

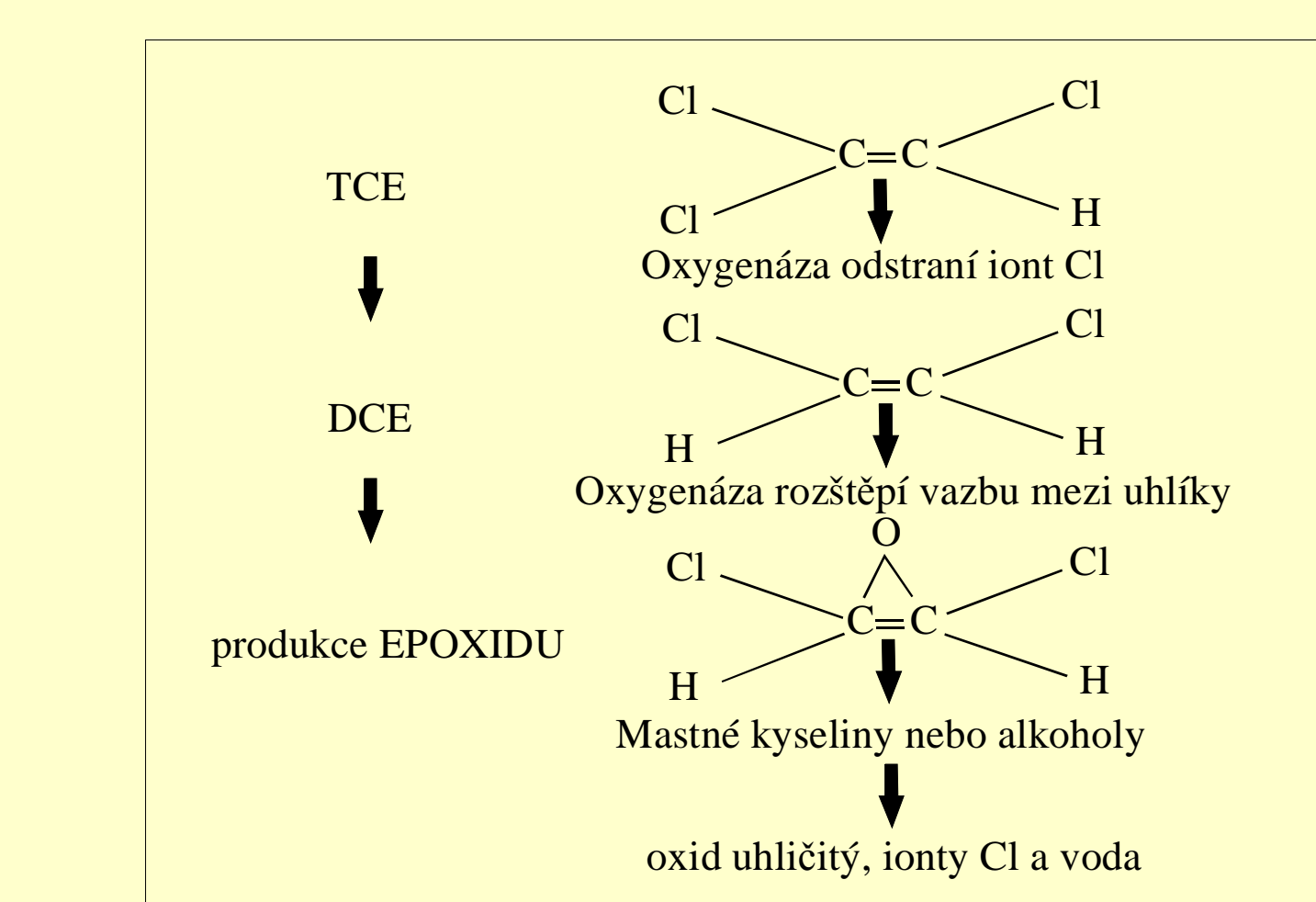
Chlorované uhlovodíky jsou vysoce toxické a obtížně odbouratelné polutanty. Mezi nejrozšířenější kontaminanty této skupiny patří chlorovaná rozpouštědla, pesticidy a v neposlední řadě polychlorované bifenylly. Jejich perzistence (schopnost přetrvávat v prostředí po dlouhou dobu beze změny), je způsobena jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi a chemickou strukturou. Trichlorethen (TCE) je kontaminantem podzemních vod a půd.

Bioremediace chlorovaných rozpouštědel (TCE, PCE) byla velice úspěšná v anaerobních podmínkách - tj. reduktivní dehalogenace. Nicméně tento úspěch byl limitován tvorbou a akumulací DCE a VC (toxické, karcinogenní látky). Také udržet anaerobní podmínky po celou dobu je obtížné a také anaerobní degradace je ve srovnání s aerobní degradací pomalejší. Další úspěšná technologie schopná odstranit HOL (halogenované organické látky) je chemická oxidace (technologie při níž se prostředí výrazně ovlivňuje - oxiduje a desinfikuje s tvorbou solí a oxidů např. Mn, výhodou je relativně rychlost) a propustné reaktivní bariéry s náplní např. Fe<sup>0</sup> (technologie závislá na vstupní koncentraci HOL, je relativně dlouhodobá a stavebně náročná).

Důstojnou alternativou nebo doplněním dříve aplikovaných technologií je aerobní degradace resp. aerobní kometabolismus (trichlorethenu (TCE), dichlorethenu (DCE) pomocí takových kmenů, kde by akumulace intermediátů byla minimalizována.

Jsou popsány tři hlavní metabolické dráhy, pomocí kterých dochází k odbourávání HOL:

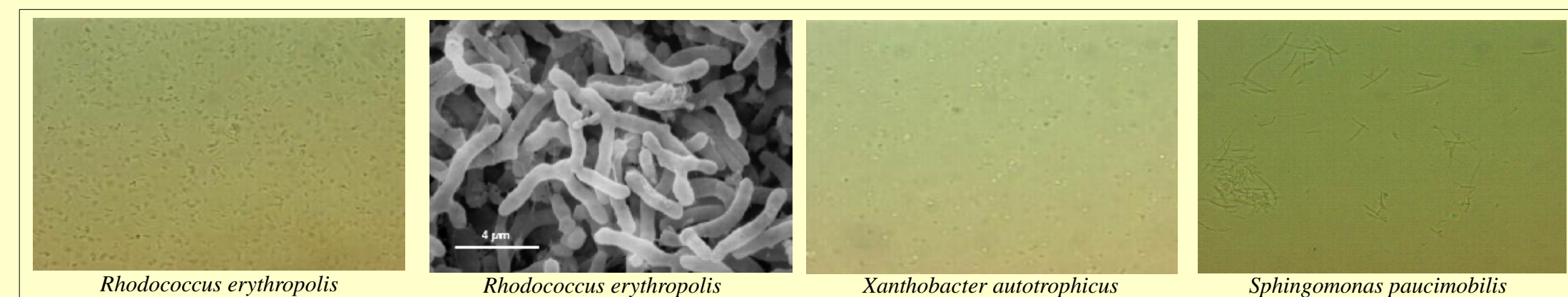
- Začlenění do centrálního metabolismu** (modifikace chemické struktury adekvátní metabolickou reakcí a zapojení této molekuly do již existující metabolické dráhy, eq. methylotrofní a methanotrofní bakterie)
- HOL je finálním akceptorem elektronů** (některé mikroorganismy jsou schopny redukovat HOL za současné produkce ATP, eq. redukce 3-chlorobenzoátu na benzoát u Desulfomonile tiedjei, reduktivní dechlorace tetrachlorethenu na 1,2-dichloroethen u Dehalobacter restrictus)
- Kometabolismem** (bakterie, mající ve svém enzymatickém vybavení široké spektrum katabolických enzymů, mohou transformovat HOL bez jejich zapojení do metabolismu energie či uhlíku)



obr. č. 1: Rozpad TCE kometabolismem

**Technologie aerobní degradace (procesem kometabolismu) TCE, DCE** byla vyvíjena, testována a schválena s mikroaerofilními kmeny *Rhodococcus erythropolis* (RE), *Xanthobacter autotrophicus* (XA) a *Sphingomonas paucimobilis* (SP), které jsou vybaveny enzymovou aktivitou umožňující dehalogenaci alifatických a aromatických

halogenovaných uhlovodíků. Pro ověření možností aplikace uvedených mikroorganismů v rámci vývoje bioremediačních technologií byl sledován vliv podmínek vnějšího prostředí na jejich reprodukční aktivitu a aktivitu enzymů klíčových pro dechloraci. Žádný z kmenů není schopen využívat PCE, TCE a trans-DCE jako jediný zdroj uhlíku a energie.



obr. č. 2: Bakteriální kmeny

Aplikace výše uvedených mikrobních kmenů vede k degradaci halogenovaných organických látek kometabolismem tzn., že přítomné polutanty (TCE, tDCE) neslouží jako primární zdroj uhlíku a energie. Aplikované mikroorganismy mají ve svém enzymatickém vybavení široké spektrum katabolických enzymů, kterými transformují halogenované organické látky aniž je přímo využijí jako zdroj uhlíku či energie.

Životní činnost mikroorganismů, jejich vývoj i veškeré aktivity jsou závislé na fyzikálních, chemických a biologických faktorech. Aby se mohly mikroorganismy rozmnožovat, musí být v prostředí jak dostatečné množství látek pro syntézu buněčné hmoty a dostatečné množství zdroje využitelné energie, tak i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se značně přizpůsobovat vnějším podmínkám změnou enzymového vybavení svých buněk.

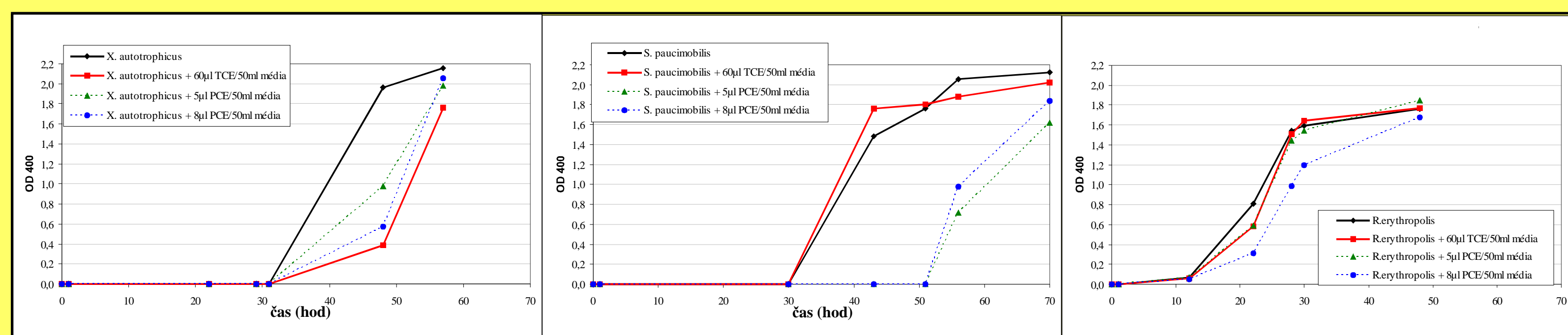
Rozsah vnějších podmínek, ve kterých jsou mikroorganismy schopny růst a disponovat enzymovou aktivitou nutnou pro degradaci HOL procesem kometabolismu, jsou rodově značně rozdílné.

**Mezi faktory vnějšího prostředí, ovlivňující činnost mikroorganismů patří:**

1. kvantita a kvalita polutantu,
2. kvalita substrátu,
3. přítomnost kyslíku,
4. kvalita nutrientů a jejich dostupnost pro mikroorganismy,
5. teplota,
6. pH, iontová síla,
7. přítomnost toxinů.

## ad 1. kvantita a kvalita polutantu:

Byl sledován vliv polutantu na růst mikroorganismů a zjištěna jejich letální koncentrace v aerobních podmínkách. Podle výsledků růstových křivek sledovaných mikroorganismů je možno konstatovat, že mezi těmito mikroorganismy jsou diference. RE má výrazně kratší lag fázi (12 hod) oproti XA (32 hod) a SP (32 hod) a to o dvacet hodin, nicméně celkový nárůst biomasy ve stacionární fázi růstu je u všech kmenů srovnatelný. Nasycené roztoky PCE a TCE na sledované kmeny nepůsobí toxicky a výrazně neovlivňují jejich růst, pouze u kmene SP je lag fáze v přítomnosti polutantu o dvacet hodin delší než kultivace bez přítomnosti polutantu.



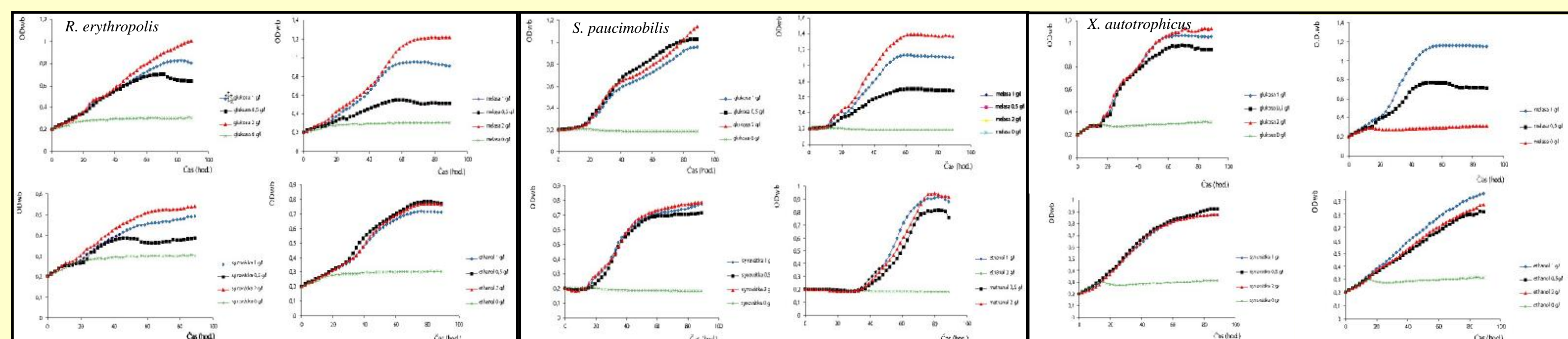
obr. č. 3: Růstové křivky testovaných mikroorganismů v závislosti na koncentraci polutantu

## ad 2. kvalita primárního substrátu:

Sledována byla také závislost růstu mikroorganismů na kvalitě a kvantitě substrátu. V případě biologických procesů se musí uvažovat minimální koncentrace substrátu, pod jejíž hladinou už degradace neprobíhá. Tato koncentrace je dána hladinou nutnou pro indukci enzymů, spotřebou energie apod. Při odbourávání polutantů kometabolismem se využívá enzymové nespecifity a proto je nutné primární („růstový“) substrát udržovat nejméně na minimální koncentraci.

Největší nárůst biomasy byl zaznamenán na melase a glukose, naopak nejhorší na methanolu. Zajímavé jsou růstové křivky, kde v případě kultivace na syrovátce, methanolu a ethanolu byl zaznamenán růst rovnoměrný v čase a není patrný přechod ani do exponenciální, ani do stacionární fáze růstu. Při srovnání všech tří bakterií je možno konstatovat, že nejvyšší reprodukční aktivita mikroorganismů byla zaznamenána na glukose a na melase.

Tento výsledek se dal očekávat, jelikož glukosa je nejsnazší využitelným zdrojem uhlíku a energie a melasa kromě snadno využitelného zdroje uhlíku a energie (sacharosa) obsahuje také různé aminokyseliny a jiné růstové faktory, které pozitivně ovlivňují růst.



obr. č. 4: Růstové křivky bakteriálních kmenů v závislosti na kvalitě a kvantitě primárního substrátu

## ad 3. přítomnost kyslíku:

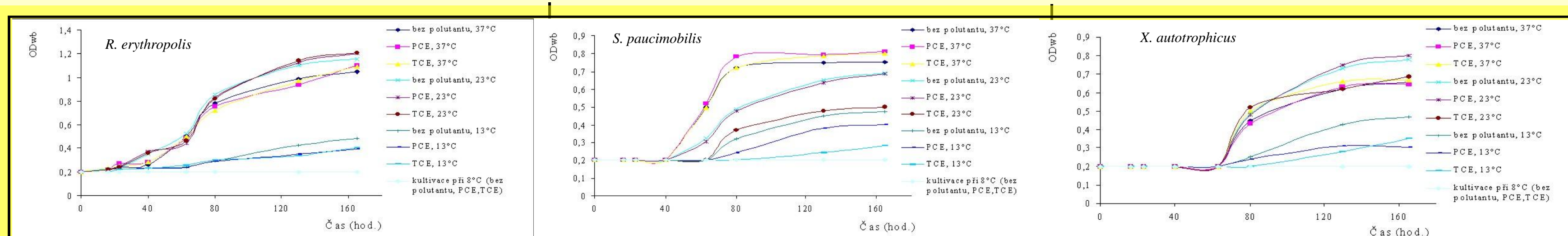
Dále byl sledován vliv statické kultivace v podmínkách aerobních a anaerobních. Mikroorganismy se značně liší svým vztahem ke kyslíku, a proto také vyžadují různý oxidačně-redukční potenciál. Růst u sledovaných bakterií je jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti polutantu v anaerobních statických kultivacích méně intenzivní než u kultivací statických aerobních, nicméně všechny tři bakterie jsou schopny růstu v nasyceném roztoku PCE, TCE i tDCE, pouze SP v nasyceném roztoku tDCE neroste. U všech kultivací nebyl pozorovatelný rozdíl nárůstu biomasy po sedmi dnech a po šestnácti dnech. Ačkoli použité mikroorganismy preferují aerobní prostředí, jsou schopné tolerovat i anoxické podmínky. Prokázalo se, že v přítomnosti primárního zdroje uhlíku a energie (např. 1 g l<sup>-1</sup> glukosy) je dechlorace TCE obecnou vlastností sledovaných mikrobních kmenů ve výše uvedeném rozpětí podmínek vnějšího prostředí.

## ad 4. kvalita nutrientů:

Kromě vhodného C-zdroje vyžadují testované kmeny pouze základní minerální nutrienty. Vhodného poměru C:N:P se dosahuje přidáním asimilovatelného zdroje těchto prvků. Základní nutrienty z prostředí musí pokrývat veškeré požadavky mikroorganismů na energii a na stavební kameny pro syntézu buněčné hmoty. Všechny kmeny byly testovány na zjišťování optimální koncentrace N a P.

## ad 5. teplota:

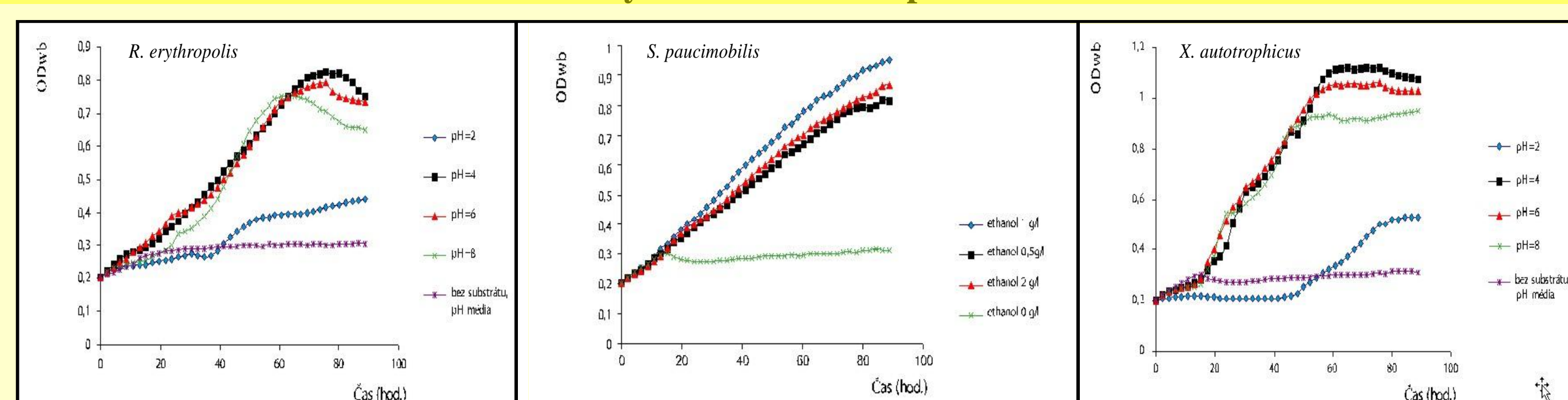
Teplota prostředí do značné míry determinuje skladbu mikrobiální populace v otevřeném biologickém systému. V přírodě, tam kde dochází ke změnám ročních období a potažmo i ke změnám teplot, dochází v závislosti na teplotě také ke zvyšování či snižování mikrobiální aktivity. Při snižující se teplotě klesá biodegradční aktivita, inhibice nastává až při cca +4°C.



obr. č. 5: Růstové křivky v závislosti na teplotě

## ad 6. pH:

Růst mikroorganismů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat jen v určitém rozmezí pH. Většina bakterií roste v kyselém či slabě alkalickém prostředí. U všech sledovaných mikroorganismů se pro průběh biodegradace jeví jako optimální pH od 4 do 8. Tato skutečnost dává možnost maximálního využití enzymatického aparátu sledovaných bakterií pro detoxikaci půd, jelikož pH půdy je ideální pro biodegradaci TCE a její vysoká pufrací kapacita toto pH udržuje i přes vznik kyselých metabolitů při rozmnožování a růstu bakterií, které v laboratorních kultivacích snižují pH až na hodnotu 2, což vede v tomto prostředí k inhibici růstu.



obr. č. 6: Růstové křivky v závislosti na pH

**ZÁVĚR: PCE, TCE, tDCE a VC nemá v metabolismu bakterií RE, SP a XA zatím funkci růstového substrátu. PCE, TCE, tDCE a VC v aerobním třepaném i statickém systému zásadně neovlivňují růst sledovaných bakterií a tudíž lze tyto bakterie exponovat nasyceným roztokům HOL. Byly nalezeny ideální podmínky (primární substrát, teplota, kyslík a pH) pro růst bakterie RE, SP a XA. Všechny sledované bakterie jsou schopny degradovat TCE, tDCE, VC v aerobním systému, přičemž jejich degrační schopnost je podobná a probíhá v průběhu celé růstové křivky, maximální koncentrace chloridů uvolněných z TCE je 13,1 mg.l<sup>-1</sup>.**

Byla vyvinuta nová technologie, která využívá testované mikroorganismy ke konverzi kontaminujících látek vedoucích k úplné mineralizaci kontaminantů na anorganické látky. Jedná se o nepatogenní, netoxické, otestované mikroaerofilní kmeny, které dokážou alifatické a aromatické chlorované uhlovodíky z životního prostředí odstraňovat bez tvorby a akumulace intermediátů např. vinylchloridu. Výhodou této technologie aerobní degradace TCE, DCE, VC je, že je možno celý biodegradční proces výrazně řídit a nevznikají při něm toxické nebo nebezpečné intermediáty.