sup>4</sup>, Kazuhiro TAKAMIZAWA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>United Graduate School of Agricultural Sciences,  
Gifu University, Japan,

<sup>2</sup>BIDEN Co., Ltd., Ogaki, Gifu, Japan,

<sup>3</sup>BIDEN GREENTEC Co., Ltd., Ogaki, Gifu, Japan,

<sup>4</sup>Faculty of Applied Biological Science Graduate School of Agriculture,  
Gifu University, Japan

## TETRACHLOROETHYLENE DECREASE BY MICROORGANISMS IN ACTIVATED SLUDGE

### ROZKŁAD TETRACHLOROETYLENU W OSADZIE CZYNNYM ZA POMOCĄ MIKROORGANIZMÓW

Tetrachloroetylen (PCE) jest lotnym związkiem organicznym używanym w wielu gałęziach przemysłu, takich jak: pranie chemiczne lub przemysł elektroniczny. Na całym świecie w pobliżu fabryk wykrywa się na powierzchni wody i gleby PCE, który wyciekł z tych przedsiębiorstw. Skazone obszary muszą podlegać remediacji ponieważ PCE jest szkodliwy dla zdrowia, co zostało określone odpowiednimi przepisami. Standard jakości wody w EU i Japonii wynosi 0,01 mg/L (ustalony przez WHO wynosi 0,04 mg/L). Zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych wykryto mikroorganizmy, które mogą degradować PCE. Zebraliśmy osad czynny pozostały po procesie oczyszczania wody z przedsiębiorstwa produkującego podzespoły elektroniczne, w którym codziennie usuwane są alifatyczne związki chlorowane, a w przeciągu tygodnia ich zsumowana zawartość sięgała 1000-2000 mg/L PCE. Każdego tygodnia dodawaliśmy 5mg/L dwuzasadowego fosforanu amonu  $[(NH_4)_2HPO_4]$  jako źródło azotu i fosforu, jak również wyciąg z drożdży jako wspomagacz wzrostu bakterii (jako minerały i witaminy). Przenieśliśmy zebrany osad czynny do zamkniętych butelek wytrząsanych w temperaturze 20°C w przeciągu 24 godzin w celu potwierdzenia zmniejszenia stężenia PCE. Łączono próbki PCE w celu uzyskania wyjściowego stężenia 200 mg/L. Stężenie PCE wyłącznie w fazie wodnej było mierzone przy pomocy techniki headspace GC/MS. W tych warunkach stężenie PCE w zebrynym, osadzie czynnym zmniejszyło się o 16 mg/L w porównaniu do próby kontrolnej (osad czynny w autoklawie). Filtrowaliśmy zebrany osad czynny używając filtrów GS-25 (rozmiar pora 1  $\mu$ m) w celu potwierdzenia adsorpcji PCE na osadzie czynnym. Odciek pofiltracyjny wykazywał znacznie zmniejszone stężenie (o 42 mg/L) PCE w porównaniu do próby zerowej (woda Millipore), podczas gdy ponowne zawieszenie osadu nie dawało żadnych wyników. Te wyniki wskazują, że biologicznie aktywne związki w osadzie czynnym są związane z obniżeniem stężenia PCE. Ponadto, po usunięciu bakterii z powierzchni filtra przy pomocy filtra membranowego (rozmiar pora 0,2  $\mu$ m), zmierzono obniżenie stężenia PCE o 74 mg/L w porównaniu do próby zerowej (woda Millipore). Tym samym demonstrujemy, że związki zewnątrzkomórkowe mogą mieć wpływ na obniżenie zawartości PCE. Zmierzone stężenie białek przy pomocy systemu Qubit (Invitrogen) ponieważ rozważano możliwość, że jeden ze związków zewnątrzkomórkowych może być białkiem takim jak enzym. Stężenie białek w odcieku z filtra membranowego 0,2  $\mu$ m (przed-ultrafiltracyjnego) wynosiło 150-250 mg/L. Frakcjonowaliśmy odciek z filtra 0,2  $\mu$ m poprzez ultrafiltrację (10K, 5K, 3K) w celu zbadania masy cząsteczkowej związków zawniętr-

komórkowych. Stężenie białek w każdej z frakcji było mierzone systemem Qubit, a ocena aktywności w zmniejszaniu stężenia PCE było dokonywana poprzez analizę zmniejszenie stężenia PCE w funkcji stężenia białek. Aktywność zmniejszania stężenia PCE we frakcji mniejszej niż 10K była większa niż we frakcjach większych niż 10K. Co ciekawe frakcja 3K wykazywała również większą aktywność. Rozważamy możliwość, że zmniejszanie zawartości PCE może być skutkiem działania wielkocząsteczkowych związków zewnątrzkomórkowych, takich jak enzymy. Jednakże te badania wykazały, że mniejsze związki zewnątrzkomórkowe takie jak peptydy mogą być związane ze zmniejszaniem zawartości PCE.

## 1. Introduction

Chlorinated ethylene like PCE has been used for various industrial productions such as dry-cleaning and cleaning of E-Infrastructure so far. Recently, many contaminated sites are being found in Japan every year. Strict environmental regulation standards had been established in the world with water and soil quality standard set at 0.01 mg/l in Japan and 0.04 mg/l in United Nations' World Health Organization (WHO). One of the treatments of pollutant is bioremediation, and it is low environmental burden. Biostimulation is a general method of remediation in Japan. Bioaugmentation has been hardly applied. However bioaugmentation is very popular remediation in Germany and the US. To-date, almost all PCE biodegradation were reported for anaerobic condition with PCE degradation by way of reductive reaction whereby, PCE is dechlorinated to trichloroethylene, *cis*-1,2-dichloroethylene, *trans*-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, vinyl chloride, and ethylene, with some of the reactions incomplete. In the case of dechlorination, the reaction stops at toxic intermediate products such as *cis*-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethylene or vinyl chloride. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 is widely known to completely mineralize PCE to ethane [1].

The most methods of bioaugmentation for PCE rehabilitation have been used anaerobic reaction, and aerobic reaction has not yet been used. The report of aerobic degradation of PCE is only *Pseudomonas stutzeri* OX1 until now [1, 3, 4]. *Pseudomonas stutzeri* OX1 degrades PCE by toluene *o*-xylene monooxygenase as cometabolism. Microorganisms capable of using PCE as energy and sole carbon source have not been found yet. The purpose of this research is to find a microorganism for aerobic bioremediation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Acclimatizing to PCE

We collected activated sludge from a wastewater treatment plant receiving electronic components and put it into a round-bottom flask attached the Liebig condenser above and aerated by pump to keep the aerobic condition. PCE (Wako, special grade, as a carbon source), ethanol (solubilized agent of PCE), and ammonium phosphate dibasic  $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ , as P and N source were added to the flask. PCE solution was added to become its final concentration between 2,000 mg/l and 10,000 mg/l every one week or two weeks interval. Also, ammonium phosphate dibasic was supplied to the some flask to become final concentration 5 mg/L once a week. After long term of acclimatization to PCE, we tried examination of PCE-decreasing.

## 2.2. Examination of PCE-decreasing

We examined decrease of PCE using sealed glass vials of 100 ml. 20 ml of activated sludge was added into the vials, and followed by supplementation of PCE solution to become 200 mg/l. Autoclaved (121 °C, 30 min) activated sludge was used as a control. After that the vial sealed with Teflon-coated butyl rubber and aluminum cap. Temperature was kept at 20 °C and rotation was performed at 120 rpm by a shaker to keep aerobic condition. After 24 hr, we analyzed PCE concentration in each glass vial by headspace GC-MS (SHIMADU, GCMS-QP2010 plus, Perkin Elmer, Headspace Sampler Turbo Matrix 40).

## 2.3. Filtration

To evaluate the decrease of PCE by the biotic or the abiotic reaction, we used filtered activated sludge mixture for the PCE reduction experiment. Filtration was performed using the glass fiber filter (ADVANTEC, GS-25, the pore size is 1 µm) and filtered activated sludge was also used for the experiment after re-suspending to Milli-Q water and 0.2 µm membrane filter (ADVANTEC, mixed cellulose ester) was also used for the test.

## 2.4. Molecular weight cut-off (MWCO)

The filtrate of 0.2 µm-pore-size membrane was ultrafiltered by using Vivaspin 20 filters with different size of MWCO (GE healthcare); 10k cut-off was initially applied and followed by 5k and 3k cut-offs. Respective fractions at each MWCO step were mixed with PCE to examine PCE-decreasing activity. PCE-decreasing activity was calculated by PCE-decreasing (mg/vial) / protein (mg/vial). Protein concentration of each fraction was measured with Quant-iT protein assay kit and Qubit Fluorometer (Invitrogen), according to the manufacture's instruction.

## 3. Results and Discussion

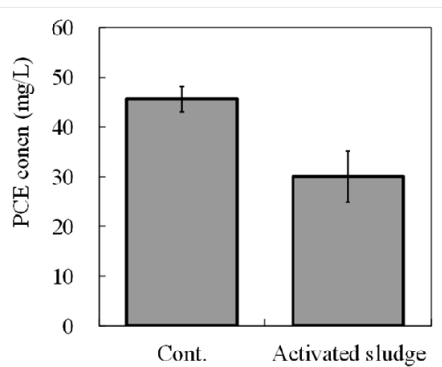


Fig. 1. PCE-decreasing in activated sludge. Cont. was autoclaved activated sludge.

Rys. Zmniejszenia ilości PCE w osadzie czynnym. Próba kontrolna znajdowała się w autoklawie.

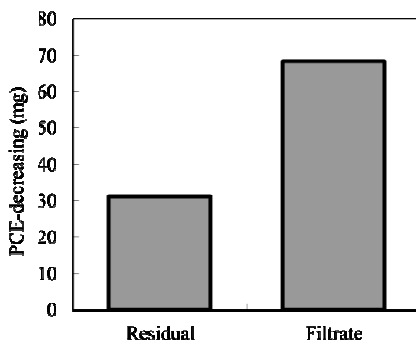


Fig. 2. Difference of PCE degradation rate between using residuals and filtrate after GS-25 filtration. PCE-decreasing was difference between control and residual or filtrate.

Rys. 2 Różnica stopnia degradacji PCE pomiędzy pozostałością a odciekem z filtra GS-25. Zmniejszenie stężenia jest różnicą pomiędzy próbą kontrolną a pozostałością lub filtrem

### 3.1. Acclimatizing by PCE

Figure 1 represents PCE decrease by activated sludge. Control remained 45.67 ( $\pm 2.52$ ) mg/L, while activated sludge remained 30.00 ( $\pm 4.49$ ) mg/L after 24 hr (Fig. 1). This result suggests that the activated sludge having PCE-decreasing activity have increased or obtained PCE-decreasing capacity after long term acclimatization to higher concentration of PCE. However, the possibility of adsorption by activated sludge cannot be denied by this experiment.

### 3.2. Decrease of PCE by filtered activated sludge

Using the glass fiber filter (GS-25), we filtered activated sludge acclimatized by PCE. Fig.2 shows the result of degradation of PCE by the GS-25 filtrate (pore size 1  $\mu\text{m}$ ) and re-suspended residue. After 24 hr, we calculated PCE-decreasing from remained PCE between control and residue or filtrate, respectively. The PCE-decreasing in filtrate was 68.9 mg while the residue was 31.3 mg. These results show the phenomenon of PCE-decreasing was not by adsorption. We filtered by 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter to remove bacteria. PCE in the membrane filtrate was remained 26.33 ( $\pm 0.75$ ) mg/L, while GS-25 filtrate was 30.16 ( $\pm 1.00$ ) mg/L after 24 hr reaction. PCE in control was remained 103.99 ( $\pm 3.38$ ) mg/L (Fig. 3). The PCE-decreasing in GS-25 filtrate was 70.9 mg, and that by membrane filtrate was 74.7 mg. The result by GS-25 filtrate and membrane filtrate were not significantly different. These results suggest degradation of PCE was occurred by liquid removed bacteria. In other words, there is a possibility that some biological compounds involve in the decrease of PCE. PCE degradation products under anaerobic condition [2, 5] such as trichloroethylene, *cis*-1, 2-dichloroethylene, 1, 1-dichloroethylene, vinyl chloride, ethylene were not detected. We do not know PCE metabolites under aerobic condition, but no candidates assumed from chemical structure of PCE were detected by GC-MS (data are not shown).

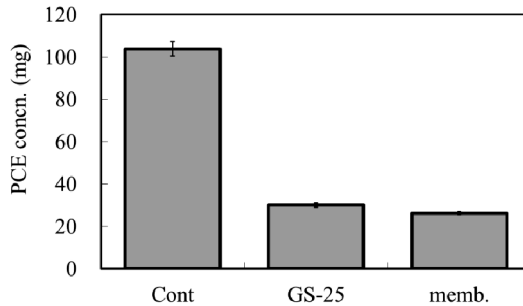


Fig. 3. Remained PCE concentration after 24 hr in each filtrate of GS-25 and 0.2  $\mu$ m membrane. Control was water (Milli-Q).

Rys. 3. Pozostałe stężenie PCE po 24h w każdym z filtratów GS-25 i membranowym 0.2  $\mu$ m. Próbką zerową jest woda Millipore)

### 3.3. PCE-decreasing activity of respective MWCO fraction

Fig. 4 shows the decrease in PCE concentration by each MWCO fraction. There were PCE-decreasing activity in each MWCO fraction and these activities were higher than 0.2  $\mu$ m membrane filtrate. PCE-decreasing activity was 1.4 in <3k fraction. These results indicate that metabolite(s) with the lower MW (<3k) related to decrease PCE. Since we have confirmed that PCE-decreasing activity of less than 3k MWCO fraction was 3.25 times as 0.2  $\mu$ m membrane filtrate. We suggested that metabolites unrelated to PCE decrease were removed by ultrafiltration or inhibitory compounds against PCE-decreasing were removed. These results indicated that peptide-like compound(s), but not proteinous ones, might be involved in decrease of PCE. These discussions were also supported by UV spectrum analysis. The ultrafiltrate (less than 3k MWCO) was found to have absorbance at 200 to 230 nm which one is general absorbance of peptide. While, in the case of 280 nm which is general absorbance of protein, not found (data not shown).

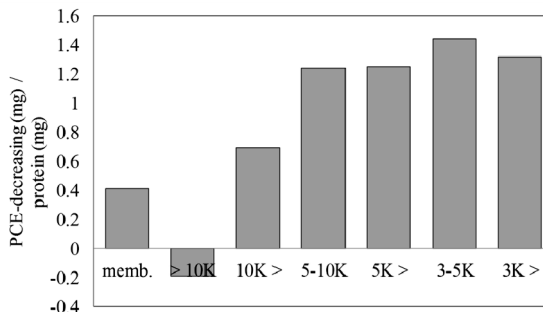


Fig. 4. PCE-decreasing activity in respective fraction of ultrafiltration. PCE-decreasing activity was calculated by PCE-decreasing (mg) / protein (mg) in each fraction. PCE-decreasing was difference between control and each fraction.

Rys. 4. Aktywność zmniejszania stężenia PCE w poszczególnych frakcjach ultrafiltracji. Aktywność zmniejszania stężenia PCE była obliczana jako zmniejszenie zawartości PCE (mg) / białka (mg) w każdej frakcji. Zmniejszenie zawartości PCE jest różnicą pomiędzy próbką kontrolną a każdą frakcją.

## 4. Conclusion

We confirmed PCE-decreasing by activated sludge when it was acclimatized by PCE for long time. Decrease of PCE was occurred under aerobic condition. However, the degradation products were not found under either aerobic or anaerobic conditions. PCE-decreasing was aerobically occurred by GS-25 filtrate. This result indicated that reduction of PCE was not adsorption by activated sludge. Moreover, decrease of PCE aerobically occurred by filtrate removed bacteria. This result means some biological compounds of microorganisms in activated sludge may involve in decrease of PCE. We are studying to identify those biological compounds and elucidate the mechanisms of decrease of PCE.

## Reference

- [1] Baggi G, Barbieri P, Galli E, Tollari S (1987) Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Appl Environ Microbiol* 53:2129–2132
- [2] Magnuson JK, Stern RV, Gosset JM, Zinder SH., Burris DR (1998) Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl and Environ Microbiol* Vol. 64, No. 4:1270–1275
- [3] Ryoo D, Shim H, Canada K, Barbieri P, Wood TK (2000) Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-*o*-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature Biotechnology* 18: 775 – 778
- [4] Shim H, Ryoo D, Barbieri P, Wood TK (2001) Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes, and vinyl chloride by toluene-*o*-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:265–269
- [5] Vogel TM, Mccarty PL (1985) Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl and Environ Microbiol* Vol. 49, No. 5:1080-1083