

# EFFECT OF SELECTED ABIOTIC ADDITIVES ON BIOREMEDIATION OF CRUDE OIL CONTAMINATION IN SOIL

## VLIV VYBRANÝCH ABIOTICKÝCH ADITIV NA BIOREMEDIACI ROPNÉHO ZNEČIŠTĚNÍ V PŮDĚ

**Pavel Kurán<sup>1,2)</sup>, Josef Trögl<sup>2)</sup>, Jana Nováková<sup>1)</sup>, Věra Pilařová<sup>2)</sup>, Kateřina Pilařová<sup>2)</sup>, Jakub Ederer<sup>2)</sup>, Petra Dáňová<sup>2)</sup>, Jana Pavlorková<sup>2)</sup>, Roman Fryčák<sup>2)</sup>, Simona Bošková<sup>2)</sup>, Josef Kozler<sup>3)</sup>, František Novák<sup>4)</sup>**

1) *Research Institute of Inorganic Chemistry, a. s., Revoluční 84, 400 01 Ústí nad Labem, Czech Republic, e-mail: pavel.kuran@vuanch.cz*

2) *Jan Evangelista Purkyně University in Ústí nad Labem, Faculty of the Environment, Králova Výšina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem, Czech Republic, e-mail: josef.trogl@ujep.cz*

3) *MikroChem LKT, spol. s r. o., Přeseka 52, 379 01 Třeboň, Czech Republic, e-mail: josef.kozler@mikrochem.cz*

4) *Biological centre AV ČR, v. v. i., Institute of Soil Biology, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czech Republic, e-mail: novak@upb.cas.cz*

### Abstract:

The effect of addition of selected abiotic additives (humic substances, zeolites) on the biodegradation of crude oil in polluted soil by joint action of autochthonic micro flora as well as by crude-oil-degrading bacterial strain was tested in the set of pot experiments. The process was followed by means of analytical parameters (hydrocarbon index, ratios pristane/C<sub>17</sub>, phytane/C<sub>18</sub>, total organic carbon content) and characterization of activity and structure of soil microbial community within one-year-experiment. Addition of humic substances did not affect biodegradation rate significantly, however it improved the evolution of soil microbial community biomass. Addition of zeolites (10% w/w) resulted in slower increase of microbial biomass compared to modules lacking zeolites, however it improved the operation with soil. In contrast, augmentation of degrading bacterial strain increased the biodegradation rate significantly and proved to be the most effective treatment.

### Keywords:

Abiotic additives, humic substances, zeolites, bioremediation, crude oil contamination, hydrocarbon index, ratio pristane/C<sub>17</sub>, ratio phytane/C<sub>18</sub>, total organic carbon content

### Abstrakt:

V sadě nádobových pokusů byl testován vliv přídatku vybraných abiotických aditiv (huminové látky, zeolity) na biodegradaci ropných látek v kontaminované půdě, a to kombinovaným působením autochtonní mikroflóry a augmentovaného ropu degradujícího bakteriálního kmene. Průběh biodegradace byl sledován pomocí zvolených analytických hodnotících postupů (obsah C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>, poměry pristan/C<sub>17</sub>, fytan/C<sub>18</sub>, obsah celkového organického uhlíku) a také charakterizací aktivity a struktury půdního společenstva v průběhu ročního experimentu. Přídatky huminových látek neměly statisticky průkazný vliv na rychlost biodegradace, nicméně měly pozitivní vliv na vývoj biomasy půdního mikrobiálního společenstva. Přídavek zeolitu (10 % hmotn.) se projevil pomalejším nárůstem mikrobiální biomasy ve srovnání s moduly bez zeolitu, nicméně výrazně usnadnil manipulaci s půdou. Naopak augmentace biodegradačního bakteriálního kmene vedla k urychlení biodegradace a ukázala se jako nejvýznamnější zásah.

### Klíčová slova:

Abiotická aditiva, huminové látky, zeolity, bioremediace, ropné znečištění, obsah C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>, poměr pristan/C<sub>17</sub>, poměr fytan/C<sub>18</sub>, obsah celkového organického uhlíku

### Úvod

Ropné látky představují nejčastější organické polutanty životního prostředí. Bioremediace takto zasažených lokalit představuje efektivní a k životnímu prostředí šetrný způsob dekontaminace (Juwarkar et al., 2010; Stroud et al., 2007). I když jsou ropné látky poměrně dobře biodegradovatelné

(ve srovnání s jinými organickými polutanty), přirozená biodegradace půd kontaminovaných vysokým obsahem ropných látek mnohdy probíhá velmi pomalu, nebo neprobíhá vůbec. Z tohoto hlediska je proto aktuální experimentální vývoj prostředků aditivně zvyšujících účinnost bioremediace půdy a jejich následného zavedení do praxe. Těmito prostředky mohou být také volná abiotická aditiva jako například huminové látky nebo zeolity. Huminové látky (HS) jsou především nástrojem na zvýšení biologické dostupnosti polutantu pro jednobuněčné degradéry nebo samostatným prostředkem chemické konverze polutantu v méně toxický kontaminant. Zeolity jako abiotická aditiva mohou posloužit jako prostředek ke zvýšení účinnosti bioremediace nahrazením běžně používaných suspensních kultur biodegradérů jejich přirozeným biofilmem, vytvořeným po kolonizaci povrchu abiotického nosiče, případně rovněž v kombinaci s aplikací dalších aditiv.

Účinnost a průběh biodegradace ropného znečištění lze sledovat úbytkem ropných látek v průběhu času. Ropné látky v životním prostředí představují kontaminaci širokou skupinou látek, které jsou pouze omezeně rozpustné ve vodě. Pro jejich skupinové stanovení se jako ukazatel využívá suma nepolárních uhlovodíků  $C_{10}-C_{40}$  (Koller et al., 2005), jejichž přesnou definici uvádí norma (ČSN EN ISO 14039). Probíhající biologické procesy lze hodnotit mnoha způsoby zahrnujícími kvantifikaci mikrobiální biomasy a její aktivity. Jako vhodný ukazatel živé mikrobiální biomasy se prosazuje stanovení fosfolipidových mastných kyselin (Zelles et al., 1992; Kaur et al., 2005).

Prezentovaný příspěvek se zabývá testováním vlivu přídavku huminových látek a zeolitu jako abiotických aditiv na biodegradaci ropných látek v půdě, a to jak působením autochtonní mikroflóry, tak po augmentaci ropu degradujícího bakteriálního kmene. V sadě nádobových pokusů v průběhu ročního experimentu je popsán průběh biodegradace ropných látek pomocí zvolených analytických hodnotících postupů (obsah  $C_{10}-C_{40}$ , poměry pristan/ $C_{17}$ , fytan/ $C_{18}$ , obsah celkového organického uhlíku TOC) a také charakterizací kvantitativní a aktivity mikrobiální biomasy (stanovením fosfolipidových mastných kyselin, respirací a aktivity dehydrogenáz).

## **Experimentální část**

### ***Nádobové pokusy***

Byla použita hlinitopísčítá půda s významným podílem kamenů (ty byly separovány sítím o velikosti ok 1 cm) po havárii přepravní cisterny s motorovou naftou. Inokulován byl kmen *Pseudomonas fluorescens* ze sbírky Mikrochem LKT o vstupní koncentraci  $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$  CFU/g vlhké půdy, nakultivovaný na minerálním médiu s přídavkem motorové nafty jako jediného zdroje C a energie. Aplikovány byly dva typy huminových látek (dále HS) připravených alkalickou extrakcí z lignitu Mikulčice a oxyhumolitu z Duchcova, každá ve třech koncentračních úrovních. Dále byl vnesen zeolit (velikost zrn 1,5-2 mm, 10 % hmot.). Poměr dusíku a fosforu v půdě (N:P) byl upraven na přibližně 6:1. Vlhkost půdy po založení nádobových pokusů byla přibližně 10 %. Detaily variant (modulů) pokusu shrnuje tab. 1.

Každý modul představuje jednu variantu experimentu v rámci jedné odběrové kampaně. Celkem bylo navrženo 6 odběrových kampaní s frekvencí odběrů každé 2 měsíce s výjimkou května a června 2010, aby se zachytil případný exponenciální pokles polutantů.

### ***Stanovení uhlovodíků v půdě***

Uhlovodíky  $C_{10}-C_{40}$  v půdě byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem adaptovanou metodou podle normy (ČSN EN ISO 14039). Detailní popis metodiky je popsán v literatuře (Kuráň et al 2011).

**Tab. 1:** Plán nádobových pokusů v definovaných modulech

Označení	Popis varianty
I	Půda z lokality
II	Půda z lokality + MO
III	Půda z lokality + MO + Lignit 50 mg/kg sušiny
IV	Půda z lokality + MO + Lignit 150 mg/kg sušiny
V	Půda z lokality + MO + Lignit 450 mg/kg sušiny
VI	Půda z lokality + MO + Oxyhumolit 50 mg/kg sušiny
VII	Půda z lokality + MO + Oxyhumolit 150 mg/kg sušiny
VIII	Půda z lokality + MO + Oxyhumolit 450 mg/kg sušiny
IX	Půda z lokality + MO na zeolitu + Lignit 50 mg/kg sušiny
X	Půda z lokality + MO na zeolitu + Lignit 150 mg/kg sušiny
XI	Půda z lokality + MO na zeolitu + Lignit 450 mg/kg sušiny
XII	Půda z lokality + MO na zeolitu + Oxyhumolit 50 mg/kg sušiny
XIII	Půda z lokality + MO na zeolitu + Oxyhumolit 150 mg/kg sušiny
XIV	Půda z lokality + MO na zeolitu + Oxyhumolit 450 mg/kg sušiny
XV	Půda z lokality + MO na zeolitu

MO – mikroorganismy

### ***Hodnocení půdního mikrobiálního společenstva***

Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) byla stanovena adaptovanou metodou dle Zellese (Zelles et al., 1992). Z navážky ~10 g půdního vzorku byly nejprve extrahovány celkové lipidy jednofázovou směsí methanol:chloroform:fosfátový pufr (2:1:0,8). Po zahuštění na vakuové odparce byla směs frakcionována extrakcí na tuhé fázi se silikagelem jako absorbentem; nežádoucí frakce nepolárních a neutrálních lipidů byly eluovány chloroformem a acetonem, žádoucí frakce polárních lipidů pak methanolem. Izolované fosfolipidy byly podrobeny methanolýze roztokem KOH v methanolu a vzniklé methylestery mastných kyselin (FAME) byly stanoveny plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem.

Půdní respirace byla stanovena titračně. Vzorek půdy (~1g) byl inkubován v uzavřené skleněné láhvi při ~25°C a vznikající CO<sub>2</sub> byl jímán do roztoku NaOH, jehož nezreagovaný podíl byl následně titrován roztokem HCl. Aktivita půdních dehydrogenáz byla stanovena spektrofotometricky (546 nm) jako rychlost redukce trifenylnitrochloridu (TTC) přímou inkubací ~2g půdy v TRIS pufru při pH 7,6 a 25 °C. Interferující absorbance látek vyextrahovaných z půdy TRIS puftrem bez TTC byla odečtena.

### ***Statistické zpracování***

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl využit software MS Excel (Microsoft, USA), Statistica 6.0 (StatSoft USA), Origin Micro Cal (Origin, USA) a QCExpert (Trilobyte, ČR). Statistické výpočty byly prováděny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Úbytek koncentrace ropných látek s časem byl modelován jednak kinetikou nultého řádu:

$$c = c_0 - k_0 t \quad (1)$$

jednak kinetikou prvního řádu:

$$c = c_k + (c_0 - c_k) e^{-\frac{t}{k_1}} \quad (2)$$

kde  $c$  je aktuální koncentrace látky v čase  $t$ ,  $c_0$  je počáteční koncentrace látky,  $c_k$  je konečná (limitní) koncentrace látky v čase  $t \rightarrow \infty$ ,  $k_0$  resp.  $k_1$  jsou rychlostní konstanty nultého resp. prvního řádu.

Z konstanty  $k_1$  byl dále vypočítán poločas poklesu látky  $t_{1/2} = k_1 \cdot \ln 2$  (3).

Aby bylo možné oba modely vzájemně porovnat, bylo třeba upravit rovnici (2) na dvouparametrovou. Vzhledem k tomu, že naměřené koncentrace  $c_0$  nebyly ve všech modulech statisticky významně odlišné, byl tento parametr při srovnání držen konstantní.

## Výsledky

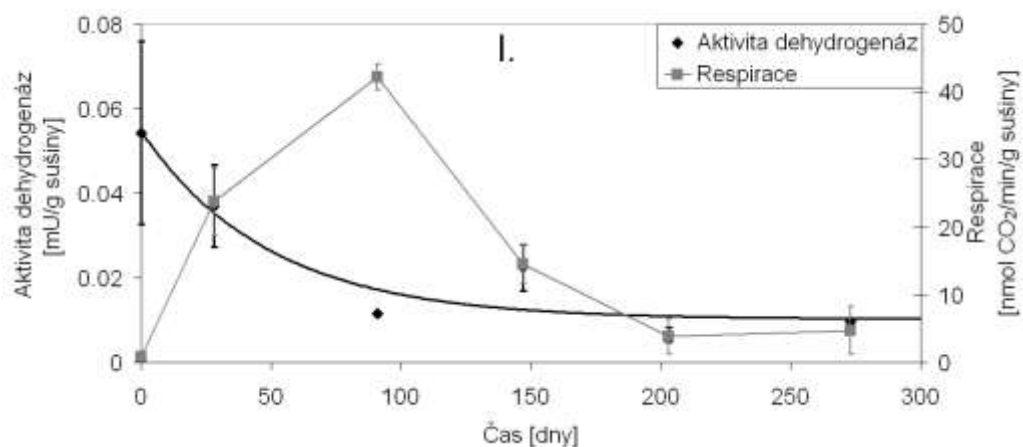
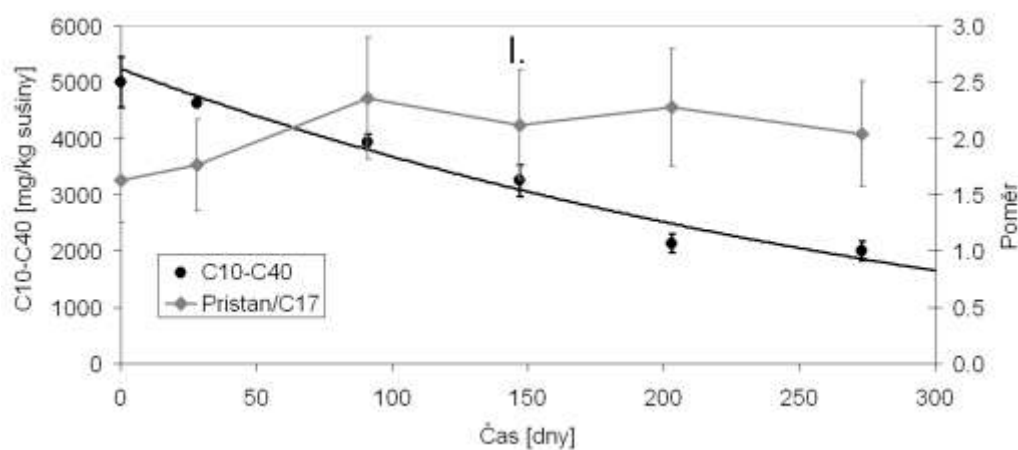
### Obsah uhlovodíků $C_{10}-C_{40}$

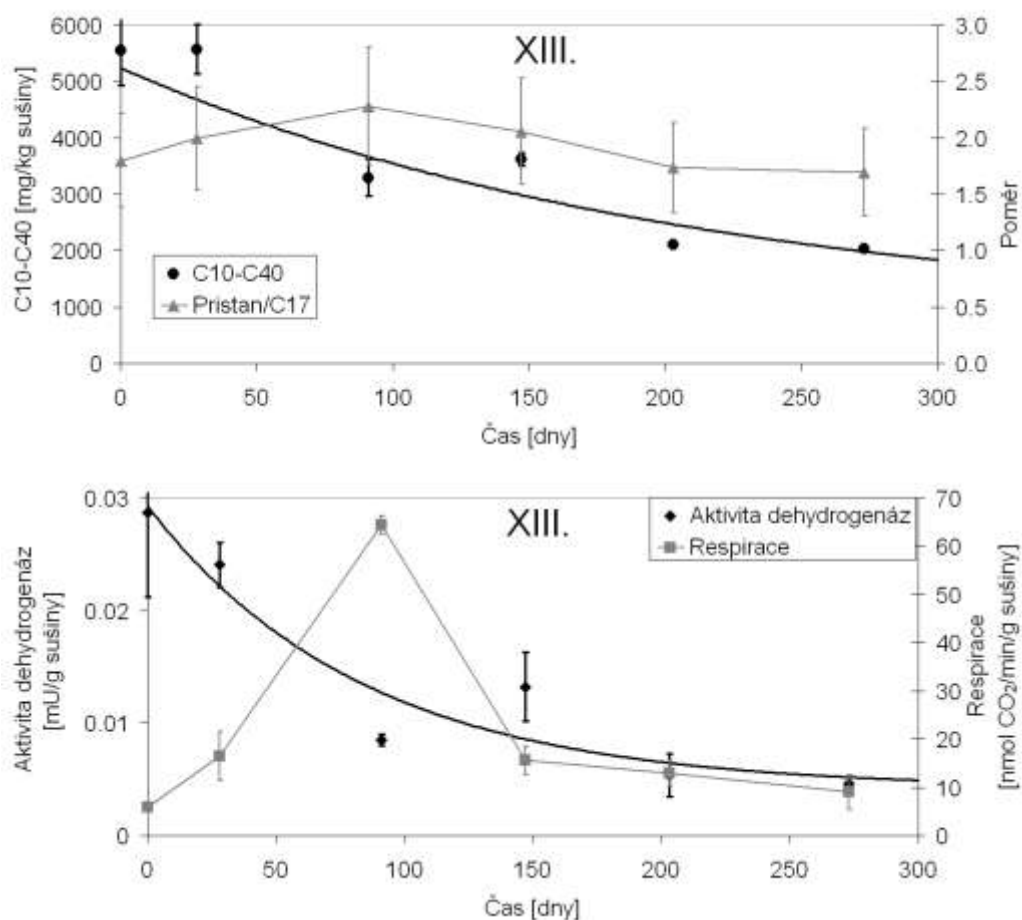
Celkový obsah uhlovodíků  $C_{10}-C_{40}$  se v průběhu experimentu u všech variant snižoval. Vypočítané poločasy poklesu koncentrace  $C_{10}-C_{40}$  ukazuje tab. 2. Většina modulů vykazovala cca měsíční prodlevu v odbourávání, kdy významnější pokles koncentrace  $C_{10}-C_{40}$  byl zaznamenán až mezi druhým a třetím odběrem (viz též obr. 1). Druhé body u modulů s významnou prodlevou byly obvykle silně vlivné při výpočtech regresních parametrů a v takovém případě byly vynechávány.

**Tab. 2:** Poločasy poklesu obsahu uhlovodíků  $C_{10}-C_{40}$  u jednotlivých modulů. Indexy *a* a *b* u hodnot vyznačují statisticky významnou odlišnost.

Modul	$t_{1/2}$ [dny]	$r^2$	Modul	$t_{1/2}$ [dny]	$r^2$	Modul	$t_{1/2}$ [dny]	$r^2$
I	236±109a	0,97	VI	142±32b	0,97	XI	79±19b	0,94
II	118±28b	0,96	VII	235±123a	0,92	XII	244±188a	0,87
III	121±48b	0,90	VIII	101±44b	0,83	XIII	146±82b	0,87
IV	128±43b	0,93	IX	89±28b	0,87	XIV	90±36b	0,87
V	138±42b	0,95	X	103±28b	0,95	XV	81±30b	0,88

$t_{1/2}$  – čas, za který se koncentrace sledované látky sníží na polovinu (poločás poklesu)  
 $r^2$  – stupeň determinace regrese





**Obr. 1:** Biodegradace (pokles obsahu uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub> s časem, vývoj poměru pristan/C<sub>17</sub>) a mikrobiální aktivita (respirace, dehydrogenázy) pro varianty I a XIII. Poklesy jsou proloženy rovnicí kinetiky prvního řádu (2).

#### **Poměr pristan/C<sub>17</sub>, fytan/C<sub>18</sub>**

V časovém horizontu květen 2010 až únor 2011 bylo pozorováno, že hodnota obou poměrů pristan/C<sub>17</sub> a fytan/C<sub>18</sub>, indikující přeměnu nerozvětvených uhlovodíků na rozvětvené, má rostoucí tendenci, maxima bylo dosaženo v srpnu, poté jejich hodnota stagnovala nebo došlo k mírnému poklesu. U modulu II nebyla stagnační fáze pozorována, data vykazovala rostoucí trend i v závěru experimentu. U modulu XIII došlo dokonce k poklesu hodnoty poměru na počáteční stav v květnu 2010. Rozdíly v prvních třech měsících byly zpravidla statisticky významné. V této souvislosti je vhodné podotknout, že v průběhu experimentu se absolutní obsah všech čtyř sledovaných analytů (pristanu, fytanu, C<sub>17</sub> a C<sub>18</sub>) významně snížil u všech variant.

#### **Obsah TOC**

U obsahu celkového organického uhlíku TOC v jednotlivých modulech je v časovém horizontu květen 2010 až únor 2011 patrná mírná klesající tendence v rozsahu hodnot 4,06-2,97 % sušiny. Výjimkou jsou hodnoty TOC pro odběry v říjnu 2010, kdy hodnoty TOC dosahují výchozích hodnot z května 2010. Tato anomálie je předmětem dalšího zkoumání.

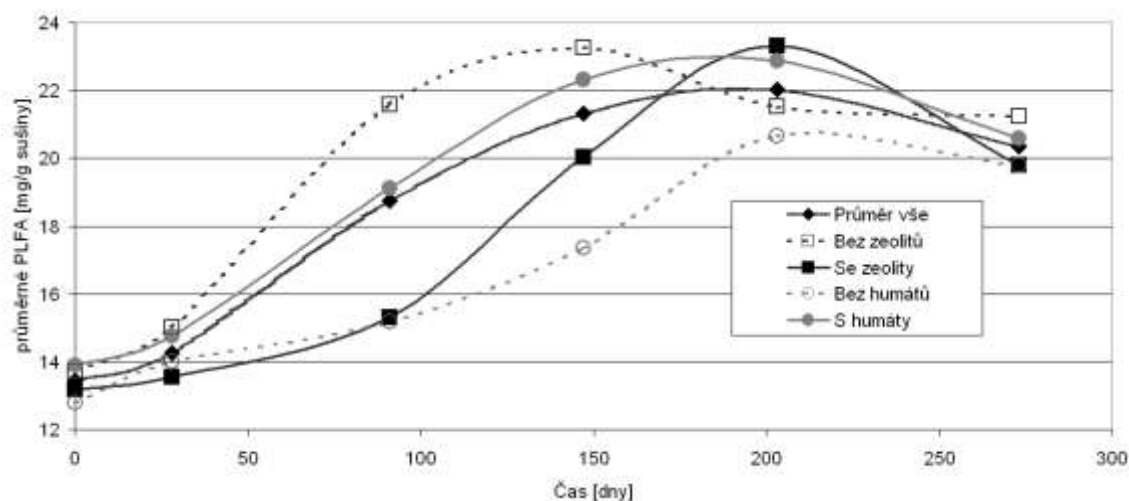
#### **Respirace a aktivita dehydrogenáz**

Aktivita dehydrogenáz u všech variant byla obecně nejvyšší na začátku a následně klesala s časem exponenciálně v souladu s poklesem koncentrací C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>. Aktivity obvykle kopírovaly i prodlevy v odbourávání uhlovodíků. Mírná anomálie byla zaznamenána u čtvrtého odběru z října 2010, kdy byly u většiny variant zaznamenány vyšší hodnoty aktivit oproti trendu poklesu.

Dosažené hodnoty respiračních aktivit dosahovaly vyšší variability než u ostatních sledovaných analytických veličin. U většiny variant vykazují respirace vzestup a pokles aktivit s maximem po 4 měsících od začátku experimentu, kdy byl také zaznamenán nejvýznamnější pokles koncentrace uhlovodíků (viz též obr. 1).

### **Obsah fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)**

Obsah PLFA, odrážející kvantitu živé mikrobiální biomasy, v průběhu celého experimentu u všech variant statisticky významně stoupl z průměrných počátečních  $13,5 \pm 2,2$  na konečných  $20,3 \pm 2,4$  mg PLFA/g sušiny, variabilita mezi variantami nebyla velká (obr. 2). Systematický vzestup byl pozorován v prvních 7 měsících v souladu s poklesem koncentrace uhlovodíků v půdě. Naopak mezi posledními odběry, kdy už byla u většiny variant degradace zanedbatelná, došlo k mírnému poklesu koncentrace PLFA. Moduly bez zeolitů a moduly s přidavkem huminových látek měly rychlejší vzestup a dosáhly maxima už po cca 5 měsících, maxima ale nebyla vyšší než u variant bez zeolitů.



**Obr. 2:** Porovnání průměrného obsahu PLFA pro jednotlivé odběrové kampaně. Relativní odchylky se pohybuje mezi 5 ž 15% a pro větší přehlednost nejsou zobrazeny.

## **Diskuze**

### **Vliv sledovaných abiotických aditiv na biodegradaci**

Oproti očekávání nebyl vliv přidavku huminových látek na biodegradaci uhlovodíků  $C_{10}$ – $C_{40}$  statisticky průkazný. Všechny moduly s přidavky huminových látek sice vykazují významně rychlejší pokles koncentrace uhlovodíků ve srovnání s kontrolou, nicméně už ne ve srovnání s inokulovanou variantou bez huminových látek (modul II). U variant s přidavkem huminových látek i zeolitu (moduly IX–XIV) byly zjištěny ještě kratší poločasy biodegradace, statisticky ovšem neprůkazné. HS připravené z lignitu vychází ze srovnání s HS vyrobenými z oxyhumolitu Duchcov lépe vzhledem ke kratším poločasům reakcí. Srovnání ztěžují atypické moduly VII a XII, vykazující značný rozptyl hodnot. Předpokládá se, že huminové látky by měly mj. zlepšovat biologickou dostupnost polutantů. Kontaminace u použité půdy byla ovšem relativně čerstvá, a proto i dobře biologicky dostupná, a tento pozitivní efekt se neprojevil. V dalších pokusech bude proto testován vliv přidavku huminových látek na půdu se starou zátěží.

Významný vliv huminových látek byl ale zaznamenán u mikrobiální biomasy. Jak je dobře patrné z obr. 2, u modulů s přidavky huminových látek přibývala mikrobiální biomasa (PLFA) rychleji než u variant bez nich. To potvrzuje další z předpokladů, že huminové látky zlepšují mikroprostředí pro půdní mikroorganismy.

Vliv zeolitu na biodegradaci uhlovodíků  $C_{10}$ – $C_{40}$  se projevuje výrazněji v již zmíněné kombinaci s rostoucí koncentrací HS (moduly IX–XIV), což vede k poklesu poločasů reakcí. Nejkratší hodnoty poločasu reakce byly dosaženy pro nejvyšší koncentraci HS 450 mg/kg sušiny. Zeolity byly do půdy přidávány ze dvou důvodů. Jednak jsme předpokládali, že zeolity na sebe navážou přidanou

mikroflóru za tvorby biofilmu a usnadní tak její přežití. Dále jsme předpokládali, že přídavek zeolitu půdy nakypří a provzdušní. Porovnání respiračních aktivit u srpnového (nejaktivnějšího) odběru ale tuto hypotézu nepotvrdilo, průměrná respirace u variant se zeolity i bez nich byla srovnatelná. Zajímavý je vliv přídavku zeolitů na mikrobiální biomasu. Moduly se zeolity vykazují pomalejší vzestup obsahu PLFA než moduly bez zeolitů. Vysvětlit tento rozpor s výchozí hypotézou není jednoduché. Pravděpodobně zde hraje roli adsorpce autochtonní i augmentované mikroflóry na zeolit a nižší růstová rychlost bakterií v biofilmu. Z praktického hlediska ovšem použitý přídavek zeolitů o koncentraci 10 % hmotnostních půdy zlehčil a výrazně usnadnil manipulaci i vizuální sledování homogenity.

### ***Sledované parametry biodegradace***

Pro základní představu o souvislosti jednotlivých sledovaných veličin s průběhem degradačního procesu byla provedena jejich vzájemná korelace (tab. 3). Výsledky ukazují, že hlavní ukazatel průběhu biodegradace – pokles uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>, koreluje velmi dobře jak s dalšími ukazateli, tak s aktivitou mikrobiálního společenstva. Nevýznamná korelace s respirací je dána počáteční nízkou respirační aktivitou pravděpodobně z důvodu nedostatku půdního kyslíku. Aktivity dehydrogenáz, které jsou ukazatelem obecného metabolismu (ne jen aerobního), korelují lépe.

**Tab. 3:** Korelace vybraných proměnných. Tučně označené korelace jsou významné na hladině významnosti  $p < .05000$ ,  $n = 90$ .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Čas		<b>0,60</b>	-0,16	<b>-0,70</b>	<b>-0,64</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,75</b>	<b>0,47</b>	<b>0,47</b>
2. PLFA	<b>0,60</b>		0,09	<b>-0,47</b>	-0,19	<b>-0,60</b>	<b>0,57</b>	<b>0,48</b>	<b>0,48</b>
3. Respirace	-0,16	0,09		-0,08	-0,02	0,05	0,00	0,17	<b>0,22</b>
4. Dehydrogenázy	<b>-0,70</b>	<b>-0,47</b>	-0,08		<b>0,62</b>	<b>0,70</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,60</b>	<b>-0,64</b>
5. TOC	<b>-0,64</b>	-0,19	-0,02	<b>0,62</b>		<b>0,57</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,31</b>
6. C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub>	<b>-0,93</b>	<b>-0,60</b>	0,05	<b>0,70</b>	<b>0,57</b>		<b>-0,72</b>	<b>-0,53</b>	<b>-0,54</b>
7. pH	<b>0,75</b>	<b>0,57</b>	0,00	<b>-0,67</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,72</b>		<b>0,65</b>	<b>0,66</b>
8. Pristan/C <sub>17</sub>	<b>0,47</b>	<b>0,48</b>	0,17	<b>-0,60</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,53</b>	<b>0,65</b>		<b>0,98</b>
9. Fytan/C <sub>18</sub>	<b>0,47</b>	<b>0,48</b>	<b>0,22</b>	<b>-0,64</b>	<b>-0,31</b>	<b>-0,54</b>	<b>0,66</b>	<b>0,98</b>	

Porovnání úbytku uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub> v kontaminované půdě v modulech II–XV (jednotlivé faktory a jejich kombinace) ve srovnání s modulem I (kontrola) ukazuje, že biodegradace probíhá i bez těchto zásahů. Úbytek uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub> lze dobře modelovat jak kinetikou prvního, tak kinetikou nultého řádu. Hodnoty Akaiikova kritéria (AIC), které se používá pro vzájemné srovnávání regresních modelů, ukazují odlišnost kontrolních a ostatních vzorků. Zatímco kontrolu lze mírně přesněji modelovat kinetikou nultého řádu, pro ostatní moduly lépe vyhovuje kinetika prvního řádu. Vhodnější model kinetiky nultého řádu naznačuje z hlediska teorie reakční kinetiky, že limitujícím elementem rychlosti procesu je nedostatek katalyzátoru, tedy mikroorganismů schopných degradovat ropné látky. Naopak vhodnější model kinetiky prvního řádu ukazuje spíše na koncentraci substrátu (ropných látek) jako limitujícího elementu rychlosti procesu, což potvrzuje domněnku, že původní půdní mikroflóra obsahovala poměrně málo mikroorganismů schopných odbourání ropných látek a tedy že inokulace biodegradačního kmene pomohla proces urychlit. To potvrzuje i srovnání poločasů poklesu koncentrace ropných látek (tab. 2), které jsou u většiny modulů významně kratší než u kontroly (výjimkou jsou atypické rozptýlené moduly VII a XII). Vzájemné srovnání neinokulované kontroly s ostatními inokulovanými moduly nicméně neukazuje významný rozdíl v obsahu PLFA. Tím lze konstatovat, že inokulovaná koncentrace  $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^6$  CFU/g vlhké půdy je relativně zanedbatelná vůči kvantitě přirozené mikroflóry, nicméně podíl této malé skupinky na odvedené biodegradační práci je významný. Augmentace vhodného biodegradačního kmene se tak ukazuje jako nejvýznamnější faktor biodegradace.

Rostoucí hodnota poměrů pristan/C<sub>17</sub> a fytan/C<sub>18</sub> je znakem, že biodegradace skutečně probíhá přeměnou nerozvětvených uhlovodíků, jako jsou n-alkany C<sub>17</sub> a C<sub>18</sub>, směrem k rozvětveným

uhlovodíkům (pristan, fytan). Tyto výsledky jsou v souladu s klesajícím obsahem uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>. Poměr pristan/C<sub>17</sub> se zpočátku experimentu zvyšoval, ke konci spíše stagnoval.

Výsledky TOC je možné vzhledem ke slabší korelaci s úbytkem uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>, nízkým respiračním aktivitám a klesající tendenci ve všech modulech interpretovat tak, že při sledované biodegradaci ropných uhlovodíků v modulech za rok 2010 dochází k přeměně jedné organické formy na jinou. K mineralizaci na anorganické komponenty (např. CO<sub>2</sub>) dochází jenom v malé míře. Část uhlovodíků byla také pravděpodobně využita bakteriemi jako zásobní látky a část se uplatnila při tvorbě bakteriální biomasy.

#### ***Půdní společenstvo v průběhu biodegradace***

Zjištěné koncentrace PLFA, které se ve všech modulech pohybovaly v rozsahu 8-30 mg PLFA/g sušiny, jsou srovnatelné např. s intenzivně obdělávanými zemědělskými půdami nebo s loukami, a naopak jsou nižší než u přirozených lesních půd. Nezanedbatelný je podíl methyllinoleátu, biomarkeru eukaryotických mikroorganismů, naznačující podíl půdních hub. Naopak respirační aktivity, stejně jako aktivity dehydrogenáz, jsou řádově nižší než u nezasazených půd (Bailey et al., 2002; Kaur et al., 2005; Zelles et al., 1992). I když bohužel nebyl k dispozici vzorek nezasazené půdy, získaná data naznačují, že přítomné ropné látky původní mikroflóru významně nezahubily, nicméně přirozené biologické procesy zpomalily a vlastního degradačního procesu se účastnil jen menší podíl přítomných mikroorganismů. Nejvyšší respirační aktivity v prostřední fázi experimentu ve srovnání se systematickým poklesem aktivity dehydrogenáz také naznačují, že přirozený biodegradační proces mohl být limitován nedostatkem kyslíku nebo nízkým obsahem počáteční půdní vlhkosti. Tyto klíčové parametry byly při zakládání experimentu vylepšeny a mohly vlastní biodegradaci odstartovat.

#### **Závěr**

V sérii nádobových pokusů byl testován vliv abiotických aditiv (huminových látek, zeolitů) na biodegradaci motorové nafty po havárii. Živá autochtonní biomasa sice zůstala i po havárii vysoká, mikroorganismy byly ale jen málo aktivní. Augmentace biodegradačního bakteriálního kmene se proto ukázala jako nejvýznamnější zásah urychlující odbourávání ropných uhlovodíků. Přidávky huminových látek neměly statisticky průkazný vliv na rychlost biodegradace, nicméně měly pozitivní vliv na vývoj biomasy půdního společenstva. Přídavek zeolitu se projevil pomalejším nárůstem biomasy ve srovnání s moduly bez zeolitu. Statisticky průkazné nejsou ani vyšší hodnoty respiračních aktivit po přidávku zeolitu. Nicméně použitý přídavek zeolitů do půdy (10 % hmotn.) výrazně usnadnil manipulaci s půdou i vizuální sledování homogenity při zakládání nádobových pokusů a pravidelné aeraci půdy.

#### **Poděkování**

Výzkum byl podpořen Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR (projekt FR-TI1/456) a spolufinancován firmou Mikrochem LKT s.r.o.

#### **Literatura:**

ČSN EN 14039 Charakterizace odpadů – Stanovení obsahu uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub> plynovou chromatografií, květen 2005.

Bailey V.I., Peacock A.D., Smith J.L., Bolton Jr H. 2002. Relationships between soil microbial biomass determined by chlorophorm fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 34, pp 1385-1389.

Juwarakar, A.A., Singh, S.K., Mudhoo, A. 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol* 9, pp 215-288.

Kaur A., Chaudhary A., Choudhary R., Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Curr. Sci.* 89, pp 1103-1112.

Koller J., Bindzar T., Bížová J., Janda V. 2005. *Hydroanalytika*, pp 97.



Kuráň P., Nováková J., Janoš P. 2011. Možnosti stanovení uhlovodíků C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub> v kompostech a kalech metodou plynové chromatografie. Chem. Listy 105, pp 133-137.

Stroud J.L., Paton G.I., Semple K.T. 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. J. Appl. Microbiol. 102, pp 1239-1253.

Tyagi M., da Fonseca M.M.R., de Carvalho C. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation 22, pp 231-241.

Zelles L., Bai Q.Y., Beck T., Beese F. 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agriculture soils. Soil. Biol. Biochem. 4, pp. 317-323.