

# VLIV OXIDAČNÍCH ČINIDEL NA PŘIROZENOU MIKROFLÓRU KONTAMINOVANÝCH MATRIC

## EFFECTS OF OXIDATION AGENTS ON TO A CONTAMINATED MATRIX NATURAL MICROFLORA

**Petr Beněš<sup>1)</sup>, Kateřina Vítková<sup>1)</sup>, Jiří Mikeš<sup>2)</sup>**

1) Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28, e-mail: [Petr.Benes@vscht.cz](mailto:Petr.Benes@vscht.cz)

2) EPS, s.r.o. V Pastouškách 205, 68604 Kunovice, [www.epssro.cz](http://www.epssro.cz)

### 1 Abstrakt

Studie se týká studia sanační metody in-situ chemické oxidace (ISCO) a možnosti její kombinace biologickým stupněm dočištění. Princip metody ISCO spočívá v aplikaci oxidačního činidla do kontaminované zóny a v následné destrukci kontaminantů. Pro biotu nepříznivé podmínky, způsobené ISCO obnáší zejména změnu pH a oxidačního potenciálu. ISCO naopak podporuje mikrobiální děje na kontaminované lokalitě snížením koncentrace toxických látek, zvýšením biologické dostupnosti substrátů, produkcí biologicky dostupných a degradovatelných látek a produkcí kyslíku pro aerobní biologickou transformaci kontaminantů. V rámci studie byly provedeny experimenty pro ověření vlivu různých koncentrací manganistanu draselného na mikroflóru, běžně se vyskytující v půdním vzorku. Dále byly testovány možnosti reinokulace zeminy, která byla kontaktována s oxidačním činidlem s cílem popsat možnosti reinokulace zeminy v rámci reálného sanačního zásahu. Nejdůležitějším zjištěním této studie je fakt, že v časovém úseku následujícím v heterogenním systému po sterilizaci vodné fáze manganistanem draselným je patrný prudký nárůst kultivovatelných mikroorganismů ve všech vzorcích ošetřených manganistanem. Tento nárůst je nejintenzivnější u vzorku, který byl ošetřen nejkoncentrovanějším roztokem manganistanu. Detekované mikroorganismy jsou zřejmě po odeznění nejintenzivnějšího oxidačního vlivu uvolněny z horninového prostředí do vodné fáze. Nejintenzivnější nárůst biomasy ve vzorku s původně největší koncentrací manganistanu je možné vysvětlit obohacením vodného prostředí o produkty štěpení huminových látek, případně o další produkty proběhlých redoxních procesů, které evidentně neinhibují růst a naopak mohou kladně podporovat růst a reprodukci mikroorganismů, popřípadě i figurovat jako primární substrát.

#### Abstract:

The study deals with the study of in-situ chemical oxidation (ISCO) as a remediation technology method and possibility of coupling ISCO with biological cleanup. Principle of ISCO is the application of oxidizing agent into the contaminated zone and the subsequent destruction of the contaminants by oxidation processes. Adverse conditions for soil biota caused by ISCO, involves particularly a change of pH and oxidation potential. On the contrary, ISCO enhances microbial processes on contaminated site by reducing concentration of toxic substances, by increasing bioavailability of substrate, by production of bio-available and bio-degradable substances, by production of oxygen for aerobic biological transformation of contaminants. Experiments verified the effect of different concentrations of potassium permanganate on microflora commonly occurring in soil sample. Further reinoculation experiments of soil which was contacted with an oxidizing agent were designed and conducted, aimed to describe the possibility of soil reinoculation within the real decontamination intervention. The most important finding of this work is following: Heterogeneous system in the time slot following the sterilization the aqueous phase with potassium permanganate is a noticeable surge of culturable microorganisms in all the samples treated with permanganate. This surge is the most intensive in the sample which was treated with the most concentrated permanganate solution. Detected microorganisms are apparently released from the soil environment into the aqueous phase after the decrease of the most intensive oxidative stress. The most intensive increase in biomass in the sample with the highest original concentration of permanganate can be explained by enrichment of the aqueous environment by the fission products of humic substances, and possibly by other products of passed redox processes, which evidently do not inhibit the growth. Contrawise this products can support the growth and reproduction of microorganisms, eventually act as a primary substrate.

## **Klíčová slova:**

In-situ chemická oxidace, manganistan draselný, bioremediace, kombinované sanační technologie.

## **Keywords:**

In-situ chemical oxidation, potassium permanganate, bioremediation, train technologies.

## **2 Úvod, výchozí skutečnosti**

Sanace kontaminovaných lokalit je dnes běžně prováděna konvenčními technologiemi, které nevyužívají žádné biologické preparáty. K těmto technologiím patří hydraulické metody, venting, podzemní těsnící stěny, sanační stěny, termické metody, pračky zemin a v neposlední řadě i in-situ chemická oxidace - ISCO

ISCO je jednou z perspektivních metod sanace kontaminovaných matric, kdy působením oxidačního činidla jsou kontaminanty degradovány na formu pro konkrétní biosystém neškodnou. V současné době ale přibývá zájmu o sanační techniky založené na biologických procesech. Lákavá je detoxikace a mineralizace polutantu na biomasu, CO<sub>2</sub> a vodu použitím bioremediačních technologií, při nichž jsou degradační procesy vedoucí k destrukci organických molekul uskutečňovány bakteriemi a jinými mikroorganismy či vyššími organismy. V poslední době byla několika studii prokázána kombinovatelnost metody ISCO s bioremediací, správná realizace propojení ISCO s bioremediací může poskytnout účinnější, rychlejší, cenově výhodnější ošetření lokality než metoda ISCO a bioremediace realizované samostatně.

### **2.1 Přímé účinky KMnO<sub>4</sub> na mikroorganismy**

Přestože má manganistan silné desinfekční účinky, rekolonizace oxidačně ošetřené lokality původně přítomnými mikroorganismy nastává rychle (řádově v týdnech až měsících). Navíc téměř s žádnými rozdíly v diverzitě komunit před a po oxidaci. Problémy může způsobit vznikající MnO<sub>2</sub>, může se totiž chovat jako alternativní donor elektronů. Tak může inhibovat redukční dechloraci v následné bioremediaci zbytkových kontaminantů po ISCO. [Dave] Negativní účinek manganistanu na mikroorganismy na buněčné úrovni spočívá oxidaci komponent buněk. Manganistanový iont je schopen oxidovat pyrimidinové báze v buněčné DNA. [Sahl]

### **2.2 Vliv ISCO na mikrobiální aktivitu**

Ve výsledcích z laboratorních a provozních studií nalezneme značné rozdíly. Zatímco je v laboratorních testech prokázána mikrobiální inhibice, v provozních podmínkách se ukazuje zdánlivě malý dopad ISCO na mikrobiální aktivitu. Laboratorní testy poskytují výsledky jen v krátkém časovém měřítku, proto nereprezentují složité mechanismy a dlouhý časový horizont dopadu ISCO v provozních podmínkách. Zde se uplatňuje porozita heterogenního média, která způsobuje krátkou cirkulaci zasakovaného oxidantu. Tato krátká doba cirkulace oxidantu a prachové částice zabraňují kontaktu mezi oxidantem a mikroby, tím jim poskytují ochranu a dovolují přežití. [Harpovic]

Oxidant je zasakován v místě nejvyšší koncentrace kontaminantu (zdrojové zóny), zde je v důsledku přímého kontaktu oxidantu s mikroorganismy a vysoce oxidačních podmínek inhibována mikrobiální aktivita. Populace mikroorganismů citlivých ke změně oxidačních podmínek poklesne, zatímco jiné druhy, necitlivé ke změně redoxního potenciálu, nejsou ovlivněny nebo dokonce reagují příznivě. Ve větších vzdálenostech od zdrojové zóny, kde je dopad oxidantu minimální dochází k přirozené atenuaci, biologickému dočištění.

Čas potřebný k obnově původních mikrobiálních populací není znám, ale po jeho uplynutí je mikrobiální aktivita a míra biodegradace zvýšená, v některých případech dokonce i na úroveň vyšší než před aplikací ISCO. Tato zvýšená bioaktivita může být vysvětlena zvýšenou dostupností substrátů a metabolitů, sníženou koncentrací toxických kontaminantů a problematických sloučenin, oxidací NOM na jednoduché substráty, zmírněnou kompeticí o nutriety a substrát s ostatní mikrobiotou, odstranění mikrobiálních predátorů (protozoa), zvýšenou teplotou, a zvýšením dostupných koncových akceptorů elektronů (TEA). [Allen] V žádné z dosavadních studií nebyl materiál po oxidaci plně sterilizován a mikrobiální aktivita nebyla permanentně inhibována.

### 2.3 Vliv ISCO na přirozenou atenuaci

Procesem přirozené atenuace dochází k degradaci kontaminantů metabolickými procesy, probíhajícími v buňkách přirozeně se vyskytujících mikroorganismů a rostlin.

Chemická oxidace může pozitivně i negativně ovlivňovat mikroorganismy, obecně ale zvyšuje biologickou dostupnost polutantů. [Jason]

Výsledky provozních i laboratorních studií ukazují, že přestože krátce po aplikaci ISCO mohou být mikroorganismy negativně ovlivněny, v delším časovém horizontu lze očekávat obnovu mikrobiální biomasy. Směs kontaminantů může obsahovat látky, které nejsou oxidovatelné. K úplné transformaci kontaminantů v takovém případě vyvstává potřeba redukčních procesů, zejména biologickými mechanismy. Lze očekávat, že téměř ve všech případech bude podporovaná přirozená atenuace nedílnou součástí aplikace ISCO.

Metodou ISCO tedy nedochází k úplné oxidaci veškeré kontaminace, k plné remediaci je potřeba následného kroku biologického dočišťování. [Cassidy] V otevřeném systému in situ je (dokonce po lokální sterilizaci chemickou oxidací) vždy půdní mikroflóra zpětně obnovena, díky podzemní vodě, přinášející původně přítomné mikroorganismy. [Brown]

### 2.4 Optimalizace ISCO pro následnou bioremediaci

Proces bioremediace spočívá v akceleraci přirozených biodegradčních procesů nebo v obohacení půdního prostředí o mikroorganismy, schopné destrukce kontaminantů. Podle charakteristiky prostředí může post-oxidační podporovaná bioremediace probíhat v anaerobních nebo aerobních podmínkách.

Správná realizace propojení ISCO s bioremediací může poskytnout účinnější, rychlejší, cenově výhodnější ošetření lokality než metoda ISCO a bioremediace realizované samostatně. Nicméně kombinace agresivní chemické oxidace s delikátní mikrobiální aktivitou vyžaduje plné porozumění dopadů každého kroku na půdní geochemii, biotu, chemismus přeměny kontaminantu. Pro optimalizaci metody ISCO spřažené s bioremediací je třeba se zaměřit na parametry určující úspěch. [Sutton]

Namísto výběru režimu chemické oxidace na základě typu kontaminantu může být chemické ošetření navrženo tak, aby co nejméně nepříznivě ovlivňovalo mikrobiální populace. Tato strategie obecně zvyšuje celkovou efektivitu odstranění kontaminace prostředí.

Podmínky způsobené ISCO oxidací mohou výrazně ovlivnit efektivitu následné biodegradace zbytkových kontaminantů. Chemická oxidace způsobuje nepříznivé podmínky pro růst a funkci mikroorganismů zejména změnou pH a oxidačního potenciálu. ISCO produkuje široké spektrum oxidovaných substrátů. Aby byl možný následný krok bioremediace, musejí být tyto látky biologicky dostupné a biodegradabilní.

Sledováním vlivu Fentonova činidla na biodegradaci byla v jednom případě oxidací odstraněna biodegradabilní frakce PAHs a tím zabráněno další bioremediaci. [Anuola] V jiném případě byla však oxidací uvolněna škála lehce biodegradabilních oxidačních produktů. [Liang]

Z mnoha studií byly vyvozeny závěry, že ISCO zvyšuje celkovou remediaci

- 1) snížením koncentrace látek toxických pro biotu. [Chapelle]
- 2) zvýšením biologické dostupnosti původního substrátu. [Kulik], [Miller]
- 3) produkcí biologicky dostupných a degradovatelných látek. [Brown], [Lee], [Marley], [Nam]
- 4) produkcí kyslíku pro aerobní biologickou transformaci kontaminantů. [Cassidy]

Tyto výsledky naznačují možnost zaměření se na optimalizaci ISCO spojenou s odstraněním méně biologicky odbouratelných sloučenin. [Jason]

### 2.5 Vliv typu oxidačního činidla na následnou bioremediaci

Obecně platí, že ISCO poskytující nejvyšší odstranění kontaminace nejvíce negativně ovlivňuje mikroorganismy a tím i celkovou účinnost remediace. [Jason]

Ve studii porovnávající ISCO manganistanem a Fentonovým činidlem na lokalitě kontaminované leteckým palivem se prokázala nejvyšší míra dekontaminace manganistanem. V celkovém porovnání efektivit byly ale výsledky opačné. Použitím méně agresivního oxidantu, který méně narušuje podmínky, byly pozorovány minimální následky na aktivitě mikroorganismů, tím byla zvýšená celková bilance odstranění kontaminace. [Xie]

Ve studiích, porovnávajících účinnost ISCO a následné bioremediace pomocí ozónu, Fentonova činidla a disíranu na lokalitě kontaminované 2,4-dinitrotoulenem se prokázalo, že oxidací disíranem dochází nejrychleji k celkovému odstranění kontaminace, přestože samotnou oxidací ISCO je kontaminant odstraněn nejméně. [Cassidy]

Vysoké koncentrace síranu vyskytující se v půdním prostředí následně po aplikaci ISCO disíranem sodným, stimulují sulfát-redukující bakterie. Je však nutné vyvarovat se vzniku toxického H<sub>2</sub>S nastolením podmínek podporujících produkci HS<sup>-</sup>. [Cassidy, Hampton]

## 2.6 Vliv množství zasakovaného oxidantu

Výsledky studií vlivu množství a koncentrace oxidantu podávají podobné výsledky jako studie vlivu typu oxidantu. Obdobně bylo prokázáno, že méně agresivní chemické odstraňování polutantu poskytuje vyšší celkovou remediaci. Tedy kratší doba vystavení oxidačnímu činidlu, menší dávky a nižší koncentrace oxidantu. V případě největší dávky málo koncentrovaného roztoku manganistanu v laboratorních experimentech s PCE kontaminovanými vzorky písčité zeminy byly obdrženy nejpříznivější výsledky. [Sahl]

Shrnutím dosavadních studií dospějeme k závěru, že minimalizací přímého kontaktu bakterií s koncentrovaným roztokem oxidačního činidla je minimalizován dopad na mikroorganismy a jejich aktivitu. Tím je dosaženo vyšší celkové nápravy. [Jason]

## 2.7 Optimalizace mikrobiální regenerace následně po aplikaci ISCO

V ideálním případě nastává biodegradace okamžitě po ISCO. Ve skutečnosti je ale obnova mikrobiální aktivity kontinuálním procesem. V procesech podporované přirozené atenuace jsou navozovány optimální podmínky dodatkem donorů nebo akceptorů elektronů, nutrietů, v případě bioaugmentace dodatkem vhodných bakterií. Aby byla docílena správná aktivita biodegradujících mikrobů, bývají v rámci biostimulace napraveny redoxní podmínky pro podporu aerobních nebo anaerobních mikroorganismů.

## 2.8 Cíle práce

Hlavním cílem této studie bylo otestovat vzorky komerčně dostupného substrátu na přítomnost mikroorganismů. Tento vzorek byl následně kontaktován s definovanými roztoky manganistanu draselného o různých koncentracích a byl sledován vliv oxidačního roztoku na množství živých mikroorganismů v systému, dále byl pozorován vliv následné reinokulace.

# 3 Experiment

## 3.1 Analýza použitého substrátu a použité metody

*Substrát:* Nejprve byla určena vlhkost vzorku sušením při 105°C do konstantní hmotnosti. Poté byl vzorek homogenizován a podroben elementární analýze v centrálních laboratořích VŠCHT formou subdodávky.

*Kultivace:* Principem metody kultivačního stanovení počtu heterotrofních organismů je izolace mikroorganismů z prostředí, jejich zředění ve vhodném médiu (fyziologický roztok), roztěr na Petriho misku s živným kultivačním médiem (agarem), kultivace a počítání narostlých kolonií. Touto metodou je možné stanovit pouze množství životaschopných mikroorganismů kultivovatelných na použitém médiu. Výsledné číslo proto používá jednotku CFU (Colony Forming Units = Kolonie tvořící jednotky = KTJ).

*Inokulace:* (očkování) je přenesení mikroorganismů z odebraného vzorku do čerstvého živného prostředí. *Reinokulace* je zpětné zavedení mikroorganismů do vzorku, ze kterého byly vykultivovány předchozí inokulací. Této metodě předchází příprava reinokulačního roztoku. Reinokulační roztok je připravován zaočkováním bakterií do tekutého kultivačního média, tzv. živného bujónu. Živný bujón je sterilní živné prostředí pro pomnožení bakterií, bohatý na nutriety, aminokyseliny, bílkoviny, peptidy a látky snadno mikrobiálně zpracovatelné

### 3.2 Kultivace nepozměněných reálných vzorků

Jako vzorek půdy byl použit substrát na kaktusy, obsahující 10 % hm. organického uhlíku a velmi bohatý soubor mikroorganismů. V celém následujícím textu je termínem nepozměněný vzorek označován systém *neošetřený manganistanem draselným*. Mikroorganismy ze 7,44g půdy byly extrahovány do 100ml fyziologického roztoku. Vzorek v uzavřené Erlenmayerově baňce třepán 15minut na třepačce. Po usazení půdy na dně bylo prováděno očkování a stanovení CFU. Koncentrace kultivovatelných mikroorganismů byla určována i během práce se vzorky s manganistanem, vzorek s nulovou koncentrací  $\text{KMnO}_4$  byl označen jako vzorek 5.

### 3.3 Kultivace vzorků po kontaktu s oxidantem

Do 5 Erlenmayerových baněk naváženo 30g vzorku půdy, odměřeno 300ml destilované vody. Do každé z baněk byla v čase nula přidána různá definovaná množství pevného  $\text{KMnO}_4$  (viz tab. 1). Poté byl spektrofotometricky stanovován úbytek manganistanu jeho reakcí s přítomnými látkami a mikroorganismy.

Tab. 1: Složení vzorků

Vzorek	Navážka půdy [g]	Destilovaná voda [ml]	Navážka $\text{KMnO}_4$ [g]	$\rho(\text{KMnO}_4)$ [g/l]
1	29,99	300	6,002	20
2	30,06	300	0,309	1
3	30,01	300	0,035	0,1
4	30,00	300	0,003	0,01
5	30,01	300	0	0

### 3.4 Reinokulace

Kolonie bakterií vypěstovaných na pevném kultivačním médiu (agaru) byly přeneseny pomocí bakteriologické očkovací kličky do živného bujónu. Tímto postupem byla získána suspenze mikroorganismů, tzv. reinokulační roztok, který byl dále použit k reinokulaci vzorků. Aby byla obnovena koncentrace mikroorganismů přítomná ve vzorku půdy před aplikací manganistanu, bylo do každého vzorku nadávkováno 300  $\mu\text{l}$  reinokulačního roztoku. Poté byla sledována změna počtu CFU ve vzorcích.

### 3.5 Přímý vliv $\text{KMnO}_4$ na mikroorganismy

Dále byly provedeny experimenty s cílem sledování vlivu manganistanu na mikroorganismy bezprostředně po skončení první rychlé části reakce manganistanu s organickou částí půdy. Jak bylo zjištěno v předešlých studiích [Láska], reaguje manganistan draselný s přirozenou zeminou velmi rychle, přičemž majoritní část oxidantu je redukována v prvních cca 120 minutách.

Do vzorků A, B byla dávkována koncentrace  $\text{KMnO}_4$  20 g/l, respektive 10 g/l, vzorek 5 byl ponechán bez manganistanu. Aplikace manganistanu byla provedena po 1 dni od promíchání zeminy s vodou, aby se z půdy uvolnily mikroorganismy. Ze všech vzorků byl pro následné ředění a kultivaci odebrán podíl po 2 hodinách po aplikaci manganistanu.

Tab. 2: Složení vzorků

Vzorek	Navážka půdy [g]	Destilovaná voda [ml]	Navážka $\text{KMnO}_4$ [g]	$\rho(\text{KMnO}_4)$ [g/l]
A	30,00	300	6,00	20
B	30,00	300	3,00	10
5	30,00	300	0	0

## 4 Výsledky a diskuse

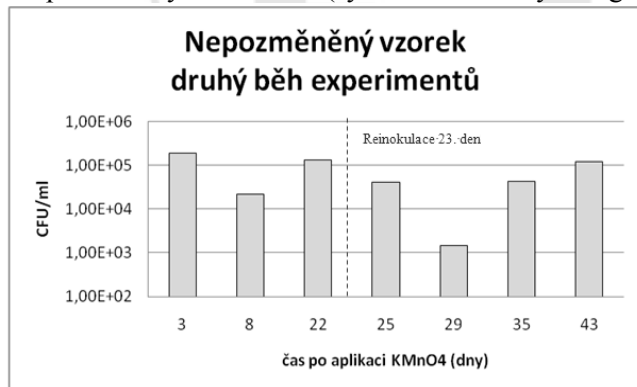
### 4.1 Výsledky analýzy použitého substrátu

Použitý substrát vykazoval vlhkost 23,4 % hm a obsah organického uhlíku 10 % hm

Z naměřených dat vyplývá, že se jedná o velmi humózní substrát s vysokou vlhkostí. Takovýto materiál je ideální pro růst přirozené půdní mikroflóry.

#### 4.2 Výsledky kultivačních experimentů nepozměněných reálných vzorků

Z hodnot počtu kolonií na agarových miskách byly vypočteny hodnoty CFU/ml v nepozměněných vzorcích (systém neošetřený manganistanem draselným).

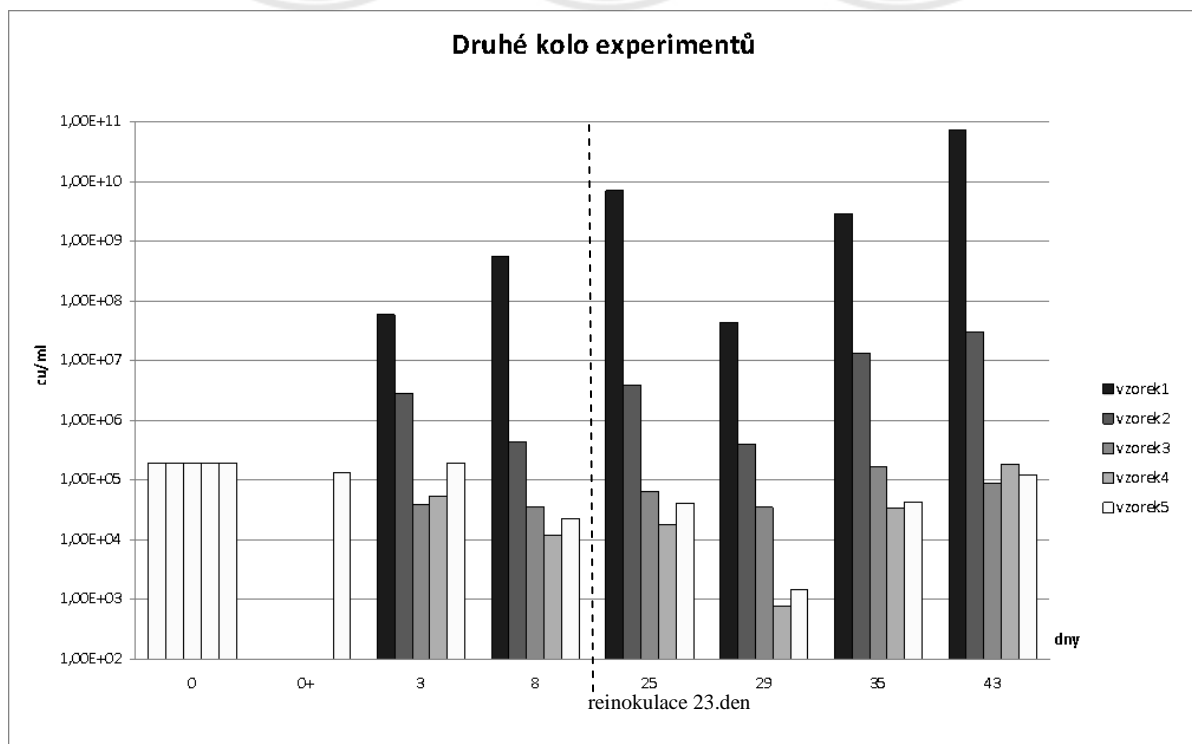


Výsledky kultivačních experimentů nepozměněných vzorků neošetřených manganistanem draselným ukazují množství kultivovatelných přítomných mikroorganismů vyjádřených jako CFU/ml ve zvolených časech odběru. Je patrné, že počet mikroorganismů kolísá v rámci jednoho řádu, což je přípustná chyba této vyšetřovací metody (až na stanovení ve 29. dni) a ani po reinokulaci nevykazuje žádné výrazné zvýšení parametru CFU/ml. Lze tedy usoudit, že v systému se vyskytuje

reálně stabilní populace mikroorganismů; jejich počet zůstává konstantní po dobu sledovaných 43 dní a není zásadním způsobem ovlivněn ani provedenou reinokulací v 23. dni (tuto skutečnost lze vnímat s největší pravděpodobností v souvislosti s příliš krátkou dobou, již velké množství mikroorganismů vyžaduje k adaptaci z uměle připraveného kultivačního systému do podmínek reálných). Tento systém se tedy jeví jako velmi stabilní a vhodný pro srovnání se vzorky, ke kterým se přidává definované množství manganistanu draselného. V rámci porovnání systémů je tedy možné pozorovat přímý vliv oxidačního roztoku na zvolené biologické systémy.

#### 4.3 Výsledky kultivačních experimentů vzorků po kontaktu s oxidantem a reinokulaci

Naměřené parametry CFU/ml jsou pro přehlednost vyneseny do grafu (obr. 1 společně s výsledky získanými pro nepozměněný vzorek. Reinokulace proběhla v 23. dni po aplikaci KMnO<sub>4</sub>.



Obr. 1: Výsledky kultivačních experimentů vzorků po kontaktu s oxidantem

Obr. 1 ukazuje graf shrnující výsledky ze všech experimentů. Parametr CFU/ml v čase nula představuje výsledky z kultivace vzorku přímo před ošetřením manganistanem draselným. Parametr CFU/ml v čase „0+“ znázorňuje okamžitý toxický účinek manganistanu na mikroorganismy vyskytující se ve vodném prostředí kultivovatelné v rámci použité metody. U vzorku neošetřeného manganistanem není zřejmá významná změna parametru CFU/ml v průběhu času.

Získané výsledky vlivu oxidačního činidla v rámci předem definovaného systému poskytují velmi překvapivá zjištění. Vzhledem k tomu, že kultivační metoda poskytuje obraz o přítomných mikroorganismech, které se uvolní do vodného prostředí, potvrzují získané výsledky fakt, že manganistan představuje destrukční činidlo vůči přítomným mikroorganismům vyskytujícím se ve vodném prostředí (viz hodnoty získané záhy po přidavku oxidačního činidla na obr. 1 označené „0+“). Nicméně přítomné horninové prostředí na dně Erlenmayerových baněk se ukazuje jako unikátní systém, který je schopný po odeznění oxidačního vlivu manganistanu dotovat vodné prostředí dalšími mikroorganismy. Jedním z vysvětlení může být zpřístupnění vodného prostředí mikroorganismům, které v různých formách přežívají v horninových strukturách, a jsou nepostihnutelné v rámci výtrepku zkoušeného vzorku do fyziologického roztoku. Změna charakteru abiotické fáze způsobená zejména oxidací, ale i dalšími nejenom chemickými změnami (mechanická deformace), zřejmě zpřístupní vodnému prostředí nezanedbatelné množství mikroorganismů, které jsou schopné v těchto podmínkách existovat a dokázaly ve struktuře horninového prostředí přežít pasáž nejintenzivnější oxidační zátěže vyvolané vstupem manganistanu do experimentálního systému. Tato dotace je (jak ukazují získané výsledky) vyšší, než úbytek počtu mikroorganismů způsobený okamžitým kontaktem biologického systému s oxidačním činidlem. Důležitou otázkou však je zohlednit, o jaký typ mikroorganismů se jedná, jaké jsou jejich požadavky na zdroj uhlíku a energie a zejména schopnost určitou dobu existovat v anoxických až aerobních podmínkách.

Mikroorganismy, které se do vodného prostředí uvolní z horninové fáze, jsou zřejmě schopny nejen přežít za nastavených podmínek, ale jak je patrné z obr. 1, jsou schopny i zvyšovat své zastoupení. Překvapivým zjištěním je, že nejvyšší nárůst biomasy v období 25 dní je pozorován u vzorku, který byl ošetřen nejkonzentrovanejším roztokem manganistanu (výchozí koncentrace 20g/l). Tento jev je pravděpodobně způsoben obohacením vodného prostředí o produkty štěpení huminových látek, případně o další produkty proběhlých redoxních procesů, které evidentně neinhibují růst a naopak mohou kladně podporovat růst a reprodukci těchto skupin mikroorganismů, popřípadě figurovat jako primární substrát.

Jedná se bezpochyby o velmi pozitivní zjištění z hlediska praktické aplikace metody ISCO, avšak je nezbytné zdůraznit, že stále existuje mnoho nezodpovězených otázek, zejména míra biodegradačního potenciálu těchto mikroorganismů. Aplikace ISCO se v zásadě týká kontaminovaných lokalit; experimenty v rámci této práce byly provedeny na modelovém nekontaminovaném systému z důvodu snížení počtu proměnných parametrů a potřeby zaplnit nedostatek informací o těchto typech interakcí.

#### 4.4 Vliv reinokulace na sledované systémy

Reinokulace systému byla provedena ve 23. dni po ošetření manganistanem a je v obr. 1 znázorněna přerušovanou linií. Motivací pro tuto analogii bioaugmentace bylo ověřit, zda nově nastolené podmínky v kultivačním uspořádání jsou nebo nejsou limitací pro umělé osídlení systému alochtonními mikroorganismy.

Ukázalo se, že v tomto případě se uplatňují nedostatky tohoto bioremediačního konceptu, které vyplývají z potřeby těchto mikroorganismů po určitou, ale dostatečně dlouhou dobu se pokusit adaptovat na reálné podmínky. Nedošlo zde ke zřetelnému navýšení přítomného mikrobiálního osídlení.

#### 4.5 Výsledky experimentů pro ověření přímého vlivu $KMnO_4$ na mikroorganismy

Tyto experimenty přinesly očekávané výsledky, manganistan vyhubil všechny mikroorganismy přítomné ve vodném roztoku. Výsledky tohoto experimentu tvoří na obr. 1 sloupec „0+“. Manganistan draselný ve fázi svého největšího oxidačního účinku vede k destrukci biologických systémů, které s ním mohou přijít do přímého kontaktu, to znamená vyskytující se ve vodné fázi experimentálního systému. Tato zjištění jsou zajímavá v rovině kombinovaných přístupů propojení

biologických a abiotických technologií, neboť bioaugmentační preparát představuje zejména volně se vyskytující mikroorganismy ve vodném prostředí.

## 5 Závěry

V rámci této studie byly provedeny experimenty s cílem popsat interakci manganistanu draselného se zvoleným vzorkem horninového prostředí. Experimenty byly zaměřeny především na sledování mikrobiálních populací ve studovaném systému. Vzorky horninového prostředí simulované vybraným substrátem byly kontaktovány s roztokem oxidantu a následně byly v definovaných intervalech prováděny kultivační experimenty a stanoven parametr CFU/ml. Během těchto experimentů byly zjištěny následující dílčí závěry:

- Elementární analýza použitého substrátu o původní vlhkosti 23,4% ukázala obsah 10% organického uhlíku. Jedná se tedy o **velmi humózní materiál**, u kterého byl **předpokládán vysoký obsah autochtonních mikroorganismů**.
- V rámci kultivačních experimentů vzorků bez ošetření manganistanem draselným bylo zjištěno, že v systému se vyskytuje **reálně stabilní populace mikroorganismů**; jejich počet zůstává konstantní po dobu sledovaných 43 dní. Na základě prezentovaných parametrů byl tento systém **zvolen jako referenční** pro následující experimenty s manganistanem draselným.
- Na obr. 1 jsou shrnuty výsledky experimentů bez i s ošetřením manganistanem draselným, včetně viditelné **totální sterilizace vodné fáze** popsané v kap. 4.5. Časový úsek následující po této sterilizaci vodné fáze ukazuje **prudký nárůst počtu kultivovatelných mikroorganismů** ve všech vzorcích ošetřených manganistanem, který je nejintenzivnější u vzorku, který byl ošetřen nejkoncentrovanějším roztokem manganistanu (výchozí koncentrace 20g/l). **Detekované mikroorganismy jsou zřejmě po odeznění nejintenzivnějšího oxidačního vlivu manganistanu uvolněny z horninového prostředí do vodné fáze**. Nejintenzivnější nárůst biomasy ve vzorku s původně největší koncentrací manganistanu je možné vysvětlit **obohacením vodného prostředí o produkty štěpení huminových látek**, případně o další produkty proběhlých redoxních procesů, které evidentně neinhibují růst a naopak **mohou kladně podporovat růst** a reprodukci mikroorganismů, popřípadě i figurovat **jako primární substrát**.
- **Reinokulace** komentovaná v kap. 4.4 ukazuje nedostatky tohoto bioremediačního konceptu, které vyplývají z potřeby mikroorganismů po určitou, ale dostatečně dlouhou dobu se pokusit adaptovat na reálné podmínky. **Nedošlo ke zřetelnému navýšení přítomného mikrobiálního osídlení**.

Výše zmíněné dílčí závěry získané v rámci experimentů provedených na modelovém nekontaminovaném systému přinášejí velmi cenná data pro kombinaci biologických a abiotických sanačních procesů. Částečně popírají často prezentovaný názor o „spálené zemi“ po zásahu roztokem manganistanu draselného, což je bezpochyby velmi pozitivní zjištění z hlediska praktické aplikace metody ISCO případně její kombinace s biologickými kroky. Je však nezbytné zdůraznit, že stále existuje mnoho nezodpovězených otázek, zejména míra biodegradačního potenciálu sledovaných mikroorganismů.





## Literatura:

- Allen, S.A., K.F. Reardon. 2000. Remediation of contaminated soils by combined chemical and biological treatment. Physical and Thermal Technologies, The Second International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Wickramanayake, G.B. and A.R. Gavaskar (Eds.), Battelle Press, Columbus, OH. 301-306
- Aunola TA, Goi A, Palmroth MRT, Langwaldt JH, Tuhkanen TA (2006) Removal of PAHs from creosote oil contaminated soil by addition of concentrated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and biodegradation. *J Adv Oxid Technol* 9:11–19
- Brown RA, Lewis R, Leahy MC, Luhrs RC (2009) In there life after ISCO? The effect od oxidants on in situ bioremediation. In: Proceedings of the tenth international in situ and on-site bioremediation symposium. Battelle, Baltimore, pp K-12
- Cassidy D, Hampton D (2009) Hydrogen sulfide production from persulfate oxidation-implications for remediation. In: Proceedings of tenth international in situ and on-site bioremediation symposium. Battelle, Baltimore, pp K-15
- Cassidy D, Northup A, Hampton D (2009) The effect of three chemical oxidants on subsequent, biodegradation of 2, 4-dinitrotoluene (DNT) in batch slurry reactors. *J Chem Technol Biotechnol*. 84, 820-826
- Dave Major, GeoSynthec Consultants, Guelph ON Sequential Application of Chemical Oxidation Using Permanganate and Bioaugmentation. University of Massachusetts Amherst, The Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy.
- Harpovic L, Sleep BE, Major DJ, Hood ED Laboratory study of treatment of trichloroethene by chemical oxidation followed by bioremediation. *Environ Sci Technol* 2005, 39:2888-2897
- Chapelle FH, Bradley PM, Casey CC, Behavior of a chlorinated ethene plume following source-area treatment with Fenton's reagent. *Ground Water Monit Remediat*. 2005, 25, 131-141
- Jason Sahl, Junko Munakata-Marr The effects of in situ chemical oxidation on microbiological processes: A review. *Remed J*. 2006, 16, 57–70.
- Kulik N., Goi A, Trapido M, Tuhkanen T, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in kreosote contaminated soil. *J Environ Manage*. 2006, 78, 382-391
- Láska, T. In-situ chemická oxidace kontaminovaných zemín aplikací manganistanu draselného – Studium reakčních mechanismů organické hmoty v rámci ISCO. bakalářská práce, ÚCHOP VŠCHT Praha, 2008
- Lee B, Hosomi M A hybrid Fenton oxidation-microbial treatment for soil highly contaminated with benz(a)anthracene. *Chemosphere*. 2001, 43, 1127-1132
- Liang YT, Van Nostrand JD, Wang J, Zhang X, Zhou JZ, Li GH (2009) Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil. *Chemosphere* 75:193–199
- Marley MC, Parikh JM, Droste EX, Lee AM, Dinardo PM, Woody BA, Hoag GE, Chheda PV (2003) Enhanced reductive dechlorination resulting from a chemical oxidation pilot test, In situ and on-site bioremediation-2003. In: Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Battelle, Orlando, p A17
- Miller CM, Valentine RL, Roehl ME, Alvarez PJJ (1996) Chemical and microbiological assessment of pendimethalin-contaminated soil after treatment with Fenton's reagent. *Water Res* 30:2579-2586
- Nam K, Rodriguez W, Kukor JJ (2001) Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere* 45:11-20
- Sahl JW, Munakata-Marr J, Crimi ML, Siegrist RL (2007) Coupling permanganate oxidation with microbial dechlorination. *Water Environ Res* 79:5–12
- Sutton, N. B., Grotenhuis, J. T. C., Langenhoff, A. A. M., Rijnaarts H. H. M. Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies. *JOURNAL OF SOILS AND SEDIMENTS* 2011, 11, 129–140.
- Xie GB, Barcelona MJ (2003) Sequential chemical oxidation and aerobic biodegradation of equivalent carbon number-based hydrocarbon fractions in jet fuel. *Environ Sci Technol* 37:4751-4760