

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Brno



BIOREMEDIACE

RNDr. Dana Horáková, CSc.

2006

Několik slov úvodem

S vývojem a využíváním vysoce citlivých analytických metod se ukazuje, že vzduch, který dýcháme, voda, kterou pijeme nebo se v ní koupeme, půda, ve které pěstujeme plodiny a prostředí, ve kterém žijí populace živočichů a rostlin, jsou kontaminovány nejrůznějšími syntetickými látkami, jejichž syntéza úzce souvisí s intenzifikací antropogenní činnosti. V zemědělsky využívané půdě a ve spodních i povrchových vodách, které se zemědělskou činností souvisejí, se jedná zejména o kontaminaci pesticidy nebo produkty, které jsou od pesticidů odvozeny. Právě hromadění pesticidů v půdě dalo podnět pro intenzivní studium jejich odstranění. Vedle pesticidů se však celá řada dalších průmyslově vyráběných sloučenin dostává do odpadních vod a půdy, a to především nedbalostí při jejich výrobě či jejich skladování. V kontaminovaném prostředí pak dochází nejčastěji k jejich samovolnému rozpadu, přičemž vznikají nejrůznější nové a většinou těžce analyzovatelné sloučeniny, které velmi často reagují s přírodní organickou hmotou.

Lze předpokládat, že znečišťující látky se v přírodě jen velmi zřídka vyskytují ve své původní čisté a chemicky definované formě, ale spíše ve formách chemicky často velmi vzdálených od struktury původní sloučeniny nebo dokonce v komplexech nebo více či méně složitých směsích. Počet takto vznikajících směsí a komplexů je nevyčísitelný, neboť množství chemikálií, které kontaminují naše životní prostředí je enormní. Rovněž koncentrace těchto kontaminujících látek může být v prostředí velmi variabilní. V místech přímého znečištění se setkáváme s kontaminací přesahující koncentraci 1.0 g /l vody či 1 g/kg půdy, tedy vyšší než 1000 ppm. Ve větších vzdálenostech od místa přímého znečištění jsou sice koncentrace kontaminujících látek (polutantů) podstatně nižší, avšak i v těchto velmi slabě znečištěných lokalitách můžeme zaznamenat jejich toxické působení, neboť se dlouhodobě akumulují ve zvířatech, rostlinách i v lidském organismu. Nelze rovněž opomenout, že celá řada chemikálií se uvolňuje do ovzduší, kde může být nejrůznějším způsobem modifikována a spolu se srážkovou činností se dostává do značných vzdáleností od vlastního místa znečištění.

Je tedy zřejmé, že předpovídat rizikové působení různých organických sloučenin na zdraví člověka, zvířat a rostlin je velmi obtížné a nemůže být založeno jen na jejich toxicitě, ale i na době expozice organismu jejich působení a na změnách, které mohou sloučeniny prodělávat v potravním řetězci nebo během jejich transportu v přírodě.

Celá řada organických molekul podléhá v přírodě abiotickému rozkladu. Např. fotochemické transformace se uskutečňují v atmosféře, v blízkosti vodní hladiny, při povrchu půdy a rostlinného pokryvu a mohou nejen některé látky modifikovat, ale i totálně rozkládat. Nefotochemické, neenzymatické reakce převažují v půdě, sedimentech a v povrchových i spodních vodách, ale jen zřídka v průběhu těchto reakcí dochází k úplné mineralizaci kontaminujících organických látek. Tyto procesy většinou vedou k pouhé modifikaci polutantu, přičemž vznikající produkty jsou nejen chemicky velmi příbuzné, ale často si zachovávají i stejné toxické vlastnosti jako výchozí látka.

Naproti tomu, enzymatické biologické procesy vedou ke značným změnám organických molekul, a to nejen v místě jejich přímé kontaminace ve vodě či v půdě, ale i v potravních řetězcích. Četné biotické procesy se mohou podílet na úplné konverzi organické látky v látku anorganickou, tedy na procesu mineralizace. Nejsou však výjimkou případy, kdy organická látka může být v biologickém procesu pouze modifikována, a to nejen strukturálně, ale i v toxikologických vlastnostech. V těchto biotických procesech se uplatňují jak rostliny, tak i živočichové, ale převaha biotických změn je uskutečňována mikroorganismy, které kontaminované prostředí osidlují.

V úvodní kapitole jsme naznačili, že složitá problematika biodegradací a bioremediací vyžaduje více, než je znalost jednoho či dvou vědních disciplin. Celá řada chemických přeměn kontaminujících látek je uskutečňována mikroorganismy, jejichž metabolický potenciál je předmětem studia mikrobiologie. Vznikající produkty jsou izolovány a kvantifikovány vysoce specifickými chemickými metodami. O škodlivosti kontaminujících látek a vznikajících produktů vypovídají studie ekologů a ekotoxikologů. Studiu kontaminovaných lokalit a návrhu technického řešení pro jejich dekontaminaci se věnují geologové, hydrogeologové a obory ekologického inženýrství. Lze tedy říci, že toto skriptum je adresováno mikrobiologům, chemikům, toxikologům, ekologům, stejně tak jako i všem, kteří se zabývají a řeší problematiku ekologického inženýrství.

RNDr. Dana Horáková, CSc.

OBSAH

BIODEGRADACE	5
Bioremediace	6
Fertilizace	6
Seeding	6
BIODEGRADACE VÁZANÁ NA RŮST MIKROORGANISMŮ	8
Asimilace uhlíku	9
Asimilace jiných prvků	10
PŘÍZPŮSOBNÍ	11
Faktory ovlivňující přizpůsobení	12
Vysvětlení pro vznik fáze přizpůsobování	13
Zmnožení malé populace degradujících mikroorganismů	13
Přítomnost toxinů (toxikantů)	14
Predace protozoi	14
Vznik nových genotypů	15
Diauxie	15
ENZYMOVÁ INDUKCE A LAG FÁZE	16
BIOTRANSFORMACE	17
Detoxikace polutantu (detoxifikace)	17
Stručný přehled detoxikačních procesů	18
Aktivace netoxického polutantu	20
Významné mechanismy aktivace	21
RIZIKA BIODEGRADACE	23
KINETIKA BIODEGRADACE	24
Procesy vázané na růst buněk	24
Biodegradace nerostoucími mikroorganismy	27
Vliv difúze a sorpce	30
KOMETABOLIZMUS	32
Enzymy s nízkou substrátovou specifitou	33
PRAHOVÉ KONCENTRACE POLUTANTU	36
BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST POLUTANTŮ	39
Sorpce	40
Chemická podstata sorpce	40
Využívání sorbovaných sloučenin	42
Kinetika	43
Stimulační efekt sorpce	43
„Stárnutí“ polutantu	44
BIODEGRADACE LÁTEK S NÍZKOU ROZPUSTNOSTÍ VE VODĚ	45
BIOSURFAKTANTY	48
VLIV CHEMICKÉ STRUKTURY NA BIODEGRADACI	50
Predikce produktů	51
VLIV PROSTŘEDÍ NA PRŮBĚH BIODEGRADACE	52
Abiotické faktory	52
Živiny v procesu biodegradace	53
Synergismus	53
Podíl predace na výsledcích biodegradace	54
Podíl vyšších rostlin na biodegradaci	54
Aerobní a anaerobní procesy biodegradace	55

BIODEGRADACE NĚKTERÝCH VÝZNAMNÝCH ORGANICKÝCH POLUTANTŮ... 55	55
Biodegradace ropy a ropných derivátů v ekosystému.....	55
Biodegradace uhlovodíků.....	58
Mikrobiální transformace karboxylových kyselin a alkoholů.....	60
Methylace a tvorba éterů.....	61
Halogenované sloučeniny.....	61
Polychlorované bifenyly (PCBs).....	62
BIOREMEDIACE TĚŽKÝCH KOVŮ.....	62
Bioakumulace a biosorpce.....	63
Biosorpční izoterma.....	64
Mechanismus biosorpce.....	64
BIOTRANSFORMACE NĚKTERÝCH TĚŽKÝCH KOVŮ.....	67
Rizika plynoucí z biotransformace kovů.....	69
PŘÍSTUPY K SANACI ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ A VYMEZENÍ NĚKTERÝCH POJMŮ.....	69
Vybrané skupiny kontaminantů.....	69
Vlastnosti vybraných kontaminantů.....	70
Vlastnosti a chování organických těkavých látek (TOL).....	70
Vlastnosti a chování částečně (obtěžně) těkavých organických polutantů.....	71
Vlastnosti a chování vybraných anorganických kontaminantů.....	72
Podíl vlastností horninového prostředí na výběr sanačních metod.....	73
NEJPOUŽÍVANĚJŠÍ SANAČNÍ TECHNOLOGIE.....	73
Konvenční sanační technologie.....	73
Bioremediační technologie.....	74
Biodegradace kontaminované půdy <i>ex situ</i>	76
Biodegradace kontaminované půdy a spodní vody <i>in situ</i>	78
Technologie biologického čištění spodních vod (<i>in situ</i> biorestation).	79
Biofiltry.....	79
Biologické odstraňování kovů.....	80
CHEMICKÁ ČASOVANÁ BOMBA (CTB).....	80
Použitá literatura.....	82

BIODEGRADACE

Biodegradace může být definována jako biologicky katalyzované snížení komplexity chemických sloučenin. Organické sloučeniny jsou v procesu biodegradace velmi často zcela rozloženy, takže vznikají anorganické sloučeniny uhlíku, dusíku, fosforu, síry a jiných prvků obsažených v původní kontaminující organické látce a tyto jsou uvolňovány do prostředí a zařazeny do koloběhu prvků v přírodě. Lze tedy říci, že tato úplná biodegradace toxické organické látky, která je známá pod pojmem **mineralizace**, je přírodě velmi prospěšná. Ve své podstatě respirace rostlin a živočichů je rovněž mineralizačním procesem, ve kterém dochází k rozkladu celé řady organických látek v živém organismu. Syntetické organické látky jsou však nejčastěji rozkládány již přímo v kontaminovaném prostředí osídleném mikroorganismy s rozsáhlou metabolickou aktivitou.

Vedle těchto biologických přeměn kontaminujících organických látek dochází ke snížení jejich komplexity rovněž působením celé řady **abiotických procesů**. Účinnost těchto abiotických procesů je však jen těžko srovnatelná s vysokou účinností biologické přeměny. Mikroorganismy jsou tedy nejvýznamnějším faktorem, který se podílí na mineralizaci antropogenních sloučenin v půdě, ve vodě a v sedimentech.

Celá řada syntetických sloučenin, které jsou zavlečeny do prostředí, je vysoce toxická nejen pro člověka a zvířata, ale i pro mikroorganismy. Z tohoto důvodu nemusí dojít v prostředí k jejich úplné destrukci, tedy k mineralizaci. Často jsou však pozorovány abiotické, popř. i biologické, tzv. **transformační procesy**, které vedou k tvorbě nových organických látek vznikajících konverzí původní organické toxické látky. Produkt této transformace se obvykle v prostředí hromadí a dlouhodobě perzistuje. Všeobecně je tedy abiotická či biologická transformace organických polutantů nežádoucí, neboť vytváří novou, většinou po chemické a toxikologické stránce neznámou kontaminaci. Odhalení nově vzniklého rizika ve vztahu ke zdraví člověka, zvířat a rostlin vyžaduje často značně nákladné hledání nových chemických a ekotoxikologických metod. Omezení detekovatelného rizika podmiňuje projekt sanačních opatření, na kterém se podílejí jak ekotechnologové, tak i mikrobiologové.

Mikrobiální degradace je procesem historickým. Tisíce látek, které byly připraveny člověkem v laboratořích, může být mikrobiologicky modifikováno nebo rozloženo v přirozeném prostředí. Degradací procesy byly pozorovány v kontaminovaných půdách a odpadních vodách, na skládkách, ve spodních i povrchových vodách, oceánech a sedimentech nejrůznějšího původu. Bylo prokázáno, že na degradaci polutantů v těchto prostředích se významnou měrou podílejí rozsáhlé mikrobiální komunity bakterií, hub a protozoí, které přímo nebo nepřímo rozkládají a využívají jak řadu přirozených organických látek, tak i celou řadu syntetik. Degradací procesy, ve kterých mikroorganismy využívají organické látky, mohou být aerobní i anaerobní. K tomu, aby se uskutečnila biodegradace organického polutantu v kontaminovaném prostředí, musí být však splněny určité předpoklady, za kterých dojde k transformaci či mineralizaci organické látky:

- **Musí existovat organismus**, který produkuje vhodné enzymy pro uskutečnění určité cílené biodegradace. Pouhá existence takového organismu s odpovídajícím katabolickým potenciálem je sice nutná, ale pro uskutečnění biodegradace není dostačující.
- Takto vybavený **organismus musí být přítomný** v kontaminovaném prostředí. Je známo, že mikroorganismy osidlují prakticky každé fyziologicky vhodné prostředí, avšak nemusí být vždy přítomen organismus s vhodným enzymatickým vybavením.

- **Organický polutant** musí být pro organismus s vhodným katabolickým potenciálem **dostupný**. Je známa celá řada organických látek, které v prostředí perzistují i za přítomnosti degradujících mikroorganismů, neboť jsou nerozpustné ve vodě či sorbované na pevné povrchy.
- Organismy s katabolickým potenciálem musí poskytovat **možnost penetrace** polutantu či transformačních produktů přes membránu, neboť biodegradace bývá uskutečňována jak extracelulárními, tak i intracelulárními enzymy.
- Populace nebo biomasa degradujících bakterií či hub osidlujících přirozené prostředí bývá pro uskutečnění biodegradace nebo transformace polutantu často nedostatečná. Z tohoto důvodu je vhodné **upravit fyziologické podmínky** kontaminovaného prostředí tak, aby dovolily rychlé množení potenciálně aktivních mikroorganismů.

Můžeme tedy shrnout, že pokud organické znečištění v prostředí perzistuje, pak nebyla splněna některá z výše uvedených podmínek pro umožnění jeho eliminace nebo že degradace probíhá velmi pomalu nebo že neexistuje organismus s odpovídající degradační kapacitou.

Bioremediace

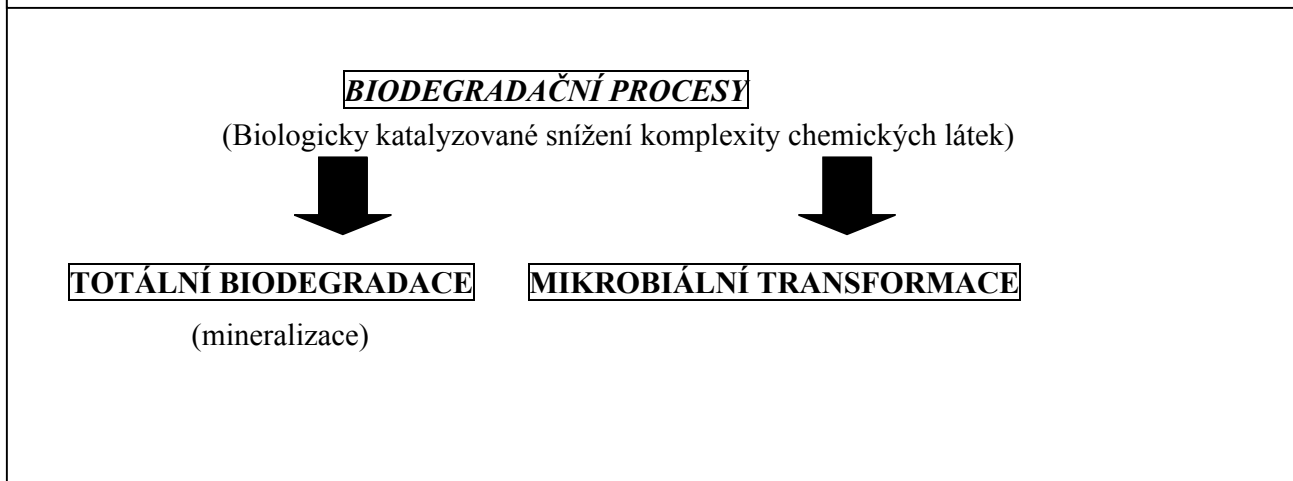
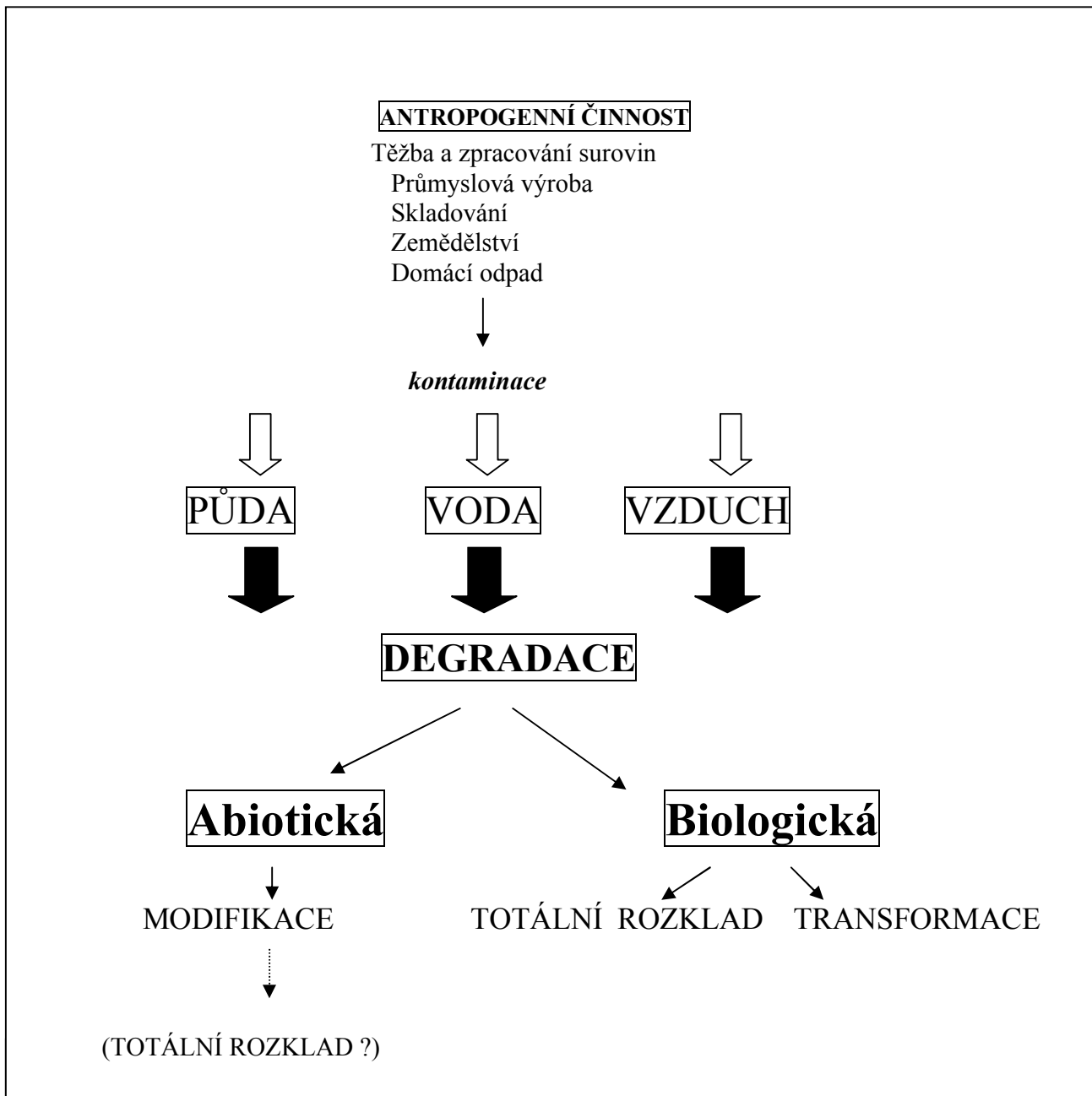
je **variantou biodegradace**. Proces biodegradace se týká všech přirozených procesů, které jsou uskutečňovány bakteriemi a jinými mikroorganismy či vyššími organismy, které vedou k destrukci organických molekul. Proces bioremediace spočívá v akceleraci těchto přirozených biodegradačních procesů nebo v přísně cílené biodegradaci. Procesy bioremediace snižují rizika nežádoucí přirozené transformace kontaminujících látek a rizika perzistence neznámých transformačních produktů v prostředí. Bioremediace je tedy biodegradační metodou, která vede k ozdravení kontaminovaného prostředí. Bioremediace může být na základě znalostí podmínek prostředí, jeho mikrobiálního osídlení a charakteru znečištění uskutečňována dvěmi základními metodami:

Fertilizace

je bioremediační metoda, která spočívá v akceleraci již probíhajících pomalých biodegradačních procesů, uskutečňovaných přirozeně se vyskytující mikroflórou. Nejčastěji spočívá ve stimulaci růstu vhodných degradátorů přidávkem zdrojů dusíku a fosforu, popř. růstových faktorů či induktorů specifických enzymů.

Seeding

spočívá v obohacení kontaminovaného prostředí degradátory se známým katabolickým potenciálem. Spolu s těmito mikroorganismy mohou, ale nemusí být aplikovány i potřebné živiny a růstové faktory. Bioremediace uskutečňovaná metodou seeding je prováděna nejčastěji s mikroorganismy izolovanými z přirozeného prostředí. V procesu bioremediace–seeding zatím nejsou využívány geneticky modifikované mikroorganismy, i když v laboratorních podmínkách jsou tyto mikroorganismy konstruovány a využívány pro studium biodegradačních procesů a konstrukci biodegradačních drah.



BIODEGRADACE VÁZANÁ NA RŮST MIKROORGANISMŮ

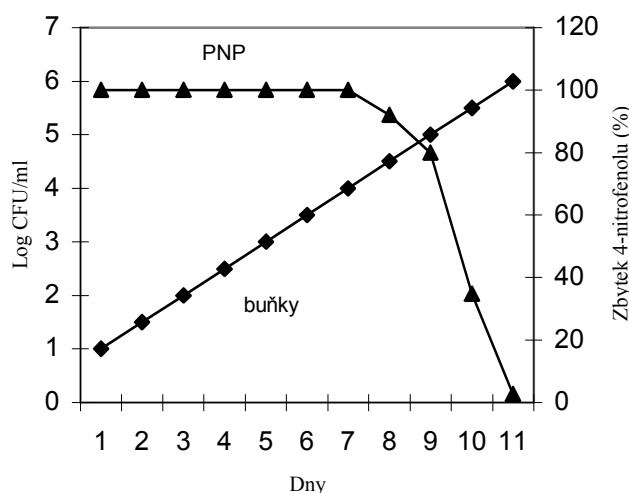
Mikroorganismy vyžadují celou řadu přirozených organických a anorganických látek, které využívají jako zdroj uhlíku, energie, dusíku, fosforu, síry nebo jiných prvků nutných pro život buňky. Největší pozornost je však zaměřena na studium zdrojů uhlíku a energie, neboť organické uhlíkaté látky patří mezi nejdůležitější kontaminanty životního prostředí. Schopnost mikroorganismů využívat organický substrát jako zdroj uhlíku a energie pro růst je prokazatelná laboratorně tzv. **enrichment-culture technique**. Tato metoda je založena na selektivním využívání jednotlivých testovaných organických sloučenin jako zdroje C a energie pro růst studovaného mikroorganismu, přičemž růst mikroorganismu je sledován v prostředí obsahujícím všechny nutné anorganické živiny, ale žádný jiný zdroj uhlíku a energie. Za těchto podmínek je studovaný mikroorganismus (degradující druh či kmen) schopný růst jen tehdy, jestliže testovanou organickou látku využívá a tedy i degraduje. Při testování přirozených mikrobiálních populací se jen velmi málo bakterií a hub může za podmínek tohoto jednoduchého pokusu množit. Přesto opakovaná selekce a nahromadění degradujících mikroorganismů s mikroorganismy. Technika obohaceného syntetického prostředí však může být i neúspěšná, neboť se experimentátor může dopustit některých závažných chyb, které nenavozují vhodné růstové podmínky pro mikroorganismy s hledaným degradačním potenciálem. Nejčastější chybou bývá nevhodně zvolená koncentrace studované organické látky. Velmi nízké koncentrace organické látky mohou být nedostačující pro množení buněk degradujícího mikroorganismu, naopak příliš vysoké koncentrace organické látky mohou být i pro degradující mikroorganismy toxické. Příčinou neúspěchu v izolaci degradujících mikroorganismů bývá i nevhodné použití selektivního media, které často postrádá esenciální růstové faktory pro jejich růst. Nejčastěji však neúspěšná izolace mikroorganismů s degradačním potenciálem přímo souvisí s dlouhodobou perzistencí některých organických látek v přírodě. Tyto neúspěšné izolace mohou být pak důkazem, že studovaná organická látka nemůže být ani za vhodně zvolených fyziologických podmínek využívána pro růst a množení mikroorganismů jako zdroj uhlíku a energie.

Proces biodegradace organických látek v přírodě je velmi často vázán na růst mikroorganismů, což se projevuje zvýšením počtu bakteriálních buněk nebo biomasy hub v prostředí. V případě, že se skutečně jedná o využívání organického znečištění jako zdroje uhlíku a energie pro růst mikroorganismů, musíme současně pozorovat významné snižování koncentrace testované organické látky. Vymizení tohoto zdroje uhlíku a energie pak následně vede k poklesu počtu buněk či snížení biomasy degradujících mikroorganismů. Pokud se koncentrace testované organické látky významně nemění, pak lze uzavřít, že pro růst mikroorganismů byl využit jiný zdroj uhlíku a energie, např. jiné buněčné nebo tkáňové složky živých organismů.

Pro biodegradaci, která je vázáná na růst mikroorganismů, bývá charakteristická mineralizace organického substrátu. Organický substrát je přeměňován až na CO₂, složky buňky a na produkty, které jsou typické pro danou katabolickou dráhu. V přirozeném prostředí však mineralizace nemusí být vždy vázána na růst buněk a naopak, produkce CO₂ nemusí být u nerostoucí populace vždy vázána na mineralizaci sledovaného organického substrátu. V přirozeném prostředí je vždy nutné vidět produkci CO₂ ve vzájemném komplexním působení více mikrobiálních druhů, které společně mohou uskutečňovat velmi pomalou mineralizaci polutantu.

Organické znečištění prostředí reprezentuje pro přirozeně se vyskytující heterotrofní mikroorganismy vhodný či méně vhodný zdroj uhlíku a energie. Mikroorganismy mohou pak na daném zdroji uhlíku růst, jestliže organická látka je degradována jejich hlavními metabolickými drahami. Jen tyto katabolické dráhy jim zajišťují dostatek materiálu a energie pro biosyntetické procesy.

Pokud organické znečištění nemůže být atakováno enzymatickým vybavením mikroorganismu, pak nemůže sloučenina sloužit ani jako zdroj uhlíku a energie a biosyntetické pochody v buňce neprobíhají. Velmi často postačí, aby tato neobvyklá kontaminující látka byla pozměněna např. abioticky nebo enzymem jiného mikroorganismu na využitelný substrát v hlavních metabolických drahách degradátora.



Obr.1 Růst bakterií degradujících 4-nitrofenol (2 ppm) Podle Wiggins a kol., 1987

Příkladem využívání organického substrátu jako zdroje uhlíku a energie s využitím „enrichment-culture technique“ mohou být bakterie metabolizující 4-nitrofenol (PNP). Růst degradujícího mikroorganismu je současně doprovázen plynulým poklesem koncentrace metabolizovatelného uhlíkatého substrátu ve vodném prostředí. (Obr.1).

Asimilace uhlíku

Během mikrobiální degradace uhlíkatého substrátu je určité procento uhlíku asimilováno a stává se součástí buňky, tedy podílí se na vytváření buněčné biomasy. Stanovení tohoto procenta uhlíku zabudovaného do biomasy je poměrně jednoduché v tekutých definovaných mediích s přidavkem uhlíkatého substrátu, který je rozpustný ve vodě. Mnohem komplikovanější je stanovení procenta asimilovaného uhlíku při degradaci organických kontaminantů v půdě, odpadní vodě, v kalech nebo sedimentech. Obtíže stanovení způsobuje přítomnost organických zbytků a také častá tvorba komplexních produktů nerozpustných ve vodě, které musí být odlišeny od nově vytvářeného buněčného materiálu. Za asimilovaný uhlík lze považovat všechnu uhlík substrátu po odečtu uhlíku, který byl buňkou mineralizován.

$$C_{\text{asimilovaný}} = C_{\text{substrátový}} - C_{\text{mineralizovaný}}$$

Také asimilovaný uhlík je však v průběhu metabolismu buňky rovněž mineralizován nebo se dostává do buněk protozoí nebo jiných predátorů. V laboratorních měřeních při práci s čistými kulturami buněk je asimilace uhlíku často vyjadřována tzv. **růstovým výtěžkem**, který udává množství vytvořené biomasy na váhovou jednotku využitého substrátu. Asimilace může být vyjádřena rovněž **molárním růstovým výtěžkem**, který představuje váhu biomasy vytvořené metabolizací jednoho molu substrátu. Tyto hodnoty jsou velmi variabilní a podstatně odlišně zejména v porovnání asimilace u aerobů a anaerobů. Za určitých podmínek může být uhlík ze substrátu zcela mineralizován. K tomuto jevu dochází zejména při nízkých koncentracích substrátu. Za těchto podmínek jinak asimilovatelný uhlíkatý substrát zřejmě slouží pro buňku pouze k zachování energie a životaschopnosti. Rychlá respirace buněk může však vést i k jejich rozkladu a postupně k celkové mineralizaci.

V kontrastu k těmto pozorováním byla prokázána existence uhlíkatých látek, které mohou být za určitých podmínek akumulovány do biomasy i v případě, že se v prostředí vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Nebylo však prokázáno, že buňky vedle tohoto asimilovaného uhlíkatého substrátu nevyužívají navíc jiný uhlíkatý substrát z prostředí, který nebylo možné identifikovat (např. odumřelé buňky). Nemůžeme proto zobecnit, že procento mineralizace vzrůstá nebo klesá se vzrůstající koncentrací degradované látky v prostředí. Procento uhlíkatého substrátu, který je buď asimilován nebo mineralizován závisí často na druhu mikroorganismu, který byl použit k transformaci, na typu využívaného substrátu, na teplotě a pravděpodobně i na jiných faktorech prostředí, v němž biodegradace probíhá.

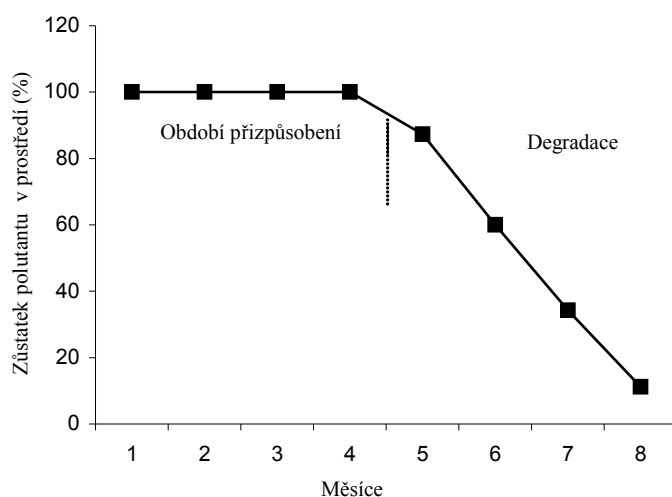
V přirozených společenstvech jsou buňky, které mohou využívat kontaminující organický substrát, často rozloženy jinými druhy mikroorganismů nebo jsou konzumovány protozoí a jinými predátory. V tomto procesu značně klesá sumárně v celém společenstvu procento uhlíku asimilovaného do jeho biomasy a současně v čase vzrůstá procento mineralizace. Můžeme shrnout, že zejména za přítomnosti kyslíku v prostředí, jsou počáteční procesy významným odrazem aktivity mikrobiální populace specificky degradující uhlíkatý substrát, zatímco postupně s časem, tyto procesy odrážejí aktivitu celé přirozené komunity mikroorganismů kontaminovaného prostředí. Procesy mineralizace biomasy degradátorů a jejich produktů probíhají v přirozeném prostředí velmi pomalu. Z toho můžeme usoudit, že většina uhlíku z degradovaného substrátu zůstává v prostředí ve formě vysokomolekulárních komplexů, které jsou velmi odolné k rychlé biodegradaci.

Asimilace jiných prvků

Celá řada kontaminujících látek může sloužit nejen jako zdroj uhlíku a energie, ale i jako zdroj jiných prvků. Nejčastěji se jedná o využití kontaminující látky jako zdroje **N,P,S** nebo **stopových prvků** pro růst degradátora v prostředí. Příkladem může být využívání 2,6-dinitrofenolu buňkami studovaného kmene *Pseudomonas* sp.. Tento mikroorganismus využívá 2,6-dinitrofenol jako zdroj dusíku. V první fázi degradace bylo pozorováno odštěpení nitritu s následnou redukcí na NH_3 , který umožňuje množení mikroorganismu. (Brujn a kol., 1987). Byla popsána celá řada mikroorganismů degradujících herbicidy a insekticidy, kteří využívají tyto látky převážně jako zdroj fosforu. Rovněž některé sirmé organické polutanty mohou sloužit pro některé degradátory jako zdroj síry. Bylo však pozorováno, že i když některé organické látky obsahují nejrůznější růstové prvky, bývá mikroorganismem využíván pouze jeden z nich. Pro heterotrofní mikroorganismy, které osidlují přirozené prostředí, zůstává však limitujícím prvkem uhlík, i když při odpovídající koncentraci N,P,S a jiných stopových prvků. Tyto mikroorganismy však nejčastěji využívají uhlíkatou kostru organického polutantu jako zdroj uhlíku a energie, přičemž tento proces nutně vede k současné mineralizaci jiných organicky vázaných prvků.

PŘÍZPŮSOBNÍ

Degradaci široké škály organických sloučenin předchází období, ve kterém nedochází k jejich zjevné destrukci. Tento časový interval je označován jako **období přizpůsobování** (*acclimation period*) nebo také fáze adaptace nebo lag fáze. Toto období můžeme definovat jako časový úsek, který uplyne od okamžiku kontaminace prostředí určitou chemikálií až do prvního prokazatelného úbytku této látky. Během tohoto období nelze v koncentraci polutantu pozorovat žádné průkazné změny. Toto období bývá vystřídáno rychlým poklesem koncentrace kontaminující látky (Obr.2).



Obr.2 Biodegradace polutantu s fází přizpůsobení

Fáze přizpůsobení může být pro člověka, zvířata i rostliny velmi nebezpečná, protože po toto období zůstává látka v prostředí beze změny a riziko jejího toxického působení vzrůstá. Mimo to v tomto období se může látka šířit do povrchových nebo spodních vod. Zejména ve spodních vodách pak kontaminant může přetrvávat, neboť pravděpodobnost jeho degradace v tomto prostředí je mizivá. Horizontální šíření polutantu může navíc zcela neočekávaně ohrožovat zdraví člověka a zvířat i v lokalitách značně vzdálených od místa primární kontaminace. Období přizpůsobení bylo pozorováno po kontaminaci nejrůznějšími syntetickými organickými látkami a to v půdě, ve vodním prostředí, v sedimentech i kalech. Délka období přizpůsobení je velmi variabilní a kolísá od několika hodin až po řadu měsíců. Délka tohoto období je silně ovlivněna jak chemikálií samotnou a její koncentrací, tak i podmínkami prostředí (teplota, provzdušnění, přítomnost živin a stopových prvků, popř. jiných, často těžce definovatelných faktorů). Za anaerobních podmínek bývá tato fáze přizpůsobení poměrně delší v porovnání s podmínkami aerobními. Všeobecně je však nutné si uvědomit, že predikce doby přizpůsobení je velmi obtížná a namnoze zcela nemožná.

Po období přizpůsobení může následovat pomalá nebo naopak rychlá biodegradace kontaminující látky. Všeobecně však platí, že pokud dojde k opakované kontaminaci prostředí degradovanou látkou již po ukončeném období přizpůsobení, pak následující druhé období přizpůsobení se výrazně zkracuje nebo dokonce chybí. Zkrácení nebo vymizení období přizpůsobení po opakované kontaminaci je vysvětlováno dostatečným počtem buněk degradujících mikroorganismů vytvořených v průběhu primárního využívání polutantu. Rychlost degradace kontaminující látky bývá však namnoze i po druhé aplikaci téže chemikálie stejná, i když někteří autoři uvádějí, že může být i podstatně vyšší v porovnání s první aplikací, kterou charakterizuje perioda přizpůsobení.

Jestliže po první aplikaci chemikálie vzroste počet degradujících buněk dvakrát, pak by se při konstantní rychlosti její degradace, vztažené na jednu buňku, měla zkrátit doba potřebná na degradaci určitého množství této látky přibližně na jednu polovinu. Jestliže vzroste počet buněk třikrát, pak na jednu třetinu atd. Ve skutečnosti však velký počet degradujících buněk je v prostředí konzumován protozoii a jinými predátory, takže nedochází k jejich plynulému nárůstu v kontaminovaném prostředí. Je tedy pravděpodobné, že pokud po dalším přidání polutantu bude biodegradace probíhat vyšší rychlostí, tak za toto zvýšení nebude zodpovědný jen nárůst populace degradujících mikroorganismů, ale také jejich zvýšená metabolická aktivita. O tom, jak dlouho přetrvává toto metabolické „naladění“ buněk, se vedou dosud diskuze. Všeobecně je však známo, že po ukončení degradace polutantu ztrácejí degradující mikroorganismy postupně svoji aktivitu a současně dochází k poklesu počtu buněk nebo biomasy. Pro různé organické látky je délka tohoto období velmi variabilní. Namnoze autoři usuzují, že rozhodující podíl na ztrátě životaschopnosti buněk má snížení jejich metabolické aktivity pro nedostatek některých „specifických“ látek.

Faktory ovlivňující přizpůsobení

Období přizpůsobování mikrobiálního společenstva jednomu substrátu bývá doprovázeno současným přizpůsobováním se i látkám jiným, i když ne všem, ale především **látkám příbuzným**. Příkladem může být metabolismus příbuzných látek po období přizpůsobení mikroorganismů k degradaci fenolu ve vodě. Experimentálně bylo prokázáno, že tyto mikroorganismy pak velmi dobře metabolizují následně přidaný 4-chlorofenol, 3-aminofenol a m-kresol. Podobně se přizpůsobení mikrobiální populace k benzenu projevuje ve zvýšení rychlosti transformace různých polycyklických aromatických sloučenin. Toto zjištění neplatí však pro degradaci různých **sloučenin ve směsích**, kde naopak může dojít k prodloužení období aklimatizace mikrobiálních společenstev a nastupující degradace některých kontaminantů může být velmi pomalá nebo se vůbec nemusí uskutečnit, ačkoliv jednotlivé složky mohou být společenstvem degradovány.

Významným faktorem, který ovlivňuje délku doby přizpůsobování, je **teplota prostředí**. Období přizpůsobení se prodlužuje zejména v nízkých teplotách.

Délku tohoto období ovlivňuje dále **hodnota pH** a **přítomnost kyslíku** v prostředí. V povrchových vodách mohou limitovat růst degradujících mikroorganismů **koncentrace dusíku a fosforu**. Bylo však prokázáno, že v půdách může dojít k degradaci dusíkatých nebo fosfátových organických sloučenin až po velmi dlouhém období, neboť degradující mikroorganismy využívají z prostředí přednostně anorganické zdroje dusíku a fosforu.

Na délce období přizpůsobení se podílí i **koncentrace kontaminující organické látky**. Ani velmi citlivé analytické metody však nedovolují precizní posouzení délky období přizpůsobení pro látku, která kontaminuje prostředí ve velmi nízké koncentraci. Bylo však prokázáno, že v rozmezí těchto relativně nízkých koncentrací látky se sebemenší zvýšení její koncentrace v prostředí projevuje rovněž zvýšením rychlosti její degradace. Naopak při kontaminaci prostředí vysokými koncentracemi polutantu musíme vždy počítat s poměrně dlouhou dobou aklimatizace degradujících mikroorganismů.

Další výzkumy však prokázaly, že délka období přizpůsobení není závislá jen na chemickém složení kontaminující látky a její koncentraci v prostředí. Rozhodujícím faktorem může být i lokalita samotná se specifitou degradujících mikrobiálních společenstev.

Zkracování nebo vymizení fáze přizpůsobení s následnou akcelerací degradace může být vážným problémem při každoroční aplikaci některých ochranných látek v zemědělství. Tyto látky, zejména herbicidy a insekticidy, se stávají díky jejich zrychlené biodegradaci v doporučených dávkách neúčinné. Tento fakt vede zemědělce ke zvyšování aplikovaného

množství herbicidu. Výsledkem této neuvážené aplikace herbicidu bývá namnoze vznik náhlé perzistence těchto látek v prostředí a jejich neúměrná koncentrace v zemědělských produktech. Na základě výsledků laboratorních i polních experimentů se předpokládá, že zvýšení rychlosti degradace pesticidů a herbicidů není závislé na zmnožení degradujících buněk či biomasy, ale spíše na zvýšení metabolické aktivity jednotlivých buněk.

Vysvětlení pro vznik fáze přizpůsobování

Vysvětlení tohoto fenoménu je velmi mnoho. Většinou však k vysvětlení sloužily laboratorní experimenty s čistými kulturami a přirozenými substráty. Je tedy zřejmé, že za těchto podmínek nelze závěry těchto experimentů aplikovat bez výhrad pro kontaminovaná prostředí. K objasnění byly proto použity pouze studie přirozených mikrobiálních společenstev vystavených vlivu syntetických sloučenin v obvyklých koncentracích jejich výskytu v prostředí. Výsledky dosažené za těchto „přírodních“ podmínek byly skutečně nesrovnatelné s laboratorními experimenty v celé řadě parametrů. Na jejich základě bylo odvozeno pět možných vysvětlení pro vznik fáze přizpůsobení mikrobiální populace danému polutantu:

- a) **zmnožení malé populace degradujících mikroorganismů**
- b) **přítomnost toxinů**
- c) **predace protozoi**
- d) **vznik nových genotypů**
- e) **diauxie**

Zmnožení malé populace degradujících mikroorganismů

Půda, přírodní vody, kaly a odpadní vody typicky obsahují malé populace mikrobiálních degradátorů, kteří mohou odbourávat syntetické organické látky nejrůznějšího chemického složení. Tyto malé populace nemohou prokazatelně degradovat kontaminující syntetické látky. Jestliže si jako příklad uvedeme populaci mikroorganismů o koncentraci 10^2 buněk v jednotkovém objemu a každá z těchto buněk rozloží cca 1 pg organického substrátu, pak při aplikované koncentraci 0,1 μg v jednotce tohoto objemu, nebude analytickými metodami zaznamenána žádná významná změna v koncentraci tohoto organického polutantu.

Jestliže bakterie využívají látku jako zdroj uhlíku a energie, pak se malá populace degradujících buněk více či méně výrazně zmnoží. Při nízkých koncentracích substrátu je fáze přizpůsobování buněk sice velmi krátká, ale množení buněk se velmi rychle zastaví, neboť zdroj uhlíku a energie je poměrně rychle vyčerpán. Na druhé straně je patrné, že aklimatizace může být naopak velmi dlouhá, a to zejména tehdy, je-li koncentrace substrátu velmi vysoká. Bylo však zjištěno, že pro zmnožení degradujících buněk je při vysoké koncentraci substrátu vyžadován velmi dlouhý čas, a že detekovatelný úbytek substrátu může být zaznamenán teprve až po dosažení vysoké koncentrace degradujících buněk v prostředí. Je pravděpodobné, že vysoké koncentrace substrátu mohou být využívány jen malým počtem degradujících mikroorganismů v lokalitě. K vytvoření dostatečného biodegradačního potenciálu prostředí je pak zapotřebí poměrně dlouhá doba, během které se tyto mikroorganismy rozmnoží a umožní stanovit detekovatelný úbytek kontaminujícího substrátu.

V současné době není zatím jasné, jak často dochází k takovéto aklimatizaci buněk, kterou můžeme jen předpokládat, neboť není vždy doprovázena výrazným poklesem koncentrace degradovaného substrátu. Celá řada autorů o existenci této fáze hovoří se samozřejmostí, aniž by jejich tvrzení bylo podepřeno experimentálními údaji. Bylo např. pozorováno, že při kontaminaci vody 4-nitrofenolem (2 mg/l) dochází poměrně k rychlému

vzrůstu počtu jeho degradátorů, ačkoliv prokazatelný úbytek látky byl pozorován až po několika dnech, kdy koncentrace buněk dosáhla cca 10^5 v 1 ml (Obr.1). Dlouhá aklimatizační fáze buněk je některými autory dávana do souvislosti s toxickým působením vysokých koncentrací substrátu, čemuž ale odporuje dosažení vysoké koncentrace buněk degradátora v prostředí, která dovolí rychlý start degradace substrátu.

K aklimatizaci mikroorganismů degradujících určitý uhlíkatý substrát může dojít i po opakované kontaminaci lokality, jestliže mezi první a další kontaminací uběhla příliš dlouhá doba, která vedla k pronikavému snížení počtu degradujících buněk (substrát, predátoři, parazité).

Přítomnost toxinů (toxikantů)

Celá řada látek, které se dostávají do prostředí, může vykazovat toxický vliv na růst a množení mikroorganismů. Tyto látky často kontaminují prostředí ve směsích s lehce degradovatelnými uhlíkatými látkami. Teprve až je tento toxikant z prostředí odstraněn (biodegradací, neenzymatickou destrukcí, sorpcí nebo vytěkáním), dochází k biodegradaci využitelného substrátu. Často může být substrát, který kontaminuje půdu, degradován i v přítomnosti toxikantu, jestliže je např. půda zředěna kontaminovanou zeminou bez toxikantu a nebo ve vytvořeném kalu, ve kterém dochází také k podstatnému zředění toxických kontaminujících látek.

Toxikant může působit různým způsobem :

- Může zpomalovat růstovou rychlost degradujících druhů a prodlužovat dobu nutnou pro degradaci polutantu. Takovým toxikantem může být nejen organická látka, ale i látky anorganické (těžké kovy).
- Toxikant může umožnit množení některých mikroorganismů, které jsou schopny jej využívat. V průběhu této degradace toxikantu dochází postupně ke snížení jeho koncentrace pod hladinu jeho antibakteriálního působení. V tomto období pak teprve dochází k množení ostatních degradujících mikroorganismů uskutečňujících štěpení zbývajících polutantů. Z toho vyplývá, že k využívání zbývajících polutantů dochází až po období, které je součtem doby nutné k dosažení neinhubiční koncentrace toxikantu a doby nutné k dosažení dostatečné koncentrace degradujících buněk.
- Toxikant může potlačovat rychleji rostoucí druhy, které obvykle převažují mezi druhy schopnými degradovat kontaminant. U pomalu rostoucích degradátorů pak dochází jen k velmi pomalému nahromadění biomasy, která je schopna degradovat kontaminující chemikálii.
- Toxiny nemusí být přítomné na počátku degradace, ale dochází často k jejich hromadění v jejím průběhu.

Predace protozoi

Celá řada přirozených ekosystémů a vzdušné odpadní systémy jsou charakteristické výskytem značně velké a vysoce aktivní populace protozoí. Tito mikroskopičtí živočichové se živí bakteriemi, které osidlují prostředí a výrazně snižují jejich počet. Velmi nízké koncentrace bakteriálních buněk jsou příčinou toho, že není dostatečně využíván ani lehce využitelný organický substrát. K potlačení predátorů v prostředí se často používají různé

selektivní inhibitory. Po použití těchto inhibitorů dochází k průkaznému zkrácení aklimatizační fáze degradujících mikroorganismů a ke zvýšení jejich koncentrace. Eliminace protozoí v prostředí se v krátkém období projeví pozorovatelným úbytkem kontaminující látky.

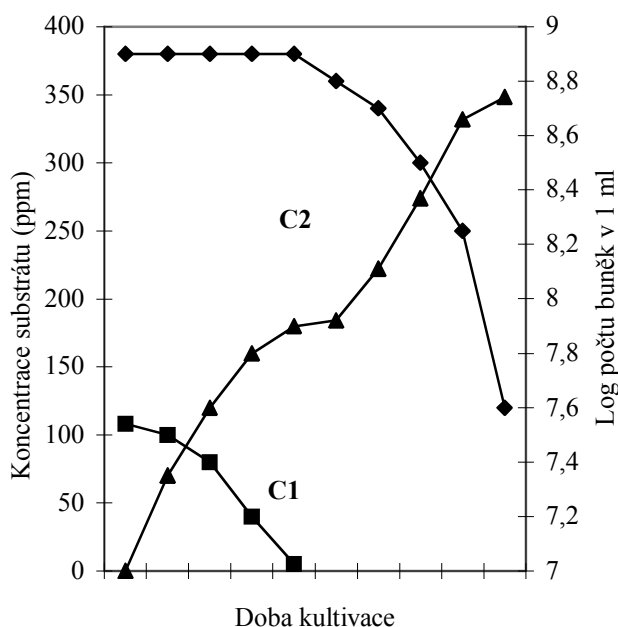
Vznik nových genotypů

Bakterie a houby, které osidlují kontaminované prostředí, mohou často podléhat genetickým změnám, které jsou výsledkem mutací nebo přenosu genetické informace z jednoho druhu na jiný. Tyto změny se uskutečňují ve velmi nízké frekvenci a jen velmi málo buněk v populaci reprezentuje nový genotyp doprovázený fenotypovými změnami. O tom, zda se fenotypově odlišné buňky budou v kontaminovaném prostředí množit, rozhoduje celá řada faktorů, která umožní jejich selekci. Z dlouhodobých pozorování vyplývá, že ve většině kontaminovaných prostředí vznikají mutační změny mikroorganismů spíše náhodně a nahromadění mutantů vyžaduje velmi dlouhý čas, který přesahuje předpokládanou dobu aklimatizace. Některé toxické kontaminanty se však mnohou značnou měrou podílet na vzniku a nahromadění mutantů, které umožní degradaci této nebo jiné toxické látky.

Přenos genů, jejichž produkty se podílejí na biodegradaci, byl experimentálně prokázán řadou autorů. Např. schopnost degradovat chlorokatechol může být přenášena z kmene *Pseudomonas* na kmen *Alcaligenes*. Výsledkem je vznik nového genotypu, který umožňuje degradaci 2-, 3- a 4-chlorofenolu, ačkoliv tuto schopnost nemá žádný z původních kmenů. Do jaké míry se vznik těchto nových genotypů podílí na biodegradaci kontaminujících látek v přirozeném prostředí, nebylo dosud spolehlivě prokázáno.

Diauxie

Čisté bakteriální kultury, které se množí v prostředí obsahujícím relativně vysoké koncentrace dvou zdrojů uhlíku, nevykazují obvykle jednoduchou exponenciální fázi, která je charakteristická pro růstovou křivku buněk v prostředí s jedním zdrojem uhlíku. V prostředí se dvěma zdroji uhlíku je množení buněk charakterizováno dvěma exponenciálními fázemi, které jsou vzájemně odděleny obdobím zpomaleného nebo neprůkazného množení (Obr.3). První exponenciální fáze je charakterizována využíváním pouze jednoho substrátu, druhá fáze pak využíváním druhého substrátu. Tento dvoufázový růst mikrobiálních buněk a postupné využívání dvou substrátů je označován jako diauxie. Diauxie je v první fázi využívání uhlíkatého substrátu charakterizována potlačením syntézy enzymů pro využívání dalšího substrátu. Preferování využívání určité organické sloučeniny před jinou může být vysvětlením pro přizpůsobovací periodu v tom případě, že kontaminant je druhým substrátem.



Obr.3 Dvoufázový růst bakteriální kultury v přítomnosti dvou zdrojů uhlíku C1 a C2 (Modifikováno podle Alexander,1999)

Podobný diauxický růst byl pozorován při využívání sloučenin fosforu. Bylo prokázáno, že *Pseudomonas testosteroni* využívá přednostně anorganický fosfor před metylfosfonátem. V první fázi růstu

a množení těchto buněk není tedy organický zdroj využíván jako zdroj fosforu a jeho degradace začíná až po využití anorganického zdroje.

Přímý důkaz existence diauxie v přirozeném prostředí neexistuje. Rovněž podíl diauxie na prodlužování délky období přizpůsobování nebyl zcela prokázán. Je velmi pravděpodobné, že v komplikovaných mikrobiálních komunitách budou různé substráty využívány spíše různými mikrobiálními druhy, nežli jedním druhem s různou substrátovou preferencí.

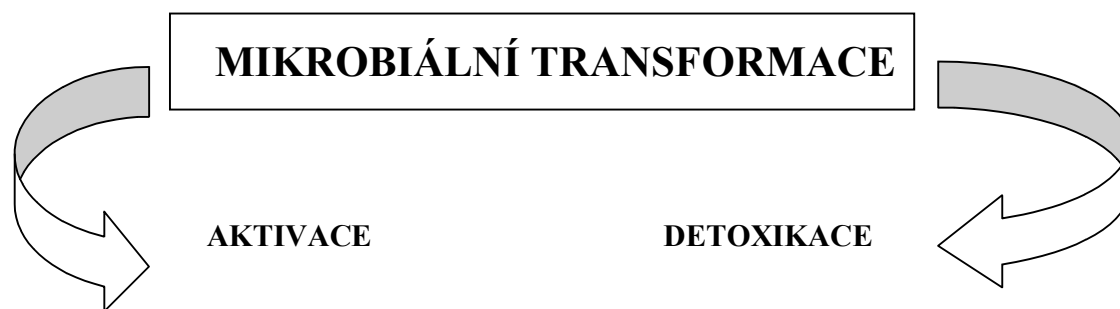
ENZYMOVÁ INDUKCE A LAG FÁZE

Mikroorganismy produkují jak *konstitutivní enzymy* (i když není substrát přítomný), tak enzymy *inducibilní* (v přítomnosti substrátu nebo jemu strukturálně podobné látky). V prostředí bez tzv. *induktoru*, je koncentrace inducibilních enzymů velmi nízká. Proces indukce byl intenzivně studován a je známo, že je uskutečňován celou řadou komplexních procesů, které se podílejí na zvýšení rychlosti tvorby degradativních enzymů. Enzymatická aktivita populace může být kontrolována katabolickou represí, při které uvolňované produkty degradace jednoho substrátu potlačují syntézu enzymů souvisejících s degradací substrátu jiného, který může poskytovat tytéž produkty.

Štěpení celé řady syntetických sloučenin může být indukováno. Mezi indukovatelné enzymy patří např. dehalogenázy. Přesto nelze přesně určit do jaké míry se indukce podílí na délce doby přizpůsobování, neboť indukce často proběhne velmi rychle (minuty nebo hodiny) a fáze aklimatizace může trvat i několik týdnů.

Výsledky laboratorních experimentů však naznačují, že jestliže první krok v metabolické dráze vyžaduje biosyntézu inducibilního enzymu a podmínky této indukci brání, pak sloučenina nemůže být v takovém prostředí degradována. Jednou z příčin, která brání indukci prvního enzymu metabolické dráhy, může být podprahová koncentrace induktoru v prostředí. Je např. známo, že indukce prvního enzymu v katabolické dráze 3- a 4-chlorobenzové kyseliny uskutečňované buňkami *Acinetobacter calcoaceticus* může probíhat jen tehdy, jestliže koncentrace těchto kontaminujících látek dosahuje alespoň 1 μM . Podobně indukce amidázy, která je nutná u gramnegativních bakterií ke štěpení fenylničovinových herbicidů, může probíhat při koncentraci 50 μM , ale k indukci nedochází, jestliže koncentrace těchto herbicidů poklesla na 10 μM .

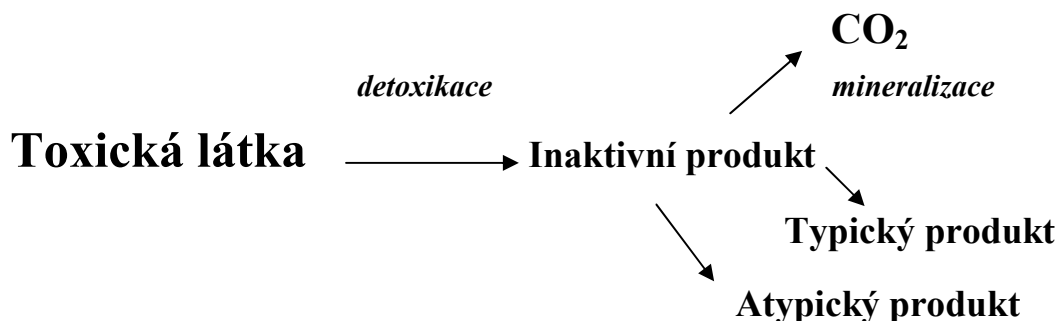
Příčinou počátečního velmi nízkého nebo žádného poklesu kontaminující látky může být i lag fáze v růstovém cyklu degradujících bakterií. Lag fáze, která doprovází přenesení mikroorganismů do čerstvého média, je pozorována i za laboratorních podmínek v bohatých růstových médiích. V přírodních podmínkách se na vzniku lag fáze podílí např. nízká koncentrace buněk v prostředí. Lag fáze přírodní populace zřejmě souvisí i s počáteční indukcí katabolických enzymů. V žádném případě však délka lag fáze nedosahuje délky aklimatizační periody, i když se na aklimatizaci buněk k degradaci polutantu pravděpodobně částečně podílí.



BIOTRANSFORMACE

Detoxikace polutantu (detoxifikace)

V tomto procesu je toxikologicky aktivní látka přeměňována na neaktivní produkt. Protože toxikologická aktivita látky je spojena často s její strukturou, např. s různými typy substituentů, prostorovou konfigurací a pod., je detoxikace uskutečňována celou řadou reakcí. Detoxikace může být uskutečňována jak abioticky tak i biologicky. Biologická detoxikace uskutečňovaná mikroorganismy je striktně závislá na koncentraci látky v prostředí. Vysoké koncentrace toxického polutantu mohou potlačovat růst mikroorganismů a omezit detoxikaci polutantu. Ve většině případů je detoxikace uskutečňována jednoduchou primární reakcí, nejčastěji *hydrolyzou*, *hydroxylací*, *dehalogenací*, *demetylací* nebo jinou *dealkylací*, *metylací*, *redukcí nitroskupiny*, *deaminací*, *štěpením éterů*, *přeměnou nitrilu na amid a konjugací*.



Mikroorganismy velmi často nevyužívají toxickou látku jako zdroj uhlíku, ale jednoduchou transformací snižují její toxicitu, čímž významnou měrou přispívají k „ozdravení“ kontaminovaného prostředí. Enzymatické reakce vedoucí k přeměně aktivní molekuly v neškodný produkt se většinou uskutečňují uvnitř buňky. Produkt pak může být buňkou likvidován jednou ze tří možností :

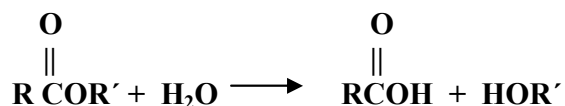
- **Inaktivní produkt** může být dále štěpen v řadě následných enzymatických reakcí, které vedou k tomu, že vzniká sloučenina běžně využitelná jako zdroj uhlíku a zbytek může být **vylučován buňkou do prostředí jako typický produkt**.
- **Atypický produkt** může být vylučován do prostředí.
- **Inaktivní produkt** může být v řadě enzymatických reakcí buňkou zcela **mineralizován**

Inaktivní produkt, který vzniká jednoduchou reakcí, je strukturálně velmi podobný toxinu a často jeho možná „toxicita“ je vázána na jeho koncentraci v prostředí. Nejúčinnější detoxikační reakcí je tedy mineralizace, kdy konečným produktem je oxid uhličitý. K detoxikačním procesům, probíhajícím v kontaminovaném prostředí, bývají často řazeny i **procesy kometabolické**, o kterých bude pojednáno později.

Stručný přehled detoxikačních procesů

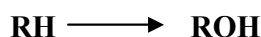
Hydrolyza

Štěpení vazby za účasti vody (např.mikrobiální štěpení esterických vazeb v insekticidu malationu za účasti karboxyesterázy)



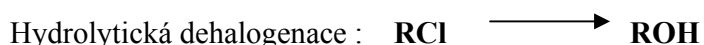
Hydroxylace:

Mikrobiální adice skupiny OH na aromatickou nebo alifatickou molekulu (mikrobiální inaktivace fungicidu MBC)



Dehalogenace

Celá řada pesticidů a škodlivých průmyslových zbytků obsahuje chlór nebo jiné halogeny, které způsobují toxicitu jejich molekuly. Enzymy, které se podílejí na detoxikaci těchto látek, jsou označovány jako dehalogenázy. Při dehalogenaci může být halogen nahrazen vodíkem (reduktivní dehalogenace) nebo hydroxylem (hydrolytická dehalogenace). Často může dojít k detoxikaci halogenovaných sloučenin i po odstranění halogenu a přilehlého vodíku (dehydrodehalogenace).

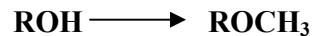


Demetylace nebo jiná dealkylace

Celá řada pesticidů obsahuje metyl nebo jiné alkylové substituenty. Tyto mohou být vázány na dusík nebo kyslík. N- nebo O- dealkylaci katalyzují četné mikroorganismy, přičemž dochází k výrazné detoxikaci pesticidu. Příkladem může být mikrobiální detoxikace s-triazinu, herbicidu, který je strukturálně podobný atrazinu. Půdní mikroorganismy mohou tuto látku dealkylovat tak, že ztrácí N-etyl nebo N-izopropylovou skupinu za současné detoxikace.

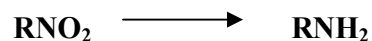
Metylace

Mikroorganismy touto v podstatě reverzní reakcí mohou detoxikovat fenol nebo některé fungicidy. Příkladem může být detoxikace fungicidů penta- a tetrachlorfenolů, které jsou v přírodě mikrobiologicky detoxikovány O-metylací :



Redukce nitroskupiny

Nitrované sloučeniny jsou toxické pro nižší i vyšší organismy. Ke ztrátě toxicity nebo jejímu omezení může dojít v důsledku redukce nitroskupiny na aminoskupinu:



Příkladem může být omezení toxicity 2,4-dinitrofenolu, jestliže je mikrobiologicky přeměněn na 2-amino-4- nebo 4-amino-2-nitrofenol. Podobně lze snížit toxicitu fungicidu pentachloronitrobenzenu jeho přeměnou na pentachloroanilin.

Deaminace

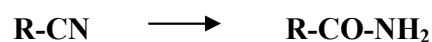
Mikrobiální deaminace, která vede k odstranění fytotoxicity, byla popsána u herbicidu metamitronu .

Štěpení éterů

Fenoxyherbicide obsahují skupiny C-O-C. Štěpením těchto éterických vazeb dochází ke snížení jejich fytotoxicity. Toto mikrobiální štěpení je překvapující, neboť vazebná energie mezi uhlíkem a kyslíkem je poměrně vysoká.

Přeměna nitrilu na amid

2,6-dichlorobenzonitril je potenciálním inhibitorem růstu některých rostlin (komerční preparát Dichlobenil). Mikrobiální konverzí na 2,6-dichlorobenzamid se tato látka stává inaktivní. Tato detoxikační reakce probíhá v půdě.



Konjugace

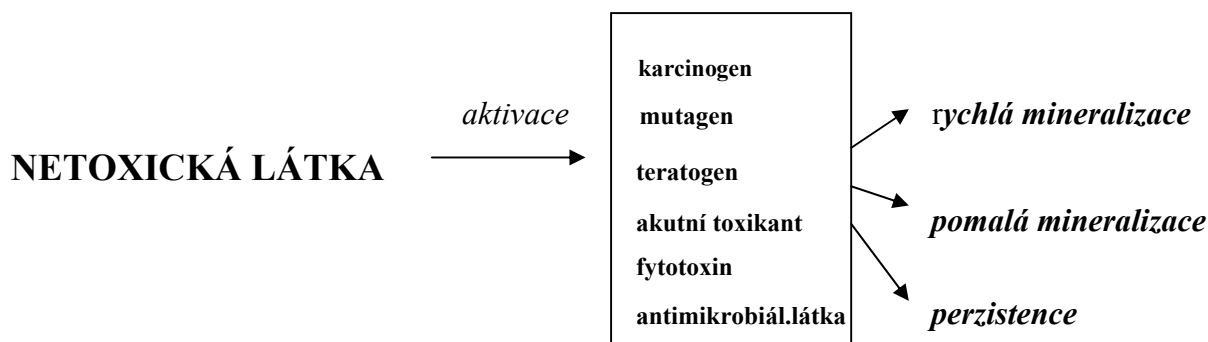
Konjugace se uskutečňuje mezi různými intermediáty přirozeně probíhajících metabolických reakcí a syntetickými molekulami. Tato kombinace normálního metabolitu s toxikantem vede velmi často ke vzniku netoxické látky. Tato konjugace se může uskutečňovat jak u živočichů tak i u rostlin, ale nejvýznamnější roli při těchto detoxikačních reakcích hrají mikroorganismy. U mikroorganismů byly popsány:

- glukózové konjugáty – houba *Cunninghamella elegans* konjuguje pyren s glukózou nebo může vytvářet glukózové deriváty s fenantrenem.
- glukuronidové konjugáty- vznikají v průběhu metabolismu fenantrenu různými houbami
- glutationové konjugáty- byly pozorovány v průběhu bakteriální degradace některých herbicidů
- aminokyselinové konjugáty- vznikají při mikrobiální detoxikaci některých herbicidů
- acylové konjugáty- na acylaci se nejčastěji podílí acetyl, ale i propionylové a formylové skupiny. Acylace je uskutečňována celou řadou mikroorganismů. Např. tvorba acetylovaných aromatických aminů byla popsána při mikrobiální degradaci trinitrotoluenu (TNT).
- sulfonátové a sulfátové konjugáty - vznikají např. při štěpení fenantrenu a 2-nitrofluorenu houbami
- konjugáty dikarbonových kyselin- tyto produkty (benzyljantarová kyselina a benzylfumarová kyselina) byly pozorovány při anaerobní transformaci toluenu.

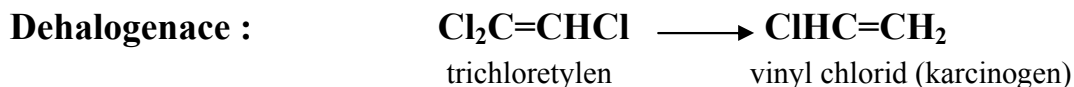
K mikrobiální detoxikaci různých substrátů může tedy docházet nejrůznějším způsobem. Mechanizmy detoxikace nejsou závislé jen na struktuře toxikantu, ale i na přítomných enzymech. Vzhledem k tomu, že většina mikrobiálních produktů degradace nebyla dosud chemicky popsána a dokonale toxikologicky prozkoumána, lze říci, že v průběhu mikrobiálního využívání a transformace může docházet nejen ke snížení toxicity původního substrátu, ale i naopak, že v některých případech mohou vznikat produkty toxickejší než původní substrát.

Aktivace netoxického polutantu

Během mikrobiální transformace může dojít k nežádoucím **přeměnám slabě toxických či netoxických kontaminujících látek v látky silně toxické**, které ohrožují zdraví člověka, zvířat a rostlin. Často vznikají i látky, které jsou toxické pro samotné mikroorganismy, takže výsledkem je jejich **akumulace a perzistence** v prostředí. Lze tedy říci, že samotná kontaminující látka není tak problematická pro životní prostředí jako její transformační produkt. Tento proces vzniku toxických produktů z neškodných substrátů je znám pod pojmem **aktivace**. Aktivace polutantů probíhá v půdě, vodě, splaškových vodách a všude tam, kde je prostředí osídleno mikroorganismy. Vznikající toxické produkty mohou být produktem **kometabolismu** (viz dále), ale i meziprodukty vznikajícími v průběhu procesu mineralizace.



Významné mechanismy aktivace

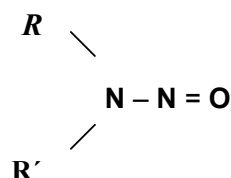


Halogenace

Houby, řasy a bakterie jsou často vybaveny enzymy, které katalyzují adici chloridu nebo bromidu do organických molekul. Většina těchto reakcí je velmi dobře prostudována, jsou známy enzymy i vznikající produkty. Např. některé řasy mohou vytvářet trichloretylen nebo tetrachloretylen (PCE). Byly popsány i řasy, které uvolňují chloroform, bromoform a jiné halogenované deriváty metanu. V přirozených procesech rovněž vzniká kyselina trichloroctová. Chlorované aromatické sloučeniny mohou být izolovány z lesní půdy a z některých rostlinných materiálů. Bazidiomycety produkují organohalogeny. Řada těchto látek je toxická a perzistuje v prostředí.

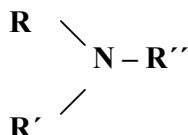
Tvorba nitrózaminů ze sekundárních aminů a nitrátů.

Aminy a nitráty najdeme ve většině půd a přírodních vodních zdrojů. Nitráty jsou chemikálie, kterých je ročně vyráběno miliony kilogramů. Sekundární aminy jsou přítomné v živočišném i rostlinném materiálu, vznikají v rozkladných procesech. K nitrózaci sekundárních aminů dochází v přítomnosti nitritů, které vznikají mikrobiologickou přeměnou nitrátů. Produktem jsou nitrózaminy (karcinogeny, teratogeny, mutageny):

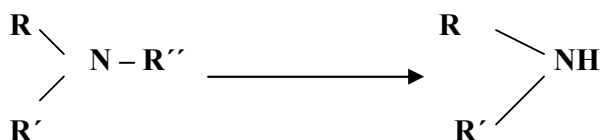


Ve většině případů jsou R a R' identické. Tyto látky jsou velmi aktivní i ve velmi nízkých koncentracích.

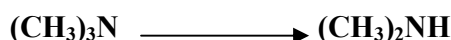
V průmyslu je rovněž využívána celá řada sekundárních a terciárních aminů. Terciární aminy mají tuto strukturu :



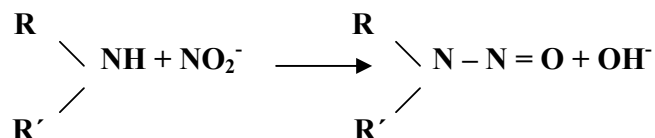
Sekundární a terciární aminy jsou obvykle přítomné v celé řadě domácích produktů a rovněž řada pesticidů je tvořena sekundárními a terciárními aminy nebo jsou některé na terciární aminy transformovány v půdě. Široký výskyt těchto látek byl zaznamenán jak v povrchových vodách, tak i ve vodách odpadních, v kalech a v půdě. Terciární aminy jsou v přírodě často transformovány mikrobiologickou cestou na sekundární aminy. Transformace je znázorněna v následující rovnici :



Často bývá studována mikrobiální transformace trimethylaminu na metylamin :



Sekundární aminy mohou být aktivovány N-nitrózací za vzniku vysoce toxických N-nitrózosloučenin :

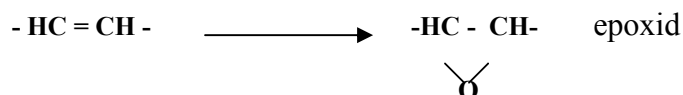


Tato nitrózace se může uskutečňovat ve vodách i v půdě a jako prekurzory mohou sloužit např. dimethylamin a dietylamín.

Nitrózační reakce mohou probíhat i spontánně, zejména při nízkých hodnotách pH prostředí.

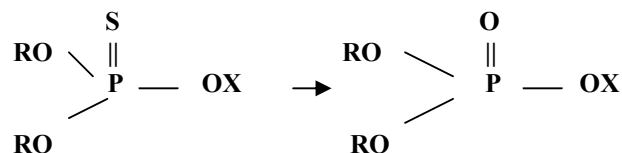
Epoxidace

Mikroorganismy velmi často tvoří epoxidy z látek nesoucích dvojnou vazbu :



Touto cestou bývají mikrobiologicky oxidovány některé insekticidy, přičemž vznikající produkt je toxický pro živočichy. Příkladem může být transformace heptachlóru na heptachlóreoxid, která probíhá v půdě. Podobně může být oxidován aldrin (insekticid) na jeho epoxid označovaný jako dieldrin. Dieldrin se stal v přírodě enormně problematickým, neboť je nejen toxičtější ve srovnání s aldrinem, ale dlouhodobě perzistuje (více než 15 let) a ohrožuje ložiska podzemních vod.

Přeměna organických fosfonotiónátů na organické fosfonáty

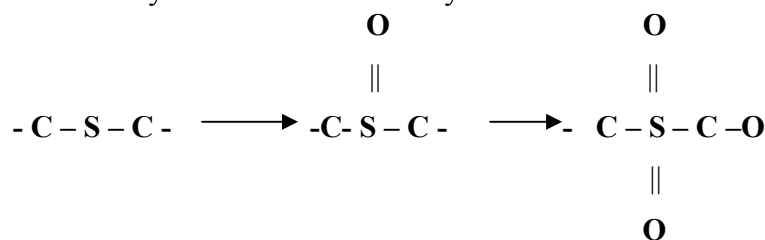


Velká skupina používaných insekticidů jsou fosfonotiónáty. Radikál R je obvykle tvořen krátkým alkylovým řetězcem, typické jsou CH_3 - nebo CH_3CH_2 - radikály. Radikál, který je označen v rovnici symbolem X, může mít velmi proměnlivou chemickou strukturu. Fosfonotiónáty mají jen nízkou toxicitu, ale jejich přeměnou na fosfonát vzniká vysoce toxická látka pro člověka a jiné savce (inhibitory cholinesterázové aktivity). Tato přeměna může být uskutečňována mikroorganismy v přirozených i zemědělských lokalitách.

Podobným typem aktivace může být transformace fosfonoditiónátů, kdy vazba $\text{P}=\text{S}$ je transformována na $\text{P}=\text{O}$. Tato přeměna byla pozorována v půdě.

Oxidace tioéterů

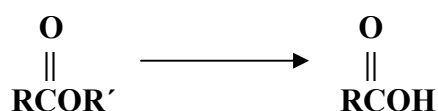
Některé látky obsahující tioéterové vazby (-C-S-C-) jsou používány jako insekticidy (např. aldicarb-nematicid) a vykazují toxicitu pouze pro hmyz. V přírodě mohou být tyto látky transformovány a současně aktivovány za vzniku sulfoxidů a sulfonů :



Tyto reakce mohou probíhat v půdě a jsou uskutečňovány mikroorganizmy.

Hydrolyza esterů

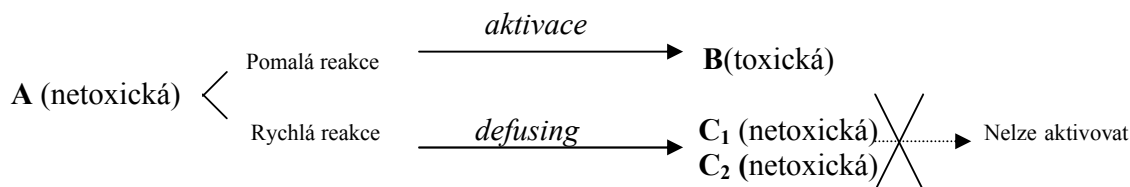
Některé herbicidy jsou aktivovány hydrolyzou za vzniku fytotoxinu, který je tvořen kyselinou



Radikálem může být metyl, etyl. Dalším možným produktem přeměny je netoxický alkohol HOR'.

V přírodě zřejmě existuje celá řada dalších možných transformací látek vedoucích k tvorbě vysoce toxických produktů. Toxické produkty, často neznámého složení, ohrožují spodní vody a stávají se nebezpečím pro zdraví obyvatel na naší planetě. Různé typy transformací byly prokázány v laboratorních podmínkách za využití čistých mikrobiálních kultur. Všeobecně bylo prokázáno, že většina aktivovaných látek perzistuje v přírodě, mění se jejich mobilita a vyskytuje se často ve velkých vzdálenostech od místa původní kontaminace.

Všechny látky, které mohou být v přírodě aktivovány, vytvářejí chemickou časovanou bombu. Nebezpečí „výbuchu“ této bomby snižuje syntéza a použití takových látek, které jsou přírodními společenstvy aktivovány jen velmi pomalu, ale naopak jsou rychle pozměny tak, že nemůže dojít k následné aktivaci :



Příkladem rychlé reakce, která zabraňuje aktivaci molekuly, může být rozklad molekuly na dvě neaktivovatelné složky (*defusing*).

RIZIKA BIODEGRADACE

V každém prostředí vznikají více či méně toxické produkty mikrobiálního rozkladu nejrůznějších polutantů. Je tedy zřejmé, že biodegradace látek kontaminujících životní prostředí není bez rizik. Ovšem každá technologie má svoje rizika. Tato rizika mohou být

značná nebo jen malá, ale vždy existují. Naším úkolem je poznání faktorů, které riziko biodegradace snižují nebo zcela redukují. Úkolem chemiků je syntéza takových látek, které vedle cílených účinků jsou v přírodě rozložitelné na netoxické produkty. Úkolem mikrobiologů je poznat co nejlépe širokou škálu metabolických reakcí a enzymů, které se podílejí na rozkladu látek vnášených do životního prostředí. Společným cílem obyvatel naší planety Země musí být její cílené ozdravení a zachování pro další generace.

KINETIKA BIODEGRADACE

Poznatky o kinetice biodegradace jsou velmi důležité pro stanovení perzistence nebo rychlosti rozkladu organického polutantu a pro odvození doby, po kterou bude tento polutant ovlivňovat životní prostředí. Nejčastěji je sledován úbytek původní kontaminující látky. To je ovšem možné jen v tom případě, kdy tato látka je již v prvním kroku detoxikována a v další metabolické sekvenci nejsou akumulovány žádné intermediáty. Tato metoda tedy nemůže být použita pro polutanty, které jsou metabolizovány jen částečně a intermediáty biodegradace se hromadí v prostředí a dokonce jsou značně toxické. Byla navržena celá řada modelů pro sledování průběhu biodegradace polutantů různými mikroorganismy. Nejčastěji jsou to modely, které vycházejí z procesů uskutečňovaných rostoucími buňkami. Existují také modely pro biodegradaci uskutečňovanou nerostoucími buňkami, které jsou aplikovány ve vysoké koncentraci do prostředí a simulují spíše enzymatické reakce podílející se na biodegradaci. Rychlost transformace či mineralizace polutantu je pak sledována především v závislosti na koncentraci kontaminující organické látky, ale i na hodnotě pH prostředí, půdní vlhkosti a teplotě nebo přítomnosti fertilizátorů klíčových reakcí. Nevýhodou modelových studií je využití jednotlivých mikrobiálních izolátů nebo sledování dílčích enzymových reakcí. Jsou tedy vzdálené od biodegradací probíhajících v přirozených podmínkách, kde jsou degradátoři vystaveni predátorům, parazitům a ostatním složkám mikrobiálního společenstva, které mohou podstatně ovlivnit průběh i výsledek biodegradace. Je tedy jen velmi málo pravděpodobné, že by jednoduchý degradační model nebo rovnice mohly být využitelné k prognóze rychlosti biodegradace všech organických polutantů v různých přirozených prostředích.

Mikroorganismy mohou uskutečňovat biodegradaci jednoduchých organických substrátů, jestliže

- a) rostou na kontaminujícím substrátu, který využívají jako zdroj uhlíku a energie (nebo jako zdroj jiného prvku nutného pro množení),
- b) rostou na jiném substrátu, který využívají jako zdroj uhlíku a energie a metabolizují kontaminující substrát,
- c) nerostou, ale metabolizují kontaminující substrát.

Procesy vázané na růst buněk

Všechny experimenty, ze kterých byly odvozeny jednotlivé modely pro průběh degradace polutantů, pracují s populacemi buněk jednoho bakteriálního druhu a jako zdroj uhlíku využívají jednoduché organické látky. Pro zjednodušení vysvětlení tyto modely vycházejí z netoxických látek rozpustných ve vodě, přičemž bakteriální buňky mají v těchto systémech zajištěny ostatní optimální podmínky pro růst (aerace, anorganické látky, růstové faktory, atd.). Při nízkých koncentracích zdroje uhlíku a energie je růstová rychlost organismů velmi nízká, protože je limitována nízkou koncentrací uhlíkatého substrátu. Se vzrůstající koncentrací uhlíkatého substrátu růstová rychlost buněk proporcionalně vzrůstá až

k dosažení maxima. Po dosažení maxima je další zvyšování koncentrace substrátu bezvýznamné. Tento vztah definoval matematicky Monod (1949):

$$\mu = \mu_{\max} S / K_s + S$$

kde

- μ specifická růstová rychlost studovaného mikroorganismu,
- μ_{\max} maximální specifická rychlost (je dosažena při vysoké substrátové koncentraci)
- S koncentrace substrátu
- K_s konstanta, která představuje koncentraci substrátu, při které je růst buněk uskutečňován s poloviční rychlostí dosažitelného maxima

Grafickým vyjádřením Monodovy rovnice je hyperbola. Hodnoty K_s vyjadřují afinitu organismu k růstovému organickému substrátu. Nízké hodnoty K_s vyjadřují tedy vysokou afinitu organismu k substrátu a opačně, vysoké hodnoty velmi nízkou afinitu k substrátu. Pro jeden bakteriální kmen se hodnoty substrátové konstanty K_s liší v závislosti na substrátu. Obráceně, hodnoty K_s pro jednotlivé substráty se liší v závislosti na mikroorganismu.

V *Tabulce 1* jsou uvedeny často i dvě hodnoty K_s pro jediný substrát. První hodnota uvádí afinitu čisté bakteriální kultury k danému substrátu, druhá pak afinitu v mikrobiální komunitě. Hodnoty K_s pro čisté kultury mohou být značně nízké, (tj. buňky mají vysokou afinitu k substrátu) a pohybují se kolem 20 $\mu\text{g/l}$. Jiné hodnoty K_s se pohybují v koncentracích často výrazně vyšších než 1 mg/l a můžeme říct, že tyto buňky či komunity mají nízkou afinitu k růstovému substrátu.

Tabulka 1 Hodnoty K_s pro bakterie rostoucí ve vodním prostředí

(Alexander, 1999)

Substrát	Organismus nebo vzorek	K_s (mg/l)	Reference
Glukóza	<i>Flavobacterium 1</i>	0,0071	van der Kooij and Hijnen (1981)
	<i>Flavobacterium 2</i>	29, 1314	Ishida <i>et al.</i> (1982)
	Říční voda	26	Larson (1980)
Glutamát	<i>Aeromonas sp.</i>	0,163, 1,3	Ishida <i>et al.</i> (1982)
Maltóza	<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	2,1	Russell and Bladwin (1979)
Xylóza	<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	55	Russell and Bladwin (1979)
m-krezol	vzorek vody	0,0006-0,0018	Bartholomew and Pfaender (1983)
Chlorobenzen	vzorek vody	0,0010-0,0051	Bartholomew and Pfaender (1983)
NTA	vzorek vody	0,060-0,170	Bartholomew and Pfaender (1983)
Fenol	odpadní voda	1,3-270	Rozich <i>et al.</i> (1985)

V přirozených systémech bylo pro jeden substrát detekováno více hodnot K_s . Např. v testech s jezerní vodou bylo zjištěno, že přítomné mikroorganismy degradující fenol rostou poloviční μ_{\max} (0,5 μ_{\max}) v různých koncentracích fenolu, tedy při různých hodnotách K_s . Tyto odlišné hodnoty K_s charakterizují jednak afinitu degradujícího

společenstva k fenolu, jednak afinitu jednotlivých degradátorů k tomuto uhlíkatému růstovému substrátu. Je tedy zřejmé, že Monodova kinetika nemůže být zevšeobecněna pro všechny degradující systémy. Její využití se zdá nevhodné zejména pro stanovení růstu mikroorganismů a jejich afinity k nerozpustným substrátům nebo k substrátům s vysokou toxicitou. Jestliže budeme uvažovat, že každá buňka v exponenciální růstové fázi metabolizuje stejný objem uhlíkatého substrátu, pak bychom měli po logaritmování hodnot zaznamenat lineární pokles koncentrace substrátu v čase. Ve skutečnosti však při záznamu změn koncentrace substrátu v čase získáme křivku, která je charakterizována počátečním malým poklesem koncentrace substrátu. Tento malý pokles koncentrace substrátu můžeme zdůvodnit nízkou koncentrací bakteriálních buněk na počátku exponenciální fáze růstu. Se vzrůstem počtu buněk v průběhu střední exponenciální fáze jejich množení dochází k velmi rychlému poklesu koncentrace sledovaného organického substrátu. V závěru exponenciální fáze růstu buněk degradátora však již není pozorováno žádné nebo jen velmi malé snížení koncentrace organického substrátu. Pokles koncentrace substrátu se tedy vztahuje jen na několik málo dělení buněk v průběhu jejich exponenciálního množení. **Logaritmická kinetika** poklesu koncentrace může být vyjádřena vztahem :

$$\frac{dS}{dt} = \mu_{\max} (S_0 + X_0 - S)$$

kde

S_0 je počáteční koncentrace substrátu

S je koncentrace substrátu v čase t

X_0 je množství substrátu, které je nutné pro vytvoření počáteční populace

Pokles koncentrace substrátu podle logaritmické kinetiky probíhá za předpokladu, že $S_0 \gg K_s$.

Jestliže je $S_0 \ll K_s$, pak se růstová rychlost buněk snižuje s postupným snižováním koncentrace substrátu. Příkladem této situace může být množení buněk *Escherichia coli* v médiu s nízkou koncentrací glukózy. Buňky se v tomto prostředí začínají množit a současně využívají glukózu, jejíž koncentrace rychle klesá. Tento pokles způsobuje snížení rychlosti dělení buněk a prodloužení intervalu mezi každým dělením. Tedy na rozdíl od klasické exponenciální fáze růstu, ve které je doba nutná k rozdělení buněk konstantní, je růst v médiu s koncentrací substrátu nižší než K_s charakterizován prodlužováním generační doby, i když počet buněk plynule stoupá. Tento růst zajišťuje **logistickou kinetiku** degradace substrátu. Nízká koncentrace substrátu může zajistit množení jen malé populace buněk. Pro zajištění průběhu degradace substrátu podle logistické kinetiky je tedy nutná nejen nízká koncentrace substrátu, ale i velmi malý počet buněk využívajících tento substrát. Logistickou kinetiku můžeme zaznamenat rovnicí:

$$-dS/dt = dS (S_0 + X_0 - S)$$

Křivka logistické kinetiky může být někdy transformována do přímky, a to v rozmezí období, kdy se počet buněk zvyšuje z 10 na 90% dosažitelného maxima koncentrace buněk.

V prostředí, ve kterém koncentrace substrátu odpovídá přibližně hodnotě K_s ($S_0 \cong K_s$), nelze aplikovat ani logaritmickou ani logistickou kinetiku. Situace je v tomto případě velmi složitá, neboť specifická růstová rychlost μ není přímo závislá na koncentraci substrátu, jak je tomu v případě $S_0 \ll K_s$ nebo do značné míry nezávislá, jak je tomu v případě $S_0 \gg K_s$. Substrát je v tomto případě využíván podle tzv. **Monod-with-growth kinetiky**. Tato kinetika může být vyjádřena matematicky vztahem :

$$-dS/dt = \mu_{\max} S(S_0 + X_0 - S) / K_s + S$$

Již dříve jsme si řekli, že vysoké koncentrace celé řady kontaminujících látek jsou pro mikroorganismy toxické, i když tyto mikroorganismy mohou tyto látky využívat jako zdroj uhlíku. Pro tyto chemikálie existuje typický vztah mezi růstem bakteriálních buněk a koncentrací zdroje uhlíku. U těchto látek lze pozorovat, že růstová rychlost buněk vzrůstá současně se zvyšováním koncentrace substrátu v tzv. nízké koncentraci. Při dosažení určité kritické koncentrace tohoto substrátu je však zaznamenán náhlý pokles růstové rychlosti buněk, který se dále prohlubuje s dalším zvyšováním koncentrace sledované látky. Běžně využívaná látka má tedy od určité koncentrace účinek antibakteriální. Vztah mezi růstovou rychlostí a koncentrací takového potenciálně toxického organického substrátu (živiny) charakterizuje Haldanova modifikace Monodovy rovnice :

$$\mu = \mu_{\max} S / K_s + S + (S^2 / K_I)$$

K_I je inhibiční konstanta, která charakterizuje potlačení růstu buněk toxickým substrátem

Tato rovnice byla sestavena na základě studia kinetiky degradace fenolu a pentachlorofenolu

Biodegradace nerostoucími mikroorganismy

Z předchozí kapitoly vyplynulo, že pokud se bakterie mají množit, musí být koncentrace substrátu natolik vysoká, aby bylo dosaženo zvýšení počtu buněk degradátora, který bude substrát využívat. V dalších experimentech bylo však pozorováno, že při velmi vysoké koncentraci degradujících buněk v prostředí vzhledem k relativně nízké koncentraci substrátu nedochází sice k množení buněk, ale substrát je přesto degradován.

Za těchto podmínek můžeme opět uvažovat tři různé situace, které mohou nastat ve vztahu koncentrace substrátu a afinity buněk : $S_0 \gg K_s$, $S_0 \cong K_s$ a $S_0 \ll K_s$. Ve všech těchto případech nedochází k množení buněk a kinetika degradace spíše odpovídá kinetice enzymových reakcí. Vztah mezi rychlostí enzymové reakce a koncentrací substrátu je často nejhodnější vyjádřit rovnicí podle Michaelis-Mentenové :

$$v = V_{\max} S / K_m + S$$

v je reakční rychlost
 V_{\max} je maximální reakční rychlost
 K_m je Michaelisova konstanta

Tato rovnice vyjadřuje podobný vztah jako Monodova rovnice s tím rozdílem, že μ_{\max} a K_s je nahrazeno v , V_{\max} a K_m . Základní rozdíl však spočívá v tom, že podle kinetiky Michaelis-Mentenové je koncentrace reaktivního materiálu-enzymu konstantní, zatímco u Monodovy kinetiky koncentrace reaktivního materiálu-buněk stoupá v důsledku jejich dělení. Vzhledem k tomu, že kinetika podle Michaelis-Mentenové je založena na konstantní koncentraci reaktivního materiálu, lze ji využít pro charakteristiku systému s nerostoucími buňkami.

V případě, že $S_0 \gg K_m$, je počáteční pokles substrátu v důsledku transformace nerostoucími buňkami téměř nezatelný. Rychlost degradace je však konstantní (**kinetika nultého řádu**) až k dosažení koncentrace substrátu odpovídající hodnotě K_m (**Monod-no-growth kinetika**). Při $S_0 \ll K_m$ dochází za nerůstových podmínek rovněž ke snížení koncentrace substrátu, avšak rychlost reakce postupně klesá spolu s poklesem koncentrace degradované látky. V tomto případě je rychlost reakce přímou funkcí koncentrace substrátu. Tato závislost je označována jako **kinetika prvního řádu**.

Kinetiku prvního řádu můžeme vyjádřit matematicky vztahem :

$$\boxed{-dS/dt = k_1 S} \quad \text{kde}$$

t je čas

S je koncentrace substrátu v čase t

k_1 je $\mu_{\max} (X_0/K_s)$ – rychlostní konstanta kinetiky prvního řádu (v jednotkách času⁻¹)

Jestliže je hodnota $k_1 = 0,01 \text{ h}^{-1}$, pak můžeme říct, že rychlost reakce je 1% za hodinu. Kinetika prvního řádu byla popsána např. při metabolismu glukózy ($0,4 \mu\text{g/l}$) buňkami *Salmonella typhimurium* nebo při degradaci metylparationu v koncentraci $200 \mu\text{g/l}$.

Monod-no-growth kinetika je charakterizována vztahem :

$$\boxed{-dS/dt = k_2 S / K_s + S} \quad \text{kde}$$

k_2 je $\mu_{\max} X_0$

Kinetika nultého řádu je charakterizována vztahem :

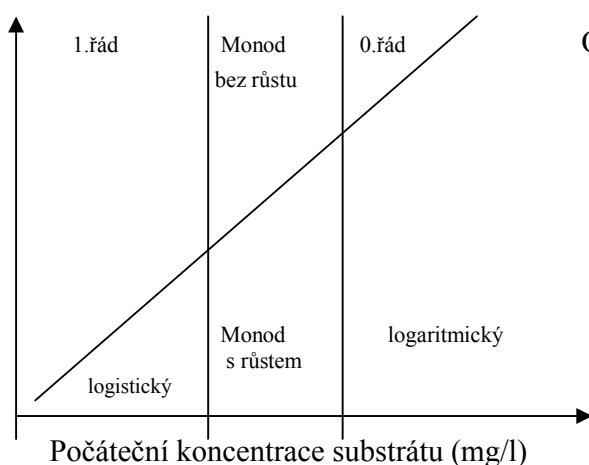
$$\boxed{-dS/dt = k_2}$$

Kinetika nultého řádu je charakterizována konstantním úbytkem substrátu v čase. Je často označována jako **lineární biodegradace organického substrátu** (nebo produkce organického produktu). Bývá popisována poměrně často pro degradaci ve vodním prostředí a to nejen v podmínkách $S_0 \gg K_s$ (nebo $S_0 \gg K_m$), kdy se buňky nemnoží, ale i v případě, že mikroorganismy rostou podle logistické kinetiky při $S_0 < K_s$.

Na základě znalostí degradačního systému a jeho kinetiky můžeme předpovídat dobu trvání biodegradace určitého polutantu. Jestliže např. zjistíme, že koncentrace polutantu před degradací dosahovala 10 mg/l a po 30 dnech degradace klesla na 9 mg/l , pak lze předpovědět, kdy bude dosaženo požadované koncentrace $10 \mu\text{g/l}$. Jestliže budeme uvažovat logaritmický model, pak dosáhneme této koncentrace po 33 dnech. Při využití modelu s kinetikou nultého řádu, pak se doba degradace prodlouží na 300 dnů. S více než 5 roky musíme počítat v případě degradace podle kinetiky prvního řádu.

Ve všech těchto systémech je však nutné vždy uvažovat vztah mezi koncentrací buněk aktivní populace a koncentrací degradovaného substrátu. Tento vztah může být velmi jednoduše znázorněn graficky (Obr.4) :

Log CFU/ml



Obr.4 Kinetika biodegradace jako funkce koncentrace substrátu a počtu degradujících buněk (modifikace dle Alexander, 1999)

Graf na obrázku je rozdělen diagonálou na 6 sekcí. Nad diagonálou jsou tři sekce reprezentující kinetiku degradace nerostoucími buňkami, neboť koncentrace substrátu není natolik vysoká, aby dovolila jejich dělení. Pod diagonálou jsou zbývající tři sekce zahrnující kinetiku degradace uskutečňovanou mikroorganismy, které využívají organický substrát jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Vzhledem k tomu, že přirozené podmínky jsou velmi složité jak po stránce fyzikální, tak i chemické, a že mikroorganismy v přirozených komunitách jsou značně heterogenní, nelze tyto modely biodegradčních kinetik jednoznačně doporučit pro předpověď průběhu degradace v přirozených ekosystémech. Mimo to nesmíme v těchto lokalitách opomenout ani působení abiotických činitelů, které se částečně nebo i významně podílejí na biodegradaci polutantu. Aplikaci biodegradčních kinetik v přirozeném ekosystému nejčastěji brání :

- Difúzní bariéry, které znemožňují dokonalý kontakt mezi mikrobiální buňkou a jejím organickým substrátem.
- Sorpce celé řady organických látek na jílovité a humózní složky půdy a sedimentu, takže kinetika jejich degradace je zcela odlišná od kinetiky degradace téže organické látky v roztoku.
- Přítomnost jiných organických molekul, které mohou být rovněž metabolizovány degradujícími druhy, což může nejen potlačovat, ale i stimulovat cílenou degradaci.
- Rychlost transformace může být značnou měrou ovlivněna anorganickými živinami, kyslíkem a růstovými faktory, přičemž regulačním mechanismem tohoto procesu může být difúze těchto látek nebo rychlost jejich vzniku či regenerace jinými členy společenstva.
- Několik mikrobiálních druhů může degradovat jedinou látku společně, přičemž tyto organismy mohou mít pro tento organický substrát zcela odlišné hodnoty K_s a K_m .
- Velikost degradující populace, její růst a aktivita může být značně ovlivněna běžně přítomnými prvky nebo jinými parazitujícími druhy .

- Velké množství degradovaných látek má velmi slabou rozpustnost ve vodě a kinetika jejich transformace může být zcela odlišná od kinetiky transformace látek ve vodné fázi.
- Buňky aktivní populace mohou být sorbovány na různé povrchy nebo osidlují povrchy ve formě mikrokolonií. Kinetika biodegradace v těchto systémech nebyla dosud spolehlivě objasněna.
- Variabilní fáze přizpůsobení mikroorganismů k degradaci určité organické látky nedovoluje předpovídat dobu její degradace, neboť všechny popsané kinetiky biodegradace s aklimatizační fází nepočítají.

Vliv difúze a sorpce

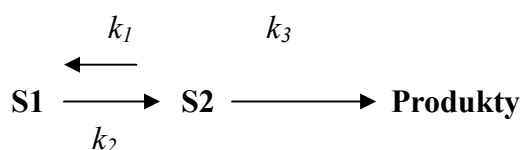
Významnou proměnnou, která může značně ovlivnit kinetiku procesu biodegradace, je koncentrace substrátu. Za změny v koncentraci využitelného substrátu mohou být zodpovědné jak procesy fyzikální tak i chemické. V procesu biodegradace hrají významnou roli difúze a sorpce degradovaných látek. Opomenutí těchto dvou procesů v laboratorních experimentech bývá nejčastější chybou laboratorních modelových experimentů a příčinou vyvození chybných závěrů.

Sorpce je často považována za jednoduchý vratný proces k dosažení rovnováhy celého systému. Ve skutečnosti se jedná o proces dvoufázový, ve kterém po počáteční krátké a rychlé fázi (<1 h) následuje pomalá a dlouhá fáze (dny). I když má sorpce značný význam pro biodegradaci organických látek v přírodě, přesto je jí, a zejména její kinetice, věnována malá pozornost. Navržené modely vycházejí z předpokladu, že hlavní roli v biodegradaci hraje difúze, neboť pouze látky ve vodní fázi jsou dostupné pro mikroorganismy. Pro uvolňování sorbovaných látek bylo také navrženo několik modelů, které však vyhovují především lehce resorbovatelným organickým substrátům. Příkladem může být model navržený Millerem a Alexandrem (1991) pro průběh biodegradace benzylaminu sorbovaného na montmorillonitovém jílu.

Je pravděpodobné, že difúze kontroluje u celé řady organických látek jejich dostupnost pro degradující mikroorganismy, čímž ovlivňuje rychlost degradace kontaminující látky. Bylo zjištěno, že část přirozených organických látek není v přírodě degradována, neboť vyplňuje velmi drobné póry (nanopóry) složek půdy a stává se tak odolná vůči mikrobiálnímu ataku. Stejně závěry vyplynuly rovněž ze studia perzistence 1,2-dibromoetanu v půdě. Půdní částice obsahují různý počet pórů o rozmanité velikosti. Velká část těchto pórů dosahuje průměru < 1 μm nebo dokonce < 0.1 μm . Jestliže většina půdních bakterií dosahuje velikosti v rozmezí 0,5-0.8 μm , pak je zřejmé, že tyto velice malé póry nemohou být osídleny půdními mikroorganismy. Dokonce bylo zjištěno, že půdní bakterie osidlují pouze relativně velké póry o průměru kolem 2 μm . Je tedy zřejmé, že látky, které vyplňují nanopóry mohou být degradovány jen za předpokladu, že budou difundovat do prostředí. Difúze je pak nejvýznamnějším faktorem, který ovlivňuje rychlost biodegradace této sloučeniny.

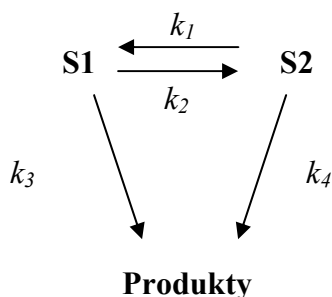
Dostupnost některých hydrofobních látek je také značně omezena, jsou-li v tzv. nevodné tekuté fázi (*nonaqueous-phase liquid*, zkráceně NAPL). Nevodnou tekutou fází může být např. ropa na mořské hladině, olej, ředidla a jejich směsi v půdě apod. Pro kinetiku biodegradace substrátů uvnitř NAPL nebyly dosud navrženy žádné modely. Rychlost biodegradace však bude bezpochyby ovlivněna mezivrstvou, tedy povrchem mezi NAPL a vodnou fází a schopností mikroorganismů růst na této vytvořené mezivrstvě nebo v přilehlé vodné fázi či na obou místech současně.

Poměrně složitá kinetika biodegradace v tomto systému NAPL byla řešena tzv. modelem dvou oblastí (*two-compartment model*). Tento kinetický model vychází z předpokladu, že substrát existuje ve dvou, dosud ne zcela přesně definovaných oblastech. Jedna oblast mění organický substrát v látku, která je pro mikroorganismy nedostupná. Po uvolnění substrátu do druhé oblasti dochází k jeho mikrobiální transformaci. K podobné situaci jako v NAPL může docházet i v půdě, kde jedna oblast je díky sorpci využitelného substrátu na koloidní povrchy půdních částic nebo jeho uložení do nanopórů pro mikroorganismy nedostupná, zatímco látky ve druhé oblasti, tedy v půdních roztocích, jsou lehce dostupné mikrobiálnímu ataku. Rychlost biodegradace polutantů v půdě je pak určována rychlostí resorpce mikrobiologicky využitelné látky nebo její difusí z míst nedostupných do míst osídlených aktivními mikroorganismy. Rychlost pohybu substrátu mezi těmito dvěma oblastmi může být charakterizována konstantami k_1 a k_2 a rychlostí k_3 mikrobiální transformace substrátu na produkt.



$\mathbf{S1}$ a $\mathbf{S2}$ je množství substrátu v nedostupné a dostupné oblasti.

Substrát může být využit i ve větší míře, jestliže *two-compartment* kinetiku vyjádříme následujícím vztahem :



Toto schéma můžeme uvažovat v případě, že koncentrace využitelného substrátu je tak nízká, že neumožní růst mikroorganismů. Přechod substrátu z jedné oblasti do druhé se uskutečňuje podle kinetiky prvního řádu. Pak tedy konstanty k_1 , k_2 , k_3 a k_4 jsou rychlostními konstantami prvního řádu. V případě, že se uskutečňuje růst aktivních mikroorganismů, nabývá celý proces na složitosti. Ve zjednodušené formě může být tento model vyjádřen dvěma matematickými závislostmi :

Pro $\mathbf{S1}$
$$d\mathbf{S1} / dt = - (k_1 + k_3)\mathbf{S1} + k_2\mathbf{S2}$$

Pro $\mathbf{S2}$
$$d\mathbf{S2} / dt = k_1\mathbf{S1} - (k_2 + k_4)\mathbf{S2}$$

Two-compartment model může být využit k vysvětlení kinetiky biodegradace především v půdě. S poměrně dobrými výsledky byl tento model potvrzen při studiu

degradace některých herbicidů. Rovněž bylo prokázáno, že modelu vyhovují zejména hodnoty získané z průběhu degradace při nízkých teplotách.

Difúze kyslíku a anorganických látek může mít značný význam i při degradaci vysokých koncentrací organického substrátu. Není rovněž vyloučeno, že rychlost difúze toxických produktů aktivních mikroorganismů kontroluje zpětnou vazbou jejich růst a metabolismus.

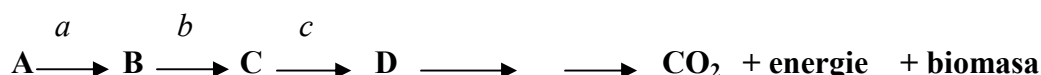
KOMETABOLIZMUS

Velmi zajímavé jsou matematické formulace kinetiky biodegradace za předpokladu, že transformace je nejen odrazem metabolismu jednoho substrátu, ale současně i růstu mikroorganismů na jiné sloučenině. Tento způsob biodegradace je v přírodě poměrně značně rozšířen. Pro zajištění růstu heterotrofů nevyhovuje degradovaný nebo transformovaný uhlíkatý substrát a je tedy nutná přítomnost dalšího lehce využitelného uhlíkatého substrátu. V průběhu růstu mikroorganismů dochází pak k enzymatické transformaci organického polutantu. Tento proces transformace je často označován termínem **kometabolizmus**, i když k tomuto označení existuje celá řada výhrad. Bylo totiž prokázáno, že transformace organického polutantu se často uskutečňuje i za nerůstových podmínek, tedy bez přítomnosti lehce degradovatelného zdroje uhlíku a kinetika degradace za nerůstových podmínek je striktně odlišná od biodegradace vázané na růst degradátora (viz výše). Proto někteří autoři navrhují tento typ metabolismu dvou substrátů označovat jako „*nahodilý metabolismus*“ V našem pojednání budeme však používat dosud vžitý termín, tedy kometabolizmus, pro mikrobiální metabolismus organické látky, která nemůže být buňkou využita jako zdroj esenciálních živin a energie. Při popisu degračních experimentů s čistými kulturami se často setkáváme i s dalším pojmem, **kooxidace**, který zužuje pojem metabolismu pouze na oxidaci organického nerůstového substrátu. Kometabolizmus byl popsán také u autotrofních mikroorganismů, které na rozdíl od heterotrofů vyžadují jako růstový substrát anorganické látky.

Kometabolická degradace byla popsána u velkého počtu látek, které kontaminují životní prostředí. Patří mezi ně např. cyklohexan, PCB, 3-fluorometylbenzoát, různé chlorofenoly, 3,4 dichloranilin, 1,3,5-trinitrobenzen, různé pesticidy a řada dalších. Je vysvětlován několika experimentálně ověřenými způsoby :

- a) počáteční enzym přeměňuje organický substrát na organický produkt, který nemůže být dále mikroorganismem transformován a využíván jako zdroj uhlíku a energie,
- b) počáteční organický substrát je transformován na organický produkt, který inhibuje další enzymy, které se podílejí na mineralizaci a jeho další využitelnosti pro růst.

Obzvláště první vysvětlení kometabolizmu (a) je velmi logické a lze je schematicky znázornit jednoduchou fiktivní metabolickou dráhou , ve které je látka **A** degradována na oxid uhličitý za uvolnění energie pro biosyntetické reakce a vytvoření meziproduktů, které jsou součástí buněčné biomasy :

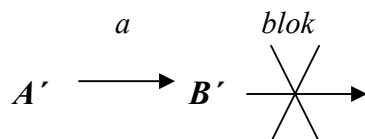


A-přirozený zdroj uhlíku

a-enzym s nízkou substrátovou specifitou

B-přirozený produkt

První enzym *a* této metabolické dráhy má velmi nízkou substrátovou specifitu a může katalyzovat i přeměny látek strukturálně podobných látky **A**, které si můžeme zjednodušeně označit jako **A'**. Produkt **B'** této reakce je však striktně odlišný od produktu **B** přeměny přirozeného substrátu **A**, takže enzym *b* nemůže katalyzovat další přeměnu látky **B'** a tento neobvyklý produkt se v prostředí akumuluje. Blokovanou metabolickou reakci si můžeme znázornit schematicky:



A' - organický polutant strukturálně podobný **A**

B' - organický produkt, strukturálně odlišný od **B**, který není transformovatelný enzymem *b*

Pro druhou hypotézu (b) vysvětlující podstatu kometabolických transformací svědčí celá řada experimentů, které prokázaly, že vznikající produkty mohou být i značně toxické. Často je popisována kometabolická přeměna látky **A** za hromadění produktu **B**, jestliže primární reakce katalyzovaná enzymem *a* je značně rychlejší, nežli proces katalyzovaný enzymem *b*. Zjednodušeně řečeno, vznik produktu **B** je rychlejší než jeho další degradace, což se projeví jeho akumulací v prostředí v tak vysokých koncentracích, které jsou pro degradující mikroorganismus toxické. Tento akumulovaný produkt může v některých reakcích ovlivňovat pouze jediný enzym, který je zodpovědný za degradaci vznikajícího toxinu. Jako příklad takovéto inhibice si můžeme uvést kometabolickou přeměnu chlorobenzenu buňkami *Pseudomonas putida* za vzniku 3-chlorokatecholu. Tento produkt se hromadí v prostředí, protože potlačuje aktivitu enzymů nutných k jeho další degradaci.

První i druhá hypotéza však potvrzují, že při kometabolických přeměnách se nevytváří biomasa a buňky se nemohou množit. Z tohoto důvodu není kometabolismus zařazen mezi biodegradace vázané na růst mikroorganismů. Mezi organizmy, které mohou uskutečňovat kometabolické přeměny patří druhy bakteriálních rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycococcus*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Hydrogenomonas*, *Methylosinus* a *Arthrobacter*, *Xanthomonas* a houby *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* a *Rhizoctonia*. Kometabolicky může být transformována celá řada sloučenin (cyklohexan, chlorofenoly, trinitrobenzen, některé pesticidy aj.) v procesu hydroxylace, oxidace, denitratace, deaminace, hydrolýzy, acylace apod.

Enzymy s nízkou substrátovou specifitou

Kometabolické reakce jsou často uskutečňovány jediným enzymem, ale byly detekovány i reakce komplexní, uskutečňované několika enzymy. Rovněž bylo prokázáno, že jeden enzym může katalyzovat přeměnu různých substrátů a není tedy absolutně specifický pro jediný substrát. Tento typ enzymů často působí na substráty strukturálně velmi podobné, ale není výjimkou, že katalyzuje přeměnu zcela odlišných molekul. V krátkém přehledu si můžeme uvést několik příkladů, ve kterých jediný enzym katalyzuje přeměnu různých substrátů.

a) **metan-monooxygenáza** u metylotrofních bakterií. Tyto mikroorganismy, pokud rostou na metanu, metanolu nebo mravenčanu, mohou kometabolizovat řadu organických látek, mezi kterými je i velký počet závažných polutantů životního prostředí. Enzymem, který katalyzuje tyto kometabolické přeměny je metanmonooxygenáza. Některé metylotrofní bakterie mohou v přítomnosti metanu jako růstového substrátu kometabolicky oxidovat

n-alkany o délce řetězce C2 až C8, *n*-alkeny C2 až C6, mono- a dichloroalkany C5 nebo C6, dialkylétery a cykloalkany,

b) **toluen-dioxygenáza** řady aerobních bakterií. Tento enzym inkorporuje dva atomy kyslíku do molekuly toluenu a touto reakcí zahajuje degradaci toluenu jako růstového substrátu. V řadě experimentů bylo však prokázáno, že toluendioxygenáza má velmi nízkou substrátovou specifitu a může kometabolicky transformovat 2- a 3-nitrotoluen na odpovídající alkoholy a hydroxylovat 4-nitrotoluen,

c) **toluen-monooxygenáza** u některých aerobních bakterií. Tento enzym inkorporuje jeden atom kyslíku do molekuly toluenu za vzniku *o*-krezolu. Současně však tyto mikroorganismy mohou kometabolizovat TCE, přeměňovat 3- a 4-nitrotolueny na odpovídající benzylalkoholy a benzaldehydy a hydroxylovat různé aromatické sloučeniny,

d) **oxygenáza** u bakterií využívajících propan. Tento enzym může katalyzovat kometabolické přeměny TCE, vinyl chloridu a dichloroethylenu,

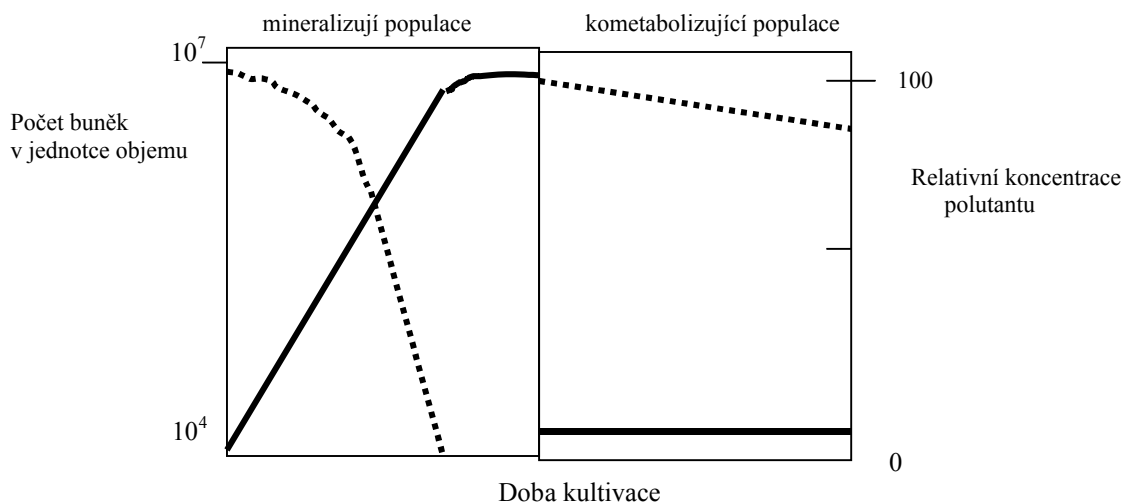
e) **amonium-monooxygenáza** u *Nitrosomonas europaea*. Tento chemoautotrofní mikroorganismus využívá v přírodě jako zdroj energie NH₃ a zdrojem uhlíku je CO₂. Současně ale může kometabolizovat TCE, 1,1-dichloroetylen, různé mono- a polyhalogenované etany, některé monocyklické aromatické sloučeniny a řadu dalších látek,

f) **halidohydroláza** katalyzující přeměnu halogenovaných mastných kyselin. U některých mikroorganismů může být tento enzym využit ke kometabolickému odštěpení halogenů z různých halogenovaných organických sloučenin bez jejich využití jako růstového substrátu,

a) **dehalogenázy**. Prostudována byla nízká substrátová specifita mikrobiální dehalogenázy katalyzující dehalogenaci CH₂Cl₂, CH₂BrCl, CH₂Br₂ a CH₂I₂ a dehalogenázy katalyzující přeměnu 4-chloro-, 4-bromo-, a 4-iodobenzoátu.

Výše uvedené příklady nejsou zdaleka vyčerpávajícím výčtem všech enzymů, u kterých byla pozorována velmi široká substrátová specifita, která umožňuje jejich podíl na kometabolických přeměnách látek a následné akumulaci produktů v prostředí. Uvedené příklady naznačují, že kometabolické přeměny nejrůznějších organických látek nejsou jen vhodným tématem pro laboratorní studie, ale že jejich význam také v přirozeném prostředí je (následně i pro zdraví člověka) obrovský. Z druhé strany, příznivou situaci v přírodě vytváří skutečnost, že populace mikroorganismů či biomasa, která působí na přeměnu syntetických látek, je relativně malá, takže kometabolické přeměny za přirozených podmínek probíhají jen velmi pomalu a rychlost jejich přeměny se s časem nemění. Na Obr.5 je uvedeno porovnání mineralizačního procesu s procesem kometabolizmu. V levé části obrázku je zřejmý nárůst počtu buněk mikrobiální populace (plná čára), která využívá substrát jako zdroj uhlíku a elektronů (přerušovaná čára). Využívání substrátu je provázeno prudkým snížením jeho koncentrace. V pravé části obrázku je zřejmé, že počet buněk kometabolizující populace zůstává konstantní (plná čára) a koncentrace transformovaného substrátu se jen nevýznamně mění (přerušovaná čára).

Nepříznivě posuzovaná akumulace produktů, kterou laboratorně prokazujeme v čistých kulturách mikroorganismů, nemusí probíhat v přirozených ekosystémech osídlených mikrobiálními společenstvy. Při studiu kometabolizmu některých látek v půdních vzorcích bylo skutečně prokázáno, že primárně kometabolicky vznikající produkty mohou být následně mineralizovány jinými členy rozsáhlého půdního společenstva.



Obr.5 Srovnání změn v počtu buněk mikrobiální populace (plná čára) v procesu využívání substrátu (přerušovaná čára) jako zdroje uhlíku a energie (vlevo) a v procesu kometabolické transformace substrátu (vpravo). (Modifikace dle Alexander, 1999)

Příkladem následné mineralizace po primární kometabolické transformaci může být využívání substrátu parationu bakteriálními buňkami. Bylo prokázáno, že paration může být kometabolicky transformován buňkami *Pseudomonas stutzeri* za vzniku 4-nitrofenolu a dietylfosfonátu. Fenolická sloučenina je pak dále mineralizována buňkami *Pseudomonas aeruginosa*. Kometabolismus s následnou mineralizací byl popsán u celé řady dvousložkových kultur různých zástupců rodu *Pseudomonas*. Některé kometabolické přeměny látek uskutečňované zástupci rodu *Pseudomonas* mohou být doplněny mineralizací kometabolických produktů zástupci rodu *Acinetobacter* nebo *Arthrobacter*. Tyto příklady tedy zdůvodňují, proč některé transformační produkty nemohou být v přírodě detekovány, ačkoliv jejich přítomnost byla prokázána laboratorně při práci s čistými kulturami mikroorganismů. Tato dvoufázová přeměna a využití substrátu je často označována jako **komplementární katabolická dráha**. Komplementární v tom smyslu, že vytváří úplné degradační sekvence. Vytváření komplementárních katabolických drah je využíváno v genetickém inženýrství při konstrukci organismů schopných úplně mineralizovat určitou syntetickou látku.

Pozoruhodné bylo zjištění, že některé látky zavlečené do přirozeného prostředí, mohou být **při určité koncentraci** kometabolizovány, při jiné koncentraci mineralizovány. Rovněž **samotné prostředí** může rozhodnout o tom, jaký proces degradace polutantu proběhne. To naznačuje, že produkty kometabolizmu se mohou hromadit jen při určité koncentraci polutantu nebo jen v určitém prostředí. Např. při studiu degradace isopropyl N-fenylkarbamátu (IPC) v jezerní vodě je tento polutant kometabolizován v koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$, ale jeho mineralizace probíhá při koncentraci 0,4 $\mu\text{g/l}$. Chlorobenzylát je kometabolizován ve vzorcích jezerní vody, ale k jeho mineralizaci dochází v přítomnosti mikroflóry sedimentu čisté vody. Tyto poznatky jsou velmi důležité při predikci degradačního procesu v přirozeném prostředí, neboť určitou naději na správnost našich závěrů nám dává pouze

koncentrace a prostředí, které se velmi blíží podmínkám laboratorně prostudovaným procesům.

Stanovení kinetiky kometabolizmu je velmi obtížné. Často se kinetika reakce mění v čase. Někteří autoři se pokusili definovat kinetiku kometabolizmu pro rostoucí a nerostoucí buňky.

Všeobecně lze však konstatovat, že samotný kometabolizmus vede vždy k velmi pomalé destrukci substrátu. Z tohoto důvodu je celá řada prací věnována možnosti **urychlení** celého procesu. Tento vytčený cíl je některými autory považován za primární, neboť celá řada polutantů, které mohou podléhat detoxikaci v důsledku kometabolické transformace, je vysoce nebezpečná nejen pro rostliny a člověka, ale často poškozují celý přirozený ekosystém. V některých studiích tohoto typu bylo prokázáno, že rychlost kometabolizmu může být zvýšena přidáním neškodných organických látek do kontaminované půdy nebo vody. Doposud však nebyl prokázán přesný vztah mezi metabolickými drahami uskutečňujícími destrukci a mineralizaci přidaného substrátu a rychlostí kometabolizace substrátu našeho zájmu.

V některých studiích bylo zvýšení rychlosti kometabolizmu polutantu dosaženo přidáním jeho strukturálního analogu, který je mineralizovatelný. Tato metoda tzv. „*analogue enrichment*“ je zaměřena na nahromadění buněk nejen s degradačním, ale i s transformačním potenciálem. Metoda byla prakticky použita ke zvýšení kometabolizmu polychlorovaných bifenyly (PCBs) přidáním mineralizovatelného a netoxického bifenyly, který může pro PCB kometabolizující buňky sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro růst. Tato metoda může být rovněž využita k nahromadění a izolaci mikroorganismů z přírodních zdrojů, kde se běžně nacházejí ve velmi nízké koncentraci.

PRAHOVÉ KONCENTRACE POLUTANTU

Organické polutanty v povrchových i spodních vodách, stejně tak jako v půdě a sedimentech, mohou být přítomné ve velmi nízkých koncentracích. Avšak i tyto stopové koncentrace jsou rizikové, neboť se postupně a dlouhodobě dostávají do vyšších organizmů kde se koncentrují a působí často jako karcinogeny a mutageny. Stávají se součástí trofických řetězců. Tyto látky jsou velmi často rezistentní k mikrobiální degradaci a to buď z důvodu jejich nevhodné chemické struktury nebo nízké (podprahové) koncentrace v prostředí. Všeobecně je známo, že pro zachování životaschopnosti každého organismu musí být vynaložena určitá energie. U zvířat a člověka je tato potřebná energie odrazem jejich basálního metabolismu. U mikroorganismů je základní energie pro udržení jejich životaschopnosti označována jako „*maintenance energy*“. U heterotrofů je tato energie získávána oxidací organických látek. Jestliže koncentrace zdroje uhlíku je dostatečně vysoká, pak substrát difunduje z roztoku k buněčnému povrchu a následně je transportován do buňky. Zde pak zajišťuje požadavek na „*maintenance energy*“ a současně poskytuje dostatek energie pro růst a množení buněk. Tak tomu ale není v případě, že koncentrace substrátu je nízká. Jestliže budeme uvažovat pouze difúzi molekul substrátu z roztoku k povrchu buňky (ignorujeme záměrně přenos přes membránu, který nemůže probíhat při vyšší rychlosti nežli difúze molekul k povrchu), pak při těchto velmi nízkých koncentracích je vysoké procento uhlíkatého substrátu spotřebováno na energii pro zachování životaschopnosti buněk (*maintenance energy*) a jen velmi nízké procento uhlíkatých látek je využito pro růst a množení buněk. Při velmi nízkých koncentracích uhlíkatého substrátu se buňka dostává do situace, kdy všechen uhlíkatý substrát, který získá z prostředí, využije pro zachování vlastní životaschopnosti bez množení a růstu. Tedy při těchto koncentracích uhlíkaté látky buňky substrát sice metabolizují, ale nerostou a tedy **nelze zaznamenat vzrůst počtu buněk ani**

nárůst biomasy. Takto působící koncentrace uhlíkaté látky jsou označovány jako **prahové koncentrace** (*threshold*).

Z jiného hlediska může být mikrobiální populace již v samém počátku tak malá, že biodegradace uhlíkaté látky je bezvýznamná nebo ji nemůžeme detekovat i přes výše uvedený fakt, že přítomné mikroorganismy metabolizují část substrátu k vlastnímu přežití i v případě, že se nemnoží. Prahová koncentrace látky pak může být definována jako **nejnižší koncentrace, která ještě umožňuje růst a množení velmi malé mikrobiální populace za současné degradace uhlíkaté látky.** Jestliže dojde k poklesu koncentrace pod tuto prahovou hodnotu, lze pozorovat jen nevýznamné nebo dokonce žádné snížení koncentrace uhlíkatého substrátu v prostředí.

O prahových koncentracích látek bylo poprvé diskutováno při studiu **mineralizace rozpustných přirozených uhlíkatých látek v oceánu.** Předpokládalo se, že vzhledem k tomu, že uhlíkaté látky se v oceánu vyskytovaly ve velmi nízkých koncentracích, neumožňovaly množení mikrobiální populace ani mineralizaci těchto přirozených uhlíkatých látek. Tento ekosystém, jak bylo shledáno později, je však natolik komplexní, že hodnoty prahových koncentrací přirozených uhlíkatých látek byly stanoveny značně nepřesně. Později bylo zjištěno, že celá řada uhlíkatých látek je v tomto prostředí „rezistentní“ k mikrobiální degradaci, neboť celý systém existuje v určité rovnováze kontinuální tvorby a současně i kontinuální degradace těchto látek.

Přesvědčivější důkaz existence určitých prahových koncentrací látek byl podán při studiu **biodegradace syntetických chemikálií ve vodě a půdě.** Vzhledem k tomu, že tyto látky nejsou vytvářeny biologickou cestou, mohla být prokázána jejich neměnná koncentrace v prostředí nebo jejich perzistence při nízkých koncentracích jako důkaz, že očekávaná biodegradace neprobíhá. Tyto studie prokázaly, že poklesem koncentrace degradované látky pod určitou hodnotu (pod prahovou koncentrací) její biodegradace neprobíhá, nebo že biodegradace probíhá menší rychlostí, než při vyšších koncentracích testované látky (jestliže uvažujeme, že rychlost degradace je proporcionální koncentraci syntetické látky). Prahové koncentrace uhlíkatých látek, které jsou využitelné jako zdroj uhlíku a energie pro růst mikroorganismů, se pohybují v $\mu\text{g/l}$ a jsou velmi variabilní. Bylo zjištěno, že prahová koncentrace glukózy, jako velmi lehce využitelného uhlíkatého substrátu pro růst *Pseudomonas* sp. a *Escherichia coli*, je přibližně $18 \mu\text{g/l}$ (Shehata a Marr, 1971), pro koryneformní bakterie však dosahuje až $210 \mu\text{g/l}$ (Law a Button, 1977), pro *Salmonella typhimurium* $5 \mu\text{g/l}$ (Schmidt a Alexander, 1985). Prahové koncentrace polutantů jsou podstatně vyšší nežli koncentrace glukózy a kolísají nejen mezi druhy, ale i mezi jednotlivými izoláty. U izolátu rodu *Pseudomonas* byla např. stanovena relativně vysoká prahová koncentrace 2,4-dichlorfenolu, a to přibližně $300 \mu\text{g/l}$ (Goldstein a kol., 1985). Prahové koncentrace některých zdrojů uhlíku pro studované mořské bakterie kolísají v rozmezí $0,15$ až 100 mg/l (Jannasch, 1967). Lze tedy říci, že některé mikroorganismy mají pro určité substráty relativně vysokou prahovou koncentraci, některé rostou i při stopových množstvích organické látky (prahové koncentrace nižší než $2 \mu\text{g/l}$).

Pro stanovení prahové koncentrace organické látky byl na teoretickém základě vytvořený model. Model je formulován

- pro maximální rychlost, při které může organizmus získat energii v přítomnosti přesné koncentrace substrátu,
- pro stav, kdy energie je využita jen pro zachování životaschopnosti buněk.

Tento model předpokládá, že množství uhlíku, které organizmus potřebuje k zachování životaschopnosti, odpovídá rychlosti difúze chemikálie k povrchu buňky. Jestliže je koncentrace uhlíku nižší, dochází k odumření buněk. Tento složitý vztah je vyjádřen následující rovnicí (Alexander, 1999) :

$$\tau = \frac{1/Y_{\max} (R_d^2 - R_b^2) / 2}{D_{AB}C_b / \rho - (m/\ln 2)(R_d^2 - R_b^2) / 2}$$

kde

τ	maximální generační doba pro buňky
Y_{\max}	výtěžek
R_b a R_d	poloměry buněk na počátku a v průběhu jejich dělení
D_{AB}	difúze chemikálie
C_b	koncentrace chemikálie
ρ	sušina buněk dělená objemem
m	koefficient přežití (maintenance coefficient)

Difúze D_{AB} většiny polutantů se pohybuje okolo 10^{-5} cm²/s. Obvyklou hodnotou Y_{\max} pro bakterie je 0,55 g sušiny/g substrátu a hodnota ρ pak 0,31 g sušiny/cm³. Hodnota m se obvykle rovná 15 mg substrátu/g sušiny/h. Za primární poloměr buňky dosadíme hodnotu 0,5 μ m (R_b) a poloměr buňky před posledním rozdělením bude 0,63 μ m (R_d). Stanovíme maximální generační dobu pro buňky při koncentraci substrátu 10, 1, 0,5, a 0,2 μ g/l. Za těchto podmínek hodnoty τ odpovídají 1,71, 21, 57 a nekonečný počet hodin. Lze tedy usoudit, že pro studované buňky je koncentrace 0,2 μ g/l prahová.

Reálné hodnoty prahové koncentrace organické látky bývají však často vyšší v porovnání s hodnotami vypočtenými, neboť každá molekula nemusí proniknout až k buněčnému povrchu, pronikat do buňky a být buňkou využita. Model tedy umožní výpočet nejnižší možné prahové koncentrace.

Jak již bylo řečeno výše, hodnoty prahové koncentrace určité organické látky jsou vysoce variabilní. **Kolísají nejen mezi druhy a v závislosti na prostředí, ale i v závislosti na přítomnosti jiných dostupných zdrojů uhlíku.** Můžeme si uvést jednoduchý příklad kolísání hodnoty prahové koncentrace pro izolované mořské bakterie využívající glukózu jako zdroj uhlíku. Jestliže byla glukóza pro tyto buňky jediným zdrojem uhlíku, pak prahová koncentrace odpovídala hodnotě 480 μ g/l. V přítomnosti argininu klesla koncentrace glukózy na prahovou hodnotu 8 μ g/l. Jestliže buňky rostly v prostředí obohaceném nejen glukózou, ale i směsí aminokyselin, pak prahová koncentrace glukózy klesla pod detekovatelnou mez. Analogické výsledky byly získány při studiu metabolismu 3-chlorbenzoátu buňkami *Pseudomonas* sp. po přidavku acetátu. Rovněž v tomto experimentu bylo pozorováno snížení prahové koncentrace primárně studované látky. Zcela opačně došlo ke zvýšení hodnoty prahové koncentrace benzoátu po přidání acetátu (sekundární substrát), jestliže k degradaci bylo použito dvoučlenné společenstvo anaerobů. Toto zjištění bylo potvrzeno i v jiných experimentech s různými směsnými kulturami.

Všeobecně lze tedy konstatovat, že **přídavek dalšího substrátu vede ke změnám prahové koncentrace primárního substrátu. Efekt sekundárního substrátu se může projevit jen tehdy, je-li degradující populace schopna tento sekundární substrát efektivně využívat nebo o něj soutěžit ve vícedruhovém mikrobiálním společenstvu.**

Z těchto poznatků lze uzavřít, že predikce biologického štěpení či perzistence degradovatelné chemikálie v určitém přirozeném ekosystému je jen velmi obtížná a může být

zatížena nejen značnou chybou, ale může vést i k mylným sanačním prognózám. V predikci je nutné tedy vycházet ze skutečnosti, že ve vysoce komplexním přirozeném prostředí se uplatňuje řada dalších a často velmi proměnlivých faktorů (např. dostupnost degradované látky pro organizmy ovlivněná sorpcí, difúzí, rozpustností aj.), které mohou značně zvýšit hodnoty prahových koncentrací zjištěných pro degradaci identické látky v laboratorních podmínkách.

BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST POLUTANTŮ

Organické polutanty kontaminující prostředí mohou být pro mikroorganismy více či méně dosažitelné. Jejich dostupnost mikrobiálnímu ataku je ovlivněna celou řadou velmi těžce definovatelných faktorů vnějšího prostředí. Snížená dostupnost látek pro využití biologickými systémy (*bioavailability*) se nejčastěji projevuje výrazným snížením rychlosti degradace polutantu nebo jeho dlouhodobou perzistencí. Často je látka nedostupná nebo jen částečně dostupná v případě, že se dostává do velmi malých půdních pórů (nanopórů), které pro svou velikost nemohou být a nejsou osídleny mikroorganismy. Póry mohou být naplněny pouze vodou (v sedimentech) nebo vodou a vzduchem (v půdě). Dostane-li se do póru kontaminující chemikálie, pak se může uvolňovat postupnou difúzí až k místům osídleným mikrobiálními degradátory. Dráha difundující molekuly, zejména v prostředí tvořeném malými částicemi, je značně složitá a „klikatá“. Mimo to, většina bakteriálních buněk roste na povrchu jen některých částic a to ve formě mikrokolonií, takže značná část půdy nese žádné degradující mikroorganismy. Je tedy účinný kontakt látky a aktivní mikrobiální buňky zcela nahodilý. Mimo to, biologická dostupnost látek v půdě může být navíc ovlivněna rychlostí jejich sorpce a resorpce z pevných povrchů.

Některé sloučeniny jsou považovány za zcela nedegradovatelné a to za jakýchkoliv podmínek. Jako příklad těchto nedegradovatelných látek si můžeme uvést různé syntetické polymery. O jiných sloučeninách je známo, že jsou sice potenciálně degradovatelné, ale přesto perzistují v prostředí. Degradace těchto látek je tedy velmi citlivá na změnu podmínek prostředí, za kterých by měla destrukce látky probíhat. Příčinou ztráty „biodegradability“ degradovatelné molekuly může být:

- koncentrace toxické látky je tak vysoká, že nemůže dojít k množení mikroorganismů a metabolismus této látky je vyloučen,
- jedna nebo více živin, které jsou nutné pro růst mikroorganismů, je v tak nízké koncentraci, že vylučuje jejich růst,
- samotný polutant může být v tak nízké koncentraci (podprahové), že vylučuje růst a množení mikroorganismů s katabolickými enzymy,
- substrát není v takové formě, která by byla dostupná pro mikroorganismy.

Z výčtu možných příčin perzistence degradovatelných organických polutantů je zřejmé, že o většině jsme se zmínili již dříve. Z výzkumu však vyplývá, že posledně uvedená příčina perzistence, označovaná také jako **biologická dostupnost**, je jednou z hlavních příčin zamezení průběhu degradačních procesů. Biologická dostupnost organických molekul může být omezena např. sorpcí na pevný materiál, přítomností v tzv. nevodné tekuté fázi (*nonaqueous-phase liquid* NAPL) nebo uvnitř částic půdy či sedimentu.

Sorpce

Pevné částice mohou značnou měrou ovlivňovat degradační aktivitu přirozené mikroflóry. Zejména sorpce na povrch pevné částice může podstatně ovlivnit dostupnost živin, modifikovat pH prostředí, měnit kyslíkové poměry v prostředí, poutat mikroorganismy a potlačovat aktivitu extracelulárních enzymů. K takovým aktivním povrchům patří jíly, huminové látky a často amorfní oxidy a hydroxidy železa a hliníku. Tyto látky mohou ovlivnit proces biodegradace **sorpcí**, která zahrnuje **adsorpci** (vazbu na povrch) a **absorpci** (vazbu uvnitř). Částice tak vytvářejí nové podmínky pro biodegradaci v prostředí takto vytvářeného mikroklima.

Půdní částice, pevné složky sedimentů a odpadních vod mohou sorbovat celou řadu organických látek. Patří mezi ně např. aminosloučeniny, organické fosfáty a fosfonáty, dusíkaté heterocyklické sloučeniny, alkylbenzylsulfonáty, kationické surfaktanty nebo různé vysokomolekulární látky. Již samotné vlastnosti sloučeniny mohou předurčit, zda a za jakých podmínek se sorpce uskuteční a jak silná bude vazba mezi látkou a povrchem částice. Na základě četných pozorování bylo na příklad prokázáno, že některé organické látky se velmi ochotně váží na jílovité částice, jiné se převážně nebo dokonce výhradně váží na organické složky půdy. Na pevné částice se vedle organických látek sorbují také látky anorganické, které mohou být rovněž součástí výživy mikroorganismů.

Proces sorpce organických látek je ovlivňován celou řadou faktorů. Patří mezi ně např. typ sloučeniny a její koncentrace v okolním roztoku, typ a množství jílovité složky nebo organické hmoty v půdě nebo v sedimentu, hodnota pH, teplota prostředí a další. U jílu hraje významnou roli typ kationtů, které mohou saturovat jeho povrch (tj. zda je jíl saturován Fe, Ca nebo H ionty) nebo velikost jeho specifického povrchu (20-80 m²/g).

Chemická podstata sorpce

Vzhledem k tomu, že půda a sedimenty obsahují značný podíl jílových složek, je sorpci, jako jednomu z faktorů, který se může podílet na průběhu degradace, věnována značná pozornost. Jílové minerály se převážně vyskytují ve dvou typech. První typ je charakterizován poměrem Si : Al = 1 : 1 (-Si .Al .Si .Al .Si .Al -), druhý typ poměrem Si : Al = 2 : 1 (-Si . Al . Si . Si . Al . Si-). První typ jílu představuje např. **kaolinit**. Patří mezi neexpandující jíly a má tedy relativně malý povrch a menší sorpční kapacitu v porovnání s typem 2 : 1. Molekuly jsou na tento jíl převážně jen adsorbovány, tedy vázány na povrch. Ke druhému typu jílu patří např. **montmorillonit**. Jeho mřížková struktura může lehce expandovat, takže tento jíl může vázat molekuly jak na vnější, tak i na vnitřní povrch.

Adsorpce se může uskutečňovat fyzikálně nebo van der Waalsovými silami, vodíkovými vazbami, iontovou výměnou nebo chemisorpcí. Všeobecně velké molekuly bývají k povrchu sorbovány vodíkovými vazbami, ale pro většinu nízkomolekulárních organických látek, mezi které patří i četné polutanty, má zvláště význam iontová výměna. **Jílové minerály a koloidní půdní organická hmota mají negativní náboj** a přitahují tedy kationty. Na jejich povrchu se proto objevují H, Ca, K nebo Mg ionty, které mohou být vytěsňovány pozitivně nabitými organickými molekulami. Lze tedy odvodit, že pozitivně nabitá organická molekuly se velmi dobře váží na jíl a huminové substance, neboť tyto složky půdy mají negativní povrchový náboj. Organické molekuly s negativním nábojem jsou naopak od těchto půdních složek odpuzovány. Z tohoto důvodu jsou za přirozených podmínek pH prostředí na negativně nabitých površích vyvázané převážně pozitivně nabitá látky.

Schopnost jílu ovlivňovat biodegradaci se liší podle jeho typu. Např. montmorillonit často sorbuje potenciální mikrobiální substráty, neboť má vysokou kapacitu iontové výměny

(*cation-exchange capacity*) a expandující mřížkovou strukturu. Tento efekt je mnohem slabší u kaolinitu a illitu.

Organická koloidní frakce půdy je zodpovědná za sorpci celé řady sloučenin, obzvláště těch, které jsou hydrofóbní. Na organickou hmotu jsou velmi účinně sorbovány polycyklické uhlovodíky a jiné nepolární polutanty. Rozsah této sorpce koreluje např. s tzv. dělicím koeficientem pro systém oktanol-voda (*octanol-water partition coefficient*), který je uváděn jako hodnota K_{ow} a udává míru hydrofobicity chemikálie a s procentem organického uhlíku v půdě nebo sedimentu. Všeobecně platí, že čím více organické hmoty je přítomno v pevné fázi, tím více hydrofóbních molekul je sorbováno. Na mechanismus této sorpce existuje několik odlišných názorů, avšak nová pozorování potvrzují hypotézu, že molekuly organického substrátu jsou sorbovány fyzikálními silami nebo chemickými vazbami nejen na povrch, ale i uvnitř celého objemu organické hmoty, čímž dochází ke změnám jejich dostupnosti pro mikroorganismy.

V půdní organické hmotě byl prokázán i proces iontové výměny. Uplatňuje se zejména u pozitivně nabitých sloučenin (např. protonizovaných herbicidů) jejich vazbou na negativně nabitou skupinu ($R-COO^-$) komplexního organického materiálu. V přírodě je tato iontová výměna významná zejména při neutrálních nebo slabě zásaditých hodnotách pH.

Sorpce je tedy významným procesem ovlivňujícím biologickou dostupnost celé řady chemikálií i přirozených mikrobiálních substrátů a hraje významnou roli v procesu biodegradace. Efekt sorpce je vysoce variabilní a závisí na celé řadě jen obtížně prokazatelných faktorů (mechanismus vazby, síla vazby, schopnost mikroorganismů využívat vázaný substrát aj.). V řadě případů jsou degradovatelné látky v důsledku sorpce zcela odolné mikrobiálnímu ataku. Tento závěr platí zejména pro sorpci hydrofóbních sloučenin. Bylo prokázáno, že mikroorganismy nemohou degradovat sorbované polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), což může být jednou z příčin nezdaru sanace některých půd. Tuto skutečnost rovněž potvrzují srovnávací biodegradační experimenty s čerstvě kontaminovanou půdou etylendibromidem a půdou, kde tentýž polutant je dlouhodobě sorbovanou kontaminantou. U čerstvě kontaminované půdy autoři prokázali snadnou resorpci etylendibromidu, zatímco u staré zátěže uvolňování etylendibromidu nebylo detekováno. Dlouhodobé pokusy potvrdily, že v úrodných půdách bohatých na organickou hmotu dochází k výraznému zpomalení degradace některých látek, např. herbicidů, v porovnání s půdami s nízkým obsahem humusu.

Zdá se tedy, že substrát musí být v takovém stavu, aby byl dosažitelný pro enzymy produkované degradátorem. Většina enzymatických stupňů mikrobiálního metabolismu nízkomolekulárních látek je intracelulární a pouze některé jeho stupně mohou být extracelulární (často tyto extracelulární stupně zcela chybí). Rozklad vysokomolekulárních látek je však obvykle zahájen extracelulárními enzymy, jejichž katalytická aktivita může být také výrazně snížena jejich sorpcí na reaktivní povrchy přirozeného sorbentu, např. montmorillonitu.

Mnohá pozorování však prokázala, že sorpce nemusí mít jen negativní vliv na průběh biodegradace, ale spíše naopak (viz Využívání sorbovaných látek a stimulační efekty).

Celkově lze shrnout, že sorpce může ovlivňovat biodegradaci nejrozličnějšími mechanismy, které lze shrnout do následujících bodů :

- anorganické živiny a růstové faktory jsou sorbovány, čímž jsou nedostupné pro replikaci a růst některých mikroorganismů,
- mikroklima v těsné blízkosti povrchu sorbentu může být méně vhodné pro transformaci látky v porovnání s okolním roztokem, neboť povrch sorbentu

přitahuje a koncentruje H^+ z roztoku, čímž dochází k významnému snížení hodnoty pH v jeho těsné blízkosti,

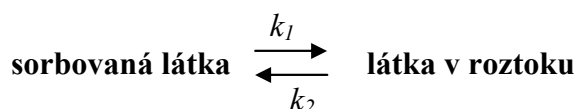
- jestliže okolní roztok obsahuje jen velmi nízké koncentrace živin, pak sorbent může tyto živiny koncentrovat na svém povrchu, což se projevuje zvýšeným nárůstem mikroorganismů v těsné blízkosti povrchu sorbentu za současné stimulace biodegradace,
- jíly a organická hmota v půdě a sedimentech se mohou podílet na sorpci mikroorganismů z prostředí. "Zahuštěné" mikroorganismy na povrchu sorbentu pak mohou účinněji degradovat polutant v porovnání s nízkým počtem buněk degradátora ve vodné fázi,
- sorbce mikroorganismů na povrchy může být podle studovaného mikrobiálního druhu nebo degradačního společenstva reverzibilní i ireverzibilní, přičemž jejich metabolická aktivita může být nezměněna nebo je ovlivněna pozitivně či negativně.

Využívání sorbovaných sloučenin

Některé sorbované molekuly mohou být využívány mikroorganismy jako zdroj uhlíku, energie, dusíku a pravděpodobně i jiných prvků. Bylo např. pozorováno, že mikroorganismy mohou využívat bílkoviny vázané na jílech, avšak rychlost jejich využívání velmi kolísá v závislosti na typu jílu, typu proteinu a na kationtovém nasycení sorbčního povrchu. Z výsledků laboratorních experimentů s hydrofóbními látkami (PCB, PAH) a polyakrylátovými kuličkami autoři dospěli k závěru, že pouze některé mikroorganismy, které využívají látku v roztoku, mohou tuto látku využívat také v sorbované formě. Zjednodušeně řečeno, mikroorganismy, které využívají sorbované látky, musí nejen produkovat odpovídající katabolické enzymy, ale současně musí vykazovat i schopnost „zpřístupnit“ sorbované molekuly enzymatickému ataku. Jedná se tedy s největší pravděpodobností o takové látky, které mohou být resorbovány a tím uvolňovány do roztoku takovou rychlostí, která umožňuje jejich využívání mikroorganismy. Některé experimenty podávají důkazy o tom, že mnohé látky mohou být využívány i bez jejich prokazatelné resorpce, a že rychlost degradace těchto sorbovaných látek je podstatně vyšší v porovnání s rychlostí jejich degradace v roztoku.

Do současné doby nebylo tedy spolehlivě prokázáno, jakým mechanismem se sorbované molekuly stávají dostupnými pro mikroorganismy. Pro formulování hypotéz budeme vycházet ze všeobecně známé skutečnosti, že pokud má být daná látka degradována a využívána pro růst, pak musí být buňkou asimilována. Za tohoto předpokladu může být mechanismus využívání vysvětlen třemi různými hypotézami :

- a) organismus může využívat látku v roztoku a metabolizuje rovněž látku, která vstupuje do vodné fáze v důsledku **spontánní resorpce**. Na počátku se v tomto systému vytváří rovnováha mezi sorbovanou látkou a látkou v roztoku :

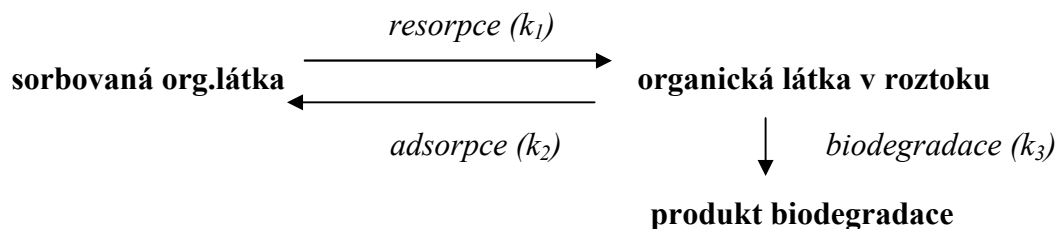


Látka je v roztoku využívána degradující populací, která se množí a při dosažení určitého počtu buněk je jejich metabolismus řízen resorpční rychlostí (k_1) až do vyčerpání využitelného substrátu.

- b) mikroorganismy produkují metabolity, které usnadňují resorpci, takže biodegradace látky probíhá větší rychlostí, nežli v případě spontánní resorpce. Za těchto podmínek není pak rychlost biodegradace limitována rychlostí spontánní resorpce. Mechanismus této tzv. **zprostředkované resorpce** není dosud spolehlivě vyřešen. Je pravděpodobné, že na zprostředkované resorpci se budou podílet biosurfaktanty, kationtová výměna nebo extracelulární enzymy. Není vyloučeno, že tato resorpce může souviset rovněž s mikrobiálně indukovanými změnami hodnoty pH nabitého povrchu.
- c) **sorbované sloučeniny jsou přímo využívány mikroorganismy**, které adherují k těmto povrchu. Organismy mohou tak přijít do přímého kontaktu s látkou, která pak může penetrovat do buňky, aniž by byla uvolňována do okolního tekutého prostředí. Hydrofóbní molekuly se dostávají do buňky přes hydrofóbní složky povrchu mikroorganismu. Toto vysvětlení je srovnatelné s vysvětlením mikrobiálního využívání látek, které nejsou rozpustné ve vodě a na něž mohou mikroorganismy adherovat za současné jejich degradace.

Kinetika

Pro biodegradaci látek, které jsou sorbovány na různých površích, bylo navrženo několik modelů. Základní model vychází z **hypotézy resorpce** (spontánní nebo zprostředkované):



Do tohoto vztahu bývá vnášen koeficient k_p , který je odrazem afinity látky k sorbentu a může sloužit k výpočtu poločasu biologického rozkladu ze vztahu k_p/k_3 . Rovnice může být ještě dále rozšířena ve zvláštním uvažovaném případě, kdy produkty biodegradace se mohou rovněž sorbovat na povrch při rychlosti sorpce charakterizované konstantou k_4 s resorpcí charakterizovanou konstantou k_5 . Některé modely byly navrženy pro biodegradaci sorbovaných látek nerostoucími populacemi mikroorganismů. Samostatnou skupinu tvoří modely kinetiky degradace na sorbovaných látkách. Přesto aplikace těchto modelů na různé přirozené systémy substrát-sorbent je velmi obtížná.

Stimulační efekt sorpce

Z předchozích závěrů by se zdálo, že sorpce může pouze negativně ovlivňovat biodegradaci proces. Bylo však zjištěno, že pevný materiál může mít za určitých podmínek silný stimulační efekt na mikroorganismy a tedy i na biodegradaci organického polutantu. Některé mikroorganismy (např. mořské oligotrofní bakterie) značně zrychlují svůj růst po

adsorpci na pevné částice (např. na skleněné kuličky). Rovněž bylo pozorováno zrychlení degradace některých polutantů po přidání některých typů jílu do prostředí (Tab.2).

Tabulka 2 Příklady stimulačního efektu sorpce na rychlost degradace (Alexander,1999)

Degradovaná látka	Sorbent	Mikroorganismus	Reference
Močová kyselina	bentonit	<i>Pseudomonas</i> sp.	Durand,1964
Hexametylendiamin	různé jily	<i>Bacillus substilis</i>	Garbara a Rotmistrov,1982
Různé aldehydy	montmorillonit	Fertilní půda	Kunc a Stotzky,1977
Glukóza	montmorillonit	aktinomycety	Martin et al.,1976

Vysvětlení je velmi obtížné, i když se předpokládá, že zrychlení degradace polutantu může být způsobeno jeho zakoncentrováním a optimalizací koncentrace na povrchu nabitě částice, nebo sorpcí toxinů z prostředí či pufrováním prostředí. Využití poznatků o sorpci v průběhu biodegradace se ukazuje za určité situace jako velmi nadějně, zejména u velmi komplexního znečištění prostředí.

„Stárnutí“ polutantu

Biologická dostupnost látek perzistujících v půdě se snižuje v čase. Tento proces zvyšování odolnosti látek k mikrobiálnímu ataku v čase je často označován jako proces „stárnutí“ látky v kontaminovaném prostředí. Předpokládá se i v kontaminovaných sedimentech, ale nebyl zde dostatečně prostudován, neboť degradační procesy zde probíhají jen velmi nízkou rychlostí. Proces zvyšování odolnosti cizorodých organických látek k degradaci v čase byl popsán při sledování změn koncentrace některých pesticidů v půdě. Tento významný rozdíl v průběhu biodegradace „starých“ a „čerstvých“ kontaminat není obvykle uvažován a vede často k mylným časovým predikcím průběhu sanace kontaminované lokality. Rychlost „stárnutí“ polutantu je značně závislá nejen na jeho chemické struktuře a koncentraci, ale i na typu půdy, nikoliv však na jejím mikrobiálním osídlení.

V řadě pozorování bylo prokázáno, že v kontaminovaných půdách nelze v průběhu biodegradace dosáhnout absolutně nulové koncentrace degradované látky. „Zbytkové“ koncentrace látky po biodegradaci se však značně liší v závislosti na době, která uplynula od samotné kontaminace půdy. Tabulka 3 uvádí výsledky laboratorního pokusu se sterilní půdou, která byla kontaminována fluorantenem v koncentraci 100 mg/kg. Do takto kontaminované půdy byly v různých časových intervalech (doba stárnutí fluorantenu) inokulovány degradující mikroorganismy. Po biodegradaci byla stanovena již neměnná zbytková koncentrace fluorantenu. Experiment prokázal, že s dobou stárnutí studovaného polutantu v půdě se zvyšuje jeho zbytková (pro mikroorganismy nedostupná) koncentrace.

Tabulka 3 Vliv „stárnutí“ na biodegradabilitu fluorantenu v půdě (podle Tang a kol.,1998)

Doba „ stárnutí“ (dny)	Koncentrace v půdě po bioremediaci (mg/kg)
0	1,65
75	4,56
107	5,85
140	7,72

Závěrem této kapitoly můžeme shrnout, že biologická dostupnost významně ovlivňuje rychlost biodegradace. Za hlavní příčiny snížení biologické dostupnosti látek je považována:

- a) interakce polutantu se složkami půdy nebo sedimentu, čímž se mění jeho fyzikální a chemické vlastnosti,
- b) polutanty nebo produkty biodegradace vytvářejí se složkami půdy (nebo navzájem) perzistující komplexy, které nelze obvykle detekovat (nemohou být extrahovány běžnými ředidly),
- c) uzavření polutantu do mikropórů resp. nanopórů mezi půdními částicemi, odkud se polutant dostává ztíženou difúzí (až 30% objemu půdy je tvořeno póry o průměru menším než 0,2 μm).
- d) v půdním nanopóru může docházet k sorpci polutantu a jeho biodegradace je pak ovlivněna případnou resorpcí.

Toxikologický význam zbytkových látek je sporný. V mnoha studiích bylo prokázáno, že pokud jsou k hodnocení degradace polutantu využívány jen obvyklé extrakční a analytické metody bez ohledu na skutečnost, že tyto metody jsou k detekci zbytkové koncentrace chemikálií nedostačující, mohou být učiněny i velmi nesprávné toxikologické závěry. Nebezpečí spočívá např. v podcenění netoxických zakomplexovaných molekul pesticidů. Tyto mohou být přímo asimilovány rostlinami a živočichy nebo zůstávají v prostředí. V prostředí jsou pak komplexy postupně rozkládány na původní chemicky detekovatelné a toxické molekuly. Přesto mnozí autoři prokazují, že koncentrace těchto „zbytkových“ a „nedostupných“ molekul je příliš malá na to, aby měla zvláštní toxikologický význam. Jsou tedy zbytkové látky rizikovým faktorem biodegradací? Pravdivou odpověď bude nutné hledat v dalším výzkumu, i když v praxi není zbytkovým látkám věnována zatím žádná pozornost.

BIODEGRADACE LÁTEK S NÍZKOU ROZPUSTNOSTÍ VE VODĚ

Celá řada polutantů není rozpustná ve vodě a vytváří tekutou složku znečištění NAPL (*nonaqueous-phase liquids*), která je nemísitelná s vodou. Vzhledem ke slabé rozpustnosti těchto látek ve vodě, může být rychlost jejich biodegradace nebo bioremediace značně omezena. S kontaminací tohoto typu se setkáváme v půdách, sedimentech, v povrchových i spodních vodách. K těmto látkám, které přecházejí do NAPL, patří např. surová ropa a ropné produkty a všechny polutanty téměř nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v organických ředidlech (Tab.4). I když tyto složky NAPL kontaminují vodnou fázi v nízké koncentraci, přesto patří k významným polutantům prostředí. V dlouhodobě kontaminovaných lokalitách se látky s nízkou rozpustností vyskytují většinou ve směsích, neboť jsou postupně degradovány přirozenými mikrobiálními společenstvy. Z Tabulky 4 je zřejmé, že u alifatických uhlovodíků se snižuje jejich rozpustnost se vzrůstem počtu atomů uhlíku v molekule. Přesto byla nejhluběji prostudována právě biodegradace některých alifatických a aromatických uhlovodíků. Bylo prokázáno, že např. alifatický uhlovodík o molekulové hmotnosti 618 ($\text{C}_{44}\text{H}_{90}$) může být degradován mikroorganismy, i když jeho rozpustnost je menší než 1 ng/l. V četných experimentech bylo potvrzeno, že celá řada mikroorganismů může využívat jako zdroj uhlíku a energie pro růst a množení také ve vodě nerozpustné

aromatické uhlovodíky. Byly navrženy tři základní mechanismy pro degradaci těchto, ve vodě nerozpustných nebo slabě rozpustných organických látek:

- využívána je jen látka, která se dostává do vodné fáze v okolí nerozpustné látky,
- mikroorganismus vytváří surfaktanty a emulgátory, které pseudosolubilizují substrát (tvorba kapiček menších než 1 μm). Tyto kapky může mikroorganismus asimilovat a využívat.
- buňky vstupují do přímého kontaktu se substrátem, který se přímo přes membrány dostává do buňky.

Vedle zvýšení dostupnosti těchto látek pro biodegradaci bývá limitujícím faktorem jejich degradace kyslík, a to zejména při degradaci ropných látek v půdě. V tomto prostředí je nutné rovněž zvýšit koncentraci N a P, neboť koncentrace těchto látek v prostředí pro rychlou degradaci bývá nedostatečná a difúze těchto živin až k povrchu olejovité látky je pomalá. Limitujícím faktorem pro degradaci ropných látek v mořské vodě bývá koncentrace Fe, které je buňkami jen obtížně asimilováno při hodnotách pH mořské vody.

Látky, které jsou ve vodě nerozpustné nebo jen slabě rozpustné, bývají charakterizovány koeficientem K_{ow} (*octanol-water partition coefficient*), který udává po dosažení rovnováhy poměr mezi koncentrací chemikálie rozpuštěné v *n*-oktanolu a koncentrací látky ve vodě. Hodnoty K_{ow} bývají často značně vysoké a bývají proto vyjádřeny jako $\log K_{ow}$. Sloučeniny s vysokou hodnotou K_{ow} můžeme považovat za hydrofóbní, naopak sloučeniny s nízkou hodnotou K_{ow} za hydrofilní. Hodnoty K_{ow} pro některé sloučeniny jsou uvedeny v Tabulce 5.

Látky přítomné v NAPL mohou být degradovány současně nebo některé mohou být degradovány přednostně a teprve po jejich transformaci může probíhat využívání látek méně citlivých k mikrobiální degradaci. Současně probíhající degradace byla pozorována např. u surové ropy, která představuje vysoce heterogenní směs alifatických a aromatických uhlovodíků, heterocyklických sloučenin a jiných doprovodných látek.

O biodegradaci jednotlivých složek NAPL rozhoduje celá řada faktorů. Mezi hlavní samozřejmě patří degradační schopnost přítomné mikroflóry. Degradační aktivita mikroorganismů je pak dále závislá :

- a) na rychlosti přechodu složek z NAPL do vodné fáze,
- b) na viskozitě NAPL,
- c) na toxicitě NAPL,
- d) na ploše styčné plochy mezi NAPL a vodnou fází,
- e) na přítomnosti složek, které jsou účinněji degradovány než sloučenina našeho zájmu,
- f) na koncentraci látky ve vodné fázi (nesmí být nižší než je prahová koncentrace látky pro přítomného degradátora).

Tabulka 4 Rozpustnost různých organických sloučenin ve vodě

Skupina látek	Sloučenina	Rozpustnost ve vodě (mg/l)
Alifatické uhlovodíky ^{a)}	Heptan (C ₇ H ₁₆)	2,9
	Oktan (C ₈ H ₁₈)	0,66
	Nonan (C ₉ H ₂₀)	0,22
	Dekan (C ₁₀ H ₂₂)	0,052
	Hexadekan (C ₁₆ H ₃₄)	0,00002
Aromatické uhlovodíky ^{b)}	Naftalen	30
	Bifenyl	7,2
	Acenaften	4,3
	Antracen	0,05
	Fenantren	1,1
	Pyren	0,13
	Chrysen	0,002
	1,2-Benzpyren	0,0053

a) Coates a kol., 1985

b) Yalkowsky a kol., 1983

Tabulka 5 Hodnoty K_{ow} pro některé organické sloučeniny (podle Laane a kol., 1987)

Organická sloučenina	Log K _{ow}
Aceton	0,23
Benzen	2,0
Dekan	5,6
Diethyltalát	3,3
Difeny léter	4,3
Dioktylftalát	8,8
Dioxan	-1,1
Pyridin	0,71
Tetradekan	7,6
Toluen	2,4
Xylen	3,1

Rychlost uvolňování látek z NAPL do vodního prostředí je velmi variabilní a závisí na charakteru NAPL a obsažených sloučeninách. Může být velmi pomalá nebo naopak velmi rychlá. Rychlost mikrobiální transformace však nemusí být limitována pouze rychlostí

uvolňování látky z NAPL, ale může být snížena i v důsledku vytváření velmi malé aktivní biomasy z nedostatku živin nebo pro toxicitu uvolňované látky.

Viskozita NAPL je velmi variabilní a ovlivňuje uvolňování obsažených kontaminantů do vodného prostředí. Vysoce viskózní NAPL podstatně snižují rychlost biodegradace obsažených složek. Jako příklad si může uvést dvě NAPL o různé viskozitě s rozpuštěným fenantrenem. Je-li NAPL tvořena leteckým petrolejem o velmi nízké viskozitě, pak rozpuštěný fenantren je mineralizován rychlostí kolem 30 ng/ml/h. Fenantren rozpuštěný v surové ropě s vysokou viskozitou je mineralizován rychlostí kolem 7 ng/ml/h.

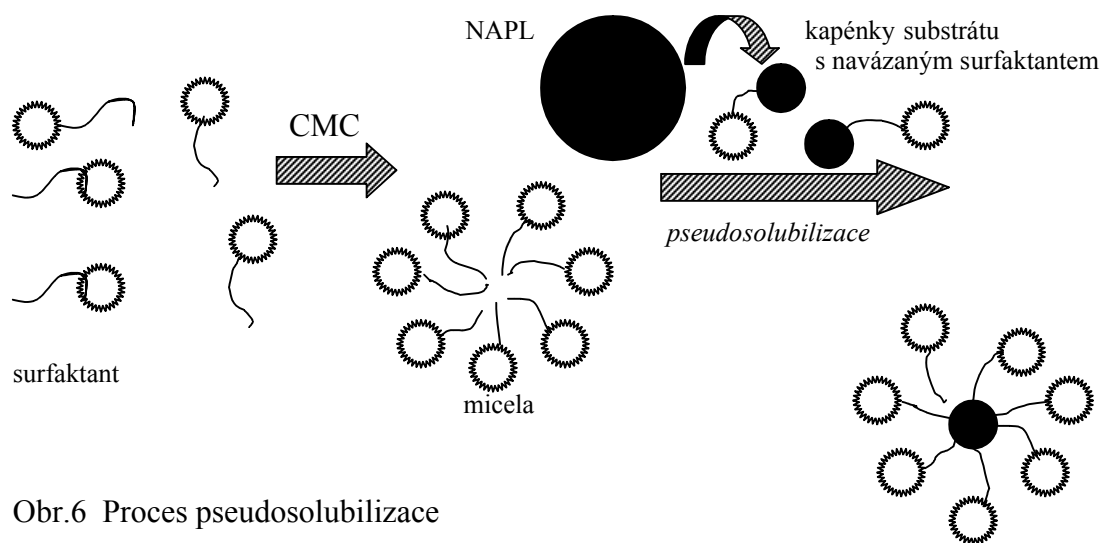
Zvláštní situace nastává v případě, že složky samotného NAPL jsou některými mikroorganismy využívány rychleji, nežli ostatní kontaminanty jinými degradátory. Mezi těmito mikroorganismy pak dochází k soutěžení o kyslík, dusík nebo fosfor. Rychlejší růst a vytvoření značné biomasy na preferovaném substrátu se projevuje snížením koncentrace limitujících živin, což vede k potlačení degradace pomaleji využívaného substrátu.

Mnohá pozorování vedou k závěru, že některé látky obsažené v NAPL mohou být transformovány pouze v procesu kometabolizmu. K jejich transformaci dochází tedy za podmínek, že z NAPL jsou uvolňovány také složky, které stimulují růst kometabolizujících mikrobiálních druhů.

BIOSURFAKTANTY

Mikroorganismy, které využívají složky NAPL, produkují povrchově aktivní látky, obvykle označované jako **emulgátory** nebo **biosurfaktanty** (*biological surface active agents*). Surfaktanty usnadňují uvolňování látek z NAPL do vodné fáze tím, že vytvářejí drobné kapénky menší než 0,1 μm . Takto vzniklá suspenze velmi malých kapének má pak vlastnosti velmi podobné vlastnostem roztoku. Mohou vznikat i typické emulze, ve kterých jsou kapky látky nemísitelné s vodou tak malé, že přetrvávají neomezeně dlouhou dobu ve vodné fázi. Čím jsou tedy kapénky menší, tím jsou emulze stabilnější. Vysokou stabilitu vznikající emulze zajišťuje emulzifikační agens. Lze tedy shrnout, že výsledkem společného působení surfaktantů a emulgátorů dochází k pronikavému zvětšení povrchu mezifáze NAPL-voda, což vede i k podstatnému zrychlení biodegradace ve vodě nerozpustné látky. Povrchově aktivní látka, která je obvykle označována jako surfaktant, může současně ovlivňovat stabilitu emulze a působí tedy současně jako emulgátor. **Většina izolovaných emulgátorů působí současně jako surfaktanty, ale ne všechny popsané surfaktanty mají emulzifikační vlastnosti.** Podle přesné definice tedy surfaktant snižuje povrchové napětí kapaliny, ale emulgátor může ovlivňovat mezifázové napětí. Bylo prokázáno, že emulgátory produkované mikroorganismy jsou současně typickými surfaktanty.

Molekula biosurfaktantu obsahuje hydrofóbní a hydrofilní část. Hydrofóbní část je obvykle tvořena mastnými (nasycenými, nenasycenými nebo hydroxylovanými) kyselinami. Hydrofilní část je po chemické stránce velmi variabilní a může být tvořena cukry, aminokyselinami, bílkovinami apod. V nízkých koncentracích jsou biosurfaktanty plně rozpustné ve vodě. Jestliže se jejich koncentrace v médiu zvyšuje, pak se molekuly surfaktantu shlukují do drobných agregátů, které jsou označovány jako micely (Obr.6)



Obr.6 Proces pseudosolubilizace

Vznikající supramolekulární struktury mohou mít různý charakter. Byly popsány sférické a cylindrické micely, dvojité vrstvy a vezikuly. Tyto struktury mohou měnit svou velikost i tvar v závislosti na typu biosurfaktantu a podmínkách prostředí. Ze studia vzniku micel vyplývá, že snížení teploty, zvýšení koncentrace elektrolytů v médiu nebo zvýšení koncentrace biosurfaktantu vede ke zvětšení velikosti micel.

Nejnižší koncentrace, při které vznikají micely je označována jako **kritická micelární koncentrace (CMC)**. Hodnoty CMC (mg povrchově aktivní látky/l) slouží k posouzení účinnosti různých biosurfaktantů. Ve vodě jsou hydrofóbní konce surfaktantu orientovány do středu micely, hydrofilní část molekul směřuje do vodní fáze. Hydrofóbní substrát uvolněný z NAPL (nebo současně i část NAPL) je inkorporovaný do středu micely a v této formě se dostává do vodné fáze. Tento jev je označován jako **pseudosolubilizace** neboli **zdánlivá rozpustnost** a dochází k němu nejčastěji za podmínek, kdy koncentrace surfaktantu neklesne pod CMC (některé surfaktanty mohou zvyšovat pseudosolubilitu hydrofóbních molekul i pod hodnotou CMC).

Produkce povrchově aktivních látek nebo emulgátorů byla popsána zejména u mikroorganismů, které mohou degradovat NAPL tvořené alkany. Rychlost pseudosolubilizace bývá obvykle vyšší v porovnání s rychlostí mikrobiálního využívání tohoto „rozpuštěného“ substrátu s následným růstem. Významným limitujícím faktorem pro degradační aktivitu buněk je velikost vytvářených kapek.

Na základě iontového charakteru se biosurfaktanty dělí na ionogenní a neionogenní. Ionogenní biosurfaktanty obsahují v hydrofilní části své molekuly funkční skupiny disociující ve vodě. Podle typu vznikajících iontů rozeznáváme anionaktivní, kationaktivní a amfoterní ionogenní biosurfaktanty. Neionogenní biosurfaktanty (např. trehalózalipidy) nesou funkční skupiny, které ve vodě nedisociují.

Produkce biosurfaktantů byla prokázána u celé řady degradujících mikroorganismů (Tab.6).

Tabulka 6 Příklady některých mikrobiálních producentů povrchově aktivních látek (Alexander, 1999)

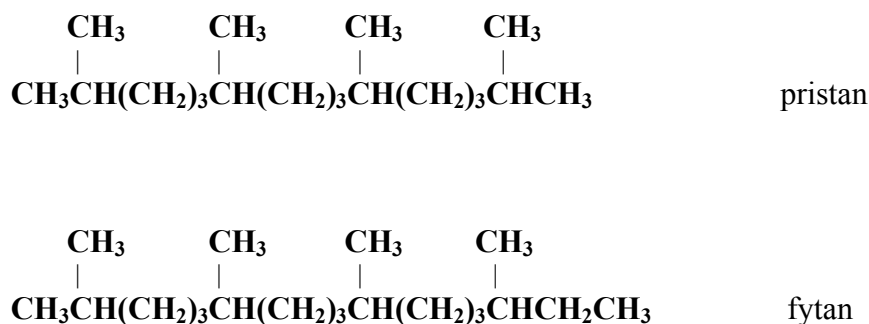
Mikroorganismus	Biosurfaktant	Reference
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Komplex trehalóزالipidů	Kretschmer <i>et al.</i> , 1982
<i>Nocardia corynebacteroides</i>	Trehalóزالipidy	Powalla <i>et al.</i> , 1989
<i>Candida bogoriensis</i>	Sofaróزالipidy	Hommel, 1990
<i>Torulopsis bombicola</i>	Sofaróزالipidy	Hommel, 1990
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnořlipidy	Robert <i>et al.</i> , 1989
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptidy	Kakinuma <i>et al.</i> , 1968
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptidy	Jenny <i>et al.</i> , 1991
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipoprotein	Pareilleux, 1979
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Lipopolysacharidy	Zosim <i>et al.</i> , 1982

VLIV CHEMICKÉ STRUKTURY NA BIODEGRADACI

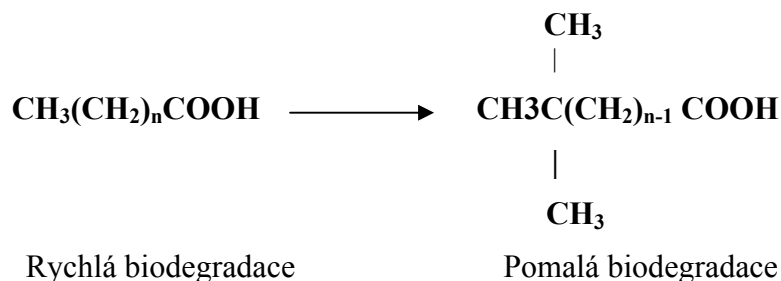
V současné době se věnuje značná pozornost predikci, zda určitá sloučenina je biologicky rozložitelná a jaké produkty lze za určitých podmínek její biodegradace očekávat. Tyto „předpovědi“ mají nejen široké uplatnění v degrační praxi, ale i při syntéze nových průmyslových sloučenin.

Jestliže však pohlédneme do historie výroby některých uměle připravených sloučenin, např. pesticidů, zjistíme, že počáteční predikce rozložitelnosti jejich molekuly sloužila zcela jiným účelům, než je tomu dnes. Cílem chemiků byla syntéza jen velmi těžce rozložitelné molekuly s neměnnou aktivitou po její aplikaci do přírody. Vývoj těchto ochranných látek vycházel z poznatků, že syntetické organické sloučeniny, které jsou běžně mineralizovány, se mohou stát částečně nebo zcela rezistentní k mikrobiálnímu útoku přidáním jednoduchých substituentů. Tyto substituenty jsou označovány jako **xenofory**, tedy substituenty, které jsou v přírodě neobvyklé nebo jsou zcela nefyziologické. Využitelnost jednoduchých aromatických molekul, mastných kyselin a dalších lehce využitelných substrátů se snižuje např. jejich substitucí Cl, NO₂, SO₃H, Br, CN nebo CF₃. Tyto xenofory jsou většinou organismů cizí a jejich odstranění může uskutečnit jen velmi málo druhů. Někdy i CH₃, NH₂, OH a OCH₃ skupiny mohou vystupovat jako xenofory. Degradace látky bývá často stimulována skupinami OH, COOH nebo amidy, estery nebo anhydridy funkčních skupin. Významnou roli v degradovatelnosti látek hraje nejen typ xenoforu, ale i jejich počet a umístění na molekule.

Významnou úlohu v perzistenci řady lehce využitelných sloučenin, např. alifatických uhlovodíků, alifatických kyselin, alkoholů a jiných chemikálií, může hrát rozsah jejich metylace. Mezi nejčastěji perzistujícími uhlovodíky v přírodě patří vysoce rozvětvený pristan a fytan.



Velmi dobře jsou degradovány mono- a dikarbonové kyseliny bez metylace. Jejich degradace probíhá velmi rychle zejména v půdě. Po náhradě dvou vodíků v jedné skupině -CH₂- mono- nebo dikarbonové kyseliny metylovou skupinou, dochází ke značnému zpomalení degradace těchto látek.



Mastné kyseliny jsou degradovány v procesu β-oxidace. Kvartérní uhlík proces β-oxidace zastaví a kyselina musí být degradována jiným procesem. Čím je kvartérní uhlík vzdálenější od skupiny COOH, tím déle může degradace v procesu β-oxidace probíhat. Značný vliv na průběh degradace alkanu nebo alifatické kyseliny může mít i místo a způsob vazby aromatického kruhu.

Výrazné rozdíly v rychlosti biodegradace byly pozorovány zejména mezi polyaromatickými uhlovodíky (PAHs). Antracen, fenantren a acenaftylen obsahují 3 kruhy, podobně jako pyren, ale oproti pyrenu jsou za aerobních podmínek rychleji degradovány. Polyaromáty se čtyřmi a pěti kruhy jsou vysoce perzistentní.

Závěry o vztahu struktury a biodegradability nelze zcela zobecňovat. Bylo zjištěno, že zcela jiné vztahy platí pro biodegradaci za aerobních a anaerobních podmínek. Využití vztahu mezi strukturou molekuly a její biodegradabilitou k predikci průběhu biodegradace látek v přirozeném prostředí je diskutabilní, neboť většina vztahů je odvozena z laboratorních experimentů s čistými kulturami.

Predikce produktů

V průběhu metabolických procesů často vnikají intermediáty (mineralizace) nebo produkty (kometabolismus), které mají značný význam jak z hlediska ekologického, tak i toxikologického. V průběhu většiny degradativních reakcí (tj. nezahrnujících polymerizační, adiční popř. konjugační reakce) probíhá u substrátu

- adice hydroxylové skupiny a vodíku z H₂O
- adice 2H nebo 2 protonů
- adice molekulového kyslíku nebo ½ O₂
- odstranění molekuly vody
- odstranění 2H nebo HR (R je substituent)

Hydroxylové skupiny, vodík nebo molekulový kyslík mohou působit přímo na degradovanou molekulu nebo mohou fungovat při odstraňování některých substituentů. V průběhu predikce vzniku metabolických produktů či intermediátů byla zaměřena pozornost zejména na studium skupin významných polutantů, např. aromatických sloučenin (mono- a polycyklických), cykloalkanů, alkanů a alkenů, halogenovaných sloučenin a dalších. Studium bylo prováděno nejen s čistými kulturami mikroorganismů, ale i s přírodním mikrobiologicky heterogenním materiálem (odpadní vody, sedimenty a kal, půda aj.)

VLIV PROSTŘEDÍ NA PRŮBĚH BIODEGRADACE

V přirozeném prostředí je růst a metabolická aktivita mikrobiálních degradátorů do značné míry ovlivněna celou řadou vnějších faktorů (fyzikálních, chemických, biologických). Samotné prostředí, v němž se degradace uskutečňuje, je v důsledku dynamiky probíhajících transformačních procesů vysoce variabilní, což zpětně ovlivňuje jak samotnou rychlost transformace polutantů, tak i mikrobiální dostupnost vznikajících produktů či jejich perzistenci. Lze tedy říci, že přirozené prostředí má nemalý vliv na úspěšný průběh degradace polutantu našeho zájmu.

Existuje celá řada informací o vysoké metabolické aktivitě čistých mikrobiálních kultur rostoucích v laboratorních médiích s optimální koncentrací polutantu. V přírodním prostředí se nám však jen velmi těžce podaří dodržet všechny laboratorní podmínky pro dosažení této vysoké biochemické aktivity.

Faktory, které v přírodním prostředí mohou významně pozměnit předpokládaný průběh degradace polutantu, mohou být abiotické a biologické.

Abiotické faktory

Z abiotických faktorů má dominantní postavení **teplota prostředí**, ve kterém má probíhat biodegradace. Je známo, že ve velkých hloubkách půdy nebo vody je teplota velmi nízká a biodegradace probíhá jen velmi pomalu nebo neprobíhá vůbec. Totéž platí pro zimní období, kdy je degradace značně zpomalena. Při studiu mikrobiální degradace ropných uhlovodíků bylo zjištěno, že jejich využívání jako zdroje uhlíku a energie se uskutečňuje v širokém teplotním rozmezí. Mezi degradátory ropných uhlovodíků patří psychrofilní, mezofilní i termofilní mikroorganismy. Nízká teplota, jako abiotický faktor, ovlivňuje především fyzikální stav uhlovodíku a tím jeho dostupnost pro mikroorganismy spojenou s poklesem rychlosti biodegradace. Při vyšších teplotách bylo naopak prokázáno, že dochází k vytékání lehkých ropných frakcí, které jsou pro degradátory toxické, což se projeví nejen abiotickým poklesem celkové koncentrace uhlovodíků, ale i zvýšením rychlosti jejich degradace v důsledku zmožení buněk degradátorů.

Rovněž extrémní **alkalita či acidita prostředí** značně zpomaluje degradaci. Přesto bylo prokázáno, že např. biodegradace ropných uhlovodíků může úspěšně probíhat v širokém rozmezí hodnot pH (pH=5-8), avšak rychlost degradace je silně závislá na obsahu kyslíku v prostředí (Hambrick et al., 1980). Ke změnám hodnoty pH prostředí může docházet i v průběhu samotné degradace, což vede ke zpomalení nebo zastavení sanačního procesu.

Významnou úlohu hraje **vlhkost prostředí**, neboť voda je nutná jak pro růst, tak i biochemickou aktivitu mikroorganismů. Vlhkost není limitujícím faktorem pouze ve vodním prostředí. V půdách musí vlhkost dosahovat 30-90% jejich vodní kapacity. Optimální vlhkost půdy záleží na jejich vlastnostech, na degradované organické látce a na tom, zda bude probíhat aerobní či anaerobní degradace. Vysoká půdní vlhkost významně snižuje **obsah vzduchu** v půdě. V zamokřených půdách pak probíhají pouze anaerobní procesy a pro aerobní degradaci jsou takovéto půdy nevhodné. Na druhé straně enormní pokles vlhkosti půdy může vést k snížení rychlosti nebo zastavení biodegradace.

Rychlost biodegradace může být snížena nebo zcela inhibována zvýšenou **salinitou půdy**. Rovněž při degradaci ropných uhlovodíků bylo zjištěno, že se vzrůstající salinitou prostředí (3,3-28,4%) klesá rychlost jejich degradace. V oceánech byla však popsána celá řada halotolerantních degradátorů organických polutantů.

Vysoký **hydrostatický tlak** u dna oceánů v kombinaci s **nízkou teplotou** způsobují snížení metabolické aktivity mikroorganismů a zpomalení biodegradace s následnou perzistencí kontaminujících organických látek. Tyto závěry potvrzuje zjištění, že ropné

frakce, klesající během těžby ke dnu oceánů, jsou prakticky nedegradovatelné ve spojení tlaku a velmi nízké teploty.

Všechny tyto abiotické faktory mohou limitovat biodegradaci polutantu. Jejich optimalizace v průběhu cílené degradace v přirozeném prostředí není prakticky možná ani ekonomicky únosná. I přes vyšší finanční náklady je však v průběhu praktických sanací vhodné sledování hodnot limitujících abiotických faktorů, což umožní odvrácení degradačně nepříznivých abiotických podmínek vedoucích k perzistenci polutantu. Nepříznivý účinek abiotických faktorů může být eliminován využíváním zvláštních sanačních technologií v uzavřených prostorách (kryté sanační haly, nádrže) nebo v bioreaktorech.

Živiny v procesu biodegradace

K růstu heterotrofních bakterií a hub jsou vyžadovány vedle zdroje uhlíku a energie (organické látky) také jiné prvky a akceptory elektronů. Akceptorem vodíku a elektronů pro aerobní mikroorganismy je kyslík, akceptorem vodíku a elektronů pro anaerobní způsob oxidace organického polutantu může být nitrát, sulfát, CO₂, železité ionty nebo organické sloučeniny. Některé bakterie a houby vyžadují mimoto specifické růstové faktory, zejména aminokyseliny, vitamíny skupiny B, vitamíny rozpustné v tucích nebo jiné organické molekuly. Nedostatek těchto látek v prostředí brání růstu mikroorganismů a snižuje rychlost biodegradace organické uhlíkaté látky. Růst mikroorganismů musí být často stimulován přidávkou anorganických sloučenin dusíku a fosforu zejména v prostředích, kde je těchto prvků nedostatek (mořská nebo spodní voda). Např. k dosažení maximální rychlosti degradace ropu (Kuwait) v mořské vodě (kontaminace 70 mg/l) je zapotřebí obohacení prostředí fosfátem (0,6 mg/l) a dusičnanem amonným (3,2 mg/l) (Bridie a Bos, 1971). Jako zdroj dusíku a fosforu mohou být využívány i složky samotného organického polutantu. Přidávky těchto prvků nebývají nutné při degradaci nízkých koncentrací organických látek v povrchových půdách. Přesto bývá obohacení půdy dusíkatými látkami a sloučeninami fosforu požíváno a slouží k počátečnímu zrychlení degradace organických polutantů. Dynamika množení a odumírání buněk, jejich konzumace predátory a parazity, vede za přirozených podmínek ke koloběhu těchto látek v prostředí a směřuje k navození rovnováhy vedoucí k cílené degradaci polutantu.

Synergismus

Degradace některých látek vyžaduje spolupráci více mikrobiálních druhů. Tyto interakce mohou být nejen velmi důležité pro nastartování biodegradčního procesu, ale i pro průběh cílené transformace či úplné mineralizace polutantu. Tato vzájemná spolupráce několika mikroorganismů na přeměně organické látky je označována jako **synergismus**. Na synergismu se obvykle podílejí mikroorganismy, které nemohou samostatně uskutečnit přeměnu či degradaci polutantu. Synergismus směřuje i ke zvýšení rychlosti cílené přeměny organického substrátu. Příkladem synergismu v degradaci ropných látek může být konzorcium RC1, které je tvořeno *Pseudomonas putida* a *Geotrichum candidum*. Mineralizace ropných látek po aplikaci RC1 probíhá vysokou rychlostí, ačkoliv aktivita jednotlivých kmenů je velmi slabá. Toto konzorcium může rovněž degradovat polyaromatické uhlovodíky je-li rozšířeno o kvasinku *Yarrowia lipolytica* (Horáková a Němec, 1994). Ou a Sikka (1977) popsali směs *Pseudomonas* a *Arthrobacter*, schopnou degradovat herbicid Silvex. Jednotlivé mikroorganismy tento herbicid nemohou degradovat.

Pro objasnění synergismu bylo navrženo několik hypotéz, které se ovšem jen velmi těžko potvrzují:

- Jeden mikroorganismus zahajuje degradaci organické látky tím, že ji využívá jako růstový substrát, druhý mikroorganismus mineralizuje vznikající produkt, který je pro

něj růstovým substrátem a nemůže být využíván prvním mikroorganizmem. Tento mechanismus bývá označován jako „ping-pong“ a byl popsán u konsorcia RC1 při degradaci ropných uhlovodíků (Horáková a Němec, 2000),

- jeden mikroorganismus produkuje růstové faktory zajišťující růst degradátora,
- první mikroorganismus pouze transformuje nebo kometabolizuje organickou látku a druhý mikroorganismus využívá produkt jako růstový substrát a dokončuje mineralizaci,
- první mikroorganismus transformuje organickou látku na toxický produkt, který dále nemůže destruovat. Druhý kmen rychle tento metabolit detoxifikuje a umožňuje urychlení degradační reakce nebo sám tento toxický produkt využívá jako zdroj uhlíku.

Za synergické reakce jsou často zodpovědné růstové faktory a to zejména vitamíny ze skupiny B a aminokyseliny. V přírodě jsou tyto synergické reakce velmi složité a nedetekovatelné, neboť do nich vstupuje více mikroorganismů. Proto objasnění podstaty synergizmu se věnují především laboratorní studie s čistými mikrobiálními kulturami v definovaných mediích. Vztah koexistence dvou mikroorganismů je často označován jako **syntrofie**. K laboratornímu studiu syntrofie bývají využíváni auxotrofní mutanti degradátora. Příkladem může být degradace dodecyltrimetylamonium bromidu auxotrofním izolátem *Xanthomonas*, který však roste jen v přítomnosti kmene *Pseudomonas*, neboť tento mikroorganismus vylučuje do prostředí růstový faktor pro tohoto auxotrofa (Dean-Raymond a Alexander, 1977). Synergické a syntrofické reakce probíhají v přírodě spontánně, neboť prostředí je osídleno značným počtem mikroorganismů s různou metabolickou aktivitou.

Podíl predace na výsledcích biodegradace

V půdě, sedimentech, povrchových i spodních vodách se setkáváme s predátory a parazity, kteří mohou ovlivnit mikrobiální osídlení přirozeného prostředí a významnou měrou ovlivnit výsledek cílené bioremediace. Patří mezi ně protozoa, bakteriofágy, viry napadající houby a organizmy, které sekretují enzymy narušující buněčnou stěnu hub a bakterií, čímž vyvolávají jejich lyzi. Vliv predace není považován za příliš závažný, neboť ve většině prostředí jsou protozoa jen ve velmi nízkém počtu a počet mikroorganismů dosahuje hodnoty 10^6 - 10^7 buněk v 1cm^3 . Přesto je nutné brát v úvahu skutečnost, že k rozdělení jednoho protozoa je zapotřebí 10^3 – 10^4 bakteriálních buněk. Na druhé straně mohou protozoa napomáhat v koloběhu dusíku a fosforu a exkretovat některé růstové faktory využitelné pro růst degradátorů..

Podíl vyšších rostlin na biodegradaci

Půda je protkána kořenovým systémem vyšších rostlin. Např. kořenový systém pšenice může dosahovat délky přes 200 m a jeho plocha zaujímá až 6 m^2 . Samotný kořenový systém je místem značné mikrobiální aktivity a interakcí mezi rostlinou a mikroorganizmy. Míra mikrobiálního osídlení kořenového systému je často vyjadřována poměrem R/S mezi mikroorganizmy (R) a rizosférní půdou (S). Tento poměr dosahuje většinou hodnoty 5-20, ale byly zjištěny i hodnoty $R/S = 100$. Je zřejmé, že mikrobiální osídlení rizosféry do značné míry závisí na rostlině samotné a na jejím fyziologickém stavu. Rovněž bylo prokázáno, že organizmy v rizosféře produkují organické látky (auxiny, látky podobné gibberellinům aj.), které ovlivňují růst kořenového systému rostliny. Kořenový systém osidlují také bakterie, které metabolizují jednoduché organické látky kontinuálně produkované kořeny rostlin. Experimenty potvrdily, že mikroorganizmy osidlující rizosféru jsou rovněž velmi dobrými degradátory různých polutantů. Některé aromatické uhlovodíky jsou velmi rychle degradovány mikroorganizmy osidlujícími rizosféru preriálních trav. V rizosféře je stimulována biodegradace trichloretylénu. Remediační technologie, které využívají

k odstranění kontaminace půdy vyšších rostlin, jsou označovány jako **fytoremediace**. V procesu fytoremediace je velmi často diskutován význam samotných rostlin nebo jejich kořenových exkretů. K hodnocení degradační aktivity rostlin slouží většinou optimalizované skleníkové experimenty. V přirozených podmínkách využití rostlin často brání i vysoká koncentrace a fytotoxicita polutantu. Z tohoto důvodu bývá fytoremediace aplikována až k „dočištění“ lokality po cílené degradaci mikrobiologické. Přesto v případech, kde toxicita polutantu neohrožuje růst rostlin, kontaminace nesahá do velkých hloubek a sanace lokality není časově limitována, může být s výhodou velmi nízkých nákladů využita fytoremediace. Nejčastěji se využívá zatravnění kontaminované plochy odolnými trávami, jako je např. jílek (*Lolium perenne*).

Aerobní a anaerobní procesy biodegradace

Celá řada polutantů může být degradována aerobními mikroorganismy. Aerobní proces biodegradace byl prostudován zejména při studiu degradace ropných uhlovodíků. Význam kyslíku v těchto procesech je dán degradačními drahami, které jsou závislé na přítomnosti kyslíku, neboť využívají k primární oxidaci nasycených a aromatických uhlovodíků specifické enzymy, oxygenázy. Bylo vypočteno, že 1 g kyslíku může v přítomnosti oxygenáz teoreticky zoxidovat 3,5 g ropy. Rychlost degradace ropných uhlovodíků prudce klesá s nárůstem anaerobiózy. Anaerobní degradace nebyla prokázána např. u benzenu, chlorobenzenu, antracenu, nasycených uhlovodíků a dalších organických látek. Některé tzv. aerobně nedegradovatelné sloučeniny mohou být naopak mikrobiologicky využívány a degradovány za anaerobních podmínek. Nevýhodou anaerobní degradace je poměrně dlouhá doba aklimatizace mikroorganismů k využívání polutantu (několik měsíců), pomalý průběh transformace a hromadění organických produktů, které mohou být často rozloženy pouze aerobně. Za anaerobních podmínek jsou degradovány např. chlorované alkeny a alkeny, fenoly, benzoáty, některé aromatické uhlovodíky, vysoce chlorované PCB, fenol, krezol a další látky. Fermentace domovního odpadu na skládkách vede k tvorbě **skládkových plynů** s vysokým obsahem CO_2 a CH_4 . Při rozkladu 1000 kg domovního odpadu může anaerobními procesy vzniknout až 800 m^3 skládkového plynu. Tento plyn může být u špatně ošetřených skládek akumulován pod povrchem a skládka může v sobě skrývat potenciální nebezpečí výbuchu. Praktická využitelnost skládkového plynu je často omezena přítomností dalších nežádoucích plynů (N_2 a H_2S) a plynných příměsí, jako jsou organická rozpouštědla (až 10 mg/m^3), benzen (až 5 mg/m^3), chlorované (50 mg/m^3) a fluoridové (10 mg/m^3) organické sloučeniny, alkeny (až 100 mg/m^3) a alkeny (až 200 mg/m^3) a popř. další těkavé látky podle typu skládky. Produkce skládkového plynu je nerovnoměrná a po dosažení maxima plynule klesá v rozmezí 5-10 let.

BIODEGRADACE NĚKTERÝCH VÝZNAMNÝCH ORGANICKÝCH POLUTANTŮ

Biodegradace ropy a ropných derivátů v ekosystému

Produkce, skladování a transport uhlovodíků vede velmi často ke kontaminaci půdy a k nutnosti její dekontaminace. Vedle spalování a fyzikálně chemických metod, které jsou relativně finančně nákladné, jsou často používány biologické metody dekontaminace. Pro celou řadu ropných derivátů jsou metody biodegradace nejen ekonomicky výhodné, ale i pro ekosystém zcela přirozené.

Schopnost mikroorganismů štěpit ropné uhlovodíky byla popsána již v r. 1946 (ZoBell, 1946). Autorem byly popsány některé mikroorganismy, které mohou využívat ropné

uhlovodíky jako jediný zdroj uhlíku a energie. ZoBell (1946) však zdůrazňuje, že tato schopnost mikroorganismů štěpit a využívat ropné uhlovodíky je striktně závislá na chemickém složení směsi ropných uhlovodíků a rovněž na podmínkách prostředí.

Surová ropa vznikla dlouhodobým anaerobním rozkladem organického materiálu. Je tvořena extrémně komplexní směsí různých uhlovodíků zahrnující alifatickou frakci, aromatickou frakci a asfaltickou frakci. Uhlovodíky alifatické frakce zahrnují n-alkany, rozvětvené alkany a cykloalkany. Nejrychleji jsou degradovány nasycené ropné uhlovodíky s menším počtem C atomů ($C_{10} - C_{24}$). Byla prokázána rovněž biodegradace n-alkanů se 44 uhlíky. Poměrně nesnadno jsou štěpeny C_4 alkany. Podobně C_5-C_9 alkany jsou sice některými mikroorganismy degradovány, ale pro celou řadu mikroorganismů jsou tyto uhlovodíky silně toxické. Rozvětvené alkany jsou všeobecně hůře využívány, nežli alkany lineární, ale naopak jsou snadněji degradovatelné ve srovnání s alkany cyklickými. Obzvláště metylace alkanů vede ke zvýšení jejich rezistence k biologickému útoku.

Lehká ropa obsahuje 10-40% lehce degradovatelných alkanů a okolo 2-20% lehkých aromatických uhlovodíků. Těžká ropa může obsahovat méně než 1% odbouratelných alkanů alifatických a méně než 2% lehkých aromatických uhlovodíků. Všeobecně se vzrůstající molekulovou hmotností a komplexností aromatických uhlovodíků se snižuje potenciální pravděpodobnost jejich biodegradace. Tedy degradační rychlost polyaromátů je nižší, nežli degradační rychlost monoaromátů. Aromáty s pěti a více kruhy jsou prakticky nedegradovatelné a mohou perzistovat po neomezenou dobu v prostředí. V lehké ropě je obsaženo kolem 2-10% těchto vysokomolekulárních polyaromátů, v těžké ropě až 35%. Je nasnadě, že tyto látky vzhledem ke značné odolnosti vůči fyzikální a biologické degradaci zůstávají nepříjemným zbytkovým polutantem čištěného prostředí.

V našich podmínkách se poměrně zřídka setkáváme s asfaltickou složkou surové ropy a s ropnými pryskyřicemi. Asfaltická složka surové ropy obsahuje sloučeniny, které jsou biologicky buď zcela nedegradovatelné nebo jsou využívány jen velmi pomalu. Rovněž ropné pryskyřice podléhají velmi omezené mikrobiální degradaci a to jen v případě, že nejsou vysoce kondenzované. Lehká ropa obsahuje 1-5% asfaltických látek a ropných pryskyřic, těžká ropa může obsahovat až 25% asfaltických látek a 20% ropných pryskyřic.

Lze tedy říci, že vysoká rychlost biodegradace bude typická pouze pro nasycené uhlovodíky a lehké aromatické uhlovodíky. Extrémně nízkou rychlostí budou naopak degradovány vysokomolekulární aromáty, asfaltické uhlovodíky a pryskyřice. Pouze Leahy a Colwell (1990) pozorovali degradaci asfaltických uhlovodíků a ropných pryskyřic v procesu kooxidace probíhající v přítomnosti dalšího lehce odbouratelného uhlovodíku. Degradační rychlost i v tomto případě byla závislá na celé řadě dalších faktorů a nelze tedy tyto výsledky zobecňovat.

Celkově můžeme říci, že žádná surová ropa není zcela degradována. Práce, které prezentují úplnou degradaci lehké ropy nebo 50% degradaci těžké ropy v týdnech nebo dokonce ve dnech, jsou více než podezřelé.

Na procesech biologické degradace ropných látek se podílí více než 70 rodů mikroorganismů. Většina těchto rodů je všeobecně rozšířena. Půdní a vodní ekosystémy, které nejsou kontaminovány ropnými uhlovodíky, obsahují však jen velmi nízké procento degradátorů ropných uhlovodíků. Naopak bylo prokázáno, že v prostředí, které je ropnými uhlovodíky kontaminováno, procentuální zastoupení mikroorganismů degradujících ropu prudce stoupá, i když žádný z izolovaných mikroorganismů není schopen degradovat všechny složky ropy (Lee a Levy, 1989).

Na biodegradaci ropy a ropných produktů se podílí více než 100 druhů mikroorganismů náležejícím ke 30 mikrobiálním rodům. Jejich zastoupení v jednotlivých kontaminovaných lokalitách je velmi variabilní v závislosti na podmínkách prostředí. Mezi nejvýznamnější degradátory ropy a ropných látek patří zástupci rodů *Pseudomonas*, *Achromobacter*,

Arthrobacter, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Candida*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Ve vodním prostředí jsou hlavními degradátory bakterie a kvasinky. V kontaminovaných půdách se na biodegradaci ropných látek velmi výrazně podílejí rovněž některé houby, např. zástupci rodu *Penicillium* a *Cunninghamella*, které jsou obvykle lepšími degradátory ropných uhlovodíků v půdě nežli např. zástupci bakteriálních rodů *Flavobacterium*, *Brevibacterium* nebo *Arthrobacter*.

Lze tedy shrnout, že mikroorganismy degradující ropné uhlovodíky jsou prakticky všeobecně rozšířeny. Můžeme se s nimi setkat ve všech typech povrchových vod a v půdě. Co se týká jejich četnosti v jednotlivých systémech, setkáváme se v literatuře s velkými diferencemi, neboť stanovení počtu těchto degradujících mikroorganismů v dané lokalitě je metodologicky často velmi odlišné. S jistotou lze však říci, že po kontaminaci prostředí ropnými uhlovodíky prudce stoupá počet degradujících mikroorganismů.

Faktory, které ovlivňují růst a enzymatickou aktivitu mikroorganismů současně ovlivňují i rychlost biodegradace ropných uhlovodíků. Perzistence ropných polutantů závisí také na kvantitě a kvalitě směsi ropných uhlovodíků a na vlastnostech samotného kontaminovaného ekosystému. V jednom prostředí mohou ropné uhlovodíky perzistovat, zatímco v jiném prostředí mohou být tytéž uhlovodíky degradovány v relativně krátkém časovém období.

Významným faktorem, který se podílí na rychlosti biodegradace, je fyzikální stav ropného uhlovodíku. Ropné uhlovodíky jsou všeobecně málo rozpustné ve vodě a jejich rozpustnost klesá se snižující se teplotou prostředí a vzrůstající viskozitou. Z tohoto důvodu dochází ve vodném prostředí při nižších teplotách k biodegradaci ropných uhlovodíků nejčastěji na rozhraní vodní a uhlovodíkové fáze a biodegradace ropných uhlovodíků v půdě probíhá jen velmi obtížně. Rychlost biodegradace může být zvýšena aplikací různých detergentů, které však svou toxicitou často ohrožují celý ekosystém.

Většina mikroorganismů degradujících ropné uhlovodíky produkuje emulzifikační látky. Produkce těchto "bioemulgátorů" byla studována např. u některých zástupců rodu *Arthrobacter*, *Pseudomonas* a *Corynebacterium*. Tyto látky jsou produkovány pouze buňkami rostoucími na uhlovodíku a jsou velmi často tvořeny mastnými kyselinami nebo jejich deriváty. Byly detekovány i bioemulgátory o velmi komplexní polymerní struktuře. Dosud není objasněno, proč některé bakteriální kmeny, ačkoli jsou velmi dobrými producenty bioemulgátorů ropných uhlovodíků, tyto uhlovodíky nedegradují.

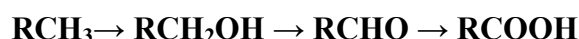
Biodegradace ropných uhlovodíků se může uskutečňovat ve velmi širokém teplotním rozmezí. Degradátory ropných látek lze detekovat mezi psychrofilními, mezofilními i termofilními mikroorganismy. Při nízkých teplotách může být rychlost biodegradace limitována lehkými těkavými uhlovodíky, které jsou pro celou řadu mikrobiálních degradátorů toxické, a které při vyšších teplotách z kontaminovaného systému rychle vyvětrávají. Nižší teploty jsou vhodné zejména pro degradaci parafinové frakce surové ropy, přičemž významnou roli v této nízkoteplotní biodegradaci hrají procesy kometabolismu.

Velmi spornou je otázka potřeby živin pro zajištění dostatečné rychlosti biodegradace ropných uhlovodíků. Z dosavadních poznatků je zřejmé, že v procesu této biodegradace musí být dodržován určitý poměr mezi uhlíkem obsaženým v degradovaném uhlovodíku a dusíkem resp. fosforem v okolním prostředí. Koncentrace dusíku a fosforu v prostředí se tedy odvozuje od koncentrace uhlovodíku samotného. V mořské prostředí je za optimální poměr mezi C:N nejčastěji považován poměr 10:1, pro C:P pak 100:1. V půdě je pak poměr mezi C:N volen 60:1 a C:P = 800:1. Studií, které se zabývají problémem obohacení kontaminovaného prostředí živinami nebo různými lipofilními „fertilizátory“ je celá řada. Výsledky všech prací jednoznačně hovoří pro nutnost přidání těchto živin do prostředí, neboť jen touto cestou je možné dosáhnout výrazného zrychlení biodegradčního procesu.

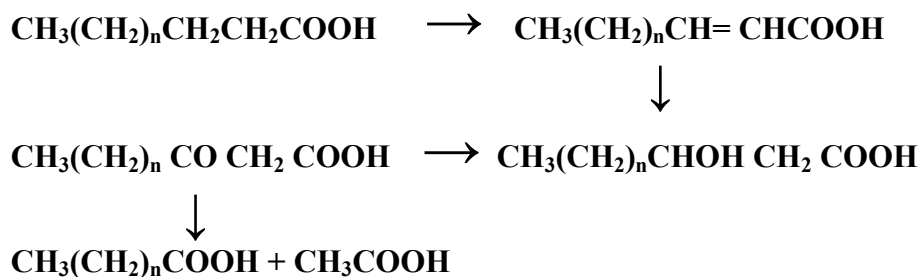
Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje rychlost biodegradace ropných uhlovodíků je kyslík. Ropné uhlovodíky mohou být degradovány rovněž anaerobně, ale pouze za předpokladu, že nitrát nebo sulfát slouží jako akceptor elektronů. V každém případě je rychlost anaerobní degradace ropných uhlovodíků podstatně nižší v porovnání s aerobním procesem mikrobiálního rozkladu. Teoreticky může být 1 g kyslíku zoxidováno 3,5 g surové ropy, jestliže jsou mikroorganismy vybaveny oxygenázami, které umožňují přímou oxidaci uhlovodíků.

Biodegradace uhlovodíků

Biodegradace n-alkanů probíhá nejčastěji **monoterminální oxidací** alifatického řetězce za vzniku primárního alkoholu, který je následně přeměňován na aldehyd a monokarbonovou kyselinu.



Vznikající mastná kyselina je dále oxidována v procesu **β -oxidace**, který vyžaduje energii ve formě ATP a přítomnost KoA. β -oxidace může probíhat podle následujícího schématu :

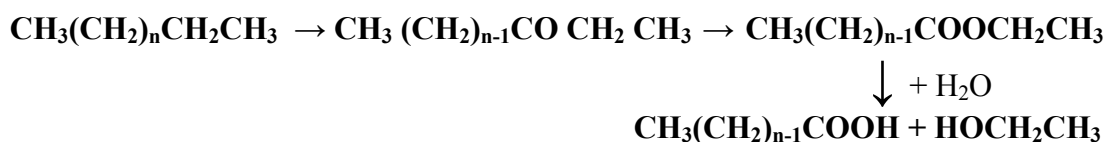


Tento způsob oxidace n-alkanů byl popsán např. u *Pseudomonas oleovorans*. Aerobní biodegradace n-oktanu byla popsána Willsem a Stephensem (Universita Minnesota) a je uvedena v databázi degradačních drah <http://www.labmed.umn.edu>. *Pseudomonas oleovorans* oxiduje n-oktan enzymem alkan 1-monooxygenázou na 1-oktanol. Tento mikroorganismus nese OCT-plazmid, který obsahuje dva operony, *alkBFGHJKL* a *alkST*. Tyto operony kodují všechny proteiny, které jsou nutné k degradaci n-oktanu. Přeměna n-oktanu na 1-oktanol je katalyzována skupinou proteinů označovaných jako „alkan hydroxylázový systém“. Tento systém obsahuje alkan monooxygenázu, rubredoxin a rubredoxin reduktázu. Rubredoxin reduktáza přenáší elektrony z NADH na rubredoxin, který přenáší pak elektrony na alkan 1-monooxygenázu, lokalizovanou v cytoplazmatické membráně. Konečným produktem dráhy oxidace n-oktanolu je oktanoyl-KoA, který vstupuje do beta-oxidačního cyklu (viz výše).

U jiných mikroorganismů byla detekována **diterminální oxidace** alifatických uhlovodíků (*Corynebacterium* sp.).

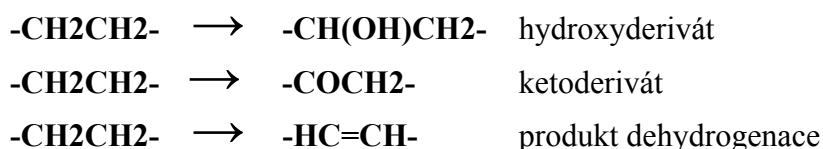


Mnohé mikroorganismy využívají jako sekundární dráhu pro oxidaci n-alkanů tzv. **subterminální oxidace**. Výsledkem této oxidace je tvorba sekundárních alkoholů a následně ketonů, které jsou substrátem pro monooxygenázové reakce. Produktem je ester, který se enzymaticky katalyzovanou hydrolýzou štěpí na alkohol a mastnou kyselinu. Další degradace těchto produktů je obdobná jako u produktů terminální oxidace.

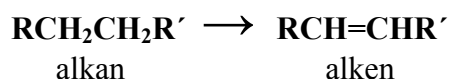


Dlouhé řetězce n-alkanů jsou asimilovány lépe nežli krátké řetězce. Bylo rovněž prokázáno, že řetězce kratší než n-nonan mohou být mikrobiálně oxidovány, ale obvykle nejsou asimilovány. Zejména alkany C₁₀-C₁₈ stimulují růst mikroorganismů. Alkany s velmi krátkými řetězci snižují životaschopnost degradující populace, neboť narušují strukturu cytoplazmatické membrány buněk.

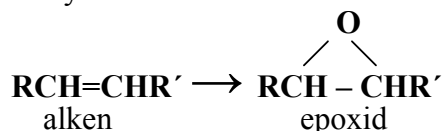
Vysoce rozvětvené izoprenoidní alkany, jako je např. pristan (2,6,10,14-tetrametylpentadekan) podléhají většinou diterminální oxidaci za tvorby dikarbonových kyselin. Oxidace pristanu byla popsána např. u *Brevibacterium erythrogenes* (Pirnik a kol., 1974), *Corynebacterium* sp. (McKenna a Kallio, 1971), *Nocardia globerula* 432 (Alvarez a kol., 2001) aj. Aerobní biodegradace pristanu je však velmi pomalá a bývá inhibována terminálním rozvětvením uhlovodíku. Rovněž **cykloalkany** jsou částečně odolné vůči mikrobiálnímu ataku. Často však mohou podléhat oxidaci za vzniku hydroxy- a ketoderivátů nebo mohou být dehydrogenovány :



Mikrobiální transformace alkenů a jiných sloučenin s dvojnou vazbou. Některé mikroorganismy mohou za určitých podmínek dehydrogenovat alkany na pozicích vzdálených od konce molekuly. V půdě byla pozorována přeměna nasyceného uhlovodíku eikosanu C₂₀H₄₂ na eikos-9-en. Podobně při anaerobní degradaci n-heptanu vznikal 1-hepten. Všeobecně lze tuto reakci uvádět jako :

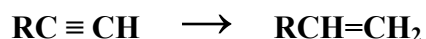


Některé sloučeniny s dvojnou vazbou (podobně jako alkeny) mohou být biologicky transformovány na epoxidy:



Známým příkladem takové přeměny je mikrobiální transformace aldrinu na dieldrin a heptachloru na heptachlorepoxid. Epoxidy pak dlouhodobě perzistují v kontaminovaném prostředí.

Mikrobiální transformace alkynů a jiných látek s trojnou vazbou. Mikroorganismy většinou redukují sloučeniny s trojnou vazbou podle schematu :



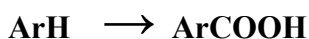
Bylo prokázáno, že bakterie produkující nitrogenázu (bakterie fixující vzdušný dusík) mohou redukovat acetylen na etylen.

Biodegradace aromatických uhlovodíků. Aromatické sloučeniny jsou termodynamicky velmi stabilní. Přesto mohou podléhat biodegradaci. Jejich rozložitelnost je však často omezoována různými substituenty, zejména chlorací a metylací. Biodegradace aromatických uhlovodíků vyžaduje často přítomnost další lehce degradovatelné sloučeniny, popř. přítomnost akceptorů elektronů.

U monocyklických uhlovodíků dochází v průběhu působení některých mikroorganismů k redukci a snížení počtu dvojných vazeb benzenového jádra. Typickým příkladem je vznik cyklohexenu z benzenu. Za aerobních podmínek byl prokázán vznik katecholu z benzenu. Primárním enzymem v této reakci je benzen-1,2-dioxygenáza. Tento enzym dává vznik cis-dihydrobenzendiolu, který je dehydrogenován na katechol. Enzym katechol-2,3-dioxygenáza katalyzuje pak rozevření benzenového kruhu za vzniku semialdehydu kyseliny 2-hydroxymukonové. K rozštěpení benzenového jádra dochází i v průběhu anaerobní degradace kyseliny benzoové fototrofní bakterií *Rhodopseudomonas palustris* a dvěma denitrifikujícími druhy *Thauera aromatica* a *Azoarcus evansii*.

Množství informací existuje o drahách, intermediátech a enzimech, které se podílejí na rozštěpení monocyklické aromatické sloučeniny.

Za aerobních i anaerobních podmínek byla pozorována rovněž karboxylace monocyklických aromatických uhlovodíků podle schématu :



Lehké aromatické uhlovodíky se v přírodě většinou rychle vypařují a jejich degradace může probíhat jen tehdy jsou-li v roztoku. Vedle intensivně studovaných katabolických procesů vedoucích k degradaci aromatických sloučenin byl prokázán i značný podíl kometabolických přeměn na jejich přirozené degradaci.

Kondenzované aromatické uhlovodíky (polyaromatické uhlovodíky, PAHs) jsou velmi odolné k mikrobiálnímu ataku. Přesto mohou být biologicky degradovány za vzniku nejrůznějších produktů, jejichž chemické složení je odlišné nejen v závislosti na struktuře substrátu, ale i podle typu degradujícího mikroorganismu. Degradční dráhy celé řady polyaromatických uhlovodíků byly již zmapovány. Jako modelový substrát pro studii metabolismu karcinogenních polyaromatických uhlovodíků byl zvolen fenantren. Bylo zjištěno, že tento tricyklický aromatický uhlovodík není sice mutagenní ani karcinogenní, ale přesto působí toxicky na celou řadu živočichů. Fenantren může být degradován některými půdními bakteriemi tzv. naftalenovou dráhou na salicylát, který je dále metabolizován tzv. ftalátovou dráhou. Byla rovněž prokázána jeho detoxikace některými houbami (*Phanerochaete chrysosporium*).

Mikrobiální transformace karboxylových kyselin a alkoholů

Řada herbicidů je tvořena aromatickými kyselinami, které podléhají mikrobiální transformaci cestou jejich enzymatické dekarboxylace nebo redukce. V prostředí se pak hromadí jejich dekarboxylované produkty. Podobně lineární mastné kyseliny mohou být za anaerobních podmínek redukovány na odpovídající aldehydy či alkoholy. Během oxidace alkanů, kdy vznikají jak mastné kyseliny tak i alkoholy, můžeme za určitých podmínek pozorovat vznik esterů .

Metylace a tvorba éterů

Hydroxylové skupiny některých kontaminujících látek (alifatických i aromatických) mohou podléhat mikrobiální O-metylaci za vzniku metoxyderivátů. Tento typ reakce je častý při kontaminaci prostředí chlorovanými fenoly. Metylovaný produkt je označován jako anisol. Konkrétní pozorování byla provedena v průběhu degradace 2,3,4,6-tetrachlorofenolu. Jako produkt mikrobiální transformace byl detekován 2,3,4,6-tetrachloroanisol.

V půdě kontaminované 2,4,6-trichlorofenolem však nebyl detekován odpovídající anisol, ale 2,4,6-trichlorofenyletyléter. Většina éterů je odolná k mikrobiální degradaci. Přesto bylo prokázáno, že některé étery mohou být mikrobiologicky štěpeny. Jedná se zejména o některé surfaktanty a polyetylenyglykoly s éterickou vazbou.

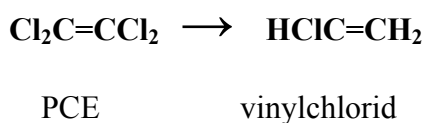
Halogenované sloučeniny

Halogenované alkany a alkeny mohou být v anaerobním prostředí reduktivně dehalogenovány. Anaerobní mikroorganismy většinou nahrazují atom halogenu atomem vodíku a v případě vyššího stupně halogenace (např. chlorace) může proces dehalogenace uhlovodíku probíhat v několika stupních. Tento postupný proces dehalogenace si můžeme znázornit na vysoce chlorovaném uhlovodíku- tetrachlormetanu :



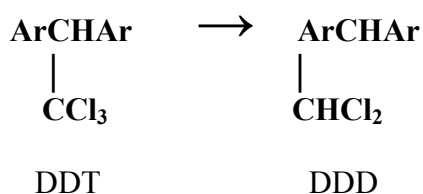
Vznikající dichlormetan je vysoce těkavá sloučenina, která jako taková má široké průmyslové využití. Patří mezi potenciální karcinogeny. Dichlormetan může být využíván aerobními i anaerobními metylotrofními bakteriemi jako zdroj uhlíku a energie (*Methylophilus* sp., *Pseudomonas* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Methylobacterium* sp.). Během degradace dichlormetanu vzniká formaldehyd a anorganický chlorid. Primárním enzymem této přeměny je dichlormetandehalogenáza.

Nenasycené halogenované uhlovodíky (např. tetra- a trichloretylen) jsou nejčastěji štěpeny anaerobně (*Dehalococcoides ethenogenes*, *Sporomusa ovata* aj.). V průběhu reduktivní dehalogenace tetrachloretylenu, označovaného průmyslově jako perchloretylen, (PCE), vzniká potenciální karcinogen, vinylchlorid:



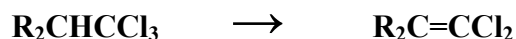
Pro degradaci trichloretylenu byla popsána rovněž aerobní dráha jeho degradace (*Mythylosinus trichosporium*, *Burholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*). Jako primární enzymy této dráhy vystupují metanmooxygenáza, toluenmooxygenáza nebo toluen dioxygenáza.

Reduktivní dehalogenace byla popsána rovněž při transformaci DDT. Primárním produktem této reduktivní dehalogenace je DDD, který může být detekován v kontaminovaném prostředí.



Některé halogenované sloučeniny podléhají mikrobiální hydrolytické dehalogenaci, během které je halogen v aromatické nebo jiné molekule nahrazen skupinou OH. Byly popsány i dehalogenace substrátů za současného odstranění vodíku (dehydrodehalogenace). Reakce tohoto typu probíhají nejčastěji v kontaminovaných půdách a v odpadních vodách.

dehydrodehalogenace



V průběhu mikrobiální transformace halogenovaných sloučenin byly často detekovány metyldiioderiváty původních halogenovaných sloučenin nebo produkty migrace halogenů v původní halogenované sloučenině .

Polychlorované bifenyly (PCBs)

Tyto látky jsou velmi perzistentní, mohou se akumulovat v přírodě a závažně ohrožovat zdraví člověka i zvířat. Mají značnou odolnost nejen k mikrobiálnímu ataku, ale i vůči teplu a chemickému rozkladu. Jsou silně hydrofóbní a proto se akumulují zejména v půdě a ve vodních sedimentech. PCBs jsou tvořeny směsí sloučenin (kongenerů). Obsahují bifenylové jádro s různým stupněm chlorace. V přírodě se nejčastěji akumulují PCB se třemi nebo více atomy chloru. Významnou roli v degradaci bifenyly hraje enzym bifenyl 2,3-dioxygenáza, která katalyzuje první stupeň jeho degradace. Degradace bifenyly byla popsána u *Pseudomonas* sp. LB400. Existuje celá řada prací, která prokazuje přirozenou schopnost bakterií degradovat PCBs. Některé experimenty prokázaly, že pro určité mikroorganismy je bifenyl nebo monochlorbifenyl růstovým substrátem. Přesto tyto mikroorganismy rostou lépe na běžných zdrojích uhlíku, takže jakékoliv znečištění prostředí organickou hmotou nepříznivě ovlivňuje degradaci této chlorované sloučeniny.

V sedimentech byla popsána rovněž anaerobní degradace PCBs cestou tzv. reduktivní dechlorace. Anaerobní dechlorace byla uskutečňována metanogenním konzorciem. Na základě četných pozorování a neúspěšných pokusů o degradaci PCBs byly identifikovány primární faktory ovlivňující degradaci těchto látek v prostředí. Jsou to :

- Stupeň chlorace – všeobecně PCBs s 5 a více atomy chloru jsou odolnější, nežli nižší kongenery.
- Rozpustnost a biologická dosažitelnost. Tento problém bývá sanačně řešen využitím bioreaktorů. Problém dosažitelnosti může umocňovat kontaminace ropou nebo jinými organickými polutanty.
- Neschopnost bakterií využívat PCBs (s výjimkou monochlorbifenyly) jako růstové substráty.
- Teplota a vlhkost prostředí.

BIOREMEDIACE TĚŽKÝCH KOVŮ

Neúplný d-orbital těžkých kovů umožňuje tvorbu komplexních sloučenin, které mohou nebo nemusí být redoxně aktivní. Těžké kovy mohou uvnitř buněk všech organismů tvořit nespecifické sloučeniny, které mohou významně ovlivňovat jejich metabolismus. Je tedy nutné účinně odstraňovat těžké kovy z prostředí pro ochranu všech živých organismů. Těžké kovy nejsou biodegradovatelné a stávají se perzistentní složkou zejména půdního prostředí. Těžké kovy lze však účinně odstraňovat z vodního prostředí, především z odpadních průmyslových vod. Nejčastěji se používají konvenční metody, mezi které patří

např. precipitace, chemická oxidace, chemická redukce, filtrace, elektrochemické čištění, odpařování a adsorpce (adsorpce na aktivní uhlí, rašelinu, zeolit, jííl apod.) .Tyto metody mají i nevýhody, neboť v případech, kdy kovy jsou v roztoku v koncentraci 1-100 mg/l, může docházet k neúplnému odstranění kovů. Metody jsou často energeticky náročné a v některých případech vzniká toxický kal, se kterým je nutné nakládat jako s nebezpečným odpadem. Možnosti biologického odstraňování těžkých kovů byly poprvé prokázány na rašelině. Velké naděje byly rovněž vkládány do účinné fytořemediace, tedy do využití vyšších rostlin v procesu bioremediace. Kapacity fytořemediačních metod se však ukázaly jako nedostatečné. V té době vznikla myšlenka odstraňovat těžké kovy s využitím mikrobiálních buněk.

Bioakumulace a biosorpce

Projekt odstraňování těžkých kovů s využitím mikroorganismů se soustředil na studium rezistence mikroorganismů k těžkým kovům (přirozené i indukované). Na základě výzkumu bylo prokázáno, že živé rezistentní mikroorganismy mohou aktivně akumulovat těžké kovy a tento proces byl označen jako **bioakumulace**. Jedná se o proces, který je závislý na metabolické aktivitě buněk schopných přežít v prostředí s vysokou koncentrací kovů nebo akumulovat vysoké koncentrace kovu, aniž by byla ovlivněna jejich životaschopnost.

Tabulka 7. Příklady akumulace některých těžkých kovů (podle Gadd, 1992)

Mikroorganismus	Prvek	Procento sušiny
<i>Zoogloea</i> sp.	Co	25
	Ni	13
<i>Citrobacter</i> sp	Cd	170
	U	900
<i>Bacillus</i> sp.	Cu	15
	Zn	14
<i>Chlorella vulgaris</i>	Au	10
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Pb	10
	Ag	5,4
	Hg	5,8
<i>Aspergillus niger</i>	Th	19

Predikce efektivity bioakumulace po aplikaci živých mikroorganismů např. do přirozeného vodního prostředí s velmi odlišnými fyzikálně-chemickými parametry byla však často velmi obtížná. Z tohoto důvodu se výzkum zaměřil na mikroorganismy, které mohly odstranit kovy z prostředí bez využívání speciálních metabolických procesů . Většinou byly testovány vnější složky buněk, které nejsou závislé na jejich metabolické aktivitě a mají známé chemické složení. Takovou známou strukturou mikrobiální buňky je její vnější obal, tedy buněčná stěna. Pro tzv. pasivní fyzikálně-chemickou sorpci různých kovů a jejich iontových forem na zvláštní „aktivní místa“ specifických molekulárních struktur buněčné stěny byl zvolen termín **bioadsorpce** nebo jednoduše **biosorpce**. Od roku 1986 je biosorpce považována za jednu z nových technologií pro odstraňování těžkých kovů z kontaminovaného prostředí. Procesy biosorpce jsou studovány z hlediska:

a) výzkumu sorpčního potenciálu přirozeně se vyskytující biomasy,

- b) uměle navozené změny biosorbentů získaných z přirozených materiálů,
- c) vysvětlení mechanismů biosorpce těžkých kovů,
- d) porovnání účinnosti biosorpce s adsorpcí uskutečňovanou na iontoměničích,
- e) možnosti komerčního využití sorpčního potenciálu biomasy.

Biosorpční metody jsou nejčastěji využívány k čištění kontaminovaných vod s nízkou koncentrací kovu, kdy se nevyplácí využití selektivních sorbentů pro nahromadění některého kovu či pro jeho izolaci ze směsi kovů. Proces biosorpce byl studován u řady mikroorganismů. Nejvhodnějším sorpčním materiálem je biomasa hub a kvasinek. Výborné biosorpční vlastnosti vykazují rody *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Streptovercillum* a *Saccharomyces*. Mezi bakteriemi vykazuje vysoký sorpční potenciál *Bacillus* sp., který je součástí řady komerčních biosorpčních preparátů. Existují také studie biosorpce kovů zástupci rodů *Pseudomonas*, *Zoogloea* a *Streptomyces*. Mezi velmi dobré kandidáty pro využití k biosorpci patří i mořské fotoautotrofní mikroorganismy jejichž sorpční aktivita je srovnatelná se zelenými řasami rodu *Chlorella*.

Biosorpční izoterma

Účinnost vazby kovu na biomasu lze stanovit výpočtem z experimentální biosorpční izotermy. Jedná se o jednoduchou metodu prováděnou v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml se známým objemem vody (V) kontaminované známou koncentrací kovu (C_i). Do tohoto systému je přidána biomasa (M) a vzorky jsou umístěny na třepačku a třepány po dobu, která je nutná k dosažení sorpční rovnováhy. Obsah každého vzorku je filtrován a filtrát je analyzován na konečnou/zbytkovou/rovnovážnou koncentraci kovu (C_f). Z dosažených hodnot je vypočtena schopnost biomasy vázat kov (U). Hodnota U je vyjádřena v miligramech vyvázaného kovu jedním gramem biomasy. Výpočet se provádí ze vztahu :

$$U = V (C_i - C_f) / M$$

Konečná hodnota C_f je závislá na objemu biomasy, která byla aplikována na počátku. Změnami M získáme hodnoty U , které vynásíme proti C_f a získáme biosorpční izoterma. Maximální hodnota U je důležitá pro charakteristiku daného sorbentu. Strmost křivky vypovídá o afinitě kovu k použité biomase. Biosorpční izoterma reprezentuje dynamický proces, který vyžaduje určitý čas pro dosažení rovnováhy mezi sorbovaným kovem a kovem rozpuštěným v roztoku. V tomto procesu nehraje počáteční koncentrace kovu významnou roli. Významná je ale hodnota konečné nebo zbytkové koncentrace.

Vedle tohoto velice jednoduchého modelu byly navrženy složitější modely, např. Langmuirův model, založený na předpokladu, že při nasycení povrchu adsorbentu nedochází k žádné migraci adsorbovaných molekul a energie adsorpce je konstantní.

Mechanismus biosorpce

Biosorpce těžkých kovů je velice rychlý proces, který není ovlivňován metabolickými inhibitory. Jedná se spíše o pasivní proces než o proces stimulovaný energeticky. Biosorpce kovů se uskutečňuje hlavně komplexací povrchových struktur buňky, iontovou výměnou nebo mikroprecipitací.

O vytvářených komplexech a mechanismech jejich vzniku existuje jen velmi málo informací. Některé techniky byly využity pouze pro zjištění umístění těžkých kovů v mikrobiální buňce (např. infračervená spektroskopie, EDAX, elektronová mikroskopie). Relativně nová technika ESCA (X-paprsková fotoelektronová spektroskopie) umožňuje stanovení vazebné energie elektronů v atomech či molekulách, která je závislá na distribuci

valenčních změn a dává tedy informaci o oxidovaném stavu atomu. V současnosti jsou pro odvození mechanismů biosorpce využívány různé chemické modifikace funkčních skupin buněčné stěny.

Mezi kovem a reaktivními skupinami buněčné stěny se uskutečňují stechiometrické interakce. Buněčná stěna vystupuje jako komplexní iontoměnič. Vzhledem k tomu, že se složení buněčné stěny u různých skupin mikroorganismů liší, můžeme pozorovat i významné rozdíly v typu a objemu navázaných kovových iontů. Buněčná stěna bakterií a cyanobakterií jsou v podstatě tvořeny peptidoglykany. Při studiu biosorpční kapacity kadmia u Gram-positivních a Gram-negativních bakterií izolovaných z aktivního kalu bylo zjištěno, že Gram-positivní bakterie mají pro kadmium vyšší biosorpční kapacitu. Je tedy zřejmé, že glykoproteidy u těchto G+ bakterií tvoří více potenciálních vazebných míst pro Cd v porovnání s fosfolipidy a lipopolysacharidy G- bakterií aktivního kalu. Při vazbě kovů buňkami *Bacillus subtilis* se uplatňuje zejména teikoová kyselina. Při studiu vazby kovů s využitím buněk *Bacillus licheniformis* bylo prokázáno, že primárním místem vazby kovů je nejen kyselina teikoová, ale i teikuronová. Fosforylované skupiny lipopolysacharidů a fosfolipidů jsou vazebnými místy pro kationy kovů na povrchu *Escherichia coli* K12. U buněk *Citrobacter* sp. byl popsán zcela neobvyklý mechanismus adsorpce kovů. *Citrobacter* sp. může odstranit z roztoku U, Cd, Cu a Pb po přidavku glycerol-2-fosfátu. Mechanismus adsorpce kovů je vyvolán enzymatickým štěpením glycerol-2-fosfátu fosfatázou, což je doprovázeno uvolněním HPO_4^{-2} a následnou precipitací kovu na povrchu buňky ve formě nerozpustného fosfátu kovu (např. CdHPO_4). Tento proces může být dobře aplikovatelný v praxi pro čištění odpadních vod s vyšším obsahem organických fosfátů.

Dostupnost, pohyblivost a vazbu kovů ovlivňují fyzikálně-chemické faktory. Vazebná místa a získání kovu z roztoku ovlivňuje hodnota pH prostředí. Při nízkých hodnotách pH jsou místa na buněčném povrchu těsně vázána s H^+ ionty a jsou tak nedostupné pro jiné kationy v roztoku. Vzárostající hodnota pH roztoku je doprovázena vzrůstem ligandů s negativním nábojem, což umožňuje vazbu jiných kationů. Jako příklad si můžeme uvést sorpci uranu buňkami aktinomycet, která je nejvyšší v prostředí s hodnotou pH kolem 6. Rovněž *Chlorella vulgaris* vykazuje značnou závislost sorpce olova na hodnotě pH kontaminovaného roztoku. Maximální rychlost adsorpce olova (15,4 mg/mg/min) se uskutečňuje v roztoku o hodnotě pH=5. Při pH= 2 rychlost adsorpce prudce klesá na hodnotu 1,2 mg/mg/min. Všeobecně lze shrnout, že proces biosorpce kovů obvykle vzrůstá mezi hodnotami pH = 4 – 8 a je limitován volbou biomasy a kovem. V některých případech vysoké hodnoty pH vedou k precipitaci kovu a k omezení procesu biosorpce.

Tabulka 8. Biosorpce kovů některými heterotrofy (houby, kvasinky a bakterie)
(podle Singh a Stapleton, 2003)

Organismus	Sorbovaný kov	Adsorpce (mg/g)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Ag, Cd, Cr, Cu	54, 30, 31, 16
	Hg, Mn, Pb, Zn	54, 12, 91, 20
	Au, Ni, U, Th	164, 18, 220, 160
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag, Co, Cu, U	4,7, 4,7 17-40, 24
	Zn, Th	14-40, 70
<i>Aspergillus niger</i>	Au, Cu, U	176, 1,7, 12
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cd, Cr, Cu, Pb	56, 0,33, 9, 122
	Zn, Hg, U	6,5, 20, 25
<i>Candida tropicalis</i>	Cd, Cr, Cu, Ni, Zn	60, 4,6, 80, 20, 30 30
<i>Bacillus subtilis</i>	Au, Fe, Mn, Ni	79, 201, 44, 6
	Cd, Cu, Pb, Zn	101, 152, 601, 137
<i>Citrobacter sp.</i>	Pb, U	4000, 8000
<i>Bacillus licheniformis</i>	Au, Cu, Fe, Mn, Ni	59, 32, 45, 38, 29

Podobně teplota ovlivňuje řadu faktorů, které regulují biosorpci kovů. Nejčastěji ovlivňuje stabilitu kovu v roztoku, konfiguraci buněčné stěny, stabilitu komplexu buňka – kov apod. Existují však studie, které prokázaly, že biosorpce některých kovů (např. uranu a mědi) není výrazně teplotně závislá a uskutečňuje se v širokém teplotním rozmezí.

Na vzrůstu biosorpce kovů se podílí i koncentrace kovu v prostředí. Studium adsorpce uranu buňkami *Actinomyces levoris* a *Streptomyces viridochromogenes* prokázaly lineární vzrůst adsorpce kovu až do koncentrace 8 ppm. Při vyšších koncentracích byl již zaznamenán slabý pokles biosorpce kovu. K podobným závěrům dospěly studie biosorpce Cd, Cu a Co na buňky *Saccharomyces cerevisiae*.

Biosorpce je všeobecně ukončena během prvních pěti minut, které uplynuly od prvního kontaktu biomasy s kontaminovaným roztokem. Po této době je dosaženo rovnováhy mezi sorbovaným kovem na biomasu a zbytkovou koncentrací kovu v roztoku. Rychlost procesu svědčí spíše o pasivním mechanismu biosorpce, nežli o metabolicky aktivním procesu. K podobnému závěru dospěly studie biosorpce uranu buňkami *Chlorella regularis*, biosorpce mědi buňkami *Zoogloea ramigera* či biosorpce olova buňkami *Chlorella vulgaris*.

Rozhodujícím faktorem v procesu biosorpce je i povaha samotné biomasy. Bylo prokázáno, že všeobecně vysoká koncentrace biomasy odstraňuje velice dobře kov z roztoku, ale hmotnost kovu vztažena na miligram suché hmotnosti biomasy je poměrně nízká. Byla vyslovena domněnka, že závislost biosorpce na hustotě buněk může být dána elektrostatickými interakcemi mezi navázanými kationy při malé vzdálenosti mezi buňkami

v husté suspenzi. Vysoká koncentrace biomasy vede často k tvorbě velkých agregátů, které narušují vytvářenou rovnováhu mezi kovem a povrchem buňky. Co se týká stáří použité biomasy, jsou výsledky pozorování velmi rozporuplné. Často nebyla prokázána žádná souvislost mezi stářím buněk a jejich sorpční kapacitou.

V praxi je samozřejmé, že kontaminované přírodní a odpadní vody neobsahují pouze kontaminující kov, ale celou řadu jiných iontů, které mohou ovlivňovat proces biosorpce kovu našeho zájmu a soutěžit o vazebná místa na povrchu mikrobiální buňky.

V řadě experimentů bylo prokázáno, že modifikace buněčného povrchu může výrazně ovlivnit vazbu kovových iontů. Tyto modifikace mohou být vyvolány působením různých vnějších faktorů jednak během růstu a nahromadění biomasy, jednak jejich přímým působením na připravenou biomasu. Chemicky lze nahromaděnou biomasu modifikovat např. promýváním detergenty, zesíťováním organickými ředidly nebo působením kyselin či louhů. Připravená biomasa bývá často působením některých vnějších faktorů usmrcena, avšak v mnoha experimentech bylo potvrzeno, že usmrcené buňky streptomycet, řas a bakterií vykazují často vyšší sorpční kapacitu v porovnání s živými buňkami.

Během kontinuálních průmyslových procesů může být k odstranění kovů z odpadních vod využita technika imobilizace živých či mrtvých buněk do matric (např. nerozpustný Ca-alginát, polyakrylamid aj.). Tyto sorpční systémy jsou velmi stabilní a dovolují dlouhodobé využívání nahromaděné biomasy. Některé imobilizované preparáty pro sorpci těžkých kovů jsou vyráběny průmyslově.

V posledních letech je věnována pozornost možnosti **využití mikrobiálních biofilmů** k průmyslovému odstraňování těžkých kovů z odpadních vod. Matrice je nejčastěji tvořena pevnou složkou (např. dřevěnými hoblinami, jílem, pískem nebo šterkem) a porézním materiálem (např. molitanem či jinou houbovitou hmotou). Pro tvorbu biofilmu buněk *Alcaligenes eutrophus* byla vyvinuta plošná membrána tvořená ZrO_2 a polysulfonem. Takto imobilizované buňky *A. eutrophus* mohou vyvolávat precipitaci kovů ve speciálním reaktoru. Testy reaktoru prokázaly vysokou účinnost při odstraňování Cd, Zn, Ni, Cu a Co z odpadních vod kontaminovaných kovy.

Při vývoji biosorbentů se klade důraz nejen na jejich účinnost sorpce kovů, ale i na možnost jejich regenerace a uvolnění sorbovaného kovu. Existuje celá řada metod eluce kovů s ohledem na vázaný prvek a mechanismus jeho vazby. Při reverzibilní sorpci se často využívají jednoduché nedestruktivní fyzikální a chemické faktory, které umožňují regeneraci biomasy a uvolnění kovu. Biomasa je pak opakovaně využívána v biosorpčních- desorpčních cyklech s ohledem na její sorpční kapacitu. Intracelulární akumulace je často ireverzibilní a k uvolnění kovu se využívá drastických metod jako je zpopelnění nebo rozpuštění v kyselině či louhu.

Závěrem lze říci, že biosorpce je ekonomicky přijatelná a technicky účinná technologie odstraňování či získávání kovů z kontaminovaného vodního prostředí.

BIOTRANSFORMACE NĚKTERÝCH TĚŽKÝCH KOVŮ

Rtuť. Rtuť patří mezi vysoce toxické těžké kovy. Do organismu se dostává přes respirační a trávicí trakt nebo přímo přes kůži a vede k otravám. Pro životní prostředí je biotransformace rtuti obzvláště nebezpečná. Mikroorganismy z různých taxonomických skupin mohou redukovat divalentní rtuť Hg(II) na kovovou rtuť Hg(0). Prostředí kontaminované rtutí většinou mikrobiální reducenty stimuluje. Adaptace těchto mikroorganismů probíhá 6-24 h. V prostředí pak vzrůstá počet Hg-rezistentních mikroorganismů. Současně se zvyšuje rychlost redukce, na které se podílí NADPH-dependentní Hg(II) reduktáza. Redukce Hg(II) může být do značné míry snížena vazbou na částice v sedimentech. Bylo prokázáno, že celá řada anaerobních mikroorganismů osídlujících sedimenty a půdy může metylovat rtuť. Vznikající mono- a dimetylrtuť je vysoce

toxická. Rtuť může být metylována i přirozenou mikroflórou žáber a střevního traktu ryb a následně akumulována ve formě metylrtuti v jejich tukové tkáni. UV-záření umožňuje abiotickou metylaci rtuti. Rtuť ve formě organických sloučenin je využívána jako velmi účinný pesticid.

Olovo. Někteří zástupci rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* a *Aeromonas* mohou v sedimentech transformovat trimetylovoacetát na tetrametylovo.

Chrom. Tento kov velmi často znečišťuje odpadní vodu z chladicích věží elektráren a dostává se nejen do povrchových vod a půdy, ale i do spodních vod. Hlavním cílem remediace půdy a vody je snížení koncentrace vysoce toxického a mobilního Cr(VI) jeho přeměnou na méně toxický a méně mobilní Cr(III). Redukce chromu vede k precipitaci kovu a ke snížení pravděpodobnosti jeho transportu do vzdálených lokalit. Mezi mikroorganismy, které redukují Cr(VI) patří např. někteří zástupci rodu *Pseudomonas* (*Pseudomonas dechromaticans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chromatophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* a další druhy), rodu *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*), rodu *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Vibrio* a další. Tyto mikroorganismy většinou prokazují vysoký stupeň tolerance k Cr(VI). Redukce Cr(VI) byla pozorována za aerobních i anaerobních podmínek. Za optimálních podmínek mohou mikroorganismy redukovat více než 99% Cr(VI).

Selen. Toxické koncentrace selenu v prostředí bývají častou příčinou úhynu ptáků. Selen se nejčastěji vyskytuje v prostředí ve formě Se(VI) nebo Se(IV). Četné mikroorganismy (např. zástupci rodů *Pseudomonas*, *Flavobacterium* a *Clostridium*) mají schopnost transformovat anionty selenu na Se(0). Tento elementární selen je nerozpustný ve vodě a může být zejména z vodního prostředí velmi dobře odstraněn. Bylo prokázáno, že transformace selenátu může být inhibována v přítomnosti nitrátů. Proto v některých těchto systémech byly k transformaci selenátu využity Se(VI) redukující mikroorganismy společně s denitrifikačními bakteriemi nebo byla vytvořena společenstva „algae-bacterium“.

V poslední době byla popsána rovněž metylace selenátu a selenitu u bakterií a řas. Metylovaný selen (CH_3SeCH_3) je silně těkavý a může se dostávat do ovzduší. Na základě mikrobiální metylace selenu byla vypracována nová technologie vysoce účinného odstraňování selenu z půd.

Uran. Mikrobiální redukce uranu je důležitým procesem v celkovém koloběhu tohoto prvku v přírodě a může být využita v technologiích pro odstraňování uranu z kontaminovaného prostředí. Podstatou těchto technologií je redukce rozpustného U(VI) na nerozpustný U(IV). V těchto technologiích bývá využíváno např. *Desulfovibrio desulfuricans* a zástupci rodu *Clostridium*. Z kontaminované půdy bývá uran nejprve extrahován bikarbonátem a U(VI) v extraktu je následně redukován vhodným mikroorganizmem.

Významné postavení v bioremediačních technologiích tohoto kovu má rovněž biosorpce. V těchto technologiích se využívají mikroorganismy, které jsou fixovány na různé pevné nosiče. Mezi často technologicky využívané mikroorganismy patří houba *Rhizopus arrhizus*, která je převedena do globulární formy nebo buňky rodu *Pseudomonas* imobilizované v polyakrylamidovém gélu.

Arzen. Tento prvek může být jak oxidován, tak i redukován a metylován. Může být i precipitován jako výsledek mikrobiální redukce sulfátu. Metylace arzenu je nežádoucí, neboť metylovaný arzen je vysoce toxický. As(III) může být mikrobiologicky oxidován na As(V). As(V) může být precipitován v reakci s feritovými ionty. S mikrobiální aktivitou *Desulfotomaculum auripigmentum* souvisí rovněž tvorba As_2S_3 , který vytváří v kontaminovaném prostředí precipitát.

Železo. Tento prvek běžně podléhá mikrobiální transformaci. Oxidace železa je jednou z nejčastěji pozorovaných transformací uskutečňovanou zástupci rodu *Thiobacillus* a *Sulfolobus*. Současně s mikrobiální transformací železa dochází v prostředí bohatém na

sulfidy k silnému okyselení prostředí v důsledku produkce kyseliny sírové. Toto okyselení vede k rozpouštění četných jiných rizikových prvků, např. Cd, Hg, Ni, Pb, Se, Ag a Al. Enzymatické aktivity *T.thiooxidans* a *T.ferrooxidans* bylo využito k tzv. **biologickému loužení** kovových prvků z kontaminovaného odpadu.

Tyto a jim metabolicky podobné mikroorganismy mohou za určitých podmínek uskutečňovat rovněž redukci železa. Vysoká aktivita Fe(III) reduktázy byla prokázána u řady půdních mikroorganismů. Redukce Fe(III) probíhá rovněž v mořských sedimentech v hloubce 6-7 km a byla detekována při ústí řek, v sedimentech s vysokým podílem organické hmoty.

Rizika plynoucí z biotransformace kovů

Na rozdíl od biodegradace organických sloučenin, kdy dochází ke štěpení molekul, nejsou kovy a metaloidy v mikrobiálních procesech štěpeny. Mohou však být mikrobiologicky modifikovány, imobilizovány nebo detoxikovány, takže i transformaci kovů lze považovat za určitý typ bioremedičního procesu. V současné době je značný zájem věnován podmínkám metylace, neboť touto cestou, zcela v rozporu s cíli bioremediačních technologií, vzrůstá toxicita celé řady kovů. Metylované formy rtuti, olova, arsenu a teluru jsou podstatně toxičtější než jejich anorganické prekurzory. Bylo prokázáno, že zejména metylované formy rtuti se akumulují v organismu člověka a zvířat a vedou k vážnému poškození jejich zdraví. Mimo to řada kovových prvků musí být před vlastní metylací redukována a četné redukované formy kovů jsou silně těkavé. Dlouhodobá pozorování potvrdila, že např. mikrobiální redukce rtuti Hg(II) poskytuje největší množství Hg(0) v atmosféře (reduktivní dráha rtuti byla prokázána např. u *Geobacter metallireducens*). Mezi často se vyskytujícími těžkými kovy mají zvláštní postavení Cd, Zn, Sn a Ge, které nejsou biologicky metylovatelné, neboť jejich redukované intermediáty jsou značně nestabilní.

Vzhledem k četným rizikům, která vyplývají z nežádoucích transformačních přeměn kovových prvků, je k vypracování bioremedičních technologií nutný vysoce odpovědný přístup podepřený laboratorními a poloprovozními testy. Většina těchto sanačních technologií je navrhována pro konkrétní lokalitu se zcela definovaným znečištěním. Opomenutí některých faktorů ovlivňujících průběh těchto sanací může vést ke zvýšení rizika dlouhodobého ohrožení zdraví člověka a zvířat

Co se týká strategie postupného snižování emisí rtuti a jejich sloučenin byla na úrovni OSN pověřena analýzou rizik organizace UNEP Chemicals. Tato organizace vydala v prosinci 2002 obsáhlou studii „Global Mercury Assessment“, ve které podrobně analyzuje současné zdroje a formy znečišťování a rizik, jež tento kov v lidském organismu znamená. Studie byla projednána na 22. zasedání Řídící rady UNEP v únoru 2003 a vedla k „Merkury Programme“, zavazující signatáře, včetně České republiky, k přehodnocení všech průmyslových i ostatních aktivit, jejichž důsledkem emise rtuti a jejich sloučenin vznikají. V roce 2005 byly stanoveny další rámcové kroky ve snižování ohrožení rizika rtuti, např. pomoc v řešení této problematiky v rozvojových zemích a zákaz vývozu přebytečné rtuti z EU s termínem r. 2011.

PŘÍSTUPY K SANACI ZNEČIŠTĚNÉHO PROSTŘEDÍ A VYMEZENÍ NĚKTERÝCH POJMŮ

Vybrané skupiny kontaminantů

Nejrozšířenější kontaminanty je možné rozdělit podle původu a fyzikálně chemických vlastností do skupin :

1. Organické těkavé látky (TOL)

benzen, toluen, etylbenzen, xylen (BTEX)
ostatní těkavé ropné uhlovodíky
nižší alkany a alkeny (cca do 11 uhlíků)
chlorované alifatické uhlovodíky (např. dichlorethan, dichloretylen, trichloretylen)

2. Organické látky obtížně těkavé

polyaromatické uhlovodíky (PAU) mimo naftalen
ostatní ropné uhlovodíky (prakticky motorová nafta a topné oleje)
polychlorované bifenyly (PCB)
fenoly

3. Anorganické látky

kyanidy
amoniak
těžké kovy

Vlastnosti vybraných kontaminantů

Vlastnosti a chování organických těkavých látek (TOL)

Pro organické těkavé látky (TOL) platí, že mají vysoký parciální tlak par. Snadný přechod těchto sloučenin z vodné fáze do fáze plynné charakterizuje **hodnota Henryho konstanty**. Tato konstanta vyjadřuje poměr mezi parciálním tlakem par látky a aktuální koncentrací rozpuštěné látky ve vodě. Tento poměr bývá také označován jako rozdělovací koeficient vzduch-voda. Čím je konstanta při určité teplotě vyšší, tím větší je tendence sloučeniny přecházet z kapalné fáze (z roztoku) do fáze plynné. V praxi to znamená, že kontaminat s vysokou hodnotou Henryho konstanty a současně i s vysokou tenzí par může být dobře stripovatelný a ventovatelný z prostředí. Důležitým kritériem pro volbu technologie sanace prostředí kontaminovaného TOL je však vedle těchto parametrů i okolnost, zda se jedná o látky halogenované či nehalogenované, neboť halogenované těkavé uhlovodíky jsou obecně biologicky hůře rozložitelné než stejné sloučeniny nehalogenované. Z tohoto důvodu bývají k sanaci této kontaminace voleny spíše metody fyzikální. Při volbě fyzikálních metod sanace prostředí kontaminovaného halogenovanými sloučeninami je však následně vyžadována složitá a finančně náročná úprava vznikajících emisí.

Mezi nejběžnější těkavé organické polutanty náležejí aromatické uhlovodíky a chlorovaná rozpouštědla (TCE, PCE). Ze skupin látek sem náleží benzínová frakce a skupina furanů (bod varu 31°C). Z polyaromatických uhlovodíků do této skupiny řadíme naftalen.

V Tabulce 8 jsou uvedeny základní charakteristiky vybraných organických látek, podle kterých lze volit technologii sanačního zásahu. Hodnoty Henryho konstanty a tlak par platí pro 25°C.

Těkavé organické polutanty (TOL) se mohou vyskytovat v kontaminovaném prostředí ve čtyřech fázích. **Plynná fáze** kontaminantu je přítomna ve formě výparů v nesaturované zóně, **pevná fáze** je tvořena kontaminátem, který je sorbován na zeminové částice jak v nesaturované, tak i v saturované zóně. **Vodnou fází** tvoří kontaminant rozpuštěný v pórové vodě, a to jak v nesaturované, tak i v saturované zóně. Velmi často je kapalný kontaminant ve **volné fázi**. Nejčastěji je v této fázi přítomen v nesaturované zóně, ale může se vyskytovat i na hladině podzemní vody nebo, pokud má vyšší specifickou hmotnost než voda, i pod hladinou spodní vody. Není výjimkou, že se tyto ropné kontaminanty při masivním úniku a překročení své koncentrace nad mez rozpustnosti mohou akumulovat na nepropustném podloží, zasakovat do jeho puklin a šířit se účinkem gravitace po případně ukloněném podloží bez ohledu na hydraulický sklon podzemní vody. Tyto ropné kontaminanty

představují tak druhotný a velmi těžce detekovatelný zdroj kontaminace spodní vody, neboť v procesu reverzibilního obnovování rovnováhy mezi vyloučenou fází a znečištěnou vodou se v důsledku jejího proudění znovu rozpouštějí. Z tohoto důvodu jsou tyto ropné uhlovodíky kontaminující horninové prostředí nejobtížněji sanovatelnou skupinou polutantů.

Mimo to, těkavé organické uhlovodíky mohou podle aktuálního barometrického tlaku a teploty v podzemí přecházet zcela nekontrolovatelně z vodné fáze do plynné a naopak.

Tabulka 8 Základní charakteristika některých organických polutantů (podle Montgomery, 1991)

Polutant	Hustota	Bod varu (°C)	Rozpustnost ve vodě (mg/l)	tlak par (mm Hg)	Henryho konstanta při 25°C (atm·m ³ /mol)
Benzen	0,877	80,1	1780	76	5,48.10 ⁻³
Toluen	0,867	110,6	515	22	6,74.10 ⁻³
o-xylen	0,88	144,4	152	6,6	5,35.10 ⁻³
n pentan	0,626	36,1	39,5	426	1,255
1,1-DCA	1,176	57,3	5500	234	5,45.10 ⁻³
1,2-DCA	1,235	83,5	8690	64	1,31.10 ⁻³
1,2-DCE	1,257	47,5	6260	265	5,32.10 ⁻³
PCE	1,623	121,2	150	14	1,16.10 ⁻²
TCE	1,464	87,2	1100	57,8	9,9.10 ⁻³
Dodekan	0,749	216,3	3,4.10 ⁻³	0,3	2,4.10 ⁻²
naftalen	1,162	217,9	30	5,4.10 ⁻²	7,34.10 ⁻⁴
B(a)P	1,351	495	3,8.10 ⁻³	2,4-5,6.10 ⁻⁹	<2,4.10 ⁻⁶
fénol	1,058	181,7	93000	0,2	3,97.10 ⁻⁷
PCB 1221	1,15	275-320	0,59	6,7.10 ⁻³	3,24.10 ⁻⁴

Vlastnosti a chování částečně (obtížně) těkavých organických polutantů

Netěkavé a částečně těkavé ropné uhlovodíky. S rostoucím počtem uhlíků mají tyto uhlovodíky stoupající bod varu, nižší tenzi par a nižší hodnotu Henryho konstanty. Můžeme tedy říci, že s počtem uhlíků v molekule uhlovodíku se snižuje jejich těkavost a jejich výskyt v plynné fázi je nižší. Naopak tyto uhlovodíky při masivní kontaminaci prostředí vytvářejí rozsáhlá ropná tělesa v kapilární zóně a na hladině podzemní vody. Vyšší ropné frakce mají klesající rozpustnost a proto se s hloubkou podzemní vody významně snižuje i koncentrace těchto polutantů.

Polyaromatické uhlovodíky (PAU). U polyaromatických uhlovodíků (PAU) s počtem aromatických jader se snižuje tenze par a klesá Henryho konstanta a rozpustnost ve

vodě. Výskyt polyaromatických uhlovodíků je často vázán na výrobu plynu, koksu a dehtu a místa manipulace s dehty. Těžké destilační frakce ropy a v nich obsažené PAU se částečně rozpouštějí při směsné kontaminaci v aromatických uhlovodících (pokud jsou přítomné ve významné koncentraci). Tím je usnadněna migrace PAU v přírodním prostředí v závislosti na vlastnostech horninového prostředí. Pokud jsou PAU přítomné v kontaminujících minerálních olejích vzniklých destilací ropy, vyskytují se v nesaturevané zóně a v blízkosti hladiny podzemních vod. Přesto byly popsány situace, kdy se tyto látky (např. vyjeté oleje) nacházely ve vysoké koncentraci v puklinových systémech i několik desítek metrů pod hladinou vody. Za všeobecně nebezpečný polyaromatický uhlovodík je považován benzo(a)pyren (B(a)P), u kterého byly potvrzeny karcinogenní účinky.

Polychlorované bifenyly (PCBs). Tyto látky byly dříve hojně používány jako přísady do nátěrových hmot, do teplovodních medií, jako plastifikátory, do transformátorových olejů a pod. Jsou velmi málo rozpustné ve vodě, ale naopak velmi dobře rozpustné v uhlovodících a tucích. S nimi se mohou šířit v podzemní vodě, kde vytvářejí emulze. Sanace lokalit kontaminovaných PCB patří k velmi obtížným. Při termickém rozkladu PCB vznikají vysoce toxické sloučeniny, degradace s využitím mikroorganismů je velmi obtížná pro vysokou toxicitu těchto látek. Dlouhodobé studie prokázaly, že PCB velmi snadno vstupují do potravního řetězce a dochází k jejich výrazné bioakumulaci.

Vlastnosti a chování vybraných anorganických kontaminantů

Těžké kovy. Těžké kovy nejčastěji kontaminují zeminu vojenských cvičišť, kalová pole vznikající při galvanotechnice a chemické povrchové úpravě kovů, vyskytují se na skládkách komunálního a průmyslového odpadu, na speciálních skládkách baterií. Mohou se dostávat do prostředí ze sklářského, textilního a kožedělného průmyslu, z hutí a válcoven a z autoopraven. Nemalou měrou ke kontaminaci prostředí přispívají samotná rudná naleziště a těžba a zpracování rud. Mezi obecně rozšířené a zdraví škodlivé kovy patří zejména arzen (As), berylium (Be), chrom (Cr), kadmium (Cd), měď (Cu), nikl (Ni), olovo (Pb), rtuť (Hg), selen (Se) a zinek (Zn).

Těžké kovy a arzen jsou běžně přítomné v čisté podzemní vodě ve stopových koncentracích. Jejich koncentrace se může nebezpečně zvýšit průnikem kontaminovaných odpadních vod. Jsou známy i případy mobilizace kovů z horninového prostředí únikem kyselých odpadů.

Kovy se častěji nacházejí v iontové formě nežli ve formě elementární. Často jsou vysráženy na půdních částicích, vytvářejí složité komplexy s organickou půdní hmotou nebo jsou sorpčně vázány na půdní matrici. Ke kontaminaci spodní vody dochází obvykle se zpožděním v závislosti na mobilitě kovu v kontaminované zemině. Mobilita kovu v půdě je pak závislá na rozpustnosti kovu ve vodě, pevnosti sorpční vazby, redoxpotenciálu zeminy a hodnotě pH. Významnou úlohu hraje přítomnost jílu a organické hmoty v půdě. Zejména oxidací a redukcí se mění rozpustnost kovů a jejich akutní toxicita.

Kyanidy. Zdrojem toxické kontaminace zemin kyanidy bývají odpady z anorganické chemické výroby, z plynáren a koksáren, galvanotechniky a chemické povrchové úpravy kovů. Kyanidy v půdě často vytvářejí více či méně rozpustné komplexy s kovy, zejména s Fe, Cu, Zn, Pb, Ag a Cd. Kyanidy alkalických kovů jsou vysoce rozpustné. Mobilita kyanidů v půdě závisí na jejich rozpustnosti.

Ve spodních vodách se kyanidy nacházejí spíše ve formě jednoduchých nebo komplexních anionů. Komplexní kyanidy jsou méně stabilní a mohou se rozkládat na HCO_3^- a NH_3 .

Amoniak a amonné ionty. V zemědělských výrobcích je primárním produktem rozkladu živočišných a rostlinných zbytků amoniak. Amonné soli jsou pak obsaženy v hnoji a dostávají se do obdělávaných půd, kde jsou dále využívány pro tvorbu organické hmoty. Zdrojem vysoké kontaminace půdy amonnými ionty mohou být i provozy plynáren a koksáren, nezajištěné skládky komunálního odpadu a v chemický průmysl. Zdrojem kontaminace může být i čpavkové chlazení. Podzemní vody jsou často kontaminovány infiltrací průmyslových odpadních vod. Bylo prokázáno, že amoniak může vznikat za anaerobních podmínek rozkladem fosilní organické hmoty. Amoniak se velmi dobře rozpouští ve vodě a disociuje na amonné ionty a OH^- .

Podíl vlastností horninového prostředí na výběr sanačních metod

Rozhodující vliv na volbu sanačních metod má homogenita, pórovitost, propustnost, obsah jílové a organické složky a mocnost pokryvu. Nemalou měrou se na šíření kontaminace podílí i rozpukání, tektonická expozice a stupeň zvětrání hornin skalního podkladu. Zvláštním, ale velmi častým případem, je ovlivnění fyzikálně mechanických a chemických vlastností nesaturované zóny antropogenními zásahy, zejména meliorací, výkopy, důlní činností apod. Mezi prioritní poznatky o tzv. saturované zóně je nutné zařadit znalosti o úrovni spodní vody a jejím směru proudění. Rovněž saturovaná zóna může být ovlivněna antropogenní činností, jejímž následkem je změna propustnosti kolektoru a chemizmu podzemní vody. Na těchto změnách se podílí zejména hlubinná důlní činnost, která zasahuje pod hladinu spodní vody a infiltrace odpadních vod ze zemědělské

NEJPOUŽÍVANĚJŠÍ SANAČNÍ TECHNOLOGIE

Konvenční sanační technologie

Sanace kontaminovaných lokalit je nejčastěji prováděna konvenčními technologiemi, které nevyužívají žádné biologické preparáty. K těmto technologiím patří např. různé hydraulické metody, venting, podzemní těsnící stěny, sanační stěny, termické metody, pračky zemin. Mezi tyto technologie lze také zařadit i přirozeně a nekontrolovaně probíhající dekontaminace a skládkování. Přirozeně probíhající dekontaminace není v podstatě sanační technologií, neboť probíhá bez zásahu člověka. Ke štěpení polutantů dochází jak v důsledku přirozené metabolické aktivity živých systémů, tak působením abiotických faktorů, zejména UV-zářením a přirozeného zvětrávání. Za těchto podmínek je rychlost degradace velmi variabilní a záleží nejen na samotném znečištění a jeho koncentraci, ale i na fyzikálně-chemických podmínkách kontaminovaného prostředí.

Hydraulické metody jsou založeny na čerpání podzemních kontaminovaných vod na povrch soustavou čerpacích vrtů. Vyčerpaná voda je čištěna a vracena zpět přes zasakovací zářezy a vrty. Tato metoda může být využita i pro odčerpávání polutantů nerozpustných ve vodě, které mohou být následně recyklovány. Metoda je finančně i časově velmi náročná, neboť vyžaduje náročný hydrogeologický průzkum sanované lokality a kontaminace může být neustále dotována promýváním nesanovalých horninových vrstev dešťovou vodou.

Pro omezení šíření kontaminace se často používá vytvoření tzv. **hydraulické bariéry**, která spočívá ve vybudování soustavy čerpacích vrtů kolmo ke spádu spodní vody. Tyto vrty se budují mimo kontaminovanou oblast, často v několika řadách. Jsou rozděleny na vrty provozované a záložní. Vrty vytvářejí souvislou bariéru bránící průniku kontaminace do prostředí. Hydraulická bariéra bývá často budována v okolí rizikových objektů a může

zde sloužit jak k pohotovému likvidaci případného úniku polutantu tak i k průběžnému monitoringu čistoty podzemních vod.

V některých lokalitách při čerpání kontaminovaných spodních vod se pro zvýšení výtěžnosti metody využívá k zasakování vod s detergenty, které urychlují proces promývání horninových vrstev a přispívají ke zkrácení sanačního procesu a možných rizik.

Venting patří mezi nekonvenční technologie využívané k sanaci lokalit kontaminovaných těkavými polutanty. Metoda spočívá v extrakci nesaturevané zóny atmosférickým vzduchem, který je odsáván ze sanačního vrtu. Odsátý vzduch s velmi nízkou koncentrací těkavého polutantu je čištěn přes sorpční filtry, které mohou být spalovány nebo desorbovány horkým vzduchem, který pak obsahuje vysoké koncentrace látky vhodné pro rekuperaci. Odsátý vzduch může být rovněž dekontaminován v biofiltru či speciálním bioreaktoru. Účinnost této metody je do značné míry závislá na těkavosti polutantu a propustnosti kontaminované vrstvy. Tato sanační metoda je široce využívána, i když je spojena s vysokými investičními a provozními náklady.

Těsnící a sanační stěny. Těsnící stěny se používají k zakonzervování polutantu. Zamezují nejen jeho šíření do okolního prostředí, ale současně brání i průniku srážkové vody. Sanační stěny jsou naproti tomu propustné pro vodu a zamezují úniku polutantu, který sorbují. Nebezpečí využívání sanačních stěn spočívá v možném lokálním překročení sorpční schopnosti stěny.

Termické metody patří ke klasickým technologiím likvidace odpadu. Moderní spalovny jsou vybaveny několikanásobnými odlučovači spalin. Přesto tuto technologii likvidace polutantů nelze považovat za bezodpadovou a zcela bezrizikovou.

Pračky zemin jsou velmi nákladným zařízením. Pračka je tvořena členěným rotačním bubnem, ve kterém se kontaminovaná zemina propírá vodou s detergenty. Kontaminanty jsou takto koncentrovány do kalu, který je pak dále likvidován (nejčastěji termicky). Využití této technologie je problematické zejména u jílovitých půd. Náklady provozu tohoto zařízení se rovněž zvyšují těžbou a úpravou zeminy před praním (odstranění velkých pevných složek půdy)

Bioremediační technologie

Samotná charakteristika bioremediačních technologií – tj. detoxikace a mineralizace polutantu na biomasu, CO₂ a vodu je velmi lákavá. Ve srovnání s jinými metodami zneškodňování kontaminovaného odpadu (spalování, odpařování, imobilizace aj.) jsou tyto technologie výhodné i ekonomicky. Mimo to, fyzikální metody vedou často k tvorbě nových zbytkových polutantů a lze tedy říci, že problém ozdravné sanace řeší jen částečně. Úspěšné provedení bioremediačního procesu a demonstrace jeho účinnosti vyžaduje interdisciplinární přístup a to z hlediska chemicko-inženýrského, ekonomického, ekotoxikologického, biologického a estetického. Následující přehled uvádí stupně bioremediačního procesu a obecnou strategii pro sledování a hodnocení účinnosti bioremediačního procesu.

1. Charakter polutantu – sledované parametry

- * chemické složení
- * koncentrace
- * toxicita
- * biologická rozložitelnost
- * rozpustnost, těkavost

Otázky související s doporučením bioremediační technologie:

Jsou kontaminující látky rozložitelné biologicky?

Dovolují podmínky biologické působení?

Jedná se o kometabolický proces?

2. Hydrogeochemická charakteristika pro doporučení typu bioremediační technologie:

* geologický průzkum lokality

* hladiny spodní vody, směr vodoteče a rychlost proudění

* přítomnost živin (zdrojů dusíku, fosforu aj.)

* přítomnost akceptorů elektronů (O₂, dusičnany aj.)

* pH, teplota, vodní potenciál prostředí

Otázky související s doporučením bioremediační technologie *in situ* nebo *ex situ*:

Jsou hydrogeologické podmínky příznivé pro sanaci *in situ*?

Jsou podmínky vhodné pro růst a aktivitu mikroorganismů?

Jsou živiny přítomné v dostatečné míře?

Může být prostředí nějak modifikováno nebo optimalizováno?

3. Mikrobiologická charakteristika lokality :

* stav mikrobiální populace

* dostatečná katabolická aktivita

* specifická katabolická aktivita

Otázky související s doporučením metody fertilizace nebo seeding:

Je přítomný dostatečný biologický potenciál pro biodegradaci?

Může být přítomná degradující populace nějak stimulována?

Je vhodná aplikace populace jiného degradátora či degradačního společenstva?

Jestliže všechny otázky byly zodpovězeny tak, že pro dekontaminaci prostředí jednoznačně doporučují bioremediační technologii, může být navržen **specifický sanační postup**.

Často se stává, že kontaminované prostředí neobsahuje vhodné degradátory nebo je zcela sterilní díky vysoké toxicitě polutantu. Je nutné provádět tedy **umělé zaočkování** (seeding) kontaminovaného prostředí katabolicky vhodnými mikroorganismy, jejichž aklimatizace k polutantu byla provedena za laboratorních podmínek. Je samozřejmé, že před vlastní inokulací (zaočkováním mikroorganismy) je potřebné upravit prostředí tak, aby co nejméně ovlivnilo životaschopnost vnášené populace. Současně je nutné zajistit podmínky pro růst a množení inokulovaných mikroorganismů. Tato cílená inokulace zkracuje aklimatizační periodu a umožní degradaci perzistujících látek.

Vnášení degradujících mikroorganismů do kontaminovaného prostředí musí být prováděno velmi uvážene. Zejména při dlouhodobé perzistenci polutantu se musíme v jednoduchém laboratorním experimentu přesvědčit, zda kontaminované prostředí neobsahuje velmi nízké počty degradujících mikroorganismů, které se nemohou množit a výrazně metabolizovat polutant pro nedostatek živin či růstových faktorů. Jsou-li v prostředí laboratorně prokázány degradující mikroorganismy, pak často postačí pouhá úprava podmínek prostředí a jeho fertilizace, což umožní degradaci perzistující látky osidlující divokou mikrobiotou.

V posledních letech byl zaznamenán enormní nárůst kontrolovaného využití mikroorganismů k destrukci chemických polutantů. Tyto technologie (bioremediace) využívají nejen známý katabolický potenciál izolovaných mikroorganismů, ale také jsou zaměřeny na snížení rizika biodegradace, které je často spontánně probíhajícími degradací velice vysoké. Nové bioremediační technologie musí vycházet nejen z faktu, že existují mikroorganismy s odpovídající katabolickou aktivitou, ale také z ekonomických kalkulací jejich provádění. V každém případě platí, že pro malé objemy kontaminované půdy nebo vody bývají tyto remediační technologie ekonomicky méně výhodné v porovnání s fyzikální či chemickou likvidací. S objemem však ekonomická náročnost bioremediačních technologií na odstranění polutantu v jednotce kontaminovaného materiálu rychle klesá.

Bioremediace mohou být prováděny technologiemi, ve kterých se degradace polutantu provádí přímo v místě kontaminace (*in situ*), tedy půda není odtěžována a kontaminovaná spodní voda není pumpována na povrch. Tyto technologie vyžadují relativně nízké náklady, jsou však pomalejší a průběh degradace polutantu je jen těžce kontrolovatelný.

Jiné technologie jsou aplikovány na odtěžený kontaminovaný materiál v místě často vzdáleném od původní lokality (*ex situ*). Manipulací s kontaminovaným materiálem sice vzrůstají náklady, ale celý dekadační proces je pod kontrolou a veškerá rizika dalšího znečištění jsou minimalizována.

Zvláštní technologie jsou pak využívány při dekontaminaci mořského prostředí. První bioremediační technologie v mořském prostředí byly provedeny v letech 1989-1991 na Aljašce po havárii tankeru s 11 miliony galonů ropy.

Biodegradace kontaminované půdy *ex situ*

Půda může být znečištěna nejrůznějšími produkty antropogenní činnosti. Bioremediační technologie jsou nejčastěji využívány pro dekontaminaci půdy znečištěné ropou a ropnými produkty. Běžně je degradace ropných uhlovodíků prováděna metodou *ex situ* tzv. **záhonovým způsobem** (*land farming method*). Půda je zemědělsky obdělávána na speciálních plochách (hnojena, zavlažována, vzdušněna prooráváním či přehazováním). Může být pouze fertilizována nebo inokulována speciálními mikrobiálními preparáty. Pro úspěšnou biodegradaci ropných uhlovodíků lze odvodit nutné množství dusíku a fosforu z koncentrace kontaminující uhlíkaté látky. Degradace se většinou provádí v halách opatřených nepropustnou podlahovou krytinou s drenážemi pro odvádění přebytečné kontaminované vody do podzemních nádrží pro opakované zkrápění biopole. Vzduch, který je v průběhu biodegradace znečišťován lehkými uhlovodíky, je dočišťován přes chemické či biologické filtry.



Obr.7 Příprava zeminy pro dekontaminaci *ex situ* (Foto Horáková, 2002)

Kompostování je dalším způsobem *ex situ* degradace některých kontaminantů obsažených v půdě. Zemina je promíchána s pevným organickým materiálem, jako je sláma, hobliny, kůra a

obohacena zdrojem dusíku a fosforu. Materiál je pak navršen do vysokých hromad a je provzdušňován mechanicky nebo soustavou trubek napojených na kompresor. K rychlosti degradace polutantu během kompostování přispívá i vrůst teploty materiálu v důsledku množení mikroorganismů na pevném organickém materiálu. Tento způsob degradace bývá používán u půd kontaminovaných chlorofenoly.



Obr.8 Velkokapacitní kompostárna



Obr.9 Příprava zeminy pro kompostování a měření teploty v kompostované zemině
(Foto Horáková, 2002)

Biodegradace v kalu je využívána nejen pro *ex situ* čištění kontaminovaných půd, ale i kalů samotných nebo sedimentů. Tento způsob degradace může probíhat přímo v lagunách nebo ve speciálních reaktorech. Metoda v reaktoru je vhodná zejména pro kontaminace, kde vznikají nebezpečné meziprodukty či nebezpečné plynné sloučeniny, jejichž produkce může být sledována. Reaktory pracují za plně kontrolovaných podmínek, takže s výhodou mohou být využívány čisté kultury izolovaných mikroorganismů. Výhodou těchto velmi nákladných zařízení je podstatné zkrácení doby sanace kontaminovaného materiálu a podstatné snížení rizik, která nelze vyloučit během přírodních procesů na otevřené lokalitě. V lagunách mohou být degradovány fenoly a krezoáty.



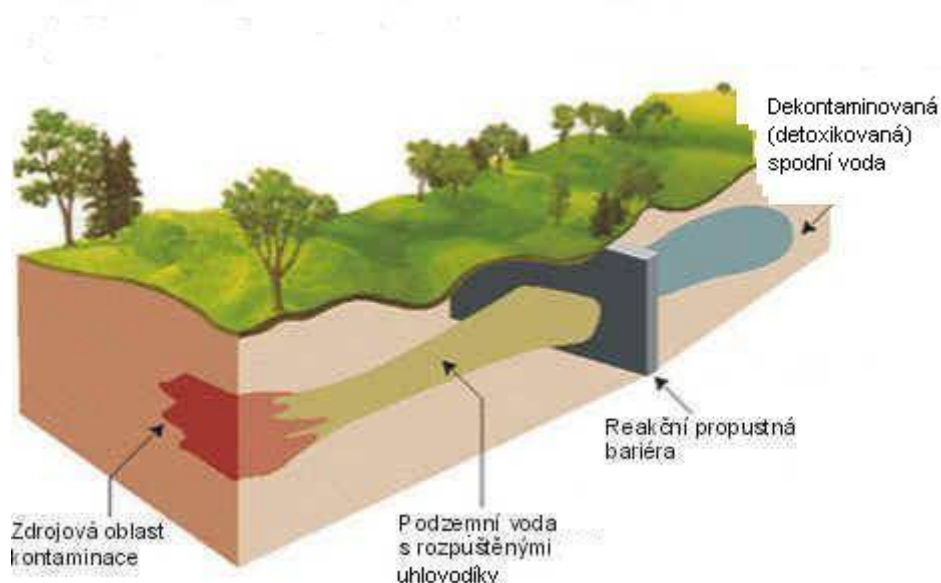
Obr.10 Laguna kontaminovaná fenoly (Foto Horáková, 2001)

Biodegradace kontaminované půdy a spodní vody *in situ*

Bioventing je sanační nedestruktivní technologie aplikovaná nejčastěji v nesaturované zóně půdy. Do půdy je vtlačován vzduch pod tlakem nebo je odsáván ze speciálních ventingových vrtů v procesu vakuové extrakce. Bioventing má uplatnění zejména při remediaci uhlovodíků. Vysoký tlak vtlačovaného vzduchu může však někdy vést k rychlému přechodu uhlovodíků do plynné fáze a jejich uvolňování do prostředí, aniž by došlo k biodegradaci kontaminantu přímo v podzemí. Naopak odsátý kontaminovaný půdní vzduch je od ventingových vrtů odváděn prostřednictvím systému trubek k sanační stanici. Zde může být čištěn ve filtrech s aktivním uhlím, kde dochází k sorpci plynného kontaminantu nebo je čištěn v **biofiltrech**. Účinnost sanačního procesu může být průběžně analyticky sledována. Na úspěšnosti využití této sanační metody se nemalou měrou podílí i různá popř. nízká propustnost sanované zóny. Tato metoda je náročná na provozní přípravu spojenou s instalací vrtů. Je využívána hlavně v oblastech, kde nelze provádět zemní práce, v horninovém prostředí nebo při hloubkových kontaminacích půdy, kdy její odtěžení by bylo ekonomicky velmi náročné.

Technologie biologického čištění spodních vod (*in situ* biorestoration).

Technologie je založena na vtlačování kyslíku a živin popř. vhodné mikroflóry do kontaminované lokality. Metoda je využívána pro čištění spodních vod kontaminovaných ropnými látkami a sloučeninami BTEX. Používá se jednak injekční vrt, který je zanořen do tzv. saturační zóny znečištění nebo zasakovací štola či zasakovací povrch nad saturevaným místem. Tato metoda vyžaduje důkladný hydrogeologický průzkum. Procesy mohou probíhat jak aerobně (vzduch, H_2O_2), tak i anaerobně (NO_3^-). Jednodušší způsob čištění spodních vod je využití reakčních propustných stěn na bázi fyzikálně-chemických procesů. Výsledkem tohoto procesu je dekontaminovaná voda nebo přeměna polutantu na netoxickou formu, která může být následně biologicky rozložena s využitím vhodné sanační biotechnologie. Jako příklad takové sanace spodních vod můžeme uvést likvidaci halogenovaných uhlovodíků, např. PCE a TCE. Jako náplň propustných bariér je využito granulované železo Fe^0 . Chlorované uhlovodíky podléhají reduktivní dechloraci na eten a etan. Tyto látky jsou již biologicky snadno odbouratelné.



Obr.11 Schéma propustné reakční bariéry

Biofiltry

Mikroorganismy mohou rozkládat i celou řadu plyných látek, jestliže jsou vázány na pevném nosiči. Jako pevný nosič může sloužit rašelina, zemina, piliny, kůra, aktivní uhlí, jílové částice, porézní sklo či keramika a textilní vlákna. Biorektory jsou využívány pro degradaci acetonu, naftalenu, propionaldehydu, toluenu, benzenu, vinylchloridu a dalších. V biofiltrech mohou být využity mikroorganismy v biofilmech nebo v imobilizované formě. Někdy jsou využívány i imobilizované enzymy.



Obr.12 Biofiltry a náplň (štěpky dřeva) pro osídlení degradátorem

Biologické odstraňování kovů

Biosorpce je proces, ve kterém mikroorganismy pasivně, tedy bez požadavku na energii, odstraňují kovy, metaloidy a radionuklidy. Biomasa (baktérie, vláknité houby, kvasinky, řasy), kterou můžeme odstranit těžké kovy, může být často tvořena neživými preparáty. Proces biosorpce je velmi rychlý a poměrně účinný. Byla prokázána biosorpce U, Zn, Cd, Co, Ni, Cu, Hg, Th, Cs, Au, Ag, Sn a Mn.

Bioakumulace je proces, který je spojen s životaschopností a metabolickou aktivitou mikroorganismů a vyžaduje energii.

Redukce kovů je uskutečňována celou řadou mikroorganismů. Vede ke změně toxicity kovu, rozpustnosti a mobility. Využití těchto reduktivních reakcí v bioremediačních technologiích je diskutováno ve spojení se zdravotními riziky přítomného kovu.

Oxidace, precipitace, metylace kovů patří rovněž k remediačním technologiím. Obzvláště proces precipitace je využíván k rychlému odstranění některých kovů z vodních zdrojů. V tomto procesu jsou nejčastěji využívány bakterie redukující sírany, obzvláště druhy rodu *Desulfovibrio*. V procesu anaerobního metabolismu těchto mikroorganismů jsou vytvářeny nerozpustné sulfidy Zn, Pb, Ni, Cr, Cd, Cu, Fe, Hg a dalších kovů. Tyto nerozpustné sulfidy mohou být odstraněny sedimentací nebo filtrací, popř. separační centrifugací. Tento proces odstraňování těžkých kovů bývá využíván ve speciálních reaktorech.

CHEMICKÁ ČASOVANÁ BOMBA (CTB)

Pojem chemická časovaná bomba úzce souvisí s nekontrolovanou aktivitou mikroorganismů na kontaminovaných lokalitách. Spouštěcím mechanismem tohoto procesu jsou samotné mikroorganismy. V průběhu jejich metabolismu totiž vznikají nejrůznější produkty, jejichž škodlivost nemůže být zjištěna, neboť nebyly dosud chemicky charakterizovány. Mimo to, množství vnášených polutantů do prostředí je mnohem rychlejší, nežli jejich rozklad. Produkty biodegradace i samotné polutanty se pak dlouhodobě akumulují v prostředí a významně je ovlivňují. Po jaké době působení těchto látek nebo v jaké jejich koncentraci se začne projevovat jejich přítomnost v prostředí na zdraví člověka, zvířat či rostlin, zůstává otázkou bez konkrétní odpovědi.

V kontrolovaných bioremediačních technologiích se snažíme o podstatné omezení negativního vlivu vznikajících mikrobiálních produktů na životní prostředí. Omezujeme tak vznik efektu CTB.

Např. v projektech sanace ropných uhlovodíků vycházíme z poznatků, že oxidované mikrobiální **metabolity uhlovodíků** jsou většinou velmi dobře rozpustné a tím i pohyblivé v půdním prostředí. Technologie musí být tedy zabezpečeny tak, aby vznikající rozpustný uhlovodík v půdě nebyl transportován do míst vzdálených od původní kontaminované lokality. Technologie biodegradace uhlovodíků rovněž zamezují, aby docházelo v důsledku produkce kyselých meziproductů k nežádoucímu vyluhování jiných látek do spodních vod. Vznikající lehké uhlovodíky které se při přirozené biodegradaci uhlovodíků odpařují do ovzduší, jsou v průběhu řízené bioremediace degradovány v biofiltrech (podobně jako chlorované uhlovodíky).

Na vzniku efektu CTB se značnou měrou podílejí **pesticidy**, které vzhledem k velmi pomalé přirozené biodegradaci jsou považovány za perzistující polutanty, jejichž akumulace v lidském organismu byla prokázána. Mimo to, samotné produkty přirozené N-, O- nebo C-dealkylace pesticidů jsou často perzistující sekundární kontaminantou životního prostředí.

Za obzvláště rizikovou pro zdraví lze považovat kontaminaci **aniliny**, které mohou být mikrobiologicky transformovány na fenylhydroxyaniliny. Tyto transformační produkty za přirozených podmínek pak snadno reagují s netransformovaným anilinem za vzniku azobenzenů. Mutagenita a karcinogenita azobenzenů byla potvrzena již v minulosti.

PCB, driny a dioxiny mohou být za aerobních podmínek mikrobiologicky transformovány na oxidované produkty s vyšší rozpustností, nežli původní látky. Surfaktanty a syntetické polymery většinou podléhají přirozené biotransformaci za vzniku dosud neznámých produktů.

Zvláštní postavení na vývoji efektu CTB mají **těžké kovy**. Již samotná přítomnost těžkých kovů v prostředí vyvolává změny v přirozené mikrobiální komunitě dané lokality. Všeobecně houby jsou odolnější k těžkým kovům nežli aktinomycety. Bakterie jsou v porovnání s těmito mikroorganismy k těžkým kovům citlivější, i když G- bakterie jsou odolnější vzhledem k bakteriím G+. Zvýšená citlivost mikroorganismů k těžkým kovům vede všeobecně ke snižování mineralizačního potenciálu půdy. V prostředí kontaminovaném těžkými kovy může sice docházet k hromadění rezistentních mikroorganismů, které však většinou vykazují nižší degradační potenciál.

Chemickou časovanou bombou pro vodní prostředí se stala mikrobiální metylace Hg(0) na metylrtuť, která je přinejmenším 100 x toxičtější pro ryby nežli kovová rtuť. Methylrtuť se akumuluje v mase ryb a může vážně ohrozit zdraví člověka při jeho konzumaci. Nemoc vyvolaná metylrtutí byla označena jako Minamotská nemoc podle jejího primárního místa výskytu (Minamota, Japonsko). Minamotská nemoc je prvním popsáním „výbuchem“ chemické časované bomby. Touto nemocí je pravděpodobně ohrožena i Brazílie, kde Hg(0) je odpadem (až 200 t/rok) při těžbě zlata. Hg(0) se dostává do ovzduší a ve srážkách kontaminuje vody a sediment Amazonky. Podle odhadu výbuch CTB bude mnohem většího rozsahu, nežli v Minamotě. Podobný problém vzniká při metylaci arzenu a antimonu.

CTB tvoří i anaerobní kaly s vysokým obsahem těžkých kovů ve formě sulfidů, které byly často využívány jako půdní výplně odtěžených lokalit a skládek. V aerobních podmínkách mohou být nerozpustné sulfidy oxidovány na rozpustné sulfáty, které jsou vysoce mobilní a mohou znečišťovat zemědělskou půdu a spodní vody. Tento problém souvisí zejména s těžbou kalů v některých přístavech (např. Rotterdam).

Použitá literatura

- Alexander, M. (Ed.) "Biodegradation and Bioremediation", Academic Press, 1999
- Alexander, M., Science **231**,132-138, 1981
- Alvarez, H. M., Souto, M. F., Viale, A., and Pucci, O. H., FEMS Microbiol.Lett. **200**,195-200, 2001
- Atlas, R. M., Microbiol.Rev. **45**,180-209,1981
- Bridie, A. L., and Bos, J., J., Inst. Pet., London **57**, 270-277,1971
- Brujhn, C., Lenke, H., and Kackmuss, H.-J., Appl. Environ.Microbiol. **53**, 208-210,1987
- Coates, M., Connell, D. W., and Barron, D., Environ. Sci. Technik., **19**, 628-632, 1985
- Dean-Raymond, D., and Alexander, M., Appl.Environ.Microbiol. **33**,1037-1041,1977
- Gadd G.M.,1992, in Microbial Control of Pollution, J.C.Fry, G.M. Gadd, R.A. Herbert, C.W. Goldstein, R.M., Makléry,L.M., and Alexander, M., Appl.Environ. Microbiol., **51**,226-232, 1985
- Hambrick, G. A., Delaune, R., and Patrick, W. H., Appl.Environ.Microbiol. **40**,365-369, 1980
- Hickey, R. F., and Smith, G. (Eds.) „Biotechnology in Industrial Waste Treatment and Bioremediation“, CRC Press, 1996
- Horáková, D. and Němec, M., Patentový spis CZ 279021,1994
- Horáková, D., and Němec, M., in Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils, M. Dekker (Ed.), pp.359-374, 2000
- Jannasch,H.W.,Limnol.Oceanogr.,**12**,264-271,1967
- Jones, and I.A. Watson-Craik (Eds.), 59-88, Cambridge Univ.Press, Cambridge,UK, 1992
- Kraus a kol., Nový akademický slovník cizích slov, Academia Praha, 2005
- Laane, C., Boeren, S., Hilhorst, R., and Veeger, C., in „Biocatalysis in Organic Media“, Laane et al., (Eds.), pp.65-84,1987
- Law,A.T., and Buton,D.K., J.Bacteriol.,**129**,115-123, 1977
- Leahy, J. G., and Colwell, R. R., Microbiol.Rev., **54**, 305-315, 1990
- Lee, K., and Levy, E. M., in „Aquatic Toxicology and Water Quality Management“, J.O. Nrigau, and J.S.S. Lakshminarayana (Eds.), N.Y. John Wiley and Sons, pp. 217-243, 1989
- McKenna, E.J., and Kallio R.E., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, **68**,1552-1554, 1971
- Miller, M. E., and Alexander, M., Environ. Sci. Technol., **25**, 245-250, 1991
- Montgomery, J.H.,Groundwater Chemicals Field Guide, CRC Press, 1991
- Monod, J., Ann.Rev.Microbiol., **3**, 371-394, 1949
- Ou, L.T., and Sikka, H. C., J.Agric.Food Chem., **25**,1336-1339,1977
- Pirnik,M.P.,Atlas R.M. and Bartha R.J., Bacteriol., **119**:868-878, 1974
- Schmidt,S.K., and Alexander,M., Appl.Environ.Microbiol. 49,822-827, 1985
- Shehata,T.E., and Marr,A.G., J.Bacteriol. **107**,210-216,1971
- Singh V.P (Ed), Biotransformations: Microbial Degradation of Health Risk Compounds. Progress in industrial mikrobiology **32**, 1995
- Singh V.P., and Stapleton R.D.Jr (Eds.), Biotransformations:Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection.Progress in Industrial Mikrobiology **36**, 2003
- Tang, J., Carroguino, M. J., Robertson, B. K., and Alexander, M., Environ. Sci.Technol. **32**,3586-3590,1998
- Wiggins,B.A., Jones,S.H., and Alexander,M., Appl.Environ.Microbiol. **53**, 791-796, 1987
- Yalkowsky, S. H., Valvani, S.C., and Mackay, D., Residue Rev.,**85**, 43-45, 1983
- ZoBell. C. E., Bact.Rev., **10**, 1-49, 1946

Skriptum vzniklo za finanční podpory projektu 1509/d FRVŠ MŠMT (2006)
Jazyková úprava textu byla provedena podle Nového akademického slovníku, Academia Praha, 2005.