

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studijní program: P3901 Aplikované vědy v inženýrství

Studijní obor: 3901V055 Aplikované vědy v inženýrství

**Výzkum kombinované biologicko-chemické metody sanace
podzemních vod znečištěných chromem**

**Research of the combined biological-chemical method for remediation of
groundwater contaminated by chromium**

Dizertační práce

2015

Autor: RNDr. Jan Němeček
Školitel: Prof. Dr. Ing. Miroslav Černík, CSc.
Forma studia: kombinovaná

PROHLÁŠENÍ

Byl jsem seznámen s tím, že na mou doktorskou dizertační práci se plně vztahuje Zákon č. 121/2000 Sb., zákon o právu autorském, zejména §60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé dizertační práce pro vnitřní potřeby TUL.

Užiji-li dizertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat náhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Doktorskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedených zdrojů a na základě konzultace se školitelem dizertační práce a ostatními odborníky v oboru.

Datum:

Podpis:.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout:

V první řadě děkuji svému školiteli Miroslavu Černíkovi za vedení a cenné připomínky během doktorského studia a psaní dizertační práce.

Děkuji dále všem kolegům z TUL za pomoc při technické realizaci laboratorních zkoušek, za provedení chemických laboratorních analýz, Tessierových sekvenčních extrakčních zkoušek a prvkové analýzy metodou SEM-EDS.

Děkuji pracovníkům společnosti DEKONTA a.s. za laboratorní mikrobiologické a ekotoxikologické zkoušky a především Ondřeji Lhotskému za cenné poznatky a jeho pomoc při technické realizaci pilotních zkoušek.

Děkuji pracovníkům Mikrobiologického ústavu AV ČR za realizaci mikrobiologických zkoušek a jmenovitě Tomáši Cathamlovi za jeho konzultace v oblasti interpretace mikrobiologických molekulárních metod.

Děkuji pracovníkům Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, především Janu Filipovi, za provedení laboratorních analýz vzorků zemin metodou XPS a Mösbauerovou spektroskopií.

Děkuji svým kolegům ze společnosti ENACON za jejich pomoc při provedení pilotních zkoušek a jmenovitě Haně Čudové za grafické práce.

V neposlední řadě děkuji své manželce za podporu a toleranci v době psaní dizertace.

OBSAH:

ABSTRAKT	8
1. ÚVOD	10
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	14
3. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	15
3.1 CHRÓM V HORNINOVÉM PROSTŘEDÍ A PROCESY OVLIVŇUJÍCÍ JEHO VÝSKYT A MIGRACI.....	15
3.1.1 <i>Formy výskytu chrómu v horninovém prostředí</i>	15
3.2 CHOVÁNÍ Cr(VI) V HORNINOVÉM PROSTŘEDÍ.....	18
3.2.2 <i>Redoxní reakce</i>	18
3.2.3 <i>Srážení</i>	20
3.2.4 <i>Sorpce</i>	21
3.3 BIOREMEDIČNÍ METODY SANACE Cr(VI).....	21
3.3.5 <i>Biologická redukce</i>	21
3.3.6 <i>Mechanismus biologické redukce Cr(VI)</i>	24
3.3.7 <i>Komplexace Cr(III) při biologické redukci Cr(VI)</i>	26
3.4 REDUKCE Cr(VI) ČÁSTICEMI NULMOČNÉHO NANOŽELEZA.....	29
3.4.8 <i>Pasivace nanočástic</i>	31
3.4.9 <i>Kinetika reakce</i>	33
3.4.10 <i>Sorpce Cr(VI) iontů na povrchu nanoželeza a produktech jeho oxidace</i>	34
3.4.11 <i>Aglomerace nanočástic a jejich modifikace</i>	34
3.4.12 <i>(Eko)toxicita nanočástic železa</i>	37
3.5 ZÁVĚR LITERÁRNÍ ČÁSTI.....	39
4. METODY PRÁCE	41
4.1 LABORATORNÍ VSÁDKOVÉ POKUSY.....	41
4.2 KOLONOVÉ ZKOUŠKY KOMBINACE OBOU PROCESŮ.....	42
4.2.1 <i>Průběh kolonové zkoušky</i>	42
4.3 PILOTNÍ ODZKOUŠENÍ KOMBINOVANÉ METODY.....	45
4.3.2 <i>Pilotní odzkoušení kombinované metody na lokalitě Hrádek nad Nisou</i>	46
4.3.3 <i>Pilotní odzkoušení kombinované metody na lokalitě C</i>	48
4.3.4 <i>Aplikace nZVI</i>	48
4.3.5 <i>Aplikace syrovátky</i>	49
4.3.6 <i>Monitoring pilotní zkoušky</i>	51
5. VÝSLEDKY	52
5.1 VÝSLEDKY LABORATORNÍCH VSÁDKOVÝCH POKUSŮ.....	52
5.2 VÝSLEDKY KOLONOVÉ ZKOUŠKY KOMBINACE OBOU PROCESŮ.....	53
5.3 VÝSLEDKY PILOTNÍHO ODZKOUŠENÍ KOMBINOVANÉ METODY.....	61
5.3.1 <i>Pilotní zkouška na lokalitě Hrádek nad Nisou</i>	61
5.3.2 <i>Pilotní zkouška na lokalitě C</i>	74
6. SOUHRN POZNATKŮ	93
7. ZÁVĚR	98
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	99
SEZNAM PRACÍ DISERTANTA:	109

SEZNAM ZKRATEK:

CMC	karboxymethylcelulóza
CIU	chlorované uhlovodíky
CIU-Eth	chlorované etheny
cis-DCE	cis-1,2-dichloroethen
DCE	dichlorethen
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroskopy (energiově disperzní roentgenová spektroskopie)
EPS	exopolymerní látka
ERS	efektivní redukční kapacita
EZVI	Emulsified Zero Valent Iron (emulzifikované nanoželezo)
CHSK _{Cr}	chemická spotřeba kyslíku oxidací dvojchromanem draselným
ICP	Inductively Coupled Plasma (indukčně vázaná plazma)
K _{sp}	Rovnovážná konstanta rozpouštění a srážení
m p.t.	metrů pod terénem
MBÚ AV ČR	Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR
nZVI	Nanosized Zero Valent Iron (nulmocné nanoželezo)
ORP	oxidačně-redukční potenciál
PCE	tetrahalorethen (perchlorethen)
PLFA	Phospholipid Lipid Fatty Acid (fosfolipidové mastné kyseliny)
pH	vodíkový exponent – míra kyselosti vodného roztoku
pK _s	záporný dekadický logaritmus rovnovážné konstanty
SEM	řádkovací (rastrový) elektronový mikroskop
SRB	síran redukující bakterie
TCE	trichlorethen
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TOC	Total Organic Carbon (celkový organický uhlík)
TUL	Technická univerzita v Liberci
UPOL	Univerzita Palackého v Olomouci
ÚCHR	úplný chemický rozbor
VC	vinylchlorid
whey	syrovátka
ZVI	Zero Valent Iron (nulmocné železo)

SEZNAM OBRÁZKŮ V TEXTU:

Obr. 1: Speciace Cr(VI) jako funkce pH (Barrera-Díaz et al. 2012)	16
Obr. 2: Rovnovážný Eh-pH diagram pro formy chrómu v rovnováze s amorfním Cr(OH) ₃ v systému chróm – voda (podle Rai et al. 1987)	17
Obr. 3: Koncentrace Cr(III) v rovnováze s Cr(OH) ₃ a Cr _{0,25} Fe _{0,75} (OH) ₃ jako funkce pH (Palmer a Wittbrodt, 1991)	20
Obr. 4: Možné mechanismy enzymatické redukce Cr(III) za aerobních (horní část) a anaerobních (dolní část) podmínek (převzato z Cheung a Gu, 2007).....	26
Obr. 5: Schéma redukčních a srážecích reakcí probíhajících na rozhraní nanočástice/voda	30
Obr. 6: Vliv pH na průběh redukce Cr(VI) (C _{Cr0} =20 mg/l, C _{Fe0} =0,6 g/l) (Christophoridis 2009) ..	31
Obr. 7: Fotografie clusterů nanočástic nulmocného železa (Wang et al., 2010).....	35
Obr. 8: Schéma částice emulzifikovaného nZVI (Watlington, 2005)	36
Obr. 9: Aparatura kombinovaných kolonových zkoušek	42
Obr. 10: Schéma pilotní zkoušky vyvíjení sanační technologie na lokalitě Hrádek nad Nisou ..	47
Obr. 11: Aplikace nZVI při pilotní zkoušce.....	49
Obr. 12: Aplikace syrovátky při pilotní zkoušce (v popředí čerpací vrt HS-1)	50
Obr. 13: Rozmístění vrtů pilotní zkoušky	50
Obr. 14: Graf vývoje Cr(VI) ve vodném podílu během vsádkové laboratorní zkoušky bioredukce (TOC 100 mg/l)	52
Obr. 15: Graf vývoje Cr _{celk.} ve vodném podílu během vsádkové laboratorní zkoušky bioredukce (TOC 100 mg/l)	53
Obr. 16: Grafy koncentrací Cr _{celk.} a Cr(VI) na nátoku (Inlet) a odtoku z kolon (Column) s vyznačením trvání jednotlivých etap zkoušky (Phase).....	54
Obr. 17: Koncentrace PLFA v zemině kolon po zkoušce	56
Obr. 18: Koncentrace Cr _{celk.} v zemině po ukončení kolonových zkoušek	57
Obr. 19: Koncentrace Fe a Cr(VI) v zemině po ukončení kolonových zkoušek	57
Obr. 20: Relativní zastoupení forem výskytu chrómu v zemině po ukončení kolonových zkoušek.....	59
Obr. 21: Koncentrace Cr(VI) a Cr(III) ve vodném podílu po ukončení loužicích zkoušek.....	61
Obr. 22: Eh podzemní vody v průběhu pilotní zkoušky	62
Obr. 23: Koncentrace Fe (nahore), NO ₃ ⁻ (uprostřed) a SO ₄ ²⁻ (dole) v podzemní vodě injektážních (vlevo) a monitorovacích (vpravo) vrtů	64
Obr. 24: pH-Eh diagram pro Fe za přítomnosti síry.....	65
Obr. 25: Vývoj koncentrace chrómu a TOC v podzemní vodě vrtu PV-214	67
Obr. 26: Koncentrace chrómu a TOC v podzemní vodě vrtu PV-217	67
Obr. 27: Koncentrace chrómu v podzemní vodě vrtu PV-201	68
Obr. 28: Koncentrace Cr(VI) v podzemní vodě před aplikací nZVI a 266 dní po aplikaci substrátu	69
Obr. 29: Počty kultivovatelných psychrofilních bakterií v podzemní vodě (KTJ/ml)	70
Obr. 30: Vývoj bakteriálního osídlení sledovaného pomocí obsahu PLFA v podzemní vodě vybraných vrtů (ng/l)	71
Obr. 31: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu PV-209	72
Obr. 32: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu PV-215	73
Obr. 33: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu PV-217	73
Obr. 34: Eh podzemní vody v průběhu pilotní zkoušky	74
Obr. 35: Koncentrace NO ₃ ⁻ , Fe, Mn a SO ₄ ²⁻ v podzemní vodě vrtů první (vpravo) a druhé (vlevo) monitorovací linie	76
Obr. 36: pH-Eh diagram pro Fe za přítomnosti síry.....	77
Obr. 37: Koncentrace TOC v podzemní vodě vrtů první (vpravo) a druhé (vlevo) monitorovací linie	78
Obr. 38: Vývoj koncentrace Cr(VI) - nahore, a Cr _{celk.} (dole) v podzemní vodě vrtů první (vpravo) a druhé (vlevo) monitorovací linie	79

Obr. 39: Koncentrace Cr(VI) v podzemní vodě před 1. aplikací nZVI (vlevo nahoře), před 2. aplikací nZVI (vpravo nahoře), po 2. aplikaci nZVI (vlevo dole) a 188 dní po aplikaci substrátu	80
Obr. 40: EDS spektrum pro detekci výskytu Cr (žlutě) – vzorek z vrtu MV-4	82
Obr. 41: Výskyt Cr a Fe ve vřezu na Obr. 40 (výstup EDS spektra)	82
Obr. 42: Možné cesty dehalogenace chlorovaných ethenů (Cwiertny a Scherer, 2010)	85
Obr. 43: Koncentrace jednotlivých ClU-Eth, ethanu a ethenu v podzemní vodě vrtu MV-3	87
Obr. 44: Sumární koncentrace ClU-Eth v podzemní vodě	87
Obr. 45: Stupeň dechlorace ClU-Eth v podzemní vodě	88
Obr. 46: Vývoj koncentrací kultivovatelných psychrofilních bakterií v průběhu pilotního testu	89
Obr. 47: Výsledky stanovení parametrů PLFA ve vodě z vrtů na lokalitě odebrané 13.1.2014 (před zahájením pilotní zkoušky), 20.11.2014 (doznívání biotické fáze) a 12.1.2015 (konec pokusu)	90
Obr. 48: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu MV-1	91
Obr. 49: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu MV-4	92
Obr. 50: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu HS-2	92

SEZNAM TABULEK V TEXTU:

Tabulka 1: Koncentrace rozpuštěného Cr(III) v organo – Cr(III) komplexech (Puzon et al. 2005)	28
Tabulka 2: Bilance odstraněného Cr _{celk.} po etapách kolonové zkoušky	55
Tabulka 3: Výsledky izotopových analýz Cr v podzemní vodě	58
Tabulka 4: Výsledky Tessierových sekvenčních extrakčních testů	59
Tabulka 5: Výsledky semikvantitativní analýzy (hm. %)	81
Tabulka 6: Hmotnostní podíl jednotlivých prvků v oblasti sraženin na Obr. 41	83

Abstrakt

Dizertační práce se zabývá výzkumem a ověřením použitelnosti kombinace dvou procesů – abiotické redukce nanoželezem (nZVI) a biotické redukce podpořené aplikací organického substrátu, k sanaci podzemních vod znečištěných šestimocným chromem Cr(VI). V rámci dizertační práce byly v laboratorním měřítku testovány alternativní organické substráty, stanoveno optimální dávkování vybraného substrátu a zhodnocena stabilita redukovaného chromu. Kolonovými zkouškami byla odzkoušena kombinace obou metod a poté ověřena kombinovaná metoda v reálných podmínkách pilotní zkoušky. Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že kombinovanou metodou bylo dosaženo vysoké účinnosti odstranění Cr(VI) z podzemních vod, při nízké a jen krátkodobé mobilitě vzniklého Cr(III). Ověřeno bylo množství a dávkování redukčního činidla a substrátu, jejich migrační schopnosti a životnost. Bylo zjištěno, že kombinací obou metod dochází k vzájemnému účinku obou geofixačních mechanismů. Aplikací nZVI dochází ke snížení celkové ekotoxicity sanovaného prostředí. nZVI oxidované během abiotické fáze na Fe(III) je částečně biogenně regenerováno na Fe(II), které následně působí jako redukční činidlo pro Cr(VI).

Aplikace nZVI, tak i substrátu ovlivnila základní chemické složení podzemní vody nevýrazně s pozorovaným pozvolným návratem k původnímu složení.

Klíčová slova:

hexavalentní chrom, biotická redukce, abiotická redukce, nanoželezo (nZVI), geofixace.

Abstract

The Ph.D. thesis deals with research and verification of a combination of two processes – abiotic reduction by nanoscale zero-valent iron (nZVI) and biotic reduction enhanced by addition of organic substrate for remediation of groundwater contaminated by hexavalent chromium Cr(VI). Within the Ph.D. work alternative organic substrates were tested in a laboratory scale, optimal dosage of the substrate was determined and stability of reduced Cr(III) was assessed. Combination of both remedial methods was evaluated within a column tests and afterwards in a field scale pilot test. Their results show that the combination of the methods exhibited high efficiency of the Cr(VI) removal from groundwater accomplished with low and only temporary mobility of Cr(III). Amounts and a delivery technique for both nZVI and the substrate were assessed, including migration ability and a life time of both agents. It was found that by combination of both methods a reciprocal effect of both geofixation mechanisms acted. By injection of nZVI an overall ecotoxicity of the environment was mitigated. NZVI oxidized during the abiotic phase was partly recovered during the biotic phase – microbially reduced to Fe(II), and acted as a reducing agent for Cr(VI).

Both nZVI and the substrate applications influenced the inorganic composition of the groundwater insignificantly with observed tendency to revert to the original composition.

Key words: hexavalent chromium, biotic reduction, abiotic reduction, nZVI, geofixation

1. Úvod

Dizertační práce se zabývá výzkumem a ověřováním kombinované abioticko-biotické metody sanace podzemních vod znečištěných chrómem.

Chrómem je obecně jedním z nejtoxičtějších a také bohužel jedním z nejčastěji se vyskytujících těžkých kovů na lokalitách kontaminovaných anorganickými polutanty (Saha et al., 2012). Vysoký počet kontaminovaných lokalit souvisí s hojnými možnostmi průmyslového použití tohoto kovu (složka speciálních nerezových ocelí, ochranná vrstva kovových výrobků, výroba žáruvzdorných hmot, činění kůží nebo konzervace dřeva).

Dominantními formami chrómu v přírodním prostředí jsou Cr(III) a Cr(VI). Šestimocná forma chrómu je z toxikologického pohledu nejzávažnější, má vysoký oxidační potenciál, je mutagenní, karcinogenní a toxická (US EPA, 1980; Nriagu and Nieboer, 1988). Naproti tomu, druhá nejvýznamnější forma výskytu - trojmocný chróm Cr(III) je v malém množství pro lidský organismus nezbytný k syntéze enzymů zapojených do metabolismu cukrů a tuků. Je tedy používán jako potravinový doplněk. Nicméně, některé méně závažné nepříznivé vlivy na lidský organismus jako jsou změny tkáně dýchacích cest nebo výskyt alergické dermatitidy jsou spojovány i s expozicí Cr(III), (US EPA, 1998). Zásadním rozdílem mezi oběma oxidačními stavy je rozpustnost ve vodě, kdy Cr(III) je o několik řádů méně rozpustný a tudíž i méně migrující a méně ochotně vstupující do buněk organismů.

Sanační technologie se zaměřují buď na přímé odstranění tohoto polutantu z horninového prostředí nebo na redukci Cr(VI) *in-situ* a tím imobilizaci vysrážením v podobě málo rozpustných sloučenin Cr(III).

Příkladem první skupiny technologií je například sanační čerpání, spočívající v zachycení proudu kontaminované vody systémem sanačních vrtů, čerpáním těchto vod a následným čištěním v místě zpravidla chemickými metodami používanými v úpravárenství odpadních průmyslových vod. Chrómem je tak zakoncentrován v kalu a ten likvidován mimo lokalitu. Tyto postupy se však často ukazují jako málo účinné nebo ekonomicky neefektivní v důsledku manipulace s velkými objemy čerpaných vod, časové náročnosti nebo v některých případech nedosažitelnosti cílových koncentrací sanace.

Technologie druhé skupiny sanačních metod se často nazývají geofixační. Jejich princip spočívá v chemické redukci Cr(VI) na Cr(III) vhodným redukčním činidlem. Vzniklý ion Cr^{3+} se rychle sorbuje nebo sráží a vzniká tedy většinou oxid, hydroxid nebo také sulfid (Jardine et al., 1999). Tyto sloučeniny jsou za běžných podmínek v kolektorech podzemních vod nerozpustné a jsou tak imobilizovány. Redukce Cr(VI) je prováděna chemicky, kdy jsou redukčními činidly polysulfidy, dithioničitan, siřičitan nebo redukované formy železa Fe(0), Fe(II) (Gheju, 2011) nebo elektrochemicky, kdy je redukantem Fe(II) vznikající reakcí na anodě železných elektrod (Barrera-Díaz et al. 2012). Schopnost nulmocného makro a mikro železa redukovat široké rozpětí kontaminantů (např. chlorované uhlovodíky – CIU, těžké kovy, TNT) byla a je hojně využívána během navrhování sanačních prací zejména při použití permeabilních reaktivních bariér (PRB) od 90. let 20. století (Watlington 2005) i v souvislosti se sanacemi znečištění způsobené Cr(VI). Spolu s vývojem v oblasti nanočástic se na přelomu tisíciletí objevila možnost využít nulmocného nanoželeza („nanoscale Zero Valent Iron“ - nZVI) k sanačním účelům rovněž pomocí *in-situ* injekce suspenze nanočástic (Zhang 2003).

Nižší koncentrace znečištění Cr(VI) v podzemní vodě, za kterých se ještě neprojevuje plně jeho toxicita vůči mikroorganismům, mohou být redukovány také biologicky. K redukci Cr(VI) mikroorganismy dochází přímo enzymaticky zprostředkovanými respiračními reakcemi, které mikroorganismům poskytují energii potřebnou pro metabolismus buněk a pro jejich růst. K biotické redukci Cr(VI) rovněž dochází nepřímo, kdy při oxidačně-redukčních respiračních reakcích dochází k redukci akceptorů elektronu Fe(III) a SO_4^{2-} na Fe(II) a H_2S , které následně redukují Cr(VI) na Cr(III). Prakticky aplikace biologických metod spočívá v zásaku organického substrátu např. melasy, ethanolu nebo syrovátky, který slouží jako zdroj energie a stavební hmoty pro růst bakterií. V některých případech je třeba optimalizovat další podmínky k růstu bakterií, jako obsah nutrietů (dusík, fosfor), oxidačně redukční potenciál prostředí nebo pH.

Kombinací abiotické (chemické) redukce Cr(VI) nulmocným nanoželezem (nZVI) a biotické redukce lze využít výhod obou mechanismů. Chemickou redukcí s využitím nZVI lze docílit rychlé snížení koncentrací Cr(VI) na úroveň, která již umožní použití ekonomičtější biologické metody v podmínkách, kdy zbytkové obsahy Cr(VI) již nejsou toxické pro autochtonní mikroorganismy redukující (přímo nebo nepřímo) Cr(VI).

Cílem dizertační práce je zhodnocení kombinované chemicko-biologické metody sanace znečištění Cr(VI). Na základě studia teoretických poznatků o chování chrómu v horninovém prostředí a mechanismech jeho geofixace byly navrženy a provedeny laboratorní zkoušky této metody. Následně byla metoda ověřena v reálných podmínkách pilotními zkouškami na dvou lokalitách. Metoda je hodnocena jak z pohledu účinnosti odstranění Cr(VI) z podzemní vody a imobility redukováného Cr(III), tak i z pohledu technického (množství a způsob dávkování redukčního činidla nebo substrátu, jejich migrační schopnosti a životnost) a environmentálního (dopad na ekotoxicitu, mikrobiální oživení, chemismus podzemní vody).

Autor dizertační práce navrhl laboratorní vsádkové a kolonové zkoušky a provedl jejich vyhodnocení, vypracoval metodiku pilotního odzkoušení, řídil průběh pilotních zkoušek a vyhodnotil získané výsledky.

Dizertační práce byla zpracovávána za podpory projektu TAČR TA01021792 „Vývoj kombinované technologie nano-bio k sanaci znečištění chrómem“, jehož je autor hlavním řešitelem. Při řešení dizertační práce autor spolupracoval s pracovníky řešitelských organizací projektu: ENACON s.r.o. (hydrogeologické a monitorovací práce), Technická univerzita v Liberci (analytické práce, technické provedení laboratorních vsádkových a kolonových testů, prvková analýza metodou SEM-EDS), DEKONTA a.s. (mikrobiologické kultivační zkoušky, zkoušky ekotoxicity) i dalších institucí (Mikrobiologický ústav AV ČR – zkoušky PLFA a 454 pyrosekvence), Česká geologická služba (izotopové analýzy, semikvantitativní fázová analýza metodou rentgenovou práškovou difrakcí) a Univerzita Palackého v Olomouci (laboratorní zkoušky metodou rentgenové fotoelektronové spektroskopie a Mösbauerovy spektroskopie).

Výsledky práce byly autorem průběžně prezentovány na odborných konferencích v ČR: Odpadové fórum (Hustopeče 2014), Sanační technologie XVI (Uherské Hradiště 2013), Sanační technologie XV (Pardubice 2012) a v zahraničí: konference CSME-2012/SARCLE-2012 (Nancy, Francie, 2012), konference AquaConSoil (Barcelona, Španělsko, 2013), konference Battelle (Monterey, USA, 2014). K ústní prezentaci byly přijaty příspěvky na konferenci AquaConSoil (Kodaň, Dánsko, 2015) a konferenci Battelle (Miami, USA, 2015), které budou předneseny až po odevzdání dizertační práce.

Výsledky pilotního odzkoušení nZVI k in-situ redukci Cr(VI) také byly publikovány v impaktovaném časopise Science of the Total Environment (Němeček, J., Lhotský, O.,

Cajthaml, T., 2013. Nanoscale zero-valent iron application for in situ reduction of hexavalent chromium and its effect on indigenous populations. *Sci. Total Environ* 485-486, 739-747. IF=3,163). V době zpracování dizertační práce byl u zahraničního periodika podán článek hodnotící výsledky pilotní zkoušky metody kombinující chemickou a biologickou redukci Cr(VI): Němeček, J., Pokorný, O., Lacinová, L., Černík, M., Masopustová, Z., Lhotský, O., Filipová, A., Cajthaml, T., 2015. Combined abiotic and biotic in-situ reduction of hexavalent chromium in groundwater using nZVI and whey: a remedial pilot test.

2. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce je výzkum a ověření použitelnosti kombinace dvou procesů – abiotické redukce nanoželezem (nZVI) a biotické redukce podpořené aplikací organického substrátu, k sanaci podzemních vod znečištěných šestimocným chromem Cr(VI). Dílčími cíly jsou určení vhodného organického substrátu, stanovení optimálního dávkování vybraného substrátu a nZVI, ověření stability redukovaného chromu v laboratorním měřítku, odzkoušení posloupné kombinace obou procesů kolonovými testy a ověření kombinované metody v reálných podmínkách pilotní zkoušky a to nejen z pohledu účinnosti odstranění Cr(VI) z podzemních vod a fixace vzniklého Cr(III), ale i z pohledu objasnění hlavních procesů redukce Cr(VI), zhodnocení technických (množství a způsob dávkování redukčního činidla nebo substrátu, jejich migrační schopnosti a životnost) a environmentální aspektů (dopad na ekotoxicitu, mikrobiální oživení, chemismus podzemní vody).

Metody vedoucí k dosažení cílů disertační práce tvoří soubor těchto experimentů:

- literární rešerše,
- výzkum a ověření účinnosti biotických procesů redukce Cr(VI) laboratorními vsádkovými pokusy,
- kolonové zkoušky kombinace obou procesů, a
- pilotní zkoušky na reálně kontaminovaných lokalitách.

3. Současný stav problematiky

3.1 *Chrómový v horninovém prostředí a procesy ovlivňující jeho výskyt a migraci*

3.1.1 **Formy výskytu chrómu v horninovém prostředí**

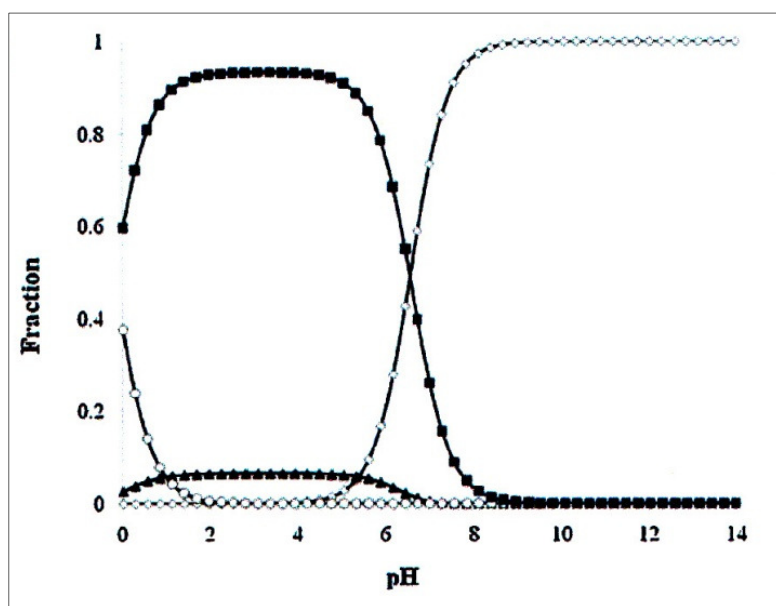
Chrómový se přirozeně vyskytuje v různých složkách přírodního prostředí. Chrómový může existovat v oxidačních stavech od 0 do +6. Dominantní formou jsou však Cr(III) a Cr(VI). V horninách se chrómový přirozeně vyskytuje v koncentracích od 20 mg/kg v žulách až po 2000 mg/kg v ultramafických horninách (Allard, 1995).

Celkem je registrováno 82 minerálů obsahujícího chrómový (Motzer, 2005), chromit (FeCr_2O_4) je však jediný ekonomicky těžitelný rudný minerál (Palmer a Wittbrodt, 1991). V šestimocné formě je přirozeně obsažen v 32 minerálních fázích především jako chromany např. na poušti Atacama v Chile (Ericksen, 1983) ale i jako fosforečnany, boritany, jodičnany a různé oxidy (Motzer, 2005). Na kontaminovaných lokalitách byly minerální fáze Cr(III) identifikovány jako amorfni $\text{Cr}(\text{OH})_3$, který může transformovat na $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nebo Cr_2O_3 (eskolait). V přítomnosti Fe(III) se může vytvářet $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$.

Ve vodném roztoku je za redukčních podmínek termodynamicky nejstabilnější formou chrómový Cr(III), avšak Cr(VI) zůstává metastabilní po dlouhou dobu (Palmer a Wittbrodt, 1991). Šestimocný chrómový se ve vodném roztoku vyskytuje ve formě chromanového aniontu (CrO_4^{2-}), dichromanového aniontu ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), popřípadě hydrogenchromanového (HCrO_4^-) a hydrogendichromanového aniontu (HCr_2O_7^-), které jsou záporně nabité, a proto ve zvodněném horninovém prostředí za běžného pH málo podléhající sorpci a jsou tedy značně mobilní.

V oxidační oblasti při koncentraci Cr(VI) nižší než 10 mmol/l (520 mg/l) nebo za neutrálního pH existuje Cr(VI) v roztoku jako H_2CrO_4^0 , HCrO_4^- a CrO_4^{2-} . Při $\text{pH} > 6,5$ dominuje CrO_4^{2-} . H_2CrO_4^0 převládá jen při pH pod 0,9 a HCrO_4^- převládá při pH mezi 0,9 a 6,5. V kyselém prostředí a koncentraci Cr(VI) nad 10 mmol/l HCrO_4^- dimeruje na $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Palmer a Wittbrodt, 1991).

Formy výskytu Cr(VI) v závislosti na pH popisuje následující diagram.

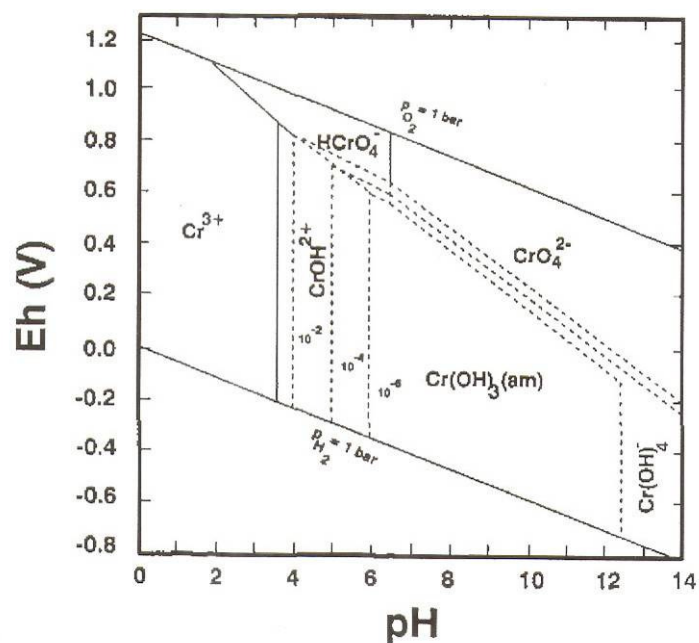


Obr. 1: Speciace Cr(VI) jako funkce pH (Barrera-Díaz et al. 2012)

(\diamond = CrO_4^{2-} ; \blacktriangle = $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$; \circ = H_2CrO_4 a \blacksquare = HCrO_4^-)

Jak chroman, tak i dichroman mají vysokou rozpustnost. Například rozpustnost chromanu draselného ve vodě při 20°C je 637,6 g/l, rozpustnost dichromanu draselného je nižší - 122,2 g/l.

Formy výskytu Cr(VI) a Cr(III) v závislosti na oxidačně-redukčním potenciálu Eh a pH jsou patrné na následujícím rovnovážném diagramu, viz Obr. 2. Při nižším pH se redukována forma Cr(III) vyskytuje ve vodách i za výrazně vyšších hodnot Eh než 0V jako volný ion Cr^{3+} . V pásmu pH 6 – 8 je nutné snížit Eh alespoň na hodnotu 0,4 V, aby redukce proběhla. Amorfni sraženina $\text{Cr}(\text{OH})_3$ je stabilní v širokém rozmezí pH 6,5 -12,5. Více rozpustné speciace vznikající hydrolyzou se mohou ve vodě vyskytovat ve vyšších koncentracích při pH nižším než 5,5 (CrOH^{2+} a Cr^{3+}) a naopak při pH vyšším než 12,5 ($\text{Cr}(\text{OH})_4^-$), viz Obr. 2.



Obr. 2: Rovnovázný Eh-pH diagram pro formy chrómu v rovnováze s amorfním Cr(OH)_3 v systému chróm – voda (podle Rai et al. 1987)

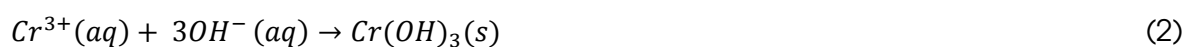
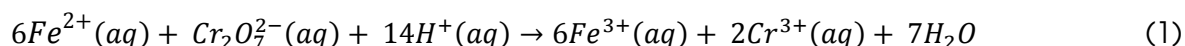
Cr(III) může dále vytvářet komplexy s organickými ligandy a polymery (Moore a Ramamoorthy, 1984). Při pokusech s fulvokyselinami a s vodnými roztoky rozpustné organické hmoty docházelo ke komplexaci Cr(III) a k udržení vyšších koncentrací rozpuštěného Cr(III) za vyššího pH než v čisté vodě (Palmer a Wittbrodt, 1991).

3.2 Chování Cr(VI) v horninovém prostředí

3.2.2 Redoxní reakce

K redukci Cr(VI) na Cr(III) v horninovém prostředí přirozeně dochází rozpuštěným dvojmocným železem, minerály obsahujícími dvojmocné železo, sloučeninami obsahujícími redukovanou síru a organickou hmotou.

Redukce Cr(VI) dvojmocným železem Fe(II) na Cr(III) s následným srážením má obecnou rovnici (např. Jardine et al., 1999):

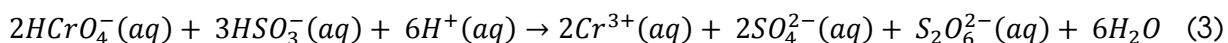


Rovnice (1) platí pro pH nižší než 10 a koncentraci PO_4^{3-} pod 0,1 mmol/l. Při pH nad 10 je oxidace Fe(II) kyslíkem rychlejší než oxidace hexavalentním chrómem. PO_4^{3-} oxidaci Fe(II) kyslíkem urychluje (Early a Rai, 1988).

$Fe^{2+}_{(aq)}$ se v podzemních vodách nevyskytuje vždy ve vysokých koncentracích, hlavním zdrojem Fe(II) jsou minerály. Např. hematit (obsahuje určitý podíl FeO) a biotit jsou schopné redukovat Cr(VI) (Early a Rai, 1988). Redukční kapacitu minerálů obsahujících Fe(II) studovali Lee a Batchelor (2003) a došli k závěru, že redukční kapacita vůči Cr(VI) byla nejvyšší u fáze green rust (GR) následovaná magnetitem, pyritem, biotitem, montmorilonitem a vermikulitem, přičemž podíl Fe(II) v minerálu byl přímo úměrný jeho redukční kapacitě.

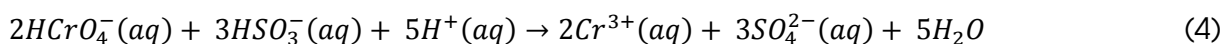
Dalšími přirozenými redukčními činidly jsou např. sulfidy a siřičitany. Sulfidy mohou redukovat Cr(VI), avšak studie naznačují, že musí být přítomen Fe(II) jako katalyzátor (U.S. EPA, 1980). Z toho vyplývá, že minerály tvořené disulfidem železnatým mohou účinně redukovat Cr(VI).

Za přítomnosti siřičitanu v přebytku je rovnice redukce Cr(VI) následující:



$S_2O_6^{2-}$ pak může redukovat trojmocné železo, pokud je přítomné, a tím podpořit redukci Cr(VI).

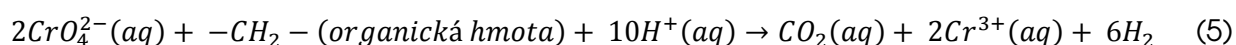
V případě přebytku Cr(VI) je podle (Beattie a Haight, 1972) redukce Cr(VI):



Dalším významným přirozeným redukčním činidlem je organická hmota. Toho se využívá při stanovení množství organické hmoty pomocí množství zredukovaného dichromanu vyjádřené jako chemická spotřeba kyslíku (CHSK-Cr).

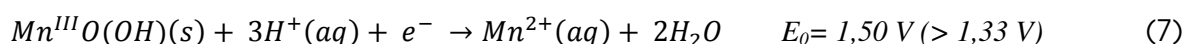
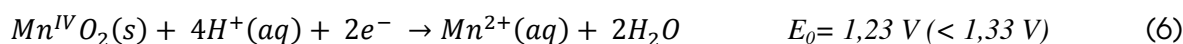
Je známo, že Cr(VI) je redukován funkčními skupinami, jako jsou karboxylové kyseliny, alkoholy a fenoly (Wiberg, 1965) obecně přítomné v huminových látkách nebo jako kontaminanty.

V řadě typů zemin je významný podíl organické hmoty tvořen huminovými látkami (huminovými kyselinami, fulvokyselinami a humíny) mající potenciál redukovat Cr(VI) podle rovnice (Brown et al., 2008):



Reoxidace, tedy zpětná oxidace Cr(III) na Cr(VI) je potenciálně možná za přítomnosti přírodních oxidačních činidel kyslíku a MnO₂. Pokusy reakce kyslíku s Cr(III) ukázaly velmi malou (Schroeder a Lee, 1975) nebo žádnou (Early a Rai, 1987) oxidaci Cr(III) i v experimentech probíhajících za pH 12,5 po dobu 24 hodin. Transformace Cr(III) rozpuštěným kyslíkem tedy zřejmě není významným mechanismem reoxidace Cr(III) v podzemních vodách.

Otázka reoxidace manganem byla intenzivně zkoumána Kimem (2002) se závěrem, že k ní může dojít, avšak za velmi specifických podmínek. Aktivním činidlem je Mn(III), který má dostatečně vysoký oxidační potenciál (> 1,33 V) aby reoxidoval Cr(III). Mn(IV) dostatečně silným oxidantem není.



Tato reakce probíhá přednostně v kyselém prostředí. Aby došlo k reoxidaci musí být splněny všechny tyto podmínky (Brown et al., 2008):

- Minerály musí obsahovat jak Mn(III), tak i Mn(IV).
- Minerály musí být přítomny v dostatečném množství, aby došlo k reakci (koncentrace minerálu obsahujícího mangan by měla být alespoň 1%).
- Prostředí musí mít kyselé pH.

- Cr(III) musí být v roztoku tím, že je rozpustný v kyselém prostředí nebo tvoří komplexní sloučeniny.
- Zemina a podzemní voda musí být v oxidačním prostředí. Nesmí být přítomny redukované minerály nebo redukovatelný/oxidovatelný organický uhlík.

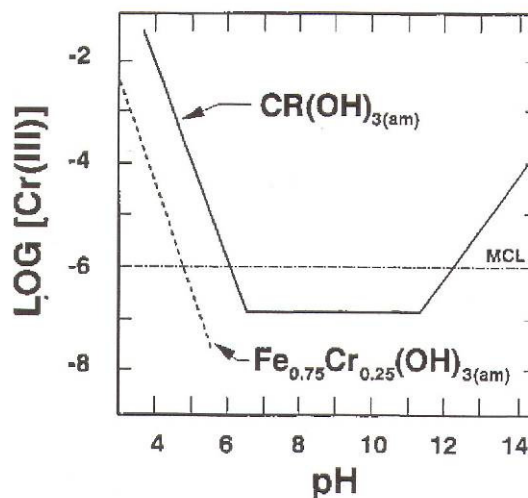
3.2.3 Srážení

Srážení a rozpouštění jednotlivých forem chrómu jsou významné procesy, které ovlivňují obsah chrómu v přírodních vodách.

V rozmezí pH mezi 6 a 12 jsou koncentrace Cr(III) limitovány hydrolyzou a srážením hydroxidů Cr(III).



Hodnota K_{sp} pro $\text{Cr}(\text{OH})_3$ je $5,01 \cdot 10^{-31}$ (Brown et al., 2008).



Obr. 3: Koncentrace Cr(III) v rovnováze s $\text{Cr}(\text{OH})_3$ a $\text{Cr}_{0,25}\text{Fe}_{0,75}(\text{OH})_3$ jako funkce pH (Palmer a Wittbrodt, 1991)

MCL – „maximal concentration limit“ – ukazatel pro pitnou vodu v USA

Rai et al. (1987) zjistil, že vysrážený $\text{Cr}(\text{OH})_3$ je amorfní. V některých případech se vysráží pevné roztoky hydroxidu chromitého a železa než čistý $\text{Cr}(\text{OH})_3$. V případě přítomnosti Fe(III) v kolektoru se vytváří amorfní pevný roztok $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$ (např. Sass a Rai, 1987 nebo Amonette a Rai, 1990). Rozpustnost $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$ klesá s klesajícím podílem Cr(III).

Pro pH mezi 5 až 12 je rozpustnost $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (amorf) menší než 10^{-6} mol/l $\text{Cr}(\text{III})_{\text{aq}}$ (odpovídá hmotnostní koncentraci $<0,05$ mg/l), viz Obr. 3.

3.2.4 Sorpce

$\text{Cr}(\text{III})$ je rychle a silně sorbován v zeminách na oxidy Fe a Mn, jílové minerály a písek (Testa, 2005). Sorpce $\text{Cr}(\text{III})$ roste s rostoucím pH (např. Rai et al., 1984), protože s růstem pH se povrchy jílových minerálů stávají více záporně nabitě, s rostoucím obsahem organické hmoty (Paya Pere z et al, 1988), zatímco sorpce $\text{Cr}(\text{III})$ klesá s rostoucím obsahem přítomných anorganických kationtů nebo rozpuštěných organických ligandů.

$\text{Cr}(\text{VI})$ ve formě HCrO_4^- a CrO_4^{2-} mohou být sorbovány na oxidy a hydroxidy Mn, Al a Fe (kladně nabitě povrchy), na jílové minerály a na jinou přírodní pevnou fázi a koloidy (např. Rai et al. 1986, Zachara et al., 1987). Nejčastějším a silným přírodním sorbentem vyskytujícím se v kolektorových horninách jsou hydroxidy Fe. Sorpce $\text{Cr}(\text{VI})$ je závislá na pH, s poklesem pH sorpce roste bez ohledu na typ sorbentu z důvodu nárůstu kladného náboje (Rai et al. 1986). Za širokého rozsahu pH 5 až 7,5 je sorpční afinita k CrO_4^{2-} pro písek větší než pro jílové minerály.

Sorpci $\text{Cr}(\text{VI})$ ovlivňuje přítomnost dalších aniontů v podzemní vodě, přítomnost kationtů ovlivňuje sorpci $\text{Cr}(\text{VI})$ velmi málo. Sorpci $\text{Cr}(\text{VI})$ snižuje např. $\text{CO}_2(\text{aq})$, H_4SiO_4 a SO_4^{2-} (Palmer a Wittbrodt, 1991).

3.3 Bioremediační metody sanace $\text{Cr}(\text{VI})$

Hlavním procesem využívaným biologickými metodami sanace podzemních vod kontaminovaných $\text{Cr}(\text{VI})$ je **biologická redukce** (Lovley, 1993; Valls et al., 2000). Kromě toho se ještě mohou uplatňovat procesy periplazmické biosorpce a intracelulární bioakumulace, kterými se však práce dále nevěnuje.

3.3.5 Biologická redukce

Biologickou redukcí mikroorganismy dochází k transformaci $\text{Cr}(\text{VI})$ na méně toxickou formu $\text{Cr}(\text{III})$. $\text{Cr}(\text{III})$ by měl v horninovém prostředí vytvářet primárně nerozpustný $\text{Cr}(\text{OH})_3$.

Jako první publikovali schopnost bakterií redukovat šestimocný chrom koncem 70. let Romanenko a Korenkov (1977). Poté byla izolována a zkoumána řada bakterií redukujících Cr(VI). Většina bakterií schopných redukovat Cr(VI) patří do skupiny **anaerobních síran redukujících bakterií** (SRB) např. *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfomicrobium neregicum* a *Desulfotomaculum reducens* (Wang et al., 1989; Wang a Shen, 1995; Lovley a Phillips, 1994; Tebo a Obrastsova, 1998; Tucker et al., 1998; McLean a Beveridge, 2001; Michel et al., 2001; Ganguli a Tripathi, 2002). Dalšími **anaerobními baktériemi a/nebo fakultativně anaerobními baktériemi**, u kterých byla zjištěna schopnost redukovat Cr(VI), jsou *Microbacterium* sp. MP30 (Pattanapitpaisal et al., 2001), *Geobacter metallireducens* (Lovley et al., 1993), *Shewanella putrefaciens* MR-1 (Myers et al., 2000), *Pantonea agglomerans* SP1 (Francis et al., 2000), *Agrobacterium radiobacter* EPS-916 (Llovera et al., 1993). Redukce Cr(VI) byla pozorována u některých extrémofilních bakterií jako jsou *Deinococcus radiodurans* R1 (Fredrikson et al., 2000) a *Pyrobaculum islandicum* (Kashefi a Lovley, 2000).

Schopnost redukovat chrom byla nalezena rovněž u řady **aerobních bakterií**: *Pseudomonas putida* P18, *Pseudomonas aeruginosa* P16 (Dogan et al. 2011), *Pseudomonas Maltophilia* O-2, *Pseudomonas syntaxa*, *Escherichia coli* ATCC 33456, *Bacillus megaterium* TKW3, *Waustersia eutropha*, *Shewanella alga* BrY-MT a u dalších neidentifikovatelných bakterií (Cheung a Gu, 2007).

Redukce Cr(VI) mikroorganismy souvisí s respiračními reakcemi, které mikroorganismům poskytují energii potřebnou pro metabolismus buněk a pro jejich růst. K přenosu energie v buňce je organizmy využíván energeticky bohatý adenosin trifosfát (ATP) vznikající při transferu elektronů z donoru na akceptor. Obecnou respirační rovnici pro oxidaci – redukci Cr lze zjednodušit v tomto smyslu za aerobních a anaerobních podmínek takto (Guha et al., 2001):

Aerobní respirace:

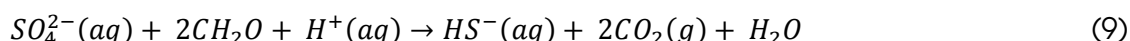
donor elektronu (redukováný) + Cr(VI) (akceptor elektronu oxidováný) + kyslík = bakterie = Cr(III)(akceptor elektronu redukováný) + CO₂ (donor elektronu oxidováný) + H₂O

Anaerobní respirace:

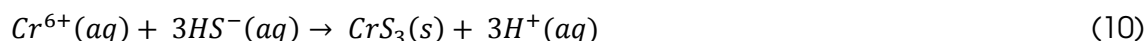
donor elektronu (redukováný) + Cr(VI) (akceptor elektronu oxidováný) = bakterie = Cr(III)(akceptor elektronu redukováný) + CO₂ (donor elektronu oxidováný) + CH₄

Donorem elektronu jsou organické substráty, které se ve zvodněném prostředí vyskytují přirozeně (humínové a fulvokyseliny) nebo jsou při aktivním bioremediačním zásahu dodávány (např. etanol, glukóza, syrovátka, glycerol, mléčnan, máselnan,....).

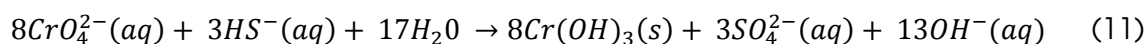
Jak je zmíněno výše, většina bakteriálních kmenů, u kterých byla zjištěna schopnost redukovat Cr(VI), patří do skupiny síran redukujících bakterií. Síran redukující bakterie spojují oxidaci organického substrátu nebo molekulárního H₂ (donory elektronu) s redukcí síranů jako externího akceptoru elektronu za anaerobních podmínek podle rovnice (Somasundaram et al., 2011):



Proces se nazývá disimilační redukce síranů (síra se nestává součástí buněčné hmoty). Konečným produktem této reakce je sulfan, který může reagovat s kationty těžkých kovů a vytvářet s nimi nerozpustné sulfidy (Somasundaram et al., 2011):



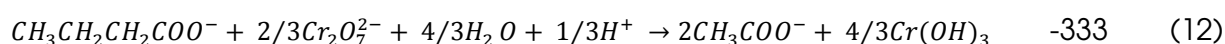
nebo redukovat oxidované formy rozpustných toxických kovů, včetně Cr(VI) na formy méně toxické a nerozpustné (Pettine et al., 1994; Kim et al., 2001; Wielinga, et al., 2001)

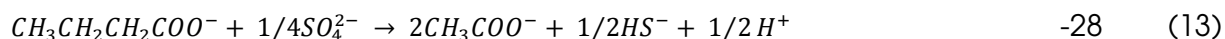


Bylo zjištěno, že některé síran redukující bakterie mohou přímo enzymaticky redukovat Fe(III), Cr(VI) a U(VI), ale nejsou schopny růstu při použití těchto kovů jako akceptorů elektronu (Lovley et al., 1993; Lovley a Phillips, 1994). Tebo a Obratsova (1998) však prokázali na kmeni *Desulfotomaculum reducens* sp. MI-1 redukcí Cr(VI) a dalších kovů: Mn(IV), Fe(III), U(VI), jako součást energii generujícího metabolismu podporujícího anaerobní růst a to za nepřítomnosti síranů.

Tato schopnost byla prokázána s využitím máselnanu jako zdroje uhlíku. Také další substráty: mléčnan a valeran vykazaly růst tohoto kmene bakterie s využitím výše uvedených akceptorů elektronu. Substráty byly oxidovány neúplně na octan. V případě absence akceptorů elektronu k bakteriálnímu růstu nedošlo. Reakce a termodynamika redukce Cr(VI) a síranů podporující tento mechanismus bakteriálního růstu jsou následující (Tebo a Obratsova, 1998):

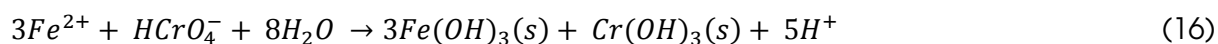
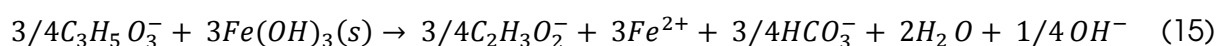
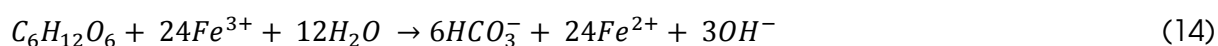
$$\Delta G^\circ \text{ (kJ.mol}^{-1}\text{)}$$





Stejnou vlastnost bakteriálního růstu s využitím Cr(VI) jako jediného akceptoru elektronu (jako náhrada za SO_4^{2-}) zjistili Cheung a Gu (2003) u izolátu síran redukující bakterie nazvaného TKW. Obdobně byla prokázána enzymatická redukce Cr(VI) u *Desulfovibrio vulgaris*, druh Hildenborough (Ehrlich, 2002).

Dalším příkladem redukce Cr(VI) je nepřímá redukce biogenním Fe(II) vznikajícím metabolickými procesy železo redukujících bakterií (Somasundaram et al. 2011):



Je těžké stanovit, zda k redukci Cr(VI) dochází primárně přímo, tedy enzymaticky nebo nepřímo biogenním sulfanem nebo Fe(II). Na základě kinetiky obou procesů, kdy Wielinga et al. (2001) uvádí více než 100x rychlejší redukci Cr(VI) dvoumocným železem oproti přímé bioredukci kmenem *D. vulgaris*, se lze domnívat, že dominujícím procesem v anaerobních systémech bude nepřímá redukce biogenním Fe(II) nebo sulfanem.

3.3.6 Mechanismus biologické redukce Cr(VI)

Např. Lovley a Phillips (1994), Michel et al. (2001) nebo Cheung a Gu (2007) se ve svých studiích zaměřili na studium enzymů, které katalyzují biologickou redukci Cr(VI).

V případě **aerobních bakterií** je až na výjimky redukce Cr(VI) katalyzována rozpustnými enzymy. Příkladem jsou rozpustné Cr(VI) reduktázy flavoproteiny ChrR a YieF purifikované z *Pseudomonas putida* MK1 a *Escherichia coli* (Cheung a Gu, 2007). ChrR katalyzuje nejdříve přenos jednoho elektronu, následuje transfer dvou elektronů na Cr(VI) za vzniku meziproductů Cr(V) a/nebo Cr(IV) před další redukcí až na Cr(III). I když část Cr(V) se spontánně reoxiduje za vzniku reaktivních kyslíkatých látek, redukce Cr(V) transferem dvou elektronů katalyzovaným ChrR omezuje možnost vzniku škodlivých radikálů (Ackerley et al., 2004). Enzym YieF vykazuje přenos čtyř elektronů najednou. Tři z nich jsou spotřebovány přímou redukcí Cr(VI) na Cr(III), zbylý elektron redukuje kyslík. V případě aerobních bakterií *Pseudomonas Maltophilia* O-2 a *Bacillus megaterium* TKW3 je redukce Cr(VI) katalyzována membránově vázanými

reduktázami. Z bakterie *Bacillus megaterium* TKW3 byla izolována reduktáza využívající NADH jako donor elektronu. Kinetika redukce Cr(VI) však ještě nebyla popsána (Cheung et al., 2006).

V **anaerobních podmínkách** je redukce Cr(VI) zprostředkována jak rozpustnými enzymy, tak i membránově vázanými - periplazmatickými enzymy.

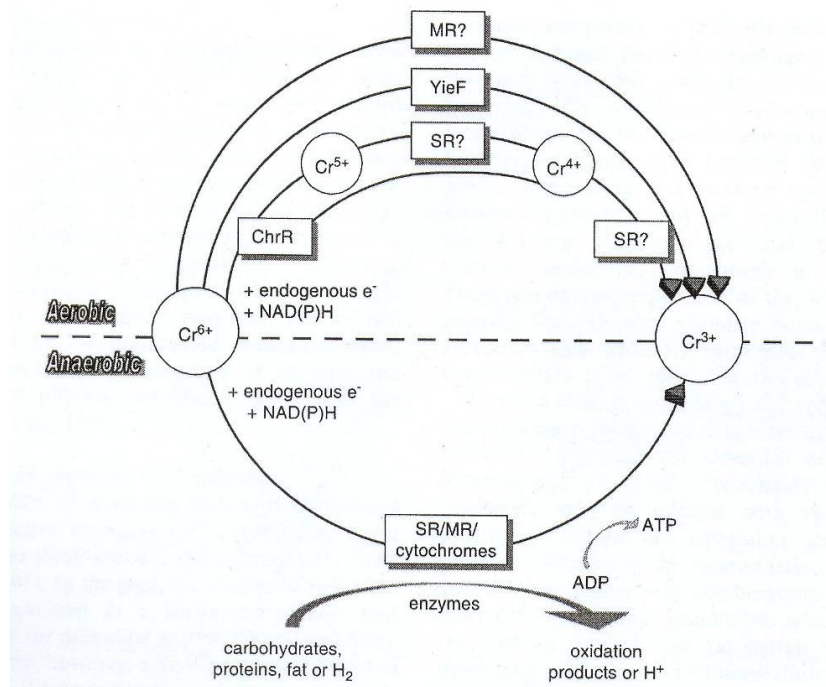
U síran redukujících a síru redukujících bakterií byl zjištěn velký počet periplazmatických enzymů - více hemových cytochromů c označovaných jako cytochromy c3. Lovley zjistil, že tetrahemový cytochrom c3 bakterie *Desulfovibrio vulgaris* kmen Hildenborough katalyzuje redukci a srážení U(VI) a Cr(VI) (Lovley et al. 1993; Lovley a Phillips 1994). Jinými autory byly v bakteriích *Desulfovibrio* zjištěny další více hemové cytochromy c3. Michel et al. (2001) testovali schopnost několika polyhemových cytochromů c a hydrogenáz síran redukujících a síru redukujících bakterií:

- cytochrom c3 (z *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough)
- cytochrom c3 (z *Desulfomicrobium norvegicum*)
- cytochrom c7 (z *Desulfuromonas acetoxidans*)
- cytochrom c553 (z *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough)
- cytochrom c3 H35M (mutovaný cytochrom z *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough)
- cytochrom c3 H22M (mutovaný cytochrom z *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough)
- (Fe) hydrogenáza (z *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough)
- (Ni-Fe-Se) hydrogenáza (z *Desulfomicrobium norvegicum*)

Výsledky laboratorních zkoušek ukázaly, že schopnost redukovat Cr(VI) mají kromě dalších cytochromů c i další enzymy např. (Ni-Fe-Se) hydrogenáza a především (Fe) hydrogenáza. Tyto hydrogenázy se nachází rovněž v periplazmatu bakterií. Pro jejich nízké obsahy a senzitivitu na kyslík a teplotu se však jejich průmyslové využití autory nedoporučuje.

Naproti tomu dobrá termostabilita cytochromů c3 a jejich vysoká koncentrace v SRB je činní potenciálně vhodné pro průmyslové využití. Nicméně, Michel et al. (2001) doporučují využít aktivity celých buněk a směsných populací než čistých proteinů.

Naopak, Cheung a Gu (2007) vidí budoucnost ve zvýšení redukčního potenciálu Cr(VI) reductáz genetickým a/nebo proteinovým inženýrstvím a po vyřešení jejich imobilizace je využívat k bioremediaci Cr(VI).



Obr. 4: Možné mechanismy enzymatické redukce Cr(VI) za aerobních (horní část) a anaerobních (dolní část) podmínek (převzato z Cheung a Gu, 2007).

Poznámka k Obr. 4: za aerobních podmínek enzym ChrR bakterie *P. putida* MK1 katalyzuje kombinaci přenosu jednoho a dvou elektronů na Cr(VI) za přechodného vzniku Cr⁵⁺. Enzym YieF bakterie *E. coli* zprostředkovává přenos čtyř elektronů pro přímou redukci Cr(VI) na Cr(III) a transferem zbylého elektronu na kyslík. Blíže nepopsaná membránově vázaná Cr(VI) reductáza byla izolována z *B. megaterium* TKW3. Pro anaerobní prostředí jsou uváděny jak rozpustné, tak i membránově vázané enzymy redukující Cr(VI), včetně cytochromů, které jsou součástí systému přenosu elektronů. Enzymy zúčastňující se redukce Cr(VI) jsou uvedeny v rámečku. SR a MR znamená rozpustné, resp. membránově vázané reductázy.

3.3.7 Komplexace Cr(III) při biologické redukci Cr(VI)

Mnoho bakteriálních kmenů je schopno redukovat Cr(VI) na Cr(III). Identifikaci koncových produktů redukce však byla v literatuře věnována malá pozornost. Je obecně míněno, že mikrobiální redukce Cr(VI) vytváří primárně nerozpustný Cr(III) jako Cr(OH)₃ nebo Cr₂O₃ na základě chemické povahy Cr(III) v anorganickém prostředí. Přibývají však důkazy o tom, že nerozpustný Cr(III) nebývá koncovým produktem po

mikrobiální redukci chromanu. Významné množství Cr(III) zůstává v supernatantu bakteriálních kultur a nesráží se po redukci (např. Shen a Wang, 1993 nebo Middleton et al., 2003). Rovněž terénním měřením byly zjištěny koncentrace Cr(III) vyšší, než se předpokládá při rozpouštění Cr(OH)₃ a Cr₂O₃ (Icopini a Long, 2002). Kromě toho bylo zjištěno, že enzymatické redukce chromanu vytváří organo-Cr(III) komplexy, kde je Cr(III) vázán na mikrobiální organický reductant, jako je cytochrom c₇ (Assfalg et al., 2002) a NAD⁺, (Puzon et al., 2002)

V rámci studie Puzona et al. (2002) byly testovány koncové produkty biotické redukce Cr(VI) za přítomnosti celulárních organických metabolitů. Byla zjištěna tvorba jak rozpustných, tak i nerozpustných organo-Cr(III) koncových produktů během redukce Cr(VI), viz Tab. 1. Dále bylo zjištěno, že kontakt již redukované trojmocné formy chrómu s celulárními organickými metabolity organo – Cr(III) komplexy nevytváří.

Tabulka 1: Koncentrace rozpuštěného Cr(III) v organo – Cr(III) komplexech (Puzon et al. 2005).

Rozpustnost komplexu ^a	Organický ligand	Rozpuštěný Cr(III) (mmol/l) ^b	Percentuelní množství rozp. Cr(III)
vysoce rozpustné organo – Cr(III) komplexy	histidin	5,01 ± 0,06	100%
	glutation	4,76 ± 0,15	95%
	α-ketoglutarát	4,65 ± 0,05	93%
	citrát	4,30 ± 0,10	86%
	askorbát	4,21 ± 0,17	84%
	malát	3,88 ± 0,04	78%
	serin	3,62 ± 0,14	72%
	cystein	3,43 ± 0,10	69%
	pyruvát	3,25 ± 0,17	65%
	oxalacetát	2,86 ± 0,05	57%
málo rozpustné komplexy	leucin	0,71 ± 0,04	14%
	glycin	0,68 ± 0,01	13%
nerozpustné komplexy	sukcinát	0,02 ± 0,01	0,4%
	sumarát	< 0,01	0%
	laktát	< 0,01	0%
	tyrosin	< 0,01	0%
	octan	< 0,01	0%
etanol	< 0,01	0%	
kontrola KPi – Cr(III)	100 mM KPi pH 7,0	< 0,01	0%

^a – Komplexy byly sdruženy na základě množství přítomného rozpuštěného Cr(III), vysoce rozpustný (> 1 mM), málo rozpustný (0,02 až 1 mM) a nerozpustný 0,02 < 0,02 mM). ^b - Počáteční koncentrace chromu pro každou reakci byla 5 mM. Redukce byla provedena v anaerobních podmínkách za přítomnosti nebo nepřítomnosti 20 mM organické látky a při použití pufru 100 mM KPi pH 7,0 při 23°C.

Mechanismy uvolnění intracelulárně vzniklých rozpustných organo – Cr(III) komplexů mimo buňky mikroorganismů nejsou známy. K uvolnění může dojít buď lyzí buněk nebo způsobem podobným exportu proteinů (Andersen et al., 2001) nebo jinými transportéry ATP-vazebných kazet (Ballatori, 2002) anebo jiným způsobem.

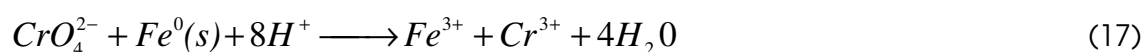
Rozpustné komplexy mohou rovněž vznikat mimo buňku interakcí chromu s intracelulárními komponenty uvolněnými z buněk. Dogan et al. (2011) studoval roli exopolymerních látek (EPS) na mikrobiální redukci Cr(VI) dvěma kmeny *Pseudomonas* (*P. putida* P18 a *P. aeruginosa* P16). Exopolymerní látky jsou produkovány mikroorganismy jako odpověď na environmentální stres. Tímto stresem může být i účinek toxických látek jako je Cr(VI) (Priester et al., 2006). V rámci studie Dagana et al. (2011) byly studovány účinky uronových kyselin (kys. galakturonové, glukuronové a algové) jako hlavních EPS přímo extrahovaných z výše uvedených mikroorganismů.

Výsledky ukázaly, že redukce Cr(VI) bakterií *Pseudomonas* vede k produkci rozpustných koncových produktů Cr(III) a nikoliv ke sraženinám Cr(III), jako Cr(OH)_{3(s)}. Přítomnost komplexních ligandů (uronových kyselin) stimuluje redukci Cr(VI), avšak zároveň zvyšuje rozpustnost Cr(III). Rovněž bylo zjištěno, že přítomnost Cr(III) výrazně snižuje aktivitu Cr(VI) reductázy obou bakterií, a že tento inhibiční efekt byl snížen dodáním uronové kyseliny (kys. algová). Dagan et al. (2011) došel k závěru, že vytvořené organo-Cr(III) komplexy chrání cytoplazmatické a/nebo periplazmatické enzymy Cr(VI) reductázy před inaktivací Cr(III) tím, že komplexovaný Cr(III) již není dostupný pro ostatní molekuly jako jsou povrchová místa buněk zodpovědných za redukci Cr(VI).

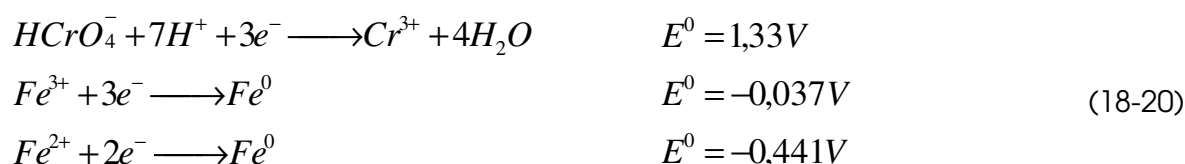
Komplexy zůstávají rozpustné a stabilní v širokém rozmezí pH od cca 4 do 14 (podle typu komplexu). V případě výskytu organo - Cr(III) komplexů v horninovém prostředí mohou tyto umožnit interakci s manganem a může tak dojít k reoxidaci Cr(III) na Cr(VI) (Barlett a James, 1979). Komplexy mohou být rovněž v přírodním prostředí přeměněny na Cr(OH)₃ nebo Cr₂O₃ pomalou výměnou ligandů nebo mikrobiální užití organické složky.

3.4 Redukce Cr(VI) částicemi nulmocného nanoželeza

Nulmocné železo (Fe⁰, zero valent iron – ZVI) představuje mírné redukční činidlo schopné redukovat šestmocný chrom Cr(VI). Při imobilizaci šestmocného chromu v horninovém prostředí dochází k jeho redukci na trojmocnou formu, k jejímu vysrážení v podobě nerozpustné sraženiny a tím k fixaci šestmocného chromu v horninovém prostředí. Redukce chromanu probíhá dle rovnice:

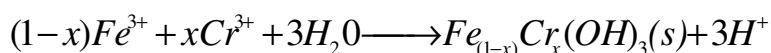
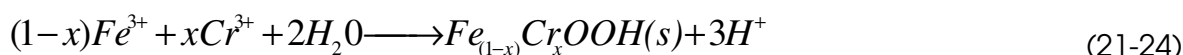
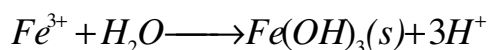
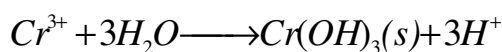


Standardní elektrodové potenciály spolu se zápisem poloreakcí ve směru redukce jsou uvedeny níže (Gheju, 2011):



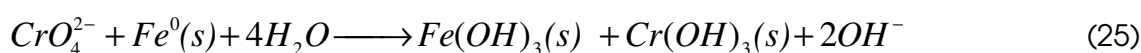
Vzhledem k uvedeným standardním elektrodovým potenciálům lze předpokládat, že chromanem se Fe⁰ bude oxidovat až na Fe(III).

Za běžných podmínek se vznikající trojmocné ionty obou kovů dále srážejí za vzniku nerozpustných čistých (rovnice 21 a 22) nebo směsných (rovnice 23 a 24) hydratovaných oxidů nebo hydroxidů podle následujících rovnic:

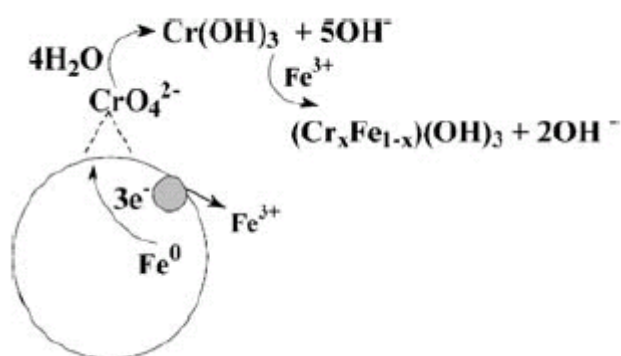


$$x = 0.75 - 0.66$$

Souhrnně lze proces redukce a srážení (rovnice 17, 21 a 22) popsat jedinou rovnicí:



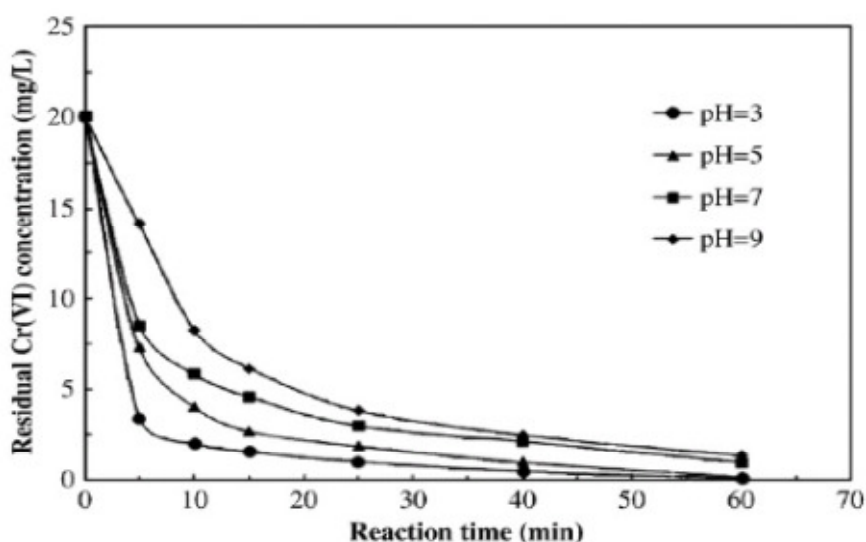
Z rovnice (25) je zřejmé, že pH během celého procesu roste. Ve fázi redukce se spotřebuje více protonů než jich vznikne během fáze srážení. Schematicky celý proces ilustruje Obr. 5. Teoretický molární, a prakticky i hmotnostní poměr reakce mezi Cr(VI) a Fe⁰ je 1:1. V praxi je ale nutné volit dávkování Fe⁰ daleko vyšší než je dáno stechiometrií reakce, kvůli pasivaci povrchu nanočástic a neaktivnímu podílu nulmocného železa uvnitř nanočástice. V literatuře (Zhang, 2003) se udávají hodnoty v širokém rozmezí od 50 do 180 mg Cr(VI)/g Fe⁰ v závislosti na experimentálních podmínkách.



Obr. 5: Schéma redukčních a srážecích reakcí probíhajících na rozhraní nanočástice/voda

Průběh redukčního děje (rovnice 17) je značně závislý na pH podzemní vody, kdy s klesajícím pH rychlost reakce roste. Laboratorní testy ukázaly, že optimální pH se

pohybuje kolem hodnoty 5 (Yoon 2011). Většina autorů však uvádí jako optimální pH=3 (Alidokht et al., 2011; Niu et al., 2005; Rahmani et al., 2011). Další snižování pH nevede k urychlení reakce, neboť se začínají uplatňovat další jevy jako je vliv pH na rozpustnost vznikajících sraženin, tvorba elektroneutrální kyseliny chromové atd. Závislost průběhu redukce na pH dokládá následující obrázek (Christophoridis et al., 2009).

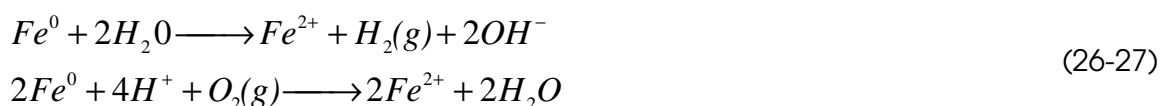


Obr. 6: Vliv pH na průběh redukce Cr(VI) ($C_{Cr0}=20$ mg/l, $C_{Fe0}=0.6$ g/l) (Christophoridis 2009)

Vliv teploty na účinnost imobilizace zkoumal Wu s nanočásticemi stabilizovanými magnetitem (Wu et al., 2009). Zjištěný vliv teploty byl malý. Při poklesu teploty ze 45°C na 25°C se účinnost procesu zvýšila zhruba o 10%. Vysvětlení tkví zřejmě ve větší náchylnosti nanočástic k aglomeraci při vyšších teplotách. Na druhou stranu, zcela opačná reakční závislost na teplotě byla zjištěna v práci zabývající se nanočásticemi stabilizovanými karboxymethylcelulózou (Wang et al., 2010).

3.4.8 Pasivace nanočástic

Ve vodném prostředí se nulmocné železo rovněž pasivuje (koroduje) oxidací vodou (anaerobní podmínky (26)) nebo v ní rozpuštěným kyslíkem (aerobní podmínky (27)), popřípadě s dalšími přítomnými oxidačními činidly (např. dusičnany), přičemž významnější je koroze v aerobním prostředí:



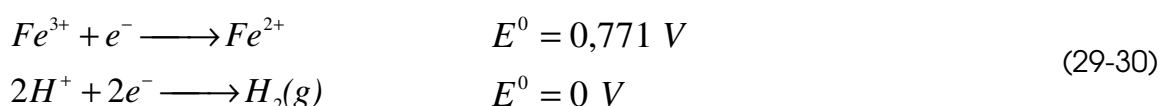
Obě reakce vedou ke zvýšení hodnoty pH podzemní vody a ke snížení hodnot oxidačně-redukčního potenciálu. Při nižším pH probíhá koroze rychleji (Christophoridis et al., 2009).

Yoon et al. (2011) laboratorními pokusy s mikro železem zjistil rychlejší pokles koncentrace Cr(VI) za přítomnosti kyslíku, tedy v oxických podmínkách a to při pokusech prováděných za pH 4, 5 i 6. Vysvětlení zřejmě spočívá v usnadnění sorpce Cr(VI) na vzniklých oxidech železa.

Vznikající dvojmocné železo se sráží v podobě hydroxidu železnatého (pKs=15,10) v zásadité oblasti pH (pH minimální rozpustnosti ~10,8). Dvojmocné železo se může za vysoké koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH>7 (s kinetikou značně závislou na pH) dále oxidovat na trojmocné železo, které se jako hydroxid železitý sráží ještě lépe (pKs=39,43; pH minimální rozpustnosti ~7,5). V kyselé oblasti (pH~5) převládají dvojmocné i trojmocné železo v rozpuštěné formě. Celý proces ilustrují následující tři rovnice (28) a dále rovnice (27) a (22):



Dvojmocné železo vzniklé reakcemi (26 a 27) je z termodynamického hlediska stále dostatečně silným redukčním činidlem schopným redukovat Cr(VI), což dokazuje hodnota standardního elektrodového potenciálu ve směru redukce (29), i když reakce již probíhá, díky vyšší hodnotě E^0 , méně ochotně. Obdobně totéž platí i pro vodík (rovnice 30) vznikající při korozi nulmocného železa vodou reakcí (26) (Wu et al., 2009).



Gheju (2011) velmi dobře popisuje mechanismy nepřímé homogenní redukce Cr(VI) produkty koroze Fe^0 . Problematický tedy není vznik samotných rozpustných produktů koroze (Fe(II), Fe(III), H_2) ale pokrytí nanočástic železa pasivační vrstvou málo rozpustných hydroxidů $Fe(OH)_2$ a $Fe(OH)_3$, které zpomalují přenos hmoty i náboje na rozhraní částice/voda.

Sraženina hydroxidu železitého, která svým skutečným složením lépe odpovídá hydratovanému oxidu železitému ($Fe_2O_3 \cdot xH_2O$ nebo amorfní $FeO(OH)$) než $Fe(OH)_3$, dále zraje a mění se postupně na α - $FeO(OH)$ (goethit), γ - $FeO(OH)$ až nakonec na Fe_2O_3 (hematit) v závislosti na hydrochemických podmínkách zvodně.

Naopak, Xu a Zhao (2007) tvrdí, že vznikající produkty koroze nejsou schopné dále redukovat Cr(VI).

3.4.9 Kinetika reakce

Kinetika redukce Cr(VI) nulmocným železem se zpravidla popisuje pomocí rovnice pro reakci pseudoprvního řádu (Chritophoridis et al., 2009):

$$-\frac{dc_{Cr}}{dt} = k c_{Cr} \quad (31)$$

kde c_{Cr} představuje molární koncentraci chrómu, t čas a k je pozorovaná rychlostní konstanta (min^{-1}), představující směrnici vztahu $\ln(c_{Cr})$ versus čas (min).

Pokud bychom vztáhli rychlostní konstantu reakce na celkový povrch částic (rovnice 32), získáme normalizovanou rychlostní konstantu k_{SA} a zjistíme, že je víceméně konstantní jak pro makro železo tak pro nano železo (Chritophoridis et al., 2009):

$$k_{SA} = \frac{k}{a_s \rho_{Fe}} \quad (32)$$

a_sspecifický povrch nanočástic (m^2/g)

ρ_{Fe}hmotnostní koncentrace nanočástic (g/l)

Pozorovaná rychlostní konstanta k lineárně roste s rostoucím množstvím aplikovaného nanoželeza a naopak klesá s rostoucí koncentrací kontaminantu (Chritophoridis et al. 2009). Lineární závislost pozorované rychlostní konstanty na koncentraci kontaminantu byla pozorována i u dalších kontaminantů (např. CIU). Ponder při pokusech s nanočásticemi vázanými na nosiči z pryskyřice (Ferragel) dále zjistil, že při překročení kritického molárního poměru $nZVI/\text{kontaminant}$ rovného 10 pozorovaná rychlostní konstanta náhle vzroste, což neodpovídá rovnici (31) (Ponder et al., 2010). V případě Cr(VI) vzrostla pozorovaná rychlostní konstanta asi 5x.

Integrální tvar kinetické rovnice (31), popisuje klesající exponenciální křivku a má tvar:

$$c = c_0 e^{-k t} \quad (33)$$

Jelikož chemických i fyzikálních dějů projevujících se poklesem koncentrace Cr(VI) se uplatňuje více najednou, názory na skutečný řád reakce redukce jsou různé. Zde zmíněná rychlostní rovnice pro reakci pseudoprvního řádu je však hojně používána (Chritophoridis et al., 2009, Alidokht et al., 2011) pro vyhodnocení rychlosti průběhu této heterogenní reakce.

3.4.10 Sorpce Cr(VI) iontů na povrchu nanoželeza a produktech jeho oxidace

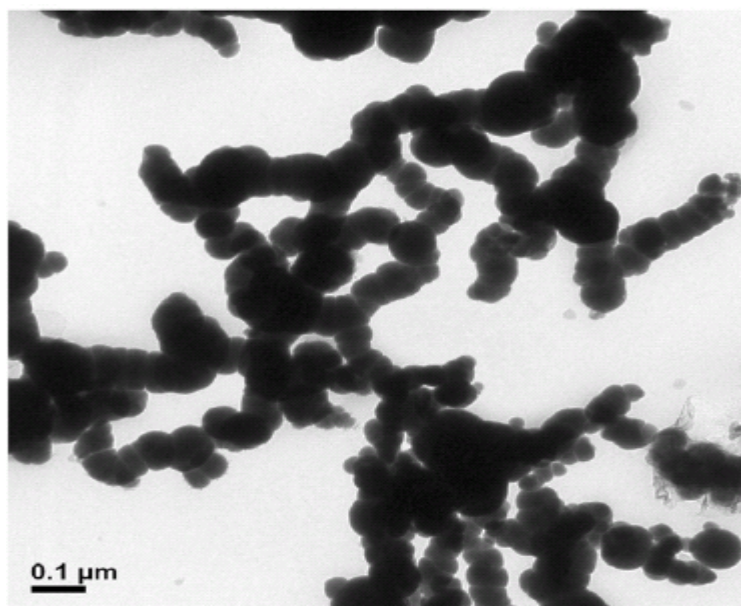
Předpokládá se, že samotné redukci předchází sorpce (nejspíš chemisorpce) Cr(VI) na povrchu částic nanoželeza (Niu et al., 2005). Doba trvání této fáze (primární sorpce) je odhadována na jednotky minut. Poté dochází následně k redukčním pochodům a k tvorbě sraženiny na povrchu nanočástic (Alidokht et al., 2011).

O sekundární sorpci hovoříme v případě sorpce aniontů Cr(VI) na povrchu vzniklých hydroxidů. Obecně platí, že sorpce aniontů klesá se vzrůstajícím pH, neboť na povrchu hydroxidů začíná převažovat záporný náboj. Vyšší pH podporuje naopak sorpci kationtů (redukovaný Cr(III)).

Zatímco v případě primární sorpce je CrO_4^{2-} nakonec imobilizován v podobě nerozpustného hydroxidu chemickou redukcí nanoželezem, CrO_4^{2-} vázaný sekundární sorpcí nikoliv (Geng et al., 2005). Proto může sekundárně vázaný CrO_4^{2-} představovat zdroj uvolňování kontaminantu zpět do roztoku, zejména při změnách pH popřípadě při navýšení koncentrací jiných vícemocných aniontů (SO_4^{2-} , PO_4^{3-}).

3.4.11 Aglomerace nanočástic a jejich modifikace

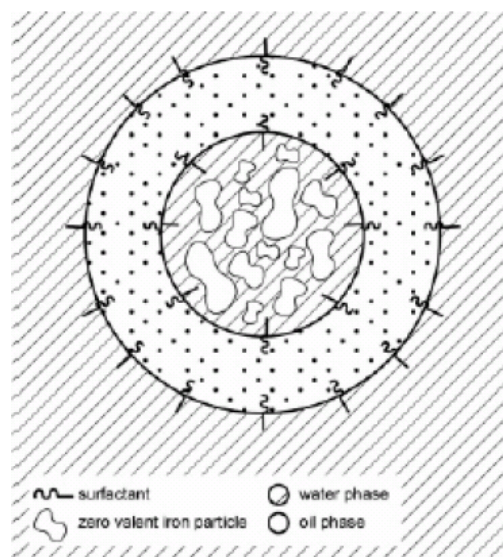
Jevem, který negativně ovlivňuje použití nZVI k redukcí Cr(VI) je náchylnost k tvorbě agregátů/clusterů. Tím se zvětšuje velikost částic, což má za následek snížení specifického reakčního povrchu i snížení mobility částic v horninovém prostředí. Udává se, že částice nZVI migrují v horninovém prostředí pouze do vzdálenosti několika metrů od aplikačního vrtu (Zhang, 2003). Obecně platí, že míra tvorby agregátů klesá se snižujícím se průměrem připravených nanočástic. Dále se uvádí, že při velmi nízké koncentraci (<30 mg/l) zůstávají nanočástice stabilní bez ohledu na jejich velikost (Keane, 2009). Mechanismů aglomerace je několik a jsou založeny na magnetických, elektrostatických i gravitačních přitažlivých silách. Fotografie clusterů nanoželeza pořízená transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) je na Obr. 7.



Obr. 7: Fotografie clusterů nanočástic nulmocného železa (Wang et al., 2010)

Z těchto důvodů se v posledních letech objevují snahy o modifikaci/stabilizaci nanočástic, která by zabránila jejich agregaci s vidinou snížení nutných dávek nZVI k dosažení požadované účinnosti sanace. Několik možností modifikace nanočástic zmínovaných v odborné literatuře je uvedeno dále v textu.

Jednou z možností je příprava částic emulzifikovaného nanoželeza (Emulsified Zero Valent Iron – EZVI), kdy jsou nanočástice enkapsulovány do hydrofóbního oleje a celá micela je stabilizována přidavkem surfaktantu (viz Obr. 8). Olejová vrstva stabilizovaná surfaktantem se po aplikaci pomalu rozpouští a degraduje a pozvolna uvolňuje reaktivní nanočástici.



Obr. 8: Schéma částice emulzifikovaného nZVI (Watlington, 2005)

Důležitou veličinou, která má vliv na aglomeraci nanočástic, je elektrokinetický potenciál (ζ - potenciál), který se vytváří při iontové adsorpci na povrchu nabitých nanočástic (elektrická dvojvrstva) (Wang et al. 2010). Na velikost ζ potenciálu má vliv pH i iontová síla roztoku. Při určité hodnotě pH je ζ potenciál nulový a dochází ke shlukování částic. Elektrostatická stabilizace nanočástic za použití některých polymerů (například karboxymethylcelulóza) je většinou založena právě na zvyšování povrchového náboje nanočástice a tím i ζ potenciálu a vzájemných repulsních sil mezi nanočásticemi.

Druhým způsobem stabilizace je stabilizace stérická, kdy je nanočástice obalena hydrofilním polymerem. V praxi mohou být uplatněny i oba přístupy zároveň.

Alidokht a kol. zkoumali možnost stabilizace škrobem a ukázali, že stabilizované částice jsou schopné zredukovat přibližně 1,6x více Cr(VI) než nestabilizované částice nZVI (Alidokht et al., 2011), a to konkrétně 33,33 mg Cr(VI)/g Fe(0). 99% účinnosti redukce stabilizovanými částicemi bylo dosaženo za 60 minut trvání reakce ($c(\text{Cr(VI)})_0=20$ mg/l, $c(\text{Fe})_0=0,6$ g/l, $\text{pH}_0=5$).

Ke stabilizaci nanočástic byla využita například karboxymethylcelulóza (CMC) (Franco et al., 2009). Nanočástice byly připraveny redukcí roztoku síranu železnatého tetrahydrogenboritanem sodným za přídavku CMC v ultrazvukové lázni. Experimenty byla prokázána vyšší efektivita stabilizovaných nanočástic v porovnání s nestabilizovanými. 99% redukce bylo dosaženo za 24 hodin trvání pokusu

($c(\text{Cr(VI)})_0=1000 \text{ mg/l}$, $c(\text{Fe}^0)_0/c(\text{Cr(VI)})_0=3$, $\text{pH}_0=5$). Jako optimální je udávána koncentrace CMC 500 mg/l při koncentraci Fe^0 100 mg/l. Nevýhodou použití CMC je, že organické produkty jejího rozkladu mohou zvyšovat rozpustnost vznikajícího Cr(III) . Navíc obal z CMC zabraňuje samotnému průběhu redukční reakce.

Wu et al. (2009) použil ke stabilizaci suspenze nanoželeza magnetit Fe_3O_4 , kdy jednotlivé nanočástice jsou vázány na povrchu osmistěnu magnetitu magnetickou silou a tím je účinně bráněno jejich aglomeraci, přičemž magnetit se rovněž aktivně zapojuje do probíhajících redoxních dějů. Jako optimální hmotnostní poměr $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Fe}$ je uvedena hodnota 40:1.

Přibližně o 20% vyšší účinnost redukce Cr(VI) byla zjištěna při porovnání částic stabilizovaných polysacharidem chitosanem ($c(\text{Cr(VI)})_0=400 \text{ mg/l}$, $c(\text{Fe(0)})_0=0,2 \text{ g/l}$) s částicemi nestabilizovanými při době trvání reakce 180 minut (Geng et al., 2009). Navíc, takto upravené částice jsou stabilní při kontaktu se vzduchem po dobu 2 měsíců.

3.4.12 (Eko)toxická nanočástic železa

Prací, které by se věnovaly ekotoxickým vlivům nZVI, zejména na autochtoní mikroflóru horninového prostředí zasažené injektáží, je pouze několik (Grieger et al., 2010). Vzhledem k poměrně rychlým přeměnám nZVI a nízké migrační schopnosti lze očekávat, že ekotoxický efekt bude pouze lokální s přirozenou obnovou původního oživení po spotřebování veškerého nZVI. Čas životnosti nZVI se odhaduje přibližně na 3/4 roku v závislosti na typu použitého nZVI a okolních podmínkách. Aktivní reakční doba nanočástic je kratší. Plošně větší ekotoxický efekt lze očekávat při použití modifikovaných částic s větší migrační schopností.

Prvotní ekotoxický vliv nZVI lze spatřovat ve vyvolaných hydrochemických změnách (nárůst pH a pokles Eh), které vyvolají odpovídající změnu mikrobiálního oživení.

Lee a kol. zjistili lineární závislost mezi koncentrací nZVI a logaritmem inaktivace bakteriálního kmene *E. Coli* (Lee et al., 2008). Toxicita nZVI byla daleko nižší při aerobních podmínkách a toxický účinek nebyl pozorován v případě jiných forem výskytu železa (makroželezo, Fe(III)). Proto lze předpokládat, že ekotoxický efekt je způsoben jednak nZVI a také ionty Fe^{2+} , a že částice nZVI přestávají být toxické po jejich kompletní oxidaci. Za anaerobních podmínek byl při koncentraci nZVI 9 mg/l pozorován pokles počtu kolonií *E. Coli* o více než 4 řády (počáteční oživení $1 - 2 \times 10^{10}$ KTJ/ml)

Chen uvádí, že pokles počtu kolonií tvořících jednotek byl přibližně 65% a 20% při expozici gram-negativních bakterií *E.Coli*, respektive gram-pozitivních bakterií *B.subtilis* vodné suspenzi nZVI o koncentraci 1g/l trvajících 1 hodinu (Chen et al., 2011). Chen dále uvádí, že důležitým parametrem, který významně snižuje toxicitu nanočástic je přítomnost huminových kyselin. Dále se v literatuře uvádí, že toxicita modifikovaných nanočástic potažených polymery (poly(styren sulfonát), polyaspartát, atd.) je výrazně nižší než v případě čistých nanočástic. Polymery zřejmě zabraňují přímému kontaktu nanočástice s buňkami bakterií.

Toxický vliv Fe^{2+} iontů je s největší pravděpodobností způsoben Fentonovým reakčním mechanismem (rovnice 34 až 36), při kterém jsou intracelulárně generovány velmi reaktivní hydroxylové a hydroperoxylové radikály nebo kyslík, jež způsobují buňkám oxidativní stres, projevující se poškozením proteinů, lipidů i DNA. Jakým způsobem dochází k transportu nanočástic dovnitř buňky není jasné, ale zřejmě se jedná o pinocytózu nebo fagocytózu. Základem procesu je reakce Fe^{2+} iontů s peroxidem vodíku, který se vyskytuje v nízké koncentraci v aerovaných podzemních vodách:



Vzniklé ionty Fe^{3+} mohou dále reagovat s peroxidem vodíku za vzniku hydroperoxylových radikálů nebo s hydroperoxylovými radikály za vzniku kyslíku, přičemž jsou regenerovány Fe^{2+} ionty.



Přímým toxickým efektem se vyznačují i samotné nanočástice nZVI, které se sorbují na stěnu buňky a obalují ji nerozpustnými produkty své degradace. Navíc mají nanočástice zřejmě schopnost fyzicky porušovat buněčnou membránu, čímž dochází k narušení integrity a vyliší cytosolu z buňky (Černík a kol., 2010).

3.5 Závěr literární části

Nejdůležitější poznatky zjištěné během provedené literární rešerše dostupných zdrojů vztahující se k problematice imobilizace chrómu biologickou redukcí a/nebo abiotickou redukcí šestimocného chrómu nanočásticemi nulmocného železa lze shrnout takto:

- Biologickou redukcí mikroorganismy dochází k transformaci Cr(VI) na méně toxickou formu Cr(III). Cr(III) v horninovém prostředí vytváří primárně nerozpustný Cr(OH)₃ nebo Cr₂O₃.
- Většina bakterií schopných redukovat Cr(VI) patří do skupiny anaerobních síran redukujících bakterií (SRB). Schopnost redukovat chróm byla nalezena rovněž u dalších anaerobních a/nebo fakultativně anaerobních bakterií, ale také u řady aerobních bakterií.
- Redukce Cr(VI) mikroorganismy souvisí s respiračními reakcemi, které mikroorganismům poskytují energii potřebnou pro metabolismus buněk a pro jejich růst. V případě aerobních bakterií je až na výjimky redukce Cr(VI) katalyzována rozpustnými enzymy. V anaerobních podmínkách je redukce Cr(VI) zprostředkována jak rozpustnými enzymy, tak i membránově vázanými - periplazmatickými enzymy.
- Dalším mechanismem bio redukce je nepřímá redukce hexavalentního chrómu sulfanem, který vzniká jako produkt metabolismu síran redukujících bakterií nebo dvoumocným železem vznikajícím metabolickou redukcí Fe(III).
- Proces abiotické imobilizace je poměrně složitý a zahrnuje několik různorodých dějů. Těmito ději jsou chemická redukce Cr(VI) nulmocným železem i produkty jeho koroze, vznik a přeměna sraženin obsahujících Cr(III), adsorpce Cr(VI) a Cr(III) na nanočástice a na vznikající sraženiny. Na všechny zmíněné děje má zásadní vliv pH.
- Částice nZVI jsou náchylné k pasivaci, kdy je jejich povrch pokryt málo rozpustnými sraženinami, a k aglomeraci, kdy dochází k jejich shlukování. V těchto případech nelze plně využít veškerého množství použitého nanoželeza respektive velkého specifického povrchu nanočástic.

- K potlačení aglomerace nanočástic jsou používány stabilizační látky jako polymery, magnetit, pryskyřice atd. Takto stabilizované částice se projevují vyšší účinností při redukci Cr(VI).
- Informace o toxicitě nZVI v ekosystému jsou velmi kusé. Ekotoxický vliv na bakteriální oživení způsobený nepřímo oxidativním stresem nebo přímým působením nanočástice může být významný, avšak prostorově lokální, kvůli nízké mobilitě nanočástic v horninovém prostředí a časově omezený, vzhledem ke „stárnutí“ nZVI .

4. Metody práce

4.1 Laboratorní vsádkové pokusy

Laboratorní vsádkové pokusy zaměřené na studium procesu bioredukce s využitím různých substrátů.

Technické provedení těchto zkoušek bylo provedeno pracovníky TUL v rámci výzkumného projektu TAČR TA01021792, jehož je autor dizertační práce hlavním řešitelem. Laboratorní vsádkové zkoušky bioredukce byly provedeny se směsí voda-zemina ve váhovém poměru 5:1. S ohledem na nedostatečný „přirozený“ obsah Cr(VI) v podzemní vodě z lokality uvažované pro pilotní zkoušku, byla tato pro účely zkoušky spikována Cr(VI) ve formě chromanu. Jako donory elektronu byly testovány tyto organické substráty: syrovátka, laktát a rostlinný olej a to všechny v koncentracích TOC 500 mg/l a 100 mg/l. Pro zhodnocení abiotické redukce a přirozené redukce byly rovněž nasazeny sterilní vzorky se substrátem a vzorky bez substrátu. Vzorky byly třepány a v pravidelných intervalech analyzována pevná a vodná fáze na obsah Cr(VI) a $Cr_{\text{celk.}}$ a sledovány fyzikální a chemické parametry vodné fáze. Ve vzorcích vodné fáze byly prováděny mikrobiologické kultivační zkoušky pro stanovení psychrofilních bakterií, anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií a síran redukujících bakterií. Na začátku a na konci laboratorní zkoušky bioredukce byly provedeny testy ekotoxicity vodného podílu směsi voda-zemina založené na měření inhibice luminiscence bakterií *Vibrio fischeri*.

Po ukončení vsádkových testů byla provedena zkouška stability precipitátů Cr(III) za různých hodnot pH. Pro zkoušky byla použita zemina z laboratorní zkoušky bioredukce při koncentraci TOC 500 mg/l vodné fáze, kdy byl použit jako substrát laktát a syrovátka. Zemina byla předem volně usušena a přesáta sítem 3 mm a v zemině laboratorně stanoven obsah $Cr_{\text{celk.}}$ a Cr(VI). Do 250 ml reagenčních lahví bylo naváženo vždy 30 g zeminy. Lahve byly zality 150 ml výluhového roztoku o pH 5; 5,9 a 7. 1x za týden bylo měřeno pH, popřípadě upraveno na požadovanou hodnotu po kapkách pomocí 0,35% HCl. Po ustálení hodnot pH (55. den loužení) byl vodní podíl slit a přefiltrován. Ve vodném i pevném podílu byly poté laboratorně stanoveny obsahy $Cr_{\text{celk.}}$ a Cr(VI).

4.2 Kolonové zkoušky kombinace obou procesů

Cílem kombinovaných kolonových zkoušek bylo ověření redukčních procesů ve větším měřítku a v jejich posloupné kombinaci, tedy abiotické redukce nanoželezem a biotické redukce s využitím syrovátky jako organického substrátu.

Kolony použité při experimentu měly objem 5 l a byly naplněny přesítovanou a homogenizovanou zemínou z kontaminované lokality Kortan Hrádek n. N., viz Obr. 9. Průtok kapaliny kolonou byl zdola nahoru.

Do kolon 2-4 byla použita 20% suspenze nanoželeza NANOFER 25 (NANO IRON, s.r.o.), dávka nZVI byla 0,5 g/kg zeminy tj. 5g/kolonu. Jedna kolona byla připravena pouze se zemínou (kolona 1). Po naplnění byly saturované kolony ponechány bez nátok vody k usazení náplně ustavení rovnováhy po dobu 24 hodin.

Pro testy byla používána voda z lokality Hrádek, která byla uměle obohacena K_2CrO_4 tak, aby koncentrace Cr(VI) byly 20 mg/l, resp. 8 mg/l.



Obr. 9: Aparatura kombinovaných kolonových zkoušek

4.2.1 Průběh kolonové zkoušky

Průběh kolonového testu lze rozdělit do 3 etap:

1. **etapa - pouze vliv nZVI:** trvání od 24/7/2012 do 28/8/2012 (35 dní), nátok vody 20 mg Cr(VI)/l do kolon 1-3, do kolony 4 vodovodní voda (pro posouzení vlivu

stárnutí nZVI bez reakce nZVI s Cr(VI)), rychlost proudění 90 ml/h, doba zdržení 20 hodin.

2. **etapa – porovnání vlivu samotné syrovátky a syrovátky po aplikaci nZVI:** trvání od 28/8/2012 do 21/11/2012 (85 dní), po přidavku roztoku syrovátky do kolon 1 a 3, nátok 8 mg Cr(VI)/l do všech kolon, průtok 7 ml/h, doba zdržení 260 hodin.
3. **etapa – po odeznění mikrobiální aktivity:** trvání od 21/11/2012 do 24/1/2013 (64 dní), nátok 8 Cr(VI) mg/l, průtok 14,5 ml/h, doba zdržení 124 hodin. V případě kolony 4 bylo trvání 3. etapy prodlouženo do 22/4/2013 (152 dní).

Schema kolonové zkoušky

	1. etapa	2. etapa	3. etapa
kolona 1	bez nZVI , nátok Cr(VI) 20 mg/l, zdržení 20 hod.	syrovátka , nátok Cr(VI) 8 mg/l, zdržení 260 hod.	bez syrovátky , nátok Cr(VI) 8 mg/l, zdržení 124 hod.
kolona 3	s nZVI , nátok Cr(VI) 20 mg/l, zdržení 20 hod.	syrovátka , nátok Cr(VI) 8 mg/l, zdržení 260 hod.	bez syrovátky , nátok Cr(VI) 8 mg/l, zdržení 124 hod.
kolona 4	s nZVI , pouze voda, bez Cr(VI) , zdržení 20 hod.	syrovátka , nátok Cr(VI) 8 mg/l, zdržení 260 hod.	bez syrovátky , nátok Cr(VI) 8 mg/l, zdržení 124 hod.

Poznámka: Zkouška s kolonou 2 provedena nebyla (kolmatovaná jemnozrnnou frakcí zeminy)

Syrovátka byla do kolon 1 a 3 nadávkována ve formě 2 l roztoku o koncentraci 3,5 g/l pomocí čerpadla rychlostí 0,4 l/h (obsah TOC v sušené syrovátce stanoven na 0,370 g/g).

Během zkoušek byly odebírány vzorky vody na přítoku a odtocích všech kolon pro analýzu Cr_{celk.}, Cr(VI) a měření pH, Eh. Vzorky vod na odtoku byly rovněž analyzovány v rozsahu úplného chemického rozboru (ÚCHR) a dále byly použity pro kultivační mikrobiální testy.

V závěru zkoušky byly vzorky vody odebrané na nátoku a na odtoku z kolon podrobeny izotopové analýze Cr (laboratoře České geologické služby). Po ukončení pokusu, byly kolony zmrazeny a náplň rozřezána na 5 segmentů značených KXA až KXE, kde X značí číslo kolony (1, 3 nebo 4) a písmena A až E značí segment kolony, kdy A je její odtoková část a E je nátoková část.

Zemina jednotlivých segmentů kolon byla v laboratořích TUL podrobena analýzám na stanovení $Cr_{\text{celk.}}$, Cr(VI) a Fe a dále provedeny Tessierovy sekvenční extrakční zkoušky. V případě kolon 1 a 3 byly se zeminou provedeny loužící zkoušky za různého pH. Rovněž byl ve vzorcích zeminy kolon stanoven obsah fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) pro zhodnocení mikrobiálního osídlení (analýzy provedli pracovníci MÚ AV ČR).

Tessierovy sekvenční extrakční testy jsou analytický proces, při kterém je posloupně chemicky loužen kov ze zeminy. Těmito testy lze rozlišit 5 základních vazeb kovu na pevnou matici (Tessier et al., 1979):

TS1: Výměnný podíl kovu, tedy podíl fyzikálně vázaný elektrostatickými silami k záporně nabitému povrchu částic zeminy. Pro určení tohoto podílu byl vzorek zeminy loužen roztokem CH_3COONa o koncentraci 1,0 mol/l při pH 8,2 po dobu jedné hodiny za stálého třepání při laboratorní teplotě.

TS2: Podíl kovu vázaný na uhličitany. Je kvantifikován loužením vzorku kyselinou, která rozpustí kalcit a dolomit a uvolní kov, aniž by rozpustila organickou hmotu nebo oxidy kovů nebo jílové minerály. Vzorek zeminy byl loužen roztokem CH_3COONa/CH_3COOH o koncentraci 1,0 mol/l při pH 5,0 po dobu 5 hodin za stálého třepání při laboratorní teplotě.

TS3: Podíl kovu vázaný na oxidy Fe a Mn. Pro určení tohoto podílu byl vzorek zeminy loužen roztokem o směsném složení: $Na_2S_2O_4$ o koncentraci 0,3 mol/l, citronan sodný o koncentraci 0,175 mol/l a kyselina citrónová o koncentraci 0,025 mol/l za stálého třepání při laboratorní teplotě po dobu 6 hodin.

TS4: Podíl kovu vázaný na organickou hmotu. Pro stanovení tohoto podílu je organická hmota oxidována při 85°C nejprve směsí 0,02M HNO_3 a 30% H_2O_2 o pH 2 po dobu 2 hodin za občasného protřepání. Dále je ke vzorku přidán 30% roztok H_2O_2 o pH 2 a vzorek je nadále loužen po dobu 3 hodin při teplotě 85°C za občasného protřepání a následně je ke vzorku přidán roztok octanu amonného o koncentraci 3,2 mol/l v 20% kyselině dusičné a vzorek je loužen za neustálého třepání po dobu 30 minut.

TS5: Reziduální podíl kovu, zpravidla vyskytující se v mřížce silikátů. Tento podíl byl kvantifikován po opakovaném odkouření směsí silných kyselin - $HF:HClO_4$ v poměru 5:1.

Tessierovy sekvenční extrakční testy byly provedeny pracovníky TUL.

Účelem zkoušek loužitelnosti bylo posouzení stability precipitátů Cr(III) za různých hodnot pH. Pro zkoušky byla použita zemina z kolon 1 (bez nZVI) a 3 (s nZVI) po ukončení čtvrtprovozních zkoušek. Konkrétně byly použity zeminy ze segmentů kolon A (odtoková část), C (prostřední část) a E (nátoková část). Nejprve byly ve vzorcích zeminy stanoveny koncentrace $Cr_{celk.}$ a Cr(VI). Výluhové zkoušky byly provedeny v poměru 30 g zeminy o původní vlhkosti ku 150 ml výluhového roztoku ve 250 ml reagenčních lahvích. Hodnota pH výluhových roztoků byla 5; 5,9 a 7. Roztoky o pH 5 a 5,9 byly připraveny ředěním roztoku 0,0035% HCl. Pro pH=7 byla použita čistá destilovaná voda. Lahve byly upnuty do rotační třepačky hlava-pata, která běžela s intervalem rotace 5 min.

1x za týden bylo měřeno pH, popřípadě upraveno na požadovanou hodnotu po kapkách pomocí 0,35% HCl. pH suspenzí o počáteční hodnotě 7 nebylo upravováno.

Po ustálení hodnot pH (56. den loužení) byl vodní podíl slit a přefiltrován. Pevný podíl byl upraven mletím a následně byl homogenizován. Ve vodném i pevném podílu byly poté laboratorně stanoveny obsahy $Cr_{celk.}$, Cr(VI) a Fe.

4.3 Pilotní odzkoušení kombinované metody

Pilotní odzkoušení kombinované metody proběhlo na 2 lokalitách: na lokalitě Hrádek nad Nisou a na lokalitě C (majitel nemovitosti, na které pilotní zkouška proběhla, si nepřeje lokalizaci uvádět a je proto důvěrná). Hydrogeologické poměry obou lokalit jsou podobné – mělký kvartérní kolektor tvořený fluvialními sedimenty s dobrou propustností. Lokalita C je ve srovnání s lokalitou Hrádek nad Nisou charakteristická smíšeným typem znečištění podzemních vod (spolu s Cr(VI) rovněž chlorované etheny) a výrazně vyšší výchozí koncentrací Cr(VI) v podzemní vodě. Uspořádání obou pilotních zkoušek bylo obdobné, tedy v první (nano) fázi abiotická redukce Cr(VI) nanoželezem, v druhé fázi biologická redukce reziduálního Cr(VI) s využitím syrovátky jako donoru elektronu. Rozdílly byly ve způsobu aplikace nZVI (na lokalitě Hrádek nad Nisou jednorázová injektáž nZVI do vystrojených vrtů, na lokalitě C opakovaná injektáž (2x) do nevystrojených sond) a množství aplikovaného nanoželeza (na lokalitě Hrádek nad Nisou 120 kg, na lokalitě C 2x20 kg).

V kapitolách níže je uspořádání pilotních zkoušek popsáno zvlášť pro obě lokality.

4.3.2 Pilotní odzkoušení kombinované metody na lokalitě Hrádek nad Nisou

4.3.2.1 Charakteristika pokusné lokality Hrádek nad Nisou

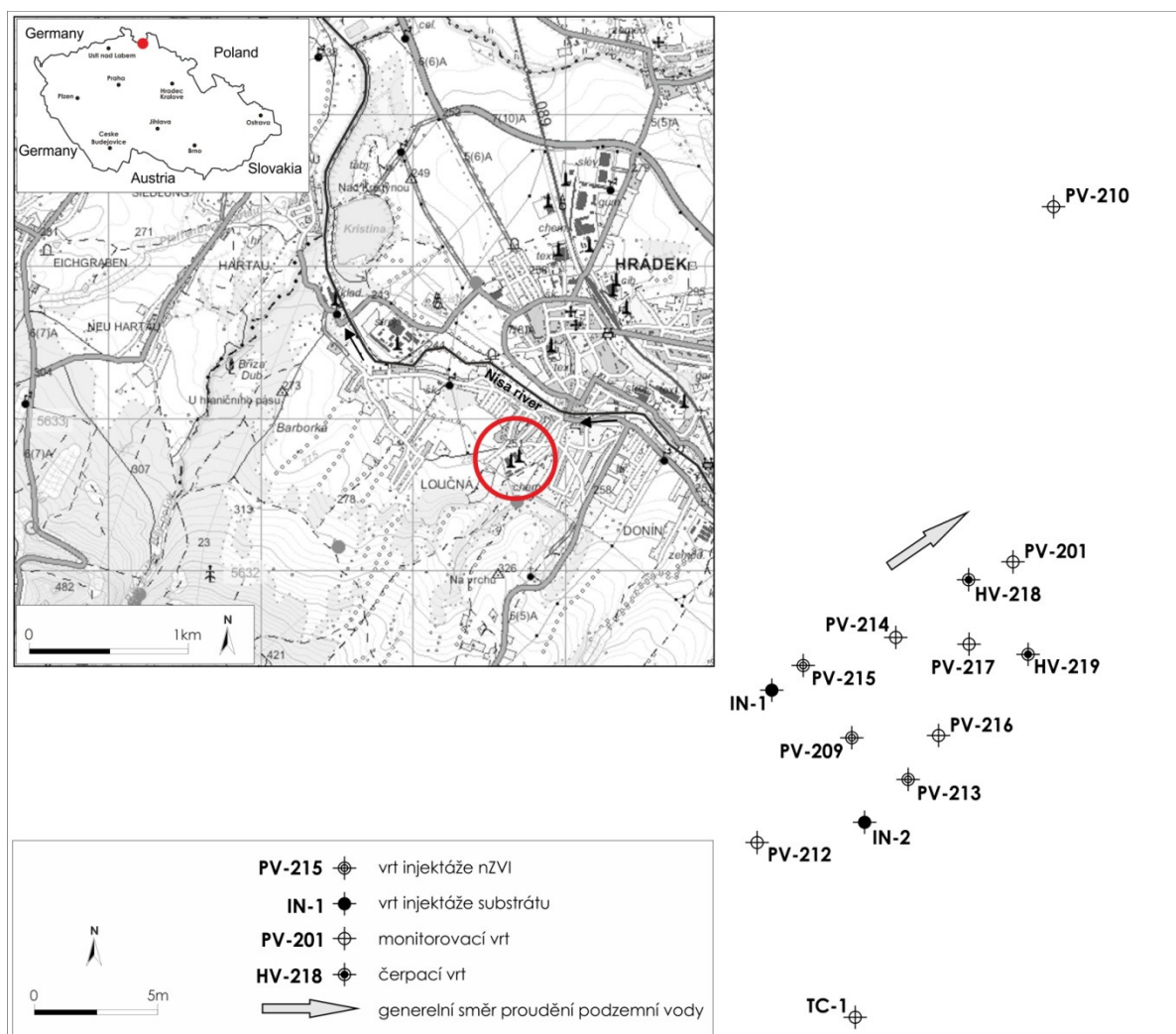
Pilotní zkouška vyvíjené sanační technologie byla provedena v areálu závodu Kortan v Hrádku nad Nisou. Historickou výrobou chromitých solí zde došlo ke kontaminaci kvartérního kolektoru hexavalentním chromem. Kolektorové horniny jsou tvořeny kvartérními písky a štěrky s proměnlivou jílovitou příměsí. Zvodněný kolektor má volnou hladinu podzemní vody v hloubce 4 až 5,5 m p.t. Mocnost zvodněného kolektoru se pohybuje od 4 m do 5 m. Podloží kolektoru tvoří relativně nepropustné fylity místy silně jílovitě zvětralé. Koeficient filtrace se pohybuje v rozmezí řádu 10^{-6} až 10^{-5} m/s. Hydrokarotáži byly zjištěny rychlosti proudění podzemní vody 0,2 až 2 m/den. Podzemní vody mají nízkou mineralizaci (do 0,3 g/l), nízké pH (5,4) a nízké obsahy celkového organického uhlíku ($\text{TOC} < 1,5$ mg/l). Oxidačně redukční potenciál kolísá od 450 do 550 mV. Z hydrochemického hlediska jsou podzemní vody klasifikovány jako smíšené typy $\text{SO}_4\text{-HCO}_3\text{-Na-Ca}$. V místě pilotní zkoušky se obsahy Cr(VI) pohybovaly od 0,8 do 2,5 mg/l.

4.3.2.2 Aplikace nZVI

V rámci první fáze pilotní zkoušky bylo v srpnu 2012 aplikováno do saturované zóny celkem 120 kg nZVI NANOFER25 (výrobce NANO-IRON s.r.o.) ve formě vodné suspenze o koncentraci 2 g Fe/l. Nanoželezo bylo injektováno do 3 vrtů PV-209, PV-215 a PV-213 trvale vystrojených v celé mocnosti saturované zóny a situovaných kolmo na směr podzemní vody, viz Obr. 10. Množství aplikovaného nZVI (2 kg nZVI/t zeminy) bylo stanoveno na základě předtím provedených kolonových zkoušek.

4.3.2.3 Aplikace syrovátky

V květnu 2013, přibližně 9 měsíců po injektáži nZVI, byla zahájena bioredukční fáze dávkováním syrovátky do horninového prostředí. Syrovátka s upraveným pH vápenným mlékem byla dávkována do vody čerpané z vrtů HV-218 a HV-219 situovaných po proudu podzemní vody a takto naředěný roztok zasakován do vrtů IN1 a IN-2 situovaných proti proudu podzemní vody od sanované oblasti. Celkem bylo zasáknuto 5 m³ syrovátky. Po cirkulaci probíhající cca 50 dní byl obnoven přirozený režim proudění podzemní vody a monitoring pilotní zkoušky probíhal dalších 9 měsíců. Obě fáze pilotní zkoušky trvaly dohromady přibližně 20 měsíců.



Obr. 10: Schéma pilotní zkoušky vyvíjení sanační technologie na lokalitě Hrádek nad Nisou

4.3.2.4 Monitoring pilotní zkoušky

Monitoring pilotní zkoušky byl prováděn ve 3 aplikačních vrtech (PV-209, PV-213, PV-215) a 4 pozorovacích vrtech situovaných proti směru (PV-212) a po směru proudění podzemní vody (PV-214, PV-216 a PV-217). Další 2 vrty situované dále po směru proudění podzemní vody (PV-201, PV-210) byly vzorkovány na omezený rozsah analýz. Odběry vzorků podzemní vody byly prováděny před a v průběhu pilotní zkoušky v intervalu cca 1 až 2 měsíců. Dohromady bylo provedeno 7 kol monitoringu po injektáži nanoželeza a 10 kol po aplikaci syrovátky. Vzorky podzemní vody byly v laboratořích TUL analyzovány na obsahy Cr(VI), Cr_{celk.}, základní kationty a anionty. Na vybraných vzorcích byla prováděna izotopová analýza chrómu (Česká

geologická služba), mikrobiologické kultivační zkoušky a zkoušky ekotoxicity (laboratoře DEKONTA a.s.) a analýzy fosfolipidových mastných kyselin – PLFA (MÚ AV ČR). Na závěr byla ze vzorků sedimentu provedena mikrobiální molekulární analýza pyrosekvenací 16S rRNA genů (MÚ AV ČR).

4.3.3 Pilotní odzkoušení kombinované metody na lokalitě C

4.3.3.1 Charakteristika pokusné lokality C

Ke kontaminaci kvartérního kolektoru hexavalentním chromem došlo na lokalitě C historickým únikem chromových vod z objektu chromovny. Kontaminované podzemní vody se vážou na kvartérní fluviální sedimenty – písčité štěrky s různým podílem hlinité příměsi, o průměrné mocnosti 4 m. Podloží kvartérního kolektoru je tvořeno vápnitými jílovci terciérního stáří. Kvartérní kolektor má napjatou hladinu podzemní vody. Nepropustný strop kolektoru je tvořen povodňovými jíly a jílovitými hlínami o mocnosti cca 5 m, ustálená hladina se nachází cca 2 m pod terénem. Průměrná hodnota koeficientu filtrace tohoto kolektoru stanovená na základě čerpací zkoušky činí $7,6 \cdot 10^{-4}$ m/s, což dle klasifikace (Jetel, J., 1973) odpovídá mírně až dosti silně propustnému kolektoru.

Použitím Darcyho rovnice byla vypočtena filtrační rychlost proudění podzemní vody (seepage velocity): 1,5 m/den. Podzemní vody mají vyšší mineralizaci (0,9 až 1,2 g/l) a neutrální pH (6,9 – 7,0) a obsahy celkového organického uhlíku (TOC < 1,0 až 5,4 mg/l). Před zahájením pilotní zkoušky oxidačně redukční potenciál kolísal od 130 do 490 mV. Z hydrochemického hlediska jsou podzemní vody klasifikovány jako typy SO₄-Ca. V místě pilotní zkoušky se obsahy Cr(VI) pohybovaly od 4,4 mg/l (vrt HV-2) do 74 mg/l (referenční vrt MV-1). Celkové obsahy chlorovaných ethenů (CIU-Eth) se pohybovaly od 400 do 6960 µg/l. Trichloroethen (TCE) a cis-1,2-dichloroethen (cis-DCE) byly dominantními CIU-Eth (TCE tvořil 45% až 93% a cis-DCE tvořil 5% až 53% celkové molární koncentrace CIU-Eth).

4.3.4 Aplikace nZVI

nZVI bylo do zvodněného kolektoru nadávkováno dvakrát – v lednu a květnu 2014. Při každém dávkování bylo ZVI injektováno v množství 20 kg ve formě vodné suspenze o koncentraci 1 g Fe/l (1. dávka) a 2 g Fe/l (2. dávka). Při první dávce byl injektován typ nZVI NANOSTAR, při druhé nZVI NANOFER 25S. nZVI bylo injektováno do 3 nevystrojených strojně zarážených sond situovaných kolmo na směr proudění

v hloubkovém rozmezí 4,0 až 8,5 m po 0,5 m intervalech zdola nahoru, viz Obr. 11.



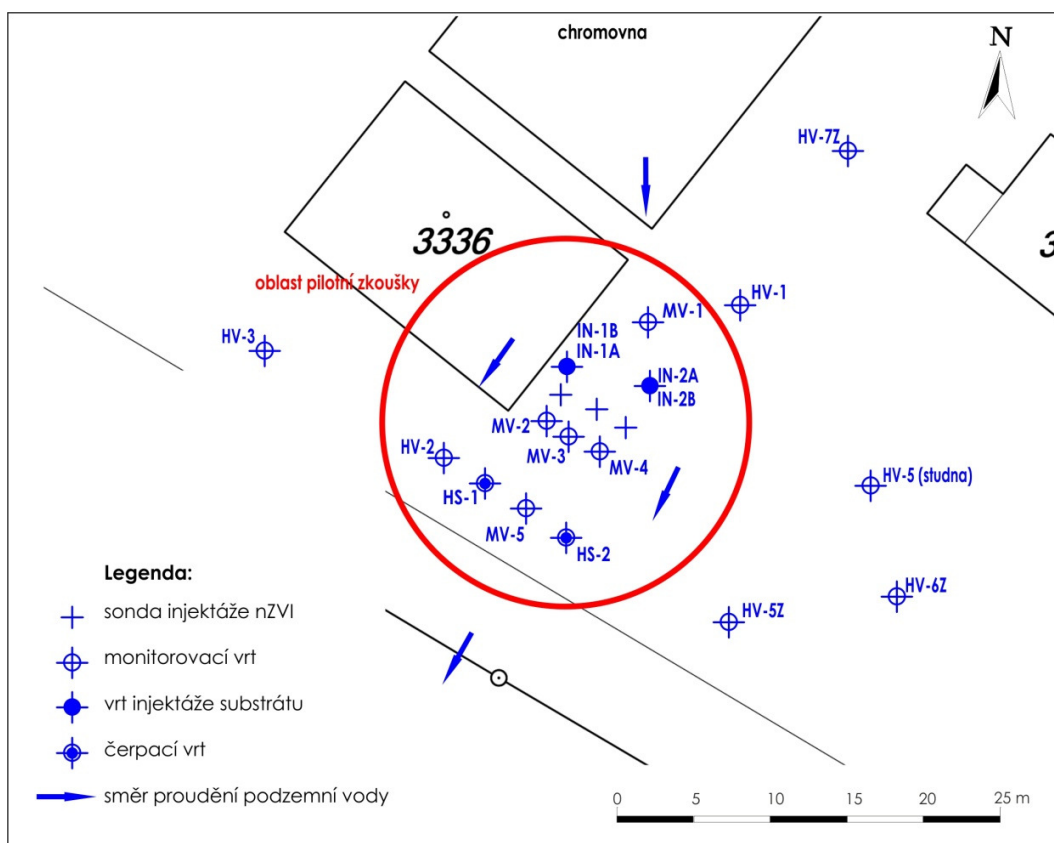
Obr. 11: Aplikace nZVI při pilotní zkoušce

4.3.5 Aplikace syrovátky

V srpnu 2014, přibližně 2,5 měsíce po 2. injektáži nZVI, byla zahájena bioredukční fáze dávkováním syrovátky do horninového prostředí. Systém dávkování byl stejný jako na lokalitě Hrádek nad Nisou. Syrovátka s upraveným pH vápenným mlékem byla dávkována do vody čerpané z vrtů HS-1 a HS-2 situovaných po proudu podzemní vody a takto naředěný roztok zasakován do vrtů IN-1 a IN-2 situovaných proti proudu podzemní vody od sanované oblasti. Celkem bylo v období 6.8.-13.9.2014 zasáknuto 8,2 m³ syrovátky. Po cirkulaci probíhající dalších 9 dní byl obnoven přirozený režim proudění podzemní vody a monitoring pilotní zkoušky probíhal dalších cca 5 měsíců. Obě fáze pilotní zkoušky trvaly dohromady přibližně 13 měsíců.



Obr. 12: Aplikace syrovátky při pilotní zkoušce (v popředí čerpací vrt HS-1)



Obr. 13: Rozmístění vrtů pilotní zkoušky

4.3.6 Monitoring pilotní zkoušky

Monitoring pilotní zkoušky byl prováděn ve 2 aplikačních vrtech (IN-1A a IN-2A) a v 8 pozorovacích vrtech situovaných proti směru (MV-1) a po směru proudění podzemní vody (první linie: MV-2, MV-3, MV-4, druhá linie: MV-5, HS-1, HS-2 a HV-2), viz Obr. 13. Odběry vzorků podzemní vody byly prováděny před a v průběhu pilotní zkoušky v intervalu cca 1 až 2 měsíců. Dohromady byly provedeny 2 kola před 1. injektáží nZVI, 11 kol monitoringu po injektáži nZVI a 12 kol po aplikaci syrovátky. Vzorky podzemní vody byly v laboratořích TUL analyzovány na obsahy Cr(VI), Cr_{celk.}, ClU-Eth, základní kationty a anionty, TOC a plyny (ethan, ethen, methan, acetylen, a během biotické fáze zkoušky i sulfan). Na vybraných vzorcích vod byly provedeny mikrobiologické kultivační zkoušky (laboratoře DEKONTA a.s.), a PLFA v podzemní vodě (MÚ AV ČR). Na závěr 2. fáze byly provedeny analýzy kolektorových zemin umístěných v kartidžích v monitorovacích vrtech na stanovení mineralogického rozboru metodou práškové rentgenové difrakce (analýzy provedeny v laboratořích České geologické služby) a prvkové analýzy metodou SEM-EDS (rastrově elektronovým mikroskopem s energiově disperzním spektroskopem) v laboratořích Oddělení přípravy a analýzy nanostruktur Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace TUL .

Vzorky zemin z kartridží byly rovněž na závěr zkoušky podrobeny analýze pro stanovení valence přítomného Cr metodou rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) a vybraný vzorek analyzován i na stanovení valence Fe metodou Mösbauerovy spektroskopie. Tyto analýzy provedla laboratoř Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

5. Výsledky

Výsledky dizertační práce jsou v kapitolách níže prezentovány po jednotlivých metodách a pro ilustraci dokladovány grafy.

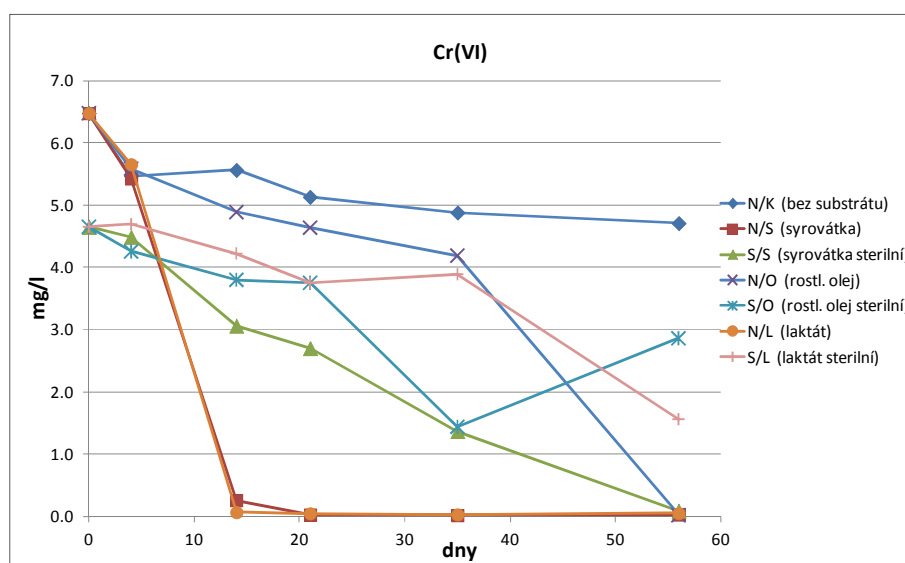
5.1 Výsledky laboratorních vsádkových pokusů

Nejrychlejší pokles rozpuštěného Cr(VI) a tedy i redukci Cr(VI) vykázaly vzorky s laktátem a syrovátkou (pokles za 14 dní o 99%, resp. 96%). Využití rostlinného oleje vede k výrazně pomalejší redukci Cr(VI) za stejné období (o 18%), na konci testu však došlo k rychlému poklesu na nízkou zbytkovou úroveň (0,02 mg/l).

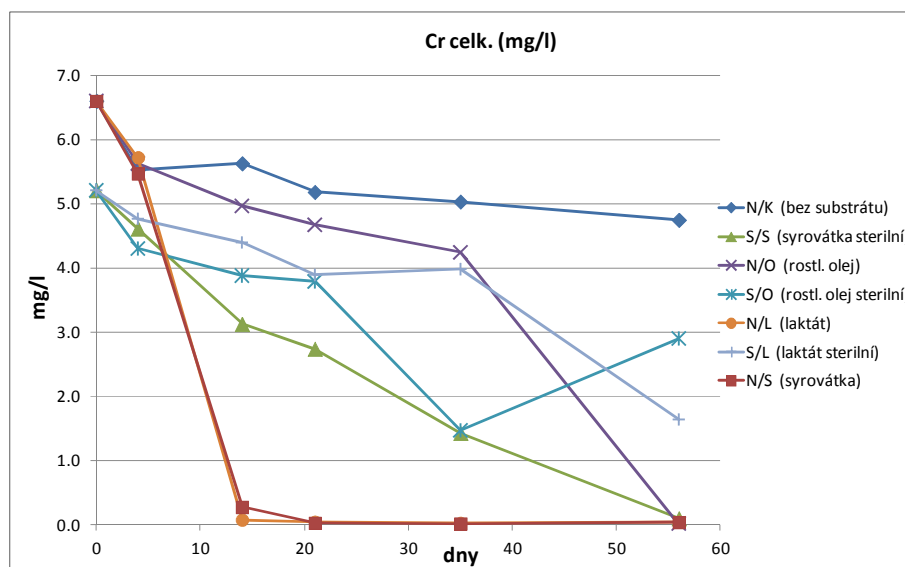
V případě syrovátky nepřineslo snížení počáteční dávky substrátu z TOC 500 mg/l na TOC 100 mg/l žádný rozdíl v rychlosti redukce Cr(VI) (0,49 resp. 0,46 mg Cr(VI)/l/den). V případě laktátu byla rychlost redukce při nižší dávce substrátu dokonce vyšší (0,38 resp. 0,48 mg Cr(VI)/l/den).

Výsledky zkoušek se sterilními a nesterilními substráty umožnily odhadnout poměr abiotické a biotické redukce. Pro syrovátku byl tento poměr rychlostí abiotické a biotické redukce Cr(VI) odhadnut na 1:3. V případě laktátu tento poměr abiotické a biotické složky redukce činí 1:13.

Koncentrace $Cr_{celk.}$ a Cr(VI) byly téměř identické, viz Obr. 14 a 15, z čehož vyplývá, že redukovaný chrom Cr(III) byl rychle imobilizován, nezůstával v roztoku.



Obr. 14: Graf vývoje Cr(VI) ve vodném podílu během vsádkové laboratorní zkoušky bioredukce (TOC 100 mg/l)



Obr. 15: Graf vývoje Cr_{celk.} ve vodném podílu během vsádkové laboratorní zkoušky bioredukce (TOC 100 mg/l)

Mikrobiologickými kultivačními zkouškami bylo největší osídlení psychrofilními baktériemi zjištěno u vzorků se syrovátkou a laktátem (10^5 až 10^6 KTJ/ml). Osídlení anaerobními a fakultativně anaerobními baktériemi bylo řídké a nepravidelné. Ojedinele byla zjištěna přítomnost síran redukujících baktérií.

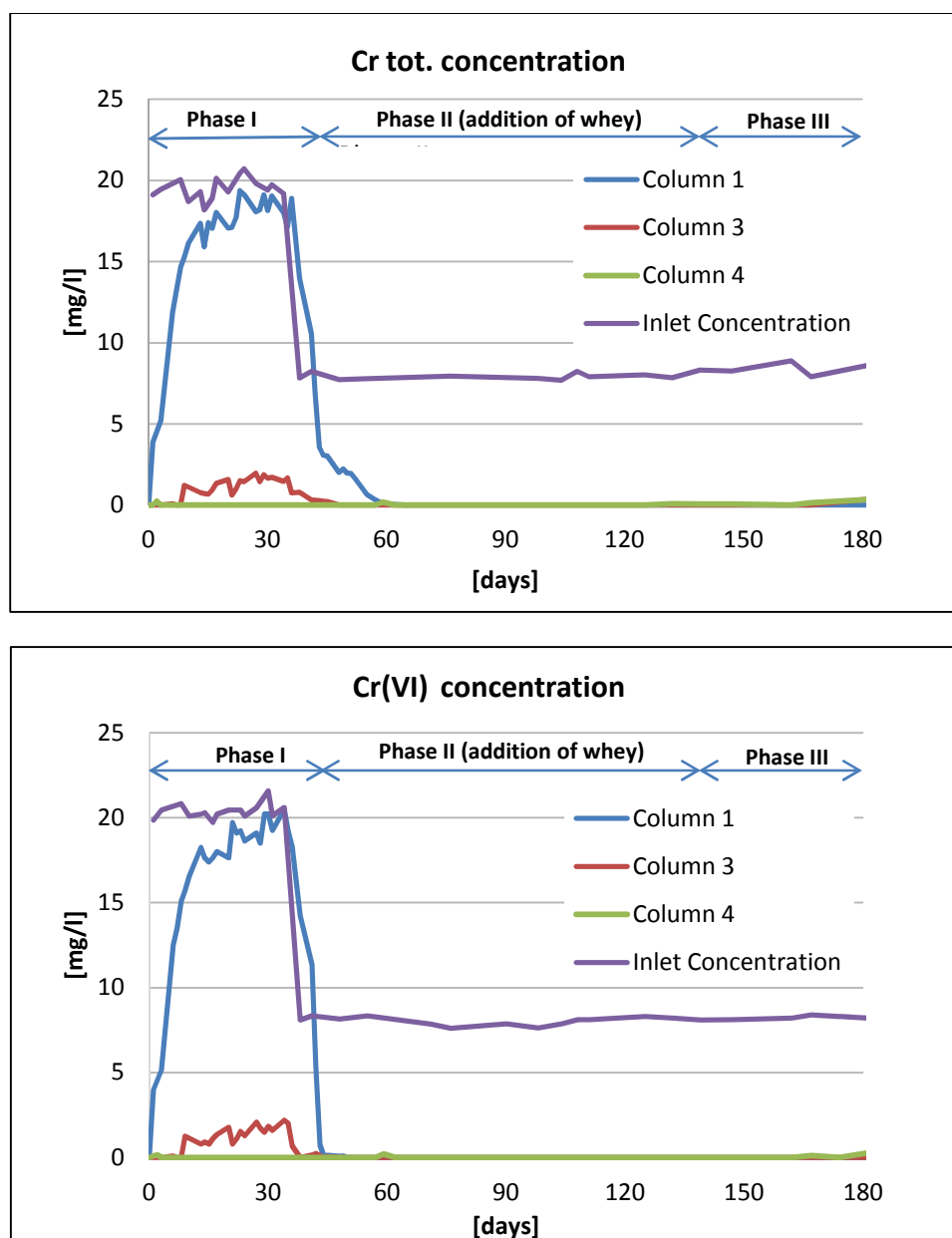
Zkouškou loužitelnosti chrómu za různého pH ze zeminy po ukončení zkoušek byl zjištěn velmi malý podíl vylouženého Cr_{celk.} z celkového množství Cr_{celk.} v zemině v případě použití laktátu při pH 7,0 a pH 5,0 a syrovátky při pH 5,0. Překvapivě o více jak řád vyšší vyloužené množství Cr bylo zjištěno u syrovátky při neutrálním pH 7,0. Příčina této zvýšené mobilizace za neutrálního pH není známa.

Výsledky zkoušky ekotoxicity pomocí úbytku luminiscence baktérií *Vibrio fischeri* vykazaly minimální inhibici vzorku na začátku pokusu, vyšší inhibici vykázal počáteční sterilní kontrolní vzorek (H30 = 44,1%). Na konci laboratorní zkoušky bioredukce nebyla zjištěna inhibice u žádného ze vzorků. Všechny vzorky, včetně vzorků kontrolních vykazaly mírnou stimulaci. Bioredukce Cr(VI) testovanými substráty tedy nemá negativní ekotoxický vliv.

5.2 Výsledky kolonové zkoušky kombinace obou procesů

Kombinovaná kolonová zkouška simulovala uvažovaný postup vyvíjené kombinované sanační metody. Byla potvrzena velmi dobrá účinnost redukce Cr(VI) nanoželezem (95%), bez negativního vlivu nZVI na přítomné mikroorganismy. Během 2. etapy

zkoušky (biotická redukce stimulovaná dodáním syrovátky) koncentrace Cr(VI) ve vodě na odtoku postupně klesla pod mez kvantifikace použité analytické metody (viz grafy kolony 3 na Obr. 16). Za celou 2. etapu činila účinnost odstranění $Cr_{celk.}$ 99%. Koncentrace Cr(VI) zůstala pod mezí kvantifikace i po celou 3. etapu, kdy byl zvýšen průtok kolonou (zkrácena doba zdržení vody v koloně). V případě $Cr_{celk.}$ byla na konci zkoušky zjištěna koncentrace nepatrně nad mezí kvantifikace (0,07 mg/l).



Obr. 16: Grafy koncentrací $Cr_{celk.}$ a Cr(VI) na nátoku (Inlet) a odtoku z kolon (Column) s vyznačením trvání jednotlivých etap zkoušky (Phase).

Tabulka 2: Bilance odstraněného $Cr_{celk.}$ po etapách kolonové zkoušky

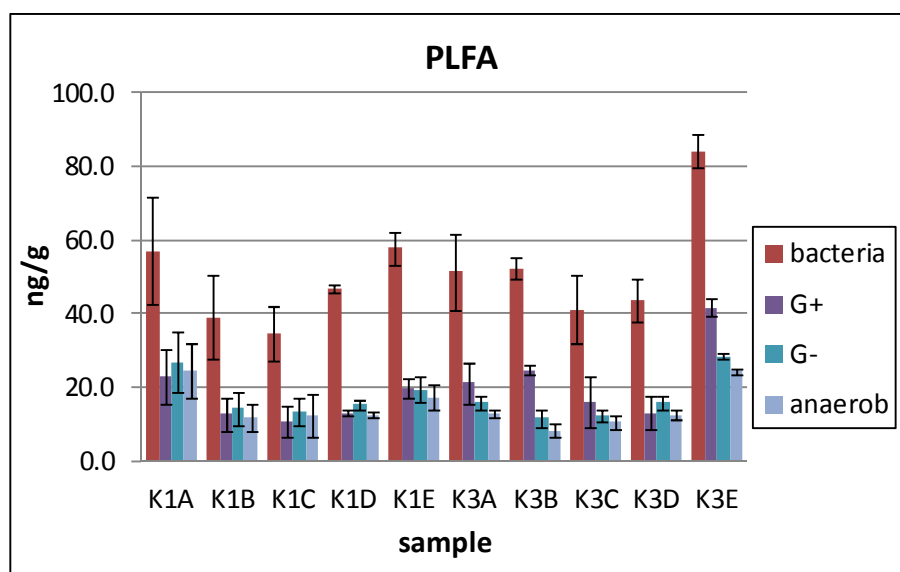
Etapa zkoušky – dominantní proces		Kolona 1	Kolona 3	Kolona 4
1.etapa – přirozená atenuace	g	0,23	x	x
	%	19%	x	x
1.etapa – redukce nanoželezem	g	x	1,02	x
	%	x	95%	x
2.etapa – bioredukce	g	0,07	0,11	x
	%	60%	99%	x
2.etapa – redukce nanoželezem	g	x	x	0,08
	%	x	x	100%
3. etapa – bioredukce	g	0,07	0,09	x
	%	100%	100%	x
3.etapa – redukce nanoželezem	g	x	x	0,09
	%	x	x	99%
Celkem	g	0,37	1,22	0,17
	%	27%	95%	99%

Následně byla vypočtena efektivní redukční kapacita nZVI (ERC), tedy množství redukovaného Cr(VI) na jednotkové množství nZVI. Vypočtená ERC ve výši 156 mg Cr(VI)/g nZVI koresponduje s hodnotami ERC stanovenými koncentračními kolonovými zkouškami (80-160 mg Cr(VI)/g nZVI) realizovanými pracovníky TUL v rámci projektu TAČR TA01021792.

Zkouškou v simultánně provozované koloně 1, do které nebylo nadávkováno nZVI, byl kvantifikován vliv přirozené atenuace Cr(VI) v zemině - 23,8 mg Cr(VI)/kg, která dobře koresponduje s hodnotou 20,7 mg Cr(VI)/kg stanovenou na základě výsledků výše citované čtvrtprovozní zkoušky koncentrační při stejné koncentraci Cr(VI) na nátok do kolony.

Výsledky **analýz fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)** v zemině jednotlivých segmentů kolon 1 a 3 odebrané po ukončení zkoušky jsou shrnuty na Obr. 17. Jsou zde uvedeny 4 různé parametry (měřeny byly i další parametry zastupující houby, aktinomycety a celkovou mikrobiální biomasu – výsledky nejsou ukázány pro jejich nízké koncentrace či veliký rozptyl). Bacteria odpovídá bakteriálnímu osídlení vzorku,

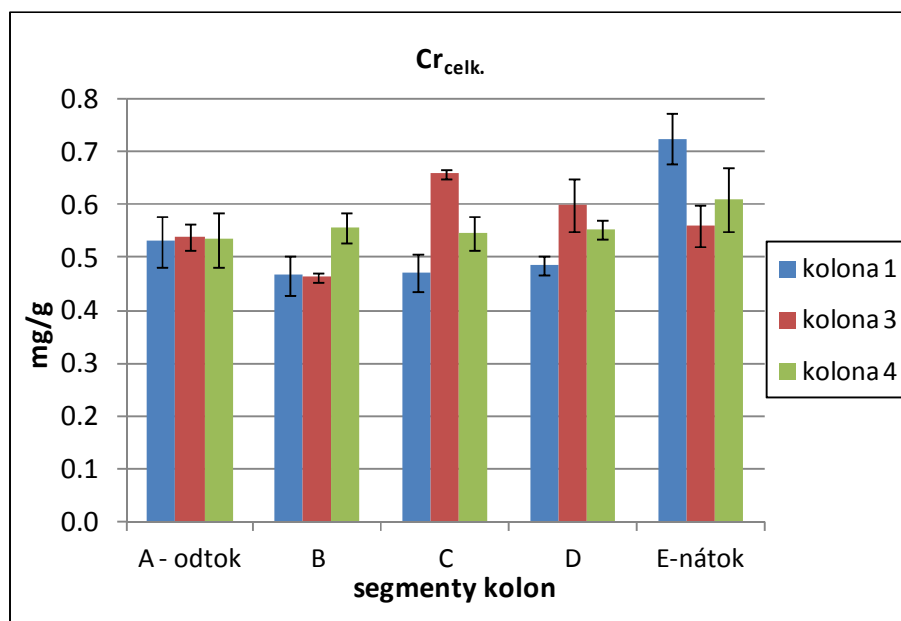
anaerob odpovídá anaerobním bakteriím a G+, G- představují gram pozitivní, respektive gram negativní bakterie. Na základě výsledků lze konstatovat, že vyšší mikrobiální osídlení zeminy bylo v nátokové a odtokové části kolon (segmenty A, resp. E) ve srovnání s jejich střední částí (segmenty B, C a D). Kolona 3, na které byla simulována kombinovaná abio- (nanoželezem) a bio- (substrátem) redukce, a která trvale dosahovala vysoké účinnosti odstranění Cr(VI), vykazovala v průměru vyšší mikrobiální osídlení především G+ bakterií ve srovnání s kolonou 1, která nZVI neobsahovala. Ta naznačuje, že nZVI nemá negativní vliv na mikrobiální populaci a její bioredukční aktivitu.



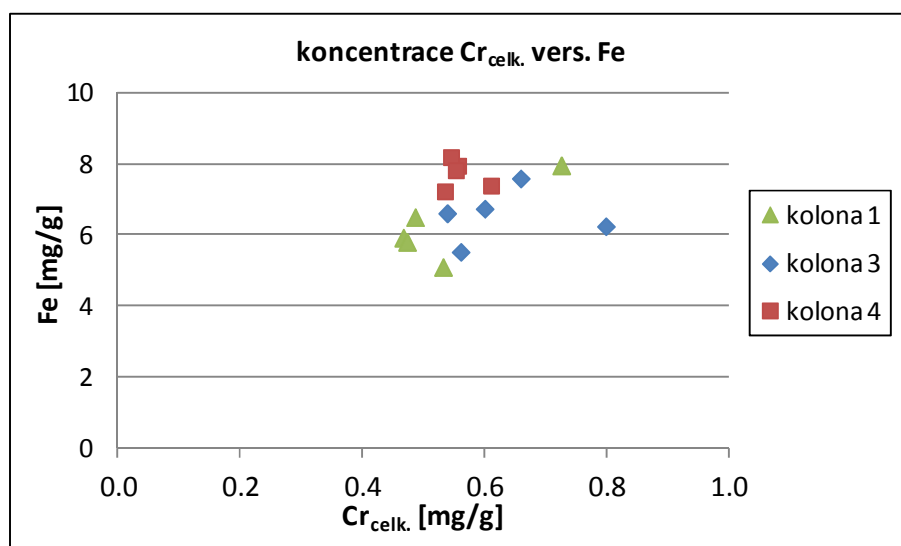
Obr. 17: Koncentrace PLFA v zemině kolon po zkoušce

Poznámka k Obr. 17: segmenty kolon jsou značeny KXA až KXE, kde X značí číslo kolony (1 nebo 3) a písmena A až E značí segment kolony, kdy A je její odtoková část a E je nátoková část.

Koncentrace celkového chrómu v zemině jednotlivých kolon po ukončení zkoušek, viz Obr. 18, odpovídá množství chrómu odstraněného z protékající vody (nejvyšší koncentrace v zemině kolony 3). Přímá závislost koncentrace $Cr_{celk.}$ v zemině na koncentraci Fe v zemině prokázána nebyla, viz Obr. 19.



Obr. 18: Koncentrace Cr_{celk.} v zemině po ukončení kolonových zkoušek



Obr. 19: Koncentrace Fe a Cr(VI) v zemině po ukončení kolonových zkoušek

Při abiotické i biotické redukci Cr(VI) dochází k izotopové frakcionalizaci. Produkt redukce je obohacen lehčími izotopy. Tento posun v poměru těžších a lehčích izotopů je kvantifikován měřením množstevního poměru $^{53}\text{Cr}/^{52}\text{Cr}$ (Ellis et al. 2002, 2004) a je vyjadřován v δ záznamu:

$$\delta^{53}\text{Cr} = \left[\frac{\left(\frac{^{53}\text{Cr}}{^{52}\text{Cr}} \right)_{\text{vzorku}}}{\left(\frac{^{53}\text{Cr}}{^{52}\text{Cr}} \right)_{\text{NIST979}}} \right] - 1 \quad (37)$$

kde NIST979 je certifikovaný izotopový standard Cr.

Izotopové zkoušky chrómu na nátoku a odtoku z jednotlivých kolon na konci zkoušky potvrdily předpoklad posunu izotopového složení chrómu směrem k těžším izotopům v případě kolon 3 a 4 obsahující nZVI. U kolony 1, ve které byla testována pouze bioredukce stimulovaná dodaným substrátem byl pozorován efekt opačný, viz Tab. 3. Vysvětlení můžeme hledat v existenci lehkých izotopů redukovaného Cr(III) v rozpuštěné formě, např. ve formě organických komplexů.

Tabulka 3: Výsledky izotopových analýz Cr ve vodě

vzorek	$\delta^{53}\text{Cr}$ (‰)	směrodatná odchylna
nátok do kolon	0,328	0,004
odtok z kolony 1	-0,699	0,052
odtok z kolony 3	2,344	0,083
odtok z kolony 4	1,554	0,006

Tessierovými sekvenčními extrakčními testy byla hodnocena vazba chrómu na pevnou matici – zeminu z jednotlivých segmentů kolon po ukončení kolonových čtvrtprovozních zkoušek. Jednotlivé kroky loužení byly provedeny tak, aby rozpustily tu frakci kovu v pevném vzorku, která je vázána na specifickou složku matrice:

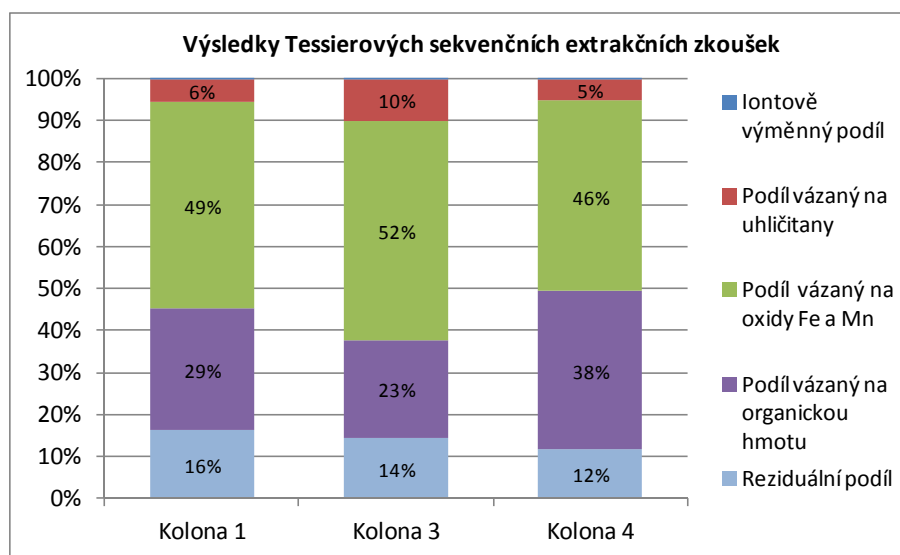
- TS1:** Iontově výměnný podíl kovu,
- TS2:** Podíl kovu vázaný na uhličitany,
- TS3:** Podíl kovu vázaný na oxidy Fe a Mn,
- TS4:** Podíl kovu vázaný na organickou hmotu,
- TS5:** Reziduální podíl kovu.

Výsledky těchto testů jsou uvedeny v Tab. 4 a graficky znázorněny na Obr. 20.

Tabulka 4: Výsledky Tessierových sekvenčních extrakčních zkoušek - koncentrace $C_{celk.}$ v sušině zeminy

kolona/segment	TS1 mg/kg suš.	TS2 mg/kg suš.	TS3 mg/kg suš.	TS4 mg/kg suš.	TS5 mg/kg suš.	Celkem mg/kg suš.
K1A	0,299	15,8	151	100	52,2	319,3
K1B	0,166	16,7	155	86,0	53,2	311,1
K1C	0,087	14,8	151	104	49,7	319,6
K1D	0,105	17,6	159	88,9	52,7	318,3
K1E	0,115	32,7	221	111	70,2	435,0
K3A	0,100	41,0	170	73,6	46,5	331,2
K3B	0,105	30,8	150	83,6	53,1	317,6
K3C	0,112	58,8	251	106	73,2	489,1
K3D	0,114	43,0	248	111	74,7	476,8
K3E	0,197	27,2	244	95,7	45,8	412,9
K4A	0,040	32,5	296	232	75,1	635,6
K4B	0,040	22,7	172	153	54,1	401,8
K4C	0,040	26,3	208	163	53,0	450,3
K4D	0,055	24,5	219	210	62,6	516,2
K4E	0,882	19,2	227	167	43,4	457,5

Pozn. uvedené koncentrace jsou aritmetickým průměrem duplicitních stanovení,



Obr. 20: Relativní zastoupení forem výskytu chrómu v zemině po ukončení kolonových zkoušek

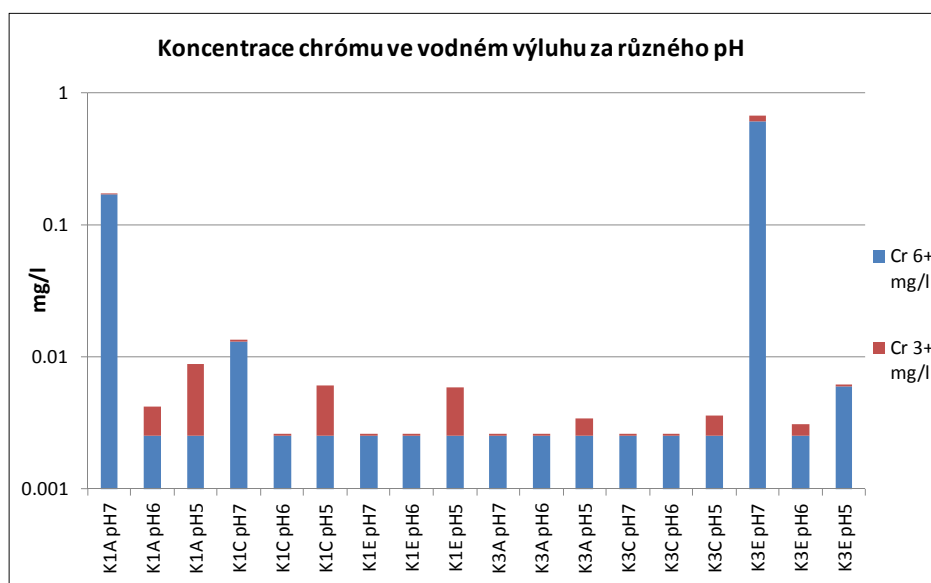
Z výsledků Tessierovy sekvenční extrakce vyplývá, že chróm se váže především na oxidy Fe a Mn (46% celkového extrahovaného množství v koloně 4 až 52% v koloně 3),

jedná se o poměrně stabilní vazbu. Množství chrómu vázaného na oxidy Fe a Mn vztažené k jednotkovému množství zeminy v sušině bylo vyšší v kolonách 3 a 4 oproti koloně 1, což pravděpodobně souvisí se skutečností, že do kolon 3 a 4 bylo nadávkováno nZVI. Významné množství chrómu je rovněž vázáno na organickou hmotu a to především v koloně 4 (38% celkového extrahovaného množství). V případě kolon 1 a 3 byl tento podíl výrazně nižší – 29%, resp. 23%. V případě této vazby je nutno zohlednit skutečnost, že se tento podíl stanovuje na základě oxidace organické hmoty roztokem $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3$. Je zřejmé, že se zpětně oxidovala i část Cr(III) na Cr(VI), který byl uvolněn do roztoku a tento podíl je tedy velmi pravděpodobně nadhodnocen.

Nízké byly podíly celkového extrahovaného chrómu vázané na uhličitany (6% až 10%) a chrómu residuálního (12% až 16%). Výsledky dále zjistily zanedbatelný podíl chrómu slabě vázaného iontově výměnnou vazbou na povrch částic (do 0,1%).

V jednotlivých kolonách se mění celkové extrahované množství v jednotlivých segmentech (především u kolon 3 a 4), relativní zastoupení složek, na kterou je chróm v zemině vázán, se však výrazně nemění.

Se zeminami kolon byly následně provedeny **zkoušky loužitelnosti** za různého pH. Koncentrace $\text{Cr}_{\text{celk.}}$ ve výluhu byly vesměs nízké a nepřekračovaly 0,01 mg/l, viz Obr. 21. Výjimkou byly výluhy za přirozeného pH dvou segmentů kolony simulující samotnou bioredukci (K1A a K1C) a 1 segmentu kolony simulující kombinovanou abio- bioredukci (K3C). Chróm ve vysokých koncentracích je v těchto vzorcích tvořen jeho šestimocnou formou. Vysvětlení lze hledat v heterogenitě zeminy, kdy místně vyšší podíl málo propustné jílovité frakce zamezil homogenní distribuci substrátu a/nebo nZVI.



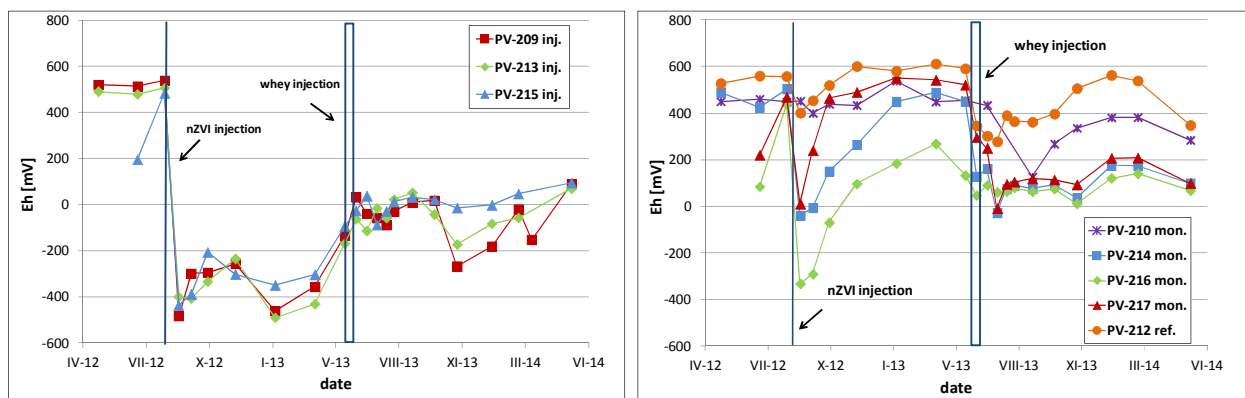
Obr. 21: Koncentrace Cr(VI) a Cr(III) ve vodném podílu po ukončení loužicích zkoušek

5.3 Výsledky pilotního odzkoušení kombinované metody

5.3.1 Pilotní zkouška na lokalitě Hrádek nad Nisou

5.3.1.1 Fyzikálně-chemické a anorganické parametry podzemní vody

Injektáží nZVI v rámci první abiotické fáze pilotní zkoušky došlo k rychlému poklesu Eh až na -480 mV v injektážních vrtech a na -330 mV ve vrtech pozorovacích (Obr. 22). Pokles Eh byl pozorován i ve vrtu PV-217 situovaném 7 m od injektážních vrtů. V dalších měsících však došlo k opětovnému nárůstu Eh především ve vzdálenějších vrtech PV-214 a PV-217, zatímco Eh podzemní vody injektážních vrtů zůstalo pod -50 mV i 9 měsíců po aplikaci nZVI. Aplikace organického substrátu – syrovátky změnila trend vývoje Eh a vyvolala další pokles Eh v pozorovacích vrtech. Pokles však nebyl tak výrazný, pravděpodobně v důsledku přítomnosti biodostupného Fe(III) vzniklého oxidací dodaného nZVI. Fe(III) pravděpodobně působil jako terminální akceptor elektronu a tento respirační proces udržoval Eh podzemní vody většiny monitorovacích vrtů v kladných hodnotách po celou dobu biotické fáze pilotní zkoušky.

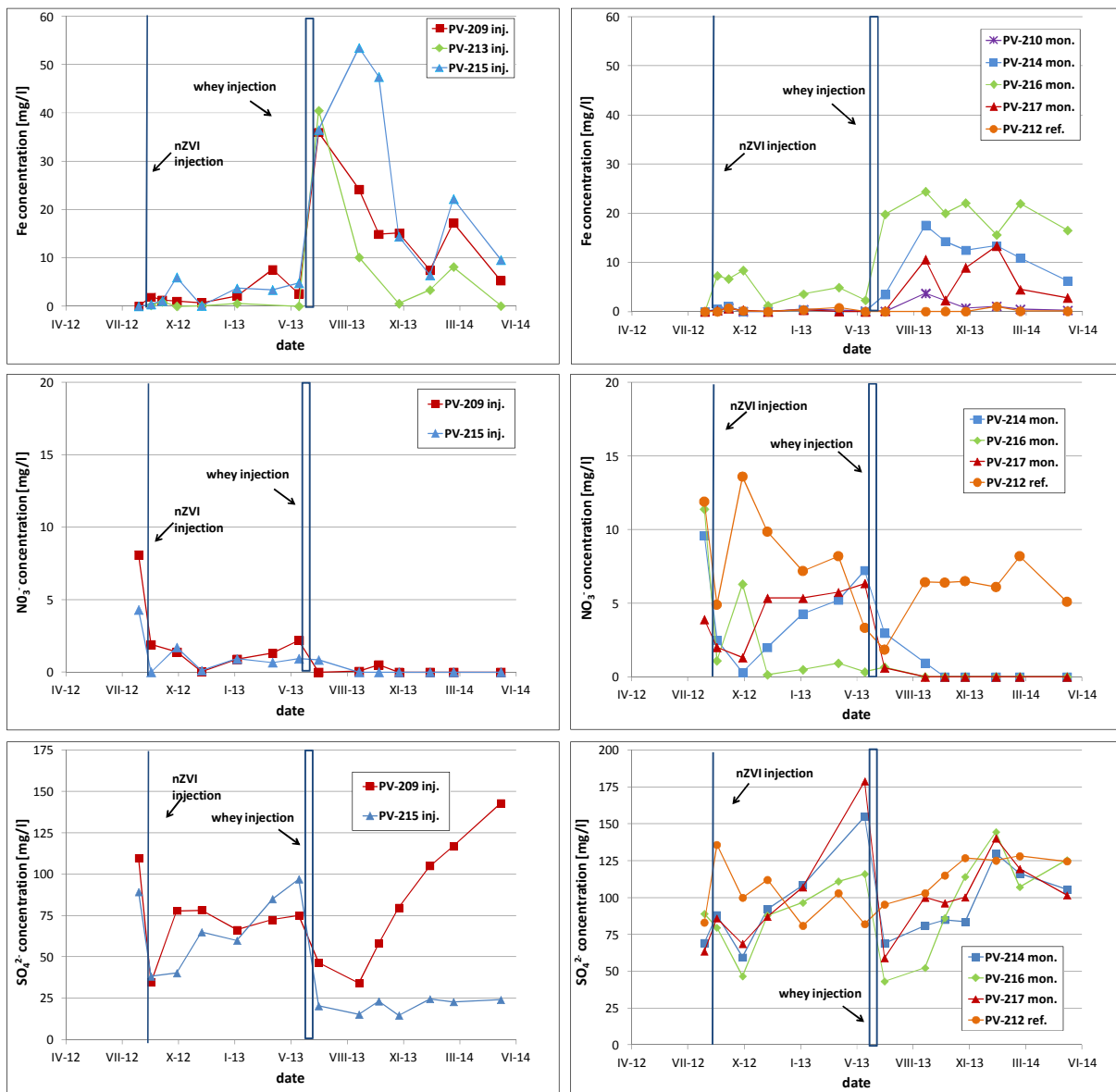


Obr. 22: Eh podzemní vody v průběhu pilotní zkoušky (vlevo injektážní vrty, vpravo monitorovací vrty; svislé linie znázorňují datum injektáže nZVI „nZVI injection“, resp. aplikaci syrovátky „whey injection“)

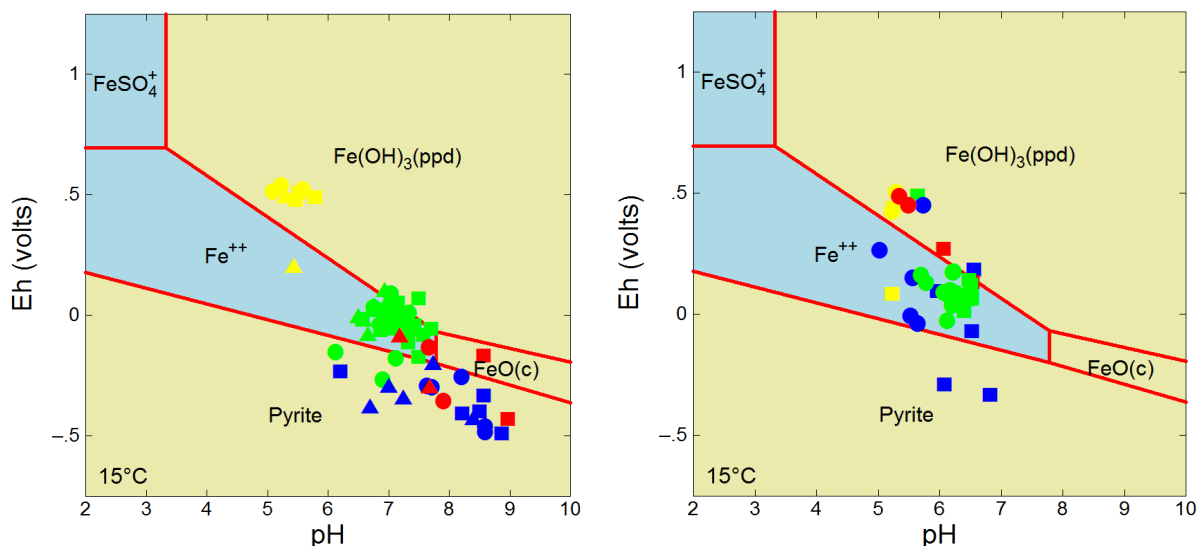
Obsahy Fe, dusičnanů a síranů odrážely oxidačně-redukční poměry zvodně a procesy probíhající během pilotní zkoušky (Obr. 23). Výchozí koncentrace **dusičnanů** kolísající od 4 do 12 mg/l klesla po injektáži nZVI pod 3 mg/l s následným pozvolným nárůstem v monitorovacích vrtech na původní úroveň. Po aplikaci syrovátky došlo k poklesu koncentrace dusičnanů pod mez laboratorní stanovitelnosti (0,5 mg/l) ve všech monitorovacích vrtech ve směru proudění podzemní vody. Naopak koncentrace **Fe** narostla z výchozí koncentrace blízké mezi laboratorní stanovitelnosti (0,1 mg/l) po injektáži nZVI na obsahy nepřekračující 10 mg/l. Po aplikaci syrovátky došlo k výraznému nárůstu koncentrace Fe až na 54 mg/l v původním vrtu injektáže nZVI a až na 25 mg/l v monitorovacích vrtech. Tyto výsledky indikují, že nZVI, které bylo oxidováno na Fe(III) během první abiotické fáze redukce Cr(VI), bylo následně redukováno (spolu s přirozeně se vyskytujícím Fe(III)) jako terminální akceptor elektronu během podpořených mikrobiálních respiračních procesů. Toto vysvětlení je podpořeno Eh-pH stabilitním diagramem systému Fe-S-H₂O na Obr. 24 vypočítaném geochemickým modelem Geochemist's Workbench (Aqueous Solutions LLC, USA). Na stabilitních diagramech je patrný posun naměřených dat Eh-pH před (žluté značky) a po injektáži nZVI (modré značky), následná oxidace nZVI (červené značky) a stabilizace (v případě injektážních vrtů) nebo částečná regenerace (monitorovací vrty) železa v oblasti stability Fe²⁺ po aplikaci substrátu (zelené symboly).

Koncentrace síranů v podzemní vodě injektážních vrtů poklesla po aplikaci nZVI dočasně pod 50 mg/l. V monitorovacích vrtech byl vliv nZVI na koncentraci síranů (Obr. 23) nevýrazný. Aplikace syrovátky se projevila prudkým poklesem koncentrace síranů jak v injektážních vrtech, tak i v pozorovacím vrtu PV-214. V dalších měsících

koncentrace síranů zůstala pod 25 mg/l v podzemní vodě vrtu PV-215, zatímco v ostatních vrtech opětovně narostla na původní úroveň. Obdobně jako v případě dusičnanů a Fe(III), sírany zřejmě působily jako terminální akceptory elektronu při mikrobiálních respiračních procesech, avšak podmínky specifické pro mikrobiální redukci síranů, jako energeticky méně výhodnou respirační reakci, byly ve srovnání s podmínkami pro redukci dusičnanů a železa plošně a časově omezené.



Obr. 23: Koncentrace Fe (nahore), NO₃⁻ (uprosřed) a SO₄²⁻ (dole) v podzemní vodě injektážních (vlevo) a monitorovacích (vpravo) vrů



Obr. 24: pH-Eh diagram pro Fe za přítomnosti síry.

Vlevo vrtý injektáže nZVI, vpravo monitorovací vrtý. Barva symbolů: žlutá – výchozí stav, modrá – aplikace nZVI, červená – stav před aplikací substrátu, zelená – po aplikaci substrátu. (Stabilitní oblasti vypočítány modelem Geochemist's Workbench (Bethke, 2000) s využitím jeho termodynamické databáze thermo.dat při potlačení hematitu, goethitu a magnetitu)

5.3.1.2 Spotřeba substrátu

Monitoring podzemních vod, který proběhl 9. den po nadávkování substrátu, zjistil skokový nárůst TOC na hodnoty mezi 189 mg/l v čerpacím vrtu HV-219 vzdáleném cca 10 m od injektážní linie a 367 mg/l ve vrtu PV-216 situovaném v bezprostřední blízkosti injektážního vrtu IN-1, do kterého byl substrát (roztok syrovátky) dávkován. Je zřejmé, že cirkulace zasakovaného roztoku v horninovém prostředí vedla k rovnoměrné distribuci substrátu v prostoru vymezeném injektážními a čerpacími vrtý a k dosažení koncentrací blízkých plánovanému obsahu TOC – 200 mg/l. Již během prováděné cirkulace podzemních vod byl pozorován rychlý pokles obsahu TOC ve všech monitorovacích vrtech. Během 4. měsíce po aplikaci substrátu klesl obsah TOC pod 10 mg/l v podzemní vodě většiny vrtů. I s ohledem na výsledky mikrobiálních analýz a vývoje koncentrace hydrogenuhličitánů se lze domnívat, že významným procesem způsobujícím pokles obsahu TOC byl bakteriální rozklad. Z vývoje TOC byla odhadnuta rychlost spotřeby TOC s využitím kinetiky prvního řádu:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (38)$$

kde:

C – biodegradovaná koncentrace látky

C_0 – počáteční koncentrace látky

k – rozpadová konstanta (čas^{-1})

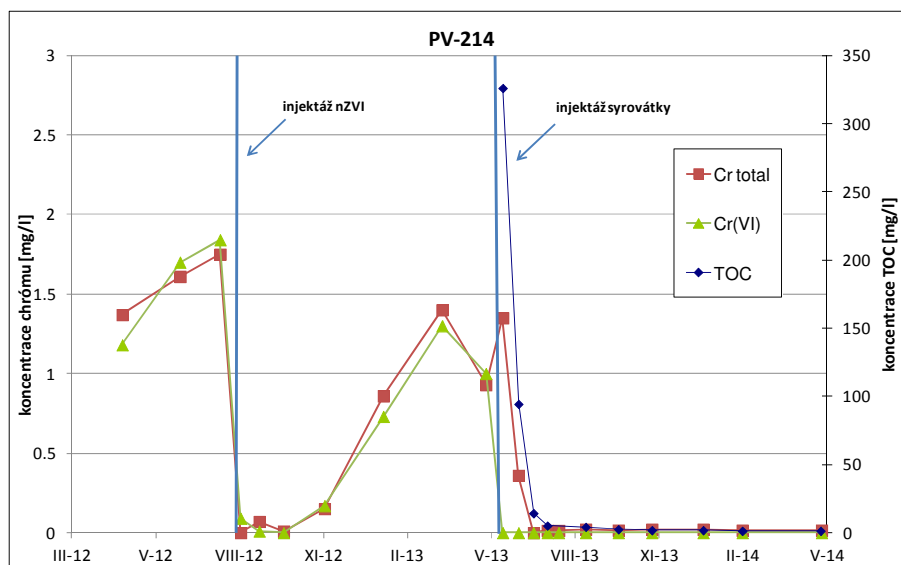
Výpočet byl proveden pomocí softwaru Excel, kdy byly vyneseny koncentrace TOC v podzemní vodě jednotlivých vrtů oproti času od zahájení aplikace. Výsledný graf pro každý vrt byl proložen exponenciální funkcí ve tvaru kinetiky prvního řádu, byla odečtena rozpadová konstanta - k .

Takto vypočtená rozpadová konstanta se pro jednotlivé vrty pohybovala v rozmezí $k = 0,024$ až $0,031 \text{ den}^{-1}$.

5.3.1.3 Koncentrace Cr(VI) a $C_{\text{celk.}}$ v podzemní vodě

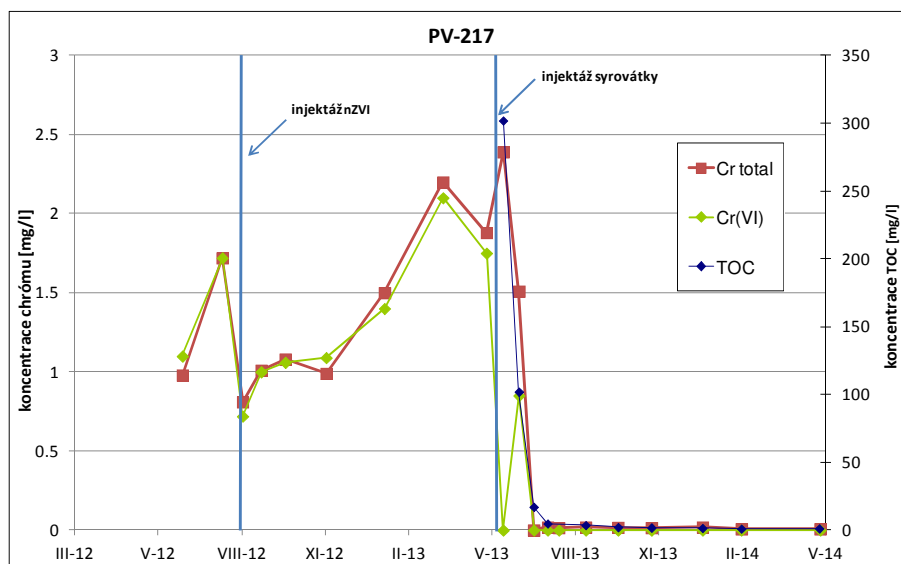
Vývoj koncentrací Cr(VI) a $C_{\text{celk.}}$ v podzemní vodě v průběhu obou fází (abi- a bio-) pilotní zkoušky, je znázorněn grafy koncentrací ve vybraných monitorovacích vrtech situovaných v různých vzdálenostech od vrtů aplikačních, viz Obr. 25 až 27.

V nejbližším umístěném monitorovacím vrtu **PV-214** se zásak nZVI projevil rychlým poklesem Cr(VI) pod mez analytické stanovitelnosti ($<0,05 \text{ mg/l}$). Po 90 dnech od zásaku nZVI byl pozorován pozvolný nástup koncentrace Cr(VI) až na přibližně 60% počáteční koncentrace. Následovalo nadávkování organického substrátu, což se projevilo ve velmi rychlém poklesu obsahu Cr(VI) v podzemní vodě pod mez stanovitelnosti. Pod touto mezí obsah Cr(VI) setrval až do konce pilotní zkoušky. Obsahy $C_{\text{celk.}}$ v podzemní vodě tohoto vrtu před a po aplikaci nZVI přibližně kopírovaly obsahy Cr(VI). Je zřejmé, že nanoželezem redukováný chróm vypadával velmi rychle z roztoku a jeho rozpustnost byla za stávajícího pH velmi malá. První měsíc po aplikaci substrátu byl zaznamenán prudký pokles koncentrace Cr(VI), nicméně obsahy $C_{\text{celk.}}$ zůstaly vysoké. Pravděpodobným vysvětlením je tvorba organických komplexů Cr(III), které způsobily dočasně zvýšenou rozpustnost redukované formy chrómu (Puzon et al., 2005 nebo James a Barlett, 1983). Biologický rozklad těchto ligandů vázaných v komplexu mohl mít za následek dočasnost tohoto jevu.



Obr. 25: Vývoj koncentrace chrómu a TOC v podzemní vodě vrtu PV-214

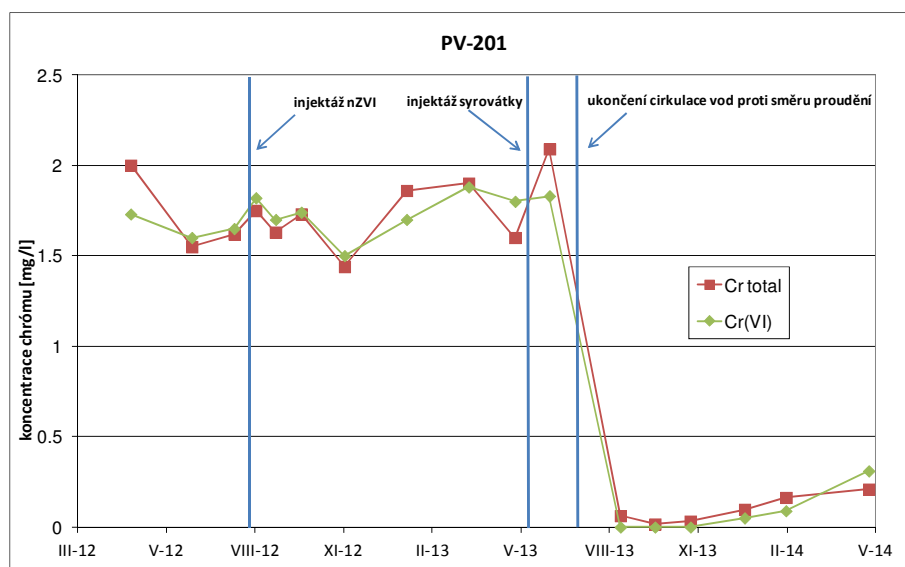
Ve vrtu **PV-217** vzdáleném cca 7 m od linie vsaku nZVI již nebyl jeho vliv tak patrný. Po počátečním poklesu koncentrace Cr(VI) v podzemní vodě bezprostředně po vsaku nZVI došlo k rychlému opětovnému nárůstu koncentrace a přibližně po 150 dnech dosáhla úrovně před aplikací nZVI a v dalších měsících dále stoupala. Po aplikaci substrátu byl vývoj koncentrace Cr(VI) a $Cr_{celk.}$ v podzemní vodě obdobný jako v případě vrtu PV-214. Koncentrace Cr(VI) klesla, byť s jedním výkyvem, pod mez laboratorní stanovitelnosti a pod touto mezí setrvala po zbytek pilotní zkoušky.



Obr. 26: Koncentrace chrómu a TOC v podzemní vodě vrtu PV-217

Vrt **PV-201** se nachází dále ve směru proudění od vrtu PV-217 (cca 10 m od linie zásaku nanoželeza) a vně cirkulační zóny provozované při a po vsaku substrátu. Zásak nZVI se na obsazích Cr(VI) prakticky neprojevil. Aplikace substrátu se projevila až po

vypnutí nucené cirkulace podzemní vody se substrátem, protože tato cirkulace bránila šíření substrátu mimo takto vytvořenou cirkulační zónu. Již první odběr po obnovení přirozeného režimu proudění (98 dní po aplikaci substrátu) zjistil pokles Cr(VI) pod mez laboratorní stanovitelnosti a pod touto mezí se pohyboval další dva měsíce, poté následoval pozvolný nárůst. Nepoměr mezi obsahy Cr(VI) a Cr_{celk.} v podzemní vodě tohoto vrtu nebyl v porovnání s vrtu PV-214 a PV-217 tak výrazný.



Obr. 27: Koncentrace chrómu v podzemní vodě vrtu PV-201

Z plošné interpretace dat je patrné, že zatímco injektáž nZVI měla účinný dosah do cca 10 m od linie injektážích vrtů, v případě následně provedené bioredukce se dosah rozšířil i na oblast vrtu PV-210 situovaného cca 22 m od vrtů injektáže substrátu (plocha přibližně 350 m²).

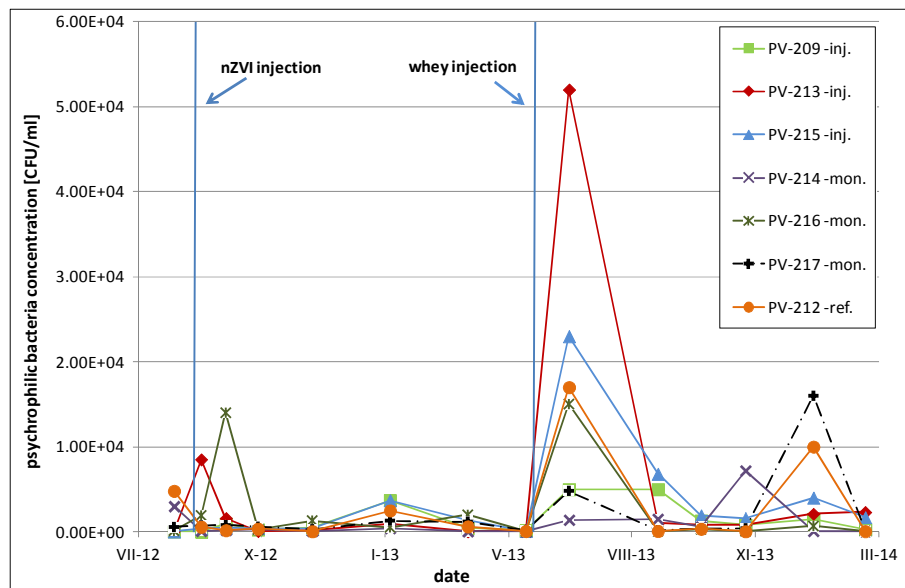


Obr. 28: Koncentrace Cr(VI) v podzemní vodě před aplikací nZVI a 266 dní po aplikaci substrátu

Přetrvávající redukční podmínky ve vztahu k Cr(VI) indikují vzájemný účinek abiotické a biotické fáze testované metody. nZVI oxidované během první biotické fáze bylo částečně regenerováno během druhé biotické fáze, tzn. biogeně redukováno na Fe(II). To pravděpodobně dlouhodobě působilo jako redukční činidlo pro Cr(VI), i když už mikrobiální osídlení pokleslo zpět na původní úroveň v důsledku vyčerpání dodaného organického substrátu (viz níže). Toto vysvětlení podporují zvýšené obsahy rozpuštěného Fe v podzemní vodě (Obr. 23) a výsledky mikrobiologické molekulární analýzy 454 pyrosekvenací, které detekovaly železo redukující mikroorganismy.

5.3.1.4 Účinek kombinované sanační metody na mikrobiální populaci

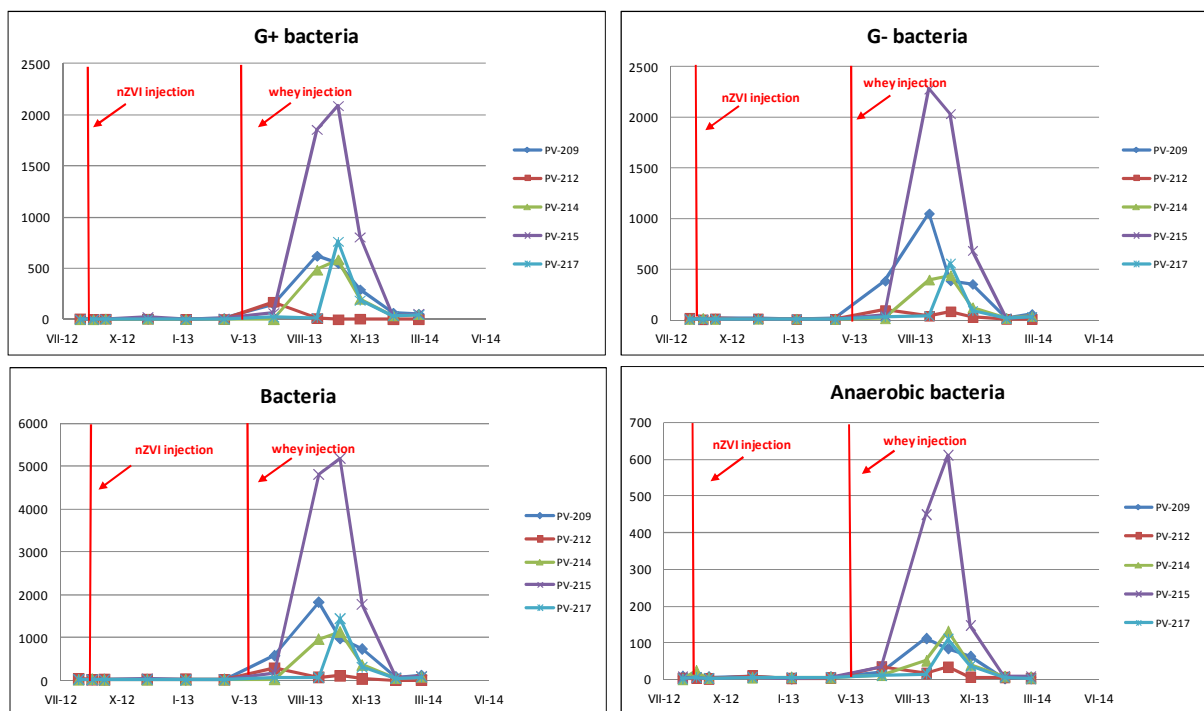
Mikrobiální populace byla během pilotní zkoušky sledována dvěma přístupy: kultivačními zkouškami pro stanovení přítomnosti psychrofilních, síran redukujících a anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií a dále analýzami PLFA. Síran redukující bakterie a anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie nebyly detekovány nebo byly detekovány ale v malých počtech. Z vývoje počtů psychrofilních bakterií (viz Obr. 29) vyplývají méně výrazné změny po injektáži nZVI, především však zřetelné zvýšení počtu KTJ jeden měsíc po aplikaci substrátu. S postupnou spotřebou substrátu v následujících měsících (pokles TOC z 189 až 367 mg/l na 1,3 až 4,1 mg/l) následoval pokles počtu KTJ.



Obr. 29: Počty kultivovatelných psychrofilních bakterií v podzemní vodě (KTJ/ml)

5.3.1.5 Analýzy PLFA a 454 pyrosekvenace

Na Obr. 30 jsou znázorněny výsledky analýz fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) v podzemní vodě charakteristických pro 4 skupiny mikroorganismů: bakterie, anaerobní bakterie, gram pozitivní (G+) bakterie a gram negativní (G-) bakterie. Analýzy PLFA v zemině během první abiotické fáze pilotní zkoušky ukázaly generelně pozitivní dopad injektáže nZVI na autochtonní mikroorganismy (data uvedena v článku autora (Němeček et al., 2014)). Na obsahy PLFA v podzemní vodě měla pozitivní vliv aplikace substrátu. Kulminace koncentrace PLFA (o 2 až 3 řády ve srovnání s úrovní před aplikací substrátu) byla zaznamenána koly monitoringu provedenými 3 až 4,5 měsíce po aplikaci, tedy později ve srovnání s výsledky kultivačních zkoušek. Poté následoval pokles koncentrací PLFA v důsledku vyčerpání substrátu.



Obr. 30: Vývoj bakteriálního osídlení sledovaného pomocí obsahu PLFA v podzemní vodě vybraných vrtů (ng/l)

Na konci pilotní zkoušky byly na Mikrobiologickém ústavu AV ČR provedeny analýzy 4 vzorků podzemní vody 454 pyrosekvencí. V průměru bylo identifikováno 1909 sekvencí na vzorek s délkou >400 bází. Na základě 97% podobnosti bylo stanoveno 362 operačních taxonomických jednotek (OTU). Po identifikaci komunity na úrovni rodu a čeledi byla zjištěna přítomnost převážně fakultativně anaerobních (referenční vrt PV-212) nebo striktně a fakultativně anaerobních bakterií (injektažní a monitorovací vrty PV-209, PV-214 a PV-217). V referenčním vrtu PV-212 dominovaly čeledě *Comamonadaceae*, *Pelobacteraceae*, *Holophagaceae*, které jsou známy schopností redukovat Fe(III) a dusičnany (Loneragan et al., 1996; Coates et al., 1999; Osaka et al., 2006) a rod *Geobacter*, kde u *G. metallireducens* byla zjištěna schopnost redukovat nejen železo ale i přímo Cr(VI) (Lovley et al., 1993). Tyto poznatky naznačují přirozený potenciál redukovat Cr(VI) v místních podmínkách.

Síran a železo redukující bakterie byly identifikovány ve vrtu PV-209 zastoupenými rody *Geobacter*, *Desulfovibrio*, *Janthinobacterium*, *Desulfosporosinus* a *Sulfurospirillum*, (Laverman et al., 1995; Bale et al., 1997; Robertson et al., 2001; Lovley et al., 2004). Velmi podobná situace byla zjištěna ve vzorcích z monitorovacích vrtů PV-214 a PV-217, ve kterých byly identifikovány rody *Geobacter*, *Sulfuritalea* a čeledě *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*,

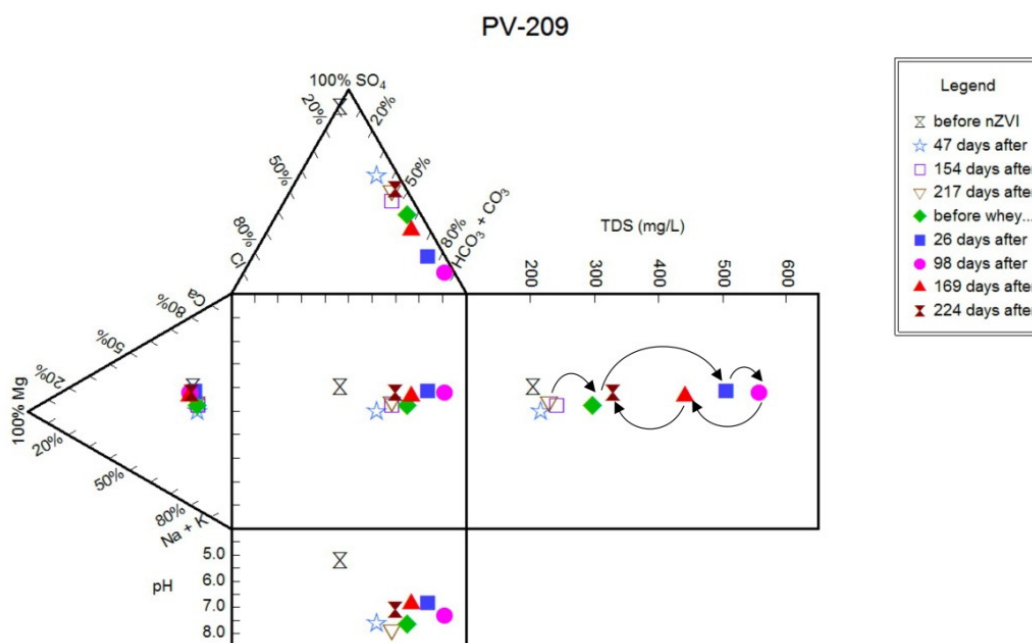
Holophagaceae, *Rhodocyclaceae*, *Nitrospinaceae*, *Ruminococcaceae*, *Catabacteriaceae* (Lovley et al., 2004; Weber et al., 2006; Li and Peng, 2011).

Přítomnost výše uvedených rodů a čeledí naznačuje, že proces redukce Cr(VI) byl významnou měrou zprostředkován železo redukujícími a síran redukujícími bakteriemi, o kterých bylo zjištěno, že reagují více jak 100x rychleji než bakterie redukující Cr(VI) přímo (Somasundaram et al., 2011). Toto tvrzení podporují zvýšené obsahy Fe(II) v podzemní vodě během biotické fáze, které přetrvávaly i po poklesu mikrobiální biomasy během posledních dvou kol monitoringu.

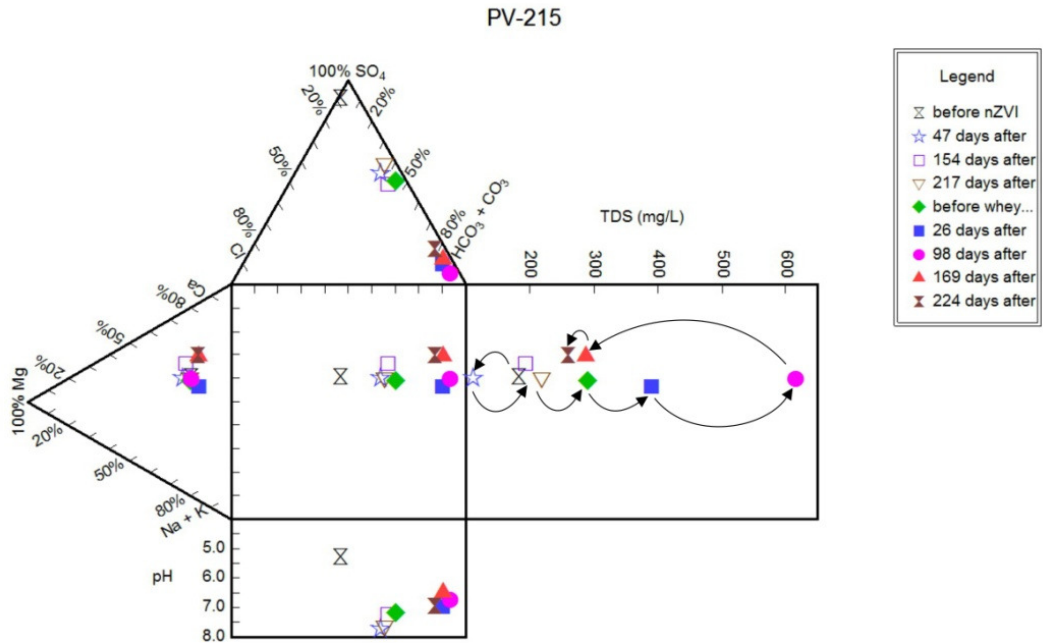
5.3.1.6 Hydrochemické změny vyvolané aplikací substrátu

Vývoj základního chemizmu podzemních vod monitorovacích vrtů PV-209, PV-215 a PV217 během pilotní zkoušky je znázorněn Durovovy grafy na Obr. 31 až 33.

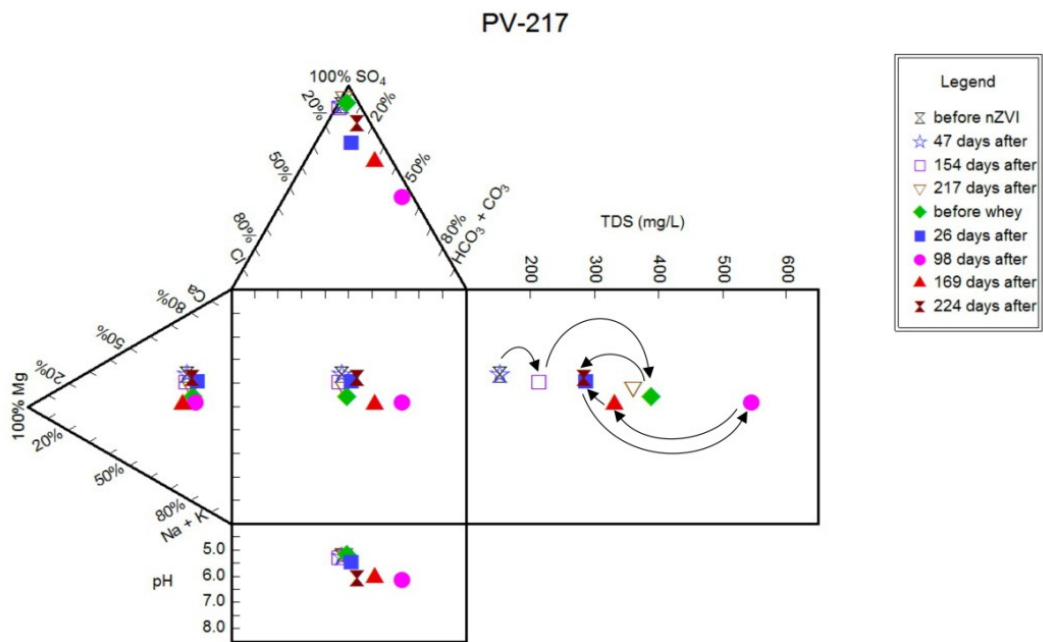
Celkově lze konstatovat, že jak aplikace nZVI, tak i substrátu ovlivnila základní chemické složení podzemní vody nevýrazně. V obou případech se jedná o nevýrazný nárůst celkové mineralizace a posun v relativním zastoupení jednotlivých iontů. V případě aplikovaného substrátu tyto změny kulminovaly přibližně 3. měsíc po jeho zásaku a poté je pozorován pozvolný návrat k původnímu složení. Změny v obsazích jednotlivých aniontů (dočasný nárůst hydrogenuhličitanů) souvisí s žádoucím rozvojem mikrobiální aktivity stimulovaným dodaným substrátem.



Obr. 31: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu PV-209



Obr. 32: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu PV-215

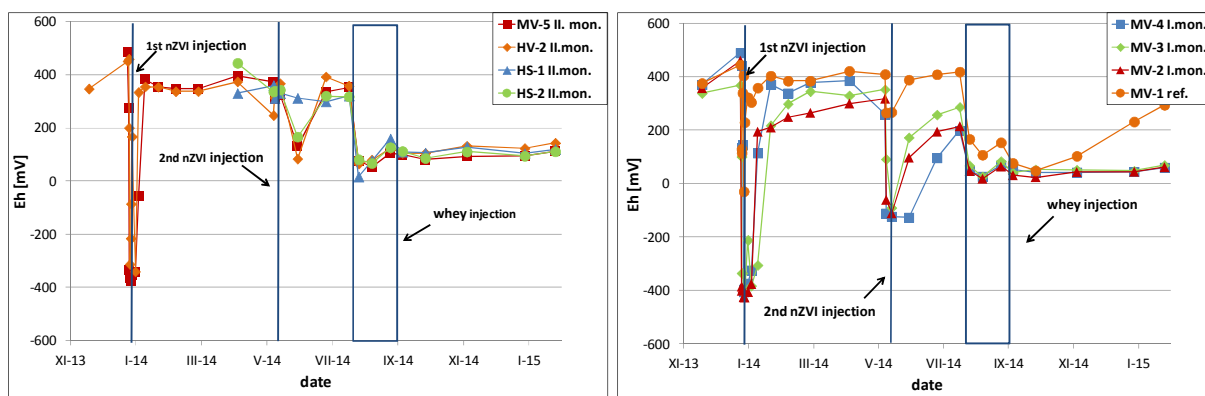


Obr. 33: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu PV-217

5.3.2 Pilotní zkouška na lokalitě C

5.3.2.1 Fyzikálně-chemické a anorganické parametry podzemní vody

Po první injektáži nZVI došlo k výraznému poklesu Eh podzemní vody z cca +400 mV na přibližně -400 mV jak ve vrtech první monitorovací linie vzdálené cca 2 m od injektážních sond (Obr. 34 vpravo), tak i druhé linie ve vzdálenosti cca 8 m (Obr. 34 vlevo). Injektáž nZVI ovlivnila i Eh podzemní vody referenčního vrtu MV-1 situovaného cca 6 m proti proudu podzemní vody. Ve vrtech druhé linie došlo k rychlému obnovení Eh na původní hodnoty, ve vrtech první linie (především ve vrtech MV-2 a MV-3, do kterých proniklo nZVI) byl nástup Eh pomalejší. Druhá aplikace nZVI se na poklesu Eh projevila méně a to především v podzemní vodě vrtů druhé monitorovací linie. Důvodem je skutečnost, že při první aplikaci byla suspenze nZVI připravena v dvojnásobném množství vody, vlastní aplikací tedy došlo k distribuci nZVI na větší vzdálenost. U vrtů první monitorovací linie byl opětovný nástup Eh pozvolnější a před aplikací substrátu dosáhl hodnot 200 – 290 mV. Aplikace organického substrátu (syrovátky) vyvolala opětovný pokles Eh k nulovým hodnotám, poté se Eh podzemní vody ustálilo na úrovni 50 mV ve vrtech první monitorovací linie a cca 100 mV ve vrtech druhé monitorovací linie a na těchto úrovních vydrželo až do konce zkoušky i po vyčerpání substrátu (viz graf obsahu TOC v podzemní vodě na Obr. 37).



Obr. 34: Eh podzemní vody v průběhu pilotní zkoušky

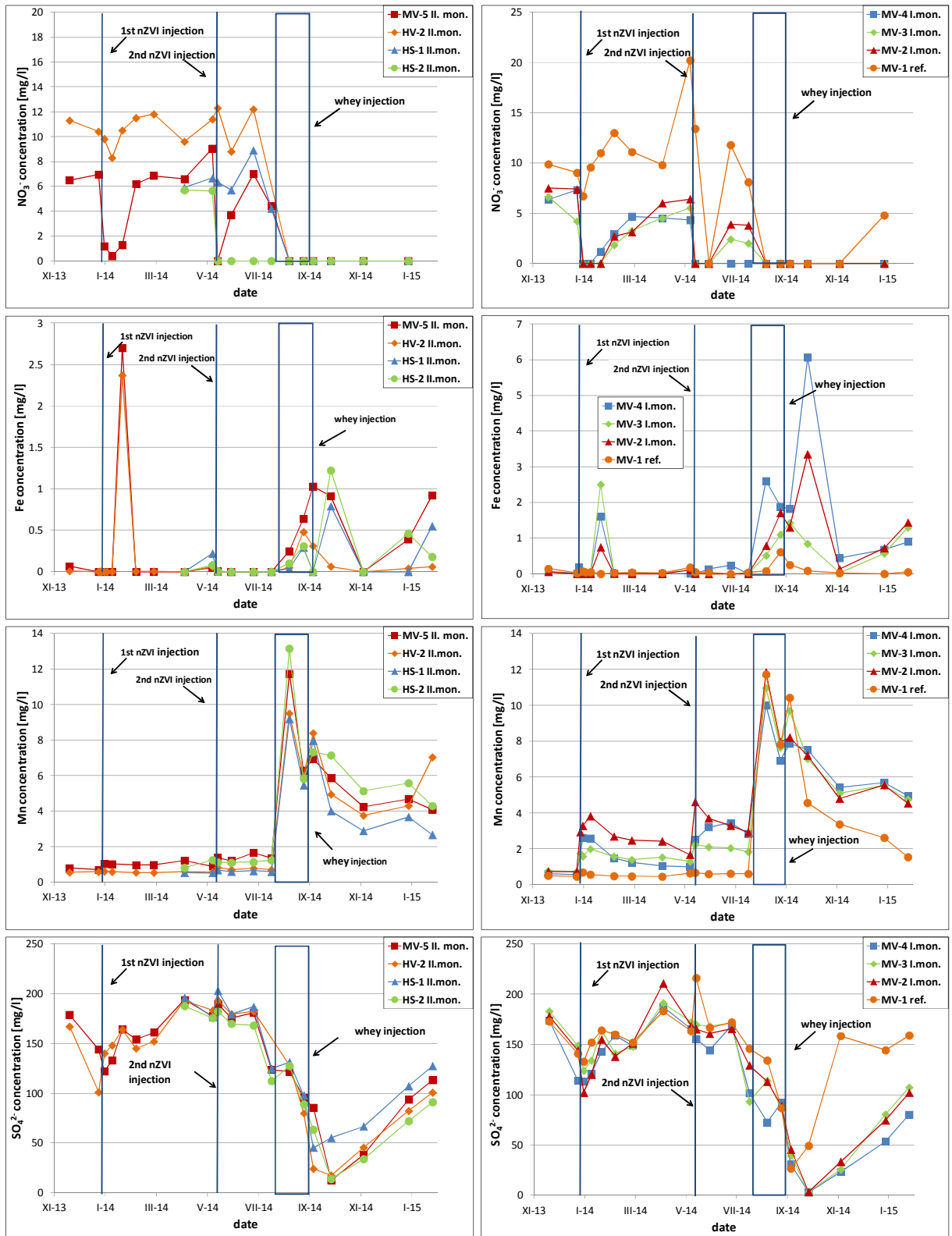
Svislé linie znázorňují datum injektáže nZVI „nZVI injection“, resp. aplikaci syrovátky „whey injection“. Vpravo jsou vyznačeny vrty první monitorovací linie, vlevo jsou vyznačeny vrty druhé monitorovací linie.

V průběhu pilotní zkoušky byl pozorován zajímavý vývoj obsahu dusičnanů, Fe, Mn a síranů (Obr. 35). Zatímco v případě **Mn** se, především v podzemní vodě první

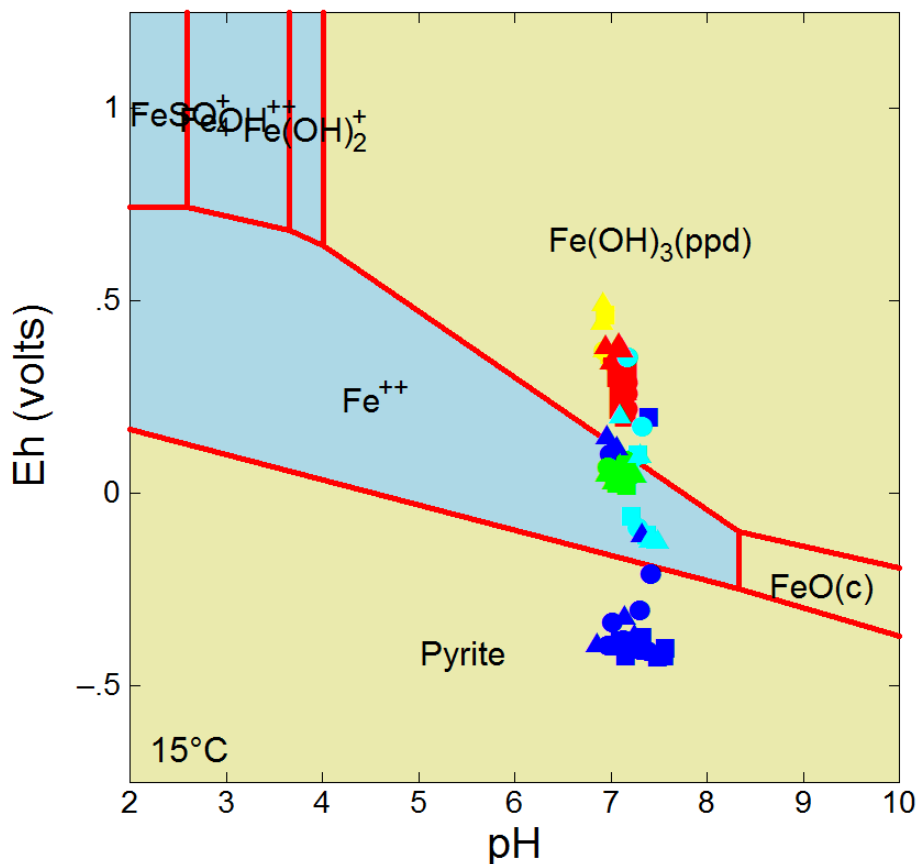
monitorovací linie, zásak nZVI a zejména substrátu projevily zřetelným nárůstem koncentrace v důsledku jeho redukce z Mn(IV) na rozpustnou formu Mn(II), u **Fe** byl tento nárůst méně výrazný a to i přes pozorovaný pokles obsahu **síranů** a výskyt methanu (data nejsou prezentována) indikující silně redukční prostředí.

Obdobně jako v případě lokality Hrádek nad Nisou byl sestaven stabilitní Eh-pH diagram pro různé speciace Fe za přítomnosti síranů, viz Obr. 36. Na grafu je patrný výrazný posun Fe z oblasti $\text{Fe}(\text{OH})_3$ až do oblasti pyritu FeS_2 po první aplikaci nZVI. Po oxidaci aplikovaného nZVI následuje návrat Fe do oblasti stability $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Tento posun se opakuje po druhé aplikaci nZVI, i když Fe nedosáhlo oblast stability pyritu. Aplikace substrátu vyvolala biologickou redukci oxidovaného Fe(III) do oblasti stability $\text{Fe}^{2+}(\text{aq})$. Lze předpokládat, že tímto způsobem bylo oxidované nZVI po aplikaci substrátu biologicky částečně regenerováno na reaktivní formy Fe(II).

Během 2. (biotické) fáze zkoušky byl rovněž sledován vývoj **sulfanu** v podzemní vodě. Před aplikací substrátu byly obsahy sulfanu pod mezí laboratorní stanovitelnosti ($<0,010$ mg/l). Po aplikaci substrátu koncentrace sulfanu redukcí síranů narostly v aplikačních vrtech až na 0,53 mg/l (IN-1A, 68 dní od zahájení dávkování syrovátky), v monitorovacích vrtech 1. linie až na 0,32 mg/l (MV-2, 68 dní po zahájení) a v monitorovacích vrtech 2. linie až 0,084 mg/l (HS-2, 106 dní po zahájení). Poté následoval pozvolný pokles a na konci zkoušky (188 dní po zahájení aplikace substrátu) byly v těchto vrtech obsahy sulfanu ve výši 47% až 60% zjištěných maxim. Přítomnost sulfanu naznačuje možnost dalšího mechanismu nepřímé biologické redukce Cr(VI) tímto plynem podle rovnic (9-11) (Somasundaram et al., 2011).



Obr. 35: Koncentrace NO_3^- , Fe, Mn a SO_4^{2-} v podzemní vodě vrtů první (vpravo) a druhé (vlevo) monitorovací linie



Obr. 36: pH-Eh diagram pro Fe za přítomnosti síry.

Barva symbolů: žlutá – výchozí stav, modrá – první aplikace nZVI, světle modrá – druhá aplikace nZVI, červená – stavy před druhou aplikací nZVI a před aplikací substrátu, zelená – po aplikaci substrátu. (Stabilitní oblasti vypočítány modelem Geochemist's Workbench s využitím jeho termodynamické databáze thermo.dat při potlačení hematitu, goethitu a magnetitu)

5.3.2.2 Spotřeba substrátu

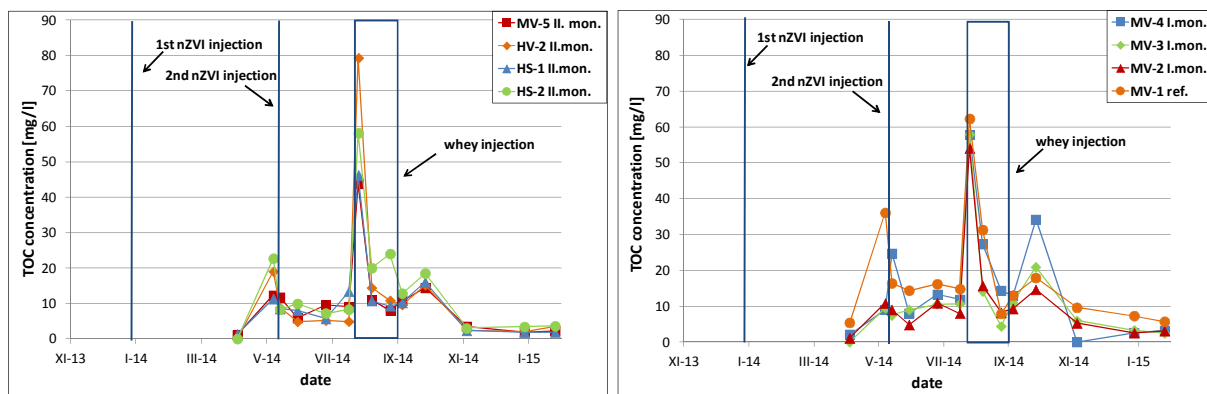
Monitoring podzemních vod, který proběhl 7. den po zahájení dávkování substrátu, zaznamenal nárůst TOC na hodnoty od 54 do 58 mg/l ve vrtech první monitorovací linie (MV-2 až MV-4) a 46 až 58 mg/l v čerpaných vrtech HS-1, resp. HS-2. Překvapivě nejvyšší koncentrace TOC byla zjištěna v nejvzdálenějším monitorovacím vrtu HV-2 (79 mg/l). Substrát se cirkulací podzemních vod rozšířil i proti směru přirozeného proudění podzemních vod (MV-1: 62 mg/l). Cirkulací vod tedy došlo k rovnoměrné distribuci substrátu, i když v nižší koncentraci TOC než se předpokládalo. Důvodem je

naředění zasáklé syrovátky velkým objemem podzemní vody vyplývající z vysoké propustnosti kolektorových hornin.

V dalších týdnech následoval rychlý pokles TOC ve všech monitorovacích vrtech doprovázený nárůstem koncentrace Mn, Fe, hydrogenuhličitanů a poklesem síranů. Je tedy zřejmé, že dominantním procesem způsobujícím pokles obsahu TOC byl bakteriální rozklad. Stejně jako v případě pilotní zkoušky na lokalitě Hrádek nad Nisou byla odhadnuta rychlost spotřeby TOC s využitím popisu poklesu TOC v podzemní vodě kinetikou prvního řádu.

Výsledné hodnoty rozpadové konstanty k činily 0,047 až 0,072 den⁻¹.

Ve srovnání s rychlostmi rozkladu substrátu na lokalitě Hrádek nad Nisou jsou hodnoty rozpadové konstanty na lokalitě C zhruba 2x vyšší.

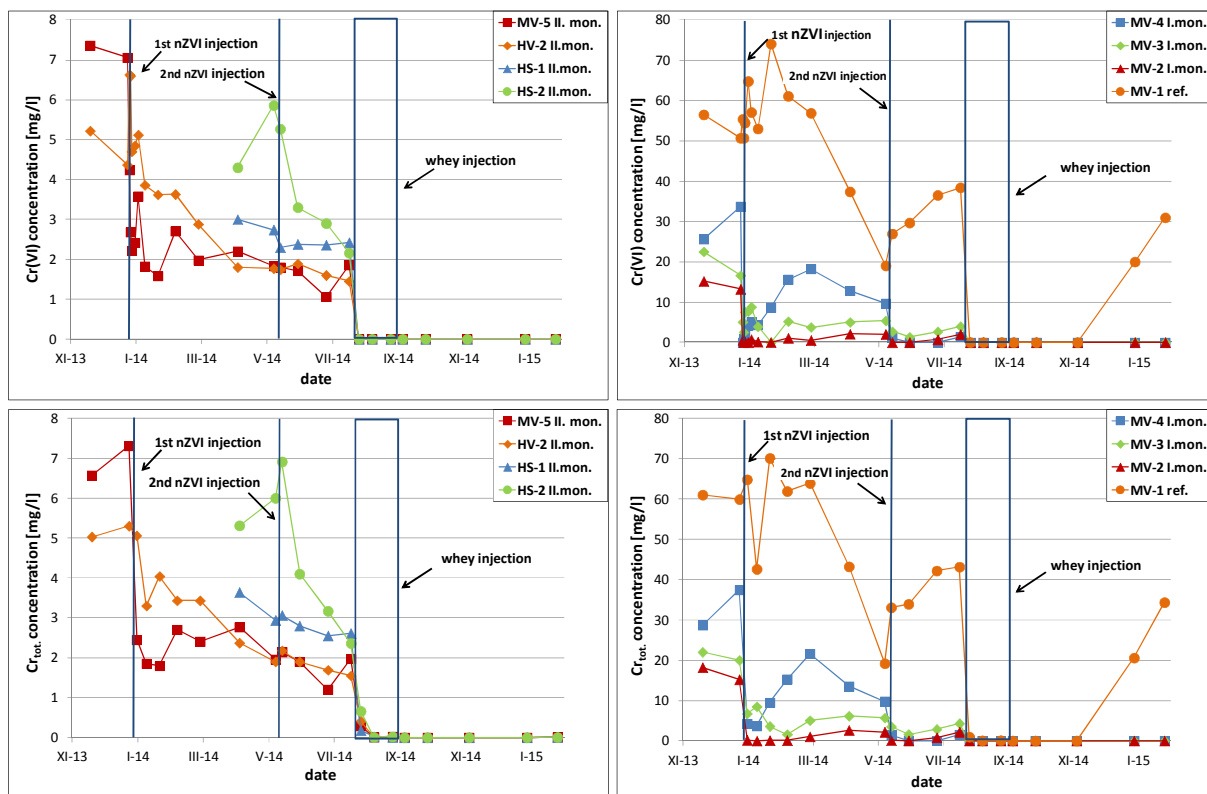


Obr. 37: Koncentrace TOC v podzemní vodě vrtů první (vpravo) a druhé (vlevo) monitorovací linie

5.3.2.3 Koncentrace Cr(VI) a $Cr_{celk.}$ v podzemní vodě

Vývoj koncentrací Cr(VI) v podzemní vodě v průběhu obou fází (nano a bio-) pilotní zkoušky, je znázorněn na Obr. 38 grafy koncentrací v monitorovacích vrtech situovaných v první (vpravo), resp. druhé monitorovací linii (vlevo), tedy v různých vzdálenostech od vrtů aplikačních.

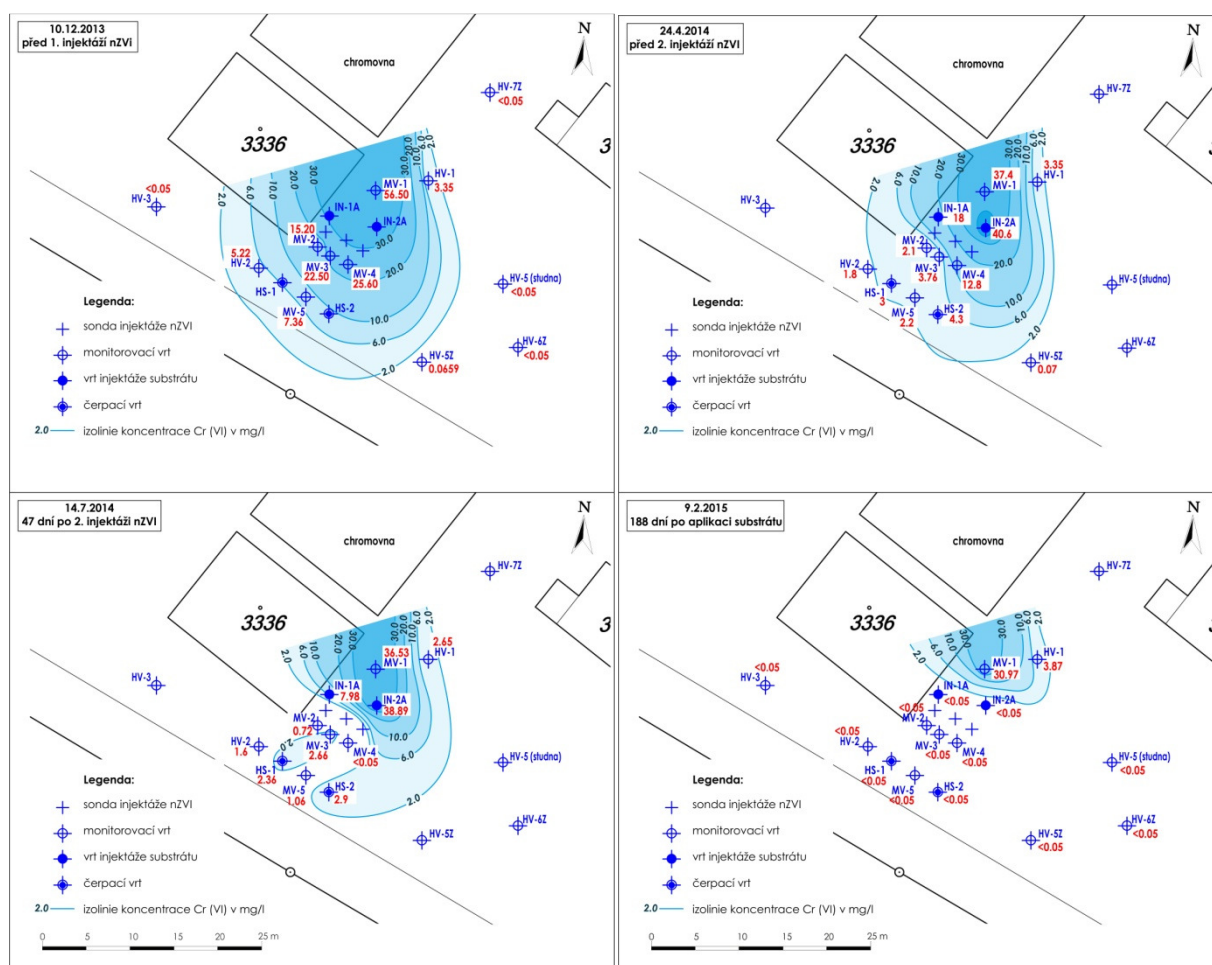
V podzemní vodě vrtů první monitorovací linie (cca 2 m od aplikačních sond) se první i druhý zásak nZVI projevil poklesem Cr(VI) až pod mez kvantifikace použité analytické metody. Opětovný nárůst obsahu Cr(VI) byl po druhé aplikaci nZVI mírnější a tak došlo ke znatelnému celkovému poklesu úrovně znečištění (na cca 10% až 15% výchozí koncentrace) před aplikací substrátu. Následné nadávkování substrátu vyvolalo rychlý pokles obsahu Cr(VI) v podzemní vodě pod mez stanovitelnosti, kde setrval i ve všech zbylých kolech monitoringu (po dobu 188 dní). Obsahy $Cr_{celk.}$ v podzemní vodě tohoto vrtu před a po aplikaci nZVI a substrátu kopírovaly obsahy Cr(VI). Na rozdíl od lokality Hrádek nad Nisou nebyly pozorovány dočasně zvýšené obsahy $Cr_{celk.}$ v podzemní vodě pravděpodobně související s tvorbou organických komplexů Cr^{3+} .



Obr. 38: Vývoj koncentrace Cr(VI) - nahore, a $Cr_{celk.}$ (dole) v podzemní vodě vrtů první (vpravo) a druhé (vlevo) monitorovací linie

Ve vrtech druhé monitorovací linie vzdálené cca 8 m od aplikačních vrtů byla výchozí koncentrace Cr(VI) výrazně nižší (jednotky mg/l) než ve vrtech první linie (desítky mg/l). Vliv aplikace nZVI nebyl v těchto vrtech tak patrný (vyjma vrtu MV-5 po první aplikaci nZVI a vrtu HS-2 po druhé aplikaci nZVI). Po aplikaci substrátu obsah Cr(VI) klesl ve všech vrtech pod mez stanovitelnosti a pod touto mezí setrval po zbytek monitorovaného období (188 dní). První kolo monitoringu po aplikaci substrátu (po 7 dnech) v podzemní vodě vrtů druhé linie detekovalo mírně zvýšený obsah Cr_{celk}. (v úrovni desetin mg/l). V dalších kolech již byl obsah velmi nízký – v úrovni prvních setin mg/l nebo pod mezí kvantifikace (<0,005 mg/l).

Změna koncentrace Cr(VI) vyvolaná injektážemi nZVI a substrátu je patrná z plošně interpretace dat na Obr. 39. Z obrázků je patrný plošně větší účinný dosah bioredukce stimulované cirkulací distribuovaného substrátu oproti účinku staticky injektovaného nanoželeza.



Obr. 39: Koncentrace Cr(VI) v podzemní vodě před 1. aplikací nZVI (vlevo nahoře), před 2. aplikací nZVI (vpravo nahoře), po 2. aplikaci nZVI (vlevo dole) a 188 dní po aplikaci substrátu

Přetrvávající redukční podmínky ve vztahu k Cr(VI) dokladují, obdobně jako v případě pilotní zkoušky na lokalitě Hrádek nad Nisou, synergický a posloupný účinek abiotické a biotické fáze testované metody. nZVI oxidované během první biotické fáze bylo částečně regenerováno během druhé biotické fáze, tzn. biogenně redukováno na Fe(II). To pravděpodobně dlouhodobě působilo jako redukční činidlo pro Cr(VI), i když už mikrobiální osídlení pokleslo zpět na původní úroveň v důsledku vyčerpání dodaného organického substrátu (viz níže).

5.3.2.4 Výsledky semikvantitativní fázové analýzy rentgenovou práškovou difrakcí

Semikvantitativní fázové analýze rentgenovou práškovou difrakcí byly v laboratoři České geologické služby podrobeny 4 vzorky kolektorové zeminy umístěné v kartridžích zavěšených ve vrtech MV-1, MV-3, MV-4 a MV-5. Vzorky zemin byly z kartridží odebrány 20.11.2014, tedy v závěru pilotní zkoušky (106 dní po zahájení bioredukční fáze), zamrazeny a odvezeny do laboratoře. Analýzy zjistily dominantní podíl křemene a minoritní až podružný podíl živců, kalcitu, chloritu a blíže neurčitelné slídy (v takto nízkých koncentracích není možné identifikovat, o který druh slídy se jedná), viz Tab. 5.

Tabulka 5: Výsledky semikvantitativní analýzy (hm. %)

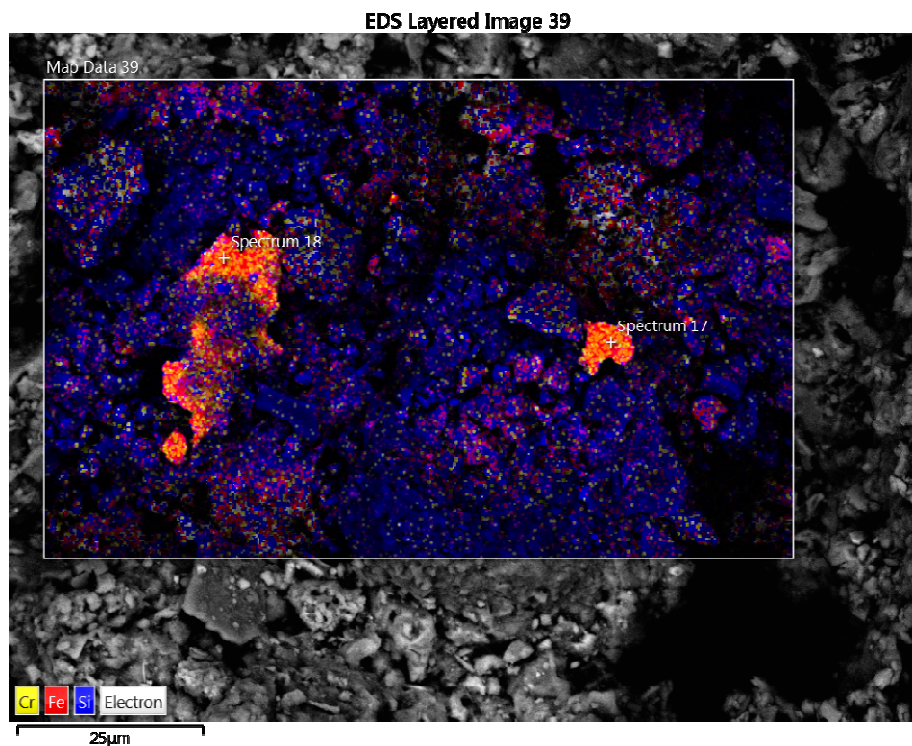
Vzorek	Q	K-živec	Na-živec	Slída	Kaolinit	Chlorit	Kalcit
MV-1	88	1	3	1	1	-	6
MV-3	85	2	4	1	1	-	7
MV-4	89	1	2	1	1	-	6
MV-5	87	1	3	1	1	-	7

Pozn.: Vzorek MV-5 by mohl obsahovat hematit na hranici limitu detekce metody. Limit detekce metody se pohybuje v závislosti na charakteru fáze a její krystalinitě v rozmezí 0.5 - 3 hm. %.

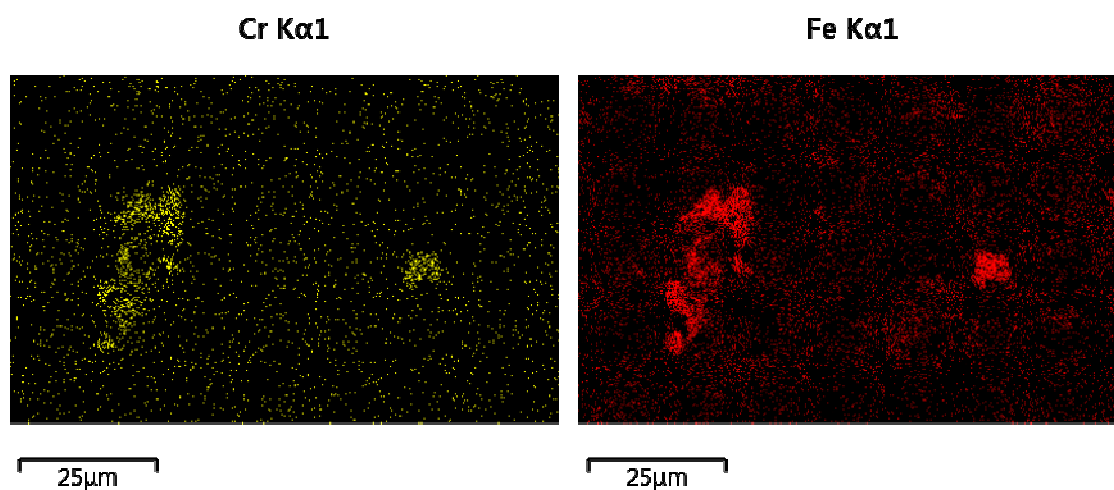
5.3.2.5 Výsledky prvkové analýzy zeminy metodou SEM-EDS

Vzorky zemin odebrané po 106 dnech od zahájení bioredukční fáze z kartridží byly rovněž podrobeny prvkové analýze metodou SEM-EDS v laboratořích TUL. Nejdříve byla provedena prvková analýza všech vzorků s malým přiblížením, aby byly zjištěny průměrné obsahy prvků v zemině. Z analýz vyplynuly dominantní podíly kyslíku (47 %váh. až 56 %váh.) a křemíku (10 %váh. až 40 %váh.), což potvrzuje převládající přítomnost křemene identifikovanou rentgenovou práškovou difrakcí. Hmotnostní podíl Cr byl velmi nízký (do 0,22 %váh.). Následně byla provedena prvková analýza vzorku z vrtu MV-3 a MV-4 s velkým přiblížením pro detailní lokalizaci a kvantifikaci výskytu chrómu se spolu se vyskytujícími prvky. Na Obr. 40 je EDS snímek vzorku z vrtu MV-4 s vyznačením výskytu prvků Cr, Fe a Si. Výskyt Cr a Fe na témže výřezu vzorku je

znázorněn na Obr. 41. Výsledky prvkové analýzy obou sraženin obsahující Cr jsou uvedeny v Tab. 6



Obr. 40: EDS spektrum pro detekci výskytu Cr (žlutě) – vzorek z vrhu MV-4



Obr. 41: Výskyt Cr a Fe ve výřezu na Obr. 40 (výstup EDS spektra)

Tabulka 6: Hmotnostní podíl jednotlivých prvků v oblasti sraženin na Obr. 40

Spektrum /prvek	Spektrum 17	Spektrum 18
C	3.08	4.15
O	5.49	3.5
Mg	0.19	ND
Al	1.12	0.72
Si	2.87	2.49
K	0.19	0.19
Ca	1.43	1.41
Cr	10.61	10.23
Fe	74.59	77.3
Cu	0.43	ND
Total	100	100

Z výsledků prvkové analýzy metodou SEM-EDS je patrné, že redukovaný chrom Cr(III) není v horninové matici rovnoměrně dispergován, ale vytváří amorfni sraženiny, ve kterých je váhově zastoupen z 10,6%, resp. 10,2%, sraženiny obsahují vysoký obsah Fe (74,6% , resp. 77,3%) a kyslíku (5,5%, resp. 3,5%), což indikuje přítomnost amorfniho $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$. Pravděpodobně na povrchu aglomerovaných nezreagovaných nZVI. To je v souladu s výsledky Tessierových sekvenčních extrakčních zkoušek provedených v rámci kolonových zkoušek, ze kterých vyplývá, že dominantní podíl chromu je po jeho redukcí v zemině vázán na oxidy (hydroxidy) Fe a Mn.

Vzorky zeminy z vrtů MV-1, MV-3, MV-4 a MV-5 byly v laboratoři UPOL analyzovány metodou rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) pro stanovení valence Cr. U vzorků MV 1, 3 a 5 byl zjištěn pouze Cr(III) a na základě analýz spektrálních čar lze usuzovat, že se jedná o oxidy/hydroxidy Cr(III), což potvrzuje interpretaci výsledku analýz SEM-EDS.

5.3.2.6 Výsledky analýz zemin metodou XPS a Mössbauerovy spektroskopie

U vzorku MV4 byla analýza XPS provedena po magnetické separaci a byl měřen pouze magnetický podíl - v tomto případě byl identifikován Cr(III) (tzn. Cr v podobě oxidů či hydroxidů) i Cr v kovovém stavu (možná přítomnost "otěru" vrtného nástroje z nerez oceli).

Pro měření valence/speciace Fe byla v laboratoři UPOL použita Mössbauerova spektroskopie (měřen byl pouze vzorek MV4 s nejvyšším obsahem Fe při teplotě 100 K

aby nedocházelo ke změnám valenčního stavu Fe v průběhu měření). Zjištěny byly následující valenční stavy Fe:

Fe(0) - 6%

Fe(II) - 21%

Fe(III) - 73%

V případě Fe(II) (a patrně části Fe(III)) se jedná o fázi "green rust - GR", u Fe(III) je fázové přiřazení poněkud nejednoznačné. GR je směsný Fe(II)-Fe(III) hydroxid, který vzniká jako meziprodukt koroze železa (Lee a Batchelor, 2002), v našem případě pravděpodobně oxidací nanočástic ZVI. Z literatury je známo, že jak síranová forma GR ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot y\text{H}_2\text{O}$), tak i uhličitanová forma GR ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot y\text{H}_2\text{O}$) jsou schopny redukovat Cr(VI) obdobnou nebo vyšší rychlostí než je přímá redukce mikroorganismy (Williams et al., 2000). Je tedy zřejmé, že redukce Cr(VI) je výsledkem působení více redukčních činidel, které jsou více či méně produkovány nebo recyklovány procesy iniciovanými studovanou kombinovanou metodou.

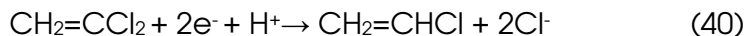
5.3.2.7 Koncentrace chlorovaných ethenů v podzemní vodě

Obdobně jako Cr(VI), tak i chlorované etheny (CIU-Eth) mohou být odstraněny z podzemních vod kombinovanou nano-bio redukční technologií. Zatímco v případě chrómu je účelem převést toxickou a mobilní hexavalentní formu Cr(VI) redukcí na netoxickou a velmi málo mobilní Cr(III), lze za vhodných podmínek abiotickými a biotickými oxidačně redukčními procesy dechlorovat chlorované etheny (ale i chlorované ethany a methany) na netoxické formy ethen a ethan (resp. ethan a methan). Při **abiotické redukci** působí nZVI jako donor elektronů, které formálně redukují uhlík v molekule chlorovaného ethenu a ve stejném kroku eliminují atomy chlóru (tzv. β -eliminace). Příkladem je redukce TCE na chloroacetylen podle rovnice (např. Cwiertny a Scherer, 2010):



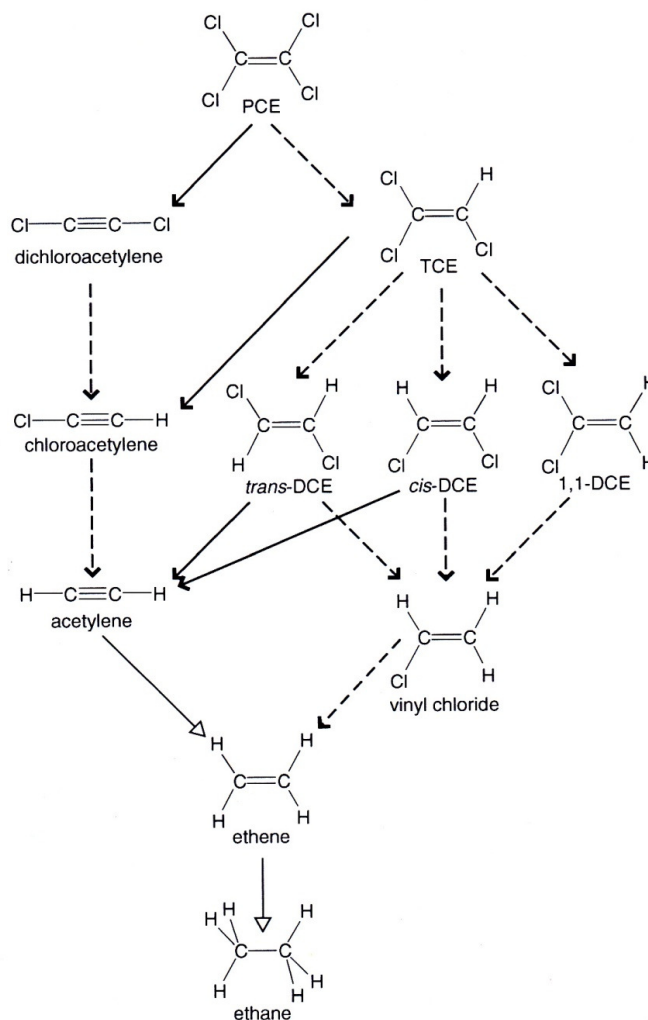
Méně termodynamicky výhodnou abiotickou formou dehalogenace je hydrogendhalogenace nebo reduktivní dehalogenace, při které dochází k sekvenční hydrogenolyze, tedy substituci vodíku za atom chlóru a zároveň k redukcí uhlíku v molekule chlorovaného ethenu elektronem darovaným nulmocným železem.

Příkladem je redukce 1,1-DCE na vinylchlorid podle rovnice (např. Cwiertny a Scherer, 2010):



Při **biologické dehalogenaci** je hlavním procesem sekvenční hydrogendethalogenace (viz výše), kdy donorem elektronu (a vodíku) je molekulární vodík produkovaný fermentací organických látek přirozeně se vyskytujících nebo účelově do zvodněného prostředí aplikovaných (v našem případě syrovátka).

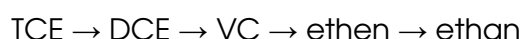
Na Obr. 42 jsou znázorněny výše popsané abiotické a biotické cesty dehalogenace chlorovaných ethenů.



Obr. 42: Možné cesty dehalogenace chlorovaných ethenů (Cwiertny a Scherer, 2010)
 Čárkované šipky značí hydrogendethalogenaci, plné šipky značí β -eliminaci, trojúhelníkové šipky značí redukci bez dehalogenace.

Abiotické fáze pilotní zkoušky (aplikace nZVI) neměly významný a především déle trvající účinek na rozklad CIU-Eth v podzemní vodě vrtů první monitorovací linie. V druhé linii monitorovacích vrtů (MV-5, HS-1, HS-2, HV-2) se vliv aplikace nZVI na obsahu CIU-Eth prakticky neprojevil vůbec. Snížení účinnosti redukce CIU-Eth nulmocným železem v přítomnosti Cr(VI) byla pozorována i při laboratorních zkouškách s makročásticemi nulmocného železa (TUL, 2013)

Aplikací syrovátky došlo ke stimulaci sekvenční biologické reduktivní dechlorace TCE na níže chlorované uhlovodíky:



V první linii monitorovacích vrtů (MV-2, MV-3, MV-4) i ve vrtu MV-1 situovaném proti směru přírodního proudění podzemních vod došlo k poklesu koncentrace TCE až pod mez laboratorní stanovitelnosti (<1 µg/l). Zároveň došlo k nárůstu koncentrací meziproductů rozkladu – cis-DCE a VC. Ty s určitým zpožděním poklesly za pozorovaného nárůstu ethenu a ethanu, viz graf vývoje koncentrace ve vrtu MV-3 na Obr. 43. V posledním kole monitoringu v únoru 2015 byl již pokles sumárních obsahů CIU-Eth v podzemní vodě první linie více jak 90%, viz Obr. 44. Postupná dechlorace je patrná na grafu Obr. 45 vyjadřujícím vývoj **stupně dechlorace**, který je definován vztahem (Sinke et al. 2001):

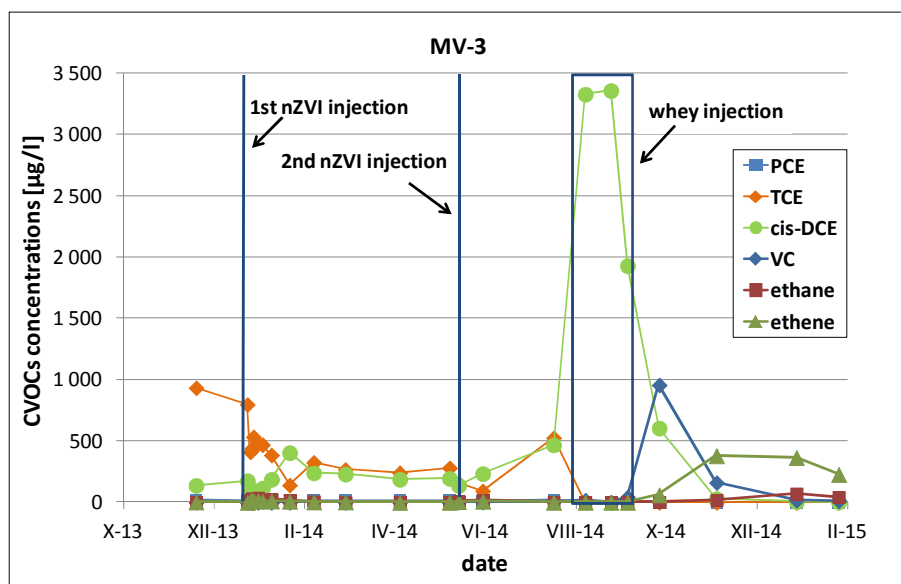
$$\frac{[TCE] + 2[cis - DCE] + 3[VC] + 4[ethen] + 4[ethan]}{4 \times ([PCE] + [TCE] + [cis - DCE] + [VC] + [ethen] + [ethan])} \times 100\%$$

kde (kontaminant) představuje molární koncentraci (mmol/l) jednotlivých kontaminantů .

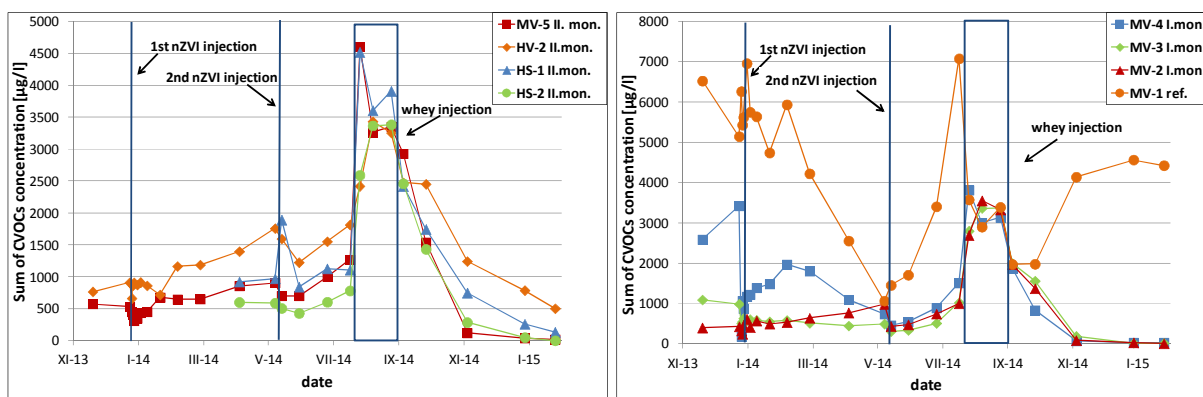
Stupeň dechlorace před první aplikací nZVI činil 26% až 35%, přičemž nejvyšší byl ve vrtu MV-5 na odtokové linii a nejnižší ve vrtu MV-1 na linii nátokové. Přirozená dechlorace CIU-Eth je tedy patrná i na vzdálenosti cca 15 m, což na základě vypočtené filtrační rychlosti (1,5 m/den, viz kap. 4.3.2.1) odpovídá době zdržení podzemní vody cca 10 dní. Po aplikacích nZVI stupeň dechlorace dočasně narostl až na 53% a 56% ve vrtu první monitorovací linie MV-3. Ve vzdálenějším vrtu MV-5 (druhá monitorovací linie) již byla dechlorace vyvolaná injektážemi nZVI výrazně nižší. Aplikace substrátu akcelerovala dechloraci na hodnotu 95% po 106 dní od začátku aplikace substrátu a 99% po 188 dnech, kdy byly v podzemní vodě přítomny prakticky jen nechlorované ethan a ethen. Za zmínku stojí i dočasný nárůst stupně dechlorace v referenčním vrtu MV-1 situovaném proti směru přirozeného proudění podzemních

vod z důvodu šíření substrátu během jeho injektáže i tímto směrem a následný pokles stupně dechlorace vyvolaný nátokem kontaminované podzemní vody.

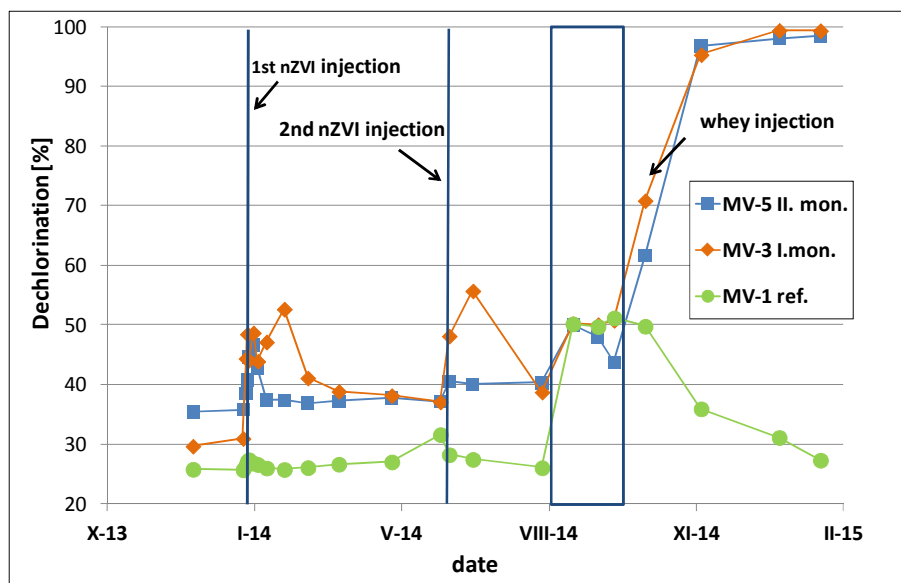
Je tedy zřejmé, že pokles koncentrace CIU-Eth je dominantně výsledkem biologické sekvenční hydrogenolýzy stimulované dodáním substrátu a nikoliv ředěním nebo sorpcí matečného TCE.



Obr. 43: Koncentrace jednotlivých CIU-Eth, ethanu a ethenu v podzemní vodě vrtu MV-3



Obr. 44: Sumární koncentrace CIU-Eth v podzemní vodě

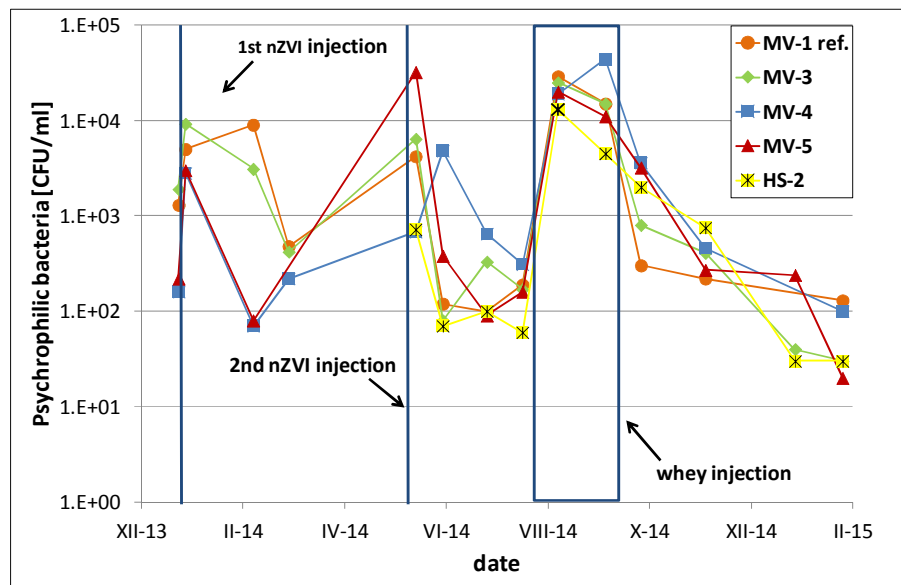


Obr. 45: Stupeň dechlorace CIU-Eth v podzemní vodě

Ve srovnání s kinetikou bioredukce Cr(VI) je rozklad CIU-Eth proces pomalejší, což je dáno tím, že rozklad méně chlorovaných ethenů (DCE a VC) vyžaduje více redukční prostředí a dominantní podíl CIU-Eth je vázán sorpcí na zeminu a postupně se do sanované podzemní vody desorbuje (tedy množství CIU-Eth v podzemní vodě „dotuje“).

5.3.2.8 Účinek kombinované sanační metody na mikrobiální populaci

Ve vzorcích podzemní vody byly v průběhu pilotní zkoušky prováděny v laboratoři společnosti Dekonta kultivační zkoušky pro stanovení přítomnosti psychrofilních bakterií. Vývoj koncentrací psychrofilních bakterií je zaznamenán na následujícím grafu.



Obr. 46: Vývoj koncentrací kultivovatelných psychrofilních bakterií v průběhu pilotního testu

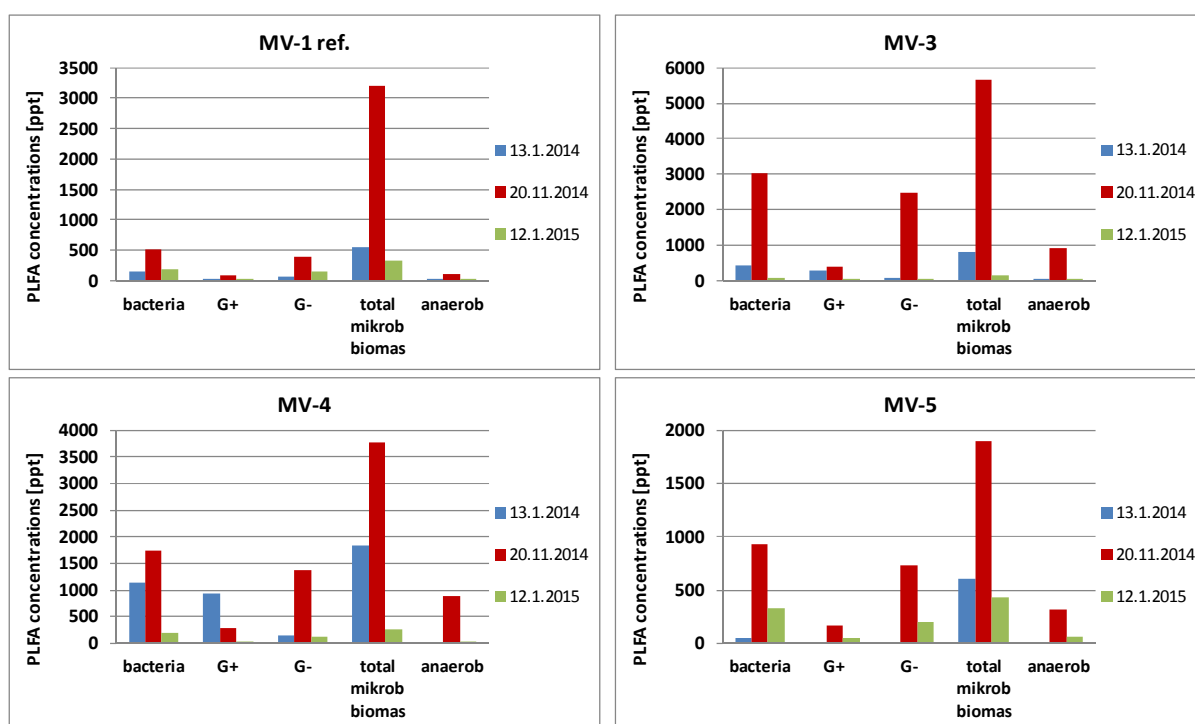
Z průběhu výsledků kultivačních zkoušek je jasně patrné, že aplikace nZVI měly na koncentrace psychrofilních bakterií vyskytujících se v podzemní vodě pozitivní vliv. Vliv aplikace syrovátky byl jednoznačně také pozitivní, když koncentrace psychrofilních bakterií ze všech sledovaných vrtů narostly nad 10⁴ KTJ/ml. Po vyčerpání dodaného substrátu (syrovátky) koncentrace psychrofilních bakterií opět poklesly až na rozsah řádů 10¹ až 10² KTJ/ml, tedy na počty nižší, než před zahájením pokusu. Tento jev souvisí pravděpodobně s přetrvávajícím redukčním prostředím zvodněného horninového prostředí s deficitem kyslíku (psychrofilní bakterie jsou kultivovány v aerobních podmínkách) a s postupným vyčerpáním dodaného substrátu (syrovátky).

5.3.2.9 Analýzy PLFA

V případě PLFA jsou k dispozici výsledky před první injekcí nZVI (13.1.2014), při doznívání biotické fáze (20.11.2014) a na konci celé pilotní zkoušky (12.1.2015). Před první injekcí nZVI bylo nejvyšší mikrobiální oživení (celková mikrobiální biomasa) ve vrtech MV-3 a MV-4, nižší ve vrtech MV-1 a MV-5. Aplikace syrovátky se na mikrobiálním oživení projevila pozitivně především ve vrtech MV-1 a MV-3, kde byl nárůst celkové mikrobiální biomasy několikanásobný. Zřejmý je rovněž nárůst bakterií a anaerobních bakterií převšim ve vrtech první linie MV-3 a MV-4, které jsou nejbližší aplikačním vrtům syrovátky a kde byly zaznamenány nejnižší hodnoty ORP. Nejnižší nárůst osídlení bakteriemi a anaerobními bakteriemi byl zaznamenán v podzemní

vodě vrtu MV-1, situovaném proti proudu od aplikačních vrtů, nicméně částečně také ovlivněným injektovanou syrovátkou.

V závěru pilotní zkoušky byl zaznamenán výrazný pokles celkového mikrobiálního oživení podobně jako na lokalitě Hrádek nad Nisou a to dokonce pod úroveň zjištěnou před zahájením pilotní zkoušky. Možným vysvětlením je inhibice mikroorganismů využívajících již spotřebovaný substrát (syrovátku) a příliš krátká doba na opětovné osídlení původními mikroorganismy, resp. jejich reakce na přetrvávající anoxické prostředí (před zahájením pilotní zkoušky bylo prostředí oxické). Koncentrace PLFA tedy vykázaly obdobný vývoj jako výsledky kultivačních zkoušek psychrofilních mikroorganismů.



Obr. 47: Výsledky stanovení parametrů PLFA ve vodě z vrtů na lokalitě odebrané 13.1.2014 (před zahájením pilotní zkoušky), 20.11.2014 (doznívání biotické fáze) a 12.1.2015 (konec pokusu)

5.3.2.10 Hydrochemické změny vyvolané aplikací substrátu

Z hydrochemického hlediska byly podzemní vody na lokalitě **před zahájením pilotní zkoušky** kombinované technologie klasifikovány většinou jako typ Ca- HCO₃.

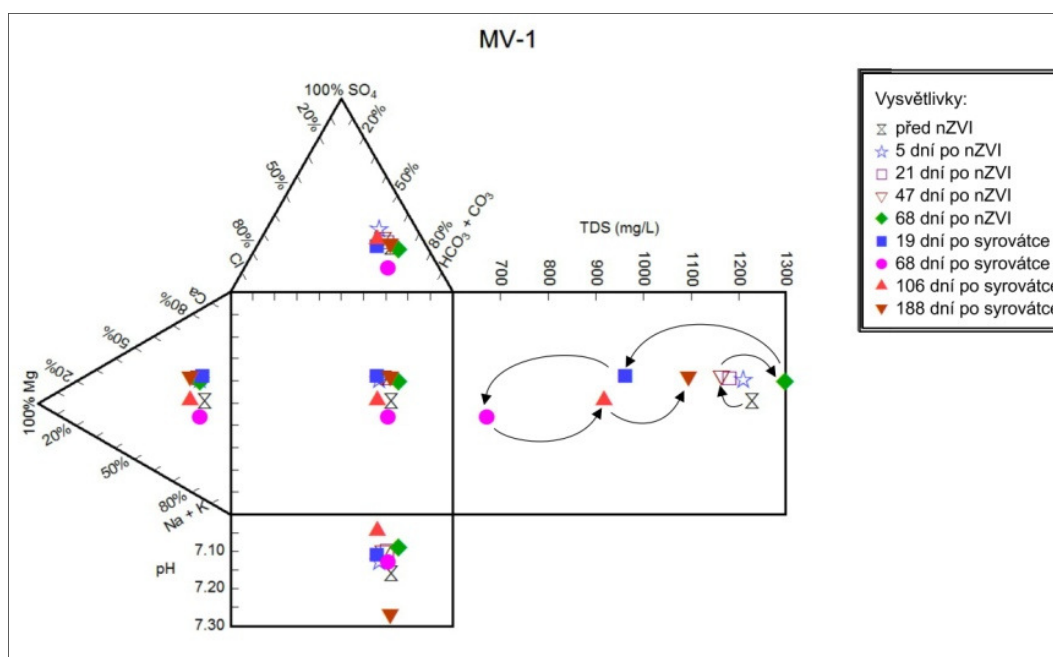
Z hlediska kvantitativního obsahu solí lze podle Alekina (Pitr 1990) podzemní vodu označit jako vodu s vyšší mineralizací (890 až 1160 mg/l) s pH pohybující se v neutrální oblasti (pH 7,1 až 7,2).

Aplikace nZVI v květnu 2014 se v základním chemizmu podzemní vody v pozorovacích vrtech prakticky neprojevila. Mineralizace podzemní vody zůstala na přibližně původní úrovni. V nejbližších pozorovacích vrtech byl pozorován nevýrazný a krátkodobý pokles obsahu hydrogenuhličitanů, pravděpodobně v důsledku vysrážení uhličitanů a mírný nárůst pH na hodnoty 7,3 až 7,5. Hydrochemický typ podzemní vody (Ca-SO₄) se nezměnil.

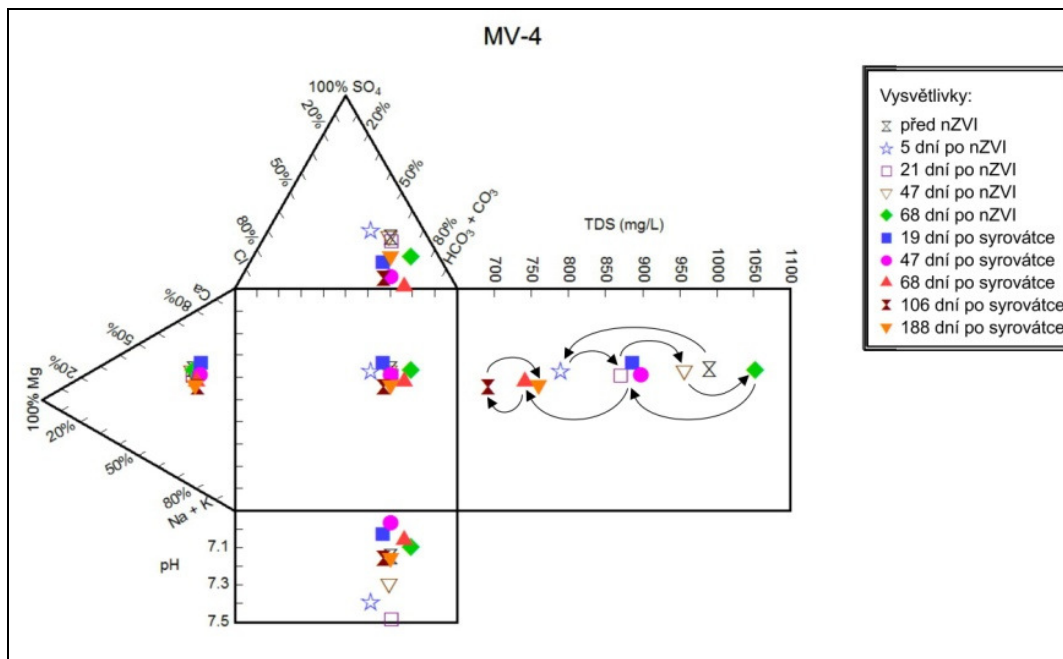
Po aplikaci substrátu došlo ke změnám chemizmu podzemní vody, které jsou typické pro mikrobiální rozklad organické hmoty, tedy k poklesu (vyčerpání) terminálních akceptorů elektronu (TEA), konkrétně síranů nebo k nárůstu již redukovaných TEA – především manganu, v menší míře i železa. Část železa se mohla vysrážet spolu s redukovanou formou síry (sulfan byl v podzemní vodě identifikován) jako FeS nebo FeS₂. Hydrochemický typ zůstal Ca-SO₄. Celková mineralizace výrazně poklesla v podzemní vodě pozorovacích objektů ve směru proudění na 610 až 690 mg/l. V druhé polovině bioredukční fáze pilotní zkoušky došlo k postupnému návratu hydrochemického složení i celkové mineralizace na původní úroveň.

Pokles pH podzemní vody vyvolaný aplikací syrovátky a následnou biochemickou produkcí mastných kyselin byl minimální a to vlivem pufrací schopnosti kolektorových hornin i aplikací malého množství vápenného mléka spolu se syrovátkou.

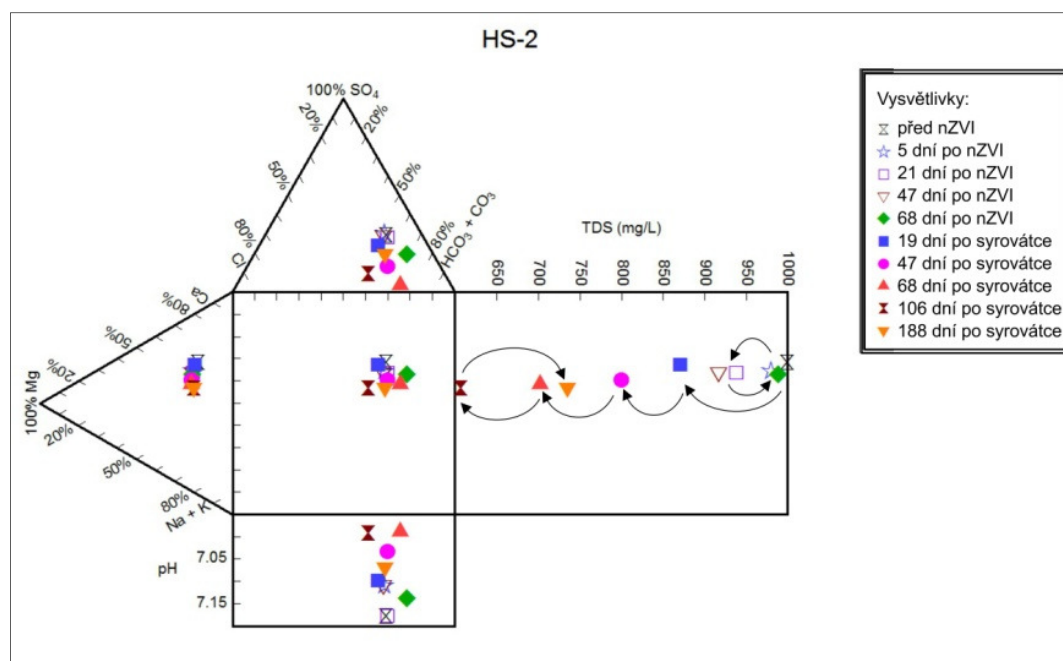
Celkově lze konstatovat, že aplikace nanoželeza ovlivnila základní chemické složení podzemní vody minimálně. Aplikace substrátu vyvolala biogeochemické procesy vedoucí k dočasnému snížení celkové mineralizace. Vývoj hydrochemických vlastností podzemních vod pro vrty MV-1, MV-4 a HS-2 je graficky znázorněn na Durovových diagramech (Obr. 48 – 50).



Obr. 48: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu MV-1



Obr. 49: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu MV-4



Obr. 50: Durovův diagram popisující vývoj hydrochemických vlastností podzemní vody ve vrtu HS-2

6. Souhrn poznatků

Hlavní poznatky ze studia kombinované metody sanace podzemních vod znečištěných hexavalentním chromem lze shrnout takto:

Vsádkové pokusy:

- Testováním substrátu vsádkovými pokusy biotické redukce byla zjištěna nejrychlejší redukce Cr(VI) v případě syrovátky a laktátu, nejpomalejší v případě rostlinného oleje. Snížení počáteční dávky substrátů z TOC 500 mg/l na 100 mg/l nezpůsobilo snížení rychlosti biotické redukce Cr(VI).
- V průběhu vsádkových pokusů byl redukovaný chrom Cr(III) rychle imobilizován a nezůstával v roztoku.
- Bioredukce Cr(VI) testovanými substráty nevyvolala negativní ekotoxický efekt.

Kombinované kolonové zkoušky:

- Kombinovanými kolonovými zkouškami byla zjištěna dobrá účinnost odstranění chromu z vodní fáze nanoželezem (95%), bez negativního účinku na mikroorganismy.
- Navazující biotická fáze kombinované kolonové zkoušky s využitím syrovátky jako substrátu vykázala účinnost odstranění chromu 99%.
- Z výsledků Tessierovy sekvenční extrakce vyplývá, že chrom se v zemině váže především na oxidy Fe a Mn (46% až 52% celkového extrahovatelného množství), jedná se o poměrně stabilní vazbu. Vyšší podíly chromu vázaného na oxidy Fe a Mn byly zjištěny u kolony simulující kombinovanou abio- a bio-redukci ve srovnání s kolonami simulujícími tyto procesy samostatně. Zanedbatelný byl podíl slabé iontově výměnné vazby chromu na horninovou matici.
- Byla vypočtena efektivní redukční kapacita nZVI (ERC) ve výši 156 mg Cr(VI)/g nZVI.
- Byla stanovena přirozená atenuační kapacita testované zeminy ve výši 23,8 mg Cr(VI)/kg.
- Na základě analýz PLFA neměla aplikace nZVI negativní vliv na mikrobiální populaci a její bioredukční aktivitu.

Pilotní zkoušky:

Lokalita Hrádek nad Nisou:

- Použití nZVI v rámci 1. fáze pilotní zkoušky vedlo k rychlému, byť ne trvalému, poklesu koncentrací Cr(VI) s celkově pozitivním dopadem na autochtonní mikroflóru. Tím se vytvořily vhodné podmínky pro 2. fázi – biotickou redukci Cr(VI).
- Aplikací substrátu (syrovátky) během 2. fáze pilotní zkoušky došlo k rozvoji anaerobní a fakultativně anaerobní mikroflóry, která následně redukovala Cr(VI). Účinek biotické redukce byl pozorován i v monitorovacím vrtu situovaném 22 m od aplikačních vrtů 9 měsíců po aplikaci substrátu. V této oblasti o ploše cca 350 m² byly obsahy Cr(VI) v podzemní vodě pod nebo blízko meze laboratorní stanovitelnosti.
- Na základě zhodnocení hydrochemických dat pilotní zkoušky je zřejmé, že dominujícím remediačním procesem 2. fáze byla nepřímá biotická redukce reaktivními formami Fe(II) a/nebo H₂S vznikajícím biotickou redukcí Fe(III), resp. SO₄²⁻ nebo reaktivními minerály obsahujícími tyto redukované prvky (např. FeS nebo FeS₂). Toto tvrzení podporují výsledky 454 pyrosekvenace, kterou byly identifikovány mikroorganismy s dokumentovanou schopností redukovat železo. Tento proces byl amplifikován přítomností biologicky dostupného Fe(III) v důsledku předchozí oxidace nZVI. Během 2. (biotické) fáze tak bylo částečně regenerováno nZVI oxidované během 1. fáze, čímž dochází k synergii obou geofixačních mechanismů.
- Jak aplikace nZVI, tak i substrátu ovlivnila základní chemické složení podzemní vody nevýrazně. V obou případech se jedná o nevýrazný nárůst celkové mineralizace a posun v relativním zastoupení jednotlivých iontů. V případě aplikovaného substrátu tyto změny kulminovaly přibližně 3. měsíc po jeho zásaku a poté je pozorován pozvolný návrat k původnímu složení. Změny v obsazích jednotlivých aniontů (nárůst hydrogenuhličitanů) souvisí s žádoucím rozvojem mikrobiální aktivity stimulovaným dodaným substrátem.

Lokalita C:

- Aplikacemi nZVI došlo k výrazné redukci koncentrace Cr(VI) především v první linii monitorovacích vrtů vzdálené 2 m od inječních sond. V pozorovacích objektech druhé linie vzdálené cca 8 m (HS-1, HS-2, MV-5 a HV-2) již nebyl efekt

nZVI tak patrný, došlo však k celkovému snížení obsahů Cr(VI) v podzemní vodě před zahájením 2. (biotické) fáze pilotní sanace. Nižší efekt nZVI oproti lokalitě Hrádek nad Nisou je pravděpodobně důsledkem menšího množství aplikovaného nZVI (2 aplikace po 20 kg nZVI oproti 1 aplikaci 120 kg nZVI).

- Během 2. (biotické) fáze došlo i přes výrazně nižší obsah TOC v podzemní vodě po nadávkování substrátu ve srovnání s lokalitou Hrádek nad Nisou (46 až 79 mg/l oproti 189 až 367 mg/l) k rychlému poklesu obsahu Cr(VI) v podzemní vodě ve všech monitorovacích vrtech pod mez kvantifikace a pod touto mezí setrvala po zbytek monitorovacího období (188 dní). Na rozdíl od pilotní zkoušky realizované v Hrádku nad Nisou nebyly v takové míře pozorovány zvýšené obsahy Cr_{celk} . Důvodem může být nižší koncentrace dodaného organického substrátu, jehož metabolity mohou vytvářet dočasné rozpustné organické komplexy Cr^{3+} nebo vyšší pH, při kterém se Cr^{3+} snáze fixuje na horninové prostředí.
- Z výsledků prvkové analýzy zeminy metodou SEM-EDS vyplývá, že redukovaný chrom Cr(III) není v horninové matici rovnoměrně dispergován, ale vytváří sraženiny obsahující vysoký obsah Fe (74,6%, resp. 77,3%) a kyslíku (5,5%, resp. 3,5%), což indikuje přítomnost $Cr_xFe_{1-x}(OH)_3$. To koresponduje s výsledky Tessierových sekvenčních extrakčních testů provedených v rámci kolonových zkoušek. Výskyt redukovaného chromu Cr(III) ve formě oxidů/hydroxidů indikují i výsledky XPS.
- Mössbauerovou spektroskopií byly ve vzorku kolektorové zeminy zjištěny valenční stavy železa Fe(0), Fe(II) a Fe(III), přičemž u Fe(II) a části Fe(III) se jedná o fázi „green rust“, o které je známa schopnost redukovat Cr(VI). Z výše uvedených poznatků je zřejmé, že redukce Cr(VI) je výsledkem působení více redukčních činidel, které jsou více či méně produkovány nebo recyklovány procesy iniciovanými studovanou kombinovanou metodou.
- Kombinovaná sanační technologie vykázala velmi dobré výsledky i v případě sanace znečištění CIU-Eth. Pokles koncentrace CIU-Eth po aplikaci nanoželeza nebyl výrazný jako Cr(VI), aplikace substrátu však stimulovala biologickou sekvenční reduktivní dechloraci chlorovaných uhlovodíků (hydrogendehalogenaci) až na nechlorované a netoxické ethen a ethan.

- Z průběhu výsledků kultivačních mikrobiologických zkoušek je jasně patrné, že aplikace nZVI a především substrátu měla pozitivní vliv na koncentrace psychrofilních bakterií vyskytujících se v podzemní vodě. Po vyčerpání dodaného substrátu (syrovátky) koncentrace psychrofilních bakterií opět poklesly. V případě analýz PLFA v podzemní vodě byl po aplikaci substrátu pozorován nárůst celkového mikrobiální osídlení podzemní vody ve srovnání se stavem před zahájením pilotní zkoušky s tím, že tento nárůst je nejmarkantnější v podzemní vodě vrtů situovaných nejbližší místu aplikace organického substrátu. V závěru pilotní zkoušky byl zaznamenán výrazný pokles celkového mikrobiálního oživení podobně jako na lokalitě Hrádek nad Nisou a to dokonce pod úroveň zjištěnou před zahájením pilotní zkoušky. Vysvětlení je možné hledat ve změnách konsorcia mikroorganismů vyvolaných aplikací substrátu a jeho následným vyčerpáním a s tím souvisejících dobíhajícími změnách oxidačně-redukčních poměrů.
- Aplikace nZVI ovlivnila základní chemické složení podzemní vody nevýrazně. Po aplikaci substrátu došlo ke změnám, které souvisí s vyvolanou intenzifikací mikrobiálních procesů - tedy k vyčerpání rozpuštěných terminálních akceptorů elektronu (především síranu) a nárůstu koncentrace některých rozpuštěných kovů (manganu, v menší míře železa) v důsledku jejich mikrobiální redukce. To generelně způsobilo pokles celkové mineralizace podzemních vod. Tyto změny lze na základě výsledků monitoringu v závěru zkoušky považovat za dočasné.

Celkové shrnutí výzkumu a ověření sanační technologie:

- Pilotními zkouškami byla prokázána vysoká účinnost posloupné kombinace abiotické redukce Cr(VI) nanoželezem a biologicky zprostředkovaná redukce Cr(VI) z pohledu trvalého odstranění Cr(VI) z podzemních vod.
- Laboratorními a pilotními zkouškami byly zjištěny provozní parametry (redukční kapacita nZVI, způsob dávkování nZVI, množství substrátu a rychlost jeho spotřeby), které jsou využitelné při koncepčních návrzích plnoprovozních aplikací sanační technologie.
- Pilotními zkouškami byl identifikován vzájemný účinek obou procesů, kdy aktivitou mikrobiálního společenství stimulovaná dodaným substrátem redukuje spotřebované nZVI z Fe(III) na reaktivní formy Fe(II), které jsou schopné redukovat Cr(VI) i po vyčerpání substrátu. Na lokalitě C byl během 2. (biotické) fáze detekován sulfan, který rovněž na Cr(VI) působí jako redukční činidlo. Během biotické fáze se tedy uplatňují nejen přímé (enzymatické) bioredukční procesy, ale pravděpodobně dominantní měrou i nepřímé související s biologickou produkcí reaktivních forem Fe a S.
- Vyvíjenou technologii lze použít i v případě směsné formy znečištění podzemních vod hexavalentním chromem a chlorovanými etheny, která je v provozech povrchových úprav kovů poměrně častá. Pokles koncentrace ClU-Eth po aplikaci nanoželeza nebyl tak výrazný jako v případě Cr(VI), aplikace substrátu však stimulovala biologickou sekvenční reduktivní dechloraci chlorovaných uhlovodíků (hydrogendehalogenaci) až na nechlorované a netoxické ethen a ethan.
- Vyvíjená technologie je environmentálně přijatelnou sanační metodou. Nespočívá ve vnosu závadných látek do horninového prostředí a nezpůsobuje dlouhodobé negativní změny v základním hydrochemickém složení podzemních vod nebo v jejich mikrobiálním oživení.

7. Závěr

Dizertační práce se zabývá výzkumem a ověřením použitelnosti kombinace dvou procesů – abiotické redukce nanoželezem (nZVI) a biotické redukce podpořené aplikací organického substrátu, k sanaci podzemních vod znečištěných šestimocným chromem Cr(VI). Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že kombinovanou metodou bylo dosaženo vysoké účinnosti odstranění Cr(VI) z podzemních vod, při nízké a jen krátkodobé mobilitě vzniklého Cr(III). Ověřeno bylo množství a dávkování redukčního činidla a substrátu, jejich migrační schopnosti a životnost. Bylo zjištěno, že kombinací obou metod dochází ke vzájemnému účinku obou geofixačních mechanismů. Aplikací nZVI dochází ke snížení celkové ekotoxicity sanovaného prostředí. nZVI oxidované během abiotické fáze na Fe(III) je aktivitou mikrobiálního společenství stimulovanou dodaným substrátem redukováno na reaktivní formy Fe(II), které jsou schopné redukovat Cr(VI) i po vyčerpání substrátu. Během biotické fáze se mikrobiálními procesy vytváří i sulfan, který rovněž na Cr(VI) působí jako redukční činidlo. Během této fáze se tedy uplatňují nejen přímé (enzymatické) bioredukční procesy, ale pravděpodobně dominantní měrou i nepřímé související s biologickou produkcí reaktivních forem Fe a S.

Vyvíjenou technologii lze použít i v případě směsné formy znečištění podzemních vod hexavalentním chromem a chlorovanými etheny, která je v provozech povrchových úprav kovů poměrně častá.

Aplikace nZVI i substrátu ovlivnily základní chemické složení podzemní vody nevýrazně s pozorovaným pozvolným návratem k původnímu složení.

Výše uvedené poznatky byly autorem prezentovány na tuzemských a zahraničních konferencích a publikovány v odborných člancích.

Závěrem lze na základě dosažených výsledků konstatovat, že tato metoda je účinnou a ekologicky šetrnou sanační metodou, kterou lze doporučit pro čištění podzemních vod znečištěných tímto kovem. Oproti v současnosti používaným technologiím on-site nebo in-situ chemické redukce sloučeninami síry má výhodu především v nižších nákladech a v absenci vnášení značného množství cizorodých látek do horninového prostředí, které mohou na dlouhou dobu ovlivnit chemismus a biotu podzemní vody.

Další výzkum v této oblasti by měl být zaměřen na zlepšení migračních vlastností nZVI a na vývoj biogeochemických metod cílených na tvorbu reaktivních minerálů.

Seznam použité literatury:

Ackerley, D.F., Gonzales, C.F., Keyhan, M., Blake II, R., Matin, A., 2004. Mechanism of chromate reduction by *E. coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology* 6, 851-860.

Alidokht, R., Khataee, A.R., Reyhanitabar, A., 2011. Reductive removal of Cr(VI) by starch-stabilized Fe₀ nanoparticles in aqueous solution, *Desalination* 270. 105–110.

Allard, B., 1995. Groundwater, in Aalbu, B. a Steinnes, E., Eds., Trace elements in natural waters. CRC Press. Boca raton. FL, 151-176.

Amonette, J.E., Rai, D., 1990. Identification of noncrystalline (Fe, Cr)(OH)₃ by infrared spectroscopy. *Clays clay Min.* 38 (2), 129-136.

Andersen, C., Hughes, C., Koronakis, V., 2001. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 522-527.

Assfalg, M., Bertini, I., Bruschi, M., Michel, C., Turano, P., 2002. The metal reductase nativity od some multiheme cytochromes c: NMR structural characterization of the reduction of chromium(VI) to chromium(III) by cytochrome C7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9750-9754.

Ballatori, N., 2002. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ. Health Perspect.* 110, 689-694.

Bale, S.J., Goodman, K., Rochelle, P.A., Marchesi, J.R., Fry, J.C., Weightman, A.J., Parkes, R.J., 1997. *Desulfovibrio profundus* sp. nov. a novel barophilic sulfatereducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int J Syst Bacteriol* 47, 515-521.

Barlett, R., James, B., 1979. Behavior of chromium in soils: III. Oxidation. *J. Environ. Qual.* 8, 31-35.

Barrera-Díaz, C.E., Lugo-Lugo, V., Bilyeu, B., 2012. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *J. Hazmat.* 223-224, 1-12.

Beattie, J.K., Haight, G.P., 1972. Chromium (VI) oxidations of inorganic substrates. In: Inorganic Reaction Mechanism, Part II (J.O. Edwards, Ed.). John Wiley and Sons, New York, pp. 98-145.

Bethke, C., 2000. The Geochemist's Workbench software package. University of Illinois, Urbana-Champaign.

Brown, R.A., Thomas, A., Dijkshoorn, P., 2008. The reduction of chromium VI, critical questions. Poster. 10th International UFZ-Deltares/TNO Conference on Soil-Water Systems in cooperation with Provincia di Milano, 3-6 June 2008

Buerge I.J., Hug S.J., 1997. Kinetics and pH Dependence of Chromium(VI) Reduction by Iron(II). Environ. Sci. Technol. 31, (5), 1997, 1426-1432.

Coates, J.D., Ellis, D.J., Gaw, C.V., Lovley, D.R., 1999. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. Int J Syst Bacteriol 49, 1615-1622.

Cwiertny, D.M., Scherer, M.M., 2010. Abiotic processes affecting the remediation of chlorinated solvents. In Stoo, H.F., Ward, C.H., eds. *In Situ Remediation of Chlorinated Solvent Plumes*. Springer, New York, NY, USA pp 69-108.

Černík M. a kolektiv (2010): Chemický podporované in situ sanační technologie. Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN 189-213. 978-80-7080-767-5.

Dogan, N.M., Kantar, C., Gulcan, S., Dodge, C.J., Yilmaz, B.C., Mamanci, M.A., Chromium(VI) Bioremoval by *Pseudomonas* Bacteria: Role of Microbial Exudates for Natural Attenuation and Biotreatment of Cr(VI) Contamination. Environ. Sci. Technol. 45, 2278-2285.

Early, L.E., Rai, D., 1987. Kinetics of Chromium(III) Oxidation to Chromium(VI) by Reaction with Manganese Dioxides. Environmental Science and Technology 21, 1187 – 1193.

Early, L.E., Rai, D., 1988. Chromate removal from aqueous solutions by reduction with ferrous ion. Environ. Sci. Technol. 22, 972-977.

Ehrlich, H.L., 2002. Geomicrobiology, 4th ed. Marcel Dekker, New York, pp. 768.

Fendorf, S.E., Li, G., 1996. Kinetics of chromate reduction by ferrous iron. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1614–1617.

Fredrickson, J.K., Kostandarithes, H.M., Li, S.W., Plymale, A.E., Daly, M.J., 2000. Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2006-2011.

Ellis, A.S., Johnson, T.M., Bullen, T.D. 2002: Cr isotopes and the fate of hexavalent chromium in the environment. *Science*, 295, 2060-2062.

Ellis, A.S., Johnson, T.M., Bullen, T.D. 2004: Chromium stable isotope fractionation during abiotic reduction of hexavalent chromium. *Eos Trans. AGU*, 85, (47), Fall Meet Suppl. Abstract V51A-0519.

Ericksen, G.E., 1983. The Chilean nitrate deposits. *Am. Sci.* 71:366-374.

Francis, C.A., Obraztsova, A.Y., Tebo, B.M., 2000. Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantonea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 543-548.

Franco, D.V., Da Silva, L. M., Jardim, W.F., 2009. Reduction of Hexavalent Chromium in Soil and Ground Water Using Zero-Valent Iron Under Batch and Semi-Batch Conditions, *Water Air Soil Pollut* 197, 49–60.

Ganguli, A., Tripathi, A.K., 2002. Bioremediation of Toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 416-420.

Geng, B., Jin, Z., Li, T., 2009. Preparation of chitosan-stabilized Fe₀ nanoparticles for removal of hexavalent chromium in water, *Science of the Total Environment* 407, 4994–5000.

Gheju, M., 2011. Hexavalent Chromium Reduction with Zero-Valent Iron (ZVI) in Aquatic Systems *Water Air Soil Poll* 222, 103-148.

Grieger, K.D., Fjorboge, A., Hartmann, N.B., 2010. Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: Risk mitigation or trade-off?. *Journal of Contaminant Hydrology* 118, 165–183.

Guha, H., Jayachandran, K., Maurrasse, F., 2001. Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella alga* under different growth conditions, Environmental Pollution 115, 209-218.

Chen, J., Xiu, Z., Lowry G.W., 2011. Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron, Water Research 45, 1995-2001.

Cheung, K.H., Gu, J-D., 2003. Reduction of chromate (CrO_4^{2-}) by an enrichment consortium and an isolate of marine sulfate-reducing bacteria. Chemosphere 52, 1523-1529.

Cheung, K.H., Lai, H.Y, Gu, J-D., 2006. Membrane-associated hexavalent chromium reductase of *Bacillus megaterium* TKW3 with induced expression. Journal of microbiology and Biotechnology 16, 855-862.

Cheung, K.H., Gu, J-D., 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. International Biodeterioration & Biodegradation 59, 8-15.

Christophoridis C., Fytianos K., Zouboulis A., 2009. Parameters Affecting the Removal of Cr(VI) from Water Using Zero Valent Iron, Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Science and Technology, Chania, Crete, 3 – 5 September 2009.

Icopini, G.A., Long, D.T., 2002. Speciation of aqueous chromium by use of solid-phase extractions in the field. Environ. Sci. Technol. 36, 2994-2999.

James, B.R., Barlett, R.J., 1983. Behavior of chromium in soils. V. fate of organically complexed Cr(III) added to soil. J Environ Qual 12, 169-172.

Jardine, P.M., Fendorf, S.E., Mayes, M.A., Larsen, I.L., Brooks, S.C., Bailey, W.B., 1999. Fate and transport of hexavalent chromium in undisturbed heterogeneous soil. Environ Sci Technol 33, 2939-2944.

Jetel, J. (1973): Logický systém pojmů – základní podmínka formalizace a matematizace v hydrogeologii. Geol. Průzk. 15, 1, 13-17.

Kashefi, K., Lovley, D.R., 2000. Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. Applied and Environmental Microbiology 66, 1050-1056.

- Keane, E., 2009. Fate, Transport, and Toxicity of Nanoscale Zero-Valent Iron (nZVI) Used During Superfund Remediation, U.S.EPA. August 2009.
- Kim, C., Dixon, J.B., Chusuei, C.C., Deng, Y., 2002. Oxidation of Chromium(III) to (VI) by Manganese Oxides, *J. Am. Soil Sci. Soc.* 66, 306-315.
- Kim, C., Zhou, Q., Geng, B., Thorton, E.C., Xu, H., 2001. Chromium (VI) reduction by hydrogen sulfide in aqueous media: stoichiometry and kinetics. *Environ Sci Technol* 35, 2219-2225.
- Laverman, A.M., Blum, J.S., Schaefer, J.K., Phillips, E.J.P., Lovley, D.R., Oremland, R.S., 1995. Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl Environ Microbiol* 1995, 3556–3561.
- Lee, C., Kim, J.Y., Lee, W.I., Nelson, K.L., Yoon, J., et al., 2008. Bactericidal effect zerovalent iron nano-scale particles on *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4927–4933.
- Lee, W., Batchelor, B., 2002. Abiotic reductive dechlorination of chlorinated ethylenes by iron-bearing soil minerals. 2. green rust. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5348-5354.
- Lee, W., Batchelor, B., 2003. Reductive capacity of natural reductants. *Environ. Sci. Technol.* 37, 535-541.
- Li, H.J., Peng, J.J., 2011. Phylogenetic diversity of dissimilatory Fe (III)-reducing bacteria in paddy soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* 10, 2705-10.
- Lonergan, D.J., Jenter, H.L., Coates, J.D., Phillips, E.J., Schmidt, T.M., Lovley, D.R., 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J Bacteriol* 178, 2402-2408.
- Lovera, S., Bonet, R, Simon-Pujol, M.D., Congegado, F., 1993. Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916, *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3516-3518.
- Lovley, D.R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology* 47, 263-290.

Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Goodwin, S., 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archive of Microbiology* 159, 336-344.

Lovley, D.R., Holmes, D.E., Nevin, K.P., 2004. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Adv Microb Physiol* 49, 219-286.

Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1994. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its C3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 726-728.

McLean, J., Beveridge, T.J., 2001. Chromate reduction by a *Pseudomonas* isolated from a site contaminated with chromate copper arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1076-1084.

Middleton, S.S., Latmani, R.B., Mackey, M.R., Ellisman, M.H., Tebo, B.M., Criddle, C.S., 2003. Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 627-637.

Michel, C., Brugna, M., Aubert, C., Bernadac, A., Bruschi, M., 2001. Enzymatic reduction of chromate comparative studies using sulfate-reducing bacteria. *Applied Microbiology and Technology* 55, 95-100.

Moore, J.W., Ramamoorthy, S., 1984. Chromium. In: *Heavy Metals in Natural Waters*. Springer-Verlag, New York, pp. 58-76.

Motzer, W., 2005. Chemistry, geochemistry, and geology of chromium and chromium compounds. In: *Chromium(VI) Handbook*. Eds. Jacobs, J.A., Guertin, J., Avakian, C. CRC Press, Boca Raton

Myers, C.R., Carstens, B.P., Antholine, W.E., Myers, J.M., 2000. Chromium (VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of applied Microbiology* 88, 98-106.

Niu, S., Liu, Y., Xu, X., Lou, Z., 2005. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by iron nanoparticles. *J Zhejiang University SCIENCE.* 10, 1022-1027.

Nriagu, J., Nieboer, E., (EDs.) 1988. Chromium in the Natural and Human Environments, Advances in Environmental Science and Technology (Book 20) Series; New York: Wiley-Interscience, 1988

Němeček, J., Lhotský, O., Cajthaml, T., 2014. Nanoscale zero-valent iron application for *in situ* reduction of hexavalent chromium and its effects on indigenous microorganism populations Sci Total Environ 485, 739-747.

Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N., Inamori, Y., 2006. Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. Microb Ecol 52, 253-266.

Palmer, C.D., Wittbrodt, P.R., 1991. Processes Affecting the Remediation of Chromium-Contaminated Sites, Environmental Health Perspectives 92, 25-40.

Palmer, C.D., Puls, W., 1994. Natural Attenuation of Hexavalent Chromium in Groundwater and Soils. EPA Ground Water Issue. EPA/540/5-94/505.

Pattanapitpaisal, P. Brown, N.L., Macaskie, L.E., 2001. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. Applied Microbiology and Biotechnology 57, 257-261.

Paya Perez, A.B., Gotz, L., Kephelopoulos, S.D., a Bignoli, G., 1988. Sorption of chromium species on soil, in Heavy Metals in the Hydrocycle, Astruz, M., and Lester, J.N., Eds., Selper. London, 59-66.

Pettine, M., Millero, F.J., Passino, R., 1994. Reduction of chromium(VI) with hydrogen-sulfide media. Mar. Chem. 46, 335-344.

Pitr, P., 1990. Hydrochemie. SNTL. Praha.

Ponder, H. M., Darab, J.G., Mallouk, T.M., 2000. Remediation of Cr(VI) and Pb(II) Aqueous Solutions Using Supported, Nanoscale Zero-valent Iron, Environ. Sci. Technol. 34, 2564-2569.

Priester, J.H., Olson, S.G., Webb, S.M., Neu, M.P. Hersman, L.E., Holden, P.S., 2006. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1988-1996.

Puzon, G.J., Petersen, J.N., Roberts, A.G., Kramer, D.M, Xun, L.A., 2002. A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III) – NAD⁺ complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 76-81.

Rai, D., Zachara, J.M., Schwab, A.P., Schmidt, R.L., Girvin, D.C., and Rogers, J.E., 1984. Chemical attenuation rates, coefficients and constants in leachate migration, Vol. 1, A critical review, Final Report Electric Power Research Institute (EPRI) EA EA-3356, EPRI, Palo Alto, CA.

Rai, D., Zachara, J.M., Early, L.E., Girvin, D.C., Moore, D.A., Resch, C.T., Sass, B.M. and Schmidt, R.L., 1986. Geochemical behaviour of chromium species, Interim Report Electric Power Research Institute (EPRI) EA EA-4544, EPRI, Palo Alto, CA.

Rai, D., Sass, B.M., Moore, D.A., 1987: Chromium (III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide. *Inorg. Chem.* 26, 345-349.

Rahmani, A.R., Samadi, M.T., Noroozi, R., 2011. Hexavalent Chromium Removal from Aqueous Solutions by Adsorption onto Synthetic Nano Size ZeroValent Iron (nZVI), *World Academy of Science, Engineering and Technology* 74.

Robertson, W.J., Bowman, J.P., Franzmann, P.D., Mee, B.J. 2001. *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 51, 133-140.

Romanenko, V.I., Korenkov, V.N., 1977. A pure culture of bacteria utilizing chromates and bichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46, 414-417.

Saha, R., Nandi, R., Saha, B., 2011. Sources and toxicity of hexavalent chromium. *J. Coord. Chem.* 64, 1782-1806

Sass, B.M., Rai, D., 1987. Solubility of amorphous chromium(III)-iron(III) hydroxide solid solutions. *Inorg. Chem.* 26, 2228-2232.

Sedlak, D.L., and Chan, P.G. 1997. Reduction of hexavalent chromium by ferrous iron. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61(11), 2185-2192.

Shen, H., Wang, Y., 1993. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3771-3777.

Schroeder, D.C., Lee, G.F., 1975. Potential Transformations of Chromium in Natural Waters. *Water, Air, Soil Pollution*, 4, 355-365.

Sinke A.J.C., Heimovaara, T.J., Tonnaer, H., a Van Veen, J.H. (2001): Simple Natural Attenuation System – SINAS demo software. TNO Institute of Environmental Sciences, Energy Research and Process Innovation in collaboration with IWACO and TAUW. TNO-MEP, Apeldoorn, The Netherlands

Somasundaram, V., Philip, L., Bhallamudi, S.M., 2011. Laboratory scale column studies on transport and biotransformation of Cr(VI) through porous media in presence of CRB, SRB and IRB. *Chem. Eng. J.* 171, 572–581.

Takeo, N., 2005. Atlas of Eh-pH diagrams. Intercomparison of thermodynamic databases. Geological Survey of Japan Open File Report No. 219, May 2005.

Tebo, B.M., Obratsova, A.Y., 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology letters* 162, 193-198.

Tessier, A., Campbell, P.G.C., a Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51. 844.

Tucker, M.D., Barton, L.L., Thomson, B.M., 1998. Reduction of cr, Mo, Se and U by *Desulfovibrio desulfuricans* immobilized in polyacrylamide gels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20, 13-19.

US EPA, 1980. Ambient water quality criteria for chromium, EPA 440/5-80-035, 1980, PC31

US EPA, 1998. Toxicological review of trivalent chromium. United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1998. Available online at < <http://www.epa.gov/iris>>.

Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V. a Fernandez, L.A., 2000. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nature Biotechnology* 18, 661-665.

Wang, Q., Qian, H., Yueping, Y., Zhang, Z., Naman, C., Xu, X., 2010: Reduction of hexavalent chromium by carboxymethyl cellulose-stabilized zero-valent iron nanoparticles, *Journal of Contaminant Hydrology* 114, 35–42.

- Wang, Y.-T., Shen, H., 1995. Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 159-163.
- Watlington, K., 2005. Emerging Nanotechnologies for Site Remediation and Wastewater Treatment, North Carolina State University. Prepared for U.S. EPA.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 752-764.
- Wiberg, K.B., 1965. Oxidation by chromic acid and chromyl compounds. In: *Oxidation in Organic Chemistry* (K.B. Wiberg, Ed.) Academic Press, New York, pp. 69-185.
- Wielinga, B., Mizuba, M.M., Hansel, C.M., Fendorf, S., 2001. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 35, 522-527.
- Williams, A.G., B., Scherer, M., M., 2000. Kinetics of chromate reduction by carbonate green rust. Hering, J., Schnoor, J.L., Eds. 220th ACS National Meeting. American Chemical Society. Washington, DC, 2000, 666-669
- Wu, J., Zhang, J., Tong, Y., Xu, X., 2009. Chromium (VI) reduction in aqueous solutions by Fe₃O₄-stabilized Fe₀ nanoparticles, *Journal of Hazardous Materials* 172, 1640-1645
- Xu, Y., Zhao, D., 2007. Reductive immobilization of chromate in water and soil using stabilized iron nanoparticles. *Water Reserach* 41, 2101 - 2108.
- Yoon, I-H., Bang, S., Chang, J-S., 2011. Effects of pH and dissolved oxygen on Cr(VI) removal in Fe(0)/H₂O systems. *Journal of Hazardous Materials* 186, 855-862.
- Zachara, J.M., Girvin, D.C., Schmidt, R.L., a Resch, C.T., 1987: Chromate adsorption on amorphous iron oxyhydroxide in the presence of major groundwater ions. *Environ. Sci. Technol.* 21: 589-594.
- Zhang, W-X., 2003. Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview, *Journal of Nanoparticle Research* 5, 323-332.

Seznam prací disertanta:

Příspěvky v odborných časopisech:

Němeček, J., Lhotský, O., Cajthaml, T., 2013. Nanoscale zero-valent iron application for in situ reduction of hexavalent chromium and its effect on indigenous populations. *Sci. Total Environ* 485-486, 739-747. IF=3,163.

Němeček, J., Pokorný, O., Lacinová, L., Černík, M., Masopustová, Z., Lhotský, O., Filipová, A., Cajthaml, T., 2015. Combined abiotic and biotic in-situ reduction of hexavalent chromium in groundwater using nZVI and whey: a remedial pilot test. (podáno k recenzi).

Innemanová, P., Velebová, R., Filipová, A., Čvančarová, M., Pokorný, P., Němeček, J., Cajthaml, T., 2015. Anaerobic in-situ biodegradation of TNT using whey as an electron donor: a case study. *New Biotechnology*, In Press, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.nbt.2015.03.014>. IF=2,106

Wimmerová L., Němeček, J., Žebrák, R., 2008. Využití vedlejších produktů z potravinářské výroby při sanaci starých ekologických zátěží. In: *Studia OECOLOGICA*, ročník II, číslo 2/2008, ISSN 1802-212X, ÚJEP Ústí nad Labem.

Vesela, L., Nemecek, J., Siglova, M., Kubal, M., 2006. The biofiltration permeable reactive barrier: Practical experience from Synthesia. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58, 224-230.

Kapitoly v knize:

Černík M. a kolektiv (2010): *Chemicky podporované in situ sanační technologie*. Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN 189-213. 978-80-7080-767-5.

Příspěvky na konferencích:

Nemecek, J., Pokorny, P., Lhotsky, O., Knytl, V., Najmanova, P., Steinova, J., Cernik, M., Cajthaml, T. 2015. Combined Nano-Biotechnology for In-Situ Remediation of Mixed Contamination of Groundwater by Hexavalent Chromium and Chlorinated

Solvents. Přijato k ústní prezentaci na konferenci AquaConSoil, June 9-12, 2015, Kodaň, Dánsko.

Steinova, J., Nemecek, J., Lhotsky, O., Sevcu A., 2015. Effect of abio- and bio-reductive treatment on dechlorinating bacteria at site contaminated by Cr(VI) and chlorinated aliphatic hydrocarbons (CAH). Conference AquaConSoil (poster section), June 9-12, 2015, Kodaň, Dánsko.

Němeček, J., Lacinová, L., Černík, M., Lhotský, O., Cajthaml, T., 2015. Nanobiotechnology for In Situ Remediation of Hexavalent Chromium in Groundwater. Přijato k ústní prezentaci na Third International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, May 18-21, 2015, Miami, Florida, USA.

Němeček, J., Lacinová, L., Černík, M., Lhotský, O., Cajthaml, T., 2014. Combined Nanobiotechnology for In Situ Remediation of Hexavalent Chromium in Groundwater (poster section). 10th International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, May 23-26, 2014, Monterey, California, USA.

Kozubek P., Němeček J., Kosinová E., Knytl V. 2014. Použití kombinované aplikace surfaktantů a chemické oxidace k sanaci lokality kontaminované chlorovanými uhlovodíky. Sborník příspěvků XIV. hydrogeologického kongresu: Průzkum, využívání a ochrana podzemní vody: nové úkoly a výzvy (Datel V., Hauerová J. – editoři), str. 101, ISBN 978-80-903635-4-0, Liberec, Česká republika.

Kozubek, P., Němeček, J., Kosinová, E., 2014. Využití surfaktantu k intenzifikaci sanace horninového prostředí kontaminovaného chlorovanými uhlovodíky – výsledky pilotního odzkoušení. Sborník konference Sanační technologie XVII, 21.-23. května 2014 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), str. 36-39, ISBN 978-80-86832-81-4, Třeboň, Česká republika.

Němeček, J., Lacinová, L., Parma, P., Černík, M., Lhotský, O., Cajthaml, T., 2014. Kombinované technologie nano-bio pro sanaci podzemních vod znečištěných Cr(VI). Sborník konference Odpadové fórum 2014, 23.-25. dubna 2014, ISBN 978-80-85990-25-6, Hustopeče, Česká republika.

Kosinová, E., Knytl, V., Němeček, J., Kozubek, P., 2014. Pilotní zkouška intenzifikace sanace podzemních vod znečištěných chlorovanými uhlovodíky aplikací surfaktantu. Sborník konference Odpadové fórum 2014, 23.-25. dubna 2014, ISBN 978-80-85990-25-6, Hustopeče, Česká republika.

Němeček, J., Pokorný, P., 2013. Biologická reduktivní dechlorace chlorovaných ethenů s využitím rostlinného oleje jako organického substrátu – pilotní ověření. Sborník konference Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi VI, 16.-17. října 2013, (Halousková O. – editor), str. 84-90, ISBN 978-80-86832-73-9, Praha, Česká republika.

Němeček, J., Pokorný, P., Lacinová, L., Parma, P., Lhotský, O., 2013. Pilotní odzkoušení nanoželeza k sanaci znečištění chrómem. Sborník konference Sanační technologie XVI, 21.-23. května 2013 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), str. 91-95, ISBN 978-80-86832-72, Uherské Hradiště, Česká republika.

Masopustová, Z., Lacinová, L., Němeček, J., Cádrová, L., 2013.: Využití kolonových testů pro sledování abioticko-biologického odbourávání chrómu. Sborník konference Sanační technologie XVI, 21.-23. května 2013 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), str. 136-138, ISBN 978-80-86832-72, Uherské Hradiště, Česká republika.

Velebová, R., Pokorný, P., Němeček, J., 2013. Biologická in situ redukce trinitrotoluenu a dalších nitroaromatických látek. Sborník konference Sanační technologie XVI, 21.-23. května 2013 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), str. 49-56, ISBN 978-80-86832-72, Uherské Hradiště, Česká republika.

Nemecek, J., Pokorny, P., Lacinova, L., Parma, P., Lhotsky, O., 2013. Combined Nano-Bio Technology for Remediation of Contamination by Hexavalent Chromium (poster presentation). AquaConSoil 2013, Barcelona, Spain.

Lhotsky, O., Nemecek, J., Cajthaml, T., 2013. Combined Nano-Bio Technology for Remediation of Contamination by Hexavalent Chromium – Observed Effects of In-Situ Nano ZVI Application on Population of Indigenous Microorganisms. AquaConSoil 2013, Barcelona, Spain.

Nemecek, J., Pokorny, P., Lacinova, L., Parma, P., Lhotsky, O., 2012. NANO-BIO-REM: Combined Technology of Contamination by Hexavalent Chromium. Abstracts of

International Conference CSME-2012/SARCLE-2012, October 22-24, 2012, p. 53, Nancy, France.

Pokorny, P., Nemecek, J., Velebova, R., 2012. Biodegradation of Explosives: Field Pilot-Scale Application. Abstracts of International Conference CSME-2012/SARCLE-2012, October 22-24, 2012, p. 25, Nancy, France.

Pokorny, P., Nemecek, J., Velebova, R., 2012. Biodegradation of Explosives: From the Laboratory Tests to the Field Pilot-Scale Application (Poster Presentation). Remediation Technologies and their Integration in Water Management Symposium. Barcelona, September 25-26, 2012, Spain.

Němeček, J., Pokorný, P., Lacinová, L., Parma, P., Lhotský, O., 2012. Nano-Bio-Rem kombinovaná sanační technologie k sanaci znečištění chrómem. Sborník konference Sanační technologie XV, 22.-24. května 2012 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), str. 26-31, ISBN 978-80-86832-66-1, Pardubice, Česká republika.

Němeček, J., Šerhant, P., Švanda, J., Kamenický, J., 2011. TOOLBOX – softwarový nástroj pro optimalizaci sanace horninového prostředí. Sborník konference Sanační technologie XIV, 24.-26. května 2011 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), str. 32-39, ISBN 978-80-86832-60-9, Uherské Hradiště, Česká republika.

Němeček, J., Pokorný P., Váňa J., Mueller J., 2009. Pilotní odzkoušení metody in-situ integrované biologické a chemické redukce EHCTm na lokalitě OHIS v Makedonii. Sborník konference Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi II, 7.-8. září 2009 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), ISBN 978-80-86832-45-6, Žďár nad Sázavou, Česká republika.

Wimmerová, L., Němeček, J., 2009. Podporovaná přirozená atenuace a vedlejší produkty z potravinářského průmyslu. WASTE FORUM 2009, 1, str. 30 – 41.

Němeček, J., Wimmerová, L., 2009. Poloprovozní odzkoušení metody podporované reduktivní dechlorace s využitím syrovátky jako fermentačního substrátu. Sborník konference Sanační technologie XII, 19.-21. května 2009 (Bukhart J., Halouskova O. – editoři), str. 153-158, ISBN 978-80-86832-44-9, Uherské Hradiště, Česká republika.

Němeček, J., 2006. Poloprovozní ověření metody in-situ chemické redukce pro sanaci podzemních vod kontaminovaných šestimocným chrómem. Sborník

konference Oxidační a redukční metody odstraňování ekologických zátěží, 24.-25. května 2006 (Bukhart J., Halouskova O. – editoři), 133 – 138, ISBN 90-86832-20-1, Luhačovice, Česká republika.

Vesela, L., Siglova, M., Nemecek, J., Kubal, M., 2005. Biological elements i permeable ractive barriers – practicle experience from Synthesia. In: Uhlmann, o., Annokkee, G.J., Arendt, F. (Eds.), Proceedings of the ConSoil Conferemce 2005, FZK/TNO, Bordeaux, pp.1497-1506.

Němeček, J., Veselá, L., 2004. Pilotní testování biofiltrační bariéry. Sborník konference Sanační technologie VII, 26.-27. května 2004 (Bukhart J., Halousková O. – editoři), 84 – 89, ISBN 80-86832-02-3, Luhačovice, Česká republika.