

## BIOREMEDIACE POLUTANTŮ ZE SKUPINY ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ – VÝVOJ TECHNOLOGIE OD LABORATOŘE PO REÁLNOU APLIKACI

**Martina Siglová, Jiří Mikeš, Vlastimil Pištěk, Miroslav Minařík**  
EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, e-mail:vyvoj@epssro.cz

V předkládaném příspěvku je naší snahou podat ucelené informace o tom, jakým způsobem se postupuje z pohledu R&D (výzkumu a vývoje) při konstrukci nové bioremediační technologie, tedy o transferu laboratorních dat do praxe a zohlednění legislativního pozadí na případové studii ftalátů.

Ačkoliv bioremediační technologie jsou jen malou částí sanačních technologií zabývajících se likvidací nebezpečných kontaminantů, jedná se o jeden z nejrychleji se rozvíjejících sektorů tohoto oboru. Je to zejména díky:

- a) stále se rozvíjející výzkumné základně
- b) přijímání nových environmentálních zákonů a rozšiřování schopnosti jejich vymáhání
- c) a konečně jedním z důležitých faktorů je stále vzrůstající zájem populace o ekologické problémy, nezávadnost a trvalou udržitelnost stavu našeho životního prostředí.

Ustanovení, přijetí a rozšiřování environmentálních zákonů je velmi dobrým podnětem pro rozvoj environmentálních biotechnologií, a to i přesto, že řada průmyslových odvětví hodnotí tyto snahy jako mrhání finančními prostředky. Hybnou silou pro sanační technologie je nezřídka zejména důrazné vymáhání práva ze strany vládních regulací a zákonů.

Celkový rozsah využívání environmentálních technologií je dán příslušnými zákony, zejména proto, že sanační procesy jsou pro jejich zadavatele neekonomické a nebývají realizovány bez určitého tlaku vlády atd. V USA je takováto legislativa spravována agenturou US EPA, což je prováděcí a kontrolní agentura, která řídí a monitoruje programy založené na US environmentální legislativě.

Obdobného stavu se pokouší dosáhnout i EU, bohužel jak vyplývá z dostupných dat [1] informace o environmentálním průmyslu zůstávají nekompletní a nekonzistentní v mnoha ohledech. Data prezentovaná níže jsou založena na nejrelevantnějších a dostupných informačních zdrojích a odhadech souhrnně zpracovaných v akčním plánu EU nazvaném Euro-Environ 2008-2010 [2].

Většina investic v průmyslu životního prostředí je a v nejbližších letech bude inkorporována zejména do odvětví environmentálního R&D, kontroly znečištění ovzduší, úpravy odpadních vod a nakládání s odpady. Konkrétně se jedná o finanční prostředky určené primárně na soulad legislativy všech členů EU, vývoj a stabilizaci nových segmentů trhu nebo inovativních řešení, zavedení pobídkových mechanismů apod. Rozvoj nových segmentů trhu se týká zejména později přijatých členů EU, neboť z celkového obrátu trhu environ. technologií v EU-25, který je odhadován na 227 000 €milionů činí 214 000 milionů € podíl odpovídající pouze EU-15 (staré členské státy EU). Mezi největší národní trhy patří zejména Francie a Německo (cca 49% celkového obrátu v roce 2004), dále UK, Itálie a Nizozemí (cca 24% celkového obrátu v roce 2004) a nové členské státy reprezentují v témže roce pouze 5,7 % celkového obrátu (přičemž polovina obrátu připadá na samotné Polsko). Z tohoto pohledu je nutné věnovat patřičnou pozornost rozvoji oblastí environmentálních technologií nových členských států EU. Je nutné nejen rozvíjet regionální a národní výzkumná centra, ale také vstoupit pomocí vlastních slibně se rozvíjejících aktivit do evropského výzkumného prostoru [2].

Regionální centra výzkumu však nejsou zanedbatelná ač zajišťují především identifikaci nutných inovací a požadavků pro daný region. Regionální nebo národní centra výzkumu by měla být schopna odpovídat zejména na následující naléhavé otázky:

- Která z environmenálních technologií bude vyvíjena v příštích 3-5 letech(s ohledem na nové regulace, stanovení nových zásad, přijetí nové legislativy apod.)?
- Jaké konkrétní projekty a analýzy mají v daném regionu deficit a tudíž potenciál se uplatnit?

- Kteří regionální „hráči“ jsou připraveni vstupovat do technologických a vědecko-výzkumných kooperací a to nejen s národními, ale i mezinárodními partnery?
- Jak posílit výzkum v oblasti environmentálních technologií, definovat priority R&D a podpořit rozšíření slibných technik apod.?
- A v neposlední řadě jak pokrýt ekonomické náklady spojené s environmentálním R&D?

Zástupci společnosti EPS, s.r.o. jsou přesvědčeni, že osvojení a transformace objevů a produktů kreativního myšlení je základní definice inovace jako procesu, jehož prostřednictvím lze významně rozšířit a obnovit škálu nabídky produktů a služeb. S ohledem na skutečnost, že dominující preferencí na trhu environmentálních technologií je nabídka služeb, resp. technologických celků, soustředí se naše úsilí na formování předmětu nabídky a poptávky do podoby nástrojů, jejichž prostřednictvím obchodní partner obdrží za své vynaložené prostředky aplikaci konkrétní biotechnologie s plným servisem. Vzhledem k tomu, že spektrum poznatků získaných výzkumnou činností se neustále zvětšuje a prohlubuje, představuje právě transfer těchto informací do podoby komerčních produktů a služeb důležitou hybnou sílu, díky které lze získávat konkurenční výhodu a dosahovat uspokojení poptávky ze strany trhu.

Oblast environmentální biotechnologie, podobně jako biotechnologie obecně, je odvětvím, jejichž alfa a omega jsou procesy založené na schopnostech, projevech a aktivitách biologických činitelů uchopených technicky tak, aby bylo dosaženo co nejvyššího efektu z jejich činnosti. Výrazný interdisciplinární charakter vyžaduje především dobrou orientaci ve všech disciplínách, které vytváří zmíněný mezioborový překryv. Jedná se zejména o soubor biologicko-chemických, inženýrských, hydrogeologických a ekonomických vědomostí. Jsou-li tyto skutečnosti splněny, vzniká dobrý předpoklad pro výrazný posun v efektivitě aplikace výstupů inovačního procesu.

V následujícím příspěvku bude na obecné platformě (doplněné o konkrétní *case study* dekontaminace sloučenin na bázi esterů kyseliny ftalové) nastíněna komplexnost procesu vývoje biologické technologie použitelné pro nápravy škod na životním prostředí a v mnoha případech nezbytnost úlohy R&D oddělení pro správnou funkci technologií při full-scale aplikacích.

V zásadě je možné volit ze dvou obvyklých technologických přístupů. Fyzikálně-chemické prostředky nápravy životního prostředí jsou z hlediska cíleného využití člověkem vývojově starší, avšak z hlediska ekonomického v řadě případů nákladnější než-li bioremediační postupy. Jejich uplatnění je oceňováno zejména tam, kde koncentrace polutantu dosahuje natolik vysokých koncentrací, že uplatnění prostředků dekontaminace pomocí biologického činitele je z fyziologických důvodů nepoužitelné, resp. možné pouze pro dočištění dané lokality.

Kontaminace ftaláty (modelový polutant) spíše vyhovuje definici plošné kontaminace, kdy koncentrace polutantu je nízká, avšak se závažným dopadem na ekosystém (karcinogenita, poškození endokrinního systému apod.). V tomto případě jsme tedy přednostně uplatnili biologický způsob dekontaminace – vývoj nové, bioremediační technologie, která v ČR a okolních státech dosud zcela chybí. Biologické metody navíc přinášejí řadu výhod, zejména díky velké flexibilitě a diverzitě biologických systémů, možnosti provádění sanace tzv. *in-situ* (tj. v místě aktuálního výskytu znečištění) a v neposlední řadě nízké ceně nápravných opatření.

Společnost EPS, s.r.o. zahájila výzkumný program týkající se biodegradace vybraných esterů kyseliny ftalové v roce 2007. Vlastní experimentální práci předcházela odborná rešerše recentních literárních pramenů, která výrazně napomohla vytvoření si povědomí o stavu poznání v oblasti nejenom přímo se dotýkající schopnosti mikroorganismů využívat látky na bázi ftalátů jako svůj zdroj uhlíku a energie, popř. je jinak metabolicky transformovat, ale podrobně si všímala širokého kontextu role a osudu těchto antropogenních polutantů v prostředí, v průmyslových aplikacích, z pohledu fyzikálního a analytického chemika a v legislativně-právním rámci.

Laboratorní práce byly zahájeny otevřením dvou paralelních směrů, jejichž cílem je buď izolovat vhodné kmeny vybavené biodegradačními schopnostmi z přirozené matrice kontaminované ftaláty

nebo adaptovat sbírkový kmen s bioremediačním potenciálem a následně získat ucelený obraz o jeho metabolických a fyziologických vlastnostech a chování ve stresových podmínkách a v podmínkách environmentálních výkyvů. Součástí studie je rovněž vyřešení přípravy kultivačních médií, zohlednění abiotických aspektů chování ftalátů a promítnutí do experimentální mikrobiologické práce [3]. Výsledkem jsou v současné době dva otestované, identifikované bioremediační taxony s prokazatelným potenciálem využít ftaláty jako svůj růstový substrát bez akumulace dalších nežádoucích meziproductů.

Naše pozornost byla v první fázi experimentů zaměřena zejména na význam selekčního tlaku přítomnosti polutantu v přirozeném prostředí, který významným způsobem transformuje skladbu přítomných mikrobiálních konsorcií. Nezanedbatelné změny, k nimž od okamžiku vstupu kontaminantu do prostředí většinou začne docházet, vedou k selekci přítomných kmenů takovým způsobem, že v prostředí setrvávají pouze ty mikrobiální taxony, které v sobě dokázaly zúročit potenciál přežití a nalézt takovou strategii, jež jim dovolila nalézt vhodný substrát (zpravidla v podobě kontaminantu, jímž je daná lokalita znečištěná). I přes skutečnost, že kultivovatelnost všech mikrobiálních druhů přítomných v biotopech Země je dodnes pouze částečná (a řada kmenů není standardní cestou kultivovatelná vůbec), lze pomocí rozboru a charakterizace profilu půdní mikroflóry na kontaminované lokalitě získat pozoruhodné mikrobiální činitele, na jejichž metabolických a fyziologických projevech lze zkonstruovat účinnou biologickou technologii aplikovatelnou k nápravě environmentálních škod.

Alternativou k tomuto postupu je přeskočení výše uvedené cesty a jejím nahrazením kmenem, který je součástí některé kolekce či jiné sbírky mikrobiálních taxonů a který je uváděn v literatuře jako potenciálně schopný degradér daného polutantu. V našem případě však tento experimentální přístup selhal a naše pozornost byla nadále zaměřena na analýzu a izolaci spektra přítomných mikroorganismů ze vzorku matric odebraných z místa výskytu antropogenního znečištění ftaláty.

Předpokladem pro plnohodnotnou práci je striktní dodržení zásad správné praxe vzorkování, zejména z hlediska šetrné manipulace a dodržení skladovacích požadavků. Vstoupí-li vzorek do laboratoře za účelem jeho využití jako zdroje potenciálně vhodných taxonů pro vývoj příslušné bioremediační technologie, představuje první důležitý krok volba strategie jeho zpracování. Zdánlivě snazší se jeví vzorky kapalné, naopak vzorky horninového prostředí s sebou přináší zásadní komplikaci v potřebě uvědomit si, že drtivá většina mikroorganismů v prostředí přežívá ve formě upoutaných populací k neživým povrchům a je schopna dokonale osídlit jakýkoliv mikroprostor v půdní matrici, jenž poskytne elementární a esenciální potřeby pro přežití ve, většinou poměrně nehostinném, prostředí. Jedná se zejména o zdroje vody, neboť vodní aktivita na určité hodnotě je klíčem pro to, zda v daném prostředí konkrétní taxon bude schopen života. Právě maximalizace uvolnění co největšího počtu přítomných mikrobiálních zástupců do osmoticky příznivého roztoku je základem pro úspěšný popis, charakterizaci a následný výběr biologických činitelů.

Po výše uvedeném izolačním kroku následuje fáze kultivačního vyšetření. V environmentální praxi je osvědčeným prostředkem v kultivačním rozboru používání různě modifikovaných kultivačních prostředí, které poslouží ke zkoušce schopnosti reprodukční aktivity za stanovených podmínek a v konečném v důsledku by měly tyto experimenty poskytnout náhled na tu část mikrobiální populace, jež je schopna přítomný polutant využívat jako svůj zdroj uhlíku, jiných stavebních prvků a energie.

Závěrečnou fází v předešlém textu popsaných technik je vyhodnocení získaných výsledků. V našem případě bylo označeno 8 morfologicky (vzhledově) se lišících kolonií a v podobě tzv. technicky čisté kultury byly přeneseny izolovaně do samostatné kultivační nádoby. Tomuto postupu se říká selekce a jejím výstupem je obdržení sady přítomných mikrobiálních činitelů, které se od sebe významně morfologicky či fyziologicky odlišují. V této fázi je dokončena práce, která souvisí s popisem a charakterizací mikrobiálního profilu přítomného v studované matrici a jako hmatatelný výsledek lze označit získání sady kmenů, u nichž je možné předpokládat vybavenost takovými metabolickými nástroji, jejichž prostřednictvím může být degradován cílový polutant, např. námi zkoumané estery kyseliny ftalové.

Dále následuje proces, jehož účelem je získat široký soubor informací o metabolických a fyziologických projevech vybraných mikrobiálních kmenů, jež byly vyizolovány a následně vyselektovány v předešlých pasážích práce. Není-li laboratoř vybavena vhodným přístrojovým zázemím, představuje tento mezikrok časově, materiálově a také z hlediska lidských zdrojů velmi nákladnou část. Společnost EPS, s.r.o. však využívá multikultivační zařízení, jehož přidaná hodnota spočívá ve významné redukci časové dotace na navržené experimenty spojené s opatřováním dat o metabolismu izolátů, neboť je schopno paralelně provádět až dvě stovky kultivačních experimentů. Díky této vysoké operativnosti bylo možné v poměrně krátkém časovém období celkem snadno oddělit kmeny, s nimiž pro další výzkum a vývoj nelze počítat, protože nedisponují schopnostmi, o které by se vyvíjená technologie v dalších fázích měla opřít, nebo nejsou schopny odolávat podmínkám, které předpokládáme v případě reálné aplikace. Redukce souboru izolovaných a selektovaných kmenů znamená časovou i nákladovou úsporu, již lze následně využít k mnohem detailnější analýze omezeného okruhu vybraných mikroorganismů. V našem případě se tak následující experimentální práce zaměřila na čtyři bakteriální taxony, které splňovaly výše uvedená kritéria.

V takto malém souboru mikroorganismů je již možné kombinovat kultivační vyšetření v kapalných médiích v laboratorních mikrokosmech s optimalizačními experimenty postavenými na platformě multikultivačního zařízení, kde již roli substrátu (tedy zdroje uhlíku a energie) sehrává studovaný polutant (ftaláty) v různých koncentračních řadách. Díky těmto experimentům lze včas odhalit tzv. substrátovou inhibici, tedy nalézt limitní množství polutantu v prostředí, za kterého je daný kmen ještě schopný být metabolicky a fyziologicky aktivní. Transparentní vyhodnocení obdržných dat je předpokladem pro kritické zhodnocení a volbu pouze těch kmenů, které splňují vytčené předpoklady na mikroorganismus, jenž se má stát jádrem zamýšlené biotechnologie pro environmentální servis. Zároveň je věnována pozornost nárokům prověřovaných taxonů na kultivační podmínky (pH, teplota, koncentrace nutrientů, vhodných akceptorů elektronů apod.).

Po vyhodnocení těchto základních dat bylo přistoupeno k finální selekci dvou bakteriálních kmenů odpovídajících požadavkům aplikační praxe, které byly následně zaslány na identifikační vyšetření do Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) v Braunschweigu. Zde byly pomocí molekulárních technik jako jsou např. sekvenční analýza genů, zahrnující též fylogenetickou analýzu určeny oba dva taxony a byly zařazeny do rodů *Rhodococcus* a *Kocuria*. Tradiční identifikační techniky (jako např. morfologické a fyziologické testy) prováděné v ČR sice předcházely volbě zahraničního pracoviště, ale nepřinesly takřka jiné výsledky, než zevrubný popis obou kmenů.

Fáze, která probíhá od loňského roku do současnosti by se dala nazvat „ohodnocením“ biodegradačních schopností vybraných kmenů za účelem jejich finálního použití při *in-situ* bioremediaci. Tato fáze experimentů již směřuje k vlastnímu vývoji reálně aplikovatelné technologie, která vyžaduje nejen důkazy toho, že koncentrace modelového polutantu klesá, jak jsme toho často svědkem, ale že klesá právě díky rozkladné schopnosti našeho biočinitele a ne spíše působením dalších procesů, které spolupůsobí v průběhu procesu bioremediace. Jinými slovy – naším cílem je potvrdit, že polutant je skutečně degradován mikroorganismy na neškodné produkty a není jednoduše pouze „přemístován“ v důsledku abiotických procesů, které zapříčiní sice jeho detekovatelný pokles v prostředí, ale nikoliv cestou jeho destrukce, ale pouze migrace, sorpce apod. Nejzákladnějším kritériem pro úspěch jakýchkoliv bioremediačních snah je potvrzení toho, že mikroorganismus je primárně zodpovědný za likvidaci převážného množství kontaminantu v sanovaném prostředí. V opačném případě nelze hovořit o bioremediační technologii.

Odpověď na otázku "jak prokázat probíhající *in-situ* bioremediaci?", je nesporně velice složitá vzhledem ke komplexnosti vlastností kontaminované matrice, hydrogeochemickým podmínkám na lokalitě a souběžně probíhajícím abiotickým mechanismům. Kontrolované laboratorní experimenty, které jsou dobře měřitelné a snadno interpretovatelné je obvykle nemožné pokládat za nezvratné potvrzení funkčnosti bioremediačního zákroku v reálných podmínkách. Ale vzhledem ke skutečnosti, že potvrzení biodegradační funkce mikroorganismů s naprostou určitostí je v reálných podmínkách zřídkakdy možná, mají data získaná v laboratoři také svou váhu.

Aby bylo možné se co nejvíce vyhnout nejednoznačnosti důkazů je doporučována poradní komisí pro in-situ bioremediace [4] evaluační strategie, která zajistí konsistentní a logický sběr nezávislých důkazů. Tato strategie by měla zahrnovat následující tři typy informací:

1. dokumentaci úbytku kontaminantů – potvrzená za laboratorních i reálných podmínek (většinou bývá zajištěno standardním vzorkováním vod a zemin v průběhu sanačního procesu)
2. laboratorní zkoušky prokazující, že mikroorganismy ze vzorků matric odebraných na lokalitě, příp. bioaugmentační materiál, mají potenciál transformovat kontaminanty za určitých podmínek očekávaných na lokalitě (obvykle bývá tento důkaz prováděn v dobře kontrolovaném laboratorním mikrokosmu)
3. experimentální prokázání toho, že laboratorně zjištěná biodegradční aktivita může probíhat i v reálném prostředí sanačního zásahu. Jedná se obvykle o nejsložitěji získatelný důkaz, neboť laboratorní důkazy nejsou dostatečné zejména z toho důvodu, že v reálné situaci jsou zvolení bioremediační činitelé konfrontováni s mnohem méně příznivými podmínkami prostředí. Existují dva základní přístupy k ověření probíhající *in-situ* biodegradace: a) proměření co nejméně porušených vzorků získaných na sanované lokalitě v laboratoři nebo b) experimenty provedené přímo na místě bioremediačního zásahu.

#### *ad a) Laboratorní měření odebraných reálných vzorků*

-zahrnuje množství technik od chemických až po mikrobiální analýzy. Mnoho z těchto technik vyžaduje srovnávací vzorky z míst, kde bioremediační zákrok neprobíhá, příp. vzorky odebrané před započítím bioremediace.

Následujících několik typů analýz může pomoci zdokumentovat průběh *in-situ* bioremediace odebraných vzorků matric:

- *Stanovení počtu bakterií* – protože množství mikroorganismů obvykle souvisí s degradací polutantu jejich zvyšující se počet může indikovat úspěšnou bioremediaci. Mohou však nastat situace, kdy je např. koncentrace kontaminantu příliš nízká pro dostatečnou reprodukci buněk anebo je omezená biodostupnost polutantu a zvýšení počtu mikroorganismů pak nemusí být detekovatelné, ač biodegradace probíhá. Velmi důležitými aspekty ovlivňujícími správnost stanovení je způsob jakým je vzorek odebrán, jak je transportován a jak rychle je zpracován. Nejrelevantnějších výsledků je dosahováno obvykle při zpracování pevných matric, neboť většina degradujících mikroorganismů je přichycena na pevných površích nebo v půdních pórech. Analýza vzorků vod je obvykle méně vypovídající neboť obsahuje jen určité, z povrchů snadno uvolnitelné, frakce mikroorganismů nebo mikroorganismy transportované podzemní vodou. Tyto hodnoty tedy bývají podhodnocené. Nicméně zvyšující se množství mikroorganismů ve vodě obvykle koresponduje s rostoucím množstvím mikroorganismů v zemině. Budeme-li tedy brát toto stanovení jako semikvantitativní může posloužit jako relativně levný indikátor stavu na lokalitě. Důležitým aspektem je také výběr metody stanovení, kterých existuje celá řada: přímé mikroskopické počítání buněk, přímé mikroskopické počítání buněk identifikující pouze bakterie s aktivním transportem elektronů (důkaz aktivně metabolizujících bakterií), kvantifikace bakterií rostoucích na pevných růstových médiích (agarech). Mezi moderní metody patří techniky založené zejména na molekulární biochemii. Tyto metody jsou obvykle přesnější, ale také finančně náročnější. Jedná se zejména o využití oligonukleotidových sond, které umožňují i identifikaci přítomných bakterií, nebo genů zodpovědných za biodegradaci. Další možností je analýza mastných kyselin, jejichž přítomnost v buněčných membránách je unikátní pro každý bakteriální taxon. Ačkoliv se v obou případech jedná o slibné metody, jsou ještě stále ve fázi testování a vyžadují specializovaná zařízení a vědomosti.
- *Množství prvoků* – vzhledem k tomu, že bakterie jsou potravní kořistí prvoků, zvýšení jejich množství bývá signálem růstu bakteriální populace, což nepřímo indikuje probíhající

bioremediační proces. Počet prvků je stanovován kultivačním vyšetřením nebo mikroskopicky.

- *Úroveň bakteriální aktivity (metabolické)* – měření demonstrují schopnost bakterií provádět požadované reakce vedoucí k úspěšnému rozkladu kontaminantu. Analýza se provádí nejčastěji v dobře kontrolovaném laboratorním mikrokosmu. Obvykle se testují změny pH, koncentrace kyslíku nebo jiného akceptoru elektronů a/nebo koncentrace nutrientů apod.
- *Schopnost adaptace* – testy adaptace mikroorganismů prokazující úroveň adaptace mikroorganismů odebraných ze znečištěné zóny na přítomný kontaminant ve srovnání s bakteriemi získaných z nekontaminovaného území. Adaptační změny jsou výsledkem genetických nebo fyziologických změn bakterií, které přišly do styku s kontaminantem. Tyto testy lze provést prostým srovnávacím, kultivačním experimentem v laboratorním mikroskopu nebo pomocí nástrojů molekulární biologie (pomocí genetických sond, které však vyžadují znalost sekvence DNA v genu zodpovědném za degradaci).
- *Měření koncentrace anorganického uhlíku* – většina mikroorganismů produkuje v průběhu biodegradačního procesu organických kontaminantů plynný  $\text{CO}_2$ , rozpuštěný  $\text{CO}_2$  nebo  $\text{HCO}_3^-$ .
- *Měření koncentrace akceptorů elektronů* – v průběhu transformace kontaminantů bakterie spotřebovávají akceptory elektronů jako jsou např.  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ , nebo  $\text{SO}_4^{2-}$ . Jejich množství je stanovováno standardními metodami analytické chemie.
- *Měření koncentrace metabolitů* – testy by měly prokázat zvyšující se koncentrace známých metabolitů mikrobiální aktivity. Klíčové produkty aerobní degradace již byly zmíněny výše. Mezi anaerobní metabolity se řadí methan, sulfidy, redukované formy Fe a Mn a plynný  $\text{N}_2$  atd.
- *Měření koncentrace metabolických meziproductů* – přítomnost dočasných metabolických meziproductů signalizuje probíhající biodegradaci. Detekce takovýchto metabolitů je prováděna např. chromatografickými technikami atd. Vzhledem k tomu, že některé meziproducty jsou degradovány příliš rychle, neznamená jejich nepřítomnost při detekci důkaz neprobíhající biodegradace.
- *Měření koncentrace látek stimulujících růst mikroorganismů* – spotřeba stimulantů růstu obvykle souvisí s aktivitou mikroorganismů a může indikovat bioremediaci.
- *Poměr nedegradovatelných / degradovatelných sloučenin* – zvýšení poměru sloučenin, které jsou obtížně rozložitelné vůči snadno degradovatelným může indikovat probíhající bioremediaci. Tento experimentální přístup je užitečný také v případech, kde se vyskytuje tatáž sloučeninách v různých formách (stereoisomerech), které se liší svou degradovatelností.

#### *ad b) Experimenty probíhající přímo na sanované lokalitě*

- zahrnují několik užitečných metod vhodných pro hodnocení aktivity degradujících mikroorganismů bez nutnosti vzorkování. Tyto analýzy jsou obvykle spojeny s nutností přidavku specifických chemikálií a studování jejich následného osudu, který by mohl svědčit ve prospěch probíhající bioremediace.

Následující metody mohou pomoci zdokumentovat průběh *in-situ* bioremediace přímo na sanované lokalitě:

- *Stimulace přítomných bakterií* – pokud je do místa sanačního zásahu dodán materiál stimulující růst mikroorganismů (kyslík, nutrienty, elektronové akceptory a donory) téměř vždy dochází k posílení degradačních aktivit. Rozdíl mezi takto ošetřenou a neošetřenou lokalitou může být připsán na vrub bioremediace, nikoliv však abiotických procesů. Je ovšem nutné tyto procesy sledovat na maximálně srovnatelných lokalitách.
- *Měření rychlosti spotřeby elektronových akceptorů a dalších stimulantů* – stimulační materiály jsou do místa sanačního působení dodávány v tzv. pulsech a následně je sledován rychlost jejich úbytku. Relativně rychlý úbytek těchto látek v kontaminovaném místě ve srovnání s místy bez znečištění indikuje úspěšný průběh bioremediace.
- *Monitorování stopovací látky* – které nebývají obvykle biologicky reaktivní mohou být přidány na určené místo a lze tak určit jaké množství kontaminantu (příp. stimulačního

materiálu) mizí nebiologickou cestou vs. degradací pomocí mikroorganismů. Jinými slovy tyto stopovací látky jsou používány k rozlišení abiotických chemických změn — jako např. volatilizace, sorpce a zředování—od chemických změn zapříčiněných mikroorganismy.

- *Značení kontaminantů* - pomocí chemických prvků, které se posléze objevují v metabolických produktech biodegradace. Nejčastěji se ke značení používá známé množství stabilních izotopů, např.  $^{13}\text{C}$  nebo deuterium. Jestliže očekávaný metabolický produkt stejné relativ. množství  $^{13}\text{C}$  nebo deuteria jako značený kontaminant, lze prohlásit, že bioremediace probíhá. Tento postup však není běžný, neboť zahrnuje vnos speciálně značeného kontaminantu, který je finančně nákladný a přechodně zvýší míru kontaminace na lokalitě.

## Závěr

Na tomto místě je třeba podotknout, že environmentální technologie na bázi biologického činitele jsou „živý organismus“, který je třeba podstupovat prakticky stále určitým kontrolním mechanismům a vyhodnocovat průběžně data z terénních aplikací. Jedině takto lze dlouhodobě udržovat efektivitu bioprosesu na vysoké úrovni. V současnosti se v rámci společnosti EPS, s.r.o. připravují podklady pro schvalovací proces nové bioremediační technologie ze strany státní správy.

## Použitá literatura

- [1] Study on Eco-industry, its size, employment, perspectives and barriers to growth in an enlarged EU (2006): zpracováno pro European Commission-DG Environment asociací Ernst & Young, Paris
- [2] Euro-Environ 2008-2010 Action Plan: [online]. [citováno dne 5.4.2009] <dostupné na: <http://209.85.129.132/search?q=cache:ezuWCTXz9TsJ:www.eureka.be/files/:2044253+bioremediation+market+size+Eu&cd=29&hl=cs&ct=clnk>
- [3] SIGLOVÁ M., MINAŘÍK M., MIKEŠ J. (2007): Osud nových environmentálních polutantů v ekosystému, sborník konference Sanační technologie X, ISBN: 978-80-86832-26-5
- [4] Committee on In Situ Bioremediation (CISB). (1993): "In Situ Bioremediation: When Does It Work?" Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., ISBN-10: 0-309-04896-6

