

Miroslav Minařík<sup>1)</sup>, Jan Masák<sup>2)</sup>, Alena Čejková<sup>2)</sup>, Martina Siglová<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> INPOST, Havlíčkova 6, CZ-686 01 Uherské Hradiště, e-mail: miroslav.minarik@quick.cz

<sup>2)</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, CZ-166 28, Praha 6, e-mail: Jan.Masak@vscht.cz

Perzistence organických polutantů v horninovém prostředí vůči biologickému rozkladu není vždy dána toxicitou přítomných kontaminantů, ale také jejich nedostupností pro biologického činitele, kterým je nejčastěji mikroorganismus. Nedostupnost je způsobována buď velmi nízkou rozpustností těchto látek ve vodném prostředí (vysokou hydrofobitou) nebo pevnou sorpcí na povrchu částic zeminy. Pevnost této vazby se obvykle zvyšuje s délkou trvání kontaminace daného prostředí. Jednou z cest, jak zvýšit možnost utilizace takovýchto kontaminujících složek přítomnými (autochtonními), respektive aditivními mikroorganismy, je aplikace povrchově aktivních látek. Vedle zvýšení dostupnosti uhlíkatých substrátů (polutantů) pro mikroorganismy, mohou mít preparáty surfaktantů, vzhledem ke své vysoké povrchové aktivitě a chemickému složení, také negativní vliv na použitého degradéra. V příspěvku jsou porovnány vlastnosti několika komerčně dostupných preparátů surfaktantů z hlediska jejich možného uplatnění při bioremediačních procesech. Testy byly prováděny se smíšenou mikrobiální populací používanou společností INPOST pro biologickou dekontaminaci podzemní vody a zeminy kontaminované ropnými uhlovodíky.

## Materiál a metody

Složení preparátu smíšené mikrobiální populace je uvedeno v Tab. I. Zastoupení uvedených mikrobiálních druhů je výsledkem optimalizace poskytující velmi široké spektrum degradovaných ropných látek a vysoké stability preparátu v proměnlivých podmínkách vnějšího prostředí. V Tab. II je uveden seznam komerčně dostupných surfaktantů, potenciálně použitelných jako aditivní složka bioremediačních procesů.

### Stanovení kritické micelární koncentrace

Dosažení koncentrace surfaktantu, při které se ve vodném roztoku začínají tvořit micely (intermolekulární agregáty surfaktantu), se projevuje skokovou změnou povrchového napětí roztoku. Velikost povrchového napětí roztoků surfaktantů byla stanovena na základě stanovení kapilární elevace.

### Kultivační techniky

**Příprava inokula:** Elenmeyerovy baňky (250 ml) s 50 ml živného bujonu (Hi-Media, India) byly zaočkovány bakteriálními kmeny (Tab. I) uchovávanými na šikmých agarrech. Po 72 hodinách kultivace na třepačce při 20 °C byly jednotlivé populace smíchány a výsledná směs použita pro inokulaci.

**Vliv surfaktantů na růst smíšené bakteriální populace:** Do Erlenmeyerových baněk (250 ml) s 50 ml média BSM byly přidány zdroje uhlíku: (0,1 g/l glukosy + 1 g/l oleje Koramo). Inokulace byla provedena 1 ml výše popsaného inokula. Dále byly přidány surfaktanty v koncentraci 40 mg/l. Tato hodnota se pohybuje v intervalu mezi CMC a dvojnásobkem CMC stanovené pro jednotlivé surfaktanty (viz dále). Variantně byly provedeny kultivace v přítomnosti surfaktantů jako jediných C-zdrojů, resp. kultivace s glukosou + olejem bez aplikace surfaktantů. Růst biomasy byl sledován jako změna optické denzity média měřená při vlnové délce 400 nm proti sterilnímu mediu.

**Stanovení biodegradační aktivity - laboratorní testy:** Do lahví o objemu 1 l bylo odvážena zemina v množství odpovídajícím 100 g sušiny. Odpovídající vlhkosti (ca 40 %) a koncentrace nutrientů bylo dosaženo přidáním 20 ml vody obohacené o živiny v koncentraci: 0,13 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,17 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 3,0 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Paralelně byly provedeny experimenty, kde do lahví byly přidány také surfaktanty v množství 0,030 g/kg suš. zem. Do každé lahve byla vložena zkumavka s 20 ml 1M KOH. Lahve byly uzavřeny a kultivovány 1 týden při pokojové teplotě. Mikrobiologický rozbor byl proveden kultivací na MPA agaru a agaru M-63 obsahujícím jako jediný C-zdroj motorovou naftu.

## Výsledky a diskuse

Při CMC (kritická micelární koncentrace) vytváří příslušná povrchově aktivní látka agregáty - micely, do kterých se mohou zachytit hydrofobní látky a zvýšit tak svůj podíl ve vodné fázi. V Tab. III jsou uvedeny hodnoty CMC testovaných surfaktantů. Interakce testovaných surfaktantů na smíšenou mikrobiální populaci (Tab. I) byla ověřena za různých modelových situací (Tab. IV, Obr. 1 - 3). Z výsledků je patrné, že žádný z aplikovaných surfaktantů nevytvořil v prostředí podmínky, které by vedly ke zvýšení růstu biomasy ve srovnání s kontrolním experimentem (bez aplikace surfaktantu). Přesto byly nalezeny mezi jednotlivými preparáty značné rozdíly. Mírně negativní vliv na růst měly preparáty Reoclean, Biocleaner a Slovasol v pořadí jak jsou uvedeny. Z hodnocení Obr. 3 plyne, že žádný z testovaných surfaktantů není za daných kultivačních podmínek využíván smíšenou mikrobiální populací jako zdroj uhlíku a energie. Negativní účinky na buněčnou populaci za těchto nerůstových podmínek se projevují u jednotlivých preparátů různou měrou. Z tohoto pohledu lze mezi surfaktanty nejšetnější k smíšené bakteriální populaci zařadit zejména Reoclean a Slovasol. Pokud do hodnocení zahrneme také cenu preparátů, vychází jako nejvhodnější preparát Reoclean. Velmi důležité je také zjištění, že právě Reoclean uvolnil ze vzorku zeminy s pevně vázanou organickou fází největší podíl ropných uhlovodíků (výsledky nejsou uvedeny).

Reoclean a Slovasol byly vybrány pro další experimenty zaměřené na ověření posílení biodegradace vysoce hydrofobních resp. pevně sorbovaných ropných uhlovodíků v zeminách. Laboratorní testy biodegradační aktivity a byly provedeny se vzorky reálné zeminy dlouhodobě kontaminované ropnými uhlovodíky s převahou nafty a motorového oleje. Celková koncentrace NEL byla 24 000 mg/l. Výsledky jsou shrnuty v Tab. IV. V přítomnosti surfaktantu Reoclean bylo opět dosaženo nejlepších výsledků, a to jak z hlediska reprodukce mikroorganismů v průběhu experimentu, tak z hlediska rychlosti degradace ropného znečištění.

## Závěr

Aplikace surfaktantů jako součásti bioremediační technologie může výrazně urychlit biodegradační proces a stabilizovat mikrofloru, která se na tomto procesu podílí. Takováto modifikace technologie však musí vycházet ze znalostí základních fyzikálně-chemických vlastností preparátu (CMC, povrchová aktivita) a jeho biologické aktivity vůči přítomným mikroorganismům.

Tab. I Seznam kmenů zastoupených v preparátu

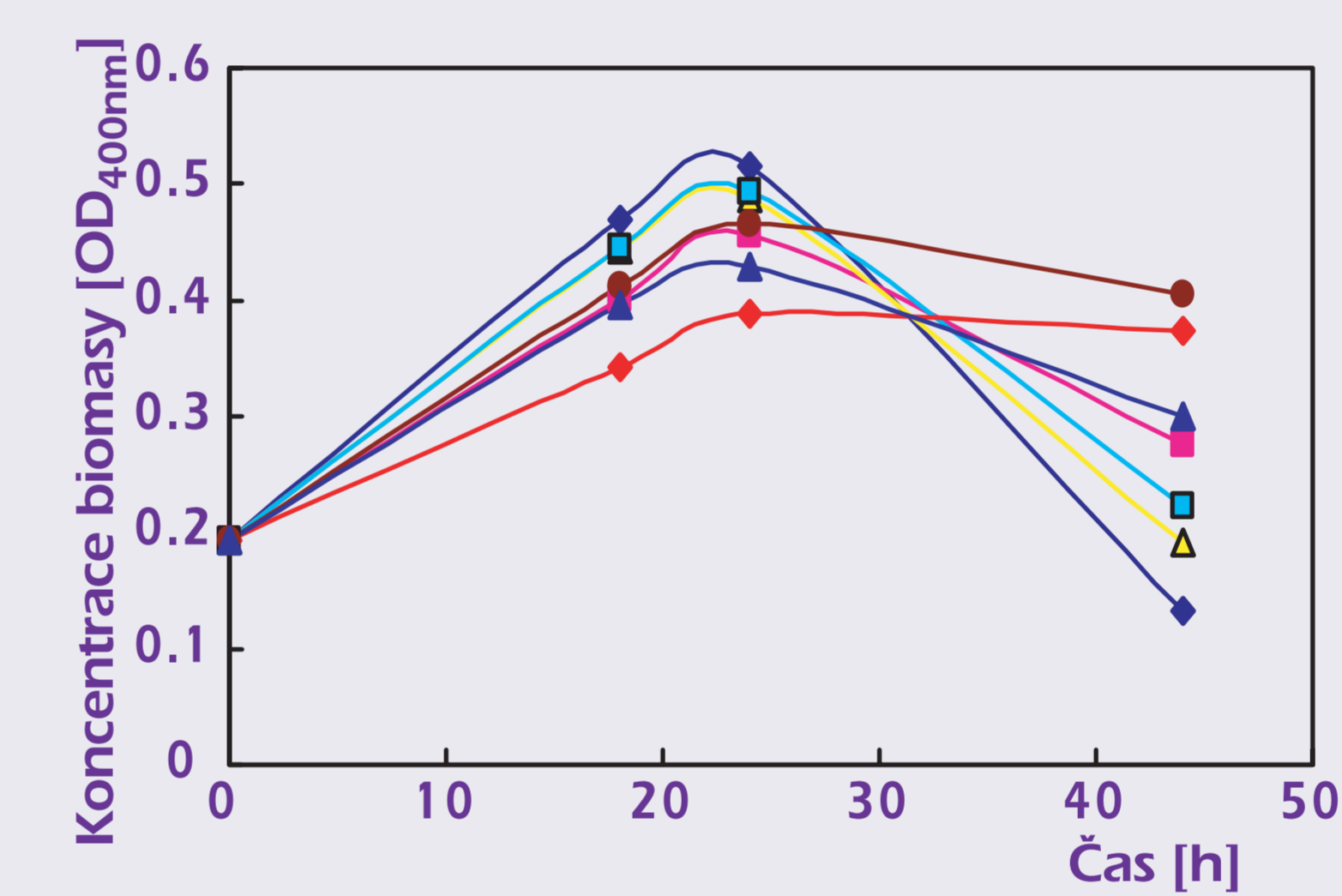
1	<i>Gordonia terrae</i> CCM 2633
2	<i>Pseudomonas putida</i> CCM 3423
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2115
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1K
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AB
6	<i>Rhodococcus coprophilus</i> CCM 2723
7	<i>Ralstonia eutropha</i> CCM 3726

Tab. II Seznam testovaných surfaktantů

1	Mighty Mike
2	Biocleaner
3	Reoclean
4	SuperNeu R
5	Slovasol 255
6	Slovasol 255.13

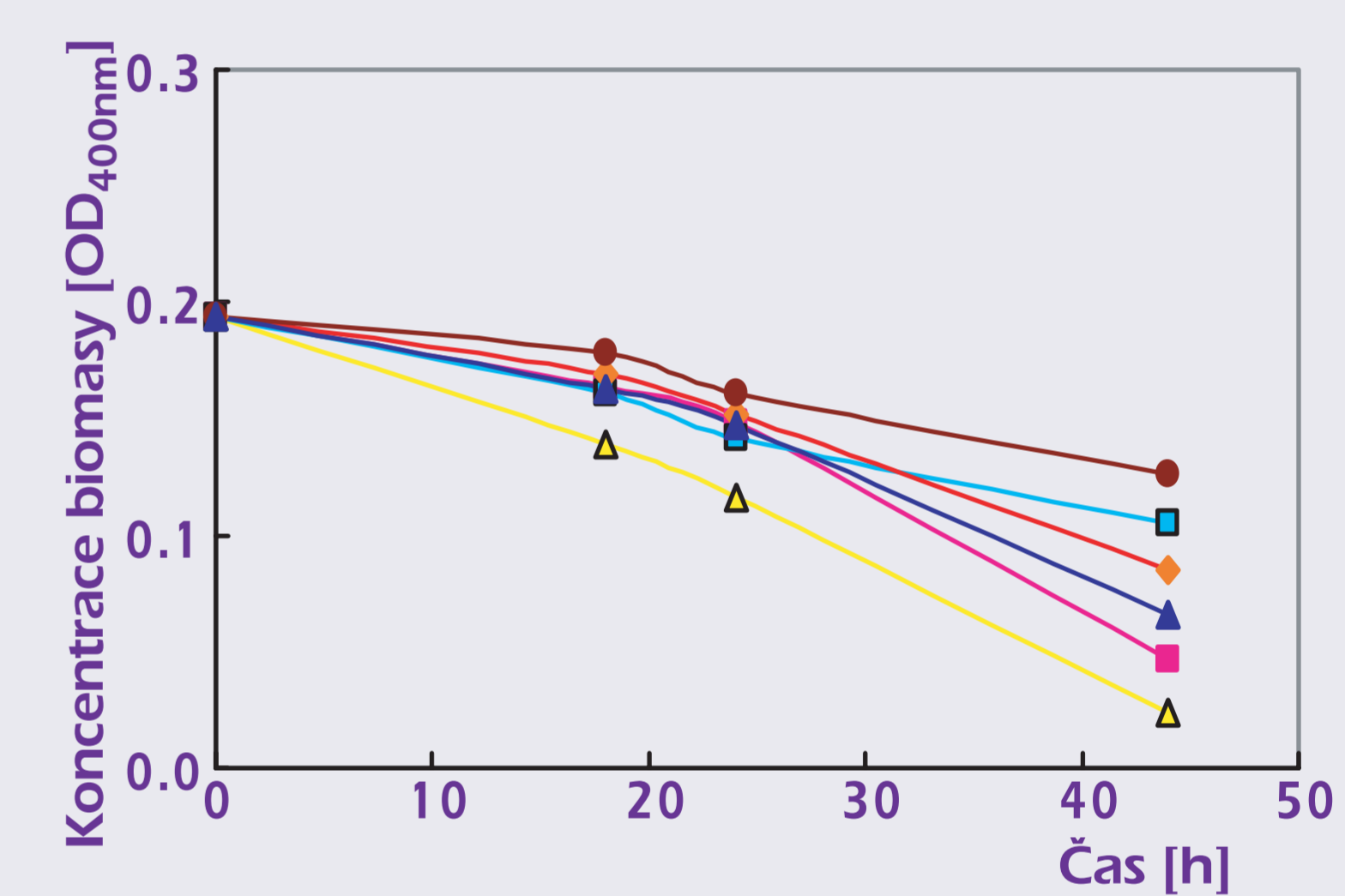
Tab. III Kritické micelární koncentrace testovaných surfaktantů.

Sufaktant	Mighty Mike	Biocleaner	Reoclean	SuperNeuR	Slovasol	Slovasol 255.13
CMC [g/l]	0,034	0,034	0,025	0,035	0,021	0,021



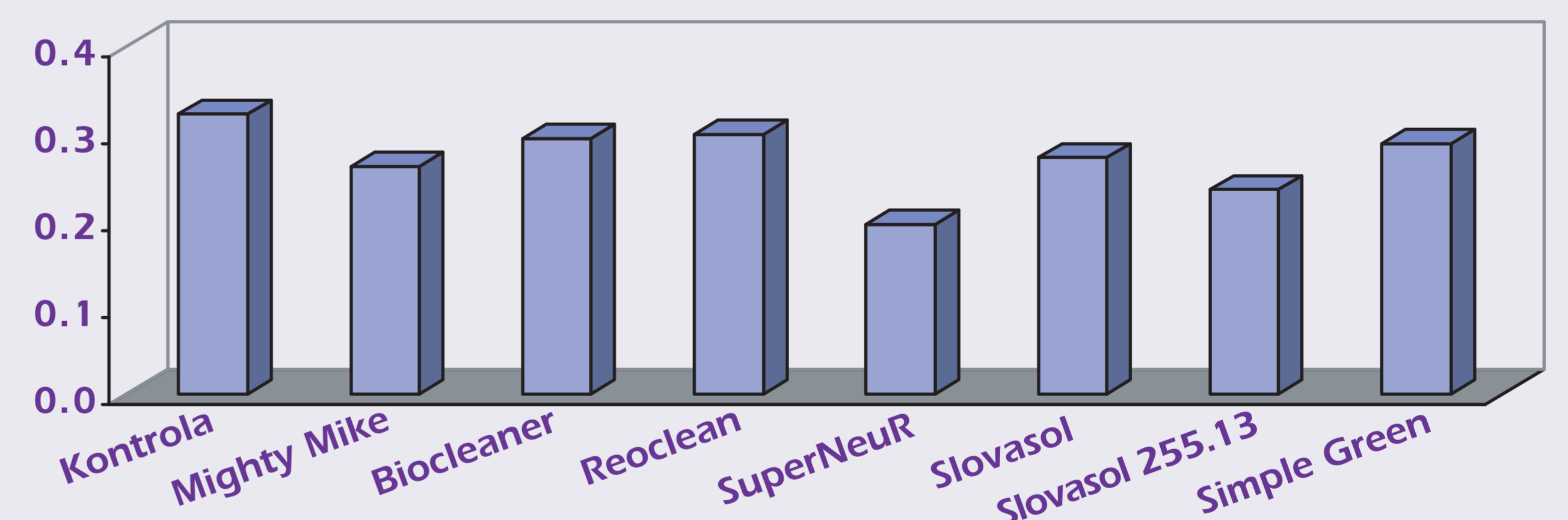
Obr. 1 Vliv přítomnosti surfaktantů v mediu na růst smíšené populace na pozadí glukosy a oleje jako zdrojů uhlíku a energie.

Legend: Mighty Mike; Biocleaner; Reoclean; SuperNeu R; Slovasol; Slovasol 255.13; kontrola



Obr. 3 Vliv přítomnosti surfaktantů na koncentraci smíšené populace v průběhu kultivace v minerálním mediu bez C-zdroje.

Legend: Mighty Mike; Biocleaner; Reoclean; SuperNeu R; Slovasol; Slovasol 255.13



Obr. 2 Vliv přítomnosti surfaktantů v mediu na maximálně dosaženou koncentraci biomasy smíšené populace na pozadí glukosy a oleje jako zdrojů uhlíku a energie.

Tab. IV Vliv přítomnosti surfaktantů na biodegradační aktivitu v zemině kontaminované ropnými uhlovodíky

	Počátek experimentu		Konec experimentu			
	Heterotrofní mikroorganismy 1/g		Heterotrofní mikroorganismy 1/g		CO <sub>2</sub>	BA
	celkem	degrad. naftu	celkem	degrad. naftu		
Kontrola	1,843x10 <sup>6</sup>	1,05x10 <sup>5</sup>	3,73x10 <sup>7</sup>	8,99x10 <sup>5</sup>	355,81	110,30
Slovasol	1,843x10 <sup>6</sup>	1,05x10 <sup>5</sup>	3,85x10 <sup>7</sup>	4,58x10 <sup>6</sup>	430,52	133,46
Reoclean	1,843x10 <sup>6</sup>	1,05x10 <sup>5</sup>	4,34x10 <sup>7</sup>	1,05x10 <sup>7</sup>	501,50	155,47

CO<sub>2</sub> - [mg CO<sub>2</sub> / kg zeminy / 24 h]

BA - [mg RU / kg zeminy / 24 h]