

Cílená konstrukce bioaugmentačních preparátů a jejich pozice v procesu efektivních bioremediací

Jiří Mikeš¹, Martina Siglová¹, Eva Podholová¹, Jana Chumchalová¹, Miroslav Minařík¹, Marek Skalický²

¹EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice www.epssro.cz;

²ENVIGEO s.r.o., Tiskařská 257/10, 108 00 Praha 10 – Malešice www.envigeo.cz

Anotace

V rámci přístupů k technické ochraně životního prostředí zaujímá v rovině aktivního nakládání s ekologickými zátěžemi své nepochybně místo bioremediace, jinými slovy biotechnologie koncipované k nápravě škod na životním prostředí. V současnosti existuje několik stěžejních směrů, kterými lze definovat základní charakteristické rysy vlastního bioremediačního procesu – zákroky in situ a ex situ, implementace reaktorových systémů s biologickým činitelem, podpora přirozené atenuace. Obecně lze říci, že zákroky koncipované v místě kontaminace s cílem snížit a transformovat přítomný polutant mají společného jmenovatele v podobě injekčních preparátů, jimiž by mělo být docíleno výrazně efektivnějšího probíhání rozkladných dějů v prostředí. Vedle biostimulačních strategií (aplikace nutrietů, kosubstrátů, akceptorů / donorů elektronů, např. kyslíku) existuje strategie bioaugmentace. Tento přístup značně polarizuje spektrum odborníků v oblasti sanačního inženýrství a environmentálních věd. Polaritu názorů lze charakterizovat přesvědčením, že vnesený mikroorganismus (tzv. biopreparát) plní bezesbýtku svou rozkladnou úlohu - na jedné straně a na straně druhé důkazy, že i sebeodolnější taxon má výrazně malou až minimální šanci přirozeně prostředí kolonizovat. Pravda je zřejmě někde mezi těmito dvěma póly. Na obranu přesvědčení, že vnesený mikroorganismus se v prostředí adaptuje a začne se metabolicky projevat lze použít bezpočet důkazů ze sanačních prací v podobě jejich monitoringu a analýz, z přesvědčení, že vnesení mikroorganismů je věc neefektivní, lze zase extrahovat poznatek, že přínos těchto zákroků leží v úplně jiné rovině, v úplně jiném časovém rámci a především na zcela jiné platformě stimulace. Jinými slovy, bioaugmentace dnes již často bývá chápána jako inženýrské řešení horizontálního genového transferu, jehož prostřednictvím je možné posílit genofond zástupců autochtonních populací (původních mikroorganismů) ve smyslu aktivního rozkladu polutantů.

V experimentální pasáži budou shrnuty dosavadní výsledky řešení projektu programu výzkumu a vývoje TIP: FR-TII/318 (Vývoj komerčně dostupných remediačních preparátů určených k přímé aplikaci na difúzně kontaminované lokality), jehož poskytovatelem dotačních prostředků ze státního rozpočtu je MPO. Budou představeny koncepty 7 os řešení projektu, v nichž každou reprezentuje konkrétní polutant, a především nově nalezené taxony a jejich společenstva, jež se následně stanou jádrem konstruovaných technologických preparátů. Konkrétně bylo dosaženo velmi dobrých výsledků v oblasti bioremediace BTEX, MTBE, PAU a deamonifikace (eliminace amonných iontů), poměrně dobrý směr řešení naznačilo hledání vhodných biooxidantů redukováných sloučenin síry, činitelů transformace anorganického fosfátu a remediace PCB.

Příspěvek v obecné rovině vysvětluje cestu od laboratoře ke komerčnímu preparátu, v případě konkrétních výstupů řešených projektů shrnuje recentní poznatky o možnostech biologické dekontaminace frekventovaných polutantů životního prostředí. Pro širší odbornou veřejnost (komerční firmy s ekologickou zátěží ve svém objektu) je zdrojem poznání, co bioremediace představuje za možný účinný nástroj v nápravě škod, pro odborníky environmentálních biotechnologií je zdrojem nových poznatků a trendů.

Abstract

In several last years, the technical approaches to environmental protection have been based on bioremediation. At the level of active management of environmental loads, bioremediation plays indisputable role among other technologies. In other words, biotechnology designed to remedy environmental damage is powerful tool how to clean up contaminated sites. Currently, there are several key directions, which can define the basic features of bioremediation process - interventions in situ and ex situ, reactor systems, implementation of a biological agent, enhanced natural attenuation. Generally, the procedures (on site) designed to reduce contamination and to transform the pollutant has a common denominator in the form of agent injection. By means of it, much more efficient degradation processes could be carried out in the environment. In addition to the strategies of biostimulation (nutrient application, co-substrates, acceptors / donors of electrons such as oxygen) exists bioaugmentation strategies. This approach is highly polarized spectrum of experts in engineering, remediation, and environmental sciences. Polarity of views can be characterized by the belief that injection of the microorganisms (called bioagents) performs fully its remediative role - on the one hand, evidence that even the best strains of microorganisms have significantly low chance to colonize the natural environment. The truth is probably somewhere between these two opinions. In defense of the belief that injection of the microorganisms in the environment is effective, there are numerous remediations in the form of monitoring and analysis. The belief that the introduction of bacteria is inefficient strategy, you can turn to the knowledge that the benefits of these interventions is in a totally different plane, in a totally different time frame and in particular on an entirely different platform of stimulation. In other words, bioaugmentation is now often viewed as an engineering solution to horizontal gene transfer, through which it is possible to strengthen the gene pool of representatives of indigenous populations (indigenous microorganisms)- in terms of active degradation of pollutants.

The experimental passage is summarizing the results of the previous project research and development program TIP: FR-TII/318 (development of commercially available preparations intended for direct application to the contaminated sites), a provider of grant funds from the state budget is MPO. This project is based on concepts of 7 axes, in which each represent a specific pollutant, and especially the newly discovered microorganisms and their communities. Specifically, it has been achieved very good results in the field of bioremediation of BTEX, MTBE, PAU, and deamonification (elimination of ammonium ions), a relatively good direction represents appropriate solutions of reduced sulfur compounds biooxidation, inorganic phosphate catching, and remediation of PCBs.

This contribution (in general) explains the path from laboratory to commercial preparation; the project summarizes recent findings on how the biological decontamination of environmental pollutants may be carried out. The benefit for the commercial public (commercial companies with environmental problems in their areas) consists in a source of knowledge - what constitutes a potential bioremediation effective tool in remediation. To environmental experts, it is a source of new trends.

Struktura příspěvku

První část je věnována shrnutí informací o úloze biologického činitele v environmentální mikrobiologii jako klíčové oblasti, jež je zdrojem informací a především zdrojem potenciálně vhodných biologických činitelů pro konstrukci technologických nástrojů. Podrobně jsou vysvětleny pojmy *bioaugmentace* a *biostimulace* jako dva stěžejní koncepty, na nichž je konstruován bioremediační zákrok. Ve druhé části se příspěvek věnuje 4 praktickým ukázkám aplikace univerzálně vhodných bioaugmentačních preparátů určených k bioremediaci znečištěných matric zatížených ropnými látkami, chlorovanými uhlovodíky, estery ftalové kyseliny a odpadních lipidů. Na těchto praktických ukázkách jsou demonstrovány výhody a omezení takto pojatého řešení technické ochrany životního prostředí na bázi biotechnologického přístupu. Zdůrazněna je potřeba vnímání charakteru těchto nástrojů v marketingovém konceptu produkt – služba, kde zejména druhé jmenované je klíčem k úspěšné aplikaci. Nastavení podmínek vlastní inokulace biologického preparátu je předpokladem pro funkční proces. Dodávka některých stimulačních faktorů zásadním způsobem zlepšuje fyziologické a metabolické projevy biologického činitele v prostředí vůči aktivní transformaci přítomného polutantu. Ve třetí části se příspěvek zabývá postupy, jak lze biologický preparát konstruovat tak, aby mohl naleznout plnohodnotné uplatnění na trhu bioremediačních preparátů. Tyto skutečnosti jsou představeny na pozadí výzkumně-vývojových aktivit společnosti EPS a velmi názorným způsobem demonstrovují postup „od laboratoře k technologii“. Závěrečná část se zabývá zhodnocením a dalším perspektivám na poli bioremediačního inženýrství jako součásti odvětví environmentálního servisu.

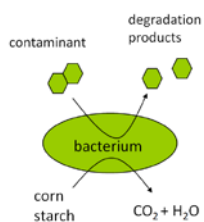
1 Biopreparáty v sanačním inženýrství

V přirozeném prostředí představuje říše mikroorganismů jak druhově, tak kvantitativně nesmírně rozmanitou oblast této formy živé hmoty. Z hlediska fylogenetického lze vývoj mikroorganismů považovat za stěžejní katalyzátor proměn hmoty spojených s utvářením životního prostředí. Mikroorganismy zřejmě představují prvotní formy organismů, které začaly kolonizovat Zemi a vytvářet na ní biosférické složky. Obecně akceptované výsledky tzv. Millerova pokusu (Miller – Urey experiment)¹ vedly k prokázání způsobu, jakým se na Zemi vytvořily rezervoáry organických látek (sacharidů, aminokyselin a mastných kyselin), které následně v rámci svých sekundárních, terciárních a kvartérních strukturací vedly ke vzniku biopolymerů. Alexander Oparin zavedl termín tzv. prebiotického bujónu (*primordial soup theory*), jež vedle vzniku monomerů a biopolymerů představuje třetí stupeň vzniku života na Zemi, tedy organizaci jednoduchých organických látek v složitější molekuly a posléze i primitivní buňky. Robert Shapiro rozpracoval tuto myšlenku do ucelené teorie. Současnou optikou představují reliktu utváření Země v biologické rovině tzv. *Archea*, tedy primitivní mikroorganismy, které se dále evolučně proměňovaly v bakterie (*Bacteria*) a zřejmě v důsledku procesu endosymbiosy v eukaryotní organismy (houby, rostliny, živočichové a člověk).

Vzhledem k oblastem, kde lze dnes *Archea* nacházet a ke skutečnosti, že se v drtivé většině případů jedná o tzv. extrémofilní organismy, existuje obrovská technologická paralela s kontaminovanými oblastmi, které ve své podstatě jsou také extrémním příkladem podmínek, v nichž by měl být organismus uplatnitelný v bioremediačním inženýrství být schopný žít a fyziologicky se projevovat. *Archea* tak sama o sobě představují nekonečně bohatou studnici potenciálně uplatnitelných mikroorganismů v bioremediačním inženýrství. Vysvětlením tohoto tvrzení je jednoduchá organizace jejich buněčného těla a zejména vysoká flexibilita metabolismu, s nízkou, nicméně velmi rychlou a účinnou flexibilitou jejich metabolické regulace. Bakterie již představují organismy vývojově komplikovanější, avšak drtivá většina výše popsaných vlastností jim zůstává zachována. Eukaryotní mikroorganismy (kvasinky, kvasinkovité organismy a plísňe) vykazují výrazně vyšší nároky na faktory, jež bezprostředně vyžadují pro svůj růst a reprodukci. Nicméně jejich výhodou na druhou stranu je disponování řadou pokročilých mechanismů (buněčný transport, produkce specifických extracelulárních produktů, komunikace), jež se velice dobře uplatňují v té fázi, kdy se jejich substrátem má stát antropogenní polutant. Obrovsky účinným prostředkem mikroorganismů je nespecifita některých enzymů, díky kterým se tzv. kometabolismus nestává pouze redundantní součástí biochemických dějů, nicméně nalézá konkrétní a účinné uplatnění v bioremediacích.

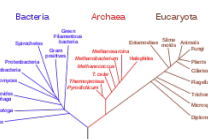
kometabolismus

unikátní metabolický nástroj, kdy v rámci využívání jednoho substrátu vznikají podmínky pro neenergetické zpracování jiného (často polutantu ŽP)



Archea, bakterie, eukaryota

současný způsob nahlížení na taxonomické členění, který do mikrobiální říše vnesl prvek tzv. *Archea*, bakteriím podobným organismům, z nichž se bakterie a eukaryotní organismy fylogeneticky vyvinuly. *Archea* jsou nesmírně vděčným objektem zájmu environmentálních technologií.



¹ *primordial soup theory* – teorie prebiotického bujónu, tedy vysvětlení, jak se organická hmota zformovala do podoby prvotních organismů

Na úvod pasáže věnující se současnému stavu v přístupech k technické ochraně životního prostředí na bázi biotechnologických postupů je na místě zmínit existenci procesů označovaných jako přirozená atenuace. Seleční tlak polutantu v prostředí je hybnou silou, která navozuje podmínky, na něž mikroorganismus musí vyvíjet úsilí adaptovat se takto dané skladbě a charakteru prostředí. Přirozená role mikroorganismů v prostředí spočívá v intenzifikaci biogeochemických cyklů, jinými slovy v koordinaci s jinými formami organismů a na pozadí fyzikálně-chemických a mechanických dějů participují na přeměně (dekompozici) organické hmoty v materiál anorganický, jenž se pak následně stává reservoárem základních látek znovu se zapojujících do koloběhu hmoty na Zemi. Obdobným způsobem lze nahlížet i na látky životnímu prostředí cizí (kontaminanty a xenobiotika), nicméně s tím omezením, že jejich klíčovou vlastností, jež jim propůjčuje roli negativní zátěže, je právě tzv. persistence, tedy odolnost vůči rozkladu na bázi biodegradace, ale v mnoha případech i přirozeným fyzikálním mechanismům transformace (fotolýzy, termální degradace).

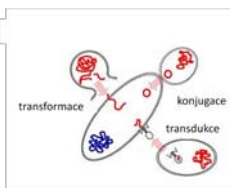
Horizontální genový transfer

vědecké vysvětlení flexibility populací mikroorganismů vůči xenobiotikům v prostředí; soubor mechanismů, jak se genová informace šíří napříč mikrobiálními společenstvy, tedy nikoliv předáváním z buňky mateřské na dceřinou v rámci druhu. Zahnuje proces transformace, konjugace a transdukcce.

Transformace – smrtí dárcovské buňky se do prostředí dostane genetická informace, již může přijmout příjemce.

Konjugace – přiblížením dvou buněk různého druhu může dojít k dočasnému spojení konjugačním kanálkem, jímž lze přesunout genetickou informaci.

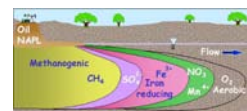
Transdukcce – vysátím genetické informace z dárcce do bakteriofága (bakteriální vir) a jeho infekcí příjemce se rovněž šíří geneticky kódované vlastnosti.



Druhou stinnou stránkou je ochota řady polutantů polymerovat a jinak se přeměňovat tak, že jejich rozložitelnost v prostředí je ještě omezenější. Přirozená atenuace představuje soubor dějů, kterými se prostředí snaží samo omezit zátěž způsobenou kontaminanty. Právě biologické procesy zahrnuté pod přirozenou atenuace jsou nevyčerpatelným zdrojem nástrojů, jež se v sanačně-inženýrské praxi mohou uplatnit v rámci dekontaminačních zákroků na biotechnologické platformě. Nejfrekventovanější koncepty bioremediace, biostimulace a bioaugmentace, se opírají o sílu, jež představuje soubor metabolických a fyziologických schopností tzv. autochtonních populací. Tato společenstva představují přirozenou mikroflóru přítomnou v prostředí, která disponuje obrovskou adaptační schopností. Inženýrské řešení se zabývá buď možností upravit podmínky na ošetřované lokalitě tak, aby tyto procesy byly ještě účinnější (dodávky akceptorů elektronů – např. kyslík, zdrojů elektronů (laktát), dusíkatých a fosforečných živin, popř. jiných esenciálních složek) nebo je založeno na injektáži mikroorganismů do prostředí, kde se nevyskytují přirozené taxony obdařené bioremediačními schopnostmi. Vzhledem k již zmíněné adaptabilitě mikroorganismů se ukazuje, že snazším a účinnějším konceptem je právě biostimulace. Nicméně to v žádném případě nevyvrací uplatnitelnost bioaugmentace. Právě naopak, jak dokazují následující informace. Současné výzkumy² ukazují, že role vneseného biologického činitele primárně nemusí být založena na myšlence osídlit kontaminovanou lokalitu vhodnou mikroflórou, nicméně již jen sama skutečnost, že se v tomto prostředí ocitne biomasa populací s bioremediačními vlastnostmi výrazně zvyšuje pravděpodobnost přenosu těchto vlastností na populace kontaminované lokalitě vlastní. Odborně se tyto děje označují jako horizontální genový transfer (HGT) a v řadě případů se zde uplatňuje a využívá faktu, že genové kódování schopnosti produkovat enzym s biodegradačním účinkem je v rámci mikroorganismu řešeno nejaderně, sekvence nukleových kyselin jsou lokalizovány na zvláštních organelách označovaných jako plasmidy. Samotné vnesení vhodné populace lze tedy vnímat jako stimulační krok, kdy biopreparát plní roli zdroje vhodné genetické informace rezultující ve zdokonalení těchto vlastností u mikroorganismů, jež těmito schopnostmi před tím nedisponovaly. K transformaci nejčastěji dochází ve vodném prostředí, ke konjugaci dochází v biofilmech a transdukcce je frekventovaným způsobem v půdním prostředí. Izolace kmenů, jejich studium a koncepce bioremediačních zákroků na bázi bioaugmentace tak představuje neobyčejně silnou možnost, jak využít přirozených schopností mikroorganismů napomoci rozkladu a transformaci antropogenních polutantů v prostředí.

Přirozená atenuace

soubor procesů s dominancí biodegradace, ale i dalších zejména fyzikálně-chemických a mechanických proces, kdy prostředí samovolně iniciuje transformaci polutantu do méně škodlivé formy. Prokazuje se monitoringem tří linií důkazů – proudění podzemní vody, přítomnost akceptorů elektronů a osídlení mikroorganismy (monitorovaná NA, neboli **MNA**). Není sanačním nástrojem, nicméně tyto děje lze podpořit a stimulovat dotací chybějících faktorů (podporovaná NA, neboli **ENA**)



² J. M. Coombs: Potential for Horizontal Gene Transfer in Microbial Communities of the Terrestrial Subsurface; D. Springael, E.M.Top: Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies; T. Barkay a B. F. Smets: Horizontal Gene Flow in Microbial Communities a její webové stránky **Barkay Laboratory** <http://aesop.rutgers.edu/~barkay/>

Mezi nejfrekventovanější skupiny polutantů v horninovém prostředí, v podzemních vodách a i v mořských ekosystémech patří ropné látky, chlorované uhlovodíky a toxické kovy. K této skupině se co do počtu, tak i co do rozmanitosti stále více přibližují ty typy antropogenních polutantů, které se do prostředí dostávají v důsledku lidské činnosti. K těmto látkám lze přiřadit velkou skupinu chemických látek označovaných jako endokrinní disruptory. Z analýzy jejich osudu v životním prostředí je již nyní možné usuzovat na problém, jenž může být zcela výstižně označen za tikající ekologickou bombu. V neposlední řadě se předmětem bioremediačních procesů stávají i tzv. biologicky rozložitelné odpady, u kterých se vedle



Obr. 1 komerčně dostupné bioaugmentační preparáty EPS, s.r.o. pro uvedené skupiny kontaminantů

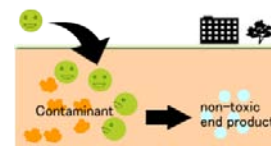
EPS, s.r.o. disponuje ve svém portfoliu čtyřmi velmi stabilními a funkčními technologiemi na bázi bioaugmentace. Na obrázku 1 jsou znázorněny biopreparáty, jejichž aplikací do ošetřované lokality lze docílovat velmi dobrých výsledků, zejména ve fázi dosahování sanačních limitů v rovině biologického dočištění lokality. Klíčovým předpokladem je co nejdokonalejší znalost vlastního mikrobiálního činitele, jeho nároků na živiny, zdroje uhlíku a energie a v neposlední řadě i reakce na podmínky prostředí s ohledem na predikci vývoje v rámci vlastního sanačního zákroku. Tyto poznatky se získávají postupy, o nichž se zmiňuje následující kapitola.

Při konstrukci uvedených biopreparátů byla zohledněna myšlenka spojovat takové skupiny mikroorganismů, které disponují vhodnými mechanismy pro rozklad cílového polutantu. V případě biopreparátu pro ropné látky se konsorcium opírá o dominantní taxon z rodu *Pseudomonas*, který disponuje vysoce účinným metabolismem pro rozklad ropných látek. Vedle jeho vlastní schopnosti produkovat biologické povrchově aktivní látky je složení kmenů doplněno o dva druhy bakterií (zástupci rodu *Gordonia* a *Variovorax*), které výrazným způsobem produkují hydrofobní pigmenty a jiné typy biologických detergentů, čímž výrazně napomáhají mobilizaci nepolárního kontaminantu, jenž je cílem bioremediačního zákroku. U inokula pro rozklad olejů (nicméně využitelné i pro bioremediaci ropných látek) byl zvolen koncept jednodruhového preparátu opřený o unikátní eukaryotní organismus *Yarrowia lipolytica*, izolovaný z téměř nefyziologických podmínek – fáze ropných uhlovodíků. Díky své rychlosti okamžitě začít užívat polutant získává konkurenční výhodu a transformuje nepolární polutanty. Inokulum pro bioremediaci chlorovaných uhlovodíků vzniklo na bázi aerobní dehalogenace, tedy pro situace, kdy zdrojem elektronů je chlorovaný uhlovodík a terminálním akceptorem elektronů kyslík. Nicméně toto inokulum je kombinováno a využívá i taxony disponující kometabolismem v aerobním a mikroaerofilním režimu. Ukázkou preparátu pro méně frekventované typy polutantů (endokrinní disruptory) je konsorcium dvou bakteriálních taxonů, které jako svůj zdroj uhlíku a energie dokážou využívat estery kyseliny ftalové. Vzhledem k tomu, že se v řadě případů opět jedná o látky méně polární, opírají se oba taxony o schopnost využívat svůj hydrofobní povrch a produkovat vhodné biologické detergenty, jež jim usnadní vlastní metabolické využití kontaminantu. Tento příklad je ukázkou zúročení obrovské metabolické flexibility zástupce rodu *Rhodococcus* a pigmentotvorné bakterie z rodu *Kocuria*.

Souhrnně lze tvrdit, že bioaugmentační koncepce představuje a představovat bude jeden z klíčových pilířů sanačního inženýrství v oblasti bioremediací. Nové poznatky základního výzkumu, jejich smysluplný transfer do podoby technologicky užitečných nástrojů a především důsledné respektování synergetického charakteru této oblasti technické ochrany životního prostředí jsou cestou, na jejímž konci může být efektivní dosažení cílů – tedy životního prostředí bez zjevných zátěží v podobě antropogenních polutantů a především člověk bude mít k dispozici účinné prostředky, jak řešit případné ekologické krizové stavy na platformě technologií bez zjevných vedlejších, negativních vlivů, které propojí možnosti vlastního prostředí s technologickými možnostmi danými rozšiřováním souborů poznatků v rovině striktně interdisciplinárního charakteru. Environmentální disciplíny jsou tomuto tvrzení neklamným důkazem.

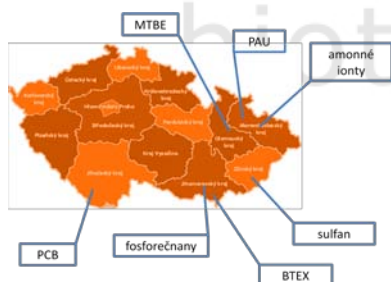
Bioaugmentace

cílené vnesení mikrobiální populace v podobě tzv. biopreparátu (inokula) do prostředí sanačního zákroku s cílem doplnit mikrobiální profil o zástupce vybaveným schopností biodegradovat cílený polutant. Protipólem (avšak vhodně se doplňujícím) je proces biostimulace, kdy oživení mikrobiálních rozkladných procesů nastává v důsledku injektáže chybějících metabolických faktorů (zdroj akceptoru elektronů, zdroj dusíku a fosforu, popř. esenciální nutriety). Bioaugmentace bývá doprovázena biostimulací v rámci nastolení efektivity zákroku.



3 Výzkum a vývoj bioaugmentačních preparátů

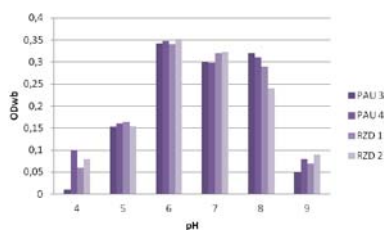
Termínem od laboratoře po technologii se dá velmi výstižně označit sled postupů, na jejichž konci může být funkční a efektivně pracující biopreparát. Na obrázku 2 je schematicky znázorněno, které kroky bezpodmínečně musí předcházet vzniku bioaugmentačního preparátu. První fází je hledání vhodného biologického činitele, v podstatě existují dva koncepty, kontaminované matrice životního prostředí studované z hlediska jeho osídlení kmeny s předpokladem disponovat nástroji pro metabolické využití kontaminantu nebo aplikace jednoho či více tzv. „sbírkových“ kmenů, tedy izolátů, jež se velmi osvědčily v testech bioremediačních schopností, nicméně se nestaly součástí žádného biopreparátu. U druhého jmenovaného postupu je nutné velmi zřetelně zdůraznit komplikaci, jež se může projevit v důsledku metabolické stagnace sbírkového kmene. Ztráta kontaktu se selektivním tlakem polutantu často vede k upozadění schopnosti tento polutant využívat. Z těchto důvodů dnes představuje velmi ožehavé téma nalezení vhodných způsobů, jak vhodné izoláty skladovat a zároveň zabránit ztrátě jejich bioremediačních schopností. Dlouhodobá expozice polutantem se souběžnou metabolickou útlumovou fází (izolát na agaru) často způsobí smrt mikroorganismů, neboť expozice je často nad inhibiční koncentrací. Aktivní přechovávání v kapalných půdách zase vyžaduje velké nároky na prostor a pravidelnou kontrolu a



Obr. 3 lokalizace odběrových míst s popisem polutantu, jenž byl konkrétním jmenovatelem pro přípravu bioaugmentačních preparátů

reinokulaci. Velmi dobrým způsobem se jeví lyofilizace kmenů (vysušování mrazem), nicméně tento postup je nákladově velmi náročný. V rámci řešení projektu podpory VaV poskytované v programu TIP Ministerstvem průmyslu a obchodu byla zvolena strategie opírající se o vymezení určité skupiny polutantů, pro které se bioaugmentační preparáty nevyskytují. Nalezení vhodných kontaminovaných lokalit, kde byl proveden odběr matric pro izolaci kmenů, představovalo krok následující. Na obrázku 3 je shrnuto zacílení odběrových míst a vymezení skupin polutantů.

Mikrobiální taxony získané izolací musí být ve druhém sledu operací podrobeny velmi detailnímu zjišťování jejich metabolických a fyziologických nároků. Na prvním místě bývá zaměřena pozornost na koncentrační rozpětí polutantu, u něhož se předpokládá přímé metabolické využití. Jinými slovy cílem je nalézt hranici, která již vykazuje inhibiční nebo letální efekt. Postupně se testují nároky na teplotu, pH, doprovodné látky,

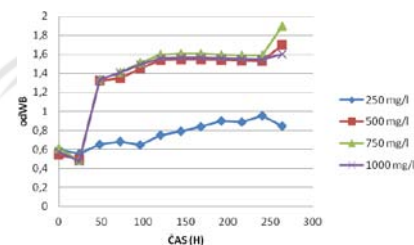


Obr. 5 dynamika růstu izolátů PAU 3, PAU 4, RZD 1 a RZD 2 na minerálním médiu s 30 µg/l naftalenu

toxicke kovy, surfaktanty a v případě konsorcií i ekologické faktory (vyloučení antagonismu – vzájemné neslučitelnosti přítomnosti obou kmenů zároveň). Dominantně se tyto typy experimentů provádí v baňkových systémech na rotačních třepačkách, avšak výraznou úsporou času je možnost designovat experimenty v režimu možností multikultivačního zařízení (např. Bioscreen C³). Souběžně se monitorují faktory, jež mohou posloužit v rámci koncepce technologického uchopení – tvorba biofilmu, vytváření agregátů, kolonizace fázových rozhraní). Na obrázku 4 je zachycen růstový profil izolátu MTBE 1 na různých koncentracích MTBE, na obrázku 5 je znázorněn profil hledání vhodné hodnoty pH u taxonů využívajících polyaromatické uhlovodíky v prostředí s 30 µg/l směsi těchto polutantů. Výstupem těchto experimentů je ucelená skupina vhodných taxonů, které se stanou základem navazujících etap transferu těchto poznatků do podoby komerčně užitkovatelného biopreparátu. V rámci těchto prací bude zohledňována vlastní konstrukce – strategie jednodruhového biopreparátu nebo naopak postavená na bázi směsi více vhodných taxonů. Na obrázku 6 je schematicky představena skladba souboru izolovaných kmenů, které byly přizpůsobeny



Obr. 2 schéma procesu „od laboratoře po lokalitu“ v rámci přípravy bioaugmentačního preparátu



Obr. 4 dynamika růstu izolátu MTBE 1 na různých koncentracích MTBE (experiment v systému Bioscreen)



Obr. 6 přehled izolovaných taxonů (AI – amonné ionty, S – odsiřování, F – fosfáty, RZD – degradace směsi PAU)

³ Bioscreen C – kultivační systém, jenž umožňuje souběžnou kultivaci 200 vzorků za definovaných podmínek, vybavený časoměrným shromažďováním výsledků. Výstupem jsou dynamické profily růstu, označované jako růstové křivky. Výrobce: Oy Growth Curves Ab Ltd (<http://www.bioscreen.fi>)

v průběhu roku 2011. Veškerá dokumentace jejich nároků, charakterizace a popis je předmětem závěrečné zprávy řešení této etapy. Vedle více známých typických polutantů (BTEX, MTBE, PAU) byla pozornost zaměřena i do oblasti stimulace procesů anaerobní digesce, resp. ochrany procesu před nežádoucím účinkem sulfanu (biologické odsiřování), eliminace fosfátu – jeho konverze do organicky vázané podoby a řešení problémů vysokých koncentrací amonických iontů na bázi deamonifikace. Cílem je v následující etapě kriticky zhodnotit dosažené výsledky a pozornost striktně zaměřit na ty taxony, které vykazují metabolickou stabilitu a snadnou adaptabilitu.

4 Perspektivy

V současnosti existují některé zásadní limity bioaugmentace, které vymezují oblasti nezbytně nutné dále zkoumat a hledat řešení k překlenutí omezení, s nimiž se aplikace bioaugmentačních preparátů potýká. Pomine-li se zásadní vliv biostimulace (obsažený v technologických aspektech přístupu označovaného ENA – *enhanced natural attenuation*), lze spatřovat nejpálčivější teoretické i praktické nedostatky v rovině monitoringu osudu vneseného biologického činitele, v kvantifikaci jeho podílu na transformaci polutantu (oboje molekulárně-biologické metody), na schopnostech biologického činitele konzervovat si bioremediačním vlastností (šetrná a persistentní expozice polutantem) a v neposlední řadě v technickém řešení vlastních bioaugmentačních zákroků. Nezanedbatelné pro oblast bioaugmentací je i zjištění jak enormně vysokého čísla dosahuje odhad počtu tzv. nekultivovatelných organismů, neboť zde se skrývá veliký technologický nástroj, nicméně nedosažitelný v důsledku nedokonalostí současného metodického aparátu.

Literatura

Barkay T, Smets BF: Horizontal Gene Flow in Microbial Communities The dynamic microbial gene pool compensates for microbial species clonality, presenting us with both threats and promises. ASM News 71, 412-419, 2005

Coombes, JM: Potential for Horizontal Gene Transfer in Microbial Communities of the Terrestrial Subsurface Methods in Molecular Biology 532, 413-433. 2009.

Springael D, Top EM: Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. Trends in Microbiology 12(2), 53 - 58, 2004.

Závěrečná zpráva řešení projektu FR-TI1/318 v roce 2010

Autoři děkují Ministerstvu průmyslu a obchodu za poskytnutí dotace na výzkum a vývoj v rámci podpory FR-TI1/318 v programu resortní podpory TIP.