

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EKOLOGIE A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ



**Využití bakterií na dekontaminaci půdy znečištěné ropnými
polutanty**

Bakalářská práce

Zuzana Volková

Studijní obor:

Ochrana a tvorba životního prostředí

Vedoucí práce: RNDr. Petr Hekera, Ph.D.

Olomouc 2013

Volková Z.: Využití bakterií na dekontaminaci půdy znečištěné ropnými polutanty, Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 58 str., česky.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá deskripcí dekontaminace půdy znečištěné ropnými látkami, kterou prováděla firma EPS s.r.o. na dekontaminační ploše ostravském areálu skládek Centrálního odvalu Zárubek. Zemina byla na dekontaminační ploše deponována za účelem snížení koncentrace látek ropného charakteru, a to do takové míry, aby předmětný odpad splňoval limity tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 Vyhlášky 294/2005 Sb. a aby mohl být dále využíván v souladu s platnou legislativou. Pro bioremediaci *ex situ* byla použita schválená technologie EPS-PAL a EPS-INOK s využitím degradujících mikroorganismů (*Variovarax paradoxus*, *Gordonia tarrae*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*). K optimálnímu průběhu bioremediace byly vytvořeny a udržovány vhodné podmínky. Během bioremediačních prací byl prováděn pravidelný monitoring respiračních plynů, respiračních testů aktivity, koncentrace základních nutrientů, koncentrace heterotrofních a kontaminant degradujících mikroorganismů a samotného organického znečištění (koncentrace C₁₀-C₄₀). Na základě průběžných výsledků monitoringu byly bioremediační práce upravovány a zintenzivňovány. Závěrečným vzorkováním bylo potvrzeno splnění limitů pro využití půdy na povrchu terénu.

Klíčová slova: aerobní bioremediace *ex situ*, degradující mikroorganismy, dekontaminační plocha, deponie, organické znečištění

Volková Z.: Utilization of bacteriums for decontamination of soil polluted petroleum's pollutants. Bachelor Thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc, 58 pp., in Czech.

ABSTRACT

This thesis describes a ground decontamination polluted by petroleum products, conducted by the company EPS s.r.o. at the decontamination area in Ostrava, landfill complex Central attleheap Zárubek. The soil was deposited in the decontamination area to reduce concentrations of oil substances to such an extent that the mentioned refuse complies the limits of tables No. 10.1 and 10.2 of annex 10. Reg. 294/2005 Coll., and thus might be further used in accordance with actual legislation. Technology EPS-PAL and EPS-INOK with using degrading microorganisms (*Variovarax paradoxus*, *Gordonia tarrae*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*) was approved for bioremediation *ex situ*. Optimal conditions for bioremediation were established and maintained. Regular monitoring of respiratory gases, respiratory activity test, the concentration of essential nutrients, concentration heterotrophic and contaminat-degrading microorganisms and separate organic contamination (concentration of C₁₀-C₄₀) has been maintained during the bioremediation process. Based on the results of running monitoring were the biodegradation process modified and intensified. The final sampling confirmed the limits for the use of land on the surface.

Keywords: aerobic bioremediation *ex situ*, degrading microorganisms, decontamination area, dumping ground, organic pollution

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Hekery, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci 3. května 2013

.....

podpis

Obsah

Seznam tabulek	viii
Seznam obrázků	ix
Seznam zkratk	x
Poděkování	xi
1. ÚVOD	1
2. CÍLE	3
3. MATERIÁL A METODY	4
3.1 Sanační technologie	4
3.2 Základní metody biodegradací	5
3.2.1 Biodegradace <i>in situ</i>	7
3.2.2 Biodegradace <i>ex situ</i>	8
3.2.3 Rizikové skupiny mikroorganismů	9
3.2.4 Kontaminanty	10
3.3 Dekontaminace půdy znečištěné ropnými polutanty firmou EPS, s.r.o.	10
3.3.1 Deponovaný materiál	11
3.3.2 Platná legislativa	11
3.3.3 Plocha skládky nebezpečného odpadu	13
3.3.4 Technická příprava	15
3.3.5 Použitá technologie	18
3.3.6 Aplikovaná média	19
3.5 Experimentální část	22
3.5.1 Metodika odběru a úpravy vzorků	23
3.5.2 Metodika hodnocení výsledků	25
4. VÝSLEDKY	34
4.1 Aplikovaná média	34
4.2 Koncentrace respiračních plynů	35
4.3 Koncentrace základních nutrietů	35
4.4 Počty heterotrofních a degradujících mikroorganismů	37
4.5 Respirační testy aktivity	38
4.6 Vývoj koncentrací C ₁₀ -C ₄₀ v průběhu aktivních prací	38
4.7 Závěrečný monitoring	39

5. DISKUZE.....	41
6. ZÁVĚR	43
Seznam použité literatury.....	45
Přílohy	47
Příloha A Posouzení rozšíření katalogu odpadů v rámci technologie EPS-INOK.....	47

Seznam tabulek

Tabulka 1 Nejvýše přípustné koncentrace škodlivin v sušině odpadů.....	12
Tabulka 2 Požadavky na výsledky ekotoxikologických testů.....	12
Tabulka 3 Množství deponovaného odpadu k. č. 17 05 03.....	23
Tabulka 4 Množství aplikovaných médií na 1005,64 tun kontaminované zeminy.....	34
Tabulka 5 Rozbor zeminy dle Vyhlášky 294/2005 Sb.....	40
Tabulka 6 Rozbor zeminy ve vzorku RC-2 (matrice: odpad-výluh) dle Vyhlášky 294/2005 Sb.	40

Seznam obrázků

Obr. 1 Areál skládek COZ, letecký snímek	14
Obr. 2 Mobilní aplikační jehla	16
Obr. 3 Aplikační rozvody.....	17
Obr. 4 Bioreaktor	18
Obr. 5 <i>Gordonia terrae</i>	20
Obr. 6 <i>Variovorax paradoxus</i> , a) mikroskopický snímek, b) fotodokumentace.....	20
Obr. 7 <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a) gramovo barvení, b) <i>P. f.</i> na MPA	21
Obr. 8 Bakterie <i>Ralstonia eutropha</i>	21
Obr. 9 Biodegradační plocha společnosti EPS, s.r.o.	24
Obr. 10 Biodegradační plocha společnosti EPS, s.r.o. – detail	25
Obr. 11 Bakteriální inokulum v bioreaktoru firmy EPS, s.r.o.	26
Obr. 12 Terénní přístroj Anagas 98.....	27
Obr. 13 Rozvoj heterotrofních mikroorganismů po 24 h inkubaci, laboratoře firmy EPS, s.r.o.....	30
Obr. 14 Titrace pro určení množství vyprodukovaného CO ₂	32
Obr. 15 Vývoj koncentrace respiračních plynů.....	35
Obr. 16 Vývoj koncentrace nutrietů.....	36
Obr. 17 Chronologický vývoj počtu heterotrofních organismů (Sektor A1, A2 a A3) ..	37
Obr. 18 Chronologický vývoj počtu degradujících organismů (Sektor A1, A2 a A3) ..	37
Obr. 19 Respirační testy aktivity (Sektor A1, A2 a A3).....	38
Obr. 20 Vývoj koncentrací C ₁₀ -C ₄₀ (Sektor A1, A2 a A3)	39

Seznam zkratk

BTEX	Benzen, toluen, ethylbenzen a skupina xylenů
COZ	Centrální odval Zárubek
ČOV	Čistírna odpadních vod
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur
EOX	Extrahovatelné organické halogeny
FID	Flame ionization detektor, Plamenově izolační detektor
INOK	Inokulum
MPA	Masopeptonový agar
MŽP ČR	Ministerstvo životního prostředí České republiky
PAL	Povrchově aktivní látky
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenyly
PHM	Pohonné hmoty
PE	Polyethylen
TOL	Organické těkavé látky
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Hekerovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Děkuji také Ing. Vlastimilu Píšťkovi, Ing. Davidu Idesovi a celému kolektivu firmy EPS s.r.o. za spolupráci, vstřícnost a trpělivost. Také děkuji své rodině a přátelům za podporu a pomoc během celého studia.

1. ÚVOD

Činnost lidí přináší stále větší tlak na životní prostředí, které je znečišťováno množstvím polutantů. Tyto látky sice přispívají k modernímu životnímu stylu, ale zároveň mají v mnoha případech tendenci přetrvávat a akumulovat se v prostředí. Některé z nich mohou být potenciálním nebezpečím pro lidské zdraví i přírodu. Ta má jedinečnou schopnost zbavovat se především organických látek pomocí samočisticích procesů, při kterých dochází k jejich rozkladu nebo přeměně na látky méně škodlivé. Tento koloběh látek v přírodě však není dostatečný na to, aby si poradil se všemi škodlivinami. Proto je třeba podpořit přírodní procesy a napomoci revitalizaci prostředí. Jednou z cest je použití bioremediací při sanaci znečištěných lokalit.

V České republice se každoročně investuje velké množství finančních prostředků do odstraňování ekologických zátěží. Optimální sanační postupy a inovační technologie mohou významně ovlivnit průběh sanací, snížit finanční náročnost a zkrátit potřebný čas (Matějů 2006).

Bioremediace jsou zejména procesy spojené s využitím bakterií a mikroorganismů obecně pro přeměnu organických látek. Jedná se většinou o cílené použití určitého druhu na konkrétní znečišťující látku, což vede ke snížení kontaminace daného prostředí. Při tomto ději dochází k přeměně chemických sloučenin na látky méně nebezpečné a netoxické, v optimálním případě na vodu a oxid uhličitý (CO₂). Touto metodou lze vyčistit například odpadní a podzemní vody, půdy, kaly a plyny. Její nevýhodou je časová náročnost. Je však velmi šetrná k životnímu prostředí a ve srovnání s některými dalšími technologiemi relativně levná (Alexander 1999).

Sledovaná dekontaminace půdy probíhá na dekontaminační ploše v ostravském areálu skládek COZ (Centrálního odvalu Zárubek) pod vedením firmy EPS, s.r.o. Pro bioremediaci *ex situ* byla použita schválená technologie EPS-INOK využívající při rozkladu organického znečištění aktivity vybraných mikrobiálních kmenů *Variovarax paradoxus*, *Gordonia tarrae*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* a EPS-PAL využívající povrchově aktivních látek k uvolnění kontaminace adsorbované na matici odpadu. Aby měla biodegradace správný průběh, byly vytvořeny a udržovány patřičné podmínky. V průběhu bioremediace byly prováděny respirační testy aktivity, monitorovány respirační plyny, koncentrace základních živin, koncentrace heterotrofních a degradujících mikroorganismů a také organického znečištění (koncentrace C₁₀-C₄₀). Na základě výsledku monitoringu byly pak sanační

práce upravovány a zintenzivňovány za účelem zvýšení efektivity celé bioremediace. Na závěr byl zhotoven reprezentativní vzorek, který byl analyzován v akreditované laboratoři. Aby mohlo být s odpadem nakládáno dle Vyhlášky 294/2005 Sb (tzn. využití na povrchu terénu, v našem případě do „stavby“ v areálu skládek COZ), musí vzorek reprezentující 1005,64 tun biodegradovaného odpadu splňovat limity tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 Vyhlášky 294/2005 Sb. (Ides 2011).

2. CÍLE

Tato práce má dva konkrétní cíle.

Prvním cílem této studie je představit možnosti sanačních prací, které se používají k dekontaminaci zemin, přiblížit metody, technologie a procesy biodegradace.

Druhým cílem bylo zjistit, zda se u dané kontaminované zeminy snížila koncentrace látek ropného charakteru, aby daný odpad vyhověl limitům tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 Vyhlášky 294/2005 Sb. a mohl být dále využit.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Sanační technologie

V praxi dnes existuje celá řada sanačních technologií. Jde o zásah, při kterém dochází k přeměně znečišťujících látek obsažených v horninovém prostředí, povrchové i podzemní vodě a půdním vzduchu na látky, které nejsou nebezpečné životnímu prostředí, ani nezpůsobují poškození zdraví lidí. Na každý druh znečištění je zapotřebí jiný druh dekontaminace (Alexander 1999).

Sanační zásah začíná sanací primárního zdroje, kterým může být např. prasklá trubka, netěsnící nádrž nebo neekologická technologie. Nejprve se zamezí dalšímu šíření znečištění do horninového prostředí a odstraní se maximum kontaminovaných zemin v nesaturované zóně. Poté proběhne co nejdokonalejší průzkum a determinace polutantů v horninovém prostředí a v povrchové, resp. častěji v podzemní vodě, včetně stanovení jejich nebezpečnosti a stupně ohrožení životního prostředí, popř. zpracováním Analýzy rizik. Dále se přechází k sanaci sekundárního zdroje znečištění, jako je horninové prostředí, voda, vzdušné emise aj. Může se využít také monitorované přirozené či řízené atenuace při odstraňování zbytkových obsahů polutantů v horninovém prostředí. Přirozená atenuace je samovolný proces, kdy se dostává znečištěné prostředí samočisticím efektem do kvazi-původního stavu a daný polutant se rozloží (vlivem fyzikálních, chemických a biologických faktorů) nebo odtéká bez antropogenního zásahu. Při podporované atenuaci je atenuační proces podporován např. dodáním potřebných živin (fosforu a dusíku) kontaminant degradujícím mikroorganismům (Horák 2006).

Sanační technologie dělíme na pasivní, kde se znečištění pouze monitoruje, např. monitoring přirozené nepodporované atenuace, a aktivní, kde dochází k odstraňování znečištění, k jeho imobilizaci či k podporované atenuaci, při které dochází k přirozenému poklesu obsahu škodlivých látek ředěním, fytosanací, odpařováním, oxidací, redukcí, sorpcí na horninovou matici, biosorpcí. Sanace kontaminovaných lokalit se provádí pomocí různých technologií, které využívají různé biologické preparáty nebo technologie založené jen na fyzikálních a chemických metodách, jako jsou venting, termické a hydraulické metody, pračky zemin nebo těsnící a sanační stěny (Alexander 1999).

Venting patří mezi standardní technologie využívané k sanaci lokalit kontaminovaných těkavými polutanty. Metoda spočívá v extrakci nesaturované zóny atmosférickým vzduchem, který je odsáván ze sanačního vrtu.

Termické metody náleží ke klasickým technologiím likvidace odpadu. Moderní spalovny jsou vybaveny několikanásobnými odlučovači spalin. Přesto se tato technologie neobejde bez zbytkové kontaminace a určitého nebezpečí. Mezi tyto sanační metody patří i tzv. nízkoteplotní termická desorpce, která je naproti tomu bezodpadová a prakticky bezriziková.

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 (Horáková 2006).

Pračky zemin pracují na principu promývání odtěžené zeminy v mobilních jednotkách, přičemž se provádí obohacení inokulem a mechanická separace (Horák 2006).

Těsnící a sanační stěny. Těsnící stěny se používají k zakonzervování polutantu pod zemí. Tyto sanační stěny brání šíření polutantů, zejména prostřednictvím podzemní vody. Sanační stěny jsou naproti tomu pro vodu propustné, mají tzv. reakční brány, kde se využívá např. nanoželezo ke zneškodnění škodlivin, nebo sorbentů k jejich zachycení. Podzemní sorpční stěny jsou málo používané, spíše jako ochranný prvek, a jsou dost nákladné. Nebezpečí využívání sanačních stěn spočívá v možném lokálním překročení sorpční schopnosti stěny (Horáková 2006).

3.2 Základní metody biodegradací

Biodegradací se obecně rozumí biologické odbourávání organických látek. Tento proces provádějí zejména mikroorganismy, které jsou vzhledem k jejich intenzivnějšímu metabolismu ve srovnání s vyššími organismy vhodnější. Biodegradace se týká jak přírodních látek, tak zejména látek, které se do životního prostředí dostaly lidskou činností. Většina těchto antropogenních látek se v přírodě stává polutanty (Trögl 2011).

Mineralizace je úplná biodegradace toxické látky, která se v kontaminovaném prostředí rozkládá za přítomnosti mikroorganismů s metabolickou aktivitou na základní anorganické látky. Jde především o mikrobiální degradaci, na které se podílí různé skupiny hub a bakterií. Ty přímo rozkládají a přeměňují dané organické látky. Aby však měla degradace správný průběh, musí být splněna řada podmínek (Horáková 2006).

Při vlastní degradaci musí být organismus schopen produkovat vhodné enzymy, které jsou potřebné k dekontaminaci určitých organických látek. Osvědčilo se vhodně upravit podmínky tak, aby se mikroorganismy mohly lépe množit (Alexander 1999).

Faktory ovlivňující biodegradaci:

- teplota prostředí,
- hodnota pH,
- vlhkost,
- koncentrace potřebných nutričních prvků (N a P),
- míra difuze a sorpce degradované látky,
- přítomnost kyslíku v prostředí (biodegradace *ex situ*),
- koncentrace polutantu,
- koncentrace heterotrofních a degradujících mikroorganismů (Atlas 1981).

Bioremediační technologie charakterizujeme detoxikací a mineralizací polutantu na biomasu, CO₂ a vodu. Postup přeměny kontaminovaných látek začíná monitoringem kontaminovaného prostředí. Zjistí se nejvhodnější sanační metoda, a to jak z ekologického, tak i z finančního hlediska (Štulík 1987).

Biodegradace mohou být prováděny technologiemi, při kterých se degradace polutantu provádí přímo v místě kontaminace (*in situ*), půda tedy není odtěžována. 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 degradační proces je pod kontrolou a veškerá rizika dalšího znečištění jsou minimalizována (Horáková 2006).

Bioremediace má výhodu oproti jiným sanačním metodám v efektivním zničení daných znečišťujících polutantů, a tím znemožnění jejich akumulace (Banat et al. 2000). Dalšími přínosy jsou relativně nízké náklady a malé zásahy do životního prostředí (Edgington 1994). Kromě toho jsou organické znečišťující látky biologicky rozloženy na anorganické sloučeniny (např. CO₂, H₂O, Cl⁻), zatímco fyzikální a chemické procesy, např. vypařování, adsorpce a těžba jednoduše přenáší znečišťující látky do dalších míst (Head 1998). Enviromentální biotechnologie spoléhá na kapacitu přirozeně se vyskytujícího polutant-degradujícího konsorcia mikrobiálních kmenů, ve kterém hrají bakterie obvykle hlavní roli (Liu & Sutfita 1993).

3.2.1 Biodegradace *in situ*

Biodegradace *in situ* se provádí přímo v horninovém prostředí, kde již není možné aplikovat jiný typ sanačních metod. Jedná se např. o plochy podloží budov, dálnic, plochy ve velkých hloubkách a plochy s velkou rozlohou zasaženou kontaminanty (Hickey & Smith 1996).

Hlavními parametry dekontaminace jsou především typ znečišťující látky, koncentrace znečištění, teplota, obsah kyslíku popř. metanu a koncentrace dostupných živin. Pro získání nejlepších výsledků jsou regulovány různé parametry, a to hlavně rozmístění vrtů na celé ploše dekontaminace, režim čerpání a vtlačení aplikace do podloží (Gruntorád et al. 2000).

Nejběžnější biologické metody sanace *in situ* jsou bioventing, kometabolický bioventing, air sparging, podporovaná bioremediace, fytořemediace a rhizoremediace.

Bioventingem rozumíme odsávání vzduchu z horninového prostředí.

U kometabolického bioventingu je vháněn do nesaturované zóny vzduch a také látky, které mohou autochtonní mikroorganismy využít jako kosubstrát pro biologický rozklad přítomných polutantů.

Air sparging funguje na principu vhánění vzduchu do podzemní vody nebo do horninového prostředí, popř. jiného plynu např. butanu, pro zlepšení biologického rozkladu kontaminantů.

Podporovanou bioremediací rozumíme stimulaci aktivity autochtonních mikroorganismů např. zapouštěním roztoku živin do kontaminované zóny, podporu desorpce polutantů a jejich zpřístupněním biodegradaci zapouštěním roztoků povrchově aktivních látek apod. (Matějů 2006).

Fytořemediace je využití nejrůznějších rostlinných druhů při degradaci, extrakci či imobilizaci látek kontaminujících půdu či vodu (Cunningham & Ow 1996).

Při biodegradaci *in situ* je často na povrch čerpána podzemní voda, do které je přidáváno inokulum, živiny, popř. povrchově aktivní látky a která je následně opět zasakována. Tak je proces intenzifikován a při promývání horninového prostředí je zpravidla dosahována vysoká efektivita zásahu. Metoda vyžaduje schválení aplikace biopreparátu a obecně cizorodých látek do horninového prostředí příslušnými úřady (Krajský úřad, příslušný vodoprávní úřad).

Biodegradace *in situ* je výhodná v tom, že může být provedena na místě, eliminuje tedy náklady na dopravu, odstraňuje odpad trvale a velikost narušeného

prostoru tak může být minimalizována. Tato sanační technologie může být použita i pro zředěné a široce rozptýlené znečištění a je cenově dostupná (Tomotada & Masao 2001).

3.2.2 Biodegradace *ex situ*

Při biodegradaci *ex situ* dochází k odtěžení zeminy a k jejímu následnému odvozu na dekontaminační zařízení, kde probíhá dekontaminace za řízených podmínek. Tato sanační metoda se používá hlavně na kontaminované zeminy a kaly, které jsou převezeny na dekontaminační plochy, do kontejnerů, mobilních buněk nebo nádrží k tomu určených. Zmíněné dekontaminační plochy musí být schváleny jako zařízení pro nakládání s nebezpečným odpadem (Novotný 2005).

Provedení bioremediace *ex situ* se dělí na:

- *on situ* – sanační čištění a čerpání na povrchu terénu v místě sanace,
- *off situ* – čištění mimo prostor sanačních prací,
- kombinované – část se vyčistí na místě, část se odtěží a pak následně odveze na speciálně upravené plochy, které slouží k těmto účelům (ib.).

Stejně jako při aplikaci biologických metod *in situ* je nezbytné v ošetřovaném materiálu dosáhnout optimálních podmínek pro činnost degradujících mikroorganismů, zejména je důležité dbát na následující parametry: pH prostředí, vlhkost, koncentraci makrobiotických prvků a koncentraci terminálního akceptoru elektronů. Velmi důležitá je i biodostupnost molekul polutantů (Matějů 2006).

Zemina musí být před uložením homogenizována, promíchána, případně zvlhčena na požadovanou vlhkost nebo i „zlehčena“ přimísením např. slámy nebo jiného materiálu kvůli lepšímu provzdušnění při aerobním procesu. Vlastní dekontaminace probíhá na dekontaminačních plochách na nepropustné vrstvě s drenážemi pro odvádění přebytečné vody, při opakovaném zkrápění této plochy. Kontaminovaná zemina se rozhrne, nakypří, a tím dojde k potřebné aeraci a stimulaci biodegradačních procesů. Při aeraci se do zeminy vhání vzduch přes trubkový systém pomocí dmychadel, popř. kompresorů (Vaníček 2002).

Jedná se o ekonomicky výhodnou a účinnou biologickou metodu čištění půd a jiných pevných materiálů. Využívá se hlavně pro materiály znečištěné organickými polutanty, jako jsou ropné uhlovodíky, polycyklické aromatické uhlovodíky, fenoly,

mastné kyseliny, alkoholy a další. Nejvyšší možné vstupní koncentrace znečištění se liší podle typů znečišťujících látek. Obecně platí, že koncentrace znečištění v materiálu nesmí působit inhibičně. To se zjišťuje správně navrženými laboratorními testy, jejichž výsledky dávají spolehlivou odpověď na to, zda daný materiál je možné biologicky čistit (Kycil 2006).

Výhodou metody *ex situ* je také relativně vysoká rychlost vlastní biodegradace, dále možnost přímé kontroly účinnosti procesu, možnost zvýšení bonity vyčištěných zemín, možnost regulace pH, vlhkosti, teploty, podílu potřebných živin, koncentrace kontaminantů a v neposlední řadě také mikroorganismů. Hlavní nevýhodou je nutnost manipulovat s poměrně velkým objemem zemin (Alexander 1999).

3.2.3 Rizikové skupiny mikroorganismů

Mikroorganismy se z hlediska nebezpečnosti při práci v laboratoři dělí do čtyř rizikových skupin (WHO Risk Group) označených jako rizikové skupina 1, 2, 3 a 4. Jednotlivé rizikové skupiny mikroorganismů jsou charakterizovány následujícím způsobem:

- **Riziková skupina 1:** Mikroorganismy představují nulové nebo nízké individuální a společenské riziko. Onemocnění člověka je nepravděpodobné.
- **Riziková skupina 2:** Mikroorganismy představují střední individuální riziko a nízké společenské riziko. Mohou způsobovat onemocnění lidí a zvířat, ale nepředstavují závažné riziko pro laboratorní pracovníky, obyvatelstvo, hospodářská zvířata a životní prostředí. Expozice v laboratoři může vést ke vzniku závažného onemocnění, avšak preventivní opatření a účinná terapie jsou běžně dostupné. Riziko šíření infekce je omezené.
- **Riziková skupina 3:** Mikroorganismy představují vysoké individuální riziko a nízké společenské riziko. Běžně způsobují závažná onemocnění lidí a zvířat, ale obvykle se nepřenáší z jedince na jedince. Preventivní opatření a účinná terapie jsou dostupné.
- **Riziková skupina 4:** Mikroorganismy představují vysoké individuální a společenské riziko. Běžně způsobují závažná onemocnění lidí a zvířat a snadno se přenáší z jedince na jedince přímým nebo nepřímým způsobem. Obvykle není dostupná účinná terapie a preventivní opatření. (WHO 2004).

3.2.4 Kontaminanty

Kontaminanty mohou být látky anorganické i organické. Mezi anorganické látky řadíme především těžké kovy, kyanidy, amoniak a jejich soli. K organickým látkám patří látky málo těkavé, např. polyaromatické uhlovodíky (PAU) mimo naftalen, polychlorované bifenyly (PCB), fenoly a do této kategorie náleží i ostatní ropné uhlovodíky (prakticky motorová nafta a topné oleje). Poslední skupinou jsou organické látky těkavé, které se značí TOL. Tato skupina je velice obsáhlá a zahrnuje nižší alkany a alkeny s délkou řetězce do 11 atomů uhlíku, chlorované alifatické uhlovodíky včetně skupiny BTEX – benzen, toluen, etylbenzen a xylen (Horáková 2006).

Ropné látky jsou vyráběny buď destilací surové ropy, která je přírodní složkou a kapalným kaustobiolitem, nebo synteticky na její bázi. Její umělá přeměna při zpracování však mění i původní přirozený charakter a vytváří pro životní prostředí v podstatě cizorodé, špatně biologicky odbouratelné složky. Znečišťování půdy, a tím i ohrožování podzemních zdrojů pitné vody ropnými látkami, patří mezi nejproblematictější zásahy člověka do životního prostředí (Fuksa 2011).

Ropné látky dlouhodobě kontaminují půdu, a tím snižují její schopnost uvolňovat potřebné živiny pro vegetaci, která slouží jako potrava pro důležitý článek potravního řetězce – konzumenty I. řádu. Kromě toho ropné látky také znemožňují biologický rozklad přirozené organické hmoty i některých lehce biologicky rozložitelných odpadů a jejich přirozenou mineralizaci (ib.).

Pro dekontaminaci půdy znečištěné ropou a ropnými produkty jsou nejčastěji využívány bioremediační technologie. U ropných uhlovodíků probíhá biodegradace v aerobním i anaerobním prostředí. Aerobní proces je v našich poměrech častější, avšak pouze nad hladinou podzemní vody, v podpovrchové vodě je nutné kyslík dodat pomocí air spargingu. Bioremediace v aerobním prostředí spočívá ve využití kyslíku a dalších oxidantů jako terminálních akceptorů elektronů, přičemž ropné látky jsou zde substrátem pro růst bakteriálních populací (Kotrba 2005).

3.3 Dekontaminace půdy znečištěné ropnými polutanty firmou EPS, s.r.o.

Vlastní aktivní bioremediační práce společnosti EPS, s.r.o. byly zahájeny po návozu kontaminované zeminy do jednotlivých sektorů, tedy od dubna 2011. Pro snížení

koncentrace organických polutantů ropného charakteru byly zvoleny technologie společnosti EPS, s.r.o. – EPS-PAL a EPS-INOK. Průběh bioremediace byl pravidelně monitorován a podle potřeby upravován. Na základě průběžných výsledků a závěrečných analýz byla daná biodegradace ukončena v říjnu 2011.

3.3.1 Deponovaný materiál

Na sledovanou biodegradační plochu byl navezen odpad katalogového čísla 17 05 03 - Zemina a kamení obsahující nebezpečné látky (druh odpadu dle MŽP ČR) v množství 1005,64 tun. Tyto kontaminované zeminy vznikly v rámci odstraňování starých ekologických zátěží z lokality SO-16/II – kolejiště stáčíště PHM u válcoven C, D v areálu Třineckých železáren, a.s., kde se manipulovalo s ropnými látkami a jejich deriváty. Celý odpad byl klasifikován jako „N“ – nebezpečný odpad.

Všechny vstupní dokumentace jako vstupní laboratorní analýzy, základní popisy odpadů, evidenční listy apod. jsou uloženy u společnosti EPS, s.r.o., která tyto odpady převzala jako oprávněný příjemce na svou dekontaminační plochu v areálu COZ v Ostravě k provedení jejich dekontaminace (Ides 2011).

3.3.2 Platná legislativa

Kontaminované zeminy a kaly jsou dle zákona o odpadech č. 185/2001 Sb. nebezpečné látky. Zacházení s těmito látkami na dekontaminačních plochách je dále upraveno vyhláškou Ministerstva životního prostředí a ministerstva zdravotnictví č. 376/2001 Sb. Hodnocení nebezpečných vlastností odpadů a vyhláškami Ministerstva životního prostředí č. 381/2001 Sb. Katalog odpadů, č. 383/2001 Sb. O podrobnostech nakládání s odpady, č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu.

Výsledný dekontaminovaný materiál by měl vyhovět limitům tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 k Vyhlášce 294/2005 – Požadavky na obsah škodlivin v odpadech využívaných na povrchu terénu. Zmíněná tabulka č. 10.1 popisuje nejvýše přípustné koncentrace škodlivin v sušině odpadů (tabulka č. 1), tabulka č. 10.2 stanovuje požadavky na výsledky ekotoxikologických testů (tabulka č. 2).

Tabulka 1 Nejvýše přípustné koncentrace škodlivin v sušině odpadů (© Inisoft.cz)

Ukazatel	Limit (mg/kg sušiny)
As	10
Cd	1
Cr	200
Hg	0,8
Ni	80
Pb	100
V	180
Suma BTEX	0,4
Kvantita RU (C10-C20)	300
Suma PAU	6
EOX	1
Suma PCB	0,2

Tabulka 2 Požadavky na výsledky ekotoxikologických testů (© Inisoft.cz)

Testovaný organismus	Doba působení (h)	Vyhodnocení I.
<i>Poecilia reticulata</i> nebo <i>Brachydanio rerio</i>	96	ryby nesmí vykazovat v ověřovacím testu výrazné změny chování ve srovnání s kontrolními vzorky a nesmí uhynout ani jedna ryba
<i>Deaphnia magna Straus</i>	48	procento imobilizace perlooček nesmí v ověřovacím testu přesáhnout 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky
<i>Raphidocelis subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornotum</i>) nebo <i>Scenedesmus subspicatus</i>	72	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice růstu řasy větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky
Semena <i>Sinapis alba</i>	72	neprokáže se v ověřovacím testu inhibice růstu kořene semene větší než 30 % ve srovnání s kontrolními vzorky

Po splnění těchto limitů se na tyto odpady se vztahuje Osvědčení o vyloučení nebezpečných vlastností odpadů č. Os/06/09/DM.

Projekt, v rámci kterého probíhá tato činnost, je realizován na základě „ekologické smlouvy“ mezi společností Třinecké železářny a.s. a státem (Ministerstvem financí ČR) a řeší odstranění ekologických zátěží vzniklých před privatizací.

V bakalářské práci jsou výsledky získané z laboratoře EPS, s.r.o. vyhodnoceny a graficky zpracovány pomocí Microsoft Office Excel, všechny testy v laboratořích byly v souladu s vyhláškou č. 294/2005 Sb. a č. 383/2001 Sb.

3.3.3 Plocha skládky nebezpečného odpadu

Rozsáhlý prostor mezi bývalými převýšenými odvaly důlní hlušiny COZ v Ostravě je díky své poloze ideální místo pro provoz zařízení ke zneškodňování a využívání odpadů s ohledem na rozsah starých ekologických zátěží v Ostravě a okolí, které je nutno postupně likvidovat (obr. 1). Technické řešení zařízení odpovídá příslušným normám a legislativním předpisům pro oblast nakládání s odpady (AWT Rekultivace 2013).

Dekontaminační plocha firmy EPS, s.r.o. se nachází přímo v COZ v nadmořské výšce 226 m n. m. Tato plocha byla uvedena do provozu v lednu roku 2009 na základě Integrovaného povolení dle zákona č. 76/2002 Sb. a spadá do kategorie 5.1 Zařízení na odstraňování nebo využívání nebezpečného odpadu a zařízení k nakládání s odpadními oleji, vždy o kapacitě vyšší než 10 tun denně, dle zákona č. 76/2002 Sb.



Obr. 1 Areál skládek COZ, letecký snímek (© <http://mapy.cz>)

Dekontaminační plocha je v současné době provozována v zatím nevyužívané kazetě vybudované pro skládkování nebezpečných odpadů. Pro kazety byl navržen kombinovaný těsnicí systém, tvořený vrstvami dvojího materiálu: minerální těsnění 5×200 mm (5 vrstev hutněných postupně po 200 mm) a hydroizolační folie PEHD tloušťky 2 mm. Na této těsnicí vrstvě je provedena ochranná drenážní vrstva netkanou geotextilií $1\ 200$ g/m² a plošná drenáž z říčního štěrku. Pro účel biodegradace je izolační a drenážní systém kazety chráněn další vrstvou geotextilie, 500 mm drceného kameniva a panely.

Plošnou drenáží prochází páteřní drén, který ústí do přečerpávací jímky průsakových vod a následně pokračuje do akumulární jímky, odkud je průsaková voda odvážená cisternami na ČOV. Všechny záchytné jímky jsou izolovány folií PEHD.

Pod folií v kazetě je nainstalován geoelektrický systém pro kontrolu těsnosti izolační folie. Vlastní systém se skládá ze snímacích elektrod rozložených po celé ploše pod izolační folií, spojovacích vodičů od jednotlivých snímačů k monitorovacímu centru, odkud se při měření snímají data do počítače a následně vyhodnocují. Měření těsnosti probíhá na principu vodivosti (Ides 2011).

3.3.4 Technická příprava

K biodegradaci půdy je zapotřebí různé technické vybavení, a to nejen k samotné činnosti, ale také pro monitoring. Na biodegradační ploše byla použita tato technická zařízení:

- mobilní aplikační jehla,
- aplikační a respirační sondy,
- aplikační rozvody,
- čerpadlo,
- bioreaktory.

Mobilní aplikační jehlou byla prováděna tlaková injekce bakteriálního roztoku, živin a povrchově aktivních látek. Aplikační jehla je jednoduchá trubka, která se zavede do odpadu a s její pomocí se aplikuje inokulum či jiné kapalné medium, které je přiváděno k jehle hadicí (obr. 2). Tato jehla se využívala vždy při aplikaci kapalných médií s výjimkou zvlhčování odpadu (voda je aplikována povrchovým rozstříkem).



Obr. 2 Mobilní aplikační jehla (© EPS, s.r.o.)

Kapalná média byla aplikována také pomocí aplikačních sond v počtu 15 ks. Sonden byly předvrtány ruční vrtanou soupravou EJKELKAMP a poté byly vystrojeny ocelovými trubkami průměru 32 mm, které byly perforovány u paty sondy. Pro cílené zintenzivnění biodegradace do potřebných míst byla používána mobilní aplikační jehla (viz výše).

Respirační sondy pro monitoring respiračních plynů v deponovaném odpadu byly na lokalitě umístěny v počtu 3 ks v sektoru A1 až A3. Tyto sondy byly mobilně přemísťovány v rámci své prostorové dispozice příslušného sektoru (přibližně na stejná místa) deponie. Respiračními sondami byla sledována koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého v půdním vzduchu. Sonden byly předvrtány a vystrojeny obdobně jako sondy aplikační s tím, že měly poloviční průměr a byly perforovány v délce 1,0 m od paty sondy. Pouze jejich ústí bylo vybaveno odběrovými ventily tak, aby jimi mohly být odsávány vzorky půdního vzduchu.

Od nádrže a čerpadel byly nainstalovány plastové aplikační rozvody z polyethylenu odolné povětrnostním vlivům (obr. 3). Jejich průměr se mohl v délce rozvodů měnit. Byly ukončeny aplikační koncovkou, která umožnila připojení mobilního aplikačního čerpadla tj. aplikační nádrž (bioreaktoru), dmychadla.



Obr. 3 Aplikační rozvody (© EPS, s.r.o.)

Na lokalitě bylo používáno mobilní aplikační velkoobjemové čerpadlo typu FS45TL, 2 ks 4m³ bioreaktoru a bioreaktor o objemu 10 m³ (obr. 4). Jako aplikační nádrž sloužila 4m³ ocelová nádrž pro potřeby zvýšení vlhkosti sanovaného odpadu a jeho povrchu vodou, zejména v teplém období (Ides 2011).



Obr. 4 Bioreaktor (© EPS, s.r.o.)

3.3.5 Použitá technologie

Pro snížení koncentrace organických látek ropného charakteru byla využita technologie EPS-INOK využívající k degradaci organického znečištění aktivity určitých druhů mikroorganismů. K urychlení biodegradace v prvních měsících bylo pro uvolnění kontaminace adsorbované na pevné matrici odpadu využito technologie EPS-PAL, využívající biologicky rozložitelných povrchově aktivních látek.

Technologie EPS-PAL slouží ke zvýšení rozpustnosti hydrofobních organických látek díky přidavku vybrané povrchově aktivní látky, čímž se ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti horninového prostředí – zvyšuje se rozpustnost a mobilita kontaminantů. Typická molekula PAL je dipólová, hydrofóbní část je orientována k nepolární látce a hydrofilní část je orientována do vodného prostředí. Vzniká tak adsorpční polymolekulární vrstva, jejíž prostorové uspořádání se nazývá micela a v důsledku toho dochází k rozpouštění hydrofobních organických látek. (Sotolářová 2005).

EPS-INOK je bioremediační technologie, která využívá aktivity konkrétních kontaminant degradujících alochtonních (vnesených) mikroorganismů ke konverzi kontaminujících látek vedoucích k úplné mineralizaci kontaminantů na anorganické

látky, tj. v přírodě se běžně vyskytující CO₂ a H₂O. Technologie využívá vybrané, již otestované, bezpečné mikrobiální kmeny, které jsou schopny využívat sanované kontaminanty jako jediný zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Tyto vybrané mikroorganismy jsou pomnoženy a následně jako inokulum („INOK“) aplikovány do kontaminovaného materiálu (Brhelová 2004).

Konkrétní konsorcium mikrobiálních kmenů bylo vybráno především v závislosti na kvalitě odstraňovaného kontaminantu ze schválených kmenů technologie EPS-INOK. Jedná se o tyto organismy: *Variovarax paradoxus*, *Gordonia tarrae*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*. Tyto bakterie nevyvolávají onemocnění u lidí a zvířat dle kritérií WHO (riziková skupina 1) a je možná jejich vzájemná kombinace pro dosažení optimálních výsledků dekontaminace. Mikroorganismy jsou schopné růstu v prostředí obsahujícím pouze základní minerální živiny (N, P) a jimi degradované uhlovodíky, mají sníženou citlivost ke změnám teploty a pH prostředí (viz příloha A).

3.3.6 Aplikovaná média

Do zájmového prostoru byla v rámci bioremediačních prací aplikována tato média:

A. Degradující mikroorganismy (*Gordonia tarrae*, *Variovarax paradoxus*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*) jsou zahrnuty v technologii EPS-INOK. Jako zdroj uhlíku a energie využívají tyto bakterie ropné polutanty, dochází tak k aerobní degradaci a přítomné kontaminanty jsou rozloženy až na oxid uhličitý a vodu. Aplikace vybraných mikrobiálních kmenů byla prováděna aplikačním čerpadlem příp. gravitačně aplikačními rozvody z aplikační nádrže.

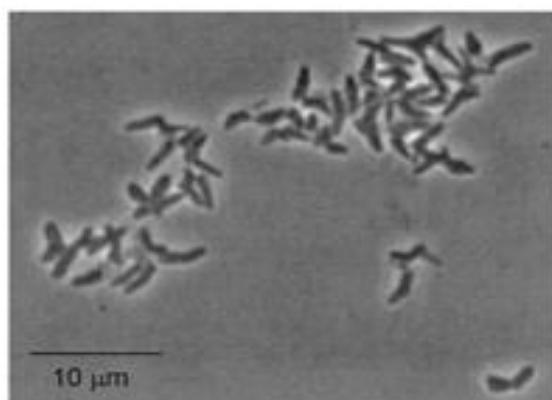
Bakterie *Gordonia terrae* CCM 2633 (obr. 5) vytváří nepravidelné kolonie koloidních a tyčinkovitých útvarů, výrazně červené pigmentace, které se často shlukují do „trsů“ o velikosti převážně do 1 mm v průměru a jsou nepohyblivé. Pro její schopnost přeměňovat a využívat C-zdroje (kromě alifatických uhlovodíků) – naftu, letecký petrolej, olej, ropu, naftalen, fenol, toluen je její využití velmi vhodné k biodegradaci.



Obr. 5 *Gordonia terrae* (© EPS, s.r.o.)

Další použitou bakterií je *Variovorax paradoxus* (obr. 6). Její kolonie jsou nepravidelné, hladké, lesklé, mírně vypouklé, nažloutlé, mírně slizovité, tvořící rovné nebo nepatrně zakřivené krátké silné tyčinky, které někdy řetízkují. Využívají C-zdroje (kromě alifatických uhlovodíků) – fenol, naftalen, toluen, ropu, olej, letecký petrolej, naftu. Vzhledem k přítomnosti pigmentů v buněčných strukturách vykazuje popisovaný taxon tendenci utilizovat látky na bázi nepolárních sloučenin, je schopen využívat ropné uhlovodíky různých délek svého řetězce a z nepříliš častých zdrojů uhlíku.

a)

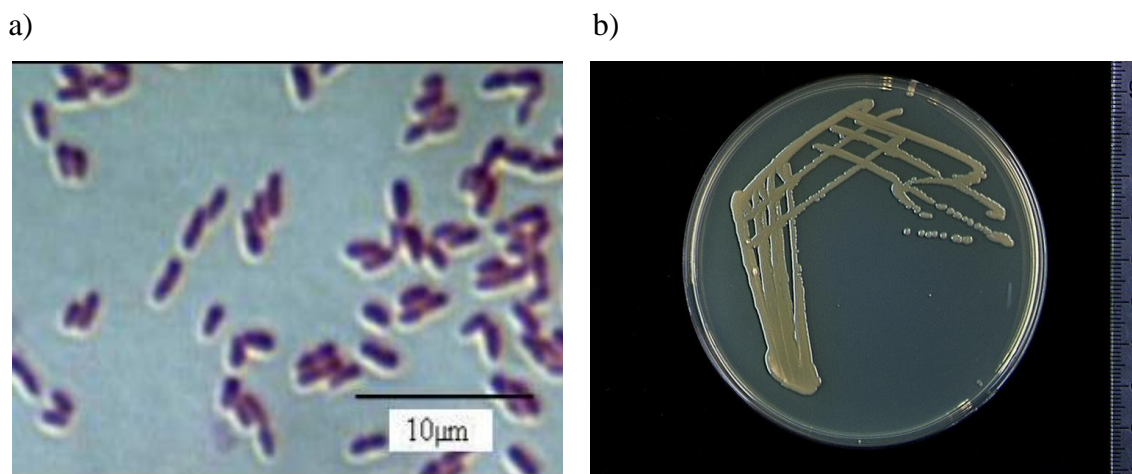


b)



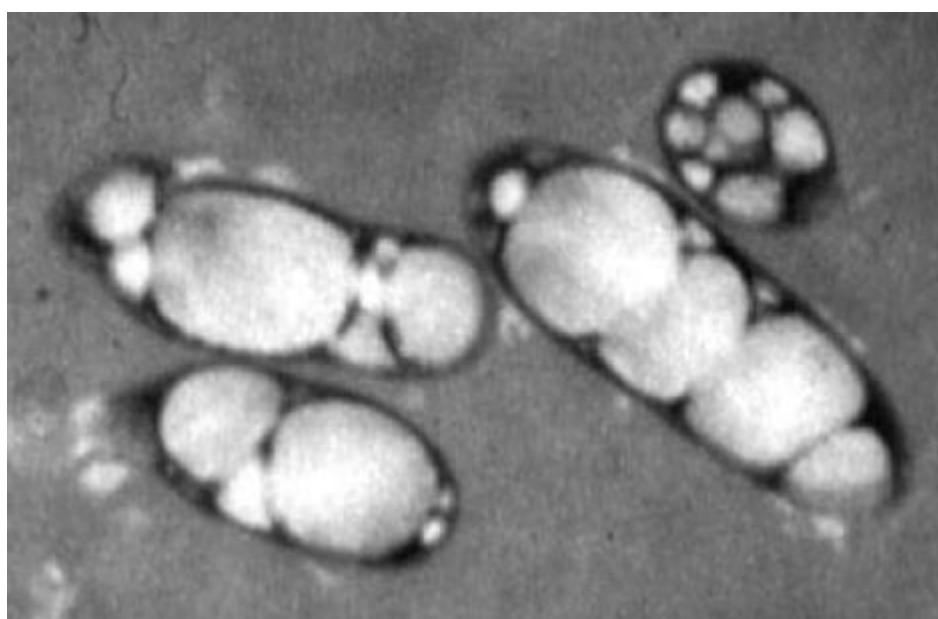
Obr. 6 *Variovorax paradoxus*, a) mikroskopický snímek (© EPS, s.r.o.), b) kultivace na Petriho misce (© EPS, s.r.o.)

Třetí mikrob je aerobní bakterie *Pseudomonas fluorescens* 1K (obr. 7) ve tvaru rovných nebo mírně zakřivených tyčinek. Vyskytují se jednotlivě, v nepravidelných shlucích a pohybují se. Kolonie mají bělavou barvu, jsou kulaté, lesklé, hladké, mírně vypouklé a mají souvislý okraj.



Obr. 7 *Pseudomonas fluorescens*, a) gramovo barvení (© EPS, s.r.o.), b) *P. f.* na MPA (© EPS, s.r.o.)

Posledním použitým degradujícím mikroorganismem je gram negativní bakterie *Ralstonia eutropha* (obr. 8). Tato bakterie tvoří tyčinky a je fakultativně anaerobní. V nepřítomnosti O_2 využívá tento organismus denitrifikace. Jako zdroj energie může sloužit celá řada organických látek (Cramm 2009).



Obr. 8 Bakterie *Ralstonia eutropha* (©<http://ecobiomaterial.com>)

B. Základní nutrienty

Nutrienty jsou důležité výživné látky pro správný vývoj a množení mikroorganismů. Důležité biogenní prvky, jako je fosfor a dusík, byly aplikovány ve formě roztoku. Jako zdroj nutrietů byla použita obecně známá a používaná hnojiva jako např. NP-sol, síran amonný aj. Ideální poměr C:N:P byl stanoven na 100:10:1 (Eweis et al. 1998). Tento správný poměr a zdroje živin byly nutné zejména na začátku bioremediačního procesu, kdy dochází k nárůstu degradační populace. Další aplikace byly realizovány přiměřeně v rámci aplikace bakteriálního inokula.

C. Vzdušný kyslík

Vzdušný kyslík je nutný pro rozklad ropných látek během nejefektivnější a nejrychlejší aerobní biodegradace. Baktérie vdechují O_2 , rozkládají ropné látky a vydechují CO_2 . Kyslík byl do horninového prostředí (v oblasti intenzivní degradace ropných látek) saturován kontinuálně dmychadlem aplikačními sondami, množství O_2 v zeminách (v nesaturované zóně) se monitorovalo respiračními měřeními na respiračních sondách. Na základě výsledků monitoringu byl upravován režim dávkování vzduchu do jednotlivých aplikačních sond kulovými ventily. Dostatečné provzdušnění kontaminovaného odpadu bývá kromě vzduchování aplikačními objekty zajištěno také pravidelným přehrnováním, převrácením a kypřením.

D. Povrchově aktivní látky

K uvolnění adsorbovaného znečištění na půdní matrici odpadu bylo využito povrchově aktivní látky REO 801, která je dobře rozložitelná degradujícími mikroorganismy. Roztok PAL byl použit zejména při zahájení aktivních bioremediačních prací.

3.5 Experimentální část

V rámci bakalářské práce jsem se zabývala otázkou, zda lze pomocí bioremediace dekontaminovat zamořenou zeminu ropnými polutanty a pak ji následně znovu použít.

Chtěla bych ověřit poznatky z teoretické části bioremediace *ex situ* a zjistit, zdali dojde ke změně vlastností vůči původnímu složení kontaminované půdy.

Na bioremediační plochu firmy EPS, s.r.o. byl během března 2011 navezen odpad zemin a kamení z míst, kde se manipulovalo s ropnými látkami a jejich deriváty. Tyto kontaminované půdy pocházely z odstraňování starých ekologických zátěží z lokality Třineckých železáren, a.s. Množství navezených odpadů předaných společnosti EPS, s.r.o. k bioremediaci je uvedeno v tabulce 3.

Koncem března došlo nejprve k celkovému smíchání. Poté byla zemina rozdělena do tří přibližně stejných sektorů A1 až A3 z důvodu lepšího monitoringu bioremediačních procesů. Tyto sektory byly následně patřičně označeny. Na závěr zde byly rozmístěny aplikační plastové rozvody od dostupné technologie.

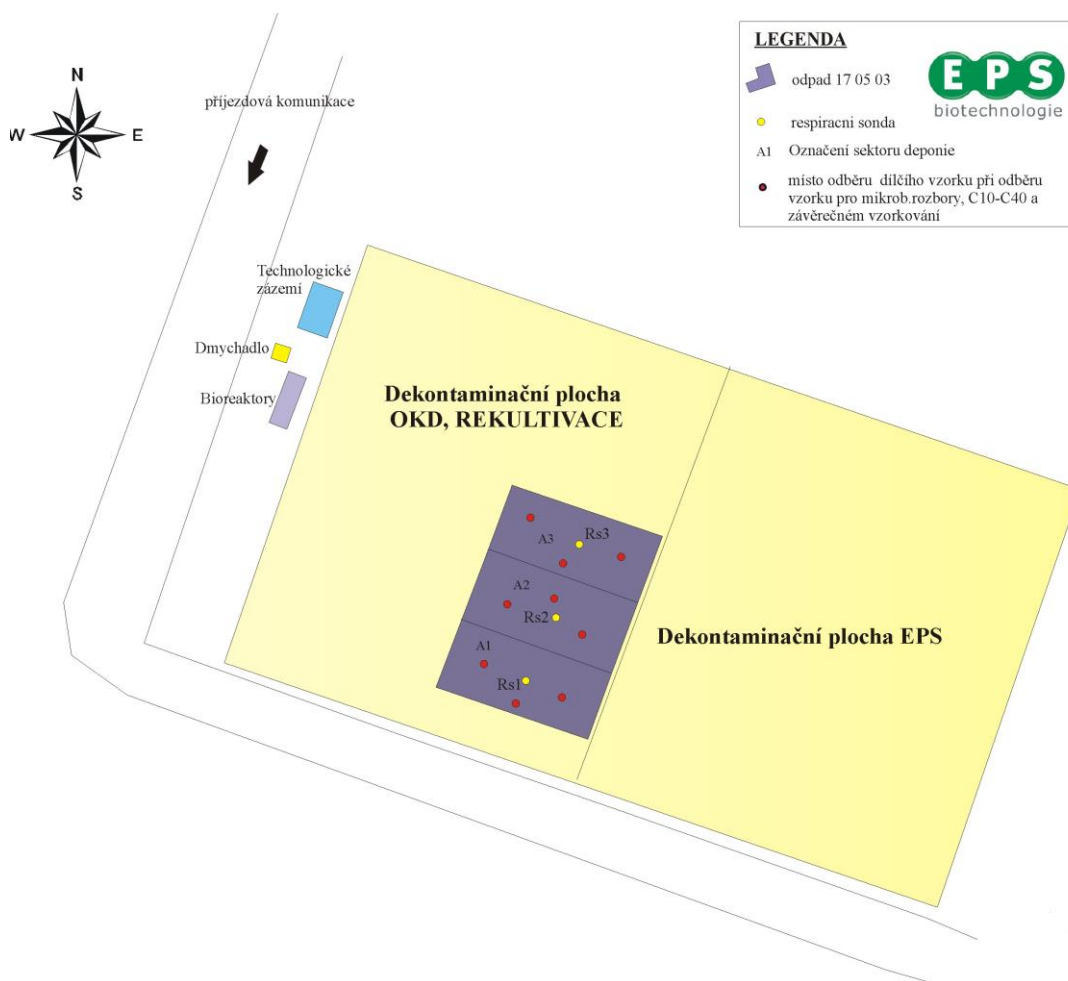
Na dekontaminační ploše v Ostravě v areálu skládek COZ byly od dubna do října 2011 odebrány vzorky a prováděna kontrolní měření. Vzorky byly v měsíčních intervalech odesílány do laboratoře EPS, s.r.o. a podle zjištěných hodnot byl proces bioremediace korigován.

Tabulka 3 Množství deponovaného odpadu k. č. 17 05 03

Návoz k datu	Množství tun	Dopravce/původce, původ
22. 3. 2011	237,04	AWT, a.s./ UNIGEO, a.s., objekt SO–16/II – Třinecké železářny, a.s.
23. 3. 2011	241,52	AWT, a.s./ UNIGEO, a.s., objekt SO–16/II – Třinecké železářny, a.s.
24. 3. 2011	423,02	AWT, a.s./ UNIGEO, a.s., objekt SO–16/II – Třinecké železářny, a.s.
25. 3. 2011	104,06	AWT, a.s./ UNIGEO, a.s., objekt SO–16/II – Třinecké železářny, a.s.
Celkem:	1005,64	

3.5.1 Metodika odběru a úpravy vzorků

V každém sektoru byly pomocí ruční vibrační soupravy EJKELKAMP s výnosem vrtného jádra odebrány tři kusy dílčích vzorků, označených červeně (obr. 9).

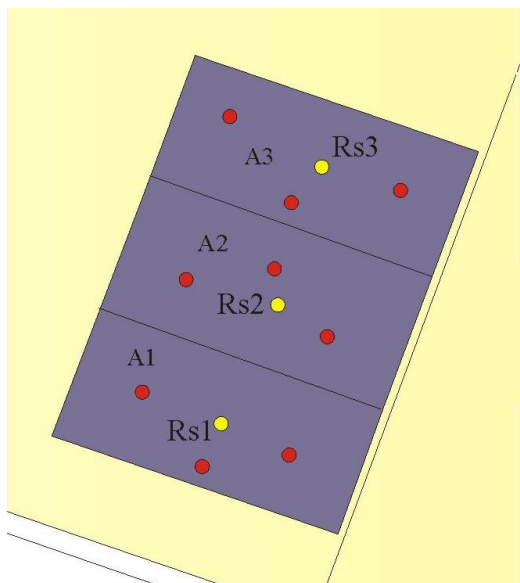


Obr. 9 Biodegradační plocha společnosti EPS, s.r.o. (© EPS, s.r.o.)

Dílčí vzorek byl sestaven z celého vrtného profilu v místě realizace sondy. Vzorky ze sekcí A1 až A3 byly homogenizovány a smíšeny v míse. Pomocí kvartování a tím zmenšování objemu vznikl reprezentativní vzorek o hmotnosti 3 kg, který byl patřičně označen podle sektoru (A1 až A3), uložen v PE sáčku do termoboxu a odvezen do laboratoře. Laboratorní vzorky byly uchovány v chladničce při teplotě od 2 do 5 °C. Zpracování bylo zahájeno co nejdříve po odběru, do 24 hodin.

Totéž se dělo i se vzorky odebranými pro stanovení koncentrace základních nutrietů, bakteriálního oživení, respiračních testů aktivity a průběžného stanovení koncentrací C₁₀-C₄₀.

Respirační plyny byly odebírány a měřeny na respiračních sondách. Vždy bylo realizováno jedno měření za měsíc. Respirační plyny byly měřeny přístrojem Anagas 98 na jedné sondě v každém sektoru označené na obrázku RS1 až RS3 žlutou barvou (obr. 10).



Obr. 10 Biodegradační plocha společnosti EPS, s.r.o. – detail (© EPS, s.r.o.)

Při závěrečném vzorkování bylo postupně odebráno 9 dílčích vzorků (3 ks z každého sektoru A1 až A3), ze kterých byl smíchán reprezentativní vzorek RC-2. Odběr a úprava vzorku se shodovala s postupem úpravy průběžných vzorků při monitoringu bioremediace. Vzorek zeminy byl odeslán do akreditované laboratoře ALS Czech Republic v Praze, kde byly rozborů závěrečného vzorkování provedeny.

3.5.2 Metodika hodnocení výsledků

Aplikovaná média

V bioreaktorech umístěných přímo u dekontaminační plochy bylo připraveno inokulum vybraných mikroorganismů k dekontaminaci ropných látek v dané půdě (obr. 11). Pomocí aplikačních rozvodů a postřiku bylo toto inokulum následně zavedeno do kontaminované zeminy v sektorech A1 až A3. K optimálnímu průběhu bioremediace byly vytvořeny a udržovány vhodné podmínky.



Obr. 11 Bakteriální inokulum v bioreaktoru firmy EPS, s.r.o. (© EPS, s.r.o.)

Respirační plyny

Měření kyslíku a oxidu uhličitého bylo uskutečněno pomocí tří respiračních sond (RS1 až RS3) terénním přístrojem Anagas 98 (obr. 12).



Obr. 12 Terénní přístroj Anagas 98 (© EPS, s.r.o.)

Základní nutrienty

Pro správný rozvoj alochtonních heterotrofních mikroorganismů a hlavně pak degradujících mikroorganismů jsou zapotřebí základní nutriční prvky, jako je dusík a fosfor. Tyto prvky byly do kontaminované zeminy dodávány ve formě roztoků běžně používaných hnojiv. Průběžný monitoring koncentrace těchto prvků ukazoval, zda je jich v daném prostředí dostatek, či je nutné tyto prvky dodat. Fosfor byl dodáván formou hnojiva NP-sol, amonné ionty pomocí síranu amonného. Měření probíhalo jednou měsíčně.

Postup pro stanovení koncentrace základních nutrietů

Při stanovení nutrietů u zemin byl nejprve připraven vodný výluh, což je roztok, který vznikne při styku zeminy s vodou ve stanoveném poměru a za stanovených podmínek vyluhování.

Pro přípravu vodného výluhu je nutné znát hmotnostní podíl sušiny v zemině. Prázdna odpařovací miska byla nejméně 30 min vysušována v sušárně při teplotě

105 °C. Po ochlazení v exsikátoru na laboratorní teplotu (minimálně 45 min) byla zvážena s přesností alespoň na 10 mg. Podle očekávaného obsahu vody bylo do odpařovací misky odváženo přiměřené množství vzorku tak, aby získaná sušina měla hmotnost nejméně 0,5 g. Miska se vzorkem byla opět vysušována v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Po ochlazení v exsikátoru na laboratorní teplotu byla odpařovací miska s vysušeným obsahem zvážena. Z rozdílu hmotnosti vzorku před sušením a po sušení byl vypočten hmotnostní podíl sušiny.

Pro přípravu samotného vodného výluhu bylo do vzorkovnice naváženo takové množství vzorku, které odpovídá 100 g jeho sušiny a bylo přidáno tolik destilované vody, aby poměr vody a pevné fáze (v přepočtu na vysušený vzorek) byl 10:1. Podmínky vyluhování jsou definovány teplotou mezi 15 až 25 °C, 24 h styku obou fází a oddělením filtrací.

Uzavřená vzorkovnice byla umístěna do třepačky. Po šesti hodinách třepání a osmnácti hodinách sedimentace byl výluh oddělen filtrací od pevné fáze. Nejdříve byla provedena předběžná filtrace přes papírový filtr, poté byla použita vakuová filtrace přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Dále bylo provedeno kontrolní měření pH vzorku pomocí pH papírku, protože pro stanovení amonných iontů i fosforečnanů pomocí setů od firmy Merck je zapotřebí, aby měl daný vzorek pH v rozmezí hodnot 4 až 13 (meze detekce spektrofotometru). Pokud vzorek tuto podmínku nesplňuje, musí být před stanovením na tuto hodnotu pH upraven přidávkem roztoku hydroxidu sodného nebo kyseliny sírové. V mém případě nebylo nutné pH upravovat.

Postup pro stanovení amonných iontů

Do zkumavky bylo odpipetováno 5 ml vzorku vodného výluhu zeminy, který byl vytemperován minimálně na 20 °C. Bylo přidáno 0,6 ml činidla NH₄-1B (vinan v silně alkalickém prostředí NaOH) a obsah zkumavky byl promíchán. Poté byla přidána jedna mikrolžička suchého chloračního činidla NH₄-2B (dihydrát dichlorisokyanuratanu sodného), která je součástí modrého šroubovacího uzávěru zásobní lahvičky. Zkumavka byla uzavřena a protřepávána tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění činidla a pak se nechala 5 min stát. Nakonec byly přidány 4 kapky činidla NH₄-3B (nitroprusid sodný, thymol a 2-propanol), směs byla zamíchána a nechala se stát dalších 5 min.

Koncentrace amonných iontů byla změřena na spektrofotometru AquaMate při vlnové délce 690 nm v kyvetě optické dráhy 1 cm. Zbarvení bylo stálé jednu hodinu.

Postup pro stanovení fosforečnanů

Do zkumavky bylo odpipetováno 5 ml vzorku vody. Bylo přidáno pět kapek činidla P-1A (anorganické sloučeniny v prostředí kyseliny sírové), které bylo do vzorku zamícháno. Potom byla přidána jedna mikrolžička činidla P-2A (kyselina askorbová), která je součástí modrého šroubovacího uzávěru zásobní lahvičky. Zkumavka byla uzavřena a protřepávána tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění činidla. Poté se nechala 5 min stát. Koncentrace fosforečnanových iontů byly změřeny na spektrofotometru AquaMate při vlnové délce 690 nm v kyvetě optické dráhy 1 cm. Zbarvení bylo stálé jednu hodinu.

Pro dané analýzy byla použita činidla z reagenčního testu Spectroquant® firmy Merck. Na základě výsledků laboratoře EPS, s.r.o. bylo následně doporučeno dávkování výše uvedených nutrientů.

Heterotrofní a degradující mikroorganismy

Pro rozklad ropných polutantů bylo aplikováno do zeminy inkulum mikroorganismů. Nejprve byly odebrány vzorky zemin ze sektorů A1 až A3, které byly poslány do laboratoře EPS, s.r.o. Zde byly navozeny vhodné podmínky, jako je stálá teplota, dostatečná koncentrace kyslíku a správná vlhkost, pro rozvoj heterotrofních i degradujících mikroorganismů. Podle výsledků pak bylo určeno dávkování inokula pro správný chod bioremediace. Koncentrace daných mikroorganismů byla také monitorována během celé dekontaminace, aby byl ověřen správný rozvoj těchto bakterií a účinnost bioremediace.

Nejprve bylo naváženo 10 g vzorku do sterilní Erlenmeyrovky baňky. Poté bylo přidáno 100 ml roztoku $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Baňka byla protřepávána na třepačce po dobu 30 min a následně se nechal obsah 5 min ustát. Jeden ml výchozí suspenze byl přenesen do 9 ml fyziologického roztoku (ředění 10^{-1}). Jeden ml takto připraveného roztoku byl přenesen do další zkumavky s fyziologickým roztokem. Opakováním tohoto postupu byla připravena ředící řada.

Postup pro stanovení kultivovatelných heterotrofních mikroorganismů

Na specifickou kultivační půdu bylo rozetřeno 0,2 ml vzorku vhodného ředění. Jako kultivační prostředí byl použit Plate Count Agar od HiMedia Laboratories, Čaderský-
envitek, spol s.r.o., na který bylo napipetováno 0,2 ml vzorku vhodného ředění a pomocí sterilní skleněné tyčinky byl dokonale rozetřen po povrchu. Po zaschnutí při laboratorní teplotě byly misky umístěny dnem vzhůru do inkubátoru s teplotou 20 až 25 °C po dobu 48 h. Po inkubaci byly vybrány inkubované plotny obsahující méně než 300 kolonií a na každé z nich byly spočítány všechny kolonie (obr. 13).



Obr. 13 Rozvoj heterotrofních mikroorganismů po 24 h inkubaci, laboratoře firmy EPS, s.r.o. (© EPS, s.r.o.)

Postup pro stanovení kultivovatelných degradujících mikroorganismů

Jako kultivační prostředí byl použit Agar Powder (obohacený o KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$). Na Petriho misku bylo rozetřeno sterilní skleněnou tyčinkou 0,1 ml nafty, která slouží jako jediný zdroj uhlíku a energie. Po absorpci C-zdroje bylo na misku odpipetováno 0,2 ml vzorku vhodného ředění a pomocí sterilní skleněné tyčinky bylo dokonale rozetřeno po povrchu. Po zaschnutí při laboratorní teplotě byly misky umístěny dnem vzhůru do inkubátoru s teplotou 20 až 25 °C na osm až deset dnů. Po inkubaci byly vybrány inkubované plotny obsahující méně než 300 kolonií a na každé z nich byly spočítány všechny kolonie.

Respirační testy aktivity

Aktivita aplikovaných mikroorganismů byla měřena pomocí respiračních testů.

Postup při stanovení respirační aktivity

Do sterilní lahve byl přenesen homogenní vzorek zeminy v množství, který odpovídá přibližně 100 g sušiny vzorku. Dále byla upravena vlhkost přidávkem asi 10 ml sterilní destilované vody. Do lahve byla poté vložena zkumavka s 20 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Zkušební vzorek byl kultivován po dobu jednoho týdne v hermeticky uzavřeném systému bez přístupu světla. Na počátku kultivace byl ve vzorku stanoven počet heterotrofních a degradujících mikroorganismů. Oxid uhličitý, který vznikal v průběhu biodegradačního procesu, byl zachycován v roztoku hydroxidu sodného. Množství vyprodukovaného oxidu uhličitého bylo stanoveno z rozdílu výsledků acidimetrických stanovení na začátku a na konci kultivace.

Na začátku acidimetrické titrace roztoku NaOH bylo odměřeno 5 ml roztoku NaOH o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do titrační baňky. Objem byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Byly přidány dvě kapky fenolftaleinu (0,5% indikátorového roztoku) a za stálého míchání byla prováděna titrace odměrným roztokem HCl o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ proti bílé podložce až do odbarvení indikátoru (obr. 14).

Po ukončení kultivace bylo odebráno 5 ml roztoku ze zkumavky v kultivační lahvi. Objem byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml a při titraci se postupovalo výše uvedeným způsobem.



Obr. 14 Titrace pro určení množství vyprodukovaného CO₂ (© EPS, s.r.o.)

Koncentrace C₁₀-C₄₀

V laboratořích společnosti EPS, s.r.o. byly také zjišťovány provozní koncentrace organického znečištění v dekontaminované zemině pomocí plynové chromatografie.

Postup pro stanovení obsahu uhlovodíků C₁₀-C₄₀ plynovou chromatografií

Nejprve bylo do 100 ml extrakční baňky naváženo 10 g původního homogenizovaného vzorku s přesností 0,1 g a bylo přidáno 20 ml acetonu. Vzorek byl krátce ručně protřepán a bylo přidáno 10 ml standardu RTW obsahující dekan a tetrakontan. Vzorek byl extrahován po dobu jedné hodiny třepáním. Po usazení byl zfiltrován přes skládaný filtrační papír do dělicí nálevky. Aceton byl odstraněn promytím organické fáze 2 x 100 ml vody. Organická fáze byla vypuštěna do skleněné zkumavky a byl přidán bezvodý síran sodný. Po krátkém protřepání byla část extraktu převedena do 5 ml vialky a byla

přidána jedna lžička Florisilu. Po usazení byl vzorek převeden do 2 ml vialky a analyzován plynovou chromatografií pomocí plynového chromatografu CP-3800 (Varian) s FID detektorem s autoinjektorem CP-8410 (Varian). S každou sérií vzorků byl analyzován slepý vzorek, který byl připraven stejně jako reálný vzorek.

4. VÝSLEDKY

Aktivní bioremediační činnost na odpadu katalogového čísla 17 05 03 v množství 1005,64 tun byla prováděna od dubna 2011 do října 2011. Pro snížení koncentrace ropných polutantů byla zvolena bioremediace *ex situ* s využitím technologií společnosti EPS, s.r.o. - EPS-INOK využívající pro degradaci organického znečištění speciálních bakteriálních kmenů a EPS-PAL pro uvolnění adsorbovaného nečištění na pevné matrici odpadu.

4.1 Aplikovaná média

Podpůrné práce byly nejvíce intenzivní na začátku bioremediace pro zkrácení tzv. lag fáze, klidového období, kdy dochází k rozvoji mikroorganismů. Tato fáze se zkracuje dodáním živin, vody, inokula a povrchově aktivních látek na minimum, aby měla bioremediace co nejkratší nástup (tabulka 4). Průběh bioremediace je závislý také na množství deponovaného odpadu, jeho kvantitativní a kvalitativní kontaminaci, klimatickém období apod.

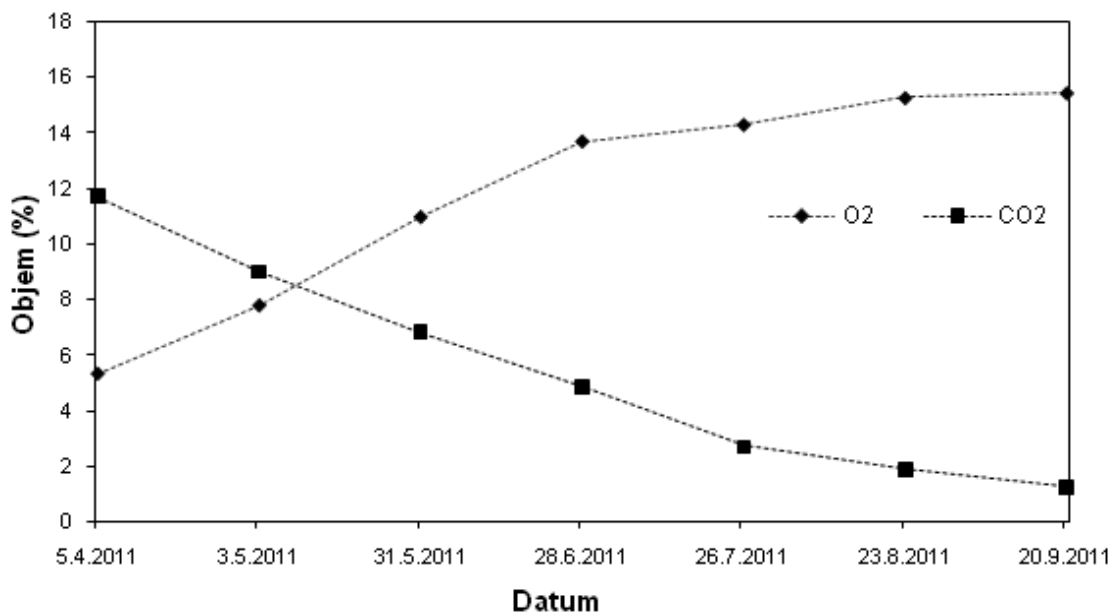
Tabulka 4 Množství aplikovaných médií na 1005,64 tun kontaminované zeminy

Období aplikace	Voda (m ³)	Inokulum (m ³)	Nutrienty (m ³)	Vzduch (m ³)	PAL (m ³)
Duben 2011	5	10	3	15 000	2
Květen 2011	10	25	2	30 000	1
Červen 2011	10	25	1	30 000	-
Červenec 2011	15	25	-	35 000	1
Srpen 2011	15	25	1	35 000	-
Září 2011	10	20	-	30 000	-
Říjen 2011	-	-	-	2 000	-

Optimální vlhkosti se docílilo zkrápěním cca 65 m³ vody, bakteriálního inokula bylo aplikováno cca 130 m³, roztoku s PAL byly využity cca 4 m³ a bylo dodáno cca 7 m³ roztoku se základními nutrienty. Aplikacími sondami bylo saturováno cca 177 000 m³ vzduchu.

4.2 Koncentrace respiračních plynů

Průběh koncentrace půdních plynů se značně měnil (obr. 15).

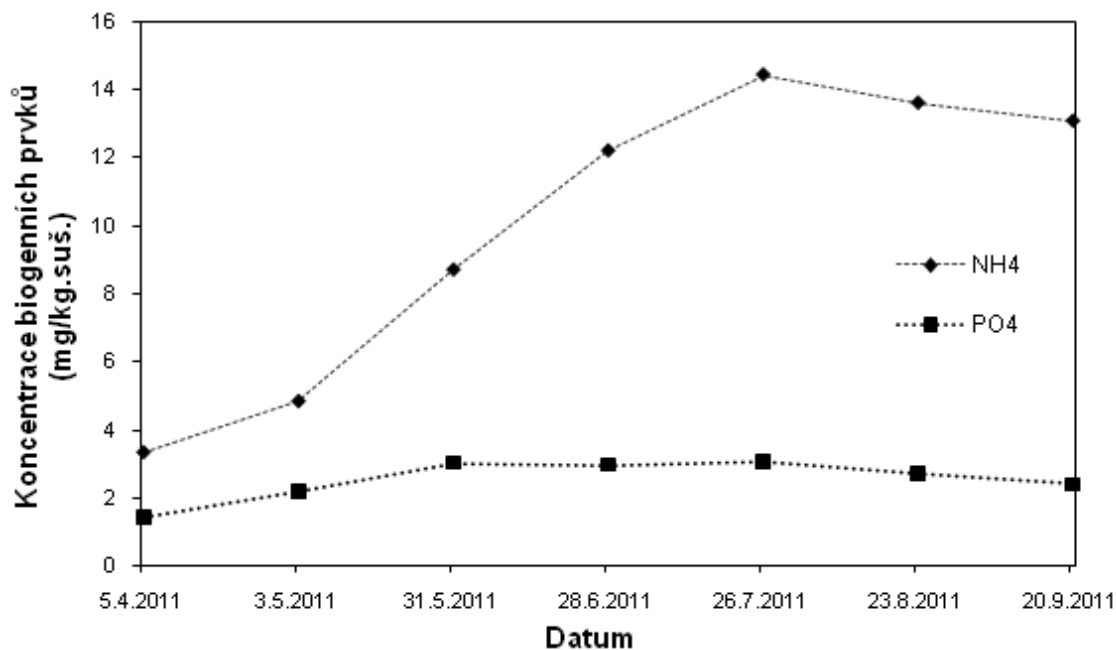


Obr. 15 Vývoj koncentrace respiračních plynů

Po navezení a úvodní aplikaci inokula a živin byly zaznamenány vysoké koncentrace CO₂ a nízké koncentrace O₂. Kyslík je potřebný pro rozvoj a vegetaci mikroorganismů, proto byl do kontaminované půdy dodáván. Během biodegradace koncentrace O₂ neklesla pod limitní hranici 4 obj. %, což signalizuje správný vývoj dekontaminace. Naproti tomu hodnoty oxidu uhličitého postupně klesají, jelikož dochází k saturaci prostředí atmosférickým vzduchem a k postupnému snižování koncentrace ropných polutantů v tělese deponie.

4.3 Koncentrace základních nutrietů

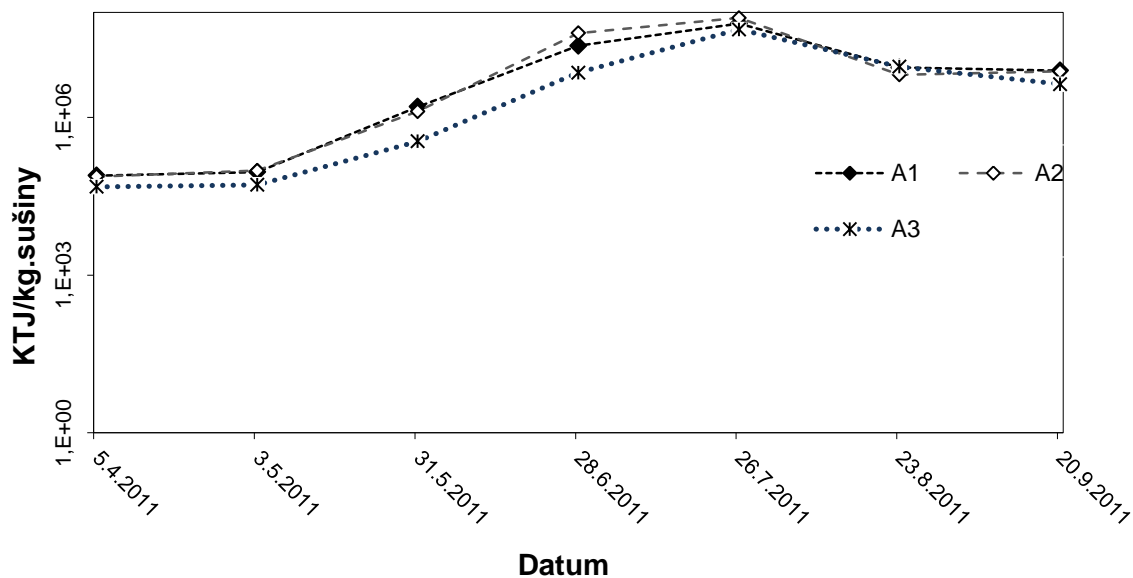
Již z prvního měření bylo patrné, že bude potřeba dodat dostatečné množství živin pro správný a přijatelně rychlý vývoj bioremediace. Následně tedy byly aplikovány roztoky hnojiva NP-sol a (NH₄)₂SO₄ zejména v měsíci dubnu a květnu. Koncentrace se postupně zvyšovala do požadovaných intervalů s odpovídajícím poměrem N:P v rozmezí 10–20:1, což je ideální poměr nutrietů pro daný typ aplikovaných bakterií (obr. 16).



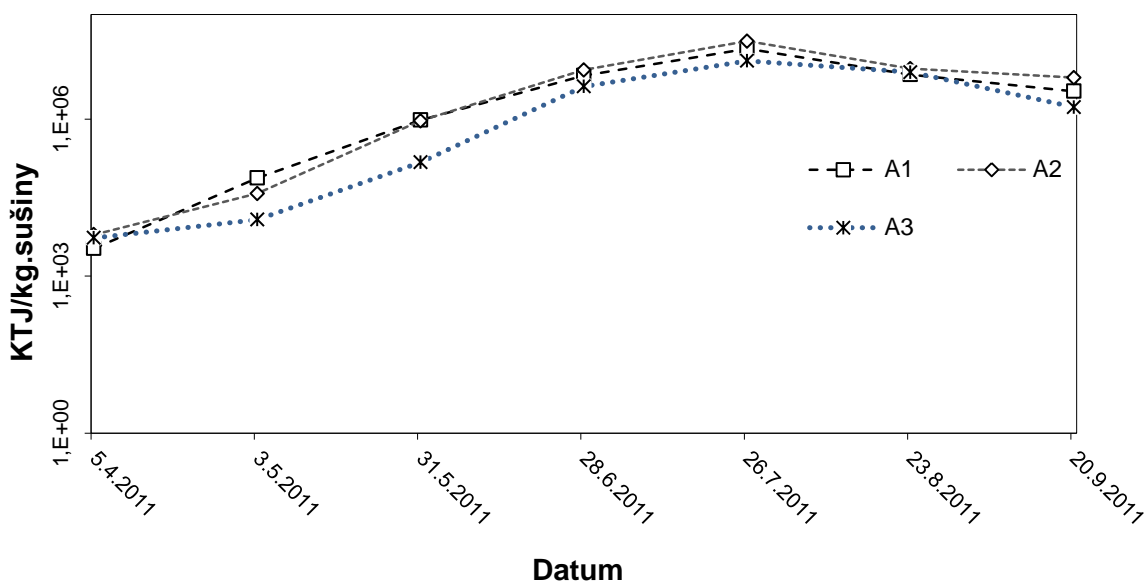
Obr. 16 Vývoj koncentrace nutrietů

Koncentrace fosforečných živin byla ze začátku zvolna navyšována, následně udržována na základě mikrobiologických analýz na požadované hodnotě a v závěru koncentrace postupně klesala se spotřebováním nutrietů mikroorganismy. Naproti tomu koncentrace dusíkatých živin stoupala až do srpna, poté zvolna klesala. Důvod vyšší dávky hnojiv byl ve vyšším zatížení zeminy organickými polutanty a možnosti následné přirozené atenuace po ukončení aktivních prací.

4.4 Počty heterotrofních a degradujících mikroorganismů



Obr. 17 Chronologický vývoj počtu heterotrofních organismů (Sektor A1, A2 a A3)



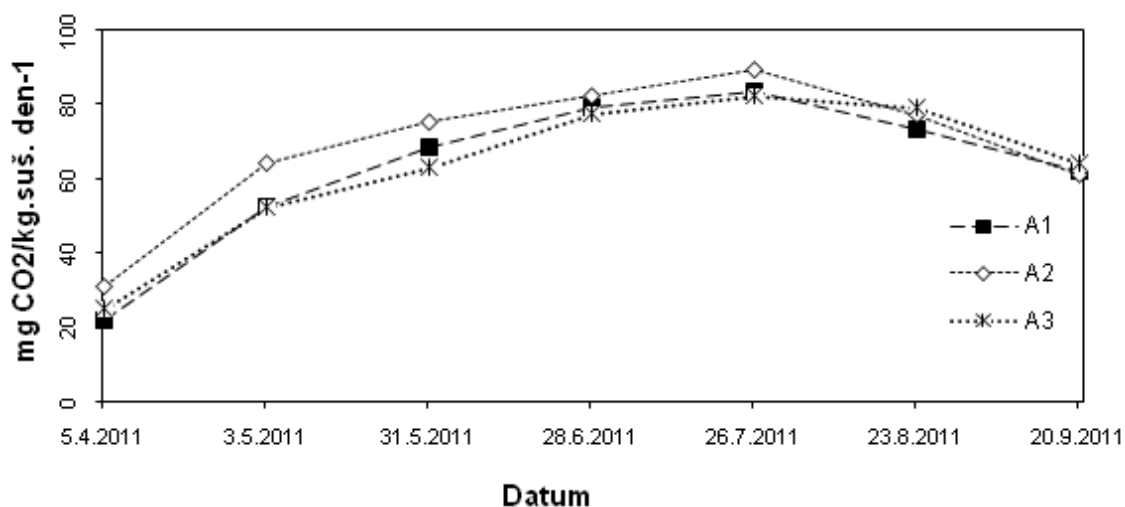
Obr. 18 Chronologický vývoj počtu degradujících organismů (Sektor A1, A2 a A3)

Nárůst koncentrace obou sledovaných skupin mikroorganismů je vysoká – až o tři řády (obr. 17, 18). Koncentrace degradujících organismů stoupala díky aplikaci inokula, živin a vzdušného kyslíku. Dosahovala hodnot v řádu až 10^6 KTJ/g.suš. Rozvoj mikroorganismů má za následek i zvýšenou aktivitu v rozkladu ropných polutantů.

Jakmile dojde ke snížení koncentrace ropných látek v zemině, sníží se i počet mikroorganismů, což signalizuje zdárný průběh a nastupující závěr bioremediace.

4.5 Respirační testy aktivity

V laboratořích společnosti EPS, s.r.o. byly každých 14 dní prováděny respirační testy aktivity mikroorganismů, které byly přítomny v dekontaminované zemině (obr. 19).

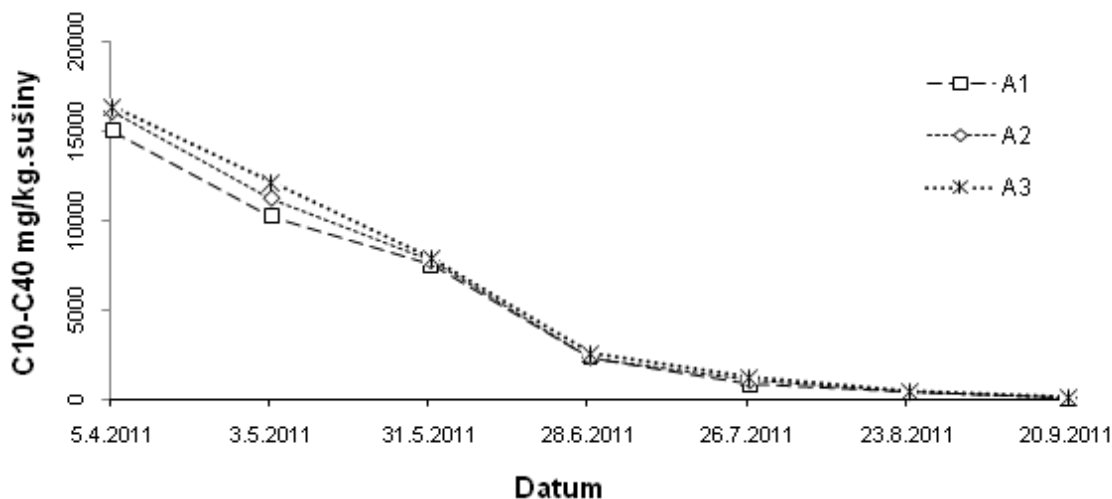


Obr. 19 Respirační testy aktivity (Sektor A1, A2 a A3)

Podle výsledků respiračních testů aktivity mikroorganismů bylo zjištěno, že po zahájení aktivních bioremediačních prací došlo k výraznému nárůstu rychlosti bioremediace, tedy i ke zvýšení aktivity daných bakterií (produkce CO₂ až 89 mg⁻¹kg.suš.den⁻¹). Respirační testy aktivity mikroorganismů potvrzovaly správnou rychlost rozvoje bakterií a průběh bioremediace.

4.6 Vývoj koncentrací C₁₀-C₄₀ v průběhu aktivních prací

Vývoj koncentrací C₁₀-C₄₀ charakterizoval stav znečištění (kvantitu) kontaminované zeminy (obr. 20).



Obr. 20 Vývoj koncentrací $C_{10-C_{40}}$ (Sektor A1, A2 a A3)

První měření koncentrace $C_{10-C_{40}}$ ukazuje hodnoty znečištění v průměru 15 830 mg/kg.suš, po zahájení aktivních prací, dodáním inokula a živin, došlo k poklesu tohoto znečištění. Znamená to tedy, že koncentrace $C_{10-C_{40}}$ klesá s dobou aplikace bioremediačních prací. Můžeme také pozorovat, že znečištění je v kontaminované zemině rozmístěno heterogenně, čemuž byla také uzpůsobena obsluha a řízení bioremediačních prací na dané lokalitě se zaměřením na jednotlivé sektory deponie.

4.7 Závěrečný monitoring

Vzorek zeminy pro závěrečnou analýzu se nijak nelišil od vzorků průběžného monitoringu. Po patřičném označení, byl uložen do termoboxu a odvezen do laboratoře společnosti ALS Czech Republic v Praze.

Reprezentativní vzorek zeminy pro závěrečný monitorig RC-2 byl odebrán pro analytické prokázání stanovených cílových limitů sanace podle splnění tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 dle Vyhlášky č. 294/2005 Sb. Termín závěrečného vzorkování bývá zvolen podle průběžných výsledků monitoringu, které by měly ukazovat splnění sanačních cílů a ukončení bioremediace (tabulka 5, 6).

Tabulka 5 Rozbor zeminy dle Vyhlášky 294/2005 Sb. (© EPS, s.r.o.)

Ukazatel	RC-2 (mg/kg suš.)	10.1 Vyhl. 294/05 Sb.	
		Limit	Vyhodnocení
Sušina při 105 °C	98,8	-	-
As	1,75	10	vyhovuje
Cd	<0,4	1	vyhovuje
Cr	5,53	200	vyhovuje
Hg	<0,2	0,8	vyhovuje
Ni	2,6	80	vyhovuje
Pb	7,2	100	vyhovuje
V	5,1	180	vyhovuje
Suma BTEX	<0,17	0,4	vyhovuje
Kvantita RU (C10-C20)	<20	300	vyhovuje
Suma PAU	<0,12	6	vyhovuje
EOX	<1,0	1	vyhovuje
Suma PCB	<0,14	0,2	vyhovuje

Zemina, která byla navezena na dekontaminační plochu firmy EPS, s.r.o., vykazovala určitý stupeň znečištění. Jeho měření vykazovalo obsahy toxických prvků (tab. 3) - arsen, kadmium, chrom, rtuť, nikl, olovo, vanad, také hodnoty EOX (Extrahovatelné organické halogeny), PAU, PCB, sumu BTEX a kvantitu C₁₀-C₄₀.

Z těchto analýz vyplývá, že reprezentativní vzorek zemin, deponovaný na dekontaminační ploše společnosti EPS, s.r.o. v areálu COZ Ostrava po úpravě formou bioremediace splňuje limity tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 Vyhlášky 294/2005 Sb. a odpad je tak možno dále využívat v souladu s platnou legislativou.

Tabulka 6 Rozbor zeminy ve vzorku RC-2 (matrice: odpad-výluh) dle Vyhlášky 294/2005 Sb. (© EPS, s.r.o.)

Parametr	Vyhodnocení testů	Vyhodnocení I.
Akutní toxicita na akv. rybách <i>Poecilia reticulata</i>	průměrná mortalita 0%	vyhovuje
Akutní toxicita na perloočkách <i>Deaphnia magna</i>	průměrná imobilizace 0%	vyhovuje
Test na sladkovodních řasách	průměrná inhibice 5,2%	vyhovuje
Test na semenech vyšších rostlin <i>Sinapis alba</i>	průměrná stimulace <1,0%	vyhovuje

5. DISKUZE

Prvním cílem této práce bylo seznámení se studovanou oblastí sanací zemin. Byly zmíněny používané sanační technologie a základní metody bioremediací. Také byly popsány rizikové skupiny mikroorganismů a kontaminanty.

Druhým cílem bylo zjistit, zda se u dané zeminy snížila koncentrace látek ropného charakteru, tak aby výsledný dekontaminovaný materiál vyhověl limitům tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 Vyhlášky 294/2005 Sb., tzn. využití na povrchu terénu, v našem případě do „stavby“ v areálu skládek COZ. Po výše popsaných aktivních bioremediačních pracích tento odpad limitům vyhověl.

Podle výsledků respiračních testů aktivity mikroorganismů bylo zjištěno, že po zahájení aktivních bioremediačních prací došlo k výraznému nárůstu rychlosti bioremediace, tedy i ke zvýšení aktivity daných bakterií – produkce CO₂ až 89 mg/kg-suš·den⁻¹. Je však nutné zmínit to, že vypočtené rychlosti rozkladu ropných uhlovodíků na základně laboratorního testu v optimálních a stálých podmínkách jsou oproti reálnému stavu na lokalitě o určité procento nadhodnoceny.

V průběhu bioremediačních procesů stoupla koncentrace degradujících organismů až na maximální hodnotu 107 KTJ/g-suš.

Stav znečištění kontaminované zeminy byl charakterizován vysokými koncentracemi C₁₀-C₄₀. Vstupní koncentrace sledovaných polutantů byla v průměru 15 830 mg/kg-suš. Po zahájení bioremediace však tyto koncentrace klesaly. Tato skutečnost potvrdila správnou účinnost biodegradace. Koncentrace ropných látek klesala až do konce června 2011, kdy došlo ke zpomalení poklesu a koncentrace se již pomalu přibližovaly podlimitním hodnotám, které prokazovaly zdařilou bioremediaci.

Bioremediace vedla k tomu, že původně kontaminovaná zemina označená jako druh odpadu katalogového čísla 17 05 03 – „Zemina a kamení obsahující nebezpečné látky s celkovou klasifikací jako nebezpečný odpad“ ztratila své nebezpečné vlastnosti, a tím byla vyřazena z této kategorie. Na tyto odpady se vztahuje Osvědčení o vyloučení nebezpečných vlastností odpadů č. Os/06/09/DM. Díky bioremediaci klesla koncentrace ropných látek až na podlimitní hodnotu (hodnota kolem 100 mg/kg-suš), a tak odpad splnil cílové limity sanace tabulek č. 10.1 a 10.2 přílohy č. 10 Vyhlášky 294/2005 Sb.

S takto upravenou zemínou lze dále nakládat v souladu s Vyhl. 294/2005 Sb., tzn. využití na povrchu terénu, v našem případě do „stavby“ v areálu skládek COZ.

Důležité je stanovení výstupní kvality zeminy. Jelikož se daná dekontaminační plocha nachází přímo v areálu skládek COZ, nabízí se tu možnost vyvézt takto upravenou zeminu přímo do skládky jako materiál skupiny N (nebezpečný odpad) bez ukončení bioremediace (důvody bývají většinou finanční). Pokud jsou na výstupní kvalitu zeminy nároky vyšší, bioremediace probíhá až do splnění požadovaných limitů.

Závěrečné dokumentační zprávy o bioremediacích jsou zpravidla interními dokumenty firem, proto v tomto případě nebylo možné průběh ani výsledky porovnat s jinými studiemi.

6. ZÁVĚR

Popisovaný odpad katalogového čísla 17 05 03 – „Zemina a kamení obsahující nebezpečné látky s celkovou klasifikací jako nebezpečný odpad“ byl v období od dubna 2011 do října 2011 deponován na dekontaminační ploše v Ostravě společnosti EPS, s.r.o.

Několikrát jsem se podílela na odběru reprezentativních vzorků pod vedením pana Ing. D. Idese, odpovědného technologa firmy EPS, s.r.o. Zúčastnila jsem se také rozborů v rámci průběžného monitoringu v laboratořích firmy EPS, s.r.o. v Kunovicích.

Bioremediace probíhala formou *ex situ*. Pro snížení koncentrace ropných uhlovodíků byly použity technologie společnosti EPS, s.r.o. – EPS-INOK a EPS-PAL. Konsorcium bakterií zahrnovalo kmeny *Variovarax paradoxus*, *Gordonia tarrae*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, které dokáží rozkládat ropné látky v ideálním případě až na oxid uhličitý a vodu. Povrchově aktivní látky pomáhaly zvýšit rozpustnost a mobilitu kontaminantů a tím usnadnily průběh bioremediace.

Hlavním záměrem byla optimalizace podmínek s cílem úspěšné biodegradace cílového polutantu. Jednalo se o udržení správného množství degradujících mikroorganismů, kyslíku, dostatku vlhkosti, základních živin a v neposlední řadě ovlivnění biodostupnosti polutantu povrchově aktivními látkami.

Podle průběžných laboratorních testů byly bioremediační práce upravovány a zintenzivňovány. Pravidelně byly měřeny respirační plyny, respirační testy aktivity, koncentrace základních živin, koncentrace heterotrofních a degradujících organismů a také koncentrace samotného organického znečištění

V závěru proběhlo závěrečné vzorkování. Analýza v rozsahu př. č. 10 (tab. č. 10.1. + 10.2.) Vyhlášky 294/2005 Sb. byla provedena v akreditovaných laboratořích společnosti ALS Czech Republic, s.r.o. Praha.

Reprezentativní vzorek RC-2 reprezentující 1005,64 tun biodegradovaného odpadu splnil limity tabulky č. 10.1 a 10.2 př. č. 10 Vyhl. 294/2005 Sb. a s odpadem tak lze nakládat dle Vyhl. 294/2005 Sb., tzn. využití na povrchu terénu, v našem případě do „stavby“ v areálu skládek COZ. Na tyto odpady se vztahuje Osvědčení o vyloučení nebezpečných vlastností odpadů č. Os/06/09/DM.

Výhody bioremediace jsou značné. Nespornou výhodou je cena, která může být u nejlevnějších metod jako je landfarming nebo fytořediace až desetkrát nižší než

u běžného mechanického ošetření. Dalším přínosem těchto sanačních postupů je jejich šetrnost k životnímu prostředí, jelikož jsou znečišťující látky přímo mineralizovány nebo alespoň přeměněny na látky méně škodlivé.

Biodegradace má však i své nevýhody. Její průběh z velké míry ovlivňován přírodními podmínkami na dané lokalitě a limitován faktory okolního prostředí jako je pH matrice, salinita, přítomnost kyslíku, organismů, koncentrace kontaminantu apod. Bioremediace má také další průběh než jiné sanační metody, nejdéle trvá landfarming, kompostování nebo fytořemediace, a to v řádech měsíců až let.

I přes výše uvedené nevýhody mají biodegradace široké využití a velký potenciál.

V této oblasti se však můžeme ještě daleko posunout. Například v použití geneticky modifikovaných organismů, které byly v laboratorních podmínkách již úspěšně testovány, problém však nastal v následném použití v terénu. Také je tu nezodpovězená otázka v případě užití extracelulárních enzymů.

Dekontaminace pomocí bakterií otevírá nové možnosti při čištění kontaminovaných lokalit a stává se tak plnohodnotným doplňkem běžných sanačních metod. Pro svou šetrnost k životnímu prostředí by měly být využívány všude tam, kde je to možné.

Seznam použité literatury

- Alexander M. 1999. Biologické postupy. In: Kolektiv autorů. 2006. Kompendium sanačních technologií. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o. p. 10–53.
- Atlas RM. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. 45: 180–209.
- AWT Rekultivace. 2013. Likvidace ekologických zátěží, skládky, odpady [Internet]. Awt-rekultivace.cz; [cited 2013 May 12]. Dostupné z: <http://www.awt-rekultivace.cz/sluzby/likvidace-ekologickych-zatezi-skladky-odpady/>
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology* 53: 495–508.
- Brhelová H. 2004. Bioremediační technologie EPS-INOK. Veselí nad Moravou: EPS s.r.o. 16 p. Interní dokument.
- Cramm R. 2009. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Molecular Mikrobiology and Biotechnology*. 16: 38–52.
- Cunningham SD, OW SW. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*. 110: 715–719.
- EcoBioMaterial.com. 2010. Polyhydroxyalkanoates (PHA) [Internet]. Dostupné z: <http://www.ecobiomaterial.com/pha-info.php>
- Edgington SM. 1994. Environmental biotechnology. *Bio/technology*. 12: 1338–1342.
- Eweis JB, Ergas SJ, Chang PY, Schroeder ED. 1998. *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill. Boston. 136–236.
- Fuksa J. 2011. Ropné látky v půdě [Internet]. Praha: Metodický portál Rpv.cz; 2011 May 20 [cited 2013 April 6]. Dostupné z: <http://clanky.rvp.cz/rss-kategorie/keyword/p%C5%AFda/clanek/k/p%C5%AFda/11915/ROPNE-LATKY-V-PUDE.html/>
- Gruntorád J et al. 2000. Zajištění jakosti sanačních prací 1. Díl. Praha: MŽP ČR. 28 p.
- Head IM. 1998. Bioremediation: toward a credible technology. *Microbiology*. 144: 599–608.
- Hickey RF, Smith G. 1996. *Biotechnology in Industrial Waste Treatment and Bioremediation*. New York: CRC Press. 279 p.
- Horák P. 2006. Mechanismy biodegradací kontaminantů a bioasanační techniky. Ústí nad Labem: FŽP UJEP. 208 p.
- Horáková D. 2006. *Bioremediace*. Brno: PřF MU. 83 p.
- Ides D. 2011. Bioremediace odpadu ex situ k. č. 17 05 03 (1005,64 t). Kunovice: EPS s.r.o. 28 p. Interní dokument.

Inisoft.cz. 2005. Inisoft – software pro odpady, obaly a ekologii [Internet]. Dostupné z: <http://www.inisoft.cz/strana/vyhlaska-294-2005-p10>

Kincl. c2006. Ošetřování půdy a ostatních pevných materiálů po vytěžení na dekontaminační ploše. In: Kolektiv autorů. 2006. Kompendium sanačních technologií. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o. p. 55.

Kotrba D. 2005. Úvod do bioremediací. Praha: VŠCHT.

Liu S, Sutfita JM. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. Trends in Biotechnology. 11: 344–352.

Mapy.cz. 2006. Letecká mapa Ostravy [Internet]. Dostupné z: http://mapy.cz/#x=18.350984&y=49.833624&z=14&t=s&q=ostrava&qp=10.881272_48.334630_20.004188_51.119584_6&l=15

Matějů. 2006. Technologie pro ošetřování nesaturované zóny a pevných materiálů. In: Kolektiv autorů. 2006. Kompendium sanačních technologií. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o. p. 9–55.

Novotný Č. 2005. Biodegradace a biotechnologie. Ostrava: Ostravská univerzita. 96 p.
Sotolářová M. 2005. Bioremediační technologie EPS-PAL. Veselí nad Moravou: EPS s.r.o. 11 p. Interní dokument.

Štulík V. 1987. Biotechnologie a ochrana přírodního prostředí: biotechnologie 9. Praha: UVTEI. 209 p.

Tomotada & Masao. c2006. In: Kolektiv autorů. 2006. Kompendium sanačních technologií. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol. s.r.o. p. 12.

Trögl. 2011. Bioremediace. [Internet]. Most: Univerzita Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem; [cited 2013 April 17] Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/1Mikr11Biodegradace.pdf>.

Vaníček I. 2002. Sanace skládek, starých ekologických zátěží. Praha: ČVUT. 247 p.

World Health Organization. 2004. Disinfection and sterilization. In: World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. Geneva. 3rd Edition: 82–93.

Přílohy

Příloha A Posouzení rozšíření katalogu odpadů v rámci technologie EPS-INOK

Tento soubor je možné získat na vyžádání u autora práce.