

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Biodegradční efektivita a růstová optima bakteriálních kmenů
izolovaných z půdy kontaminované ropnými uhlovodíky:**

**Zhodnocení praktické využitelnosti vybraného kmene
pro remediace kontaminovaných půd**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracoval: Bc. Petr Kotas

Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Tříška, CSc.

České Budějovice, duben 2009

Diplomová práce

Kotas, P. 2009. Biodegradační efektivita a růstová optima bakteriálních kmenů izolovaných z půdy kontaminované ropnými uhlovodíky: Zhodnocení praktické využitelnosti vybraného kmene pro bioremediace kontaminovaných půd. [Biodegradation efficiency and optimum growth conditions of bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbons contaminated soil: Evaluation of the selected strain efficiency for contaminated soil bioremediation. Mgr. Thesis, in Czech] – 59p. + 2 encl., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Laboratory scale batch studies were performed in order to determine the optimum growth conditions and diesel oil biodegradation ability of the selected strain isolated from petroleum hydrocarbons contaminated soil. These results were used to evaluate the potential of the selected strain for *in situ* application in PRB remediation technology.

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 30.4.2009

.....

Poděkování:

Výčet lidí, kteří mi během tvorby této diplomové práce pomohli technicky či radou, je velmi široký a doufám, že neopominu nikoho, kdo to zasluhuje. Poděkovat tak musím zejména svému školiteli doc. Ing. Janu Třískovi, CSc za trpělivost a invenci při vedení předložené diplomové práce. Dále pak Ing. Kamile Růžičkové za obětavé rady a pomoc při práci v Laboratoři analytické chemie životního prostředí, Ústavu systémové biologie a ekologie Biologického centra AV ČR, v.v.i. Ve spojení se zasvěcením do pro mě nového oboru mikrobiologie a biodegradací ropných látek děkuji prof. RNDr. Vladimíru Jirků, DrSc. z Fakulty potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha. Mgr. Mariu Byssovi, PhD, zaměstnanci firmy MikroChem LKT, spol. s.r.o., Třeboň, potom musím poděkovat za poskytnutí studovaného biologického materiálu a konzultace spojené s jeho kultivací. Velké díky patří prof. Ing. Haně Šantrůčkové, CSc za užitečné rady a možnost bez omezení využívat velkou část vybavení spadajícího pod Katedru biologie ekosystémů Přírodovědecké fakulty JČU v Českých Budějovicích, bez čehož by tato diplomová práce nikdy nevznikla. Poděkovat musím také všem členům této katedry za nezištnou pomoc a rady při řešení teoretických i praktických problémů spojených s tvorbou této diplomové práce, jmenovitě potom Ing. Jiřímu Bártovi, PhD a Ing. Tomáši Pickovi, PhD. Další z mých upřímných díky patří RNDr. Daně Elhotové, PhD., z Biologického centra AV ČR, v.v.i., Ústavu půdní biologie, za odborné konzultace a možnost využití metod MIS Sherlock k taxonomickému zařazení studovaných bakteriálních kmenů. Ve spojení s touto problematikou nesmím opomenout vyslovení díky grantovému projektu MŠMT ČR (LC 06066), v jehož rámci byly analýzy provedené metodou MIS Sherlock provedeny. Poděkovat musím také Mgr. Vojtovi Kasalickému, který mne provedl nástrahami stanovení mikroskopických počtů bakteriálních buněk pomocí fluorescenční mikroskopie i prof. RNDr. Karlu Šimkovi, CSc. z Hydrobiologického ústavu Biologického centra AV ČR, v.v.i., který mi provedení těchto stanovení umožnil. Další díky musím vyslovit také doc. RNDr. Jindřichu Břízovi, CSc z Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologického centra AV ČR, v.v.i., který mi ochotně propůjčil přístrojové vybavení k dlouhodobému třepání pokusných kultur.

Zvláštní a velké díky patří mým rodičům, Heleně a Petrovi Kotasovým, kteří mne po celou dobu studia nepřetržitě a nezištně podporují, a mé přítelkyni Ericce Hovorkové za lásku a trpělivost, kterou mne obdarovává.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1. PERMEABILNÍ REAKTIVNÍ BARIÉRY – PRB	2
2.1.1. Typy PRB.....	2
2.2. VYUŽÍVANÉ REAKTIVNÍ MATERIÁLY A ROZSAH POUŽITELNOSTI PRB	3
2.2.1. Instalace a monitoring PRB	5
2.2.2. Porovnání in situ a ex situ remediací kontaminovaných půd	6
2.3. IN SITU BIOREMEDIACE ROPNÝCH UHLOVODÍKŮ	7
2.3.1. Mobilita a rizika ropných uhlovodíků.....	9
2.3.2. Biodegradovatelnost ropných uhlovodíků	10
2.3.3. Proces zvětrávání a biodegradace ropné kontaminace a využití biomarkerů k posouzení jeho průběhu	10
2.3.4. Technologie bioremediace půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky.....	12
2.4. VYUŽITÍ BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ PRO BIOREMEDIACE PŮD KONTAMINOVANÝCH ROPNÝMI UHLOVODÍKY. 13	
2.4.1. Faktory ovlivňující účinnost mikrobiální mineralizace ropných uhlovodíků.....	13
2.4.2. Biodegradační potenciál vybraných kmenů.....	15
3. CÍLE PRÁCE.....	16
4. METODIKA.....	18
4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	18
4.2. TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ BAKTERIÁLNÍCH TAXONŮ METODOU SHERLOCK	18
4.3. POUŽÍVANÉ LÁTKY	19
4.4. KULTIVACE.....	19
4.5. HODNOCENÍ RŮSTU A KONCENTRACE BUNĚK V BAKTERIÁLNÍ SUSPENZI	20
4.6. VÝBĚR BAKTERIÁLNÍHO KMENE S NEJLEPŠÍMI RŮSTOVÝMI VLASTNOSTMI	21
4.7. FYZIOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY VYBRANÉHO BAKTERIÁLNÍHO KMENE	21
4.7.1. Optimalizace kultivace	21
4.7.2. Stanovení optimálních podmínek pro růst vybraného bakteriálního kmene	23
4.8. ANALÝZA A KVANTIFIKACE PROCESU BIODEGRADACE NAFTY	25
4.9. EXTRAKCE A ANALÝZA EXTRAKTŮ.....	25
4.10. POSUZOVÁNÍ MÍRY DEGRADACE.....	26
4.11. STATISTICKÉ HODNOCENÍ DAT	27
5. VÝSLEDKY	28
5.1. IDENTIFIKACE KMENŮ METODOU SHERLOCK	28
5.2. VÝBĚR KMENE S NEJLEPŠÍMI RŮSTOVÝMI SCHOPNOSTMI	28
5.3. KORELACE OPTICKÉ DENZITY S KONCENTRACÍ BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	28
5.4. OPTIMALIZACE KULTIVACE	29
5.4.1. Optimalizace složení kultivačních medií.	29
5.4.2. Vliv koncentrace nafty v živném mediu na růst kultury	30
5.4.3. Optimalizace kultivace a inokulace.....	31
5.5. RŮST BAKTERIÁLNÍ KULTURY PŘI SIMULACI VYBRANÝCH PODMÍNEK PROSTŘEDÍ – VYMEZENÍ OPTIMÁLNÍCH RŮSTOVÝCH PODMÍNEK.....	32
5.5.1. Efekt pH.....	32
5.5.2. Efekt salinity.....	33
5.5.3. Efekt teploty.....	34
5.5.4. Efekt přidání kovů	34
5.5.5. Nároky na živiny.....	35
5.6. BIODEGRADAČNÍ EFEKTIVITA KMENE ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS	37
5.6.1. Degradace nafty kulturou kmene <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	37
5.6.2. Zhodnocení degradace pomocí diagnostických poměrů n-C17/pristan a n-C18/phytan.....	41
6. DISKUZE	43
6.1. IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ	43
6.2. VÝBĚR KMENE PODLE RŮSTU	43
6.3. OPTIMALIZACE KULTIVACE KMENE ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS	44

6.4. RŮSTOVÁ OPTIMA KMENE ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS	46
6.5. BIODEGRADAČNÍ EFEKTIVITA KMENE ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS	49
6.6. ZHODNOCENÍ VYUŽITELNOSTI KMENE ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS PRO BIOREMEDIACE KONTAMINOVANÝCH PŮD A POUŽITÍ V TECHNOLOGII PRB	50
7. ZÁVĚRY	53
8. PŘEHLED LITERATURY	54

PŘÍLOHY

Zkratky použité v této práci

BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen, xylén
CCM	Czech Collection of Microorganisms – Česká sbírka mikroorganismů
CMC	critical micelle concentration – koncentrace povrchově aktivních látek měnící rozpustnost hydrofobní fáze ve vodném roztoku
MTBE	methyl- <i>tert</i> -butyl-ether
NEL	nepolární extrahovatelné látky
OD	optická denzita
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PRB	permeabilní reaktivní bariéry
UCM	unresolved complex mixture – směs ropných látek, jejichž píky nahromaděné kolem základní linie chromatogramu nelze identifikovat

1. Úvod

Ropa a její frakce hrají v moderní společnosti velice významnou roli. Spolu s rostoucí lidskou populací a pokračující industrializací rozvojových zemí roste celosvětově poptávka po palivech a ostatních ropných produktech. V roce 2008 byla celosvětová spotřeba ropy 31,5 miliardy barelů (1 barel = 159 l), což je téměř o 3,5 miliardy barelů více než v roce 2000 a zhruba 1,5 násobek spotřeby ropy na počátku 70. let (DOE 2009). Ropa je v současnosti dominantním zdrojem energie a očekává se, že jím zůstane přinejmenším ještě po několik příštích desetiletí (NRC 2002, převzato z Wang and Brown 2008).

Celosvětová těžba ropy a její využívání, transport a skladování nevyhnutelně vedou k únikům do životního prostředí. Podle odhadů unikne do oceánů ročně více než 1 300 000 t ropných látek. Objem úniků na souši není znám (NRC 2002), nicméně je zaznamenáno velké množství povrchových i podpovrchových kontaminací následkem havárií a úniků ze zásobních kontejnerů.

Při dekontaminaci půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky se osvědčuje využití přirozeného biodegradačního potenciálu některých půdních mikroorganismů. V posledních patnácti letech bylo provedeno mnoho studií potvrzujících účinnost půdních mikroorganismů při degradaci ropných uhlovodíků *in situ* (Hunkeler et al. 2002, Gogoi et al. 2002, Scow and Hicks 2005) i v pokusných podmínkách (Das and Mukherjee 2007, Vieira et al. 2007, Machín-Ramírez et al. 2008).

Předložená diplomová práce se zabývá zhodnocením možnosti využití vybraných bakteriálních kmenů při bioremediacích kontaminovaných půd *in situ*. Testované kmeny byly vyselektovány pracovníky VŠCHT Praha z půd v areálu terminálu firmy Slovnaft, a. s. kontaminovaných ropnými uhlovodíky. Získané poznatky by mohly být využity pro případné cílené aplikace těchto kmenů při *in situ* bioremediacích kontaminovaných půd. Práce je provázána s praktickými testy pokusné kolony simulující slibně se rozvíjející *in situ* remediační technologii Permeabilních reaktivních bariér (PRB), které provádí firma MikroChem LKT, spol. s.r.o., Třeboň.

2. Literární přehled

2.1. Permeabilní reaktivní bariéry – PRB

Pravděpodobně žádná jiná technologie remediace kontaminované půdy a podzemních vod nezbudila v posledních dvou desetiletích tolik zájmu jako použití podpovrchových permeabilních reaktivních bariér (PRB). Je tomu tak zejména kvůli výhodnému poměru cena/účinnost a potenciálu PRB zabránit šíření kontaminantu v podmínkách, které neumožňují efektivní využití jiné metody dekontaminace (EPA 1998). PRB jsou obecně definovány jako *nahrazení původního materiálu v podloží reaktivním materiálem navržené tak, aby byl kontaminant bariérou zachycen nebo transformován do ekologicky akceptovatelné formy a vytékající podzemní voda splňovala požadavky na limitní koncentrace kontaminantů* (Powell and Puls 1997).

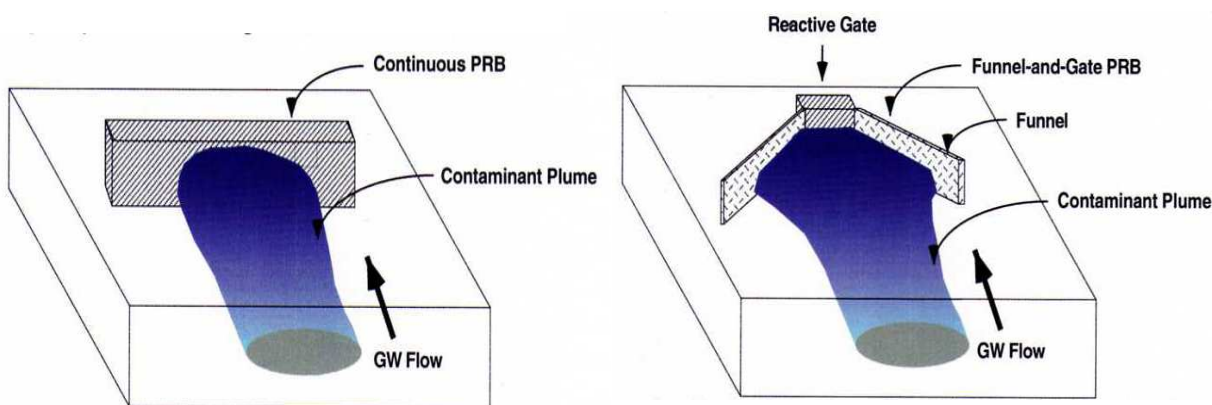
2.1.1. Typy PRB

Pro použití v praxi jsou k dispozici dva základní koncepty, „kontinuální“ PRB (continuous PRB) a systém „trychtýř a brána“ (funnel-and-gate design) (Obr.1). Pro kontinuální PRB je typický minimální vliv na tok podzemní vody v místě aplikace. Absence nepropustných valů umožňuje podzemní vodě protékat bariérou podle původního odtokového gradientu a původní rychlostí. Materiál tvořící bariéru je zvolen tak, aby se jeho propustnost pro podzemní vodu shodovala nebo byla o něco vyšší, než je propustnost okolního materiálu. Jedinými požadavky, kladenými při budování, je „přehrazení“ podloží v pravém úhlu na směr toku podzemní vody tak, aby bariérou protékala veškerá kontaminovaná voda. V ideálním případě je vhodné ukotvit dno PRB do nepropustného podloží. Tím se zabrání odtoku kontaminantu pod bariérou.

V případě konfigurace „funnel-and-gate“ jsou do podloží zabudovány nepropustné stěny svádějící vodu do funkční zóny vyplněné reaktivním materiálem, tzv. brány. Nepropustná zóna je budována tak, aby obklopila kontaminovanou oblast a po spádu tekoucí podzemní vodu nasměrovala do reaktivní části systému. Nevýhodou tohoto pojetí je riziko odtoku kontaminantu kolem PRB. Dokonce i když je propustnost v „bráně“ použitého materiálu výrazně vyšší než propustnost vodonosné vrstvy, dochází na rozhraní reaktivní materiál-původní hornina ke zpomalení rychlosti odtoku podzemní vody na původní hodnoty. Vzhledem k tomu, že propustná oblast je podstatně menší než prostor,

ze kterého je do ní nepropustnými valy přiváděna voda, může docházet k akumulaci vody a následkem toho i k odtoku kontaminované vody kolem systému (EPA 1998). Na druhé straně může nahromadění vody na přítokové straně bariéry vést k vytvoření vyššího spádu a tím i navýšení odtoku z bariéry přes rozhraní reaktivního a původního materiálu (Cushing et al. 1996, citace převzata z Day et al. 1999). Výhodou konceptu „funnel-and-gate“ PRB je díky soustředění kontaminované vody do jednoho místa možnost eliminovat kontaminaci sestávající ze směsi kontaminantů různé povahy. V tom případě je reaktivní zóna vyplněna kombinací reaktivních materiálů nebo rozdělena na několik za sebou řazených sekcí, z nichž každá je vyplněna jiným typem reaktivního materiálu (EPA 1999).

Vzhledem k odlišné konfiguraci a z toho vyplývajících požadavků na velikost a vlastnosti je nutné podle charakteru a parametrů místa aplikace (viz. odd. 2.1.3.) zvážit, jaký typ PRB je vhodné v daných podmínkách využít.



Obr.1 Schéma zachycení kontaminované podzemní vody „kontinuální“ PRB a „funnel-and-gate“ systémem. Zatímco v prvním případě nejsou směr a rychlost toku kontaminované vody skrz reaktivní zónu ovlivněny, ve druhém případě je podzemní voda svedena nepropustnými stěnami do reaktivní brány (zdroj: EPA 1998).

2.2. Využívané reaktivní materiály a rozsah použitelnosti PRB

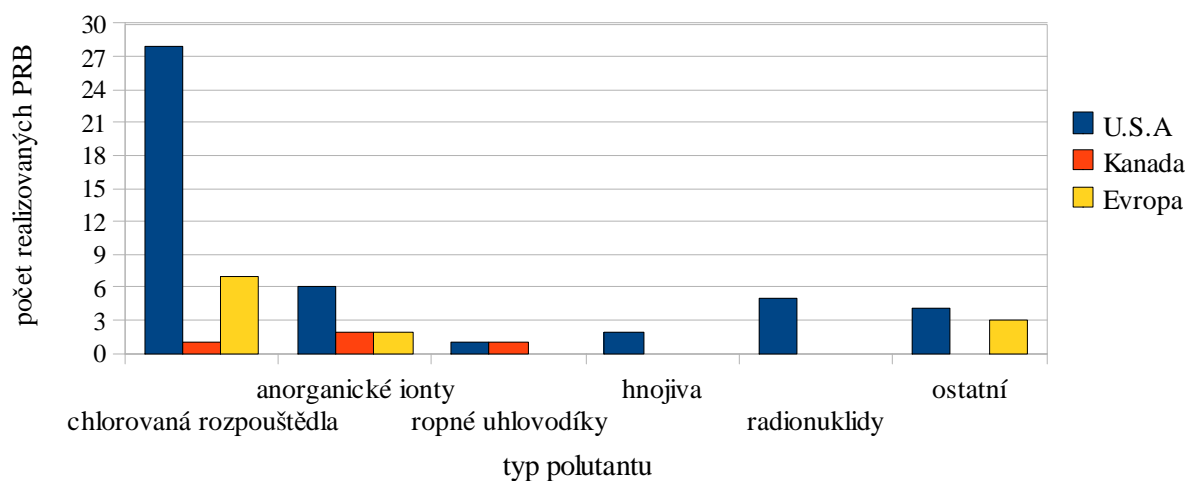
Reaktivní media musejí mít vlastnosti vhodné pro jejich dlouhodobé použití v podmínkách PRB. Měla by být kompatibilní s prostředím, ve kterém budou použita, tzn. nesmějí s kontaminantem reagovat za vzniku nebezpečných látek nebo vedlejších produktů. Kvůli minimalizaci nákladů musí být použitý materiál cenově dostupný a dostatečně perzistentní, což znamená zejména nízkou rozpustnost a schopnost udržet si reaktivitu po dostatečně dlouhou dobu (EPA 1998). Podle povahy znečišťující látky je volen reaktivní materiál, který kontaminant imobilizuje fyzikálními, chemickými nebo biologickými procesy, zahrnujícími srážení, absorpci, oxidaci/redukci, fixaci a degradaci (McGovern et al. 2002, EPA 1998).

Nejčastěji používaným reaktivním materiálem v PRB je Fe^0 . Poměrně časté je

využití Fe^0 v kombinaci s jiným materiálem, např. pískem nebo štěrkem (EPA 2002). Dalšími materiály, i když ne tak používanými, jsou aktivovaný uhlík (Plagentz et al. 2005, EPA 2002), kyslík aj. (EPA 2002, EPA 1999). Zvláštní kategorií tvoří porézní materiály, které samy o sobě nemusí mít schopnost poutat nebo degradovat kontaminant, ale díky vysokému specifickému povrchu jsou využívány jako nosiče bakteriální biomasy. Ta tvoří aktivní složku PRB (Kermanshahi et al. 2005, Vesela et al. 2006, Quan et al. 2004).

Vzhledem k faktu, že se v mnoha případech na kontaminované lokalitě vyskytuje několik znečišťujících látek pohromadě, je výhodné použití několika reaktivních materiálů spojujících fyzikální, chemické a biologické procesy v účinné odstranění polutantu z podzemní vody. Mezi takovéto materiály patří například přírodní zeolity. Jejich kationtová kapacita umožňuje efektivní odstraňování kationtů těžkých kovů (např. chromany a arsenany) nebo demobilizaci nepolárních organických polutantů (např. chlorované uhlovodíky). Zeolity jsou zároveň vhodné jako nosiče mikrobiální biomasy (Melenová and Demnerová 2004). Dalším příkladem kombinace abiotických procesů degradace s procesy biodegradace je použití Fe^0 a mikrobiálního inokula (Fernandez – Sanchez 2004).

PRB jsou aplikovatelné na širokou škálu znečišťujících látek různé povahy. V praxi je momentálně nejčastější využití PRB pro remediace půd kontaminovaných chlorovanými rozpouštědly a anorganickými polutanty (těžké kovy, radionuklidy, dusíkaté látky) (EPA 1998, 2002, PRB - fact sheet 2002, Vogan et al. 1999). Na půdy kontaminované ropnými uhlovodíky již byly PRB také s úspěchem aplikovány (Hooker and Skeen 1996, EPA 1998, 2002, Guerin et al. 2002, McGovern et al. 2002), tato technologie není zatím nicméně příliš rozšířená. Rozsah a způsob použití technologie PRB na území U.S.A., Kanady a Evropy je graficky znázorněn na Obr. 2.



Obr.2 Rozdělení realizovaných PRB podle typu kontaminace a místa realizace (zdroj: EPA 2002)

Perspektiva využití PRB pro pasivní remediaci (tzn. na principu samovolného toku kontaminované vody skrz reaktivní zónu) kontaminovaných vod vede k intenzivnímu výzkumu rozšiřujícímu rozsah použitelnosti této technologie. V laboratorních podmínkách tak bylo úspěšně simulováno biologické odbourávání směsí ropných uhlovodíků (Vieira et al. 2007, Prince et al. 2008, Rahman et al. 2003, Mukherji et al. 2004, Boopathy 2004) včetně PAU (Mougin 2002, Cajthaml et al. 2001, van Herwijnen et al. 2003), MTBE (Moreels et al. 2004), dusíkatých látek jako např. NO_3^- , NO_2^- a NH_4^+ (Ding et al. 2001), PCB (Luo et al. 2008) aj.

2.2.1. Instalace a monitoring PRB

Velká část dosud instalovaných PRB byla vytvořena jednoduchým vyhloubením příkopu, který byl naplněn reaktivním materiálem (EPA 2002). Tato metoda je vhodná pouze pro mělké instalace na dobře přístupných místech. Spolu s vývojem technologií spojených s aplikovatelností a efektivitou PRB jsou vyvíjeny i geotechnologické konstrukční metody umožňující bezpečnější, efektivnější a finančně výhodnější instalace PRB. Nové techniky zahrnují vysokotlaké injektování nepropustného nebo reaktivního materiálu do podloží, využití viskózních roztoků jako media zpevňujícího hloubený příkop a dopravujícího reaktivní materiál na místo aplikace, hloubkové míchání půdy s reaktivním materiálem prostřednictvím vrtných zařízení a kontinuální hloubení, při kterém je během tvorby příkopu původní materiál nahrazován materiálem reaktivním (EPA 1998, Day et al. 1999).

Samotné instalaci PRB předchází podrobná charakterizace kontaminovaného místa zahrnující rozsah a typ kontaminace, hydrogeologii, geochemii a mikrobiologii (EPA 1998, Vogan et al. 1999, Ding et al. 2001, Guerin et al. 2002, McGovern et al. 2002, Kalin 2004, Filler et al. 2006).

Maximální koncentrace a typ kontaminace jsou základní parametry, které je nutné zjistit před aplikací jak *in situ* (PRB, bioaugmentace), tak i *ex situ* (těžba a převoz kontaminované půdy na místo dekontaminace) remediací. U PRB je to obzvlášť důležité, protože po instalaci je nákladné a obtížné měnit parametry reaktivní zóny. Pro maximální funkčnost bariéry je také důležité přesně vymezit šířku, hloubku a délku kontaminované oblasti spolu s koncentrací kontaminantu v závislosti na těchto dimenzích a možné změny těchto parametrů v čase (McGovern et al. 2002).

Vzhledem k principu fungování PRB, kdy je kontaminant unášen tokem podzemní vody, je nezbytné porozumět hydrogeologii v místě aplikace PRB. Přednostně musí být

získány informace o vodním gradientu, hydraulické vodivosti podloží, stratigrafii hornin, porozitě podloží a sezónních změnách v průtoku a směru toku podzemní vody. Rychlost toku a koncentrace kontaminantu jsou zásadní pro dimenzování reaktivní zóny. Ta musí být navržena tak, aby doba zdržení kontaminantu v reaktivní zóně byla dostačující pro snížení jeho koncentrace na požadované hodnoty (EPA 1998).

Geochemické vlastnosti podloží a podzemní vody jsou zase určující pro odhad očekávané životnosti PRB a výběr vhodného reaktivního materiálu. Bylo například dokázáno, že voda, procházející přes bariéru tvořenou Fe^0 , významně mění své geochemické vlastnosti, včetně výrazného zvýšení pH na 9-10 a eliminace O_2 významným poklesem redoxního potenciálu. Vysoký obsah uhličitánů může vést k výraznému srážení kalcitu (CaCO_3) nebo sideritu (FeCO_3) a snižovat tak reaktivitu a hydraulickou vodivost bariéry (EPA 1998).

Mikrobiální aspekty jsou zatím asi nejméně probádaným faktorem, který může významně ovlivnit úspěšnost remediací. Původní mikrobiální konsorcia jsou často schopná využít organické kontaminanty nebo podporovat degradaci nepřímo, například přítomnost sulfát-redukujících bakterií snižuje redoxní potenciál a může tak urychlit redukci kontaminantů. V poslední době je prováděno mnoho laboratorních studií ve snaze porozumět mikrobiálním interakcím a využít potenciál půdních mikroorganismů při remediacích kontaminovaných půd (EPA 1998) (dále viz. odd. 2.3.).

Před i po instalaci PRB je nezbytné navrhnout plán monitoringu. Ten se dělí na dva základní typy, „ověřovací“ (compliance) a „výkonnostní“ (performance). Prvně jmenovaný slouží k získání informací o kontaminaci, vlastnostech půdy a podzemní vody. Druhý typ monitoringu je zaměřen přímo na systém PRB. Zahrnuje hodnocení proměn fyzikálních, chemických a mineralogických parametrů nad a pod bariérou v čase. Monitoring by měl odhalit případné změny v permeabilitě bariéry, ztrátu reaktivity, zkrácení doby zdržení kontaminantu v reaktivní zóně a průsaky přes nepropustné struktury. Během procesu remediací by měly být sledovány také produkty degradace kontaminantů. Pro účely monitoringu je ve zdrojové oblasti kontaminantu i v prostoru kolem bariéry vybudován systém vzorkovacích vrtů. Rozmístění vrtů je navrženo tak, aby bylo možné sledovat výše zmíněné parametry ve všech třech dimenzích, ve kterých se kontaminant může šířit (EPA 1998, Kalin 2004).

2.2.2. Porovnání in situ a ex situ remediací kontaminovaných půd

Princip *ex situ* remediací spočívá nejčastěji v odtěžení kontaminované půdy nebo

odčerpání kontaminované podzemní vody a přepravy tohoto materiálu z místa kontaminace na místo, kde bude provedena dekontaminace. Finanční náročnost těchto procesů je často velmi vysoká. Naopak *in situ* aplikace PRB je finančně relativně nenáročná, přičemž nejdražšími položkami této technologie jsou samotná výstavba PRB a cena použitého reaktivního materiálu. Vzhledem k energetické nezávislosti jsou výrazně sníženy také náklady na provoz a údržbu bariér (EPA 1998, Clark et al. 1997). Podle odhadů je remediace podzemních vod pomocí PRB ve srovnání s metodami „pump-and-treat“ („odčerpat a vyčistit“) zhruba o 25 % levnější (Day et al. 1999, PRB – fact sheet 2002, EPA 2002). Nejvyšší náklady jsou během provozu a údržby vynakládány na monitoring a případnou obměnu reaktivního materiálu (EPA 1998, McGovern et al. 2001).

Kromě ceny patří mezi další výhody minimální zásahy do prostředí a původního odtokového režimu podzemních vod.

Životnost PRB je závislá na typu použitého reaktivního materiálu, vlastnostech podloží a na množství a koncentraci polutantu v prostředí. Vzhledem k faktu, že se jedná o relativně mladou technologii, nejsou zatím k dispozici komplexní data, ze kterých lze životnost různých typů bariér určit, odhady nicméně hovoří o horizontu 10-20 let, v některých případech i déle (EPA 1998, PRB fact – sheet 2002).

Nevýhodami jsou zejména nutnost dlouhodobého monitoringu funkčnosti PRB a možnost změny v průtočnosti bariéry následkem srážení látek biologického či chemického původu (EPA 1998, PRB – fact sheet 2002). Důležitým omezením aplikovatelnosti technologie PRB je charakter kontaminovaného podloží. Příliš mocné nebo sytké vodonosné vrstvy hornin mohou vyloučit použitelnost PRB (EPA 1998, Day et al. 1999).

2.3. In situ bioremediace ropných uhlovodíků

In situ bioremediace je lidskou aktivitou podmíněný proces biodegradace cílového polutantu v původním prostředí (Mearns 1998). Během biodegradace je organický polutant mineralizován na anorganické produkty jako oxid uhličitý, methan, vodu a anorganické soli (Farhadian et al. 2008).

Ropné uhlovodíky jsou jedněmi z nejčastějších kontaminantů půd. Úniky vyskytující se během těžby, zpracování, přepravy a skladování ropy a ropných produktů představují environmentální rizika a vzbuzují zájem široké veřejnosti (Wang and Brown 2008). Ropa je složitá směs hydrofobních látek jako jsou *n*-alkany, isoalkany, cykloalkany, aromáty, resiny a asfalteny. Frakce vznikající rektifikací ropy se dají na základě jejich

chemického složení rozdělit do následujících skupin (Wang and Brown 2008):

1. Lehké destiláty: Pro tuto frakci jsou typické uhlovodíky v rozsahu C_3 - C_{16} . Do této skupiny ropných produktů patří automobilové a některé letecké benzíny, pro něž je typická vysoká těkavost, hořlavost a teplota varu mezi 40-180 °C. Benzíny obsahují velké množství BTEX. Vzhledem ke způsobu jejich použití (pohonné hmoty) jsou obohacovány tzv. aditivami, které upravují jejich hoření, výbušnost a další vlastnosti. Mezi nejdůležitější aditiva patří MTBE, zvyšující oktanové číslo pohonných směsí, a inhibitory koroze. Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem a inertnosti je MTBE nejrozšířenějším polutantem mezi látkami obsaženými v pohonných hmotách (Moreels et al. 2004). Do 90-tých let patřily k významným aditivům také deriváty uhlovodíků obsahující olovo (např. tetraethylolovo).
2. Středně těžké destiláty: Tyto destiláty jsou produkty v relativně širším rozsahu C_6 - C_{26} a zahrnují pohonné hmoty do leteckých turbín, kerosin a dieselová paliva. Teplota varu dieselových směsí je přibližně 125-380 °C. Diesel se skládá z uhlovodíků v rozmezí C_8 - C_{28} a má výrazný obsah *n*-alkanů, alkylovaných cyklohexanů a PAU. Typický pro tuto ropnou frakci je vysoký obsah UCM (unresolved complex mixture) (viz. Obr. 3).
3. Těžké topné oleje: Tato frakce je používána k výrobě energie. Často je ředěna lehčími frakcemi a používána pro pohon plavidel, odkud uniká do vodního prostředí. Její složení je velmi rozmanité a odpovídá typu ropy, ze které je získána.
4. Mazací oleje: Mazací oleje jsou vyráběny atmosférickou nebo vakuovou destilací a procházejí řadou úprav, které vedou k navýšení viskozity, úpravě barvy a dalších vlastností. Takto vzniklé produkty mají široké použití ve strojírenství, průmyslu, stavebnictví aj. Mazací oleje tvoří směs uhlovodíků v rozmezí C_{18} - C_{40} a teplotou varu nad 340 °C.
5. Odpadní oleje: Tato frakce je tvořena směsí odpadů při výrobě nebo použití výše zmíněných frakcí ropy. Jako odpad je častým kontaminantem vod v oblastech

s intenzivní lodní dopravou. Finální složení je s ohledem na způsob vzniku velmi různorodé.

Úspěšnost bioremediací půd kontaminovaných nejen ropnými uhlovodíky je podmíněna několika předpoklady: 1) kontaminant je biologicky odbouratelný původními nebo (v rámci technologie) introdukovanými mikroorganismy, 2) rychlost mineralizace může být navýšena, 3) koncept remediace musí být úspěšně simulován v reálných podmínkách 4) stimulace mineralizace může být docíleno *in situ* a 5) kompletní mineralizace nebo rozkladu polutantu na neškodné produkty je dosaženo na místě aplikace technologie (Höhener et al. 1998).

2.3.1. Mobilita a rizika ropných uhlovodíků

Mobilita ropných uhlovodíků je závislá na prostředí, ve kterém dojde k úniku. Ve vodním prostředí dochází vzhledem k hydrofobní povaze ropných uhlovodíků k vytvoření tenkého povlaku na hladině. Rychlost šíření tohoto typu kontaminace je pak závislá na vodních proudech a povětrnostních podmínkách. Nejvíce mobilní ropnou kontaminaci tvoří středně těžké destiláty (viz. odd. 2.2.), které na vodní hladině vytvářejí velmi tenký, rychle se šířící film (Wang and Brown 2008). Naopak v půdním prostředí je šíření ropných uhlovodíků značně omezeno, na kontaminovaných místech je nicméně doloženo významné šíření kontaminace podzemní vodou (Guerin et al. 2002, Hunkeler et al. 2002). Z hlediska šíření představuje největší riziko zejména MTBE (viz. odd. 2.2.) a aromatické uhlovodíky (včetně BTEX), které jsou ve vodě zhruba tři až pětkrát rozpustnější než alifatické uhlovodíky se stejným počtem uhlíků v molekule (Moreels et al. 2004, Vieira et al. 2007). Šíření ropných uhlovodíků podzemní vodou nastává v okamžiku, když je rychlost rozpouštění ve zdrojové oblasti (oblast s ropnými uhlovodíky v nevodné fázi) vyšší než rychlost biodegradace (Mackay et al. 1985). Některé uhlovodíky obsažené v ropě jsou těkavé a mohou tedy přecházet do plynného skupenství a kontaminovat ovzduší. Jedná se zejména o látky ze skupiny BTEX a alifatické uhlovodíky v rozmezí C₅-C₁₂. Ztráta těkáním je jedním z nejvýznamnějších procesů vedoucích k úbytku ropné kontaminace, zejména potom u lehčích frakcí (Snape et al. 2005, Wang and Brown 2008).

Rizika spojená s úniky ropných látek jsou hodnocena zejména podle míry nebezpečnosti pro lidský organismus. Z tohoto hlediska bylo organizací U.S. EPA (Environmental Protection Agency, U.S.A) vybráno 20 látek, jejichž výskyt je spojený s ropou a jež jsou celosvětově monitorovány jako prioritní polutanty indikující nebezpečné

znečištění. Jedná se o benzen, toluen, ethyl-benzen, xyleny a 16 prioritních sloučenin ze skupiny PAU (Wang and Brown 2008). Rozsáhlá kontaminace různých, zejména potom vodních prostředí má nicméně dopad na stabilitu a biodiverzitu ekosystému (Mearns 1998) bez ohledu na výskyt dvaceti výše jmenovaných látek.

2.3.2. Biodegradovatelnost ropných uhlovodíků

Hlavními faktory komplikujícími proces biodegradace organických polutantů, včetně ropných látek, jsou zejména nadbytek alternativních přírodních zdrojů uhlíku, nedostatek živin, nepříznivé redoxní podmínky, nedostatek vhodných donorů a akceptorů elektronů, toxicita, omezená biodostupnost polutantu a kombinace geochemických a hydrogeologických faktorů (Kalin 2004).

Různé skupiny látek ropného původu nepodléhají biodegradaci ve stejném měřítku. Ve většině případů jsou ropné látky mineralizovány půdní mikroflórou v následujícím pořadí: *n*-alkany s přímým řetězcem, větvené isoalkany, cykloalkany, aromáty (Das and Mukherjee 2006, Vieira et al. 2007, Prince et al. 2008,). Parafíny (*n*-alkany) podléhají biodegradaci zpravidla tím lépe, čím méně atomů uhlíku v řetězci mají (Rahman et al. 2003). Byla prokázána i schopnost půdní mikroflóry využít těkavé složky ropné kontaminace (převážně monoaromatické látky ze skupin BTEX) v plynném skupenství (Höhener et al. 2003).

Vzhledem k šíření kontaminantu podzemní vodou je i jeho odbourávání závislé na konkrétních podmínkách panujících ve vodou nasycené zóně. Ačkoliv jsou aerobní pochody utilizace organických substrátů podstatně rychlejší než anaerobní, prostředí hornin nasycených vodou je většinou na kyslík chudé a jsou tak upřednostněny anaerobní pochody odbourávání organických polutantů (Scow and Hicks 2005).

2.3.3. Proces zvětrávání a biodegradace ropné kontaminace a využití biomarkerů k posouzení jeho průběhu

Biomarkery jsou stabilní organické sloučeniny nacházející se v uhlí, ropě a sedimentárních horninách (Payet et al. 1999). Jejich původní organická struktura zůstává téměř nepozměněná po dlouhou dobu a mohou tak poskytnout mnoho informací o svém původu a historii. Chemická analýza charakteristických a environmentálně perzistentních biomarkerů poskytuje důležité informace o zdroji a původu znečištění, typu kontaminace a monitorování procesu biodegradace a „zvětrávání“ ropy a ropných produktů (Wang and Brown 2008).

Mezi biomarkery patří celá řada látek zahrnující acyklické isoprenoidní alkany, terpany, sterany, diasterany, seskviterpany, mono- a triaromatické sterany aj. Důležitou roli mají kromě látek samotných také diagnostické indexy a poměry mezi vybranými sloučeninami. Mezi nejpoužívanější indexy patří tzv. Weathering Index – WI (Wang et al. 1995) a Carbon Preference Index – CPI (Wang and Brown 2008). Tyto dva indexy jsou vyjádřeny následovně:

$$WI = (\text{suma } n\text{-C}_8 + n\text{-C}_{10} + n\text{-C}_{12} + n\text{-C}_{14}) / (\text{suma } n\text{-C}_{22} + n\text{-C}_{24} + n\text{-C}_{26} + n\text{-C}_{28})$$

$$CPI = (\text{suma lichých } n\text{-alkanů}) / (\text{suma sudých } n\text{-alkanů}) *$$

* zahrnuje pouze n-alkany v rozmezí C₈-C₄₄

Hodnoty, jakých CPI nabývá, je možné použít k diagnostice původu ropy nebo ropné kontaminace. Hodnoty kolem 1 jsou typické pro většinu typů ropy. Pokud hodnoty CPI překračují hodnotu 2, svědčí to o relativně vysokém podílu látek z rostlinného materiálu, zejména rostlinných vosků (Bryselbout et al. 1998).

WI poskytuje informaci o stupni „zvětrání“ daného ropného produktu. Míra „zvětratelnosti“ alkanů je přímo úměrná počtu atomů uhlíku v řetězci. Čím kratší řetězec (a tím nižší teplota varu), tím snadněji podléhá procesům zvětrávání (Wang and Brown 2008).

Nejčastěji používané typy diagnostických poměrů jsou vyjádřeny následovně:

$$(2.1.) \quad \text{poměr} = a/b \quad \sim \quad (2.2.) \quad \text{poměr (\%)} = 100 \times a/(a + b)$$

kde *a* a *b* představují výšky píků, plochy píků nebo koncentraci. Poměry definované rovnicí 2.1. nabývají hodnot mezi 0 a nekonečnem, zatímco poměry definované rovnicí 2.2. nabývají hodnot mezi 0 a 100. Velkou výhodou diagnostických poměrů je, že efekt koncentrace nemá při jejich hodnocení vliv (Wang and Brown 2008).

Obecný průběh hlavních změn ve složení ropných produktů v důsledku „zvětrávání“ se dá hrubě shrnout do několika základních kroků. Nejprve dochází k redukci abundance alkanů s krátkými řetězci, zřetelný je i pokles obsahu BTEX. Pokračujícím zvětráváním dochází k další redukci *n*-alkanů i lehčích isoprenoidních sloučenin. Obsah těkavých aromatických látek rapidně klesá, dochází i k poklesu koncentrace C₀- a C₁-

naftalenů. U silně zvětralé ropy a jejích frakcí jsou nejen *n*-alkany, ale také iso- a cykloalkany výrazně nebo kompletně ztraceny. BTEX a alkyl-benzeny úplně chybí. Biomarkery jsou koncentrovány díky jejich stabilitě a resistenci vůči biodegradaci (Wang and Brown 2008).

Mezi hlavní ukazatele stupně biodegradace ropných uhlovodíků patří diagnostické poměry *n*-C₁₇/pristan a *n*-C₁₈/phytan. Využití isoprenoidních látek pristanu a phytanu je založeno na výrazně vyšší odolnosti těchto sloučenin vůči biodegradaci než je tomu u *n*-alkanů (*n*-C₁₇, *n*-C₁₈), s nimiž eluují téměř ve stejném čase. Srovnání poměru *n*-C₁₇/pristan a *n*-C₁₈/phytan mezi zdrojem kontaminace a šířící se kontaminací poskytuje vodítko k ohodnocení stupně biotické mineralizace polutantu (Johnston et al. 2007, Wang and Brown 2008). Bylo nicméně dokázáno, že některé půdní bakterie jsou schopny isoprenoidní látky poměrně snadno využít (Nakajama et al. 1985).

2.3.4. Technologie bioremediace půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky

Kontaminované půdy mají potenciál přirozeně snižovat koncentraci kontaminantu skrze fyzikálně-chemicko-biologické procesy. Přítomnost mikroorganismů s biodegradčním potenciálem byla prokázána v kontaminovaných půdách ve všech zeměpisných šířkách, včetně chladných regionů, kterými jsou Antarktida a Aljaška (Filler et al. 2006). V drtivé většině případů však přirozené podmínky nepostačují k eliminaci kontaminace, která se tak dále šíří (Mackay et al. 1985). Lidský zásah v podobě bioremediace může podpořit či nahradit přirozené schopnosti prostředí a eliminovat kontaminaci zcela nebo na přijatelné hodnoty.

V zásadě existují dva přístupy k *in situ* bioremediacím. Buď navýšení stávajícího biodegradčního potenciálu prostředí nebo využití potenciálu v laboratorních podmínkách ověřených a účinných mikroorganismů (Kalin 2004).

Inokulace kontaminovaného prostředí kulturou s vysokou schopností mineralizovat cílový substrát je zatím v praxi nepříliš rozšířený způsob, který má nicméně velmi slibné výsledky v laboratorních podmínkách (Rahman et al. 2003, Boopathy 2004, de Carvalho and da Fonseca 2005, Medina-Moreno et al. 2005, Nyman et al. 2007, Vieira et al. 2007). Inokulum může být aplikováno ve formě suspenze přímo na kontaminovanou půdu (bioaugmentace) (Gogoi et al. 2003) nebo do reaktivní části PRB. Pro tento typ bioremedace je vhodné vybudování PRB typu „funnel-and-gate“ s „bránou“ ve formě bioreaktoru, kam by bylo inokulum aplikováno a kde by probíhal proces biodegradace (MikroChem 2007). Důležitým faktorem pro dosažení stejné účinnosti v místě aplikace

jako v laboratorních podmínkách je zabezpečení vhodných podmínek a výběr nosného materiálu. Některé studie, jako např. Karmenshahi et al 2005 a Quan et al 2004, dokládají úspěšnou imobilizaci inokula na vhodném nosiči a vysokou účinnost následné biodegradace.

Bioremediace kontaminace ropnými uhlovodíky formou stimulace přirozeného potenciálu prostředí zahrnuje monitoring půdních podmínek a následně jejich cílenou úpravu za účelem navýšení biodegradace. Kromě rozsahu a koncentrace kontaminantu v podloží je nutné změřit a ohodnotit indikátory mikrobiální aktivity. Do této skupiny parametrů patří koncentrace rozpuštěného kyslíku, nitrátů, nitritů, sulfidů, sulfátů, Fe^{2+} , Mn^{2+} , CO_2 , methanu, pH a alkalinity. Na základě těchto dat je pak odhadnut charakter a maximální potenciál pro přirozenou degradaci. Dá se tak například na základě nízké koncentrace rozpuštěného kyslíku v oblasti kontaminace (ve srovnání s nekontaminovaným okolím) usoudit na probíhající aerobní biodegradaci, a naopak, pokles koncentrace anaerobních akceptorů elektronů a vyšší obsah produktů anaerobního metabolismu poukazuje na anaerobní odbourávání kontaminace (Hooker and Skeen 1996). Tyto trendy byly potvrzeny i v případě *in-situ* remediací (Hunkeler et al. 2002).

Po vyhodnocení výše zmíněných dat je možné přejít k samotné stimulaci mikrobiální aktivity. Toho může být docíleno injektováním vody obohacené o kyslík, základní živiny N a P (Hunkeler et al. 2002, Gogoi et al. 2003) a/nebo povrchově aktivních látek zvyšujících dostupnost hydrofobních polutantů pro biodegradaci (viz. odd. 2.3.1.).

Veškeré zásahy do prostředí musí být pečlivě zváženy a to nejlépe na základě předchozích testů. Přehnané vstupy mohou působit toxicky a negativně ovlivnit přírodní společenstva a tím i proces degradace (Kalin 2004, Mohn and Stewart 2000). Aplikaci *in situ* bioremediačních technologií (PRB, bioaugmentace, biostimulační procesy) by tak měly předcházet laboratorní a pilotní experimenty modelující podmínky v místě budoucí aplikace (Guerin et al. 2002, Boopathy 2004).

2.4. Využití bakteriálních kmenů pro bioremediace půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky

2.4.1. Faktory ovlivňující účinnost mikrobiální mineralizace ropných uhlovodíků

Mezi faktory, které mají přímý vliv na schopnost mikrobiální biomasy biodegradovat ropné uhlovodíky patří především dostupnost živin, fyzikálně-chemické faktory prostředí a dostupnost kontaminantu (Kalin 2004).

Zásadní předpoklad pro navýšení aktivity mikrobiální biomasy a míry biodegradace je uspokojení živinových nároků, zejména u nejvíce limitujících prvků jakými jsou N a P. Obecně používanou strategií je obohacení živinami v takovém množství, aby bylo dosaženo poměru C/N/P v prostředí 100:5:1 (Nikolopoulou et al. 2007). Optimální dostupnost a poměr N a P v prostředí jsou nezbytné předpoklady k dosažení maximální míry degradace organických kontaminantů, což bylo prokázáno jak v laboratorních podmínkách (Smith and Cleland 1998), tak i při *in-situ* bioremediacích (Hunkeler et al. 2002). V souvislosti s bioremediacemi ropných uhlovodíků jako hydrofobních látek bylo s úspěchem testováno použití lipofilních zdrojů N a P (kys. močová, lecitin). Toto řešení má výhodu zejména v cílené aplikaci zdrojů živin, které mají vysokou afinitu k hydrofobním látkám a jsou tak k dispozici na fázovém rozhraní voda-hydrofobní polutant (Nikolopoulou et al. 2007).

Mezi hlavní fyzikálně-chemické faktory prostředí ovlivňující proces biodegradace patří pH a obsah kyslíku. Hodnota pH má přímý vliv na složení půdních mikrobiálních společenstev. Při hodnotách pH v kyselé oblasti (pH 3-6) jsou zvýhodněny houbové organismy, optimální pro růst bakteriálních společenstev je pH 5-9 (Ambrož 1986). Nedostatek kyslíku je zásadním faktorem limitujícím aerobní procesy. Nejběžnějším způsobem syčení podzemního prostředí kyslíkem je aplikace peroxidu vodíku nebo injektování okysličené vody do půdy. Použití peroxidu vodíku je výhodné vzhledem k vysokému potenciálu uvolňovat kyslík a poměrně lehké a levné aplikaci (Menendez-Vega et al. 2007). V půdních ekosystémech s nízkým redoxním potenciálem, přirozeně limitovaných kyslíkem, přebírají funkci akceptoru elektronů namísto kyslíku nitráty, sulfáty a karbonáty. Jak ukázal Boopathy (2004), nejrychleji probíhá degradace ropných uhlovodíků v anaerobních podmínkách s přítomností všech těchto akceptorů, následně v sulfát-redukujících, nitrát-redukujících a nejpomaleji v methanogenních podmínkách.

Vliv na mikrobiální aktivitu může mít také výskyt toxických kovů a vysoké obsahy solí v půdě, což dokazují závěry práce Balrich and Skotsky (1985). Extenzivní souběžná kontaminace půd těžkými kovy (Pb) spolu s ropným znečištěním (Mohn and Stewart 2000) a využití bakteriálních kmenů aklimatizovaných na určité koncentrace solí v prostředí (Mukherji et al. 2004) však nemusí mít na intenzitu mineralizace ropných uhlovodíků vliv.

Velká pozornost je v souvislosti s bioremediacemi věnována problematice nedostatečné biodostupnosti polutantů s hydrofobním charakterem. Povrchově aktivní látky, tzv. surfaktanty, mají schopnost redukovat povrchové a mezifázové napětí a zvýšit tak rozpustnost, mobilitu, biodostupnost a následnou biodegradovatelnost hydrofobních látek

(Singh et al. 2007). Mnoho půdních mikroorganismů má schopnost produkovat takovéto látky, nicméně pro stimulaci intenzity biodegradace je nutné exogenně navýšit jejich obsah v půdním prostředí (Menendez-Vega et al. 2007). Laboratorně bylo dosaženo významného navýšení biogenní mineralizace ropných látek jak s přírodními surfaktanty (Whang et al. 2008) tak s použitím uměle připravených produktů (Nyman et al. 2007). V review Singh et al. (2007) byl popsán proces extrakce povrchově aktivních látek z bakteriálních kultur a jejich technologického využití.

2.4.2. Biodegradační potenciál vybraných kmenů

Nebyly nalezeny žádné konkrétní informace o potenciálu kmene *Achromobacter xylosoxidans* degradovat směsi ropných látek zahrnující alifatické a isoprenoidní uhlovodíky. V odborné literatuře lze dohledat studie potvrzující schopnost tohoto bakteriálního kmene degradovat uhlovodíky aromatické. Podle Mougín (2002) jsou výskyt a schopnost tohoto kmene degradovat aromatické uhlovodíky vázány na půdy s pH blízko neutrálním hodnotám. Ve studii Quan et al. (2004) bylo tímto kmenem degradováno téměř 87,9 % 2,4-dichlorfenolu během 30 dní trvající kultivace. Tato studie zároveň prokázala schopnost kmene *Achromobacter xylosoxidans* kolonizovat nosný keramický materiál.

V případě kmene *Bacillus subtilis* byla potvrzena schopnost degradovat komplexní směs ropných uhlovodíků. Během 5-ti denní kultivace v tekutých mediích bylo docíleno v průměru 59% úbytku ropné směsi, přičemž nejvyšší úbytky byly zaznamenány ve frakci C₁₂-C₃₀ (Verma et al. 2006). Das and Mukherjee (2007) docílili laboratorní kultivací kontaminované půdy inokulované kmenem *Bacillus subtilis* 29% degradace ropných uhlovodíků během 60 dní trvajícího pokusu. Po 120 dnech bylo toto množství navýšeno na 52 %. U kmene *Bacillus subtilis* i dalších zástupců rodu *Bacillus* byla potvrzena produkce povrchově aktivních látek (Singh et al. 2007, Das and Mukherjee 2007). Zástupci tohoto rodu se dobře adaptují na podmínky půdního prostředí kontaminovaného ropnými uhlovodíky (Rahman et al. 2003). Vysokou přizpůsobivost kmene *Bacillus subtilis* doložili i Mukherjee and Das (2005) když při porovnání kultur tohoto kmene, vyselektovaných z odlišných prostředí (ropnými uhlovodíky kontaminované půdy a kvašené potraviny) zjistili odlišná růstová optima (pH, teplota, salinita).

3. Cíle práce

Ex situ remediace kontaminovaných půd je nákladný a zdlouhavý proces doprovázený rozsáhlými zásahy v prostředí. Proto je v posledních dvou desetiletích věnována velká pozornost technologiím *in situ*. Oproti *ex situ* metodám jsou doprovázeny minimálními zásahy do prostředí a značně redukuje finanční náročnost remediace.

Ve spojitosti s remediacemi půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky technologiemi *in situ* se využívá přirozeného biodegradačního potenciálu některých půdních mikroorganismů. Firma MikroChem LKT Třeboň, s pobočkou v Českých Budějovicích, testuje v rámci výzkumného projektu efektivitu technologie biotické PRB při dekontaminaci půd znečištěných PAH a NEL. Biotická PRB funguje na principu svedení kontaminované vody do reakčního centra naplněného nosným materiálem a na něm přichyceným biofilmem tvořeným mikroorganismy se schopností mineralizovat ropné uhlovodíky. Za účelem získání vhodného biologického materiálu byly z kontaminované půdy vyselektovány 4 kmeny, u kterých byla prokázána schopnost využít jako substrát ropné látky (NEL).

Předložená diplomová práce využívá těchto bakteriálních kmenů pro studium biodegradace nafty. Hlavním cílem je posoudit, navrhnout a experimentálně ověřit optimální kultivační podmínky pro vybraný bakteriální kmen. Zhodnotit reakci tohoto kmene na různé vlivy půdního prostředí, jako např. teplotu, pH, salinitu, přítomnost těžkých kovů, různé poměry N/P, a posoudit potenciál vybraného bakteriálního kmene degradovat naftu v různých podmínkách půdního prostředí s tím, že nafta bude jediným zdrojem uhlíku a energie při remediaci. Diplomová práce má následujících šest dílčích cílů:

1. Vybrat bakteriální kmen s nejlepšími růstovými schopnostmi.
2. Pokusit se optimalizovat kultivaci vybraného kmene.
3. Vymežit fyziologické nároky a optimální růstové podmínky.
4. Stanovit efektivitu vybraného bakteriálního kmene při biodegradaci ropných uhlovodíků.

5. Ověřit identifikaci již zařazených bakteriálních kmenů a pokusit se identifikovat jeden neznámý kmen pomocí analýzy profilu fosfolipidických mastných kyselin v bakteriálních buněčných membránách (metoda MIS Sherlock).

6. Zhodnotit všechny získané výsledky a na jejich základě doporučit, resp. navrhnout optimální podmínky pro nasazení vybraných bakteriálních kmenů pro bioremediaci kontaminovaných půd technologií propustných reaktivních bariér.

4. Metodika

4.1. Biologický materiál

Bakteriální kmeny byly pro účely studie dodány na šikmých agarech pracovníky firmy MikroChem LKT, spol. s.r.o., Třeboň. Pro získání tohoto biologického materiálu byl vybrán areál terminálu firmy Slovnaft, a.s. (obec Horný Hričov, okres Žilina, SK), který je kontaminovaný látkami skupiny NEL, konkrétně ropnými uhlovodíky C₁₀-C₂₀ a minoritně zastoupenými alifatickými chlorovanými uhlovodíky a látkami skupiny BTEX. Hlavním zdrojem kontaminace je motorová nafta (MikroChem 2007). Z vybrané lokality byly pracovníky firmy odebrány vzorky kontaminovaných štěrků a znečištěné podzemní vody. Tento materiál byl následně předán pracovníkům VŠCHT v Praze, kde byly vyselektovány čtyři bakteriální kmeny schopné využít jako substrát ropné látky (NEL) z dodaných vzorků. Kmen s pracovním označením A se na pracovišti České sbírky mikroorganismů (Masarykova univerzita v Brně, Tvrdého 14, 602 00 Brno), které taxonomické zařazení provádělo, nepodařilo s pomocí dostupných mikrobiologických databází ani knihoven mikroorganismů identifikovat. Kmeny byly identifikovány na základě fenotypových a morfologických testů. Zbýlé tři kmeny s označením B, C a D byly identifikovány jako *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus mycoides* respektive *Bacillus sp.* Bakteriální kultury byly během studie dlouhodobě uchovávány na agarových plotnách při pokojové teplotě.

Z hlediska zdravotních rizik patří všechny čtyři kmeny dle klasifikace WHO do třídy I, čili mezi mikroorganismy použitelné bez omezení, nezpůsobující onemocnění lidí nebo zvířat (MikroChem 2007).

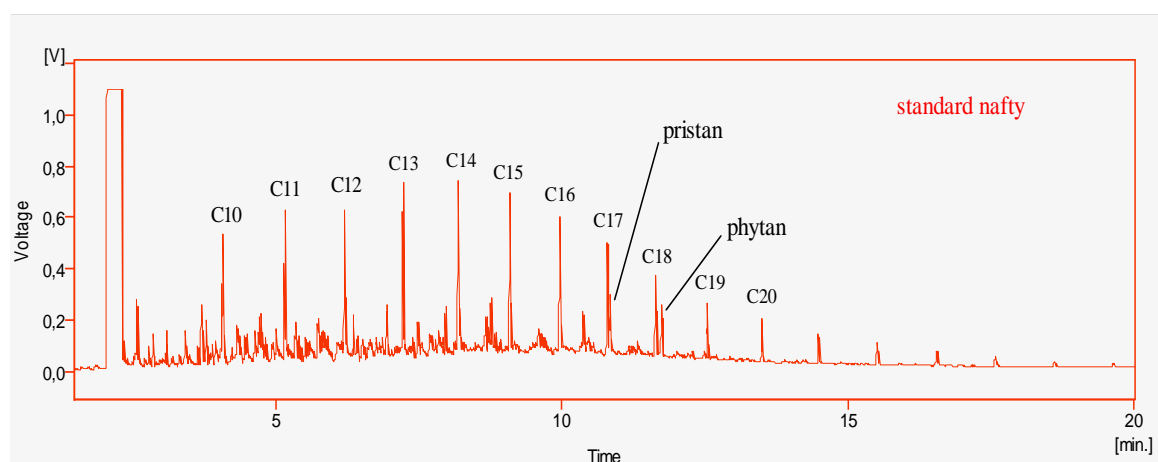
4.2. Taxonomické zařazení bakteriálních taxonů metodou Sherlock

Vzhledem k nepodařené identifikaci kmene A byla provedena identifikace tohoto i ostatních kmenů metodou MIS Sherlock (MIDI, Inc, USA). Tato metoda je založena na GC analýze buněčných mastných kyselin bakteriální kultury. Analýza každého vzorku byla provedena dvěma analogickými postupy, klasickou cestou (MIS Operating Manual 2008) a pomocí nové metody (Instant FAME User's Guide 2008). GC analýza zahrnuje kalibraci pomocí MIS Sherlock standardu, referenčního vzorku (CCM kmen, *Stenotrophomonas maltophilia* CCM 1639) a následné určení profilu mastných kyselin analyzovaného kmene. Taxonomické zařazení je získáno po srovnání výsledku analýzy neznámého kmene a knihovny známých mikroorganismů. V tomto případě byly použity

knihovny pro aerobní bakterie verze TSBA 6.1. pro klasické zpracování a RTSBA 6.1 pro rychlou Instant. verzi. Výsledkem analýzy je přiřazení k druhu na základě indexu podobnosti (SI, similarity index). Hodnota SI rovna nebo vyšší než 0,5 a s rozdílem vyšším než 0,1 mezi případnou další druhovou nabídkou je považována za průkaznou pro druhovou identifikaci (MIS Operating Manual 2008).

4.3. Používané látky

Všechny látky používané v této studii byly čistoty p.a. Ve studii byla jako modelová směs ropných uhlovodíků používána nafta. Byla dodána firmou MikroChem LKT a pocházela z jednoho zdroje. Před použitím byla nafta sterilizována filtrací přes filtr s porozitou 0,2 μm . Chromatogram nafty je na Obr. 3.



Obr. 3 Chromatogram standardu nafty

4.4. Kultivace

V průběhu všech pokusů byla jediným zdrojem uhlíku v mediu nafta. Růst kultury byl studován v 250 ml Erlemayerových baňkách obsahujících 39,6 ml media a 0,4 ml nafty (1 % v/v). Kultivace probíhala při teplotě 21 ± 2 °C na recipročních třepáčkách s intenzitou třepání 130 rpm. Biodegradace nafty byla studována v 500 ml Erlemayerových baňkách obsahujících 99 ml media a 1 ml nafty (1 % v/v), při teplotě 28 °C a orbitálním třepáním rychlostí 160 rpm. Objem inokula přidávaného do jednotlivých systémů byl zvolen tak, aby optická denzita (OD) bakteriální suspenze na začátku pokusu odpovídala přibližně hodnotě 0,2 (cca 4 ml inokula na 100 ml media).

Veškeré alternativy studovaných proměnných, při kterých byly hodnoceny růstové křivky, byly během pokusů zastoupeny třemi opakováními a jedním „slepým“ stanovením neobsahujícím inokulum. Míra biodegradace byla posuzována během 20 dní trvajícíchho

experimentu, kdy byly na každý ze tří odběrových termínů (1., 7. a 20. den kultivace) připraveny tři systémy obsahující kulturu a dva kontrolní systémy bez biomasy. Celá sada byla extrahována v den odběru.

4.5. Hodnocení růstu a koncentrace buněk v bakteriální suspenzi

Při kvantifikaci biodegradace byla v odběrových termínech stanovena hustota bakteriální suspenze. Za tímto účelem bylo před extrakcí odebíráno 90 μl kultury z každého pokusného systému. Toto množství bylo následně naředěno 765 μl sterilního fyziologického roztoku a fixováno 45 μl 40% formaldehydu (konečná koncentrace formaldehydu = 2 %). Adekvátní množství takto naředěného vzorku bylo obarveno pomocí barviva DAPI (výsledná koncentrace 0,2 %) a zfiltrováno přes polykarbonátové filtry s porozitou 0,2 μm (firma Durapore, U.S.A.). Poté bylo pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60 napočítáno 400 a více bakteriálních buněk, přičemž byl zaznamenáván počet počítacích polí, na kterých bylo tohoto počtu dosaženo. Pomocí přepočtového faktoru mikroskopu pak bylo z těchto údajů vypočteno množství bakteriálních buněk v 1ml původní kultury. Před aplikací fluorescenčního barviva byl vzorek sonikován ultrazvukovými pulzy. Tento postup vedl k rozbití shluků buněk, které se při vyšších buněčných hustotách v kulturách tvořily, a homogenizoval tak vzorek před filtrací.

Růst bakteriální kultury byl během fyziologických pokusů hodnocen jako funkce optické denzity bakteriální suspenze. Absorbance byla během pokusů proměřována v denním kroku (s výjimkou víkendů) po dobu 8-10 dní při vlnové délce 600 nm (Mukherji et al. 2004). Pro měření OD byl použit přístroj BioPhotometr (firma Eppendorf) využívající plastové mikrokivety s minimálním objemem pro měření 50 μl . Při jednotlivých měřeních bylo z pokusných systémů odebíráno 0,5 ml bakteriální suspenze. Doplňkově byla měřena absorbance čistého media a směsi medium-nafta, aby mohla být provedena korekce hodnot naměřených během další práce.

V každém kroku byla absorbance pro jednotlivé systémy proměřována třikrát. Z těchto hodnot pak byla jako aritmetický průměr vypočtena hodnota optické denzity charakterizující systém v daném odběrovém termínu. Pokud se jedna ze tří naměřených hodnot absorbance lišila od průměru zbývajících dvou o více než 30 %, byla ze souboru dat vypuštěna. Hodnota OD reprezentující hodnotu studované proměnné v grafech a ve výsledcích byla vypočtena jako aritmetický průměr průměrných hodnot OD pro každý z trojice pokusných systémů. Pro názornost je postup při získávání dat a jejich následném

hodnocení znázorněn takto:

studované proměnné.....	různý počet
počet systémů	3 na jednu hodnotu studované proměnné
hodnota charakterizující jeden systém v daném čase.....	Ø z 3-násobného měření absorbance
hodnoty charakterizující proměnnou ve výsledných grafech.....	Ø z hodnot získaných pro jednotlivé systémy

Před zahájením pokusů studujících růstové křivky byla pokusně stanovena závislost odezvy absorbance na hustotě bakteriální suspenze. V tomto případě byl počet bakterií, odpovídající určité absorbanci suspenze, stanoven metodou fluorescenční mikroskopie stejným způsobem, jaký byl použit v případě studie kvantifikující biodegradaci.

4.6. Výběr bakteriálního kmene s nejlepšími růstovými vlastnostmi

Ze čtyř kmenů, které byly k dispozici, byl vybrán jeden kmen s nejlepšími růstovými schopnostmi ve smyslu rychlosti a setrvalosti růstu. Výběr vycházel z předpokladu, že kmen vykazující lepší růstové schopnosti s naftou jako jediným zdrojem uhlíku bude neefektivnější při degradaci nafty a nejvhodnější pro další pokusy a případné využití v praxi. Tomuto předpokladu odpovídají i výsledky prací Mukherji et al. (2004) a Vieira et al. (2007), ve kterých byl rozsah utilizace ropných uhlovodíků mikroorganismy závislý na intenzitě bakteriálního růstu a jejich biomase. Výběr kmene byl proveden na základě několikanásobného výběrového testu s délkou trvání 10 dní.

4.7. Fyziologické charakteristiky vybraného bakteriálního kmene

4.7.1. Optimalizace kultivace

Před započítím pokusů byla změřena růstová křivka vybraného kmene a posouzen průběh růstu a délka exponenciální fáze růstu. Všechny následující pokusy byly na základě těchto zjištění inokulovány uprostřed exponenciální růstové fáze, což odpovídalo zhruba 40-70 hodinám po přeočkování inokula z pevného agaru do tekutého media. Dále byla provedena série pokusů za účelem optimalizace kultivace kmene. Tyto testy zahrnovaly: a) optimalizaci složení růstového media, b) posouzení vlivu koncentrace nafty v mediu na intenzitu růstu, c) posouzení vlivu substrátu použitého při kultivaci inokula (nafta ~ glukóza) na další růst kultury během pokusů v mediu s naftou, glukózou nebo oběma zdroji uhlíku.

Na pracovišti VŠCHT Praha bylo při práci s bakteriálními kmeny diskutovanými v této práci používáno basalt salt medium (BSM). To bylo použito i při výběru kmene, kterým se tato studie dále zabývá (viz. odd. 3.6.). Před další prací s tímto kmenem byly vyzkoušeny tři jiné alternativy medií za účelem optimalizovat minerální složení živného roztoku. Kompozice alternativních medií byly převzaty z prací zabývajících se biodegradací ropných uhlovodíků (Machín-Ramírez et al. 2007 – medium 1, Quan et al. 2004 – medium 2, Mukherji et al. 2004 – medium 3). Složení medií je uvedeno v Tab.1.

Tab. 1
Složení různých variant minerálních medií

	koncentrace [g/l]			
	medium 1	medium 2	medium 3	BSM
KH_2PO_4	1,3	0,84	0,17	0,17
K_2HPO_4		0,983	0,435	0,13
NH_4Cl	0,5		0,85	
Na_2HPO_4	2,1		0,668	
NaCl_2		0,06		
$\text{CaCl}_2 * 2\text{H}_2\text{O}$		0,06	0,0275	0,00026
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		0,48		0,71
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$				
$\text{MgSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	0,11	0,0255	
$\text{FeSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	0,0239	0,0132	0,00025	0,0006
$\text{MnSO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$		0,000034		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$		0,000035		0,0002
$\text{CuSO}_4 * 5\text{H}_2\text{O}$		0,000019		
$\text{CoCl}_2 * 7\text{H}_2\text{O}$		0,000366		
$\text{ZnSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$		0,0001		
H_3BO_3		0,0003		
$\text{MgCl}_2 * 7\text{H}_2\text{O}$				0,34
$\text{MnCl}_2 * 4\text{H}_2\text{O}$				0,0001
glukóza *				10
pH	6,6	7,1	7,3	7

* glukóza byla použita jen v některých případech

Druhý faktor zahrnutý mezi optimalizační pokusy byl vliv koncentrace nafty v mediu na růst kultury. Vzhledem k hydrofobní povaze nafty probíhá její utilizace na povrchu mikroskopických kapének, tzv. micel, jejichž tvorba je podněcována jak třepáním pokusného media, tak produkcí povrchově aktivních látek bakteriální biomasou

(Singh et al. 2001). Množství utilizované nafty i množství energie a uhlíku využitelných pro růst je proto závislé na celkové ploše rozhraní mezi vodnou a organickou fází. Při pokusu byl proto hodnocen růst inokula v BSM mediu s 0,25%, 1% a 2% koncentrací nafty (v/v).

Případný vliv použití odlišných zdrojů uhlíku (nafta ~ glukóza) při přípravě inokula na růst kultury během pokusných kultivací byl testován pokusem, jehož design je pro přehlednost uveden v Tab.2. Jsou zde zahrnuty všechny kombinace využití nafty nebo glukózy během kultivace inokula i následné pokusné kultivace, aby bylo možné posoudit, který způsob získávání inokula a jeho použití je nejvýhodnější.

Tab. 2

Experimentální design - vliv zdroje uhlíku na kultivaci inokula a jeho růst během pokusu

zdroje uhlíku*

inokulum	pokus	počet systémů	počet slepých stanovení
n	g	3	1
g	g	3	1
n	g + n	3	1
g	g + n	3	1
g	n	3	1
n	n	3	1

* n...nafta, g...glukóza, n + g...směs nafty a glukózy

4.7.2. Stanovení optimálních podmínek pro růst vybraného bakteriálního kmene

Aktivita bakteriální kultury v různých podmínkách prostředí, jako pH, salinita, teplota, různé koncentrace živin nebo přítomnost těžkých kovů, je určující pro posuzování míry využitelnosti daného bakteriálního kmene. Kultury vybraného kmene byly kultivovány v gradientech všech výše zmíněných podmínek. Vliv testovaných proměnných na bakteriální biomasu byl hodnocen podle růstových křivek.

Úpravy pH na požadované hodnoty byly provedeny pomocí KOH a H₂SO₄. Vzhledem k širokému rozmezí pH různých typů půd byly testovány následující hodnoty pH: 4,5, 5,5, 6,3, 7 a 8. Při posuzování efektu salinity na růst inokula byla připravena media obohacená o NaCl v hmotnostních koncentracích 0 %, 0,5 %, 1,5 % a 4,5 %. Vliv teploty na rychlost bakteriálního růstu byl posouzen za účelem porovnání aktivity při teplotě blízké půdnímu prostředí s růstem při laboratorní teplotě. Průběh růstu byl sledován

při teplotách 10 ± 1 °C a 21 ± 2 °C.

Stanovení nároků na živiny bylo provedeno porovnáváním růstových křivek bakteriálních kultur v mediích s upravenými molárními poměry dvou základních limitujících prvků, dusíku a fosforu. Molární poměry těchto prvků byly upravovány nad a pod úroveň základního média (N/P = 2,54:1) dvěma způsoby. Při prvním pokusu byla navyšována koncentrace dusíku, přičemž koncentrace fosforu zůstala shodná se základním médiem, ve druhém případě byla snižována koncentrace fosforu, zatímco koncentrace dusíku se oproti základnímu mediu nezměnila. V prvním případě byly při pokusu s ohledem na literární zdroje (Mukherji et al. 2004) testovány molární poměry N/P v mediích 1,25:1, 4:1, 8:1, 15:1 a 25:1. Ve druhém případě byly testovány molární poměry N/P 1,25:1, 5:1, 10:1, 20:1 a 40:1. Poměr N/P základního média byl kvůli srovnání přítomen v každém z experimentů. Jako zdroje dusíku i fosforu v roztoku byly použity shodné soli jako v původním mediu, tedy NH_4Cl , K_2HPO_4 a KH_2PO_4 .

Dopad případné kontaminace remediované půdy těžkými kovy na růst kultury byl simulován obohacením růstového média o soli těžkých kovů Co, Pb, Cu, Cr. Pokus byl doplněn o Fe a Mn jako kovy běžně se vyskytující ve vyšších koncentracích v podzemních vodách. Cílové koncentrace těžkých kovů byly zvoleny podle kritérií zakotvených v Metodickém pokynu odboru pro ekologické škody (MŽP 1996). Pro pokus byly vybrány koncentrace spadající pod kritérium B. To je definováno jako přibližný průměr koncentrací rovnajících se přirozeným obsahům těchto látek v přírodě (kritérium A) a koncentrací těchto látek, které představují znečištění znamenající významné riziko ohrožení zdraví člověka a složek životního prostředí (kritérium C) (MŽP 1996). Hodnoty kritérií pro vybrané těžké kovy jsou shrnuty v Tab. 3. V případě Fe a Mn, které nejsou monitorovány jako rizikové kovy, byla koncentrace zvolena jako desetinásobek limitních koncentrací pro užitkové vody na 3 mg/l respektive 2 mg/l. K dosažení požadovaných koncentrací kovů v mediích byly použity následující soli: $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Tab. 3

Limitní koncentrace vybraných kovů v podzemních vodách

kovy	kritéria		
	A µg/l	B µg/l	C µg/l
Co	20	100	200
Pb	20	100	200
Cu	20	200	500
Cr ⁺⁶	1	35	75
Fe ⁺² *		3000	
Mn ⁺² *		2000	

tučně tištěné hodnoty představují koncentrace kovů použité v práci

*.....nejsou monitorovány jako rizikové prvky

4.8. Analýza a kvantifikace procesu biodegradace nafty

Pokus byl rozdělen do dvou částí podle způsobu, jakým byly získány pokusné kultury. V prvním případě byla kultivací inokula v mediu s obsahem glukózy získána čistá kultura o koncentraci buněk řádově 10^8 na 1 ml. Ve druhém případě bylo nejprve vyprodukováno inokulum v mediu obsahujícím naftu jako jediný zdroj uhlíku. Pět mililitry této kultury byly před započítáním pokusu inokulovány pokusné systémy. Poté byla do takto připravených systémů přidána nafta (1% celkového objemu). Pro odstranění vlivu nafty, jež mohla být do pokusu zanesena s inokulem, bylo provedeno trojnásobné stanovení obsahu nafty v 5 ml inokula použitého pro založení pokusu. Od výsledků analýz extraktů byla získaná hodnota odečtena.

4.9. Extrakce a analýza extraktů

Extrahován byl vždy celý objem pokusných systémů. Bakteriální biomasa byla před extrakcí v roztoku ponechána, aby nedošlo k nadhodnocení výsledků důsledkem adsorpce kapének nafty na pelety bakteriální biomasy, pokud by byla biomasa z roztoku odstraněna centrifugací.

Použitým extrakčním činidlem byl dichlormethan pro GC (Merck). Extrakce sestávala z přelití celého extrahovaného objemu do děličky a následného čtyřnásobného vytřepávání (vždy po 15 ml) jak roztoku v děličce, tak i původní pokusné baňky, extrakčním činidlem. U systémů obsahujících bakteriální suspenzi předcházela vytřepávání 10 minutová sonikace ve vodní lázni, aby byla zajištěna maximální výtěžnost extrakcí.

Filtraci organické fáze přes vyžíhaný síran sodný následovalo odpaření veškerého extrakčního činidla na vakuové odparce. Odpařování bylo prováděno za pokojové teploty. Takto získané vzorky nafty byly naředěny 8 ml toluenu, převedeny do vialek a uchovávány při teplotě 4°C do doby, než byly analyzovány.

Chromatografické analýzy byly prováděny metodou GC-FID na přístroji HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II. Při měření byla použita kolona pro plynovou chromatografii Zebron ZB-5MS od firmy Phenomenex® s těmito parametry: délka = 30 m, vnitřní průměr = 0,25mm (df = 0,25 μm).

Teplotní program optimalizovaný pro analýzy vzorků nafty měl následující průběh: 60 °C → 15 °C/min → 200 °C → 7,5 °C/min → 275 °C. Po každé analýze se osvědčilo navýšit teplotu kolony během promývání nosným plynem (He) na 300 °C po dobu 10 min. Tím byly z kolony vymyty všechny nečistoty a dařilo se držet vysoký standard opakovatelnosti měření.

4.10. Posuzování míry degradace

Chromatogramy získané analýzou extrahovaných vzorků byly vyhodnoceny pomocí programu Clarity, který je dodáván k přístrojovému vybavení pro GC-FID firmou DataApex. Program poskytuje kromě automatické integrace plochy jednotlivých chromatografických píků také možnost integrovat vybrané úseky chromatogramu manuálně, podle potřeby. Této možnosti bylo využito v případě posuzování degradace nafty uvedené v této práci. Při hodnocení byla integrována plocha chromatogramu s elučním časem 2,3 až 19,7 minuty. Tento údaj byl brán jako ukazatel celkové koncentrace nafty ve vzorku.

Míra degradace nafty byla ve studii posuzována také podle diagnostických poměrů $n\text{-C}_{17}$ /pristan a $n\text{-C}_{18}$ /phytan (viz. odd. 2.2.3.). Také v tomto případě byly píky příslušných uhlovodíků ručně integrovány. Při hodnocení byla brána výška těchto píků jako přímí ukazatel koncentrace dané látky ve vzorku.

Identifikace jednotlivých chromatografických píků n -alkanů byla provedena pomocí standardu dodekanu ($n\text{-C}_{10}$) a hexadekanu ($n\text{-C}_{16}$). Standardy těchto uhlovodíků byly nejprve analyzovány jednotlivě a poté metodou vnitřního standardu, kdy byly přidány do vzorku nafty.

4.11. Statistické hodnocení dat

K hodnocení získaných dat byl použit program Statistica 8. Posuzování rozdílnosti růstových křivek v rámci jednotlivých pokusů bylo prováděno pomocí metody „Repeated measures ANOVA“. Při uvádění výsledků těchto analýz jsou v textu uváděny údaje o hladině významnosti „p“ a počet stupňů volnosti „df“. Test byl považován za průkazný, pokud bylo dosaženo hladiny významnosti 0,05 a nižší. V případě posuzování vlivu substrátu použitého při kultivaci inokula (nafta ~ glukóza) na další růst kultury v mediu s naftou, glukózou nebo oběma zdroji uhlíku (viz. odd. 3.7.1) byla k hodnocení dat použita metoda „Factorial ANOVA“, tzv. dvoucestná ANOVA. V některých případech byly tyto statistiky doplněny o mnohorozměrné porovnání dat provedené v rámci použitých statistických metod, což poskytuje možnost rozdělení různých alternativ pokusu (např. různé hodnoty pH) do statisticky navzájem odlišných skupin. O rozdělení do skupin podle vzájemné podobnosti se zde rozhoduje na základě hodnoty „DV mean“ („průměrná odchylka“).

5. Výsledky

5.1. Identifikace kmenů metodou Sherlock

Metodou Sherlock se podařilo identifikovat kmeny A, B a C, kmen D na metodou předepsaném agaru nerostl. Oběma provedenými postupy extrakcí buněčných mastných kyselin bylo dosaženo shodných výsledků analýz. Kmeny byly identifikovány následovně: kmen A – *Bacillus cereus* (SI = 0,71), kmen B – *Rhodococcus erythropolis* (SI = 0,756), kmen C – *Rhodococcus erythropolis* (SI = 0,529). Vzhledem k hodnotám indexu podobnosti uvedeným v závorkách se jedná o spolehlivé a průkazné výsledky. Pouze u kmene C je hodnota indexu nižší, nicméně stále v rozsahu, který indikuje dobrou shodu s mikroorganismy vedenými v databázi vytvořené pro účely metody Sherlock (MIS Operating Manual 2008).

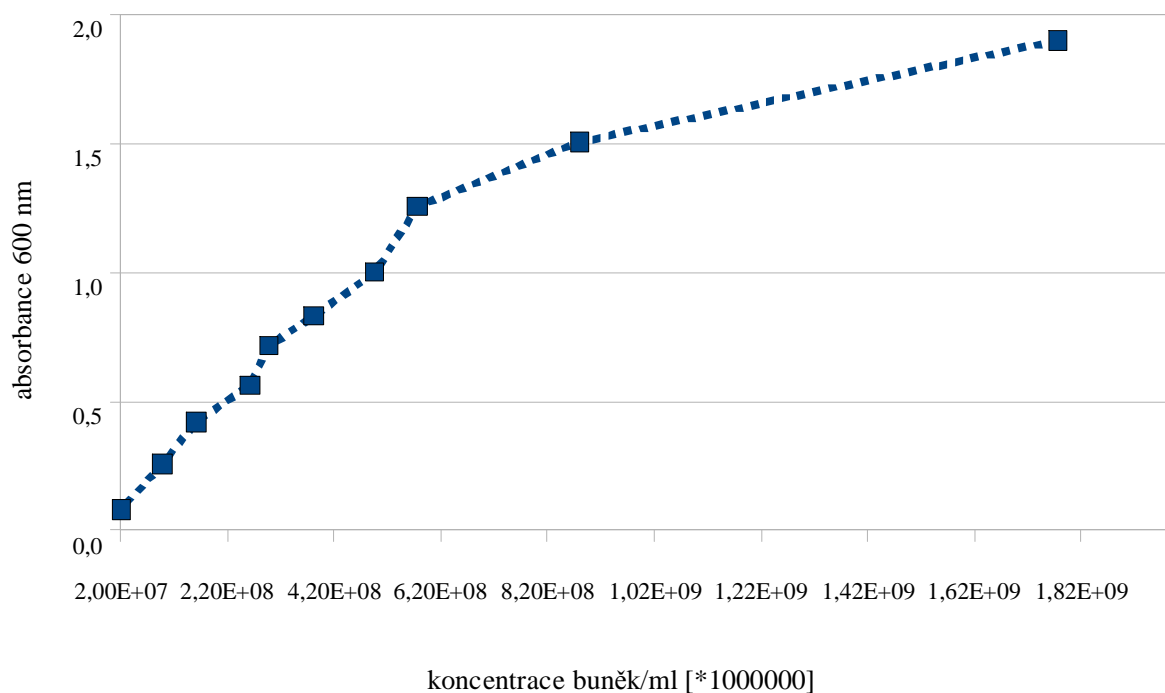
5.2. Výběr kmene s nejlepšími růstovými schopnostmi

Během výběrových kultivací bylo u všech kmenů dosahováno podobného průběhu růstu, odlišnosti se vyskytly hlavně v maximálních hodnotách absorbance, kterých bylo během pokusu dosahováno. To platilo zejména o kmeni *Bacillus* sp. (kmen D), který rostl výrazně méně než zbylé tři kmeny. Tento kmen byl také jediný, jehož růst byl po vzájemném porovnání statisticky významně odlišný od růstu zbylých tří kmenů.

Kmeny s pracovním označením A, B a C (neidentifikovaný kmen, *Achromobacter xylosoxidans* a *Bacillus mycoides*) nebyly po vzájemném porovnání růstových křivek statisticky významně odlišné ($p = 0,789$, $df = 2,6$), na základě průběhu růstu a rovnoměrných výsledků během všech pokusů byl však pro další práci vybrán kmen *Achromobacter xylosoxidans*. Všechny další výsledky prezentované v této studii se vztahují k tomuto kmeni.

5.3. Korelace optické denzity s koncentrací bakteriálních buněk

Jak je patrné z Obr. 4, absorbance bakteriální suspenze poměrně dobře koresponduje s koncentrací bakteriálních buněk v kultuře. Až do hodnot optické denzity kolem 1,3 lze považovat závislost mezi koncentrací buněk a absorbancí kultury za lineární. Při vyšších hodnotách OD bakteriální suspenze než 1,3 přestává být vztah lineární a při interpretaci výsledků by mohlo dojít k mírnému nadhodnocení výsledků. I tak nicméně



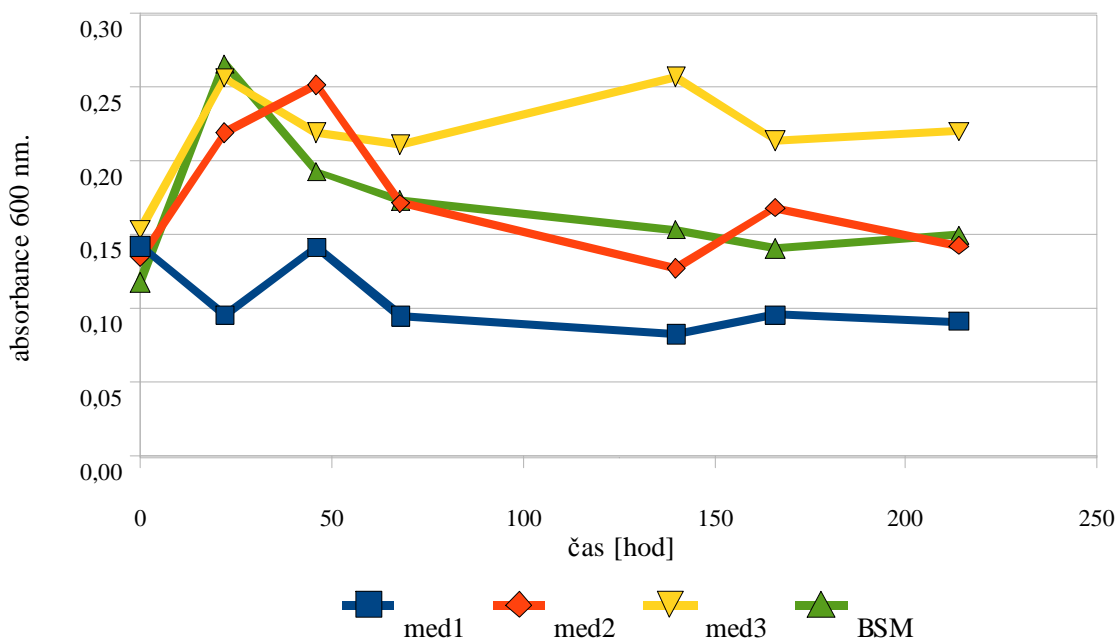
naměřené hodnoty OD dobře korelují s koncentrací buněk v kulturách.

Obr. 4 Korelace optické denzity s koncentrací bakteriálních buněk v kultuře kmene *Achromobacter xylosoxidans*.

5.4. Optimalizace kultivace

5.4.1. Optimalizace složení kultivačních medií.

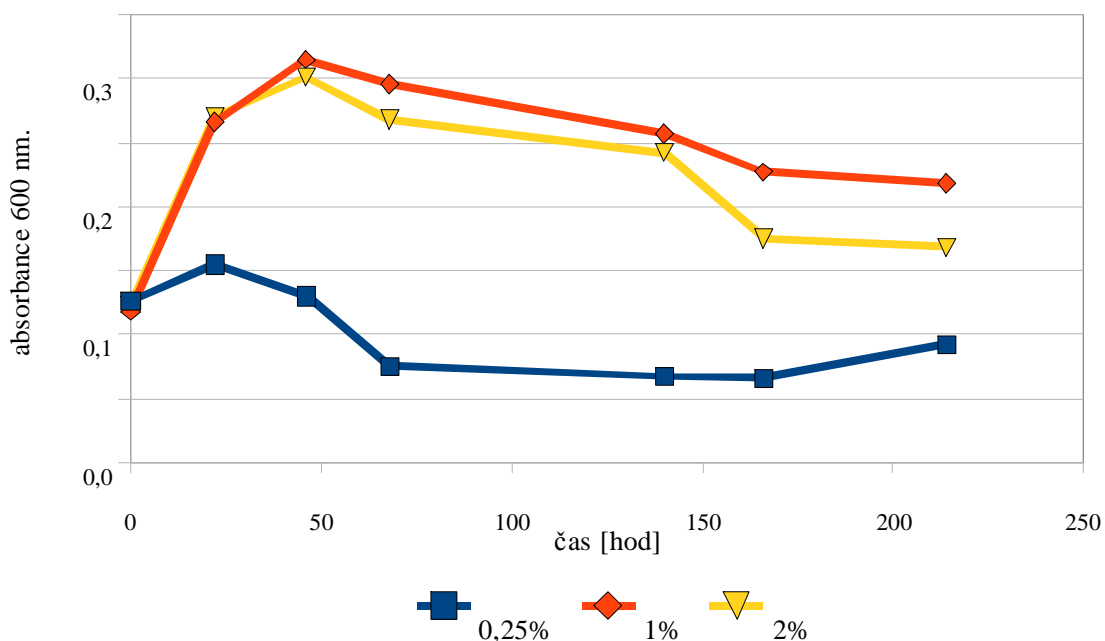
Srovnání růstových křivek kultur ve čtyřech vybraných kultivačních mediích je znázorněno na Obr. 5. Kromě media 1 došlo ve zbylých třech mediích k poměrně rychlému navýšení optické denzity na 2,5 násobek hodnot z počátku pokusu (z OD 0,12 na OD 0,27). U medií 2 a BSM byl po cca 50 hodinách kultivace nárůst následován poklesem až na počáteční hodnoty. Jediným mediem, v němž byly hodnoty absorbance bakteriální suspenze vyrovnané po celou dobu pokusu, bylo medium 3. Toto medium bylo také použito pro všechny další kultivace provedené v této studii. Rozhodnutí použít medium 3 bylo také podpořeno statistickým vyhodnocením pokusu. Rozdílnost mezi medii byla vysoce prokazatelná ($p = 0,0000$, $df = 3,6$), z mnohonásobného porovnání medií vzešly dvě skupiny, první tvořená mediem 1 a druhá, zahrnující zbylá tři media. Ve druhé skupině se potom od zbylých dvou lišilo nejvíce právě medium 3 (DV mean pro medium 3 = 0,21, pro medium 2 = 0,176, pro BSM = 0,173, pro medium 1 = 0,106).



Obr. 5 Průběh růstových křivek v závislosti na složení použitého media

5.4.2. Vliv koncentrace nafty v živném mediu na růst kultury

Vyhodnocením pokusu byl potvrzen vliv celkové koncentrace přidaného hydrofobního substrátu (nafty) na následný růst optické denzity kultur. Jak je patrné z Obr. 6, přidavek malého množství nafty (0,25 % v/v) do živného media limituje růst biomasy.



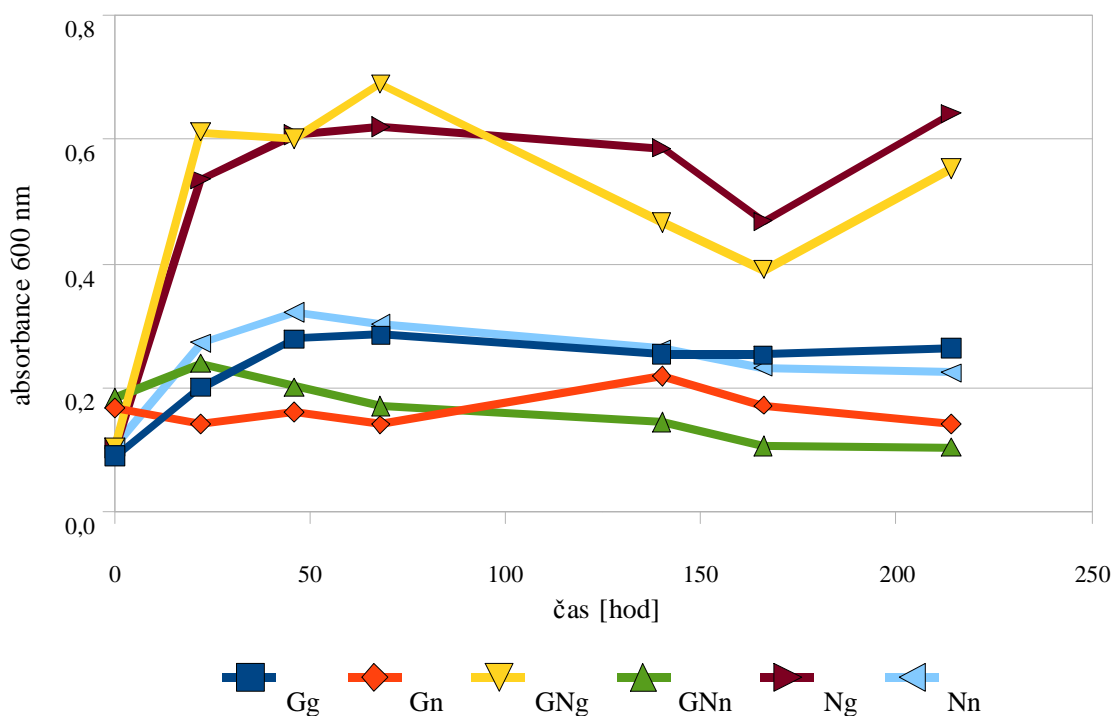
Obr. 6 Vliv koncentrace nafty na růst kultur v živném mediu

Doplnění media o naftu na koncentraci 1 % a 2 % (v/v) navýšilo rychlost a inten-

zitu růstu biomasy. Při těchto dvou koncentracích probíhal růst prakticky souběžně až do 150. hodiny trvání pokusu, poté došlo u medií s nejvyšší koncentrací nafty k mírnému poklesu OD.

5.4.3. Optimalizace kultivace a inokulace

Na Obr. 7 znázorňujícím výsledky tohoto pokusu jsou patrné dvě skupiny růstových křivek. Kultury vykazující intenzivní růst, zobrazené v horní části grafu, mají jeden společný ukazatel – inokulum bylo kultivováno v mediu obsahujícím glukózu a v pokusném mediu byla obsažena nafta. Ve spodní skupině růstových křivek lze odlišit křivky kultur, které byly kultivovány před inokulací i během pokusné kultivace v mediu se shodným substrátem (Gg nebo Nn), od křivek kultur, jejichž inokulum bylo kultivováno s naftou jako jediným substrátem. Růstové křivky prvně jmenovaných kultur se od zbylých dvou liší výraznějším nárůstem optické denzity během prvních 50 hodin kultivace a vyrovnaným průběhem absorbance po zbytek pokusu.



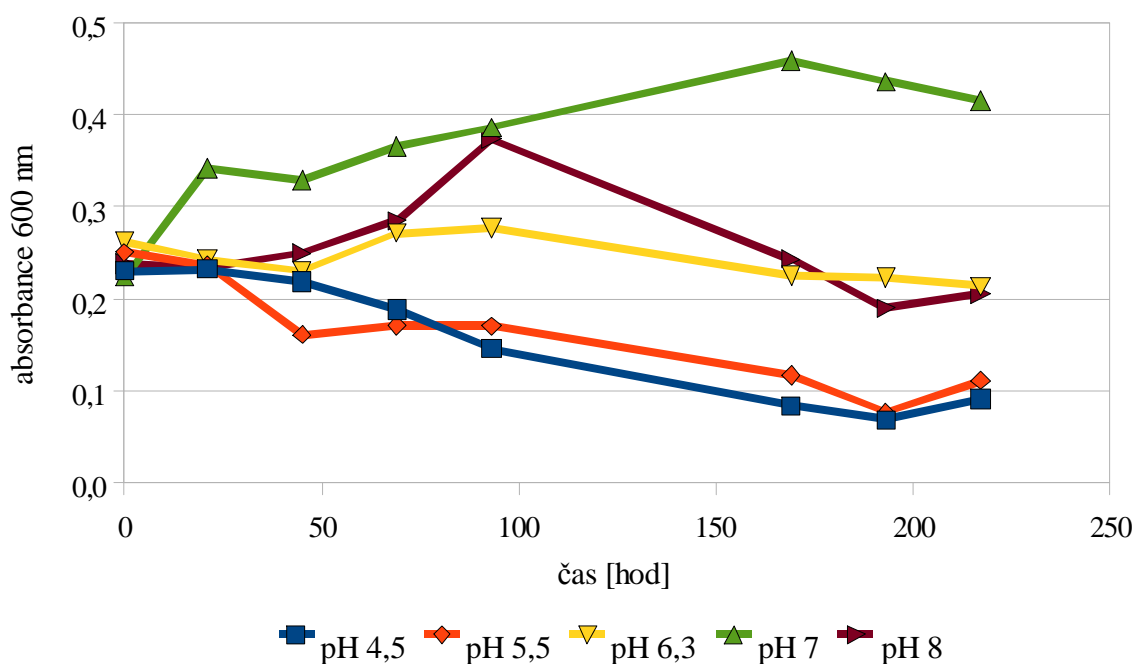
Obr. 7 Růst pokusných kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* v závislosti na typu substrátu použitého během přípravy inokula a během následné pokusné kultivace. Velká písmena v legendě označují typ substrátu použitého během pokusu (G-glukóza, N-nafta, GN-glukóza i nafta souběžně), malá písmena označují typ substrátu použitého během kultivace inokula (g-glukóza, n-nafta).

Statistické hodnocení pokusu mnohonásobným porovnáním potvrdilo předešlé závěry a rozdělilo pokusné alternativy do dvou skupin. V jedné skupině byly kultury, které vzešly z inokula vykultivovaného na naftě a které byly během pokusu kultivovány s jiným substrátem než tomu bylo u inokula (růstové křivky označené Gn a GNn). Zbylé růstové křivky (Gg, Nn, GNg a Ng) byly ve druhé, od první statisticky odlišné, skupině.

5.5. Růst bakteriální kultury při simulaci vybraných podmínek prostředí – vymezení optimálních růstových podmínek

5.5.1. Efekt pH

Z testovaných hodnot pH byl nejvýraznější růst patrný v mediu s pH 7. Při této hodnotě byl nárůst absorbance bakteriální suspenze nejrychlejší i nejvyrovnanější, k útlumu růstu došlo až po cca 180 hodinách kultivace. Při pH 8 byl růst zpočátku pozvolný, vyvrcholil cca po 100 hodinách kultivace, pak ale došlo k výraznému a trvalému propadu absorbance. Hraniční hodnotou, při které nedošlo k prakticky žádnému nárůstu, bylo pH 6,3. Obě dvě hodnoty pH v kyselé oblasti (pH 5,5 a 4,5) inhibovaly růst a během celé doby kultivace byl zaznamenán pokles absorbance. Růstové křivky kultur v mediích s různým pH jsou zachyceny na Obr. 8.

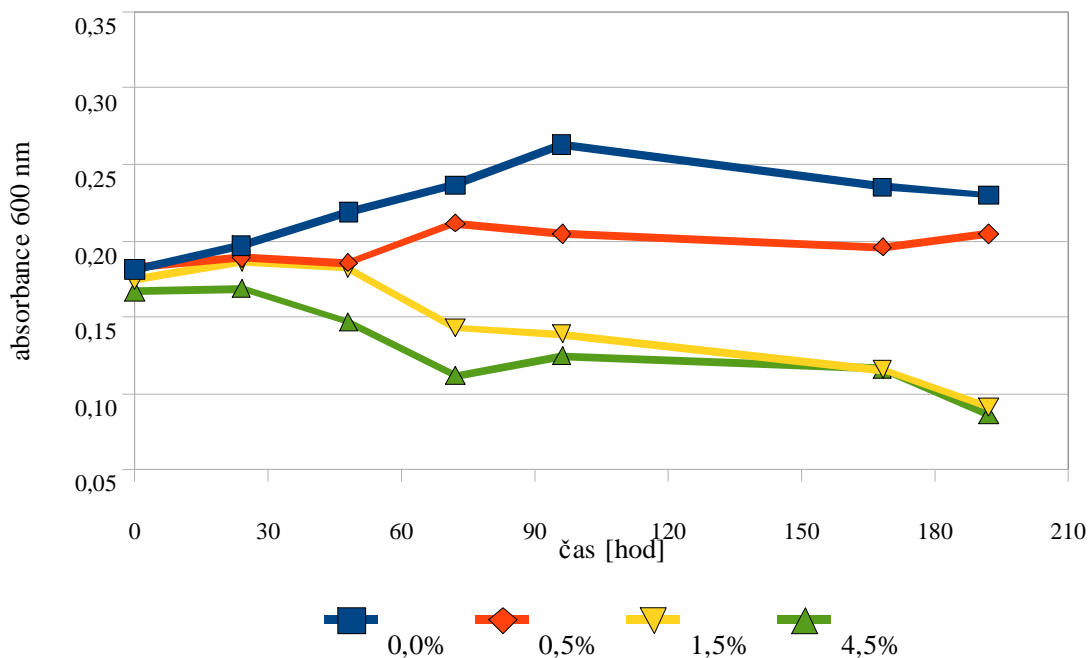


Obr. 8 Růstové křivky kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* při kultivaci v mediích s upraveným pH.

Statistický test vysoce průkazně ($p = 0,000031$, $df = 4,7$) potvrdil vliv pH na průběh růstu absorbance kultur. Mnohonásobné porovnání rozdělilo hodnoty pH do dvou navzájem odlišných skupin, první tvořily hodnoty v kyselé oblasti pH 4,5 a 5,5 (DV mean pro pH 5,5 = 0,164, pro pH 4,5 = 0,208), druhou zbylé tři hodnoty pH (DV mean pro pH 6,3 = 0,24, pro pH 8 = 0,243 a pro pH 7 = 0,258).

5.5.2. Efekt salinity

Efekt solí přidaných do kultivačních medií začal být dobře patrný cca po 50 hodinách kultivace, kdy došlo k výraznému oddělení růstových křivek kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* pěstovaných bez NaCl nebo jen s minimálním přídavkem této soli a kultur s vyšší koncentrací NaCl v mediích. Zatímco kultury v mediích s vyšší koncentrací solí vykazovaly téměř okamžitý pokles absorbance, u kultur s nízkým obsahem solí (0,5 %) byl patrný růst. V mediích s nulovou salinitou byl rovnoměrný růst patrný po dobu cca 100 hodin, poté došlo k mírnému snížení optické denzity bakteriální suspenze. Růstové křivky kultur v mediích s různou salinitou jsou zachyceny na Obr. 9.



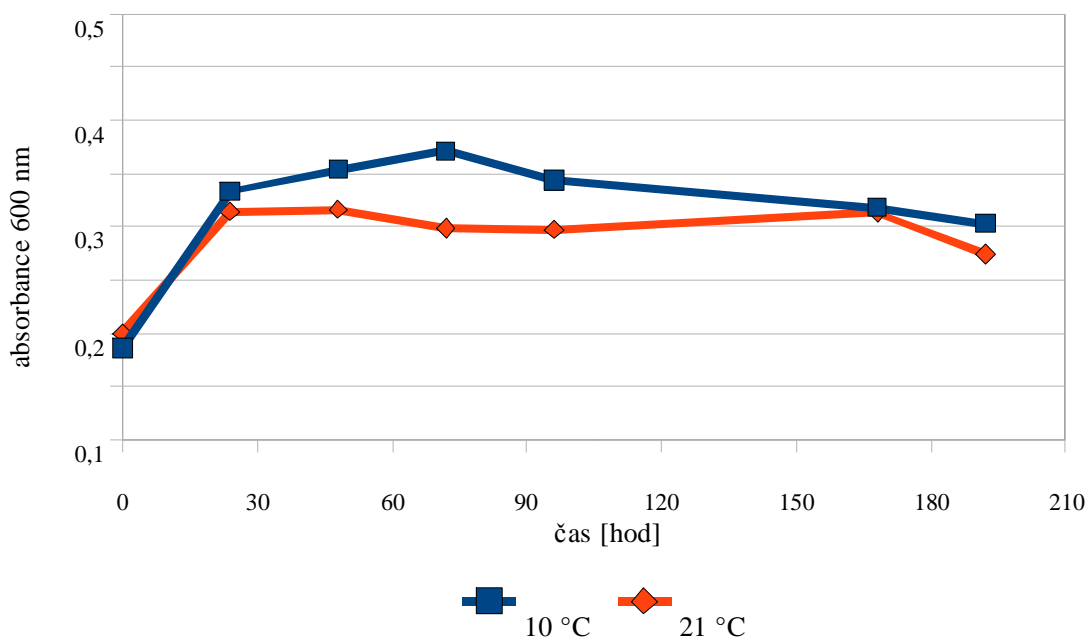
Obr. 9 Růstové křivky kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* při kultivaci v mediích s různou salinitou.

Statistické hodnocení pokusu vyšlo průkazně ($p = 0,00038$, $df = 3,6$), vliv salinity

byl tedy statisticky potvrzen. Podle očekávání byly kultury po mnohonásobném porovnání rozděleny do dvou skupin. Skupiny tvořily kultury kultivované v mediích se salinitou 0 % (DV mean = 0,211) a kultury kultivované v prostředí s 1,5% a 4,5% salinitou (DV mean = 0,147 respektive 0,131). Media s 0,5% koncentrací NaCl nebylo možné na základě mnohonásobného porovnání přiřadit ani do jedné ze skupin (DV mean = 0,171).

5.5.3. Efekt teploty

Při porovnání růstových křivek kultury kultivované při teplotě 10 °C a 21 °C (Obr. 10) je patrný shodný průběh růstu kultur. Proti očekávání nicméně došlo k výraznějšímu růstu u kultur pěstovaných při nižší teplotě. Tento rozdíl byl potvrzen i statistikou, o čemž svědčí hodnota $p = 0,018$ ($df = 1,6$).



Obr. 10 Vliv kultivační teploty na průběh růstu kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans*.

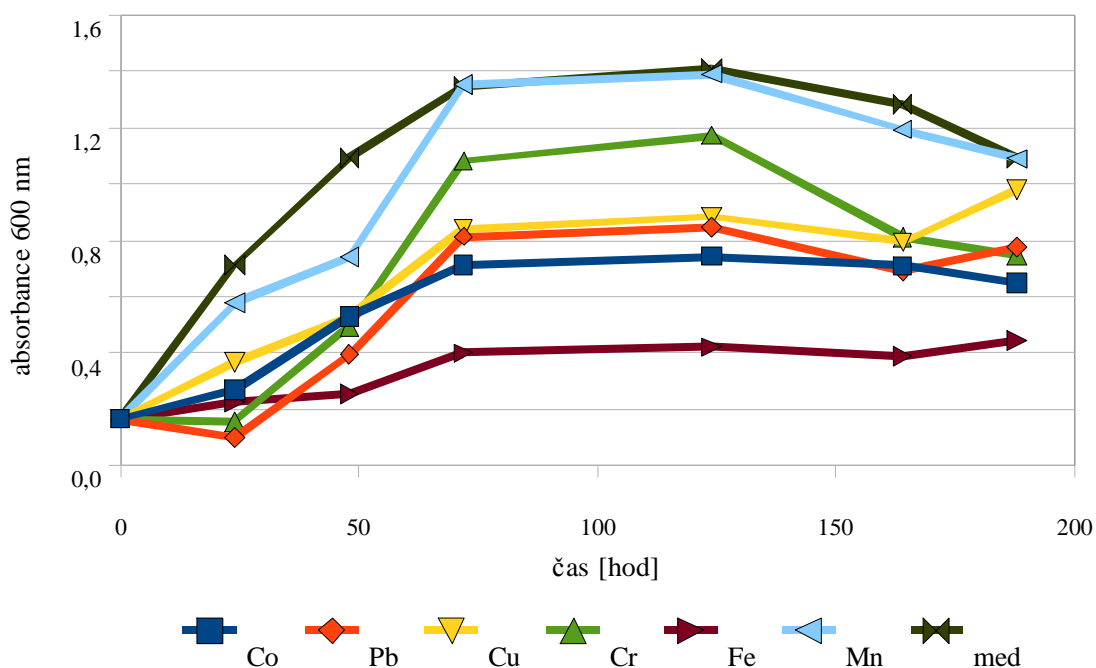
5.5.4. Efekt přidání kovů

Růst kultur v mediích s přidavkem solí Co, Pb, Cu i Cr byl ve srovnání s kontrolními kulturami, kultivovanými bez přidavku kovu, inhibován. Podobný průběh měl růst kultur v přítomnosti všech těchto kovů – pozvolný nárůst absorbance byl patrný po dobu cca 70 hodin, poté došlo ke stagnaci růstu a po zhruba 120 hodinách začala optická denzita klesat. Naměřené růstové křivky jsou graficky znázorněny na Obr. 11.

Růstové křivky v mediích obohacených o soli Fe a Mn vykazovaly odlišný charakter. Zatímco v případě manganu byl růst intenzivní a téměř totožný s růstem kultur

v kontrolním mediu, u kultur obohacených o Fe došlo k nejvýraznější inhibici růstu.

Vliv kovů na růst kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* vyšel vysoce průkazně ($p = 0,00000$, $df = 6,6$). Metoda mnohonásobného porovnání rozdělila testované kovy do čtyř skupin podle míry vlivu. Mn byl seskupen s kontrolním mediem (DV mean pro kontrolní medium = 0,983, DV mean pro Mn = 0,915) což svědčí o zanedbatelném vlivu tohoto kovu v dané koncentraci na růst kultury. V dalších dvojicích kovů s vlivem statisticky oddělitelným od vlivu ostatních skupin byly podle zvyšujícího se vlivu na růst kultur Cr a Cu respektive Co a Pb (DV mean pro tyto kovy = 0,646 a 0,638 respektive 0,526 a 0,528). Železo bylo podle výsledků pokusu prokazatelně nejvíce inhibujícím kovem (DV mean = 0,31).



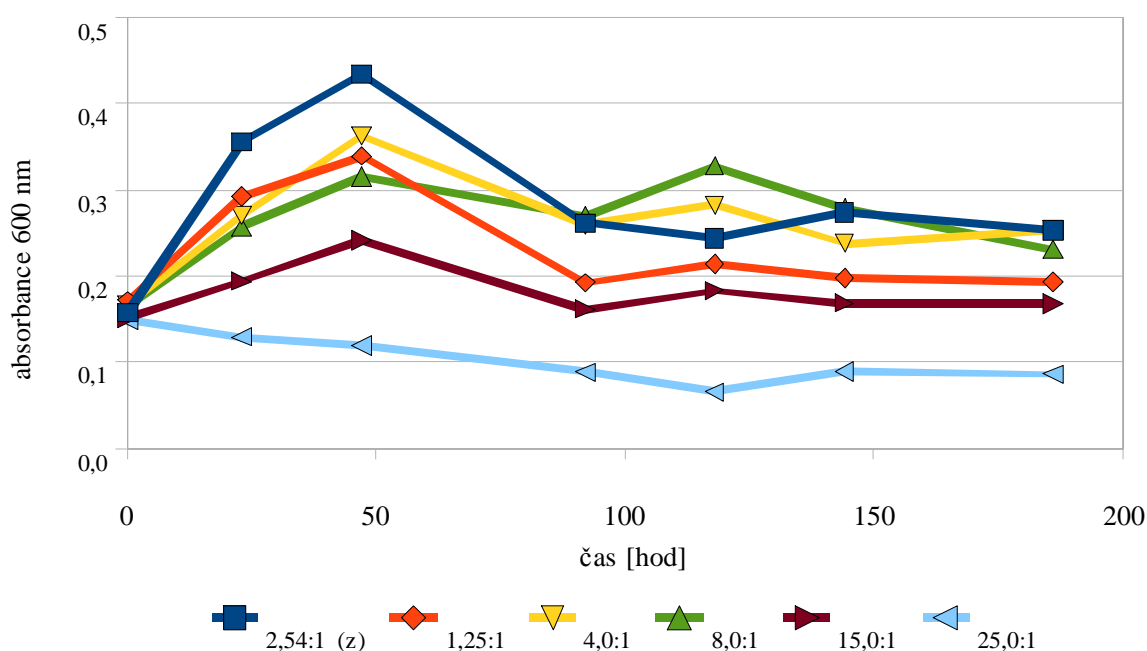
Obr. 11 Růst kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* v mediích obohacených o některé těžké kovy, železo a mangan.

5.5.5. Nároky na živiny

Laboratorní pokusy byly navrženy tak, aby bylo možné stanovit optimální poměr N/P a limitní koncentrace N či P, inhibující růst pokusných kultur. V první sérii pokusných kultivací byl upraven poměr N/P změnou koncentrace zdroje dusíku nad a pod poměr N/P v pokusném mediu. Podle Obr. 12, zachycujícího růstové křivky kultur v mediích s pozměněnými poměry N/P, je patrný vliv poměru hlavních živin na optickou denzitu bakteriální suspenze. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán u základního media s poměrem

N/P 2,54:1. U jediné pokusné alternativy s poměrem N/P pod úrovní základního media (N/P = 1,25:1) byl po počátečním nárůstu absorbance zaznamenán brzký propad, což může svědčit o nízké dostupnosti dusíku v mediu. U vyšších poměrů N/P 4:1 a 8:1 nedosáhl nárůst absorbance bakteriální suspenze takových hodnot jako u základního media, dosažené hodnoty se nicméně během dalšího průběhu pokusu výrazně nesnižovaly, zejména v případě poměru 8:1.

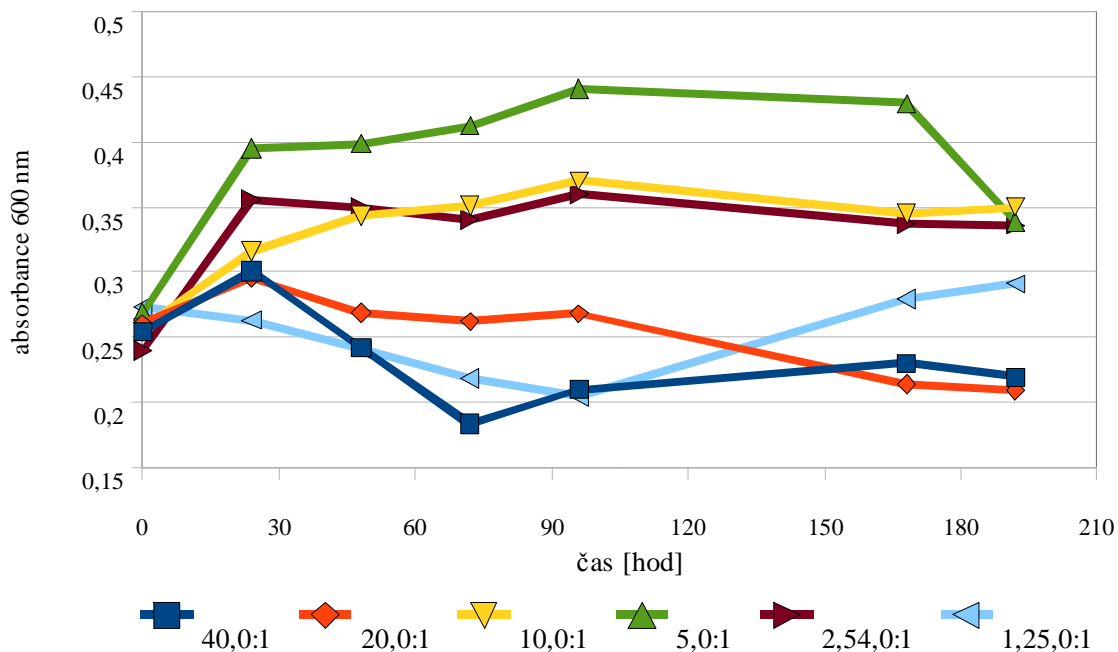
V případě poměru N/P 15:1 byl naměřen lehký nárůst absorbance následovaný propadem na inokulační hodnoty optické denzity. Nejvyšší poměr N/P vykazoval od počátku ve všech pokusných systémech propad absorbance.



Obr. 12 Průběhy absorbancí kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* naměřených v mediích s různými poměry N/P. Změny poměru bylo v mediích dosaženo zvyšováním koncentrace dusíku.

Vliv různých poměrů N/P v roztoku živných medií ovlivnil růst kultur, což je velmi dobře patrné z hodnoty hladiny významnosti $p = 0,0000$ vypočtené Statistikou při posuzování průběhu růstu v čase ($df = 5,6$).

Kromě navyšování poměru N/P pomocí zvyšování koncentrace zdroje dusíku byl také proveden pokus za účelem stanovení limitního poměru N/P snižováním koncentrace fosforečnanů pod úroveň základního media. Růstové křivky kultur v takto pozměněných živných mediích jsou znázorněny na Obr. 13.



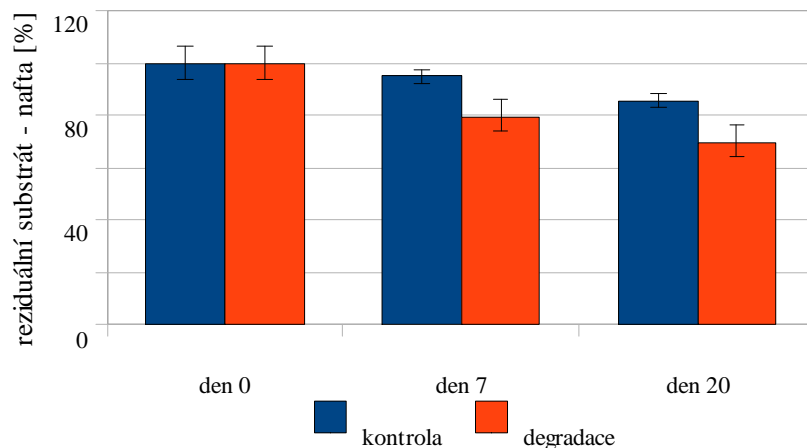
Obr. 13 Průběhy absorbancí kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* naměřených v mediích s různými poměry N/P. Změny poměru bylo v mediích dosaženo snížením koncentrace fosforu.

Z obrázku je patrné, že nejvýraznější a nejvyrovnanější růst byl dosažen při poměru N/P 5:1 následovaný poměry 2,54:1 a 10:1. Poměr 1,25:1 v mediu s největší nabídkou dusíku i fosforu vykazoval poněkud překvapivě pokles optické denzity, stejně jako tomu bylo u N/P 20:1 a 40:1. Statistické hodnocení vyšlo opět průkazně, hodnota $p = 0,00046$ potvrzuje hypotézu, že různé poměry N/P mají vliv na růst kultury.

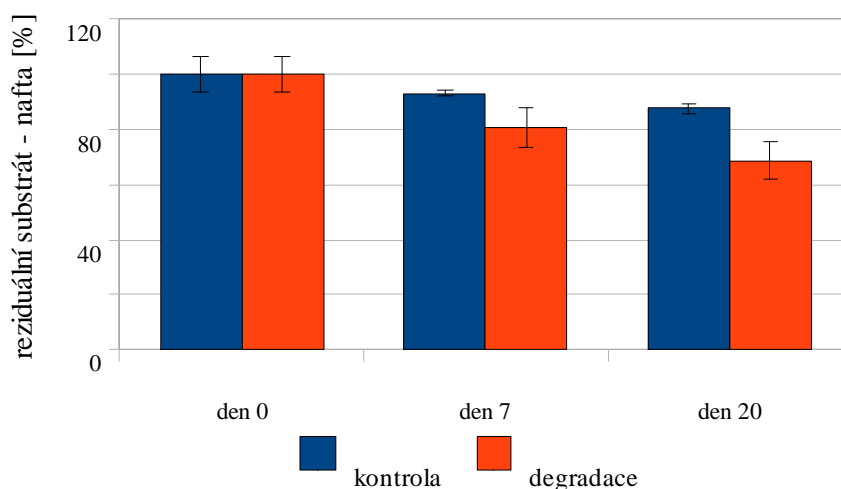
5.6. Biodegradační efektivita kmene *Achromobacter xylosoxidans*

5.6.1. Degradace nafty kulturou kmene *Achromobacter xylosoxidans*

Množství reziduální nafty během pokusu s naftou jako jediným substrátem je znázorněno na Obr. 14, množství reziduální nafty v pokusu, ve kterém byla nafta doplněna o glukózu je znázorněno na Obr. 15. Data reprezentují průměry z duplikovaných měření v případě kontrolních systémů respektive průměry z trojice měření v případě pokusných systémů, obsahujících bakteriální biomasu.

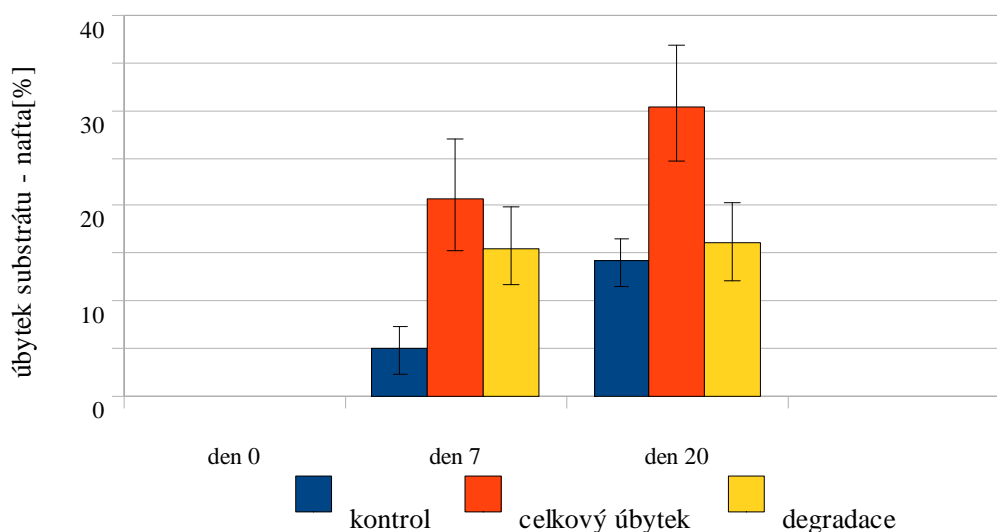


Obr. 14 Degradace nafty v mediu s absencí alternativního substrátu

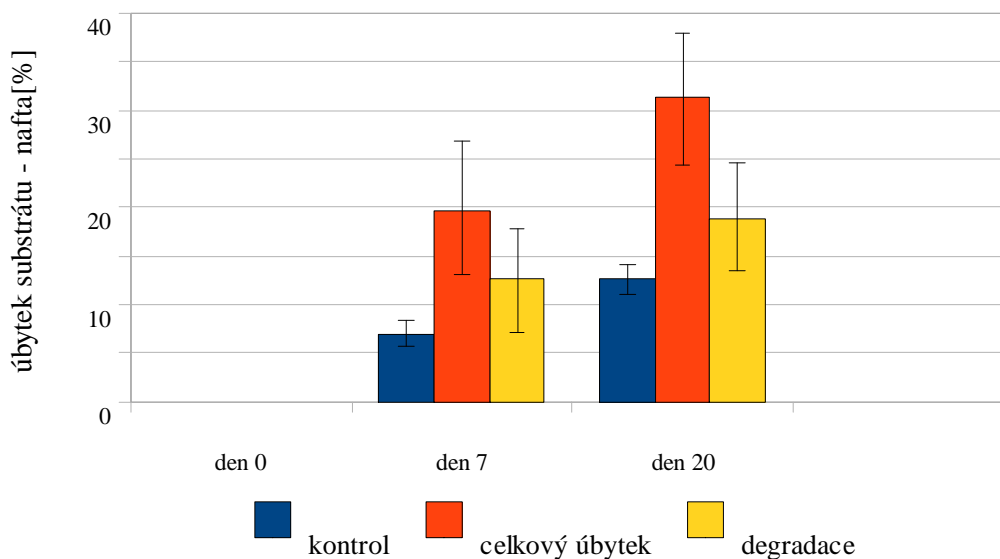


Obr. 15 Degradace nafty v mediu s glukózou jako alternativním substrátem.

V obou grafech je pomocí chybových úseček vyznačen rozsah minimálních a maximálních naměřených hodnot. Jak znázorňují Obr. 16 a 17, v obou dvou případech byl zjištěný úbytek nafty podobný. V případě media bez doplňkového substrátu bylo po 7 a 20 dnech pokusu degradováno bakteriální biomasou 15,6 % respektive 16 % z celkového množství dodané nafty. Pokusné kultury kultivované v mediu s glukózou i naftou degradovaly po 7 a 20 dnech pokusu 12,7 % respektive 18,7 % z dodaného množství nafty. Průběžný vývoj degradace v odběrových termínech je dobře patrný z kombinovaných chromatogramů v příloze (Příloha I a II).



Obr. 16 Kvantifikace úbytku nafty abiotickými ztrátami, celkového úbytku nafty (zahrnuje abiotické ztráty i degradaci) a čistého úbytku zapříčiněného degradací. Graf zobrazuje výsledky kultivace kmene *Achromobacter xylosoxidans* s naftou jako jediným růstovým substrátem.

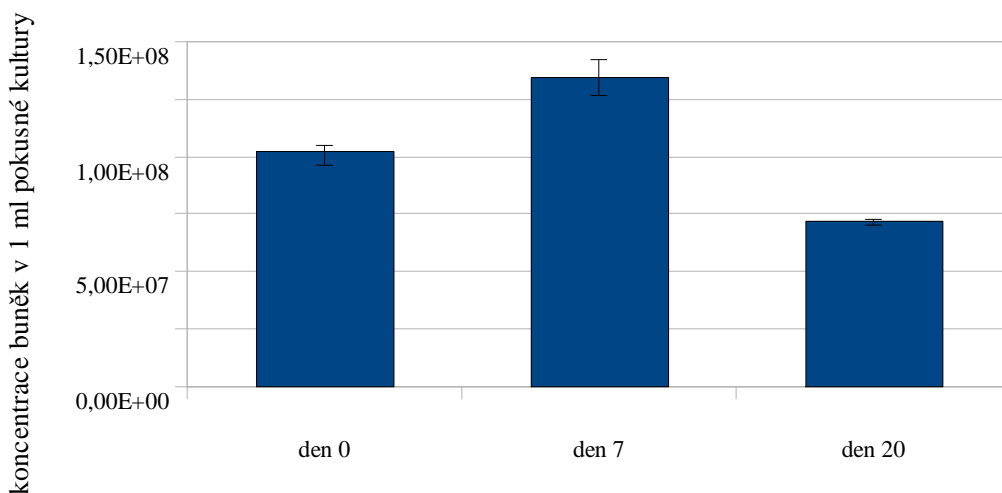


Obr. 17 Kvantifikace úbytku nafty abiotickými ztrátami, celkového úbytku nafty (zahrnuje abiotické ztráty i degradaci) a čistého úbytku zapříčiněného degradací. Graf zobrazuje výsledky kultivace kmene *Achromobacter xylosoxidans* v mediích obohacených o glukózu.

Na Obr. 16 i 17 je dobře patrný podíl abiotických ztrát. Ty byly v případě pokusné alternativy s absencí glukózy 5 % a 14,3 % pro 7. respektive 20. den trvání pokusu. V případě kombinace glukózy a nafty v živném mediu byly abiotické ztráty 7. a 20. den trvání pokusu 7 % a 12,5 %. Z uvedených dat je patrný rozdíl mezi oběma pokusnými alternativami. Zatímco v prvním případě byl rozdíl mezi ztrátami nafty degradací 7. a 20.

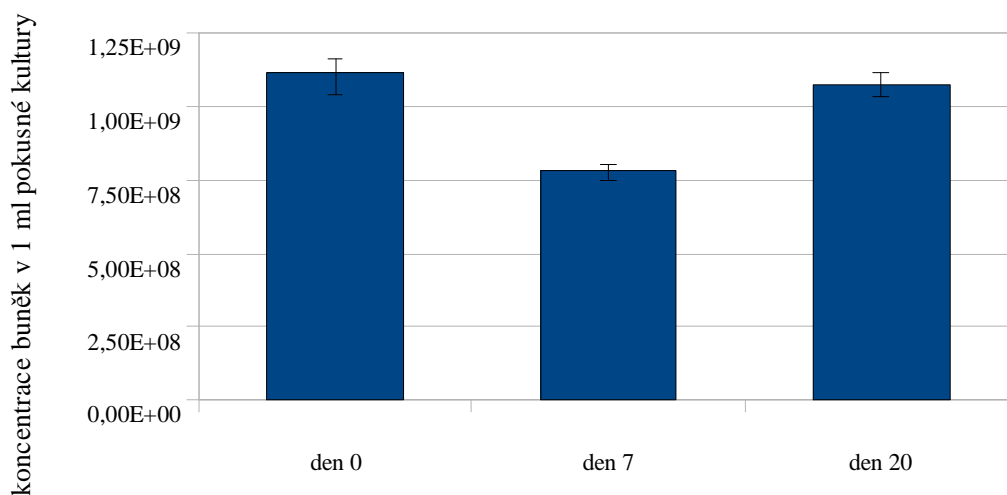
den minimální a většina utilizovaného substrátu byla odbourána během prvních sedmi dní, u pokusu kombinujícího dva substráty došlo k výraznému úbytku nafty jak během prvních sedmi dní, tak i v následujících dnech trvání pokusu.

Koncentrace bakteriální biomasy byla během celého pokusu o jeden až dva řády vyšší v kulturách kultivovaných v mediích se směsným substrátem než v mediích kultivovaných pouze s naftou. Co se týče změn koncentrace bakteriální biomasy během pokusu, došlo v pokusných systémech s naftou a systémech s kombinovaným substrátem k opačnému trendu. Zatímco při pokusu s naftou byl 7. den pokusu zaznamenán nárůst mikroskopických počtů bakterií následovaný výrazným poklesem ke konci pokusu (viz. Obr. 18), u systémů s kombinovaným substrátem byl 7. den pokusu zaznamenán pokles mikroskopických počtů bakteriálních buněk následovaný výrazným nárůstem (viz. Obr. 19).



Obr. 18 Změny mikroskopických počtů bakteriálních buněk během pokusu s naftou.

V případě Obr. 18 i 19 jsou demonstrovány hodnoty průměry z trojice hodnot reprezentujících jednotlivé pokusné systémy odebíraných 0., 7. a 20. den pokusu. Chybové úsečky znázorňují minimální a maximální naměřené hodnoty.



Obr. 19 Změny mikroskopických počtů bakteriálních buněk během pokusu s naftou doplněnou o glukózu.

5.6.2. Zhodnocení degradace pomocí diagnostických poměrů *n-C17/pristan* a *n-C18/phytan*

Diagnostické poměry byly porovnávány mezi jednotlivými odběrovými termíny a mezi kontrolními a pokusnými systémy v jednom odběrovém termínu navzájem. Z dat uvedených v Tab.4 není patrný žádný trend vývoje hodnot daných poměrů v čase. Rozdíly mezi kontrolními a pokusnými měřeními v rámci jednoho odběrového termínu nejsou významné, stejně tak je tomu i v případě porovnání mezi 0., 7. a 20. dnem trvání pokusu.

Tab. 4

Poměry *n-C17/pristane* a *n-C18/phytane* během pokusu stanovujícího biodegradační efektivitu vybraného kmene

	varianta pokusu pouze s naftou				
	Ø 0.den – standard	Ø 7.den – kontrola	Ø 7.den - pokus	Ø 20.den - kontrola	Ø 20.den - pokus
<i>n-C₁₇/pristane</i>	1,71 ± 0,01	1,65 ± 0,03	1,71 ± 0,03	1,68 ± 0,02	1,69 ± 0,04
<i>n-C₁₈/phytane</i>	1,45 ± 0,04	1,48 ± 0,03	1,53 ± 0,01	1,47 ± 0,01	1,51 ± 0,00
	varianta pokusu s naftou a glukózou				
<i>n-C₁₇/pristane</i>	1,74 ± 0,03	1,72 ± 0,04	1,76 ± 0,03	1,72 ± 0,01	1,76 ± 0,04
<i>n-C₁₈/phytane</i>	1,53 ± 0,02	1,51 ± 0,01	1,49 ± 0,02	1,52 ± 0,00	1,54 ± 0,01

Mírný rozdíl je možné zaznamenat při porovnání hodnot poměrů $n\text{-C}_{17}$ /pristan a $n\text{-C}_{18}$ /phytan mezi jednotlivými pokusy. V pokusné variantě s naftou i glukózou nabývají udávané poměry obecně vyšších hodnot než v pokusné variantě, kde byla jediným zdrojem uhlíku a energie nafta.

6. Diskuze

6.1. Identifikace bakteriálních kmenů

Rozdílnost taxonomického zařazení testovaných kmenů různými metodami bohužel nemůže být diskutována vzhledem k faktu, že nejsou přesně známy metody, jakými byla identifikace provedena na pracovišti České sbírky mikroorganismů. I přes snahu dohledat dokumentaci nebylo nalezeno označení, pod kterým byly kmeny na pracovišti České sbírky mikroorganismů identifikovány a nepodařilo se tedy zjistit přesnou metodiku identifikace. Jisté je nicméně to, že taxonomické určení bylo provedeno na základě fenotypových a biochemických testů. Tento přístup je založen na fyziologických a morfologických projevech daných kultur a jeho princip je tedy výrazně odlišný od analýzy složení buněčných mastných kyselin, jež využívá systém Sherlock.

V celé předložené práci je používáno taxonomické zařazení určené při identifikaci na pracovišti České sbírky mikroorganismů.

Tab. 5

Výsledek identifikace kmenů získané metodou Sherlock a podle CCM

kmen	Sherlock	CCM
A	<i>Bacillus mycoides</i>	nepodařená identifikace
B	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
C	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
D	nepodařená identifikace	<i>Bacillus sp.</i>

6.2. Výběr kmene podle růstu

Z výsledků výběrových pokusů lze vyvodit, že všechny čtyři kmeny jsou schopné růstu na naftě jako jediném zdroji uhlíku a energie. To odpovídá i výsledkům testů biodegradačního potenciálu u těchto kmenů provedeného na VŠCHT Praha (MikroChem 2007). V případě kmene určeného jako *Bacillus sp.* (kmen D) byl růst nejméně intenzivní, zatímco u zbylých tří kmenů – neidentifikovaného (A), *Achromobacter xylosoxidans* (B) a *Bacillus subtilis* (C) byl růst intenzivnější. I když na uvedeném pracovišti nebyl růst hodnocen proměřováním optické denzity kultivovaných kultur, ale pouze změnou koncentrace buněk v kulturách na začátku a na konci pokusu ověřujícího schopnost

degradovat ropné uhlovodíky, byl trend nárůstu koncentrace buněk během pokusu shodný se závěry výběrových pokusů provedených v rámci této diplomové práce. Největší nárůst buněk byl zaznamenán u neidentifikovaného kmene A a kmene *Achromobacter xylosoxidans*, který byl použit pro účely této diplomové práce, následně potom u kmenů *Bacillus subtilis* a *Bacillus* sp. (MikroChem 2007). Tyto výsledky nemohou být navzájem porovnávány vzhledem k odlišnému pojetí i účelu pokusů, svědčí nicméně o růstové aktivitě jednotlivých kmenů v prostředí obohaceném o naftu.

6.3. Optimalizace kultivace kmene *Achromobacter xylosoxidans*

Výsledky pokusu srovnávajícího růst kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* ve čtyřech mediích s různým složení minerálních solí vyloučil použití media 1. Toto medium je ze čtyř testovaných variant nejchudší ve smyslu počtu nutrientů, které jsou bakteriálnímu růstu k dispozici. Vzhledem k průběhu růstu kultur v mediu s obsahem iontů Fe v pokusu popsáném v odd. 4.7.2. a 5.5.4., kde byl růst v přítomnosti železa silně inhibován, a kde byla koncentrace tohoto kovu podobná jako v mediu 1 (viz. Tab.1, Tab.3 a odd. 5.5.4.), je možné nízkou intenzitu růstu v mediu 1 považovat za následek vysoké koncentrace právě tohoto prvku. V mediu 1 je zhruba o dva řády vyšší koncentrace Fe než v mediích vykazujících nejlepší růst (media 3 a BSM). Dalším faktorem, který mohl mít na inhibici růstu kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* v mediu 1 vliv, je pH tohoto media. To bylo ve srovnání s ostatními mediemi nižší (pH = 6,6) a ve srovnání s pokusem posuzujícím vliv pH na růst biomasy kmene blízko hodnotám pH potlačujících růst (viz. odd. 5.5.1.). Ostatní tři media, ač odlišná skladbou minerálních solí (zejména medium 2 bylo minerálně bohatší než medium 3 a BSM), vykazovala podobný růst kultivovaných kultur.

Omezená biodostupnost hydrofobních organických látek pro mikroorganismy může být významný faktor limitující proces biodegradace (Guha and Jaffe 1996). Během třepání pokusných medií sice dochází k rozptýlení substrátu do vodného roztoku v podobě micel, degradace může nicméně stále probíhat pouze na omezené ploše fázového rozhraní voda-hydrofobní substrát nebo na ještě omezenějším zdroji uhlovodíků, které byly ve vodném prostředí rozpuštěny (Singh et al. 2007). Tři pokusné koncentrace nafty (0,25 %, 1 % a 2 % v/v) v pokusných mediích tyto předpoklady potvrdily (viz. odd. 5.4.2.). Intenzivnější růst optické denzity bakteriální kultury v mediích s vyššími koncentracemi nafty svědčí o větším množství organického substrátu přístupného pro utilizaci bakteriální biomasou.

Některé bakteriální kmeny mají schopnost produkovat povrchově aktivní látky, tzv. surfaktanty. Produkce těchto látek nad hodnoty CMC (critical micelle concentration) může snížit povrchové napětí mezi fázemi a navýšit tak rozpustnost a biodostupnost hydrofobních substrátů (Whang et al. 2008). Kmen *Achromobacter xylosoxidans* však ve výčtu mikroorganismů schopných produkovat povrchově aktivní látky, uvedeném v práci vypracované Singh et al. (2007), chybí. Absence vlastní produkce povrchově aktivních látek může být nahrazena umělým dodáním povrchově aktivních látek do kontaminovaného prostředí. Pokusně tak bylo dosaženo navýšení intenzity biodegradace (Beal and Betts 2000, Rahman et al. 2003).

Pokus, který měl za účel posoudit vliv způsobu kultivace inokula ve smyslu použitého zdroje uhlíku (energeticky bohatá a snadno přijatelná glukóza vs hůře užitelná a těžko dostupná nafta) na další růst kultury kmene *Achromobacter xylosoxidans* v mediích se stejnou nabídkou substrátů jako při kultivaci inokula plus kombinaci těchto dvou substrátů, poskytl zajímavé informace. Prokazatelně nejvýraznější růst vykazovaly kultury v mediích, kde bylo inokulum předkultivováno v živném roztoku obsahujícím glukózu a následně bylo využito k založení pokusu, kde byla jako substrát k dispozici nafta (viz. odd. 5.4.3). To bylo pravděpodobně způsobeno vyvinutím enzymatického aparátu na energeticky výhodném substrátu. Po přenesení takovéto kultury do prostředí vyžadujícím příjem a zpracování hůře využitelného zdroje uhlíku a energie je enzymaticky vybavená biomasa schopná rychleji a účinněji degradovat nabídnutý substrát a využívat jej ke svému růstu. Podobný jev byl zaznamenán i po přeočkování kultury z agarových ploten obsahujících glukózu (agary byly stejného minerálního složení jako tekutá kultivační media) do minerálních medií obsahujících jako jediný zdroj uhlíku naftu. Přeočkování kultury následoval intenzivní nárůst optické denzity tekutých kultur, nicméně po využití této rychle narostlé biomasy k inokulaci dalších pokusů, kde byla zdrojem uhlíku opět pouze nafta, již tak výrazný růst nevyvolalo. To je také důvodem, proč většina růstových křivek prezentovaných v této studii dosáhla maxima OD zhruba na trojnásobku inokulačních hodnot OD. Tento způsob zakládání pokusů byl zvolen s ohledem na případné budoucí aplikace výsledků v praxi, kdy by degradace ropných uhlovodíků probíhala bez přítomnosti energeticky bohatého substrátu, jakým je glukóza.

Ve spojitosti s touto problematikou je nutné okomentovat také další výsledky tohoto pokusu. Druhá skupina pokusných kultur vykazovala poměrně výrazný nárůst absorbance na zhruba trojnásobek inokulačních hodnot OD během prvních 50 hodin kultivace (OD = 0,3), potom růst stagnoval až do konce pokusu na těchto hodnotách. Ve všech

případech se jednalo o kultury, které byly během přípravy inokula i během následného pokusu kultivovány na stejném mediu. To je zvláštní zejména v případě glukózy, protože původní hypotézy předpokládaly nejvýraznější růst právě v přítomnosti tohoto substrátu. Během kultivací s glukózou jako jediným substrátem však bylo paradoxně dosahováno nerovnoměrného a často nepříliš výrazného růstu kultur, zejména ve srovnání s kultivacemi, kde byly kultury přeneseny z medií obsahujících glukózu do medií obsahujících naftu. Nejhorší výsledky, co se intenzity růstu optické denzity bakteriálních kultur týče, vykazovaly pokusné systémy, v nichž bylo v přítomnosti glukózy kultivováno inokulum vyprodukované pouze v přítomnosti nafty. Vysvětlením této tendence by mohla být tzv. substrátově indukovaná smrt. Tento jev se vyskytuje v případě přenesení mikroorganismů z nepříznivého prostředí do podmínek s vysokou nabídkou energeticky bohatého a lehkou využitelného substrátu. Bakteriální buňky nejsou schopny redukovat příjem tohoto substrátu a umírají následkem hromadění produktů vlastního metabolismu (Ambrož 1986).

6.4. Růstová optima kmene *Achromobacter xylosoxidans*

Za optimální pH pro růst bakterií je obecně považováno rozmezí pH 6,5-8,5 (Das and Mukherjee 2007). V případě studovaného kmene *Achromobacter xylosoxidans* se jeví toto vymezení jako maximální rozsah pH umožňující růst. Optimální rozsah pH pro růst je podle výsledků užší. Na to se dá usuzovat z průběhu růstu v mediích s pH 6,3, kdy nedocházelo k žádnému nárůstu absorbance bakteriální suspenze, a v mediích s pH 8, kdy sice kultury reagovaly postupným zvyšováním optické denzity, zhruba po 100 hodinách ale následoval výrazný pokles OD až pod hodnoty na počátku pokusu. To nasvědčuje tomu, že se optimální hodnoty pH pro růst tohoto kmene nacházejí v úzkém rozmezí kolem pH 7. Na tuto hodnotu pH jsou také ve většině studií zaměřených podobným způsobem jako předložená práce upravovány používaná média (Mukherji et al 2004, Song et al. 2006, Mancera-López et al. 2007, Machín-Ramírez et al. 2008).

Zvýšený obsah solí může být častým faktorem komplikujícím bioremediace prostředí kontaminovaných ropnými uhlovodíky (de Carvalho and da Fonseca 2005). Zvýšená salinita je častým jevem zejména v příbřežních oblastech moří a oceánů a v aridních oblastech. Kultura kmene *Achromobacter xylosoxidans* reagovala na přítomnost 0,5% koncentraci solí nižší intenzitou růstu a delší lagovou fází než při absenci solí v mediu. Podle výsledků se koncentrace NaCl vyšší než 0,5 % jeví jako silně potlačující životaschopnost kultur. U kultury vyselektované z půdy s nulovou salinitou lze

podobný efekt salinity předpokládat, jak ale nasvědčuje práce Mukherji et al. (2004), lze postupnou aklimatizací mikroorganismů na vyšší koncentrace solí docílit určité tolerance k salinitě.

Růst pokusné bakteriální biomasy za teploty blízké teplotě půdnímu prostředí je zásadní. Se zvyšující se teplotou často stoupá degradační efektivita bakteriálních kmenů (de Carvalho and da Fonseca 2005). Většinou jsou pokusy prováděny přímo za laboratorní či vyšší teploty (20-30 °C) (Mukherji et al. 2004, Das and Mukherjee 2007, Nikolopoulou et al. 2007, Vieira et al. 2007, Prince et al. 2008). Je poměrně neobvyklé, aby byl růst při teplotě 10 °C porovnatelný nebo dokonce převyšoval růst za teploty 20 °C, jako tomu je podle výsledků u kmene *Achromobacter xylosoxidans* (viz. odd. 5.5.3). Minimální negativní vliv nižších teplot na aktivitu bakteriální biomasy je velmi důležitým předpokladem pro její praktickou využitelnost (Filler et al. 2006).

Zejména v průmyslových a těžebních areálech se může vyskytnout souběžná kontaminace půd ropnými uhlovodíky a těžkými kovy (Mohn and Stewart 2000, Balrich and Skotsky 1985). Posuzovat problematiku toxicity kovů není pouze otázkou výskytu daného kovu, ale také jeho koncentrace a formy v prostředí. Některé kovy, které za vyšších koncentrací prokazatelně inhibují bakteriální růst, patří mezi mikronutrienty a při nízkých koncentracích mohou růst bakteriální biomasy naopak stimulovat. Jedná se například o kobalt, nikl a měď (Gikas 2008). Stimulační efekt byl do určitých koncentrací doložen i u Cr^{6+} a Cr^{3+} (Gikas and Romanos 2006). Výsledky pokusu (viz. odd. 5.5.4) ukazují, že právě ionty Cr^{6+} byly v koncentraci odpovídající B kritériu stanoveném MŽP (35 $\mu\text{g/l}$) (MŽP 1996) nejméně inhibujícím těžkým kovem. Naopak u Co^{2+} se v pokusné koncentraci jevil jako nejvíce inhibující těžký kov, ač jsou jeho soli na rozdíl od chromu či olova, jež vykazovalo také menší negativní vliv, častou součástí kultivačních medií. Negativní vliv extenzivní kontaminace Co, Pb, Cu a Cr (zhruba o řád nižší koncentrace než je kritérium B pro podzemní vody) potvrdil také Mohn and Stewart (2000).

Velmi rozdílný vliv na růst pokusných kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* měly testované koncentrace iontů Fe a Mn. Ač jsou ionty těchto kovů v podzemních vodách běžné i ve vyšších koncentracích a často se vyskytují pospolu (Pitter 1999), jejich vliv na růst bakteriální biomasy byl zcela odlišný. Zatímco testované koncentrace manganu neměly na růst pokusných kultur žádný vliv, u iontů železa tomu bylo naopak a v dané koncentraci inhibovaly růst biomasy zdaleka nejvíce (viz. odd. 5.5.4). Oba dva tyto kovy jsou také běžnou, v případě železa dokonce nezbytnou součástí kultivačních medií. Při jejich přípravě byla v rámci této studie použita sůl $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Při jejím rozpouštění

se do roztoku dostává železo v redukované formě Fe^{2+} . Lze předpokládat, že tato forma železa vzhledem k obsahu kyslíku v mediích podléhá oxidaci, takže v roztoku media je železo zastoupeno ve formě Fe^{3+} . Kultura kmene *Achromobacter xylosoxidans* byla vyselektována z povrchových vrstev půdy, kde nebyla vystavena tak vysokým koncentracím železa typickým pro podzemní vody z větších hloubek, takže je možné, že právě tento fakt je důvodem, proč vyšší koncentrace železa inhibují růst tohoto kmene. Ohodnocení růstu v mediích obsahujících různé kovy může poskytnout informaci, jak bude daná kultura reagovat na ten který kov, neposkytuje nicméně mnoho informací o kombinovaném efektu v případě výskytu více kovů v prostředí (Gikas 2008).

Nejlepší růst kmene *Achromobacter xylosoxidans* v mediích s různými poměry N/P vykazovaly kultury kultivované za molárního poměru 2,54:1. Zvýšení poměru N/P navýšením koncentrace dusíku na 4:1 a 8:1 vedlo k mírnému snížení maximální dosažené absorbance, kultury nicméně stále vykazovaly významný růst. Podobných výsledků dosáhli i Mukherji et al (2004), když zaznamenali nejlepší růstové odezvy v mediích s N/P poměrem 2:1 a 5:1. U vyšších koncentrací dusíku (N/P = 15:1 a 25:1) byl růst kultur inhibován, znovu ve shodě s výše uvedenou studií. Inhibice byla zřejmě způsobena toxicitou vysokých koncentrací amonných iontů (jako zdroj dusíku byl použit NH_4Cl). Při molárním poměru N/P 25:1 byla koncentrace těchto iontů v mediu 2,82 g/l.

V základním mediu byla koncentrace dusíku a fosforu 225 mg/l respektive 94 mg/l. Pokud bychom brali v potaz koncentraci nafty v mediích 1 objemové procento, což představuje při hustotě nafty zhruba 0,8 g/ml množství 8g nafty na 1 l media, a množství uhlíku v naftě 85 hmotnostních procent (hrubý odhad vycházející z předpokladu, že nafta je tvořena pouze nasycenými alifatickými uhlovodíky, ve skutečnosti je zastoupení nasycených alifatických uhlovodíků v naftě v rozmezí 60-80 % (Wang and Brown 2008)), dostáváme koncentraci organického uhlíku 6,8 g/l. Tyto koncentrace uhlíku, dusíku a fosforu představují poměr C/N/P v základním mediu 77:2,54:1. Za optimální poměr C/N/P pro maximální intenzitu degradace organických látek je považován poměr 100:5:1 (Nikolopolou et al. 2007). Nejblíže tomuto poměru byly právě media vykazující nejvýraznější růst kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans*.

Podobné výsledky byly získány i v případě pokusu, ve kterém byly molární poměry N/P měněny snižováním koncentrace fosforu. Nejlepší růst kultury vykazovala media s poměrem N/P 2,54, 5:1 a 10:1. To odpovídá C/N/P poměrům 77:2,54:1, 150:5:1 a 300:10:1. Zároveň jsou tyto výsledky v dobré shodě s optimálním poměrem N/P pro degradace organických substrátů (Nikolopolou et al. 2007). Kultury s N/P poměrem 20:1

a 40:1 byly zřejmě limitovány nízkou koncentrací fosforu nebo špatným poměrem C/N/P. Při hodnocení významu poměrů uhlíku, dusíku a fosforu na růst kultur kmene *Achromobacter xylosoxidans* je potřeba brát v potaz, že celkové odhadnuté množství uhlíku není pro bakteriální biomasu dostupné vzhledem k hydrofobní povaze nafty.

6.5. Biodegradační efektivita kmene *Achromobacter xylosoxidans*

Během pokusu s naftou jako jediným substrátem a pokusu, kde byla k naftě jako doplňkový substrát přidána glukóza, byl kmen *Achromobacter xylosoxidans* schopný degradovat 16 % respektive 18,7 % z celkového množství nafty během 20 dní trvajících pokusu. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s výsledky práce Mukherji et al. (2004), ve které byly za podobných podmínek zjištěny úbytky nafty během 30 dní trvajících pokusu 30 %. Srovnatelné jsou i abiotické ztráty nafty během pokusu. Ty v citované práci dosáhly 12 %-14 %, zatímco v předložené studii bylo na vrub abiotickým ztrátám evaporací přisouzeno 12,5 % během pokusu s naftou jako jediným substrátem a 14,3 % během pokusu, ve kterém byla nafta doplněna o glukózu. Další studií, ve které bylo dosaženo srovnatelných výsledků, je práce Machín-Ramírez et al. (2008). Zde bylo během 15-ti denní kultivace bakteriálního konsorcia v kalu obsahujícím směs ropných uhlovodíků dosaženo degradace 24 % TPH. Nutno doplnit, že v uvedených pracech bylo k pokusům použito bakteriální konsorcium a ne čistá bakteriální kultura. Některé další studie dokládají rapidnější úbytky ropných uhlovodíků během delšího časového úseku. Například práce Vieira et al. (2007) dokládá 90% úbytek ropných uhlovodíků obsažených v naftě během 49 dní trvajících pokusu. Při srovnání s literaturou lze biodegradační efektivitu studovaného kmene považovat spíše za nižší.

Zajímavá je skutečnost, že přidavek glukózy jako energeticky bohatého substrátu, nevedl k navýšení biodegradace. Množství degradované nafty dosažené během obou pokusů bylo prakticky shodné, navíc celková biomasa buněk byla v pokusných systémech obsahujících glukózu až o dva řády vyšší. Podobného výsledku jako v případě pokusu popsaného v této studii bylo nicméně dosaženo při pokusu provedeném na pracovišti VŠCHT Praha. Zde bylo prakticky za stejných kultivačních podmínek v BSM mediu obsahujícím glukózu dosaženo mineralizace 25,4% z původního množství nafty (MikroChem 2007). Vzhledem k poměrně vysoké koncentraci glukózy v živném roztoku mohla být nafta degradována jen vedlejšími metabolickými pochody, zatímco jako hlavní substrát byla bakteriální biomasou využívána glukóza.

Hlavní podíl degradovaného substrátu v pokusných mediích s naftou jako jediným

zdrojem uhlíku a energie byl utilizován během prvních sedmi dnů pokusu (15,6 %), mezi 7. a 20. dnem pak nedošlo k výraznému navýšení tohoto množství (16 % na konci pokusu). Při porovnání těchto výsledků s vývojem koncentrace bakteriálních buněk během tohoto pokusu (Obr. 18) je vidět, že mezi 0. a 7. dnem pokusu došlo k navýšení koncentrace buněk, zatímco mezi 7. a 20. dnem koncentrace buněk v mediích poklesla. To indikuje, že degradace nafty je spojena s aktivní fází růstu biomasy. Stejný vztah by popsán i ve studii Mukherji et al. (2004). U pokusu kombinujícího dva zdroje uhlíku, naftu a glukózu, byl průběh degradace pozvolný a mezi 7. a 20. dnem pokusu došlo k navýšení degradovaného substrátu z 12,7 % na 18,7 %. Koncentrace buněk naopak oproti pokusu realizovanému pouze s naftou 7. den mírně poklesla (Obr. 19), aby mezi 7. a 20. dnem pokusu zase narostla na hodnotu z počátku pokusu. Tento trend mohl být následkem adaptace kultury na nový, těžko využitelný substrát. Po překlenutí adaptační lag-fáze mohly bakterie substrát vyžívat ve větší míře, což se odrazilo v nárůstu koncentrace buněk v roztoku i dalším úbytku nafty.

Posouzení míry degradace podle diagnostických poměrů $n\text{-C}_{17}$ /pristan a $n\text{-C}_{18}$ /phytan nebylo průkazné. Ač je tento diagnostický poměr často využíván k posouzení míry biodegradace ropných uhlovodíků (Payet et al. 1999, Johnston et al. 2007, Wang and Brown 2008), byla prokázána schopnost některých bakteriálních kmenů poměrně rychle degradovat kromě alifatických uhlovodíků i uhlovodíky izoprenoidní (Nakajama et al. 1985). Druhým faktorem, který mohl mít na neprůkaznost změny v diagnostických poměrech $n\text{-C}_{17}$ /pristan a $n\text{-C}_{18}$ /phytan vliv, je fakt, že alifatické uhlovodíky nepodléhají degradaci stejnou měrou. Prioritně jsou degradovány n -alkany s nižším počtem uhlíků v řetězci (Rahman et al. 2003). Vzhledem k poměrně nízké míře degradace nafty během provedených pokusů tak nemusely uhlovodíky s téměř nejdelšími řetězci v modelové směsi uhlovodíků degradaci podléhat (rozsah výrazněji zastoupených n -alkanů v použité naftě je $\text{C}_9\text{-C}_{21}$ – viz. Obr.3). Toto vysvětlení nulové změny diagnostických poměrů je pravděpodobnější, protože ke změně poměru nedošlo ani mezi kontrolními a pokusnými vzorky.

6.6. Zhodnocení využitelnosti kmene *Achromobacter xylosoxidans* pro bioremediace kontaminovaných půd a použití v technologii PRB

Výsledky jednotlivých pokusů naznačují, že potenciál kmene *Achromobacter xylosoxidans* pro využití při bioremediacích půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky je limitován poměrně úzkým rozmezím podmínek, ve kterých vykazuje růstovou aktivitu

spojenou s degradací cílového substrátu (Mukherji et al. 2004). Hlavními limitacemi by bylo zasolení kontaminovaných půd, nepříznivé pH a vysoká koncentrace železa v prostředí. Naopak pozitivní vlastností kmene *Achromobacter xylosoxidans* je podle výsledků studie schopnost zachovat si aktivitu i při nízkých teplotách a relativní perzistence proti výskytu některých těžkých kovů.

Praktická použitelnost kmene *Achromobacter xylosoxidans* jako biologické náplně reaktivního centra biotické PRB by byla limitována výše jmenovanými faktory. V úvahu připadá použitelnost kmene *Achromobacter xylosoxidans* v PRB v podmínkách, kde by nebylo nutné protékající podzemní vodu aerovat nebo by byly výdaje na aeraci biotické části minimalizovány, tzn. u bariéry aplikované do podloží s málo mocnými vodonosnými vrstvami situovanými v malé hloubce pod povrchem. V opačném případě by bylo vhodnější využití anaerobních mikroorganismů, u kterých odpadá nutnost zajistit optimální přísun kyslíku jako akceptoru elektronů (Scow and Hicks 2005). Parametry kontaminované vody by musely být v případě nevyhovujících parametrů (pH) upravovány a reaktivní zóna PRB by musela být navržena s ohledem na koncentrace ropných uhlovodíků v přítoku tak, aby byla doba zdržení uvnitř reaktivní zóny dostatečná pro degradaci kontaminace (EPA 1998). Vzhledem k negativnímu vlivu přítomnosti železa na růst bakteriální biomasy by zřejmě nebylo možné ve spojení s kulturou kmene *Achromobacter xylosoxidans* použít jako reaktivní materiál Fe^0 .

Pouze na základě pokusů provedených v této studii není možné vyloučit či doporučit kmen *Achromobacter xylosoxidans* pro využití jako náplň biotické PRB. Před definitivním rozhodnutím by bylo nutné provést ještě mnoho dalších testů, zejména výběr vhodného nosného materiálu. Ten by musel být s ohledem na poměrně nízkou efektivitu kmene *Achromobacter xylosoxidans* při degradaci nafty schopen pojmout vysokou bakteriální biomasu. Podle výsledků studie Quan et al. (2004) je kmen *Achromobacter xylosoxidans* schopný velmi dobře vytvářet biofilm na vhodném porézním materiálu. Dalšího navýšení degradace by bylo možné docílit aplikací povrchově aktivních látek (Singh et al. 2007).

V případě zjištění výskytu tohoto kmene v půdě kontaminované ropnými uhlovodíky a zabránění šíření kontaminace např. formou PRB zachycující kontaminant skrze fyzikálně-chemické procesy (McGovern et al. 2002, Guerin et al. 2002) je možné doporučit *in situ* bioremediaci formou bioaugmentace. To by obnášelo vylepšení živinových poměrů v půdě dodáním vhodného množství dusíku, fosforu a draslíku (Hunkeler et al. 2002), popř. navýšení přírodní populace kmene *Achromobacter*

xylooxidans formou inokulace. Následkem těchto zásahů by byla zvýšena přirozená schopnost půdní mikroflóry mineralizovat organické polutanty (Hunkeler et al. 2002, Kalin 2004).

7. Závěry

Pro účely předložené diplomové práce byl ze čtyř možných kmenů vybrán na základě porovnání růstových křivek kmen *Achromobacter xylosoxidans*. Při další práci s tímto kmenem byla vymezena jeho růstová optima ve vybraných podmínkách prostředí a stanovena efektivita tohoto kmene při degradaci ropných uhlovodíků. Ty bylo během studie reprezentovány naftou.

Kultura kmene *Achromobacter xylosoxidans* vykazovala v mediích s různým pH nejintenzivnější růst při pH 7, v mediích se zvýšenou salinitou byl růst naopak silně inhibován, podle výsledků je tak neaklimatizovaný kmen schopný tolerovat pouze velmi nízkou salinitu prostředí. Výsledky naznačují, že tento kmen je schopný degradovat ropné uhlovodíky při teplotách půdního prostředí podobnou rychlostí jako za laboratorní teploty. Při kultivacích v mediích s obsahem některých těžkých kovů (Cu, Cr, Co a Pb) v koncentracích odpovídajících kritériu B, stanoveného Ministerstvem životního prostředí jako koncentrace signalizující významné znečištění, byl růst kultury kmene *Achromobacter xylosoxidans* nejvíce inhibován kovy ve vzestupném pořadí Cr→Cu→Pb→Co. V případě medií obohacených o Fe v koncentraci 3 mg/l byla kultura kmene *Achromobacter xylosoxidans* inhibována ve srovnání s ostatními kovy nejvíce. Naopak obohacení růstových medií o Mn v koncentraci 2 mg/l nevyvolalo žádný negativní efekt. Co se týká optimálního molárního poměru N/P v živných mediích, nejlepšího růstu bylo docíleno v mediích s N/P poměrem 2,54:1, 4:1 a 8:1. Toxicita amonných iontů se pak projevila při molárním poměru N/P 25:1. Při úpravách molárních poměrů N/P snížením koncentrace fosforu pod koncentraci v základním mediu bylo nejlepšího růstu dosaženo v mediích s N/P poměrem 5:1.

Kmen *Achromobacter xylosoxidans* byl během 20 dní trvajících pokusu schopen degradovat 16 % celkového množství nafty v mediích s naftou jako jediným zdrojem uhlíku a energie, a téměř 19 % nafty v mediích, kde byla nafta doplněna o glukózu.

Z provedených pokusů nelze plně zhodnotit vhodnost kmene *Achromobacter xylosoxidans* pro využití v biotické PRB. Při vhodném řešení této technologie ve smyslu výběru vhodného materiálu schopného v dostatečné míře poutat biomasu tohoto kmene, zabezpečení vhodných podmínek pro její růst a dostatečné doby zdržení kontaminované vody v reaktivní zóně, je možné považovat využití kmene *Achromobacter xylosoxidans* pro remediace půd a podzemních vod kontaminovaných ropnými uhlovodíky za reálné.

8. Přehled literatury

- Ambrož, Z. 1986. Mikrobiologie. Obecná část. Vysoká škola zemědělská v Brně.
- Balrich, H. and G. Skotsky. 1985. Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecological processes: a review and potential application to regulatory process. *Environ. Res.* 36: 111–137.
- Beal, R. and W.B. Betts. 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 89: 158–168.
- Boopathy, R. 2004. Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study. *Bioresource Technology* 94: 143–51.
- Bryselbout, C.; P. Henner; E. Lichtfouse. 1998. Fossil fuel biomarkers in plant waxes as pollution parameters. *Sci. Tot. Environ* 222: 201–204.
- Cajthaml, T.; V. Pacáková; V. Šásek. 2001. Mikrobiální degradace polycyklických aromatických uhlovodíků. *Chem. Listy* 95: 404–410.
- Cushing, R.; D. Gravedling; P.B. McMahon. 1996. Overview of the Denver Federal Center. Remediation Technologies Development Forum, Permeable Barriers Action Team meeting. Denver, Colorado.
- Das, K. and A.K. Mukherjee. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98: 1339–1345.
- Day, S.R.; S.F. O'Hannesin; L. Marsden. 1999. Geotechnical techniques for the construction of reactive barriers. *Journal of Hazardous Materials B67*: 285–297.
- de Carvalho, C.C.C.R. and M.M.R. da Fonseca. 2005. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 389–399.
- Ding, A.; Z. Zhang; J. Fu; L. Cheng. 2001. Biological control of leachate from municipal landfills. *Chemosphere* 44: 1–8.
- DOE. 2009. Energy Information Administrative Web Site, United States Department of Energy, <http://eia.doe.gov/>.
- EPA 1998. Permeable Reactive Barrier Technologies for Contaminant Remediation, United States Environmental Protection Agency. EPA/600/R-98/125.
- EPA 1999. Field Application of *In Situ* Remediation Technologies: Permeable Reactive Barriers. United States Environmental Protection Agency. EPA/542/R-99/002.

EPA 2002. Field Application of *In Situ* Remediation Technologies: Permeable Reactive Barriers. United States Environmental Protection Agency.

Farhadian, M.; C. Vachelard, D. Duchez, Ch. Laroche. 2008. *In situ* bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology* 99: 5296–5308.

Fernandez-Sanchez, J.M.; E.J. Sawvel; P.J.J. Alvarez. 2004. Effect of Fe⁰ quantity on the efficiency of integrated microbial- Fe⁰ treatment processes. *Chemosphere* 54: 823–829.

Filler, D.M.; C.M. Reynolds; I. Snape; A.J. Daugulis; D.L. Barnes; P.J. Williams. 2006. Advances in engineered remediation for use in the Arctic and Antarctica. *Polar Record* 42: 111–120.

Gikas, P. 2008. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: A review. *Journal of Hazardous Materials* 159: 187–203

Gikas, P. and P. Romanos. 2006. Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexa-valent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 133: 212–217.

Gogoi, B.K.; N.N. Dutta; P. Goswami; T.R. Krishna Mohan. 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental research* 7:762–782.

Guerin, T.F.; S. Horner; T. McGovern; B. Davey. 2002. An application of permeable reactive barrier technology to petroleum contaminated groundwater. *Water Research* 36: 15–24.

Guha, S. and P.R. Jaffe. 1996. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1382–1391.

Höhener, P.; C. Duwig; G. Pasteris; K. Kaufmann; N. Dakhel; H. Harms. 2003. Biodegradation of petroleum hydrocarbon vapors: laboratory studies on rates and kinetics in unsaturated alluvial sand. *Journal of Contaminant Hydrology* 66: 93–115.

Höhener, P.; D. Hunkeler; A. Hess; T. Bregnard; J. Zeyer. 1998. Methodology for the evaluation of engineered *in situ* bioremediation: lessons from a case study. *Journal of Microbiological Methods* 32: 179–192.

Hooker, S.B. and R.S. Skeen. 1996. Intrinsic bioremediation: an environmental restoration technology. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 317–320.

Hunkeler, D.; P. Höhener; J. Zeyer. 2002. Engineered and subsequent intrinsic *in situ* bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology* 59: 231–245.

Instant FAME User's Guide 2008. Sherlock Microbial Identification system. Version 6.1. © MIDI, Inc. Newark.

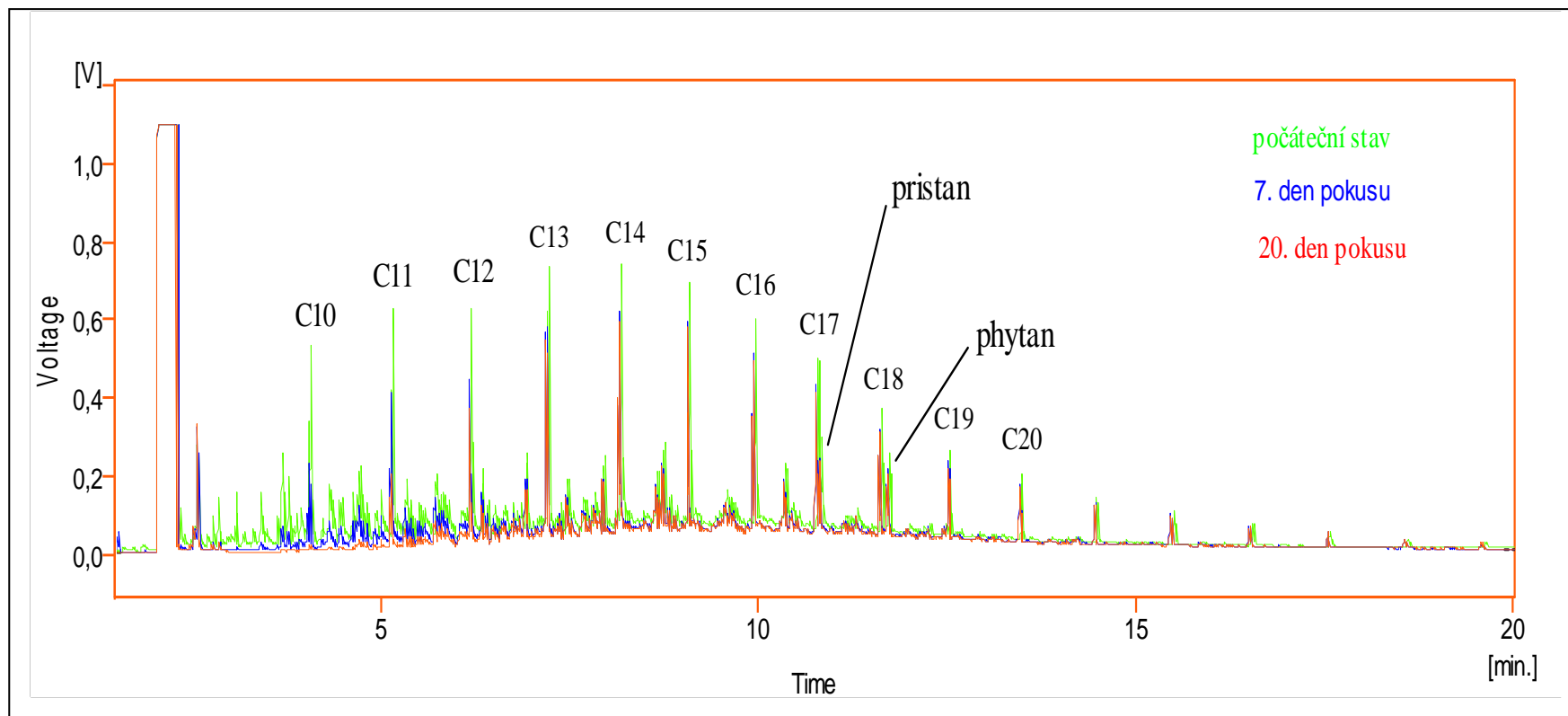
- Johnston, C.D.; T.P. Bastow; N.L. Lines. 2007. The use of biodegradation signatures and biomarkers to differentiate spills of petroleum hydrocarbon liquids in the subsurface and estimate natural mass loss. *European Journal of Soil Biology* 43: 328–334.
- Kalin, R.M. 2004. Engineered passive bioreactive barriers: risk-managing the legacy of industrial soil and groundwater pollution. *Current Opinion in Microbiology* 7: 227–238.
- Kermanshahi pour, A.; D. Karamanev; A. Margatis. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift reactor. *Water Research* 39: 3704–3714.
- Luo, W.; E.M. D'Angelo; M.S. Coyne. 2008. Organic carbon effects on aerobic polychlorinated biphenyl removal and bacterial community composition in soils and sediments. *Chemosphere* 70: 364–373.
- Mackay, D.; P.V. Roberts; J.A. Cherry. 1985. Transport of organic contaminants in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 19: 384–392.
- Machín-Ramírez, C.; A.I. Okoh; D. Morales; K. Mayolo-Delosia; R. Quintero; M.R. Trejo-Hernández. 2008. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. *Chemosphere* 70: 737–744.
- McGovern, T.; Turlough F. Guerin; S. Horner; B. Davey. 2002. Design, construction and operation of a funnel and gate *in-situ* permeable reactive barrier for remediation of petroleum hydrocarbons in groundwater. *Water, Air, and Soil Pollution* 136: 11–31.
- McMahon, P.B. 1997. Field Evaluation of a Permeable Reactive Barrier containing Zero-Valence Iron at the Denver Federal center. Remediation Technologies Development Forum, Permeable Barriers Action Team meeting. Virginia Beach, Virginia.
- Mearns, A.J. 1998. Cleaning Oiled Shores: Putting Bioremediation to the Test. Review. *Spill Science & Technology Bulletin* 4: 209–217.
- Medina-Moreno, S.A.; S. Huerta-Ochoa; M. Gitiérrez-Rojas. 2005. Hydrocarbon biodegradation in oxygen limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology* 51:231–239.
- Melenova, I. and K. Demnerova. 2004. Nové možnosti odstraňování polutantů ze životního prostředí a využití multifunkčního permeabilního bariérového systému – multibariéry. *Chem. Listy* 98: 908 – 915.
- Menendez-Vega, D.; J.L.R. Gallego; A.I. Pelaez; G. Fernandez de Cordoba; J. Moreno; D. Muñoz; J. Sanchez. 2007. Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* 43:310–321.
- MikroChem LKT, spol. s.r.o., Třeboň. 2007. Roční výzkumná zpráva projektu FT-TA3/077.
- MIS Operating Manual 2008. Sherlock Microbial Identification system. Version 6.1. © MIDI, Inc. Newark.

- Mohn, W.W. and G.R. Stewart. 2000. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1161–1172.
- Moreels D.; L. Bastiaens; F. Ollevier; R. Merckx; L. Diels; D. Springael. 2004. Evaluation of the intrinsic methyl *tert*-butyl ether (MTBE) biodegradation potential of hydrocarbon contaminated subsurface soils in batch microcosm systems. *Microbiology Ecology* 49: 121–128
- Mougin, Ch. 2002. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Compounds* 22: 1011–1043.
- Mukherjee, A.K. and K. Das. 2005. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 479–489.
- Mukherji, S.; S. Jagadevan; G. Mohapatra; A. Vijay. 2004. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. *Bioresource Technology* 95: 281–286.
- MŽP 1996. Metodický pokyn odboru pro ekologické škody ministerstva Životního prostředí České Republiky – kritéria znečištění zemin a podzemní vody. čl. 3, příloha 1.
- Nakajama, K.; A. Sato; Y. Takahara; T. Iida. 1985. Microbial oxidation of isoprenoid alkanes, phytane, norpristane and farnesane. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1993–2002.
- Nikolopoulou, M.; N. Pasadakis; N. Kalogerakis. 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. *Desalination* 211: 286–295.
- NRC (National Research Council). 2002. Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects. Washington, D.C.: The National Academia Press.
- Nyman, J.A.; P.L. Klerks; S. Bhattacharyya. 2007. Effects of chemical additives on hydrocarbon disappearance and biodegradation in freshwater marsh ecosystem. *Environmental Pollution* 149: 227–238.
- Payet, C.; C. Bryselbout; J.-L. Morel; E. Lichtfouse. 1999. Fossil fuel biomarkers in sewage sludges: environmental significance. *Naturwissenschaften* 86: 484–488.
- Permeable Reactive Barriers. 2002. Perchlorate Treatment Technology - Fact Sheet.
- Pitter, P. 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT. 2. vydání. 568 s.
- Plagentz, V.; M. Ebert; A. Dahmke. 2005. Remediation of groundwater containing chlorinated and brominated hydrocarbons, benzene and chromate by sequential treatment using ZVI and GAC. *Environ. Geol.* 49: 684–695.
- Powell, R.M. and R.W. Puls. 1997. Permeable Reactive Subsurface Barriers for the Interception and Remediation of Chlorinated Hydrocarbons and Chromium(VI) Plumes in Ground Water. U.S.EPA Remedial Technology Fact Sheet. EPA/600/F-97/008.

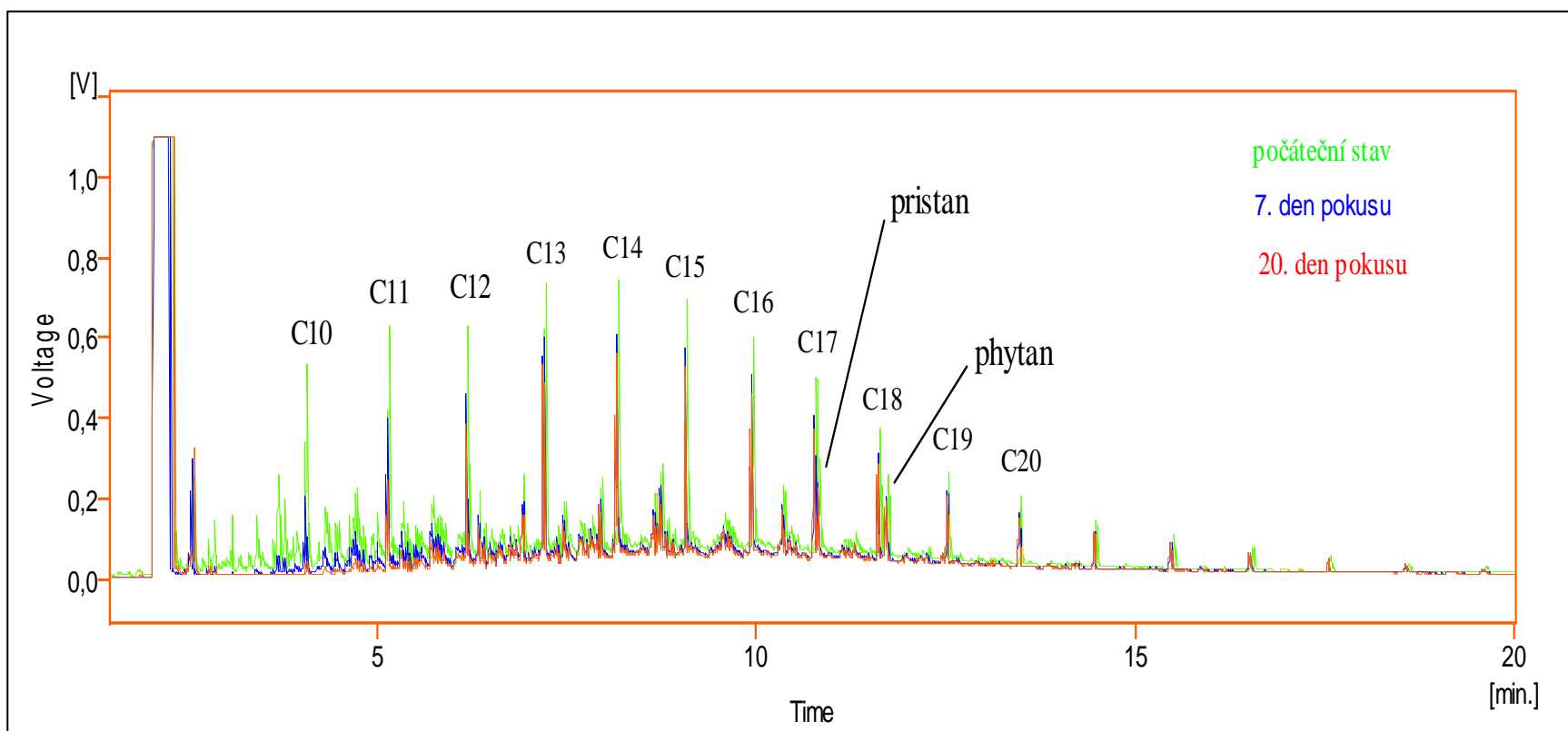
- Prince, R.C.; C. Haitmanek; C.C. Lee. 2008. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere* 71: 1446–1451.
- Quan, X.; H. Shi; Y. Zhang; J. Wang; Y. Qian. 2004. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. *Separation and Purification Technology* 34: 97–103.
- Rahman, K.S.M.; T.J. Rahman; Y. Kourkoutas; I. Petsas; R. Marchant; I.M. Banat. 2003. Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 90: 159–168.
- Scow, K.M. and K.A.Hicks. 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Microbiology* 16: 246–253.
- Singh, A.; J.D. Van Hamme; O.P. Ward. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25: 99–121.
- Smith, V.H.; D.W. Cleland. 1998. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 32: 3386–3395.
- Snape, I.; P.McA. Harvey; S.H. Ferguson; J.L. Rayner; A.T. Revill. 2005. Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica. I. A chemical approach using GC–FID. *Chemosphere* 61: 1485–1494.
- Song, X.-y.; Y.-f. Song; T.-h. Sun; Q.-x. Zhou; W. Zhang; L. Zhang. 2006. Adaptability of microbial inoculators and their contribution to degradation of mineral oil and PAHs. *Journal of Environmental Sciences* 18 (2): 310–317.
- van Herwijnen, R.V.; B.F. van de Sande; F.W.M. Van der Wielen; D. Springael; H.A.J. Govers; J.R. Parsons. 2003. Influence of phenantrene and fluoranthene on the degradation of fluorene and glucose by *Sphingomonas* sp. strain LB126 in chemostat cultures. *TEMS Microbiology Ecology* 46: 105–111.
- Verma, S.; R. Bhargava; V. Pruthi. 2006. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 207–213.
- Vesela, L.; J. Nemecek; M. Siglova; M. Kubal. 2006. The biofiltration permeable reactive barrier: Practical experience from Synthesia. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58: 224–230.
- Vieira, P.A.; R.B. Vieira; F.P. de França; V.L. Cardoso. 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials* 140: 52–59.
- Vogan, J.L.; R.M. Focht; D.K. Clark; S.L.Graham. 1999. Performance evaluation of a permeable reactive barrier for remediation of dissolved chlorinated solvents in groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 68: 97–108.
- Wang, Z and C. Brown. 2008. Chemical Fingerprinting of Petroleum Hydrocarbons. *Methods in Environmental Forensics*. 386 p. CRC Press. Editor: S.M. Mudge. 43–107.

Wang, Z.; M. Fingas; M. Landriault; L.Sigouin; N. Xu. 1995. Identification of alkylbenzenes and direct determination of BTEX and (BTEX + C₃-benzenes) in oils by GC-MS. *Analytical Chemistry* 67: 3491–3500.

Whang; L.-M.; P.-W.G. Liu; Ch.-Ch. Ma; S.-S. Cheng. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* 151: 155–163.



Srovnání chromatogramů vzorků extrahovaných 0., 7. a 20. den pokusu. Na obrázku jsou k jednotlivým píkům *n*-alkanů přiřazeny popisky charakterizující počet uhlíků v řetězci. Poloha píků pristau a phytanu je znázorněna čarou.



Srovnání chromatogramů vzorků extrahovaných 0., 7. a 20. den pokusu. Na obrázku jsou k jednotlivým píkům n -alkanů přiřazeny popisky charakterizující počet uhlíků v řetězci. Poloha píků pristanu a phytanu je znázorněna čarou.