

KLÍČOVÉ FAKTORY BIOREMEDIÁČNÍCH PŘÍSTUPŮ V RÁMCI NÁPRAVY EKOLOGICKÝCH ŠKOD

Jiří Mikeš *1, Miroslav Minařík *2

*1 EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, Česká republika, e-mail: eps@epssro.cz

*2 EPS biodegradácie, s.r.o., P.O.BOX 138, 909 01 Skalica, e-mail: eps@eps-biodegradacie.sk

Klíčová slova

kombinované sanační technologie, bioaugmentace, biostimulace, přirozená atenuace, podporované bioprocesy, horizontální genový transfer, biodostupnost a biodosažitelnost, VBNC

Okruh metod, které lze uplatnit v procesech nápravy škod na životním prostředí, je široký. Podobně jako v jiných lidských aktivitách je i v jejich rámci silně akcentováno hledisko efektivity. V jejich případě však silně zaznívá důraz na skutečně účinné vypořádání se složkami, které se v systému horninového prostředí, podzemní i povrchové vody a ovzduší s ohledem na environmentální rizika a rizika vůči lidskému zdraví nesmí vyskytovat. Smyslem tohoto sdělení je poskytnout ucelený pohled na silné a slabé stránky sanačního inženýrství a na příležitosti a hrozby, jež vyplývají z procesu inovací a výzkumně-vývojových činností na tomto poli, zejména s důrazem na bioremediační koncepci.

Koncept sanačních zákroků se může plně opřít o technologie založené na mechanických, fyzikálních a chemických principech. Nicméně hlavními kritérii posouzení vhodnosti je na jedné straně ekonomická účinnost a na straně druhé skutečná míra dopadu, tedy nejenom v rovině odstranění polutantu, ale i vedlejších efektů, jež v mnoha případech mohou vykazovat negativní působení na životní prostředí. S ohledem na fakt, že biologické procesy jsou integrální součástí prostředí, tedy i kontaminovaného, jednoznačně zde vyplývá potřeba tyto skutečnosti vnímat a vyhodnocovat. Pro moderní sanační společnost, operující v oblasti environmentálního servisu, by mělo být samozřejmé integrovat multidisciplinární aspekt tohoto oboru. To vyžaduje nejenom znalost v rovině vlastního prostředí zatíženého přítomností polutantu (geologický a hydrogeologický aspekt), ale také chemických principů cizorodé látky a v neposlední řadě důsledků pramenících z kontaktu kontaminantu s biologickým činitelem. Kontaminované prostředí je bohatým zdrojem informací a vhodného materiálu, jenž lze zužítkovat ve fázi analýzy rizik, ve fázi predikce vývoje lokality s přítomným polutantem, ale především v rovině konstrukce vlastního sanačního zákroku. Existují omezení aplikace technologických řešení, která se týkají jak abiotických technologií, tak bioremediačních zákroků. V mnoha případech se ukazuje jako efektivní koncept skutečnost, že lze velmi dobře profitovat z kombinace obou přístupů (kombinované sanační technologie, *treatment train*). S tím velmi úzce souvisí schopnost poznat, kvantifikovat a zejména interpretovat přirozené biogeochemické cykly, které se na lokalitě uskutečňují, a s nimiž je možné pro konstrukci vlastního sanačního zákroku počítat. Takto koncipované postupy se označují termínem podporované bioprocesy.

V současnosti se poměrně výrazně upozorňuje na tři témata, která mohou být vnímána jako klíčové faktory bioremediačního procesu. Ukazuje se, že pokrývají zásadní slabá místa bioremediačního procesu a vytváří prostor pro řešení otázek spojených s účinností, charakterizací, monitoringem a predikcí bioremediačních zákroků. První oblastí je míra dopadu bioaugmentace a biostimulace, dvou stěžejních směrů bioremediace. Toto téma polarizuje odbornou veřejnost a

vytváří skupiny zastánců obou přístupů. V současnosti se ukazuje jako velmi nadějná argumentace ve prospěch bioaugmentace role tzv. horizontálního genového transferu mezi autochtonní a alochtonní částí mikrobiálního spektra kontaminované lokality. Jinými slovy, mezidruhový transfer biodegradčních a adaptačních vlastností. Druhou oblast vyjadřuje úsilí odlišovat význam pojmu biologická dostupnost od termínu biologická dosažitelnost. Díky těmto ukazatelům lze mnohem účinněji optimalizovat sanační zákrok na bioremediačním principu jak v rovině biologického činitele (dostupnost), tak z hlediska chemismu polutantu a geologické charakteristiky prostředí (dosažitelnost). Poslední oblastí, jež významně mění zažité postupy bioremediací, je uznání faktu, že drtivá většina mikroorganismů je v režimu konvenčních kultivačních metod (metod spojených s růstem) nekultivovatelná a jejich detekce proveditelná pouze na bázi molekulárně-biologické analytiky. Tyto organismy se označují jako VBNC. Nicméně potřeba integrovat metody studia mikroorganismů na principech nespojených s jejich kultivací představuje nutnost i pro hodnocení stavu prostředí, monitoring přirozených i inženýrsky konstruovaných procesů a zejména v rámci predikce vývoje.

Pojmy a termíny

Horninové prostředí, podzemní vodu, půdu i povrchové vody osídluje neskutečně pestré spektrum mikroorganismů, které se v evolučním průběhu vybavily unikátními mechanismy, díky kterým v tomto prostředí mohou žít, reprodukovat se a profitovat ze zdrojů, jimž jim tyto sféry poskytují. Zároveň však nezanedbatelným způsobem napomáhají koloběhu hmoty na Zemi, jinými slovy jsou ústředním urychlovačem procesů proměny hmoty a její transformace do nových podob. Systémoví biologové rozdělují živé organismy do tzv. domén, z nichž nejdůležitější jsou *Archea*, prokaryotní mikroorganismy a eukaryotní organismy. *Archea* je možné vnímat jako unikátní skupinu mikroorganismů vybavenými vlastnostmi, jež jim umožňují obývat v některých případech naprosto extrémní podmínky (místa s vysokou koncentrací solí, vysokou teplotou – vulkány, vřídla, popř. ty části prostředí, kde existuje vychýlení z hlediska pH). Jejich technologický potenciál se opírá právě o schopnost žít v atypických podmínkách; jako vhodný příklad se hodí zdůraznění jejich podílu na tvorbě methanu z organických substrátů. Prokaryotní mikroorganismy, tedy zejména bakterie, svou stavbou představují jednoduché formy života, tvořené jednou buňkou. Nicméně díky značné metabolické a fyziologické flexibilitě se nejrychleji přizpůsobují změnám prostředí a získávají tím značnou konkurenční výhodu. V průběhu evoluce sehrály zřejmě klíčovou roli v procesu tzv. endosymbiozy, v ději, kdy nastalo vyšší koordinování a utváření nových typů organismů. Právě prokaryotní organismy se v rámci těchto nových celků funkčně profilovaly a staly se základem organel eukaryotních organismů, např. mitochondrií (respirační centra) nebo chloroplastů (fixovače světelné energie a místa jejího zpracování). Jak již bylo nastíněno v předešlém textu, eukaryotní organismy jsou evolučně vyšší, s propracovanějším stupněm konstrukce buňky a se zřetelně ohraničenými funkčními celky (buněčné kompartmenty – jádro, mitochondrie, obalové struktury). Z hlediska praxe bioremediačního inženýrství se jako vhodný příklad jeví zejména kvasinkové organismy a plísně (nižší houby), avšak evolučně výše je reprezentují rostliny, živočichové a člověk na mnohobuněčné úrovni. Důvodem, proč jsou mikroorganismy zajímavé pro technologická řešení spojená s technickou ochranou životního prostředí a nápravami škod, na něm spáchaných, je jejich metabolismus. Velmi výstižnou definicí pro charakterizaci mikrobiálního metabolismu představuje následující popis: Metabolismem se rozumí ucelený soubor na sebe navazujících procesů, jejichž prostřednictvím dochází k látkové, energetické a informační výměně. Každý organismus vyžaduje zdroj uhlíku (a jiných stavebních komponent), zdroj energie a zdroj redukčního ekvivalentu na jedné straně a na druhé

straně akceptor elektronů, látku oxidovanou, která je schopná plnit funkci příjemce elektronů vygenerovaných v redoxních reakcích buněčného metabolismu (u aerobních organismů kyslík, u anaerobních mikroorganismů např. sírany, dusičnany, oxid uhličitý nebo jiná organická látka – fermentace).

Pro pochopení procesů v životním prostředí je stěžejní osvojení si pojmů, které zohledňují adaptaci mikroorganismů na konkrétně definované podmínky. Výrazem autochtonní mikroorganismus se označuje biologický činitel, který je v daném místě původní. Oproti tomu alochtonní mikroorganismy jsou ty, které byly z místa přirozeného výskytu vyňaty a při životě udržovány v uměle vytvořených podmínkách (kultivační systémy typu agarové médium, bioreaktor). Díky značné adaptační schopnosti se mikroorganismy rychle přizpůsobí novým podmínkám a u uměle zkonstruovaných podmínek platí, že jim v mnoha případech poskytují uspokojivý dostatek, což vede ke ztrátě schopnosti přežít v proměnlivém spektru vlivů reálných systémů. Fenomén tzv. selekčního tlaku je pro bioremediační inženýry klíčovým faktorem, díky kterému jsou biologičtí činitelé nuceni se ve snaze přežít přizpůsobovat. Ztráta schopnosti aktivovat obranné mechanismy a pokles určité flexibility čelit výkyvům vede ke vzniku značně citlivých skupin organismů. Nejrozšířenější strategií pro přežití v reálných podmínkách je schopnost tvořit biofilm, jinými slovy inteligentní buněčnou agregaci, která poskytuje několik zásadních výhod pro udržitelnost života. Fixací populací přítomných v tomto mikrobiálním konsorciu k pevnému podloží se zvyšuje pravděpodobnost styku se zdroji substrátu, který je distribuován vodou. Na tomto místě musí být zdůrazněno, že vodní aktivita je klíčovým předpokladem pro přítomnost života kdekoliv. Biofilm sám o sobě má vlastní retenční schopnost vůči vodě. Druhou velkou předností biofilmu je jeho úloha v obranné strategii, buňky asociované v biofilmu dokáží účinně čelit inhibitorům, toxickým účinkům některých látek, popř. extrémním výkyvům parametrů prostředí (teplota, pH, osmotický tlak). V neposlední řadě představuje strategie biofilmu účinný prostředek, jak efektivně kolonizovat prostředí, protože sám biofilm může suplovat zdroj mikrobiálních jedinců pro další rozšiřování v systému, jsou-li podmínky slučitelné s požadavky na životní projevy konkrétních skupin mikroorganismů.

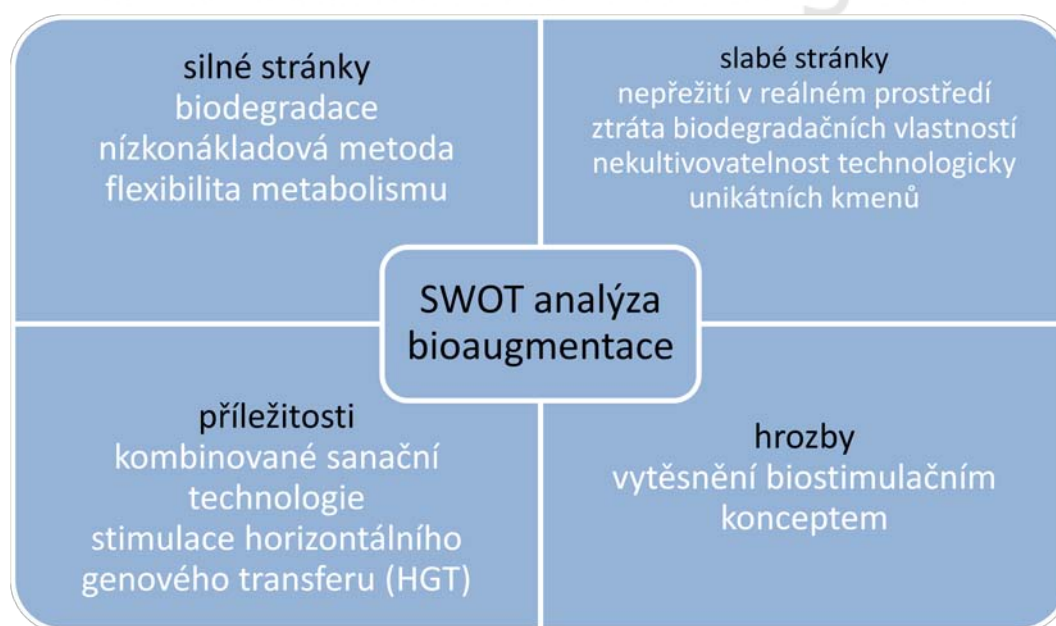
Doplňkovým nástrojem, díky kterému mikroorganismy představují velmi flexibilní složku prostředí, je schopnost horizontálního transferu genetické informace, nikoliv pouze vertikálně v rámci mateřské a dceřiné buňky, nicméně mezi různými rody. Tímto se může příjemce obohatit o unikátní metabolické nebo fyziologické vlastnosti, které mohou sehrát klíčovou roli v přežití v daném prostředí. Z bioremediačního pohledu se takto může šířit i informace, která je zodpovědná za kódování schopnosti vytvářet vhodné enzymy pro biologickou transformaci nebo degradaci polutantů. Posledním klíčovým termínem, jenž uzavře tento blok, je fenomén nekultivovatelných mikroorganismů, pro něž anglosaská literatura používá akronym VBNC (živé, ale nekultivovatelné). Nejstřídmější odhady environmentálních mikrobiologů hovoří o tom, že až 99,9 % (viz. rámeček 2) mikrobiálních druhů přítomných na Zemi je nekultivovatelných v režimu metod, jež jsou spojené s růstem.¹ Identifikace, studium funkčních vlastností i stanovení počtu souvisí u konvenčních metod s potřebou kultivovat tyto organismy v definovaném kultivačním systému. Nevýhodou (kromě vyšší spotřeby času na analýzu) je nepostihnutí skutečného profilu přítomných mikrobiálních zástupců právě z výše uvedených důvodů. Jedním z racionálních vysvětlení je skutečnost, že autochtonní mikroorganismy v mnoha případech představují tzv. oligotrofy, tedy organismy, které jsou schopné vystačit s výrazným minimem dostupných živin, aniž by se to zásadně projevilo na jejich životních

¹ Kimura N.

funkcích. Kultivace v umělých systémech většinou představuje dodávku kompletního spektra nutričních faktorů a u oligotrofně žijících mikroorganismů tak dochází k vyvolání nutričního stresu a s tím spojených šoků.

SWOT analýza bioaugmentace

V projektovém managementu plní názornou a ilustrační funkci SWOT analýza, rozbor silných a slabých stránek problému a příležitostí, resp. hrozeb z něho vyplývajících. Je-li společným jmenovatelem těchto oblastí bioaugmentace, může se na tomto modelu přehledným způsobem demonstrovat potenciál, slabiny a perspektivy směru, jímž je vnášení biologického činitele do kontaminovaného prostředí obecně.



Obr. 1 SWOT analýza bioaugmentačního konceptu

Není pochyb o tom, že jednou z nejsilnějších stránek jakékoliv formy bioremediace je její nízkonákladovost v porovnání s metodami chemickými, fyzikálními nebo mechanickými. Své zde sehrává rovněž již dříve uskutečněný objev procesů přirozené atenuace, tedy komplexní struktury dějů, kdy prostředí samo o sobě je schopné dílčím způsobem umenšovat environmentální rizika plynoucí z přítomnosti kontaminantu v prostředí. Ukázalo se, že v mnoha případech její podpora dokáže efektivně řešit environmentální problém. V prostředí střední Evropy se však spíše jedná o tzv. kombinované sanační technologie, z důvodů odlišných geograficko-geologických charakteristik, než jaké jsou např. v USA. Slabinou bioaugmentačního konceptu může být omezená schopnost vnášených mikroorganismů do horninového prostředí, popřípadě ztráta konkrétní biodegradční schopnosti a z čistě technologického hlediska pak nekultivovatelnost nekultivovatelných mikroorganismů, které v mnoha ohledech jsou nositeli transformace polutantů do méně škodlivých podob. Příležitosti, které z bioaugmentace vyplývají, jsou jednoznačně silná vazba na kombinované sanační technologie jako vhodný doplněk některých abiotických konceptů (ISCO, sanační promývání). Druhou velkou příležitostí je jakékoliv další potvrzování významu fenoménu horizontálního genového transferu. Za hrozbu bioaugmentačního konceptu bývalo dříve považováno vytěsnění biostimulací (úpravou podmínek pro přirozené mikroorganismy na dané lokalitě), nicméně dnes lze v některých případech profitovat z kombinace obou přístupů.

Soumrak bioaugmentace

Bioaugmentace polarizuje odbornou veřejnost. Na jedné straně její zastánci, kteří ji vnímají jako unikátní nástroj „ochočení“ biologického činitele v inženýrském režimu s nedozírnými možnostmi uplatnění, na druhé straně skeptici, jež deklarují neschopnost uměle kultivované mikrobiální populace v systému reálných podmínek vůbec přežít. Pravda leží mezi těmito póly. Proč? Rozhodně nelze zpochybnit díky obrovské metabolické pestrosti význam mikroorganismů v biodegradčních procesech. Každý alochtonní mikroorganismus byl kdysi (před svou izolací, selekcí a propagací) mikroorganismem autochtonním, tedy původním, indogenním. Procesem kultivace v uměle vytvořených podmínkách však snadno pozbuďte schopnosti přizpůsobovat se reálným výkyvům podmínek a stane se výrazně senzitivnějším. To nahrává kritikům bioaugmentace, kteří zpochybňují účinnost takové metody, zejména argumentací o neschopnosti přežít. Velmi dobrým obranným protiargumentem zastánců se tak stává právě výše několikrát zmiňovaný horizontální genový transfer. Smrt injektovaných mikroorganismů tak v podstatě může představovat vítězství, neboť geneticky kódovaná informace o schopnosti rozkládat konkrétní polutant může být vstřebána příjemcem v podobě původního mikrobiálního osídlení na kontaminované lokalitě.

Východiska a řešení

Někteří výzkumní pracovníci jsou přesvědčeni, že průlomem v bioaugmentační koncepci bude plná legalizace aplikace geneticky modifikovaných mikroorganismů. V USA se s oblibou používá termín „superbug“, univerzální mikrobiální biodegradér, který je schopen transformovat cokoli škodlivého, na cokoli neškodného. Toto je skutečně z oblasti sci-fi, neboť geneticky modifikovaný mikroorganismus je v mnoha případech ještě citlivější, než v umělých podmínkách připravované populace mikroorganismů alochtonních. A s ohledem na minimální posun v predikci možných rizik nikoliv vůči lidskému zdraví, ale spíše vůči ekosystémům, je málo pravděpodobné uvolnění těchto technologií na bázi GMO do běžné praxe. Ukazuje se, že bioaugmentace stále své uplatnění má, zejména tehdy, naplňuje-li firma z odvětví sanačního servisu marketingový koncept produkt (biopreparát) – služba (precizní aplikace s maximální podporou účinnosti zákroku). EPS, s.r.o. v rámci své výzkumně-vývojové činnosti dosáhla a zejména prakticky odzkoušela koncept biopreparátů na bázi mikrobiálních společenství. Pro ropné látky byl vyvinut preparát, v němž dominuje bakterie schopná degradace ropných uhlovodíků, efektivitu procesu však posilují dva další druhy bakterií, jejichž úkolem je saturovat systém biologickými povrchově aktivními látkami. Chlorované uhlovodíky jsou řešeny ve stupni tzv. DCE stall unikátní technologií, která se opírá o kombinaci bakteriálních kmenů zužitkovávajících v režimu syntrofie (vzájemné potravní prospěšnosti) a za aerobních podmínek skupinu chlorovaných uhlovodíků odvozených od dichlorethylenu (DCE). Velmi úspěšným biopreparátem pro dekontaminaci ropných kontaminací nebo likvidaci odpadních tuků v *ex situ* režimu je preparát opřený o lipofilní kvasinku. V neposlední řadě pro degradaci látek ze skupiny endokrinních disruptorů bylo vyvinuto speciální inkulum dvou bakteriálních taxonů, které tyto látky využívají jako zdroj uhlíku a energie. V rámci řešení projektu TIP FR-TI1/318 jsou vyvíjeny podobně unikátní biologické preparáty pro aplikaci v lokalitách nebo maticích zatížených polyaromatickými uhlovodíky, MTBE a látkami ze skupiny BTEX. Cílem je poskytovat komerčně dostupná řešení pro dočišťování lokalit na bioremediační bázi v duchu marketingového kontinua produkt – služba.

ZÚ 2011

Literatura

Kimura, N.: Metagenomics: Access to unculturable microbes in the environment (2003)

Poděkování

Autoři si dovoluují poděkovat poskytovateli dotace pro výzkum a vývoj z programu TIP za finanční podporu programu FR-TI1/318.

