

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ, PRAHA

Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav biochemie a mikrobiologie

Technická 3, 166 28 Praha 6

Disertační práce

**POLOPROVOZNÍ OVĚŘOVÁNÍ DVOU PRINCIPIÁLNĚ
ODLIŠNÝCH SANAČNÍCH POSTUPŮ**

Studijní obor: Mikrobiologie (15-10-600)
Školitelka: Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.

Praha, 2005

Mgr. Petra Innemanová

Motto:

...Pokud bychom naše vědecké práce nezpracovávali tak často v laboratořích, ale více v terénu, v polních podmínkách – nejlépe doslova na poli – postupoval by vědecký pokrok daleko opatrněji. Naučíme-li se ohodnocovat potenciální dopad nových technologií v souvislostech a v průběhu určité doby, klesá pravděpodobnost, že odstartujeme destruktivní řetěz s nezamýšlenými důsledky.

Helena Norberg-Hodge, Dávné budoucnosti

Za pomoc a podporu při realizaci této disertační práce děkuji Prof. Ing. Kateřině Demnerové, CSc. a všem kolegům z firmy DEKONTA, a.s.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a použila jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Datum:

Mgr. Petra Innemanová

SOUHRN

Jedním z negativních důsledků lidské činnosti a s ní souvisejících havárií je značné rozšíření organického znečištění horninového prostředí. Každoročně je publikována řada nových informací o možnostech odstraňování antropogenního znečištění ze životního prostředí. Důležitým krokem při zavádění těchto poznatků do praxe bývá jejich poloprovozní testování, případně jiné ověřování v reálných podmínkách. Je zřejmé, že realizace každého pilotního pokusu vyžaduje řešení zcela specifických problémů, které nelze v laboratorním měřítku předpovídat.

V rámci aplikovaného výzkumu firmy DEKONTA, a.s. byly ověřovány dva principiálně odlišné sanační přístupy – monitorování přirozené atenuace na lokalitě kontaminované ropnými látkami a podporovaná biodegradace zemin znečištěných polychlorovanými bifenoly.

I) Na řadě lokalit dochází k tzv. přirozené atenuaci znečištění, což může potenciálně snížit náklady potřebné na sanaci. Toto přirozené snížení obsahu znečištění nastává vlivem mnoha procesů jako je ředění, disperse, sorpce, odtékání, biologická a abiotická transformace atd. Pro využití přirozené atenuace jako sanačního přístupu je zaveden termín “monitorovaná přirozená atenuace” a toto monitorování musí být velmi důsledné a spolehlivé.

Pro zhodnocení vlivu přirozené atenuace na znečištění ropného původu byla sbírána data z lokality Rýcholka v Choustníkově Hradišti. Jedná se o areál zemědělského družstva dlouhodobě kontaminovaný úniky ze stáčení pohonných hmot. Každý měsíc, po dobu jednoho roku, byly v podzemní vodě a v zeminách sledovány koncentrace ropných uhlovodíků, aerobních a anaerobních bakterií, potenciálních akceptorů elektronu (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}) a dalších produktů bakteriálního metabolismu (Fe^{II} , Mn^{II}). Zároveň byla uskutečněna řada laboratorních testů zaměřených na zhodnocení biodegradací kapacity prostředí, určení stupně degradace přítomného kontaminantu, porovnání různých stupňů sanačního zásahu atd.

Praktické zkušenosti z lokality společně s publikovanými poznatky pak sloužily jako podklad pro vypracování metodické příručky “Monitorovaná přirozená atenuace ropných uhlovodíků a chlorovaných alifatických uhlovodíků” vydané Ministerstvem životního prostředí v roce 2001.

Vedlejším výsledkem projektu a zároveň cílem 1. části předkládané disertační práce bylo podrobné zhodnocení stavu znečištění na lokalitě Rýcholka a návrh dalšího nakládání s přítomnou zbytkovou kontaminací. Na základě výsledků měření bylo konstatováno, že se v tomto případě jedná o vyčerpané ložisko znečištění, pravděpodobně nadále ustupující vlivem přirozených procesů. Není nutné realizovat jakýkoliv aktivní sanační zásah, což představuje nezanedbatelné snížení nákladů na dočištění lokality.

II) Polychlorované bifenoly naopak představují typ kontaminace, která pravděpodobně vyžaduje více aktivní přístup k sanaci, neboť proces přirozené atenuace bývá v tomto případě velmi pomalý.

Na úložišti skládky nebezpečných odpadů Všebořice v Ústí nad Labem byl proto realizován pilotní pokus biologické dekontaminace zemin znečištěných PCB. Cílem pokusu a zároveň náplní 2. části disertační práce bylo praktické ověření zkušeností z laboratorních experimentů při poloprovozní sanaci dvou vzorků z lokalit Milovice (areál bývalého vojenského prostoru) a Milevsko (bývalá obalovna živičných směsí) obsahujících koncentrace PCB v řádu sta a desítky $mg \cdot kg^{-1}$.

Biologická dekontaminace dvou vzorků zemin o hmotnosti 10t byla založena na tzv. “sekvenčním” naerobně-aerobním procesu. Efektivita sanačního procesu byla hodnocena na základě obsahu PCB (včetně kongenerové charakteristiky), minerálních živin, mikroflóry a intenzity respirace na počátku, v průběhu a na konci pokusu.

Vstupní koncentrace znečištění byly zvoleny s ohledem na předpokládanou nižší účinnost metody a nutnost následného uložení odpadu podle platné legislativy. Tato skutečnost se však ukázala být v rozporu s vlastním principem biodegradčních metod. Zbytkové koncentrace, se kterými bylo pracováno, jsou pravděpodobně pro mikroorganismy málo využitelné. Navíc se zde silně projevují procesy stárnutí kontaminantu, kdy dochází k nevratným sorpcím na pevné částice a tedy dalšímu snižování biologické dostupnosti.

Klíčová slova: Monitorovaná přirozená atenuace, Ropné uhlovodíky, Polychlorované bifenoly, Biodegradace, Pilotní testy

SUMMARY

TWO DIFFERENT APPROACHES IN TOXIC POLLUTION REMEDIATION – PILOT SCALE TESTS

Large amount of organic substances has been leached into subsurface as a result of human activities and/or related accidents. A lot of new information concerning possibilities of their subsequent removal from the living environment is published every year. A very important step for an application of new methods as functional technologies is their pilot scale testing or other verification under service conditions. It is clear, that the experimental treatment of tons of contaminated soils or vast volumes of water often requires solving of specific problems, not occurring on the microcosms scale.

Two different approaches (natural attenuation and enhanced biodegradation) for removal of contamination were verified by means of proprietary applied research conducted at the DEKONTA company.

I) At many contaminated sites the subsurface is capable of natural attenuation of pollutants thus potentially decreasing the cost of remediation. This reduction in concentration of pollutants is due to a number of processes, including simple dilution, dispersion, sorption, volatilisation, biotic and abiotic transformation. The use of natural attenuation as a remedial approach is referred to as 'Monitored Natural Attenuation' by the U.S. Environmental Protection Agency. Reliance on natural attenuation requires a reliable monitoring method of the process.

To confirm the effect of natural attenuation, necessary data was collected on a petroleum contaminated filling station, belonging to the agricultural cooperative of 'Rýcholka', Choustníkovo Hradiště (CZ). During one-year concentrations of petroleum hydrocarbons, living aerobic and anaerobic microorganisms, electron acceptors (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}) and other products of bacterial metabolism (Fe^{II} , Mn^{II}) were monthly monitored in the groundwater and the soil. The practical experience together with recently published data led into creation of the guidelines titled as 'Monitored Natural Attenuation of the Petroleum and Aliphatic Chlorinated Hydrocarbons', which was published by the Ministry of Environment in 2001.

Detail risk analysis of contamination situation on the site of 'Rýcholka' and design of further treatment of present residual contamination were other results of the project and also goals of the first part of the submitted thesis. Based on the obtained results it was concluded, that this is a depleted source of contamination, probably henceforward recovered by natural attenuation processes. Thus it is not necessary to realise any active remedial intervention, which means indispensable decrease of expenditure for site re-treatment.

II) In contrast to natural attenuation, a highly active approach is required for such types of pollution as polychlorinated biphenyls (PCBs). The pilot scale test, which establishes a necessary connection link between experience from laboratory studies and a full establishment of a PCBs remediation method into practice, was carried out on a fully protected landfill site in Ústí nad Labem (CZ) from April 2001 to November 2003. Sites of samples origin (the Milovice military training area and the Milevsko asphalt mixing plant, CZ) belong to highly exposed cases of PCBs contamination widely covered in Czech media.

The biological remediation of the 10 tons soil samples (containing PCBs at concentrations of hundreds and tens $mg \cdot kg^{-1}$) was based on a so-called 'sequential' anaerobic-aerobic process. The remediation process was evaluated on the basis of chemical and microbiological analyses. PCB concentration, including congener characterization, concentration of mineral nutrients, total microflora and respiration intensity were determined at the start, during the process and at the end of the experiment. Starting concentrations of contamination were chosen with regard to expected lower efficiency of the method and the requirement of subsequent waste landfilling according to the active legislation. This fact, however, emerged to be in contrast to the biodegradation method principle itself. The tested residual concentrations were probably of negligible benefit to the microorganisms. In addition, there was a strong effect of contaminant ageing leading to irreversible sorption of contamination to solid particles resulting in further decrease of its biological availability.

Keywords: Monitored Natural Attenuation, Petroleum, Polychlorinated Biphenyls, Bioremediation, Pilot Scale Test

SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

ADR	advekčně disperzní rovnice
BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny
CFU	kolonie-tvořící jednotky
ČOV	čistička odpadních vod
CT	tetrachlormethan
DCE	dichlorethylen
Eh	oxidačně-redukční potenciál
EOX	extrahovatelné organické halogeny
IČ spektrometrie	infračervená spektrometrie
GC	plynová chromatografie
GC/ECD	plynová chromatografie detektorem elektronového záchytu
GC/FID	plynová chromatografie s plameno-ionizační detekcí
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
MPA	monitorovaná přirozená atenuace
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
NEL	nepolární extrahovatelné látky
PA	přirozená atenuace
PB	přirozená biodegradace
PCB	polychlorované bifenyly
PCE	tetrachlorethylen (perchlorethylen)
RU	ropné uhlovodíky
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TCE	trichlorethylen
TOC	celkový organický uhlík
VC	vinylchlorid

	Str.:
1. ÚVOD	1
2. SANAČNÍ PŘÍSTUP č.1 – MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE ROPNÉHO ZNEČIŠTĚNÍ	2
2.1. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE – TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1.1. Definice přirozené atenuace	2
2.1.2. Základní charakteristika procesů přirozené atenuace	3
2.1.3. Monitorovaná přirozená atenuace jako alternativní sanační přístup	4
2.1.3.1. Přirozená atenuace ropných uhlovodíků	5
2.1.3.2. Přirozená atenuace chlorovaných alifatických uhlovodíků	5
2.1.3.3. Přirozená atenuace ostatních polutantů	6
2.1.4. Monitorování přirozené atenuace ropných uhlovodíků a chlorovaných alifatických Uhlovodíků	6
2.1.4.1. Průzkum procesů přirozené atenuace, přehled sledovaných parametrů a jejich význam	6
2.1.4.1.1. Časový a prostorový vývoj kontaminačního mraku	7
2.1.4.1.2. Nepřímý důkaz a kvantifikace procesů přirozené atenuace pomocí geochemických indikátorů	8
2.1.4.1.3. Přímý důkaz atenuačních procesů	11
2.1.5. Přirozená biodegradace jako významná složka přirozené atenuace	11
2.1.5.1. Biodegradace ropných uhlovodíků	14
2.1.5.1.1. Aerobní biodegradace ropných uhlovodíků	14
2.1.5.1.2. Anaerobní biodegradace ropných uhlovodíků	16
2.1.6. Modelování přirozené atenuace	18
2.1.6.1. Analytické modely přirozené atenuace	20
2.1.6.2. Numerické modely přirozené atenuace	20
2.2. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE – CÍLE PRÁCE	22
2.3. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
2.3.1. Materiál a metody	23
2.3.1.1. Použitý materiál a přístrojové vybavení	23
2.3.1.2. Výběr lokality	24
2.3.1.2.1. Popis objektu a údaje o území	24
2.3.1.2.2. Geografická poloha lokality	25
2.3.1.2.3. Geologické poměry na lokalitě	25
2.3.1.2.4. Hydrogeologické poměry na lokalitě	26
2.3.1.2.5. Geomorfologické poměry na lokalitě	26
2.3.1.3. Seznam provedených prací	27
2.3.1.3.1. Monitorování jednotlivých indikátorů přirozeného degradačního procesu na lokalitě	27
2.3.1.3.2. Porovnání přirozeného procesu snižování obsahu kontaminace přímo na lokalitě a aktivního způsobu dekontaminace s využitím různých stupňů sanace	27
2.3.1.3.3. Vyhodnocení použitelnosti zvolených metod indikace přirozených biodegradačních dějů	28
2.3.1.3.4. Důkaz přítomnosti / absence přirozeného biodegradačního procesu na lokalitě na základě naměřených údajů	29
2.3.1.4. Monitorovací objekty a rozsah provedených prací	29
2.3.1.4.1. Objekty pro monitorování podzemních vod	29
2.3.1.4.2. Objekty pro monitorování zemin	31
2.3.1.4.3. Analýzy vzorků podzemních vod	33
2.3.1.4.4. Analýzy vzorků zemin	34
2.3.1.4.5. Modelové laboratorní testy	34
2.3.1.5. Použité metody	35

2.3.1.5.1. Metody pro monitorování podzemních vod	35
2.3.1.5.2. Metody pro analýzu zemin	35
2.3.1.5.3. Popis jednotlivých metod	36
2.3.1.5.4. Modelové testy	38
2.3.1.5.5. Statistické metody	41
2.3.2. Výsledky	42
2.3.2.1. Výsledky monitorování lokality	42
2.3.2.1.1. Výsledky sběru dat 1. typu	42
2.3.2.1.2. Výsledky sběru dat 2. typu	43
2.3.2.1.3. Výsledky sběru dat 3. typu	49
2.3.2.2. Výsledky doplňkových laboratorních testů	53
2.3.2.2.1. Výsledky testu degradovatelnosti nafty a bionafty	53
2.3.2.2.2. Výsledky modelových testů sanace <i>ex situ</i>	54
2.4. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE - DISKUSE VÝSLEDKŮ	55
2.4.1. Diskuse výsledků získaných z monitoringu lokality a z laboratorních testů	55
2.4.1.1. Data 1. typu na lokalitě Choustníkovo Hradiště	55
2.4.1.2. Data 2. typu na lokalitě Choustníkovo Hradiště	56
2.4.1.3. Data 3. typu na lokalitě Choustníkovo Hradiště	57
2.4.1.4. Modelové testy sanace <i>ex situ</i>	58
2.4.1.5. Testy degradovatelnosti nafty a bionafty	59
2.4.2. Diskuse výsledků podle 5 hlavních cílů řešení projektu	60
2.4.2.1. Monitoring jednotlivých indikátorů přirozeného biodegradačního procesu na lokalitě	60
2.4.2.2. Porovnání přirozeného procesu s aktivním způsobem dekontaminace	60
2.4.2.3. Vyhodnocení použitelnosti zvolených metod indikace přirozených degradačních dějů	60
2.4.2.4. Důkaz přítomnosti/absence přirozeného biodegradačního procesu na lokalitě na základě naměřených údajů	62
2.4.2.5. Návrh nejvhodnějšího sanačního opatření na dočištění lokality	63
3. SANAČNÍ PŘÍSTUP č.2 – PODPOROVANÁ BIOLOGICKÁ DEKONTAMINACE <i>EX SITU</i> ZEMIN KONTAMINOVANÝCH PCB	64
3.1. DEKONTAMINACE PCB – TEORETICKÁ ČÁST	64
3.1.1. Charakteristika PCB	64
3.1.1.1. Technické vlastnosti a použití	65
3.1.1.2. Toxikologické vlastnosti	65
3.1.2. Možnosti odstranění PCB ze životního prostředí	66
3.1.3. Biologické metody dekontaminace PCB	67
3.1.3.1. Hlavní mechanismy biodegradace PCB	67
3.1.3.1.1. Aerobní mechanismus	68
3.1.3.1.2. Anaerobní mechanismus	70
3.1.3.1.3. Základní principy biodegradace PCB	70

3.1.3.1.4. Meziprodukty biodegradace PCB	71
3.1.3.2. Modifikace biodegradačních metod	71
3.1.3.3. Omezení využívání mikroorganismů pro sanační technologie v ČR	72
3.1.3.4. Legislativa pro nakládání se zeminami s obsahem PCB	73
3.2. PODPOROVANÁ BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V ZEMINÁCH – CÍLE PRÁCE	74
3.3. PODPOROVANÁ BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V ZEMINÁCH – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	75
3.3.1. Materiál a metody	75
3.3.1.1. Použitý materiál	75
3.3.1.2. Výběr vzorků a místo realizace poloprovozu	76
3.3.1.3. Volba technologického postupu	78
3.3.1.4. Popis navržené technologie	79
3.3.1.4.1. Časový harmonogram prací	80
3.3.1.4.2. Použitá aditiva a jejich dávkování	81
3.3.1.5. Použité metody	83
3.3.1.5.1. Sledování obsahu a kvality kontaminantu v průběhu procesu	83
3.3.1.5.2. Analýzy zaměřené na technologickou kontrolu procesu	84
3.3.2. Výsledky	87
3.3.2.1. Vstupní parametry poloprovozní části	87
3.3.2.2. Výsledky průběžných analýz obsahu a kvality kontaminantu	88
3.3.2.3. Výsledky analýz zaměřených na technologickou kontrolu procesu	89
3.3.2.4. Výsledky izolace bakterií rostoucích na PCB	92
3.4. PODPOROVANÁ BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V ZEMINÁCH – DISKUSE VÝSLEDKŮ	93
4. ZÁVĚR	96
5. LITERATURA	98
6. PŘÍLOHY	

1. ÚVOD

Důsledkem životního stylu v posledních desetiletích je značné a rozšířené znečištění zemin, podzemních i povrchových vod a ovzduší. Hromadí se znečišťující látky, ať již organického, nebo anorganického charakteru, představují závažný problém jak pro budoucnost lidstva, tak pro životní prostředí jako celek.

Nedílnou součástí procesu ochrany a tvorby životního prostředí je proto každé efektivní odstraňování veškerého antropogenního znečištění. V praxi je využívána řada metod a technologií, které jsou pro tento účel k dispozici.

Základní výzkum na poli sanačních technologií v posledních desetiletích značně pokročil a také vyžaduje stále užší specializaci jednotlivých vědeckých pracovníků. Poněkud odlišné nároky jsou však kladeny na odborníky, zabývající se výzkumem aplikovaným, případně přímo realizací sanačních technologií. Je totiž téměř nemožné dosáhnout v poloprovozním, resp. provozním měřítku stejných podmínek, za kterých byl proces studován v laboratoři. Na jedné straně exaktní základní výzkum většinou vyžaduje velice úzkou specializaci řešitele (např. pokud pracujeme pouze s jedním bakteriálním kmenem), na straně druhé je pro výzkum aplikovaný nezbytný široký rozhled napříč obory a to nejen přírodovědnými. Patří sem navíc právo, ekonomie, ekologická etika atd.

V této práci jsou na příkladu terénních ověřování dvou zcela odlišných sanačních přístupů předvedena zmíněná specifika a principy aplikovaného výzkumu v oboru sanačních biotechnologií.

- Identifikace a rámcové vyhodnocení procesů přirozené atenuace na lokalitě dlouhodobě kontaminované ropnými uhlovodíky
- Poloprovozní testy mikrobiální dekontaminace zemin dlouhodobě kontaminovaných polychlorovanými bifenoly.

Práce je proto rozdělena do dvou oddílů popisujících dva nezávislé a zcela odlišné poloprovozní testy, tak aby společně dosáhly co nejvyšší vypovídací schopnosti ohledně problematiky aplikovaného výzkumu v uvedeném oboru:

- Pasivní přístup, kdy veškeré inženýrské práce spočívají v podrobném monitorování a vyhodnocování procesu tzv. přirozené atenuace
- Aktivní přístup, který předpokládá určitý řízený zásah do procesů probíhajících v kontaminovaném médiu.

2. SANAČNÍ PŘÍSTUP č.1 - MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE ROPNÉHO ZNEČIŠTĚNÍ

2.1. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE – TEORETICKÁ ČÁST

V posledních letech je věnována stále větší pozornost procesům přirozené atenuace (dále jen PA).

Jedná se o procesy, které mají vliv na chování znečištění v životním prostředí bez ohledu na to, zda je realizován jakýkoliv sanační zásah. Ukazuje se, že se tyto přirozené procesy na postupné dekontaminaci lokality často podílejí více, než se dosud předpokládalo, a za určitých okolností mohou vhodně doplnit, případně zcela nahradit tzv. aktivní sanační metody.

To má zpětný význam při posuzování rizik vyplývajících ze známých případů znečištění. Je zřejmé, že pokud přirozené procesy časem stabilizují kontaminační mrak v určitých hranicích a v určité vzdálenosti od zdroje znečištění (rozumíme zde znečištění horninového prostředí a podzemní vody) a pokud bude reálně tyto hranice stanovit, bude možné využití těchto poznatků ještě před volbou definitivní sanační technologie na konkrétní lokalitě. Hodnocení vlivu PA jako součást systému posuzování a nápravy starých ekologických zátěží tak může přispět k efektivnějšímu vynakládání finančních prostředků. Je však nutné poznamenat, že se zde nejedná o přenechání zodpovědnosti za vyčištění lokality pouze přírodním procesům – průběh PA musí být kvalitně monitorován, a protože délka sanace může být v porovnání s aktivními metodami několikanásobně vyšší, zvyšují se i náklady na monitoring. Výraznější ekonomické úspory může využití PA přinést tam, kde by využití aktivních metod vyžadovalo omezení provozu ekonomicky výhodných činností, destrukci nadzemních staveb apod.

2.1.1. Definice PA

- **Přirozená atenuace (zkr. PA)** - angl. **natural attenuation**, je definována jako *spolupůsobení procesů biodegradace, disperze, rozpouštění, sorpce, odtékání nebo chemické a biologické stabilizace znečištění, které za vhodných podmínek a bez lidského zásahu snižují hmotnost, mobilitu, toxicitu, objem nebo koncentraci jednotlivých složek znečištění v horninovém prostředí a v podzemní vodě.* (EPA, 1999b; Harder, 1991; Hillel, 1989; Lyman, 1982). Mikrobiální rozklad (*přirozená biodegradace*) přitom představuje jednu z nejvýznamnějších složek procesu, protože jeho výsledkem může být úplná mineralizace organického znečištění. V anglickém jazyce jsou používanými synonymy pro termín *natural attenuation* následující spojení:
 - Intrinsic attenuation
 - Intrinsic remediation
 - Passive remediation

- **Přirozená biodegradace - (PB)**- hlavní, ale nikoliv jediná složka procesu *přirozené atenuace*. Přirozená biodegradace je tedy podmožinou přirozené atenuace. Na druhé straně, ne každá přirozená atenuace zahrnuje i přirozenou biodegradaci. Synonymy termínu *přirozená biodegradace* jsou také např. spontánní biodegradace, spontánní rozklad uhlovodíků atd.
- **Monitorovaná přirozená atenuace** - spolehnout se na procesy PA (ve smyslu podrobného monitorování a průběžného vyhodnocování situace v rámci sanačních opatření na dané lokalitě) za účelem snížení rizik plynoucích z ekologické zátěže.

2.1.2. Základní charakteristika procesů přirozené atenuace

Procesy přirozené atenuace probíhají na všech kontaminovaných lokalitách, ale jejich typ, intenzita a účinnost se liší v závislosti na typu a koncentraci znečištění a na hydrologických a geologických poměrech na lokalitě.

Potenciální rizika plynoucí z přítomnosti znečištění na lokalitě mohou být prostřednictvím PA procesů snižována třemi různými způsoby:

- Transformací znečištění na méně toxické formy pomocí rozkladných procesů (biodegradace, radioaktivní rozpad, hydrolyza apod.)

V určitých případech může transformace vést ke vzniku toxickejších meziproductů než původní znečištění (např. vznik vinylchloridu reductivní dehalogenací chlorovaných uhlovodíků, který však může být dále degradován na neškodné produkty CO₂, H₂O a Cl⁻).

- Zmenšením potenciální úrovně expozice snížením koncentrací (ředění, disperze, tčkání)
- Snížením mobility a biologické dostupnosti znečištění sorpcí na tuhé fázi kolektoru.

Procesy PA působí tedy na znečištění ve dvou směrech:

- snižováním celkového množství znečištění (biochemická nebo fyzikálně-chemická degradace látek snižuje celkové množství znečištění v prostředí, příp. sorpce na horninovém prostředí snižuje množství látek v podzemní vodě)
- snižováním koncentrace znečištění, ale bez snižování jeho celkového množství v prostředí (vlivem disperzně-difúzních procesů a ředění).

Oba tyto jevy jsou nedílně spojeny a vzájemně se ovlivňují, např. při určitých koncentracích mohou být degradační procesy intenzivnější.

Každý kontaminační mrak má 4 fáze svého vývoje:

- rozšiřování

- stabilizace vlivem přirozeně probíhajících procesů a aktivních nebo pasivních sanačních zásahů
- zmenšování mraku vlivem stejných procesů jako v předchozím bodě (pokud je dotace znečištění do prostředí menší než společný vliv sanačního zásahu a současně atenuačních procesů)
- zánik.

(EPA, 1998; Šráček, 2000b; Wiedemeier et al., 1999)

2.1.3. Monitorovaná přirozená atenuace jako alternativní sanační postup

Pro označení cíleného využití procesů *PA* je navržen termín *monitorovaná přirozená atenuace* .. Její využití jako alternativy k aktivním sanačním postupům je možné pouze při splnění několika základních podmínek:

- Při použití monitorované *PA* nedojde ke zvýšení rizika ohrožení lidského zdraví ani dalších složek životního prostředí ve srovnání s aktivními sanačními postupy.
- Je zaručeno, že kontaminační mrak již je, nebo bude stabilizován v určité ohraničené ploše a *PA* nedovolí jeho další šíření.

Teprve po splnění těchto dvou základních podmínek je možné zohlednit další kritéria pro použití monitorované *PA*, jako jsou například:

1. Ekonomické posouzení variant sanace (celkové náklady na sanaci)
2. Riziko neočekávaného šíření kontaminačního mraku
3. Alternativní sanační technologie představující další riziko, např. při přemístění kontaminovaného materiálu, rozšíření znečištění nebo narušení ekosystému
4. Úroveň poznání atenuačních procesů na konkrétní lokalitě
5. Snaha o minimální narušení infrastruktury, možnost využívání dotčených pozemků
6. Existence kontinuálního zdroje znečištění, který nemůže být jednoduše a levně odstraněn a bude vyžadovat dlouhotrvající sanaci.

Přirozená atenuace by neměla být uvažována, pokud není nebo nebude zaručena ochrana lidského zdraví a životního prostředí a jsou-li alternativní remediační technologie dostupnější a ekonomicky efektivnější.

2.1.3.1. Přirozená atenuace ropných uhlovodíků

V současné době jsou nejlépe dokumentovány procesy PA snižující hladiny organického znečištění na lokalitách kontaminovaných **ropnými látkami**. Přestože se jedná o směs alifatických, aromatických a polyaromatických uhlovodíků, z hlediska PA jsou nejdůležitější složkou ropného znečištění látky BTEX (benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny) - vzhledem k jejich relativně vysoké rozpustnosti a tedy mobilitě. Organismy v půdě a podzemní vodě rozkládají tyto látky prostřednictvím metabolických pochodů na konečné oxidační produkty, které jsou vesměs neškodné a netoxické.

Různé studie potvrzují účinnost jak aerobních, tak anaerobních mechanismů biodegradace (kap. 2.1.5.2.).

V původním ohnisku znečištění ropnými uhlovodíky zpravidla přetrvávají těžší uhlovodíky s nižší rozpustností a těkavostí. Přestože tyto složky představují relativně nízké riziko z hlediska další migrace, může jejich nebezpečnost pro lidské zdraví nebo pro další složky životního prostředí spočívat buď v přímém kontaktu s kontaminovaným materiálem (zeminou), nebo v pomalém rozpouštění do podzemní vody. Z tohoto důvodu je samotná monitorovaná PA zpravidla nedostatečná jako jediný sanační přístup na kontaminované lokalitě a je nezbytné ji kombinovat s aktivní sanací v oblasti zdroje znečištění.

2.1.3.2. Přirozená atenuace chlorovaných alifatických uhlovodíků

Chlorovaná rozpouštědla (např. trichlorethylen TCE) představují další velmi rozšířenou skupinu polutantů, které mohou být za určitých podmínek biologicky degradovány (reduktivní dehalogenace). Podmínky vhodné pro efektivní degradaci chlorovaných uhlovodíků jsou v porovnání s případy PA ropného znečištění vzácnější. V případě chlorovaných rozpouštědel je nezbytné vyloučit riziko hromadění reakčního meziprojektu – vinylchloridu v kolektoru a jeho přechodu do půdního vzduchu. Hrozí totiž riziko akumulace plynného vinylchloridu, např. ve sklepních prostorech budov.

Na některých lokalitách (v určitých geologických podmínkách) může za podmínek degradace chlorovaných uhlovodíků (silně redukční podmínky) docházet k uvolňování toxických kovů (např. arzén, mangan) vázaných v horninovém prostředí kolektoru. Kovy jsou obvykle mobilnější než organické znečištění. Výsledkem může být sekundární znečištění horninového prostředí anorganickými složkami s vyšší mobilitou nebo toxicitou než původní znečištění organickými polutanty. To znamená, že při použití monitorované PA je nezbytné vyhodnocovat a průběžně monitorovat i anorganické složky podzemní vody.

2.1.3.3. Přirozená atenuace ostatních polutantů

Koncentrace mobilních a toxických forem nerozložitelných **anorganických polutantů** může být také efektivně snižována přirozenými procesy. Specifickou skupinu anorganických polutantů představují **radionuklidy**, které kromě doposud popisovaných mechanismů podléhají radioaktivnímu rozpadu. Běžné znečištění je však často směsí různých chemických látek (například ropné uhlovodíky – NEL). Z těchto směsí je každá ze složek odbourávána jinou rychlostí a některé složky nemusí být odbourány vůbec. Příkladem je běžné aditivum bezolovnatých benzínů: metyl-tertbutyl ether (MTBE), který se biodegradací odbourává velmi pomalu a může být transportován na značnou vzdálenost. To znamená, že hůře odbouratelné nebo zcela neodbouratelné složky mohou být z tohoto hlediska velmi rizikové a je nutné jim věnovat pozornost při monitorování.

Dalším faktorem je přítomnost „neurčitě“ stanovitelných složek. Při analytickém stanovení je pouze část složek ve směsi jednoznačně identifikována (např. složky BTEX v skupině NEL). Při klasickém způsobu sanace – sanačním čerpání - lze předpokládat, že všechny složky ve skupině NEL mají přibližně stejné chování – jsou odčerpávány a zachytávány na filtrech. V případě využití PA nemusí všechny složky podléhat stejnému způsobu a rychlosti rozkladu. Pro hodnocení možností PA může být nezbytné detailně identifikovat větší množství složek ve směsích látek, než je tomu v případě klasických sanačních přístupů.

2.1.4. *Monitorování přirozené atenuace ropných uhlovodíků a chlorovaných alifatických uhlovodíků*

V současné době převažují v České republice lokality kontaminované organickým znečištěním (zejména ropné uhlovodíky, následují chlorované alifatické uhlovodíky). Pozornost bude proto zaměřena zejména na tyto typy znečištění.

2.1.4.1. **Průzkum procesů přirozené atenuace, přehled sledovaných ukazatelů a jejich využitelnost**

Prvním krokem při hodnocení monitorované PA jako sanační alternativy je sběr dat potřebných k zhodnocení stavu lokality. Tento průzkum spočívá v určení rozsahu a intenzity znečištění a charakterizaci kontaminovaného prostředí.

Průzkumné práce zaměřené na zhodnocení procesů PA a jejich kvantifikaci směřují ke zjištění 3 základních souborů informací, potřebných pro rozhodnutí o možnosti aplikace monitorované PA (Wiedemeier et al, 1999; Wiedemeier, 1994; Šrámek, 2000b; Norris, 1994):

1. Časový a prostorový vývoj kontaminačního mraku
2. Nepřímý důkaz a kvantifikace probíhajících procesů PA pomocí geochemických indikátorů
3. Přímý důkaz atenuačních procesů na vzorku kontaminovaného materiálu z předemné lokality (laboratorní nebo terénní).

Rozhodování o použití monitorované PA na základě dat 1. typu je možné v případě, že mají dostatečnou kvalitu a časový rozsah. Pro zodpovědné rozhodnutí o použití monitorované PA by měla být data 1. typu téměř vždy doplněna daty 2. typu. V případě, kdy ani soubor dat 1. a 2. typu neposkytuje dostatečný základ pro rozhodnutí, mohou být nezbytná data 3. typu.

Obecně může být požadováno více informací k prokázání účinnosti monitorované PA, zvláště pokud nedochází k degradaci biologickými procesy, nebo kdy dochází k transformaci na (přes) toxičtější nebo mobilnější konečné produkty (meziprodukty). Množství potřebných informací je závislé na místních podmínkách každé lokality.

2.1.4.1.1. Časový a prostorový vývoj kontaminačního mraku

Tato část průzkumu je zaměřena na získání kvantitativních dat o časovém vývoji kontaminačního mraku v konkrétních geologických a hydrogeologických podmínkách. Rozdíl mezi množstvím dotace znečištění do prostředí a jeho aktuálně zjištěným množstvím je dokladem probíhajících atenuačních procesů.

V této etapě prací je nezbytné realizovat zejména následující činnosti:

- Vymezení zóny s volnou fází znečištění (např. měření ve vrtech, hmotová bilance u neporušeného vzorku získaného jádrováním, atmogeochemický průzkum)
- Vymezení plošného a hloubkového rozšíření kontaminačního mraku, resp. rozpuštěného znečištění (instalace piezometrů nebo vrtů dle předem vypočítané maximální vzdálenosti transportu kontaminačního mraku)
- Stanovení koncentrace a kvality znečištění v jednotlivých vrtech. V případě ropného znečištění se jedná zejména o látky BTEX, v případě chlorovaných rozpouštědel jde o směs alifatických chlorovaných uhlovodíků

- Určení trendů ve vývoji kontaminačního mraku během několika vzorkovacích period (např. neparametrickými testy jako je Mann-Kendallův test).

Podrobná znalost geologických a hydrogeologických poměrů na lokalitě je nezbytností při každém uvažovaném využití monitorované PA. Jedná se o litologický charakter lokality, vertikální geologický profil, zrnitostní charakteristiku sedimentů, obsah organických a jílových částic, váhová frakce organického uhlíku, efektivní porozita, míra a typ propustnosti, rychlost proudění podzemní vody, hydraulický gradient, úroveň hladiny podzemní vody pod terénem, preferenční cesty proudění, základní fyzikálně-chemické parametry podzemní vody apod.

Výše popsany soubor informací však není dostačující pro důslednou charakterizaci PA procesů na lokalitě ani v případě, kdy historická data jasně dokumentují trend stagnace nebo zmenšování kontaminačního mraku.

Pro upřesnění mechanismů, které se na PA znečištění podílejí přednostně, je nezbytné dále vyhodnotit geochemické indikátory procesů PA. Jedná se o data, která poskytují informaci o zastoupení přirozené biodegradace jako jediného mechanismu, který umožňuje trvalé odstranění polutantu z prostředí, v celkovém procesu PA.

2.1.4.1.2. Nepřímý důkaz a kvantifikace procesů přirozené atenuace pomocí geochemických indikátorů

Jde o hydrogeologická a geochemická data, která mohou být použita k nepřímému určení hlavního typu atenuačního procesu (přirozené biodegradace) probíhajícího na lokalitě, a ke kvantifikaci procesů, které sníží koncentrace znečištění na požadovanou úroveň. Výsledky průzkumu lokality mohou být například použity pro kvantifikaci míry/rychlosti sorpce, rozpouštění nebo biologických degradačních procesů. Existují 3 typy těchto geochemických indikátorů shrnutých v tabulce 1. Význam jednotlivých parametrů měřených v podzemní vodě je popsán v tabulce 2.

Tab. 1: Seznam důležitých geochemických indikátorů PA

Procesy v podzemní vodě	Sledované parametry
Snižování množství terminálních akceptorů elektronu jako ukazatel oxidačních procesů	O ₂ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻
Výskyt produktů metabolismu vznikajících během atenuačních procesů	Mn ^{II} , Fe ^{II} , CH ₄
Celková charakteristika prostředí, především z redoxního hlediska	Eh

Tab. 2: Význam jednotlivých geochemických indikátorů PA (Widemeier et al., 1999)

Ukazatel	Využití
O ₂	Koncentrace pod 0,5mg.l ⁻¹ indikují anaerobní podmínky
NO ₃ ⁻	Terminální akceptor elektronu pro mikrobiální respiraci při absenci O ₂ *
SO ₄ ²⁻	Terminální akceptor elektronu pro anaerobní mikrobiální respiraci
Mn ^{II}	Indikace redukce Mn ^{IV} během mikrobiální degradace organických sloučenin při absenci O ₂ a NO ₃ ⁻
Fe ^{II}	Indikace redukce Fe ^{III} během mikrobiální degradace organických sloučenin v nepřítomnosti O ₂ , NO ₃ ⁻ a Mn ^{IV}
CH ₄	Přítomnost CH ₄ dokazuje degradaci organických sloučenin methanogenezí
Eh	Odráží relativní oxidační nebo redukční vlastnosti podzemní vody. Je ovlivňován typem biologické degradace organických sloučenin.

*vzhledem k nehomogenitě sledovaného systému je nutno předpokládat respiraci kyslíku a nitrátu současně.

Při postupném upřesňování situace na lokalitě se však mohou uplatnit některé další parametry podzemní vody popsané v tabulce 3.

Tab. 3: Význam doplňkových geochemických indikátorů PA (Widemeier et al., 1999)

Analýza	Využití
H ₂ S	Metabolický meziprodukt redukce SO ₄ ²⁻ . Přítomnost H ₂ S dokazuje oxidaci organických sloučenin cestou redukce SO ₄ ²⁻ .
CO ₂	CO ₂ je produkován během biodegradace různých typů organických sloučenin.
alkalita	a) zjišťování pufrční kapacity podzemní vody. b) indikátor pro ověření, zda jsou všechny vzorky odebírány ze stejné zvodně.
pH	a) aerobní a anaerobní procesy jsou pH-senzitivní. b) indikátor pro ověření, zda jsou všechny vzorky odebírány ze stejné zvodně.
teplota	S teplotou vzrůstá rychlost biologických procesů.
vodivost	Indikátor pro ověření, zda jsou všechny vzorky odebírány ze stejné zvodně.
chloridy	c) finální produkt redukce chlorovaných uhlovodíků d) indikátor pro ověření, zda jsou všechny vzorky odebírány ze stejné zvodně.
celkový organický uhlík	Užití při klasifikaci kontaminované zóny (a vyhodnocení, zda je možný kometabolismus při absenci antropogenního uhlíku – týká se chlorovaných uhlovodíků).
H ₂	Užití při hodnocení míry anaerobních procesů.

Naprostá většina studií a matematických modelů pracuje s výsledky analýz podzemních vod. Ojedinele je doporučováno obdobné zpracování pevných vzorků. Kennedy et al. (2004) upozorňuje na přesnější informace získané při hodnocení výše uvedených indikátorů přímo v zeminách (například Fe^{II} bylo nalezeno 300krát více v minerální formě jako FeS než ve formě rozpuštěné).

Jako doplňkové a okrajové je považováno přímé monitorování mikrobiologických parametrů jako indikátorů probíhajících biodegradčních procesů. Přesto je jim stále častěji věnována pozornost.

Biodegradční procesy jsou totiž často hlavním destrukčním mechanismem PA.

Solanoserena et.al. (1998) a Lahvis et. al. (1999) doporučují měření O₂ a CO₂ v půdním vzduchu jako ukazatel autochtonní degradační kapacity prostředí. Margesin et al. (1999) a Kao et al. (2001) kromě toho používají i metody počítání mikroorganismů jako doplňkovou metodu pro určování přirozené biodegradace na lokalitě. Naopak Kaufmann et. al. (2004) upozorňuje na skutečnost, že počet bakterií

koreluje nejen s obsahem znečištění, ale také s množstvím půdního organického uhlíku a obsahem dusíku.

I přesto může být údaj o množství živých mikroorganismů v prostředí důležitým ukazatelem případné toxicity prostředí.

2.1.4.1.3. Přímý důkaz atenuačních procesů

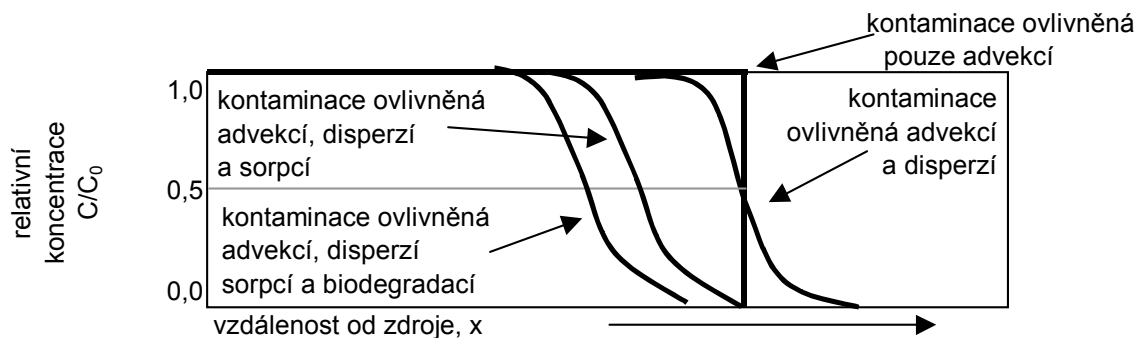
Jedná se o data z polních nebo laboratorních studií na tzv. mikrokosmech, které na vzorku kontaminovaného materiálu z konkrétní lokality přímo prokáží, zda atenuační procesy probíhají a zda jsou tyto procesy schopné snížit koncentrace znečištění na požadovanou úroveň. Typické je použití tohoto typu dat pouze k průkazu biodegradace.

Nevýhodou může být skutečnost, že procesy ověřené „in vitro“ v laboratoři nemusí se stejnou intenzitou probíhat v přírodním prostředí.

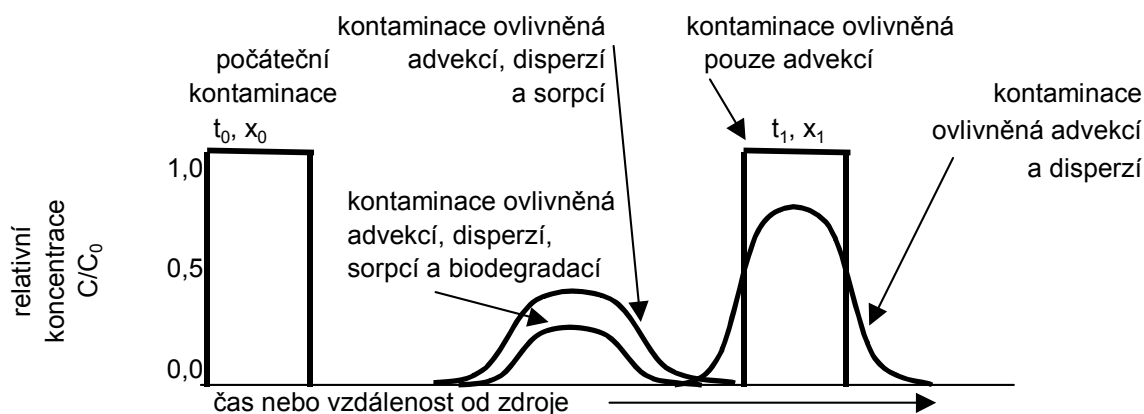
2.1.5. Přirozená biodegradace jako významná složka přirozené atenuace

Přirozená biodegradace patří k hlavním mechanismům destrukce znečištění (v případě chlorovaných alifatických uhlovodíků je navíc možné počítat s chemickým rozkladem). Ostatní mechanismy zahrnuté v definici PA (kap. 2.1.1.) pouze převádějí znečištění do různých fází a stavů, ale nemohou docílit definitivního odstranění kontaminace z prostředí.

Vliv nejvýznamnějších výše popsaných mechanismů přirozené atenuace na koncentraci znečištění v prostředí je schematicky znázorněn na obrázku 1.



Křivka ukazuje změnu v koncentraci znečištění při kontinuálním zdroji ovlivněnou pouze advekci, při kombinovaném vlivu advekce a hydrodynamické disperze, při kombinovaném vlivu advekce, hydrodynamické disperze a sorpce a při kombinovaném vlivu advekce, hydrodynamické disperze, sorpce a biodegradace.



Křivka ukazuje změnu v koncentraci znečištění při okamžitém zdroji ovlivněnou pouze advekci při kombinovaném vlivu advekce a hydrodynamické disperze, při kombinovaném vlivu advekce, hydrodynamické disperze a sorpce a při kombinovaném vlivu advekce, hydrodynamické disperze, sorpce a biodegradace.

Obr. 1: Jednorozměrný transport rozpuštěného znečištění vlivem advekce, disperze, sorpce a biodegradace (Wiedemeier et al., 1999)

Pod pojmem biodegradace organických látek rozumíme částečné zjednodušení nebo kompletní rozklad jejich molekulární struktury pomocí fyziologických reakcí, které jsou zprostředkovány mikroorganismy. Mikroorganismy přitom mohou využívat pouze takové reakce, které jsou termodynamicky možné.

Pojem přirozená biodegradace bude používán pro označení biodegradčních procesů, které probíhají v horninovém prostředí samovolně, tj. bez jakéhokoliv technologického zásahu.

Podle terminálního akceptoru elektronu můžeme rozdělit metabolické dráhy organického substrátu (jako donoru elektronů) na

- *Aerobní respiraci*: O_2 slouží jako terminální akceptor elektronu a vystupuje z reakce v redukované formě jako H_2O
- *Anaerobní respiraci*: pokud je vyčerpán O_2 z prostředí, může být nahrazen anorganickými ionty jako jsou NO_3^- (a NO_2^-), SO_4^{2-} nebo CO_2 . Ty jsou redukovány na N_2 , N_2O , NH_3 , S^{2-} nebo CH_4 . Jako terminální akceptory elektronu při anaerobní respiraci mohou dále sloužit např. Fe^{III} nebo organické molekuly (fumarát, apod.)
- *Fermentaci*: donorem i akceptorem elektronu je organická látka (často meziprodukt metabolismu organického zdroje energie). Jako metabolický konečný produkt vzniká více redukovaná organická molekula.

(Hurst et al., 1997)

Podle terminálního akceptoru elektronu můžeme také bakterie rozdělit do tří kategorií:

- *Aerobní bakterie*: bakterie, které mohou využívat pouze molekulární kyslík jako terminální akceptor elektronu. Bez O_2 tyto bakterie nejsou schopné degradace.
- *Fakultativně aerobní / anaerobní bakterie*: bakterie, které mohou využívat molekulární kyslík, ale v jeho nepřítomnosti přecházejí například na využívání NO_3^- a Mn^{IV} nebo Fe^{III} jako terminálních akceptorů elektronu.
- *Striktně anaerobní bakterie*: bakterie, které nemohou využívat molekulární kyslík jako terminální akceptor elektronu a pro které je O_2 toxický. Přestože mohou využívat NO_3^- nebo další sloučeniny, obecně platí, že jako terminální akceptory elektronu upřednostňují SO_4^{2-} a CO_2 .

(EPA, 1999a)

Teoretické pořadí spotřeby terminálních akceptorů elektronu je $O_2 \rightarrow NO_3^- \rightarrow Mn^{IV} \rightarrow Fe^{III} \rightarrow SO_4^{2-} \rightarrow CO_2$ (methanogeneze), což odpovídá pořadí spotřeby terminálních akceptorů elektronu i v nekontaminovaných kolektorech. V terénu však můžeme pozorovat překryv mezi jednotlivými zónami (aerobní, anoxickou, anaerobní) a současné využití několika terminálních akceptorů elektronu.

Výsledkem biodegradace je podzemní voda s nízkým redoxním potenciálem (Eh často < -200 mV) a zvýšenou koncentrací kovů. To je důsledkem rozpouštění MnO_2 a $Fe(OH)_3$ obsažených v pevné fázi a tím uvolnění kovů jako jsou Pb^{2+} a Zn^{2+} , které byly původně na MnO_2 a $Fe(OH)_3$ adsorbovány. Při tomto procesu dochází také ke zvýšení koncentrace celkového anorganického uhlíku ve vodě a ke vzrůstu parciálního tlaku CO_2 a koncentrace celkového rozpuštěného uhlíku (Šrámek et al., 2000a).

Na druhé straně biodegradace některých chlorovaných alifatických uhlovodíků (např. PCE, TCE, CT) může být zahájena pouze v redukčním prostředí. Hlavním procesem je reduktivní dehalogenace, u které dochází k postupné ztrátě atomů chlóru a polutant sám je terminálním akceptorem elektronu. Chlór je odtržen a nahrazen vodíkem. Typické pořadí reakcí např. u PCE je PCE (tetrachlorethen) → TCE (trichlorethen) → 1,2-DCE (1,2-dichlorethen) → VC (vinylchlorid) → ethylen.

Běžně se rozlišují 3 typy prostředí biodegradace chlorovaných alifatických uhlovodíků. Typ 1 odpovídá výskytu chlorovaných uhlovodíků společně s dalším organickým uhlíkem antropogenního původu (např. BTEX). Biodegradace ropných uhlovodíků zajistí redukční prostředí nutné k reduktivní dehalogenaci chlorovaných látek. Typ 2 je charakterizován vysokou přirozenou koncentrací organického uhlíku, jehož přítomnost zajišťuje redukční prostředí. Typ 3 reprezentuje prostředí bez antropogenního a přírodního organického uhlíku a s detekovatelnou koncentrací O₂. V tomto prostředí dochází ke snížení koncentrace některých chlorovaných alifatických uhlovodíků pouze takovými procesy, jako je disperze.

Za oxidačních podmínek je možný biologický atak sloučenin VC, DCE a některých dalších meziproductů reduktivní dehalogenace výsechlorovaných alifatických uhlovodíků. (Šráček et al., 2000a, Wiedemeier et al., 1999)

2.1.5.1. Biodegradace ropných uhlovodíků

V případě biodegradace ropných uhlovodíků se většinou jedná o primární metabolismus, při kterém jsou ropné uhlovodíky využívány jako zdroj uhlíku a energie pro mikroorganismy.

Podle přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpuštěného O₂ jako hlavního terminálního akceptoru elektronu rozlišujeme dva typy biologické oxidace ropných uhlovodíků

- aerobní biodegradace
- anaerobní biodegradace.

2.1.5.1.1. Aerobní biodegradace ropných uhlovodíků

Převážná většina ropných uhlovodíků je rozložitelná aerobní cestou, pokud degradující mikroorganismy mají zajištěn přísun kyslíku a živin potřebných pro využívání ropných uhlovodíků jako zdroje energie.

Obecně jsou alifatické uhlovodíky s menší molekulovou hmotností snadněji rozložitelné a rezistence k biodegradaci stoupá s rostoucí molekulovou hmotností. Relativní rezistence těžších uhlovodíků je kompenzována jejich větším sklonem k sorpci na horninové prostředí, čímž je sníženo riziko plynoucí

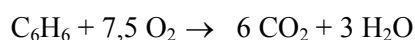
z jejich migrace. Směs ropných uhlovodíků vyžaduje společnou biodegradaci alifatických, aromatických a alicyklických uhlovodíků. Nízkomolekulární aromatické uhlovodíky (BTEX) jsou snadněji degradovatelné v koncentracích odpovídajících rozpustnosti v podzemní vodě. Mineralizace aromatických uhlovodíků na CO₂ a H₂O za aerobních podmínek zahrnuje využití kyslíku jako kosubstrátu enzymů oxygenáz během iniciační fáze metabolismu a později jako terminálního akceptoru elektronu pro produkci energie.

Z hlediska PA jsou obecně nejdůležitější složkou ropného znečištění monoaromatické uhlovodíky BTEX vzhledem k jejich relativně vysoké rozpustnosti ve vodě. To zvyšuje jejich mobilitu a tedy potenciální riziko pro životní prostředí.

Bez vnějšího zásahu dochází v horninovém prostředí k přednostnímu vyčerpání O₂ při biodegradčních procesech. Přirozená aerobní biodegradace bývá spíše limitovaná nedostatkem kyslíku než nedostatkem minerálních živin.

Přesto může být měření obsahu dusíku ve formě NH₄⁺ důležitou informací, neboť se podle Jacksona et.al. (1999) jedná o limitující živinu, která může zvyšovat rychlost biodegradace 2-3x.

Následující vztahy popisují stechiometrii biodegradace ropných uhlovodíků na příkladu benzenu a dále BTEX:



7,5 molů kyslíku (molekulová hmotnost 32 g.mol⁻¹) je potřeba k oxidaci 1 molu benzenu (78 g.mol⁻¹). Z toho vyplývá, že hmotnostní poměr kyslík : benzen je 240 : 78 = 3,08 : 1. K oxidaci 1 g benzenu je potřeba 3,08 g kyslíku. Průměrná hodnota spotřeby kyslíku na oxidaci 1 g jednotlivých komponent BTEX je 3,14 g O₂. Utilizační faktor F pro BTEX je tedy F=3,14.

Utilizační faktory pro ostatní terminální akceptory elektronu nebo meziproducty oxidačně-redukčních dějů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Hodnoty utilizačního faktoru F

Terminální oxidačně-redukční proces	Průměrný hmot. poměr termin. akceptoru elektronu a BTEX	Průměrný hmot. poměr metab. meziproductu a BTEX	Utilizační faktor F pro BTEX (mg.mg ⁻¹)
Aerobní respirace	3,14 : 1	-	3,14
Redukce NO ₃ ⁻	4,9 : 1	-	4,9
Redukce Fe(III)	-	21,8 : 1	21,8
Redukce SO ₄ ²⁻	4,7 : 1	-	4,7
Methanogeneze	-	0,78 : 1	0,78

(Wiedemeier et al., 1999)

Biodegradace ropných uhlovodíků je nejefektivnější při aerobním procesu, přičemž musí být splněny následující podmínky:

- přítomnost aerobních bakterií
- O_2 přítomný v koncentracích vyšších než $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
- přítomnost degradovatelného organického uhlíku
- oxidující podmínky.

Protože rozpustnost O_2 ve vodě je poměrně nízká, dochází v podmínkách přirozené biodegradace ropného znečištění k rychlému přechodu systému do anaerobní oblasti.

2.1.5.1.2. Anaerobní biodegradace ropných uhlovodíků

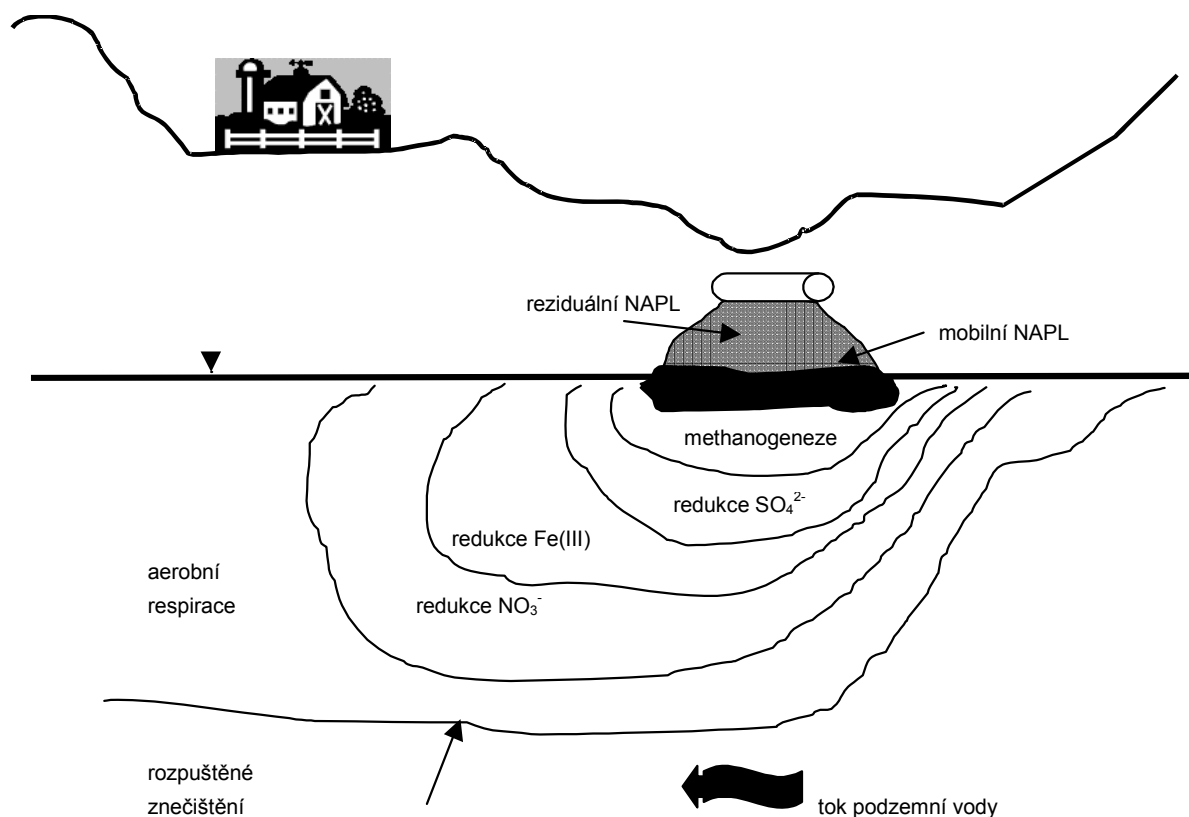
V přirozených podmínkách je anaerobní biodegradace nejvýznamnější proces odstraňující aromatický podíl ropného znečištění (BTEX) z podzemní vody.

Po spotřebování většiny kyslíku rozpuštěného v podzemní vodě nastávají anaerobní podmínky a jako další terminální akceptory elektronu mohou být využívány ionty NO_3^- . Bylo prokázáno, že benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny, naftalen a řada dalších složek ropného znečištění mohou být degradovány, pokud je NO_3^- využíván jako terminální akceptor elektronu. Grishchenkov et.al. (2000) například dokazuje schopnost aerobní i anaerobní degradace ropných uhlovodíků u nitrát redukujících bakterií *Pseudomonas sp.* A *Brevibacillus sp.*

Po spotřebování NO_3^- pak nastupují procesy redukující Fe^{III} v pevné fázi na rozpustný Fe^{II} a oxidace ropného znečištění cestou redukce SO_4^{2-} a nakonec methanogeneze.

Při měření rychlosti jednotlivých anaerobních dějů v laboratorních podmínkách byl pozorován nejrychlejší úbytek ropných uhlovodíků u směsi elektronových akceptorů. Následovala SO_4^{2-} redukce, NO_3^- redukce a methanogeneze (Boopathy, 2004).

Typické rozmístění jednotlivých zón podle terminálních akceptorů elektronu v procesu biodegradace je znázorněno na obrázku 2.



Obr.2: Zobrazení jednotlivých zón při procesu přirozené biodegradace na lokalitě Bemidji v Minnesotě, USA (Wiedemeier et al., 1999)

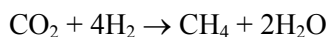
Důležitým ukazatelem charakterizujícím podmínky v prostředí je hodnota oxidačně-redukčního potenciálu (Eh) podzemní vody. Redoxní reakce v podzemní vodě jsou zprostředkovány biologicky, proto stupeň biodegradace jednak ovlivňuje Eh, ale současně je na něm závislý. Mnoho biologických procesů probíhá pouze v rámci určitého rozmezí Eh. Oxidačně-redukční potenciál může být také používán jako indikátor určitých geochemických aktivit (např. redukce síranů, dusičnanů nebo železa). Hodnota Eh v podzemní vodě se obecně pohybuje od 800 mV až k hodnotě -400 mV. Čím menší než nula je hodnota Eh, tím více je prostředí redukční a podmínky v dané oblasti anaerobní. Měření oxidačně-redukčního potenciálu také umožňuje odhadnout velikost a umístění ohniska znečištění. Jeho hodnoty zjištěné v oblasti ohniska bývají nižší než hodnoty naměřené mimo ni. Je to způsobeno anaerobními podmínkami, které běžně nastávají v oblasti ohniska rozpuštěných uhlovodíků.

Následující stechiometrické rovnice znázorňují degradaci organického znečištění (reprezentovaného modelovou sloučeninou CH₂O) v různých redoxních podmínkách.

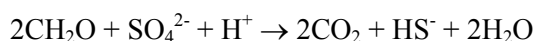
Methanogeneze (redukce CO₂), fermentativní



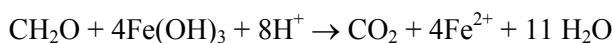
Pozn.: Pro organické znečištění odlišné od modelové sloučeniny vzniká během fermentace H₂, který může být oxidován při současné redukci CO₂:



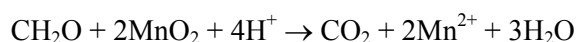
Redukce SO₄²⁻



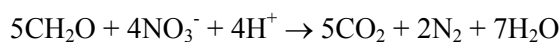
Redukce Fe(III)



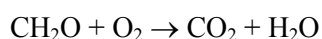
Redukce Mn(IV)



Redukce NO₃⁻



Aerobní respirace (redukce O₂)



(EPA, 1999a)

2.1.6. Modelování procesů přirozené atenuace

Matematické modelování transportu a interakcí složek znečištění může být užitečným nástrojem při hodnocení procesů přirozené atenuace. Model může být nezbytný pro předpověď migrace rozpuštěných látek a odhad koncentrace znečištění v potenciálních recipientech znečištěné podzemní vody (vodní zdroje, toky atd.). Modely je možné dále využít k syntéze, interpretaci a prezentaci dat o kontaminovaném hydrogeologickém systému. Další možností může být simulace a testování jednotlivých alternativ sanace a uplatnění různých sanačních technologií (např. odstranění ohniska znečištění, sanační čerpání, air sparging atd.).

Modelem přirozené atenuace může být takový model, který simuluje proudění podzemní vody v kontaminovaném hydrogeologickém kolektoru, transport a interakce rozpuštěných látek, včetně procesů disperze, sorpce, biodegradace, popřípadě i přechodů mezi fázemi (rozpuštění, odtěkání apod.).

Před zpracováním matematického modelu je nezbytné posoudit, zda je matematický model pro danou lokalitu nezbytný. V případech, kdy je pomocí archivních analytických dat prokázáno postupné zmenšování rozsahu kontaminačního mraku nebo pokles koncentrací znečištění, nemusí být transportní model nezbytný. Může být však využit například pro předpověď, jak dlouho bude trvat pokles koncentrací na určitou úroveň.

Parciální diferenciální rovnice popisující transport a interakce látek, tzv. advektivně-disperzní rovnice (ADR), může být řešena numerickými nebo analytickými metodami.

Analytické řešení ADR je známo pouze pro omezené množství reálných problémů a zpravidla vyžaduje jejich značné zjednodušení (homogenní a izotropní prostředí, v čase konstantní okrajové podmínky apod.). Výhodou je jednoduchost jejich použití a zpravidla nižší konečná cena. Modely, které řeší ADR numerickými metodami, jsou obecně flexibilnější a umožňují zohlednit mnohem více místních podmínek pro konkrétní lokalitu. Nevýhodou může být značná náročnost na množství a kvalitu vstupních dat.

Volba použitého modelu je závislá na jeho zadání (analýza hydrogeologického systému/jednoduchá předpověď maximální délky kontaminačního mraku) a na složitosti koncepčního modelu lokality.

Zatímco analytické modely mohou být dostačující v jednoduchých případech, numerické modely jsou vhodné obecně pro složitější hydrogeologické podmínky (nehomogenní a anizotropní prostředí), v případě časově proměnných okrajových podmínek nebo v případě potřeby modelovat širší rozsah interakcí. Numerické modely jsou rovněž nezbytné pro simulaci procesů atenuace souběžně s dalšími sanačními metodami (např. sanační čerpání v ohnisku znečištění a uplatnění procesů atenuace v okrajových částech kontaminačního mraku).

V některých případech může být účelné pro první fázi hodnocení zpracovat zjednodušený analytický model a pro detailnější popis a prognózy následně podrobný numerický model.

Základní vstupní parametry modelů zahrnují efektivní rychlost proudění podzemní vody, koeficient filtrace, nasycenou mocnost kolektoru, efektivní porozitu, konfiguraci místa zdroje znečištění, vstupní koncentrace znečištění (případně jeho složek), disperzní koeficienty, retardační faktor, rozpadové konstanty atd.

Modely pro simulace přirozené atenuace je možné kromě způsobu řešení ADR dále rozdělit podle použitého popisu odbourávání znečištění (rozpad podle kinetiky 1. řádu, biodegradace omezená dostupností terminálních akceptorů elektronu, Monodův kinetický model).

2.1.6.1. Analytické modely přirozené atenuace

Analytická řešení ADR jsou známá jen pro omezený okruh jednoduchých problémů. Z tohoto důvodu jsou analytické modely vhodné pouze pro relativně jednoduché hydrogeologické systémy.

K dispozici je široký okruh programů využívajících analytická řešení ADR.

K nejdostupnějším patří softwarový program pro simulaci přirozené atenuace rozpuštěných uhlovodíků BIOSCREEN, pracující v prostředí tabulkového procesoru EXCEL (Microsoft Corporation). BIOSCREEN (Newell et al., 1996) byl vyvinut Air Force Center for Environmental Excellence (AFCEE) a je distribuován prostřednictvím EPA a jejích internetových stránek.

Použití modelu BIOSCREEN je omezeno na jednoduché hydrogeologické podmínky a ustálené proudění podzemní vody, bez vlivu dalších faktorů, jako např. sanačního čerpání. BIOSCREEN je součástí programového balíku MoNA Tool Kit, (Carey, 1999), vyvinutého speciálně pro hodnocení a vizualizaci procesů přirozené atenuace.

BIOCHLOR (Aziz et al., 2000) je podobným analytickým modelem jako BIOSCREEN. BIOCHLOR využívá opět prostředí tabulkového procesoru EXCEL, velmi podobné je rovněž jeho ovládání. Tento model je určen pro simulaci přirozené atenuace alifatických chlorovaných uhlovodíků (chlorovaných ethylenů) v sérii na sebe navazujících degradačních reakcí.

Dalším modelem, využívajícím analytické řešení ADR je např. PRINCE (Cushman, 1993).

2.1.6.2. Numerické modely přirozené atenuace

Pro simulaci proudění podzemní vody, transportu a interakce rozpuštěných látek ve složitějších hydrogeologických podmínkách, popřípadě se zahrnutím vlivu dalších faktorů, jako je například sanačního čerpání nebo s časem se měnící okrajové podmínky, jsou výhodnější modely využívající řešení ADR numerickými metodami. Úspěšnost modelového řešení závisí především na správné identifikaci rozhodujících procesů, ovlivňujících transport a degradaci znečištění (sestavení správného koncepčního modelu lokality) a volbě odpovídajícího softwaru.

K jednodušším a volně dostupným softwarovým prostředkům, založeným na numerickém řešení ADR, se řadí modely BIOPLUME II (Rifai et al., 1987) a BIOPLUME III (Rifai et al., 1998).

Model BIOPLUME II simuluje 2D transport a degradaci uhlovodíků v podmínkách, kdy biodegradace je omezena dostupností oxidačního činidla (kyslíku rozpuštěného v podzemní vodě). Dále mohou být zohledněny procesy sorpce (retardace) a podélné a příčné disperze.

BIOPLUME III rozšiřuje předchozí model o možnosti využití dalších oxidačních činidel. Předpoklady, na kterých je BIOPLUME III založen, jsou shodné jako v případě modelu BIOSCREEN.

Dalším podobným modelem je například BIOMOC (Essaid a Benkins, 1997), vyvinutý na stejném základě U. S. Geological Survey.

Velmi dobře propracovaným a podporovaným transportním modelem je RT3D (Clement, 1997). Tento model vychází ze známého modelu transportu rozpuštěných látek MT3D a simuluje transport a interakce rozpuštěných látek v třírozměrném hydrogeologickém kolektoru. K dispozici jsou předdefinované varianty degradačních reakcí (např. okamžitá aerobní biodegradace BTEX, okamžitá biodegradace BTEX s uplatněním více oxidačních činidel, kineticky omezená biodegradace BTEX s uplatněním více oxidačních činidel, postupná anaerobní biodegradace alifatických chlorovaných uhlovodíků, kineticky omezená adsorpce atd.) s možností uživatelské definice vlastních degradačních reakcí. RT3D je podporován řadou komerčních produktů pro simulaci modelování proudění podzemní vody a transportu rozpuštěných látek, jako jsou GMS, Groundwater Vistas, Visual Modflow atd.

2.2. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE – CÍLE PRÁCE

V rámci Programu státní podpory výzkumu a vývoje MŽP ČR VaV/550/1/98 STARÉ ZÁTĚŽE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ byl v letech 1998-2000 zpracován projekt „Indikátory přirozené biodegradační kapacity horninového prostředí“.

Praktickou náplní projektu a **předmětem 1. části této disertační práce bylo terénní ověřování metod navržených pro monitorování přirozené biodegradační kapacity horninového prostředí na vytipované lokalitě kontaminované ropnými uhlovodíky**. Praktické zkušenosti pak sloužily jako podpora při teoretické práci na sestavení metodické příručky *Monitorovaná přirozená atenuace ropných uhlovodíků a chlorovaných alifatických uhlovodíků v podzemní vodě* (Innemanová et. al. 2001), která byla vydána Ministerstvem životního prostředí. Tato metodická příručka je určena jako informační nástroj pro pracovníky státní správy zodpovědné za výběr vhodného nápravného opatření.

Protože poskytnuté finanční prostředky a doba trvání projektu neumožňovaly dlouhodobý monitoring lokality, nejedná se zde o *monitorovanou přirozenou atenuaci* v pravém slova smyslu, kdy dlouhodobý monitoring zcela nahrazuje aktivní sanační zásah. Konkrétní lokalita byla vybrána pouze za účelem praktického ověření navrhovaných metod pro metodickou příručku. Průzkumné práce byly ale rozšířeny o řadu doplňkových testů tak, aby bylo možné co nejpodrobněji vyhodnotit situaci na lokalitě a doporučit finančně nejvýhodnější nápravu současného stavu kontaminace.

Zatímco výsledky ověřování navržené metodiky (tj. porovnávání různých typů analýz, různých způsobů odběrů vzorků a časových prodlev mezi odběrem a analýzou vzorku) jsou předmětem závěrečné zprávy k projektu, která je k dispozici v knihovně MŽP, předkládaná disertační práce se věnuje té části projektu, která vede k vyhodnocení situace na lokalitě, konkrétně důkazu existence přirozené biodegradace jako součásti přirozené atenuace.

2.3. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE - EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hlavní směry řešení první části disertační práce lze rozdělit do těchto základních bodů:

- a) Výběr vhodné lokality a monitorování jednotlivých indikátorů přirozeného biodegradačního procesu na této lokalitě po dobu 7 měsíců.
- b) Porovnání přirozeného procesu snižování obsahu kontaminace přímo na lokalitě a aktivního způsobu dekontaminace s využitím různých stupňů sanace.
- c) Vyhodnocení použitelnosti zvolených metod indikace přirozených degradačních dějů.
- d) Důkaz přítomnosti / absence přirozeného biodegradačního procesu na lokalitě na základě naměřených údajů (data 1. až 3. typu).
- e) Návrh vhodného sanačního opatření pro dočištění lokality

2.3.1. Materiál a metody

2.3.1.1. Použitý materiál a přístrojové vybavení

Při řešení zadání byly použity následující suroviny a přístroje:

analytické terénní sety pro stanovení NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , Fe, Mn, pH (Merck, resp. Macherey Nagel)

Masopeptonový agar č. 2 - *kultivační metody*

syntetické hnojivo NPK- (Lovochemie, Lovosice) – *modelové testy*

motorová nafta, bionafta – *modelové testy*

KOH (0,1M), HCl (0,1M), BaCl₂ (nasycený roztok) - *respirometrie*

H₂SO₄ (koncentrovaná) – *fixace Fe a Mn dle ČSN ISO 6332 a 6333*

inokulum obsahující bakteriální kmeny schválené Státním zdravotním ústavem pro biodegradace ropného znečištění (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) - *modelování sanačního zásahu*

fyzilogický roztok: (9g NaCl do 1l vody)

minerální médium o složení: KH₂PO₄ (8,50 g do 1 l vody), K₂HPO₄ (21,75 g.l⁻¹), Na₂HPO₄.7H₂O (33,40 g.l⁻¹), NH₄Cl (1,72 g.l⁻¹), KCl (10 g.l⁻¹), MgSO₄.7H₂O (22,5 mg.l⁻¹), CaCl₂ bezvodý (27,5 mg.l⁻¹), FeCl₃.6H₂O (0,25 mg.l⁻¹)

třepačka LT2

dvouparametrový kapesní měřicí přístroj MultiLine P3 firmy WTW

pH-kombinovaná elektroda s vestavěným čidlem teploty SenTix 41 od WTW

kyslíková sonda CellOx 325 od WTW

vzduchová kalibrační nádobka OxiCal-Slod WTW

redox-kombinovaná elektroda SenTix ORP od WTW

ruční penetrační souprava EIJELKAMP

biologický termostat BT50

2.3.1.2. Výběr lokality

Po dohodě s odborným garantem MŽP a ve spolupráci s firmou EKORA, s.r.o., byla pro monitoring vybrána lokalita patřící společnosti RÝCHOLKA, s.r.o. v Choustníkově Hradišti. Jedná se o zemědělský podnik, v jehož majetku je čerpací stanice pohonných hmot s podzemním úložištěm nádrží. Vzhledem k dlouhodobé kontaminaci okolního prostředí ropnými uhlovodíky zde byly provedeny průzkumné práce zahrnující posouzení kontaminace půdního vzduchu, zemin a podzemních vod. V zájmovém území (zemědělský dvůr) jsou vybudovány 3 hydrogeologické vrty.

Starou ekologickou zátěží na této lokalitě je míněno zejména řádně nedokončené odstranění dlouhodobé havárie na podzemních vodách, které bylo uloženo rozhodnutím Oblastního inspektorátu České inspekce životního prostředí. (V minulosti zde bylo nařízeno sanační čerpání a stavební úpravy tak, aby nedocházelo k další dotaci ropných látek do horninového prostředí.)

Čerpací stanice pohonných hmot je dosud v provozu. Od r. 1997 je zde čerpána bionafta.

2.3.1.2.1. Popis objektu a údaje o území

Areál mechanizačního střediska Choustníkovo Hradiště je lokalizován v severozápadní části obce. Současná čerpací stanice byla vybudována v r. 1972. K únikům ropných látek docházelo vzhledem k nedostatečnému technickému zabezpečení prostoru stanice pravděpodobně v průběhu celého období jejího využívání. První pokusy o ověření stupně kontaminace byly zahájeny v roce 1987, kdy byl vystrojen monitorovací vrt HV-11. V říjnu r. 1992 byla na základě terénního šetření pracovníků OkÚ v Trutnově zahájena další etapa průzkumných prací zahrnující vyhloubení dalšího sanačně-monitorovacího vrtu CH-2.

Na základě Rozhodnutí RŽP OkÚ v Trutnově ze dne 1.3.1993 bylo zahájeno sanační čerpání pulsačním způsobem na vrtu CH-2 v prostoru čerpací stanice, které probíhalo nepřetržitě od května 1993 do listopadu 1996. Sanační práce byly přerušeny na počátku roku 1997. V průběhu let 1992-1995 proběhla nápravná opatření zahrnující kontrolu těsnosti nádrží a vybudování zpevněné plochy u výdejního místa odkanalizované na lapol se dvěma komorami.

V rámci doplňkového průzkumu v r. 1998 byl vyhlouben třetí vystrojený monitorovací vrt HV-3 do hloubky 10 m p.t. ve směru předpokládaného odtoku podzemní vody od hlavního zdroje kontaminace – stáčiště pohonných hmot. Poloha celkem tří monitorovacích vrtů HV-11, CH-2 a HV-3 a domovní studny (č.p. 26) je vyznačena na obr. 3 v kap. 2.3.1.4.1.

U stávajících vrtů je prokázán přítok pouze z první zvodně báze kvarteru.

Směr proudění podzemní vody v zájmovém území údajně vyznačuje spojnice vrtů CH-2 a HV-3 (obr. 3). Koeficient filtrace se pohybuje k řádu 10^{-5} m.s^{-1} .

(Šifnerová, 1998)

2.3.1.2.2. *Geografická poloha lokality*

Zájmové území se nachází v mírně zvlněném terénu Náchodské pahorkatiny, která je součástí orlického podhůří, mezi Jaroměří a Dvorem Králové.

Hospodářství Choustníkovo Hradiště je situováno při severním okraji intravilánu obce ve vzdálenosti cca 300 m od odbočky z hlavní silnice Jaroměř – Trutnov. Povrch terénu se svažuje k JVv do údolí Kocbeřského potoka.

(Šifnerová, 1998)

2.3.1.2.3. *Geologické poměry na lokalitě*

Zájmové území patří orograficky k oblasti Podkrkonoší. Tektonicky bylo území velmi aktivní a výsledkem byla současná morfologie krajiny s výraznou antiklinálou zvičinskou, radiální poruchou údolím Labe a synklinálou královedvorskou. Skalní podloží je zde tvořeno algonkickým fylity.

Mocnost reliktu spodního turonu se pohybuje mezi 43 - 50 m, cenomanské sedimenty dosahují pouze 21 m. Podle petrografického vývoje zde chybí cenoman sladkovodní. Mořský cenoman je představován jemnozrnnými a hrubozrnnými pískovci se slepencovým obzorem na bázi. Spodní turon je vyvinut ve facii polopevných rozpadových slínovců. Křídová sedimentace končí středním turonem, mladší souvrství včetně části středního turonu byly denudovány. Kvarterní pokrývka, která místy přesahuje 7 m mocnosti, je tvořena zeminami fluvialně-eolitického původu.

(Šifnerová, 1998; Peták, 1997)

2.3.1.2.4. *Hydrogeologické poměry na lokalitě*

Královedvorská hydrogeologická struktura, do které spadá zájmové území, je označena jako rajon M-19.

K dotacím zásob dochází v severním křídle synklinály na výchozech cenomanských pískovců s hojnými rozevřenými puklinami. Hydrogeologickým kolektorem s oživeným pohybem jsou i ve středu pánve pískovce cenomanu a spodní část spodního turonu. Vrchní část spodního turonu a turon střední jsou hodnoceny jako izolátor (artéský strop).

Jak potvrzují doposud provedené hydrogeologické práce, zájmové území leží mimo infiltrační čelo hydrogeologické struktury (výchozy cenomanských pískovců s otevřenou puklinatostí). Zvýšenému vsaku brání sprašový pokryv, omezuje ho vrstva koluviálních zemín s úlomky pískovců a slabě zpevněné jílovce spodnoturonské báze lze hodnotit jako lokální izolátor pro gravitační vody a cenomanský kolektor. U stávajících vrtů je prokázán přítok pouze z 1. zvodně báze kvarteru (resp. z povrchového pásma uvolnění puklin v prostředí středního turonu).

Na vrtu HV-11 byl zřetelně dokumentován přítok jen z báze kvarteru a to v množství $0,24 \text{ l.s}^{-1}$, prakticky od 12 m do 20 m byl profil sterilní. Vrt CH-2 zaznamenal přítok v množství pouze cca $0,05 \text{ l.s}^{-1}$, což jen potvrzuje omezenou propustnost pokryvných vrstev, zvláště prachovitých. Rychlost šíření kontaminantů je v tomto prostředí velmi pomalá a dlouhodobá.

V průběhu režimního kolísání hladin podzemních vod se dostávají maximální stavy v březnu až dubnu a minima v říjnu až listopadu.

(Šifnerová, 1998; Peták, 1997)

2.3.1.2.5. *Geomorfologické poměry na lokalitě*

Z geomorfologického hlediska se území s hodnoceným objektem nachází v severovýchodním cípu subprovincie Česká tabule, při hranici s Krkonošsko – jesenickou subprovincií. Zájmový region spadá do geomorfologického celku Jičínská pahorkatina.

2.3.1.3. Seznam provedených prací

V souladu s pěti hlavními cíly specifikovanými v úvodu kap. 2.3. byly uskutečněny následující práce:

2.3.1.3.1. Monitorování jednotlivých indikátorů přirozeného degradačního procesu na lokalitě

Během období duben – říjen 1999 probíhal na lokalitě Choustníkovo Hradiště monitoring těchto indikátorů přirozeného biodegradačního procesu:

Základní analýzy:

- 1) koncentrace v podzemní vodě: O_2 , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , Fe^{II} , Mn^{II} , nepolární extrahovatelné látky (NEL), ropné uhlovodíky (RU), celkový organický uhlík (TOC) - v místě znečištění a v kontrolních místech
- 2) koncentrace v zemině: NEL

Doplňkové analýzy:

- 3) pH a oxidačně-redukční potenciál podzemní vody
- 4) porovnání kvantitativního zastoupení aerobních bakterií kultivovatelných metodou výsevu na agarové plotny – v místě znečištění a v kontrolních místech
- 5) jednorázové stanovení počtu anaerobních bakterií kultivovatelných metodou výsevu na agarové plotny a jednorázové stanovení bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie – v místě znečištění a v kontrolních místech
- 6) přirozený obsah minerálních živin ve formě NH_4^+ a PO_4^{3-} .

2.3.1.3.2. Porovnání přirozeného procesu snižování obsahu kontaminace přímo na lokalitě a aktivního způsobu dekontaminace s využitím různých stupňů sanace

Modelové testy aktivního způsobu sanace *ex situ* na vzorcích zemin odebraných z kontaminované oblasti byly uskutečněny v laboratoři firmy DEKONTA. Testy zahrnují následující varianty:

- a) bez jakékoliv manipulace
- b) pouze aerace
- c) aerace + dotace minerálních živin
- d) aerace + dotace minerálních živin a bakteriálního inokula schváleného Státním zdravotním ústavem.

2.3.1.3.3. Vyhodnocení použitelnosti zvolených metod indikace přirozených degradačních dějů

Seznam metod navržených pro monitoring lokality je uveden v tabulce 5. Bylo naplánováno ověření jejich použitelnosti v reálných situacích.

Tab. 5: Seznam navržených analýz vzorků z lokality Choustníkovo Hradiště

Ukazatel	Navrhovaná metoda	Ukazatel	Navrhovaná metoda
obsah NEL v podzemní vodě	IČ - spektrometrie	oxidačně-redukční potenciál podzemní vody	potenciometrie
obsah NEL v zemině	IČ - spektrometrie	obsah mikroflóry kultivovatelné na MPA č. 2 v podzemní vodě	výsev na agarové plotny
obsah RU v podzemní vodě	GC	obsah mikroflóry kultivovatelné na MPA č. 2 ve vodném výluhu zemin	výsev na agarové plotny
TOC v podzemní vodě	TC - monitor	obsah anaerobních bakterií v podzemní vodě	výsev na agarové plotny, anaerobní kultivace
obsah NH_4^+ , PO_4^{3-} v podzemní vodě	mobilní analytika	obsah rozpuštěného kyslíku v podzemní vodě	potenciometrie, (jodometrie)
obsah NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , Fe^{II} , Mn^{II} v podzemní vodě	mobilní analytika, spektrofotometrie	celkový obsah mikroflóry v podzemní vodě	fluorescenční mikroskopie
pH	potenciometrie	celkový obsah mikroflóry ve vodném výluhu zemin	fluorescenční mikroskopie

2.3.1.3.4. *Důkaz přítomnosti/absence přirozeného biodegradačního procesu na lokalitě na základě naměřených údajů*

V následujícím textu jsou uvedeny předpokládané změny koncentrací sledovaných indikátorů (kap. 2.3.1.3.1.) v podzemní vodě, pokud proces přirozené biodegradace skutečně nastal:

O₂ ... negativní korelace s koncentrací kontaminantu (elektronový akceptor)

NO₃⁻ ... negativní korelace s koncentrací kontaminantu (elektronový akceptor)

SO₄²⁻ ... negativní korelace s koncentrací kontaminantu (elektronový akceptor)

Fe^{II} ... pozitivní korelace s koncentrací kontaminantu (produkt redukce nerozpustného Fe^{III})

Mn^{II} ... pozitivní korelace s koncentrací kontaminantu (produkt redukce Mn^{IV})

Ostatní předpokládané změny:

redox-potenciál ... pokles v místě kontaminace

NEL, RU ... klesající trend koncentrace v místě znečištění

Bakteriální osídlení... korelace s koncentrací kontaminantu, případně důkaz netoxicity prostředí

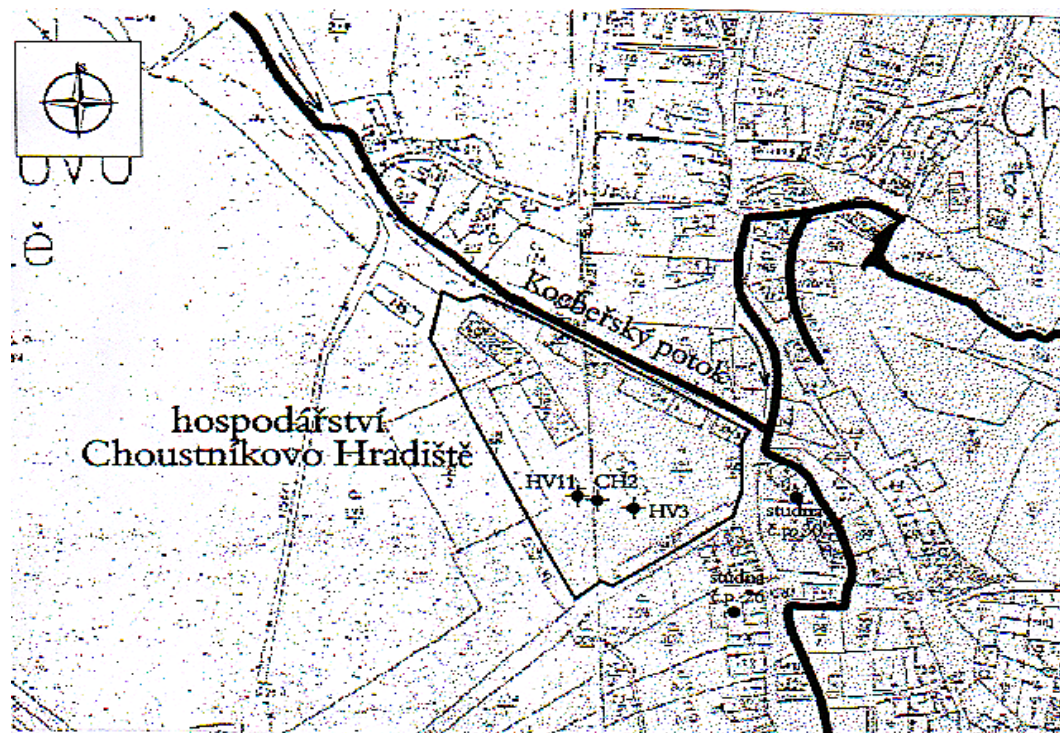
Rozdíly v jednotlivých ukazatelích mezi kontaminovanou oblastí a kontrolním místem a prokázané korelační vztahy slouží k důkazu přítomnosti přirozeného biodegradačního procesu.

Do hodnocení byly dále zahrnuty výsledky laboratorních testů zaměřených na zjištění adaptovanosti autochtonní mikroflóry, respirometrických dat a biologické rozložitelnosti daného kontaminantu.

2.3.1.4. Monitorovací objekty a rozsah provedených prací

2.3.1.4.1. Objekty pro monitorování podzemních vod

Pro sběr hydrochemických a mikrobiologických dat byly využity 3 hydrogeologické vrty HV-11, CH-2 a HV-3 a domovní studna v č.p. 26 (obr. 3).



Obr. 3: Rozmístění odběrových míst pro monitoring podzemních vod

Charakteristika odběrových míst:

V ohnisku znečištění (cca 1 m SV od stojanu na stáčení pohonných hmot) je umístěný vrt CH-2 (vystrojen v r. 1992). V letech 1993-1996 zde probíhalo sanační čerpání, při kterém došlo k vytěžení cca 16 kg NEL. V té době byla zřejmě odstraněna volná fáze ropných látek na hladině podzemní vody. Vrt CH-2 byl nyní použit pro monitoring hydrochemických dat v ohnisku znečištění. (Dokumentace vrtu v příloze 1).

Vrt HV-11 umístěný cca 10 m SZ proti směru proudění podzemní vody byl vystrojen v r. 1987 a jeho dokumentace není k dispozici. Tento vrt nyní sloužil jako kontrolní odběrové místo pro monitoring hydrochemických dat před stykem podzemní vody s ohniskem znečištění.

Vrt HV-3 byl vystrojen v r. 1998 pro posouzení možného šíření kontaminace směrem od zdroje. Vrt je umístěný cca 30 m JV od hlavního zdroje kontaminace ve směru předpokládaného odtoku podzemní vody. Nyní byl použit pro monitoring hydrochemických dat po průchodu podzemní vody ohniskem znečištění za předpokladu, že vrt zasahuje do kontaminačního mraku. (Dokumentace vrtu v příloze 1).

Při odběru dynamických vzorků dne 26.5.1999 bylo prokázáno, že žádný z uvedených vrtů není zanesený.

Domovní studna v č.p. 26 umístěná cca 200 m JV po směru proudění podzemní vody od zdroje kontaminace sloužila jako kontrolní odběrové místo při sběru hydrochemických dat.

2.3.1.4.2. Objekty pro monitorování zemin

Poprvé byly vzorky zemin odebrány dne 26.5.1999 pomocí penetrační soupravy EIJELKAMP (odběrová místa 1-3, obr. 4). Protože se nepodařilo proniknout přes pevnou vrstvu pískovců pravděpodobně obsahující znečištění, v žádném ze tří odebraných vzorků nebyla zjištěna výrazná kontaminace NEL.

Vzorek zemin obsahující mírně zvýšenou koncentraci NEL se podařilo získat dne 29.9.1999, kdy byl v prostoru stáčiště pohonných hmot pomocí soupravy WIRTH B00 vyhlouben nevystrojený vrt do hloubky 9 m. Umístění vrtu je zakresleno na obrázku 4.

2.3.1.4.3. *Analýzy vzorků podzemních vod*

Uskutečněné analýzy vzorků podzemních vod z vrtů HV-11, CH-2, HV-3 a domovní studny v č.p. 26 jsou shrnuty v tabulce 6. Statické odběry vzorků provedla firma DEKONTA, a.s., dynamické odběry firma VODNÍ ZDROJE CHRUDIM, s.r.o.

Tab. 6: *Uskutečněné analýzy vzorků podzemních vod.*

Způsob odběru	29.4.	26.5.		29.6.	5.8.	24.8.	14.9.		26.10.
	statický	statický	dynam.	statický	statický	statický	statický	dynam.	statický
NEL (IČ-spektrometrie) – lab.	*	*	*	*	*	*	*	*	
BTEX (GC) – lab.									*
RU (GC) – lab.				*					
TOC – lab.				*					*
pH – ter.	*	*	*	*	*	*	*	*	
O ₂ – ter.	*	*	*	*	*	*	*	*	
E _h – ter.				*	*	*	*	*	
Fe – ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
Fe – lab.				*	*	*	*	*	
Mn – ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
Mn – lab.				*	*	*	*	*	
SO ₄ ²⁻ - ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
SO ₄ ²⁻ - lab.	*	*	*	*	*	*	*	*	
NO ₃ ⁻ - ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
NO ₃ ⁻ lab.	*	*	*	*	*	*	*	*	
NO ₂ ⁻ - ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
NO ₂ ⁻ - lab.	*	*	*	*	*	*	*	*	
NH ₄ ⁺ - ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
PO ₄ ³⁻ - ter. – MAS	*	*	*	*	*	*	*	*	
CFU - aerob. kultivace –lab.		*	*	*	*	*	*	*	
CFU - anaerob. kultivace –lab.							*	*	
celkový počet bakterií – fluorescenč. mikroskopie – lab.							*	*	

* uskutečněná analýza

zkratky: *ter.- MAS* ... mobilní analytické sety

ter. ... měřeno v terénu pomocí mobilního přístroje MultiLine P3 od firmy WTW

lab. ... měřeno v laboratoři s příslušnou specializací

Analýzy označené *ter.-MAS* a *ter.* byly vždy prováděny v terénu ihned po odběru vzorku, dále po převozu vzorku do laboratoře firmy DEKONTA a po 24 h skladování v chladničce.

2.3.1.4.4. *Analýzy vzorků zemin*

U vzorků zemin odebraných 26.5. 1999 byl stanoven obsah NEL. Zeminy byly dále použity při testech adaptovanosti autochtonní mikroflóry na daný kontaminant (kap. 2.3.1.5.4.). Protože v těchto vzorcích nebylo prokázáno znečištění ropnými uhlovodíky, bylo dále nutné odebrat vzorek zemin z hloubky do 9 m v bezprostřední blízkosti stáčiště pohonných hmot, aby mohla být provedena bližší charakteristika znečištění.

Obsah NEL byl stanoven u vzorků zemin z hloubek 0-3 m, 3-6 m, 6-7 m, 7-8 m, 8-9 m.

Dále byl stanoven počet CFU.g⁻¹ zeminy při aerobní kultivaci a celkový počet bakterií ve výluhu metodou fluorescenční mikroskopie.

Směsný vzorek kontaminovaných zemin byl použit pro modelové testy sanačního zásahu (kap. 2.3.1.5.4.).

2.3.1.4.5. Modelové laboratorní testy

U vzorků odebraných z lokality byly provedeny následující laboratorní testy:

- a) testy schopnosti původní mikroflóry z podzemních vod a zemin lokality Choustníkovo Hradiště degradovat motorovou naftu.
- b) respirační testy vzorků kontaminovaných zemin pro posouzení schopnosti autochtonní mikroflóry degradovat daný kontaminant.
- c) testy aktivního způsobu sanace na vzorcích kontaminovaných zemin (vzorky odebrané dne 29.9. 1999). Jednalo se o porovnání variant:
 - s dotací minerálních živin, bakteriálního inokula a aerací
 - s dotací minerálních živin a aerací
 - s aerací
 - kontrola bez aktivního zásahu.
- d) testy biologické rozložitelnosti kontaminantu (nafta a bionafta) a jeho porovnání s kontrolou (abiotické změny) a se současným charakterem znečištění na lokalitě Choustníkovo Hradiště. Pro podrobnější popis stupně degradace kontaminantu v modelových testech i v reálném prostředí byla použita metoda porovnávání obsahu relativně stabilních složek znečištění - rozvětvených uhlovodíků *fytan* (3,7,11,15-tetramethylhexadekan) a *pristan* (3,7,11,15-tetramethylpentadekan) vůči celkovému obsahu ropných uhlovodíků.

2.3.1.5. Použité metody

2.3.1.5.1. Metody pro monitorování podzemních vod

V tabulce 7 je uveden přehled metod použitých při monitorování podzemních vod. Metody označené DEKONTA (byly prováděny v místě odběru, případně po převozu do laboratoří firmy DEKONTA, a.s.) jsou podrobněji popsány v kapitole 2.3.1.5.3. U ostatních metod se jedná o standardní postupy používané příslušnými komerčními laboratořemi.

Tab. 7: Přehled použitých metod.

Ukazatel	Metodika (laboratoř)
NEL	IČ-spektrometrie (Kaučuk Kralupy)
BTEX	GC (Aquatest)
RU	GC (Analytické laboratoře Plzeň)
TOC	TC-monitor (Analytické laboratoře Plzeň)
pH	přenosný měřicí přístroj –DEKONTA
O ₂	přenosný měřicí přístroj –DEKONTA
E _h (oxidačně-redukční potenciál)	přenosný měřicí přístroj –DEKONTA
Fe	mobilní analytické sety firmy Macherey Nagel – DEKONTA spektrofotometrie (VZ Chrudim)
Mn	mobilní analytické sety firmy Macherey Nagel – DEKONTA spektrofotometrie (VZ Chrudim)
SO ₄ ²⁻	mobilní analytické sety firmy Macherey Nagel – DEKONTA spektrofotometrie (VZ Chrudim)
NO ₃ ⁻	mobilní analytické sety firmy Merck a Macherey Nagel – DEKONTA spektrofotometrie (VZ Chrudim)
NO ₂ ⁻	mobilní analytické sety firmy Merck a Macherey Nagel – DEKONTA spektrofotometrie (VZ Chrudim)
NH ₄ ⁺	mobilní analytické sety firmy Merck
PO ₄ ³⁻	mobilní analytické sety firmy Merck
CFU - aerob. kultivace	výsevy na agarové plotny – DEKONTA
CFU - anaerob. kultivace	výsevy na agarové plotny (G-servis)
celkový počet bakterií	fluorescenční mikroskopie (Výzkumný ústav vodohospodářský – Praha)

2.3.1.5.2. Metody pro analýzu zemin

V tabulce 8 je uveden přehled metod použitých při analýze zemin. Metody označené DEKONTA (byly prováděny v laboratořích firmy DEKONTA, a. s.) jsou podrobněji popsány v kapitole 2.3.1.5.3.

U ostatních metod se jedná o standardní postupy používané příslušnými komerčními laboratořemi.

Tab. 8: Přehled použitých metod

Ukazatel	Metodika (laboratoř)
NEL	IČ-spektrometrie (Kaučuk Kralupy)
CFU – aerobní kultivace	výsevy na agarové plotny – DEKONTA
celkový počet bakterií	fluorescenční mikroskopie (Výzkumný ústav vodohospodářský – Praha)
produkce CO ₂ - respirometrie	titrační metoda - DEKONTA

2.3.1.5.3. Popis jednotlivých metod

V této kapitole bude uveden pouze popis metod, které byly prováděny v laboratořích firmy DEKONTA, a.s. Ostatní analýzy byly prováděny subdodavatelsky a popis jednotlivých metod je předmětem provozních řádů příslušných laboratoří.

Stanovení obsahu Fe, Mn, SO₄²⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺ a PO₄³⁻ pomocí mobilní analytiky

Stanovení uvedených ukazatelů bylo prováděno vždy v terénu ihned po odběru (obr. 5), dále po převozu vzorku do laboratoře a po 24 h skladování vzorku v chladničce. Vzorky byly převáženy ve skleněných lahvích tak, aby neobsahovaly vzduchovou bublinu.

Stanovení obsahu minerálních živin ve formě NH₄⁺ a PO₄³⁻ bylo prováděno pomocí analytických setů firmy Merck. Jejich správnost byla ověřena ve třech nezávislých laboratořích.

Stanovení obsahu Fe, Mn, SO₄²⁻, NO₃⁻ a NO₂⁻ v podzemní vodě bylo prováděno pomocí analytických setů firmy Macherey Nagel, resp. Merck. Kontrolu prováděla laboratoř VZ Chrudim. Při práci s mobilními analytickými sety bylo postupováno vždy přesně podle příslušného návodu.



Obr. 5: Terénní laboratoř.

Měření pH, oxidačně-redukčního potenciálu a obsahu rozpuštěného O₂

Stanovení uvedených ukazatelů bylo prováděno vždy v terénu ihned po odběru, dále po převozu vzorku do laboratoře a po 24 h skladování vzorku v chladničce. Vzorky byly převáženy ve skleněných lahvích tak, aby neobsahovaly vzduchovou bublinu.

Měření pH pomocí přenosného přístroje MultiLine P3 s pH kombinovanou elektrodou SenTix 41, měření oxidačně-redukčního potenciálu s redox-kombinovanou elektrodou SenTix ORP a stanovení obsahu rozpuštěného O₂ kyslíkovou sondou Cellox 325 probíhalo podle manuálu přístroje MultiLine P3.

Před každým měřením bylo nutné provést kalibraci všech elektrod.

Při měření bylo nutné s elektrodami ve vzorku zvolna pohybovat, aby bylo zajištěno obtékání membrány kapalinou.

Stanovení počtu CFU s aerobní kultivací

Pro stanovení koncentrace bakterií kultivační technikou byly vzorky převáženy ve skleněných vzorkovnicích v chladicí brašně.

Stručný popis metody:

- pro vytvoření ředící řady byl používán fyziologický roztok
- desetinásobné ředění vzorku podzemní vody poskytlo ředící řadu

- agarové plotny obsahující komplexní médium (Masopeptonový agar č. 2) byly inokulovány z každého ředění duplicitně
- počet buněk na 1 ml vody byl vypočítán z množství kolonií na desce narostlých po 48 h inkubaci při 30°C.

2.3.1.5.4. Modelové testy

Testy schopnosti autochtonní mikroflóry degradovat motorovou naftu

U vzorků podzemních vod z lokality Choustníkovo Hradiště odebraných dne 26.5.1999 byly provedeny testy schopnosti autochtonní mikroflóry rozkládat motorovou naftu.

50 ml vzorku z každého odběrového místa (u HV-11, CH-2 a HV-3 statický i dynamický odběr) bylo umístěno do sterilní Erlenmayerovy baňky. Sterilní kontaminant (nafta) byl přidán v množství 2% (hm.). Obsah baňky byl smíchán v poměru 10:1 se sterilním roztokem minerálních živin (v desetinásobné koncentraci minerálního média) a třepán na třepačce. Jako kontrola sloužil vzorek bez přídavku nafty.

Na základě nárůstu koncentrace vyselektovaných bakteriálních kultur v přítomnosti nafty jako jediného zdroje uhlíku byla posuzována adaptovanost autochtonní mikroflóry.

Změna koncentrace bakteriálních buněk byla hodnocena pomocí kultivačních metod (kap. 2.3.1.5.3.).

Respirační test vzorku zemin

Respirační test kontaminovaných zemin byl uskutečněn jako další důkaz schopnosti autochtonní mikroflóry degradovat přítomný kontaminant.

Vzorky kontaminovaných zemin odebrané dne 29.9.1999 byly rozděleny do dvou skupin. První skupina byla ponechána jako kontrolní, do vzorků druhé skupiny byl přidán zdroj minerálních živin (hnojivo NPK v množství 3 g na 1 kg zeminy) pro podporu metabolismu autochtonní mikroflóry. Aerace byla zajištěna kypřením.

U obou skupin byla měřena 24 h respirace v průběhu jednoho týdne.

Měření 24 h respirace:

- Na dno uzavíratelné nádoby bylo rovnoměrně navrstveno 50 g zeminy a ovlhčeno 10 ml destilované vody. Na půdu byla položena skleněná tyčinka ve tvaru V a na ni Petriho miska s 10 ml 0,1M KOH a 2 kapkami fenolftaleinu. Nádoba byla neprodyšně uzavřena a inkubována při 22°C.

- Po 24 h byla miska vyjmuta, hydroxid kvantitativně přelit do titrační baňky při dvojnásobném propláchnutí misky destilovanou vodou, byl přidán 1 ml nasyceného roztoku BaCl₂ a hydroxid byl titrován roztokem 0,1M HCl z růžové do úplného odbarvení.
- Současně byl titrován slepý pokus (stejně uspořádání bez zeminy).
- Byl zjištěn rozdíl mezi titrací hydroxidu z nádoby se zeminou a ze slepého pokusu. Výsledek byl přepočítán na 100 g suché půdy a případně na 24 h za předpokladu, že 1 ml spotřebovaného 0,1M KOH váže 2,2 mg CO₂.

Výsledek respiračního testu bývá uveden v **mg CO₂. 24 h.⁻¹.100 g⁻¹ sušiny** a je slovně hodnocen podle následujících údajů:

Tab .9: Slovní hodnocení respirace

mg CO ₂ . 24 h. ⁻¹ .100 g ⁻¹ sušiny	Slovní hodnocení
< 5	velmi slabá
5 – 10	slabá
10 – 40	střední
40 – 150	silná
> 150	velmi silná

Testy biologické rozložitelnosti kontaminantu a jeho porovnání se současným charakterem znečištění na lokalitě

Pro testy biologické rozložitelnosti byly použity dva typy kontaminantu:

nafta – na lokalitě s ní bylo manipulováno do roku 1997

bionafta – na lokalitě je používána od r. 1997.

Jako kontrolní vzorek sloužila varianta pokusu, kde testovaný kontaminant podléhal pouze abiotickým změnám (mikroorganismy byly usmrceny).

Vzorek motorové nafty a vzorek bionafty (odebraný z čerpací stanice pohonných hmot) byl vždy v množství 2% (hm.) přidán do Erlenmayerovy baňky s minerálním médiem a adaptovaným inokulem. Při laboratorní teplotě a intenzivním provzdušňování na třepačce probíhal od 2.6.1999 po dobu 5ti měsíců biologický rozklad testovaného kontaminantu.

Kontrolní vzorek – bez inokulace a fixovaný formaldehydem na 2% (hm.) – sloužil k posouzení abiotického úbytku nafty během pokusu.

V závěru pokusu bylo provedeno chromatografické a spektrální porovnání kvality kontaminantu

- původního (nafta a bionafta odebraná z čerpací stanice pohonných hmot)

- částečně degradovaného po 5ti měsících intenzivního biologického rozkladu v laboratorních podmínkách
- pozměněného abiotickými vlivy po 5ti měsících aerace v laboratorních podmínkách
- potenciálně pozměněného působením přirozených biodegradačních dějů (vzorek odebraný na lokalitě).

Chemické analýzy provedly Analytické laboratoře Plzeň (GC/MS a GC/FID) a laboratoř Kaučuk, Kralupy (IČ-spektrometrie).

Testy aktivního způsobu sanace na vzorcích kontaminovaných zemin

Vzorek kontaminovaných zemin z lokality Choustníkovo Hradiště byl získán dne 29.9.1999. V bezprostřední blízkosti stáčíště pohonných hmot (cca 1,5 m od stojanu) byly odebrány vzorky zemin do hloubky 9 m (obr. 4, kap. 2.3.1.4.2.).

Modelové testy sanace *ex situ* probíhaly ve zkrácené podobě od 6.10.1999 do 4.11.1999 a simulovaly čtyři stupně sanačního zásahu:

pouze odtěžení bez další možnosti aerace

odtěžení + aerace

odtěžení + dotace minerálních živin + aerace

odtěžení + dotace minerálních živin a bakteriálního inokula + aerace

Směsný vzorek zemin odebraných z hloubky 6-7 m o koncentraci NEL 530 g.kg⁻¹ byl rozdělen na 4 části o hmotnosti 300 g. Pro dosažení maximální rychlosti degradace probíhaly modelové testy ve vzosu, tj. po doplnění každého vzorku vodou na výsledný objem 1 l byl vzorek provzdušňován třepáním na třepáčce.

Varianty sanačního zásahu u vzorků zemin:

bez manipulace

300 g zemin doplněné vodou na objem 1 l, aerace

300 g zemin doplněné vodou na objem 1 l, aerace, přídavek 1 g hnojiva NPK

300 g zemin doplněné vodou na objem 1 l, aerace, přídavek 1 g hnojiva NPK, 10 ml směsného bakteriálního inokula schváleného Státním zdravotním ústavem pro biodegradace ropných uhlovodíků.

Rozdíl v rychlosti degradace znečištění u jednotlivých variant byl posuzován na základě koncentrace NEL ve vzorcích na začátku a po 4 týdnech trvání pokusu. Obsah NEL byl stanoven metodou IČ-spektrometrie v laboratoři Kaučuk Kralupy.

2.3.1.5.5. *Statistické metody*

Pro získání informace, zda hodnoty NEL naměřené v ohnisku znečištění (vrt CH-2) mají klesající trend, byl použit „Mann-Kendallův test pro malé soubory“ (vhodný pro analýzu méně než 10ti časových dat z jednoho odběrového místa).

Pro vyhodnocení korelačních vztahů mezi hydrochemickými daty a obsahem NEL, RU, resp. TOC v odběrových místech HV-11, CH-2, HV-3 a č.p. 26 byl aplikován „test korelačního koeficientu“ (Meloun, 1994).

2.3.2. Výsledky

2.3.2.1. Výsledky monitorování lokality

Tato kapitola je členěna podle 3 základních souborů dat, které charakterizují proces přirozeného ubývání kontaminace na lokalitě (přirozené atenuace):

Data 1. typu

Historická databáze dokazuje stabilizaci ohniska znečištění a/nebo pokles celkového množství znečištění v čase. (Data 1. typu neposkytují vysvětlení, který z mechanismů je příčinou přirozeného úbytku znečištění na lokalitě.)

Data 2. typu

Chemická a hydrochemická data dokazují spotřebu elektronových akceptorů a donorů a zvýšení obsahu metabolických meziproduktů. (Data 2. typu poskytují informace konkrétně o procesu přirozené biodegradace, tj. součásti přirozené atenuace.)

Data 3. typu

Mikrobiologická data dokazují přítomnost biodegradace a poskytují odhad degradačních poměrů.

2.3.2.1.1. Výsledky sběru dat 1. typu

Souhrn historických dat z lokality:

V tabulce 10 jsou shrnuty výsledky stanovení NEL, které byly v minulosti uskutečněny a byly dohledány v dokumentaci firmy EKORA. Dále jsou zde uvedeny výsledky posledních odběrů. U vrtu CH-2 jsou uvedeny hodnoty NEL od r. 1997, kdy bylo ukončeno sanační čerpání. Vrt HV-3 byl vyhlouben 29.1.1998. Jako údaj za r. 1999 je uvedena průměrná hodnota NEL (směrodatná odchylka) vypočítaná ze 6ti měření uskutečněných v měsících duben až září.

Při odběru ze dne 26.10.1999 nebyl v žádném z odběrových míst zjištěn obsah BTEX v hodnotě přesahující detekční limit $0,2 \mu\text{g.l}^{-1}$, proto nejsou aromatické ropné uhlovodíky dále sledovány.

Tab. 10: Obsah NEL v podzemní vodě

Vrt CH-2		Vrt HV-3	
Datum odběru	NEL (mg.l ⁻¹)	Datum odběru	NEL (mg.l ⁻¹)
23.1.1997	3,1		
18.2.1997	1,53	2.2.1998	0,13
29.1.1998	1,3	11.2.1998	360*
1999	0,96 ± 0,39	1999	0,24 ± 0,23

* Po vystrojení vrtu HV-3 byla na hladině podzemní vody zastižena volná fáze ropných látek

Výsledky statistického testu:

Mann-Kendallův test pro malé soubory (analýza časových dat z jednoho odběrového místa) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byl aplikován na hodnoty NEL z vrtu CH-2.

Mann-Kendallův test na hladině významnosti 0,05 pro $n=4$:

datum měření NEL (mg.l ⁻¹)	23.1.1997	18.2.1997	29.1.1998	1999	počet kladných rozdílů	počet záporných rozdílů
3,1		z	z	z	0	3
1,53			z	z	0	2
1,3				z	0	1
					0	6

z...záporný rozdíl

Hodnota $S = \text{počet } k - \text{počet } z$

$$S = 0 - 6 = -6$$

Pro velikost souboru $n=4$ a absolutní hodnotu $S=6$ najdeme pravděpodobnost p (tab. v příloze 2): $p=0,042$

$S < 0, p < \alpha (0.042 < 0.05) \Rightarrow$ zamítáme nulovou hypotézu, lze tvrdit, že data vykazují klesající trend

2.3.2.1.2. Výsledky sběru dat 2. typu

Za data 2. typu považujeme hodnoty hydrochemických ukazatelů v podzemní vodě. Změny v koncentracích elektronových akceptorů a dceřinných produktů dokumentují proces přirozené biodegradace na lokalitě. Hodnota oxidačně-redukčního potenciálu podzemní vody slouží jako indikátor aerobních, resp. anaerobních podmínek.

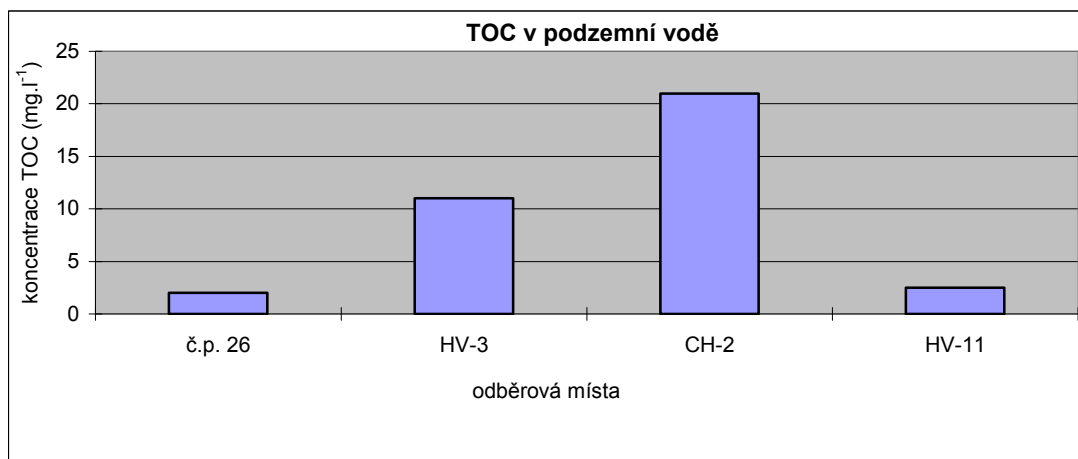
Výsledky monitorování obsahu elektronových akceptorů a hodnot oxidačně-redukčního potenciálu v podzemní vodě

V grafech 1 až 7 jsou vyneseny průměrné hodnoty hydrochemických dat z jednotlivých vrtů za celé monitorovací období a jejich směrodatné odchylky. Grafy znázorňují rozdíl mezi jednotlivými vrty a vzájemný vztah mezi jednotlivými indikátory a obsahem kontaminace ve vrtu. Tyto údaje byly podkladem pro vyhodnocení korelačních vztahů pomocí testu korelačního koeficientu.

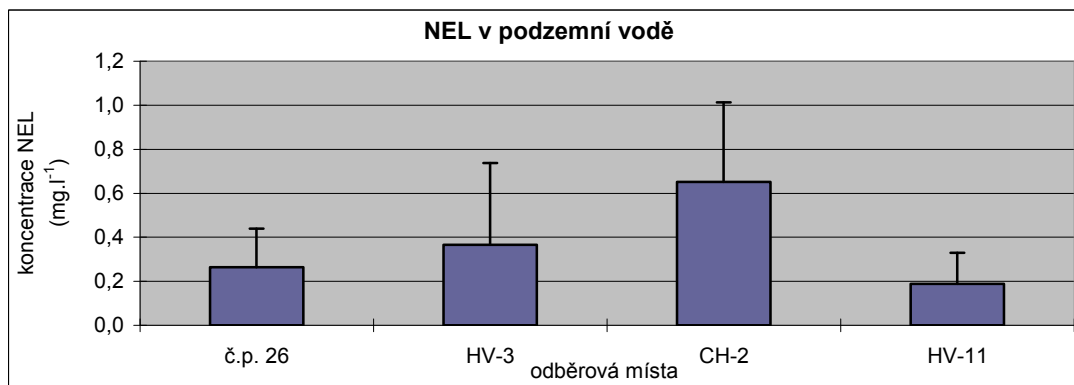
Výsledky screeningu rozpuštěného O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , Mn, Fe a oxidačně-redukčního potenciálu ve vzorcích podzemních vod z odběrových míst HV-11, CH-2, HV-3 a č.p. 26 jsou dále shrnuty v celkem 56 grafech, které jsou součástí závěrečné zprávy projektu VaV/550/1/98 STARÉ ZÁTĚŽE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ a jsou k dispozici v knihovně MŽP.

Jsou zde uvedeny všechny naměřené hodnoty v období duben až září 1999. Grafy dokumentují rozdíly mezi jednotlivými metodami, vývoj naměřených hodnot v čase (případné sezónní změny) a změny v naměřených hodnotách v důsledku převozu vzorků nebo jejich 24 h skladování. Svým rozsahem přesahují rámec této disertační práce a budou proto pouze rámcově diskutovány v kapitole 2.4.

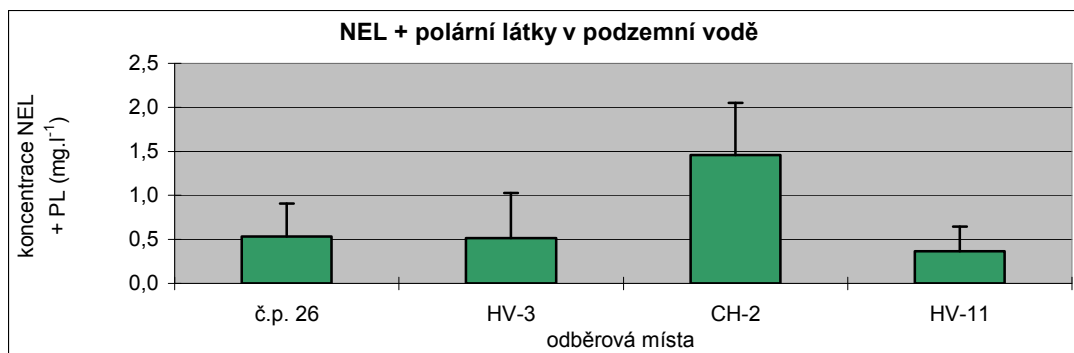
Graf č. 1



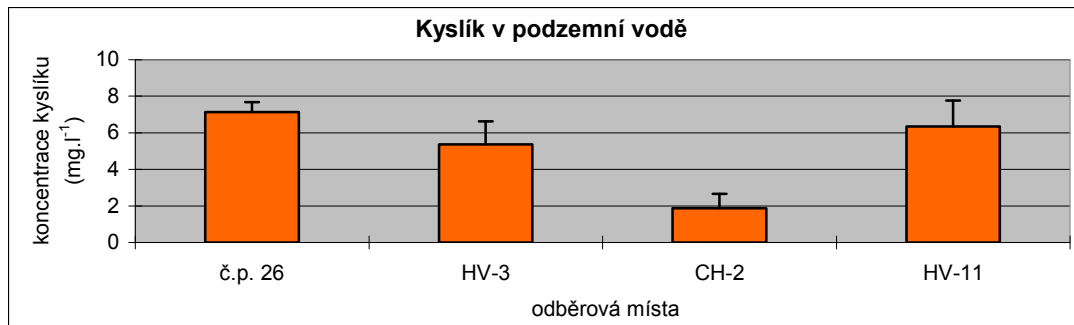
Graf č. 2



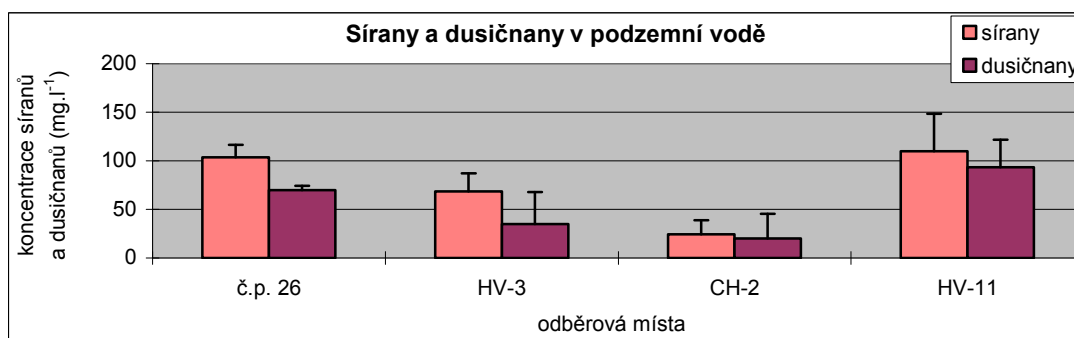
Graf č. 3



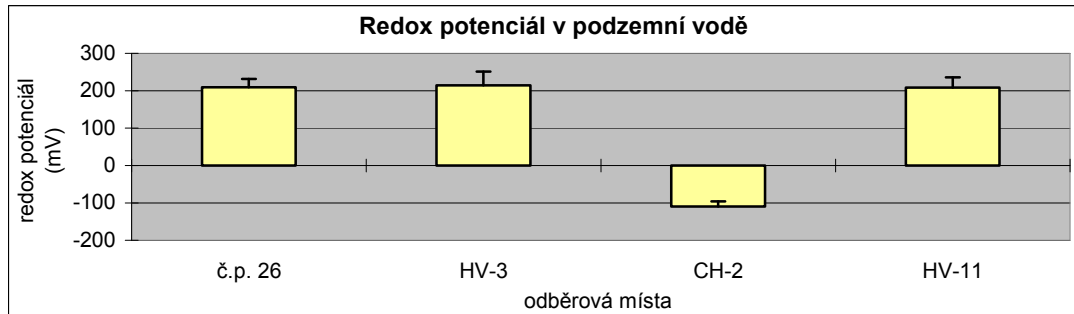
Graf č.4



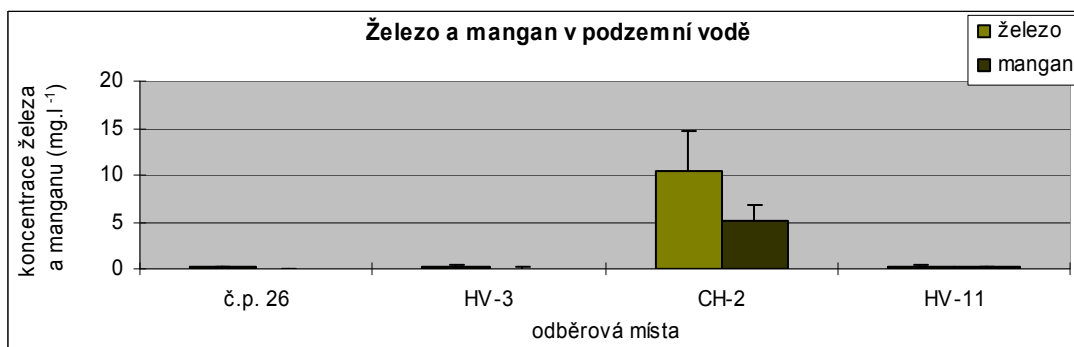
Graf č. 5



Graf č. 6



Graf č.



Výsledky měření pH a obsahu minerálních živin

Průměrné hodnoty pH a průměrný obsah minerálních živin ve formě NH_4^+ a PO_4^{3-} jsou uvedeny v tabulce 11. (Dusík ve formě NO_3^- byl monitorován jako potenciální elektronový akceptor). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky jsou vypočítány z 5ti měření uskutečněných v průběhu sezóny 1999.

Tab. č. 11: Průměrné hodnoty pH a průměrné koncentrace minerálních živin

	č.p. 26	HV-3	CH-2	HV-11
pH (Měřicí přístroj MultiLine P3)	$7,1 \pm 0,18$	$6,8 \pm 0,05$	$6,7 \pm 0,04$	$6,6 \pm 0,05$
Obsah NO_3^- (mg.l^{-1})	$69,8 \pm 4,6$	$20,2 \pm 4,0$	$2,8 \pm 1,1$	$83,4 \pm 19,0$
Obsah NH_4^+ (mg.l^{-1})	0	0	0	0
Obsah PO_4^{3-} (mg.l^{-1})	$2,8 \pm 0,4$	$6,5 \pm 3,5$	$1,4 \pm 1,0$	$0,5 \pm 0,2$

Výsledky testu korelačního koeficientu

Byly zkoumány korelační vztahy mezi obsahem kontaminace v jednotlivých vrtech vyjádřeným jako NEL, RU, resp. TOC a obsahem jednotlivých elektronových akceptorů, dceřinných produktů a hodnotou oxidačně-redukčního potenciálu.

Obsah celkového organického uhlíku (TOC) nelze reprodukovat jako obsah znečištění. Hodnota TOC na lokalitě Choustníkovo Hradiště však s největší pravděpodobností reprezentuje zbytkové znečištění a produkty jeho biologického rozkladu, protože hodnoty TOC v kontrolních odběrových místech jsou velmi nízké.

Výsledky testu korelačního koeficientu jsou uvedeny v tabulkách 12 - 14.

Tab. 12: Zdrojová data pro test korelačního koeficientu

Vrt	TOC	NEL	RU	kyslík	E_h	sírany	mangan	železo	pH	dusičnany
čp. 26	2,00	0,26	0,53	7,01	209,75	103,50	0,04	0,11	7,34	69,78
HV-3	11,00	0,37	0,52	3,29	214,50	68,50	0,06	0,35	7,08	34,80
CH-2	21,00	0,65	1,46	1,70	-109,75	24,42	5,16	9,91	7,02	19,95
HV-11	2,50	0,19	0,37	5,08	208,25	109,83	0,12	0,24	6,93	93,43

Tab. 13: Korelační koeficienty

	<i>TOC</i>	<i>NEL</i>	<i>RU</i>	<i>kyslík</i>	<i>E_h</i>	<i>sírany</i>	<i>mangan</i>	<i>železo</i>	<i>pH</i>	<i>dusičnany</i>
<i>TOC</i>	1,0000									
<i>NEL</i>	0,9739	1,0000								
<i>RU</i>	0,9026	0,9652	1,0000							
<i>kyslík</i>	-0,9335	-0,8303	-0,7288	1,0000						
<i>E_h</i>	-0,8791	-0,9288	-0,9867	0,7407	1,0000					
<i>sírany</i>	-0,9961	-0,9858	-0,9142	0,9008	0,8784	1,0000				
<i>mangan</i>	0,8857	0,9318	0,9864	-0,7518	-0,9999	-0,8841	1,0000			
<i>železo</i>	0,8944	0,9383	0,9878	-0,7618	-0,9994	-0,8930	0,9998	1,0000		
<i>pH</i>	-0,3165	-0,1454	-0,1398	0,5995	0,2680	0,2311	-0,2787	-0,2788	1,0000	
<i>dusičnany</i>	-0,9120	-0,9028	-0,7652	0,7932	0,6791	0,9352	-0,6856	-0,6989	-0,0090	1,0000

Tab. 14: Testy korelačních koeficientů:

	<i>TOC</i>	<i>NEL</i>	<i>RU</i>	<i>kyslík</i>	<i>E_h</i>	<i>sírany</i>	<i>mangan</i>	<i>železo</i>	<i>pH</i>	<i>dusičnany</i>
<i>TOC</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>NEL</i>	6,067		0	0	0	0	0	0	0	0
<i>RU</i>	2,966	5,219		0	0	0	0	0	0	0
<i>kyslík</i>	-3,683	-2,107	-1,505		0	0	0	0	0	0
<i>E_h</i>	-2,608	-3,544	-8,594	1,559		0	0	0	0	0
<i>sírany</i>	-15,873	-8,310	-3,191	2,934	2,599		0	0	0	0
<i>mangan</i>	2,698	3,632	8,473	-1,612	-84,690	-2,676		0	0	0
<i>železo</i>	2,829	3,837	8,972	-1,663	-41,923	-2,806	73,046		0	0
<i>pH</i>	-0,472	-0,208	-0,200	1,059	0,393	0,336	-0,410	-0,411		0
<i>dusičnany</i>	-3,144	-2,968	-1,681	1,842	1,309	3,735	-1,332	-1,382	-0,013	

Kritická hodnota pro hladinu významnosti 10% a 4-2=2 stupně volnosti je 2,290 (tab. v příloze 2).

Pokud je absolutní hodnota testu korelačního koeficientu větší než kritická hodnota, lze korelaci považovat za významnou (červené hodnoty).

Porovnání statického a dynamického odběru podzemních vod

Hydrochemické údaje získané při statickém a dynamickém odběru podzemních vod jsou porovnány tabulce 15.

Z dat získaných zejména v ohnisku znečištění (CH-2) je zřejmé, že hodnoty naměřené u vzorků odebraných dynamickým způsobem jsou vždy příznivější z hlediska znečištění lokality. (Hodnoty sledovaných ukazatelů se více blíží hodnotám z kontrolních míst.)

Tab. 15: Porovnání statických a dynamických odběrů.

Ukazatel	Datum odběru	č.p. 26	HV-3	CH-2	HV-11
NEL (mg.l⁻¹)	26.5.1999	0,6	0,33 / 0,11	0,73 / 0,05	0,03 / <0,03
	14.9.1999	< 0,03	0,04 / < 0,03	5,36 / 1,09	< 0,03 / < 0,03
Fe (mg.l⁻¹)	26.5.1999	< 0,1	0,41 / < 0,1	14,5 / 7,05	0,37 / < 0,1
	14.9.1999	< 0,1	0,12 / 0,16	10,2 / 5,3	0,16 / 0,12
Mn (mg.l⁻¹)	26.5.1999	0,05	0,19 / 0,58	5,29 / 2,3	0,41 / 0,06
	14.9.1999	< 0,05	0,07 / 0,27	4,28 / 3,9	< 0,05 / 0,06
SO₄²⁻ (mg.l⁻¹)	26.5.1999	109	75 / 119	< 25 / 64	126 / 102
	14.9.1999	110	107 / 99	52 / 67	84 / 82
NO₃⁻ (mg.l⁻¹)	26.5.1999	71,8	19,3 / 76,1	3,1 / 45,3	112 / 124
	14.9.1999	74,9	108 / 75,7	41,2 / 49,3	99,2 / 100
O₂ (mg.l⁻¹)	26.5.1999	7,7	2,35 / 3,85	0,2 / 5,45	4,4 / 4,9
	14.9.1999	7,28	6,2 / 6,4	2,54 / 5,75	6,85 / 6,90
E_h (mV)	14.9.1999	208	215 / 154	-101 / -25	228 / 206

Hodnoty před lomítkem statický odběr

Hodnoty za lomítkem ... dynamický odběr

U domovní studny č.p. 26 nebyly dynamické odběry vzorků vody prováděny

2.3.2.1.3. Výsledky sběru dat 3. typu

Data 3. typu se opírají o modelové laboratorní testy simulující podmínky na lokalitě. Z časových a ekonomických důvodů bylo v této práci získávání dat 3. typu omezeno na důkaz přítomnosti mikroflóry adaptované na daný kontaminant v podzemní vodě a zemině nenasycené zóny.

Výsledky testů adaptovanosti přirozené mikroflóry:

Dne 27.5.1999 byly zahájeny testy adaptovanosti přirozené mikroflóry u vzorků zemin a podzemních vod odebraných na lokalitě 26.5.1999. Jednalo se o vzorky podzemních vod z vrtů HV-3, CH-2, HV-11 a domovní studny č.p. 26. Vzorky zemin byly odebrány ze tří různých míst v okolí monitorovaných vrtů. Zemina byla odebrána vždy z maximální hloubky dosažené pomocí soupravy EIJELKAMP (na začátek vrstvy pískovců). U vzorků zemin většinou nebyla zjištěna výrazná kontaminace NEL (viz tab. 16).

Tab. 16: Hodnoty NEL u vzorků zemin (odběrová místa jsou zakreslena na obrázku 4 v kapitole 2.3.1.4.2.)

Odběrové místo	NEL (mg.kg ⁻¹)
1	27
2	9
3	238

U všech vzorků vod a vodních výluhů zemin (v poměru 1:1) byla dokázána přítomnost mikroorganismů schopných degradovat motorovou naftu.

Přítomnost adaptované mikroflóry se projevila nárůstem počtu kolonie-tvořících jednotek (CFU) během aerobní kultivace na agarových plotnách u vzorků s přidavkem minerálních živin a sterilní motorové nafty o průměrně 3 řády ve srovnání s kontrolou.

Jako kontrola byl vždy použit příslušný vzorek obohacený o minerální živiny, ale bez přidavku nafty.

Doba kultivace: 10 dní.

Tab. 17: Koncentrace aerobních bakterií kultivovatelných na MPA u vzorků vod a vodních výluhů zemin – testy adaptovanosti

vzorek	CFU.ml ⁻¹ - vstup	CFU.ml ⁻¹ – po 10 dnech kultivace	
		kontrola	nafta
č.p. 26 – voda	1,8.10 ²	1,6.10 ⁵	2,6.10 ⁸
HV-11 – voda	5.10 ²	3,8.10 ⁵	1,5.10 ⁸
CH-2 – voda	50	5,7.10 ⁵	1,2.10 ⁹
CH-2 –voda (dynam. odběr)	1.10 ³	1,5.10 ⁶	6,7.10 ⁷
HV-3 – voda	1,5.10 ³	5,1.10 ⁵	1.10 ⁸
č. 1 – výluh zeminy	2,4.10 ⁵	2,4.10 ⁶	3,3.10 ⁸
č. 2 – výluh zeminy	1,2.10 ⁴	1,1.10 ⁶	4,4.10 ⁸
č. 3 – výluh zeminy	2,8.10 ⁵	6,8.10 ⁵	3,6.10 ⁸

Výsledky respiračních testů zemin:

V tabulkách 18 až 21 jsou uvedeny údaje o 24 hodinové respiraci jednotlivých vzorků měřené každodenně po dobu jednoho pracovního týdne. Data jsou pro srovnání doplněna o výsledky mikrobiologických analýz.

Jedná se zeminy znečištěné motorovou naftou, které byly získány při vyhloubení nevystrojeného vrtu do hloubky 9 m dne 29.9.1999.

Tab. 18: Respirační test vzorku zemin odebraného z hloubky 3-6 m.

Vstupní koncentrace NEL: $27,5 \pm 2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$					
	doba měření	prvních 24 h	druhých 24 h	třetích 24 h	čtvrtých 24h
přídavek živin	respirace ($\text{mg CO}_2.100\text{g}^{-1}.24\text{h}^{-1}$)	3,19	18,74	9,8	16,4
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$6,2.10^6$	$1,3.10^7$	$1,6.10^7$	$2,7.10^7$
kontrola bez přídavku živin	respirace ($\text{mg CO}_2.100\text{g}^{-1}.24\text{h}^{-1}$)	1,65	7,86	7,05	2,54
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$1,1.10^7$	1.10^7	6.10^6	$2,3.10^6$

Respirace vzrostla po přídavku minerálních živin průměrně 3x.

Tab. 19: Respirační test vzorku zemin odebraného z hloubky 6-7 m.

Vstupní koncentrace NEL: $521 \pm 39 \text{ mg.kg}^{-1}$					
	doba měření	prvních 24 h	druhých 24 h	třetích 24 h	čtvrtých 24h
přídavek živin	respirace ($\text{mg CO}_2.100\text{g}^{-1}.24\text{h}^{-1}$)	8,45	40,34	14,15	43,62
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$1,7.10^7$	$1,8.10^7$	$4,4.10^7$	$2,8.10^7$
kontrola bez přídavku živin	respirace ($\text{mg CO}_2.100\text{g}^{-1}.24\text{h}^{-1}$)	6,67	7,3	6,9	6,06
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	8.10^6	1.10^7	$1,3.10^6$	$8,6.10^6$

Respirace vzrostla po přídavku minerálních živin průměrně 4x.

Tab. 20: Respirační test vzorku zemin odebraného z hloubky 7-8 m.

Vstupní koncentrace NEL: $436 \pm 6 \text{ mg.kg}^{-1}$					
	doba měření	prvních 24 h	druhých 24 h	třetích 24 h	čtvrtých 24h
přídavek živin	respirace ($\text{mg CO}_2.100\text{g}^{-1}.24\text{h}^{-1}$)	41,09	62,01	35,76	90,43
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$2,7.10^7$	4.10^7	$1,7.10^8$	$4,3.10^7$
kontrola bez přídavku živin	respirace ($\text{mg CO}_2.100\text{g}^{-1}.24\text{h}^{-1}$)	15,01	10,11	15,40	7,82
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$4,4.10^6$	$1,1.10^7$	$1,2.10^7$	$7,4.10^6$

Respirace vzrostla po přídavku minerálních živin průměrně 5,7x.

Tab. 21: Respirační test vzorku zemin odebraného z hloubky 8-9 m.

Vstupní koncentrace NEL: $175 \pm 25 \text{ mg.kg}^{-1}$					
	doba měření	prvních 24 h	druhých 24 h	třetích 24 h	čtvrtých 24h
přídavek živin	respirace ($\text{mg CO}_2 \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$)	27,74	65,03	68,82	59,16
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^7$
kontrola bez přídavku živin	respirace ($\text{mg CO}_2 \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$)	10,92	12,46	12,73	7,11
	počet CFU.g ⁻¹ (aerobní)	$8,6 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$

Respirace vzrostla po přídavku minerálních živin průměrně 5,3x.

Výsledky mikrobiologických analýz vzorků vod zemin z Lokality Choustníkovo Hradiště:

Porovnání počtu aerobních a anaerobních bakterií kultivovatelných na MPA v jednotlivých odběrových místech na lokalitě Choustníkovo Hradiště jsou shrnuty v tabulkách 22 a 23.

Tab. 22: Výsledky mikrobiologických analýz podzemních vod na lokalitě Choustníkovo Hradiště.

odběrové místo:	č.p. 26	HV-3	CH-2 (ohnisko znečištění)	HV-11
CFU.ml ⁻¹ (aerobní kultivace) průměr z 5ti měření	$7,4 \cdot 10^2 \pm$ $4,5 \cdot 10^2$	$8,4 \cdot 10^2$ $\pm 4,5 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^2$ $\pm 1,3 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^3$ $\pm 1 \cdot 10^3$
CFU.ml ⁻¹ (anaerobní kultivace)	$1,7 \cdot 10^4$	$7,2 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$
celkový počet bakterií.ml ⁻¹ (přímé počítání – fluorescenční mikroskopie)		$5,1 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^7$

Tab. 23: Výsledky mikrobiologických analýz zemin z lokality Choustníkovo Hradiště – vrt ze dne 29.9.1999.

odběr z hloubky:	0-3 m	3-6 m	6-7 m	7-8 m	8-9 m
NEL (mg.kg^{-1}) průměr ze 3 měření	$6,75 \pm 4,25$	$27,5 \pm 2,5$	521 ± 39	436 ± 6	175 ± 25
popis vzorku	navážky	písčité hlíny, slabý zápach po naftě	písčité štěrky, slabý zápach po naftě	úlomky šedých pískovců, zápach po naftě	šedé pískovce, slabý zápach po naftě
CFU.g ⁻¹ (aerobní kultivace)	$2 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^4$
celkový počet bakterií.g ⁻¹ (přímé počítání – fluorescenční mikroskopie)	x	x	X	$1,1 \cdot 10^5$	x

x ... pro silný zákal vodného výluhu nepočitatelné

2.3.2.2. Výsledky doplňkových laboratorních testů

2.3.2.2.1. Výsledky testu degradovatelnosti nafty a bionafty

Výsledky laboratorního testu biologické rozložitelnosti motorové nafty a bionafty (na lokalitě je stáčena od r. 1996) jsou uvedeny v tabulce 24.

Dále bylo provedeno kvalitativní porovnání kontaminantu odebraného z lokality (zemina odebraná z hloubky 6-7 m v bezprostřední blízkosti stojanu na stáčení pohonných hmot) a nafty resp. bionafty ve třech stavech: beze změn, po biodegradaci, pouze abiotické změny (Kaučuk Kralupy, Analytické laboratoře Plzeň).

V IČ-spektrech kontaminantu před a po biodegradaci byly sice zaznamenány určité změny v obsahu $-CH_3$ a $-CH_2-$ skupin, ale pozorované změny nebyly dostatečně definovatelné, aby bylo možné tuto metodu využít k jednoznačnému určení stupně rozkladu neznámého znečištění ropného původu.

Konkrétnější informace poskytlo chromatografické porovnání jednotlivých typů znečištění.

Z charakteru chromatogramu nafty před a po biodegradaci (viz příloha 3) je patrné, že poměr intenzit píků alifatických uhlovodíků v kontaminantu vůči stabilnímu pristanu a fytanu je diametrálně odlišný. Rozvětvené alifatické uhlovodíky pristan (3,7,11,15-tetramethylpentadekan) a fytan (3,7,11,15-tetramethylhexadekan) v systému motorová nafta-voda a bionafta-voda vykazují při biodegradaci výrazně vyšší stabilitu, než základní složky obou médií, tj. uhlovodíky C_{12} až C_{15} . Stabilita se projevuje v poklesu poměru obsahu jednotlivých základních uhlovodíků nafty vůči obsahu pristanu a fytanu v naftě po degradačním procesu.

Při aplikaci zjištěných trendů na posouzení stupně degradace ropné kontaminace analyzovaných reálných vzorků zemin z lokality Choustníkovo Hradiště (kontaminace identifikována jako motorová nafta bez přítomnosti bionafty) lze **celkový stupeň degradace odhadnout na přibližně 90 % oproti původnímu stavu motorové nafty**. (Pokles poměru intenzit píků chromatogramů, tj. poměrů obsahů jednotlivých základních složek motorové nafty vůči stabilním markerům, se pohybuje na úrovni 3 až 15 % výchozího stavu.)

Zjišťování stupně biologického odbourání na základě chromatografického porovnání relativního obsahu perzistentních markerů (rozvětvené uhlovodíky fytan a pristan) a snadno degradovatelných složek se jeví jako metoda využitelná pro kontaminace surovou ropou, naftou a oleji.

Tab. 24: Zůstatek motorové nafty a bionafty po 5ti měsících biologického rozkladu a abiotického ubývání.

	motorová nafta			bionafta		
	vstup	abiotické změny	biodegradace	vstup	abiotické změny	biodegradace
celkové množství znečištění v 250 ml baňce (mg)	4 100	3 200	150	4 150	2 330	15
úbytek (%)	-	22	96,3	-	44	99,6

2.3.2.2.2. Výsledky modelových testů sanace ex situ

Pokles obsahu kontaminantu v zemině po 4 týdenním testu biodegradace *ex situ* a při různých stupních sanačního zásahu je uveden v tabulce 25.

Tab. 25: Výsledné koncentrace NEL při modelové sanaci ex situ.

Vstupní koncentrace NEL (mg.kg ⁻¹)	Koncentrace NEL po 4 týdnech aerace (mg.kg ⁻¹)	Koncentrace NEL po 4 týdnech aerace + dotace živin (mg.kg ⁻¹)	Koncentrace NEL po 4 týdnech aerace + dotace živin + inokulace (mg.kg ⁻¹)
530	150	235	221

2.4. MONITOROVANÁ PŘIROZENÁ ATENUACE – DISKUSE VÝSLEDKŮ

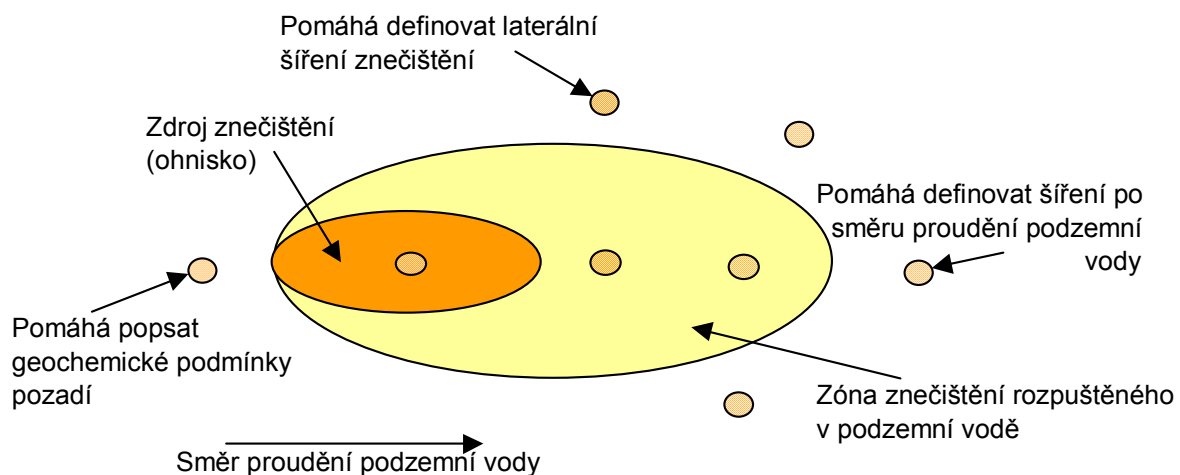
Tato kapitola bude členěna na dvě základní části:

- a) diskuse všech výsledků získaných při monitoringu lokality a z laboratorních testů
- b) diskuse výsledků podle 5 hlavních cílů řešení projektu popsanych v úvodu kapitoly 2.3.

2.4.1. Diskuse výsledků získaných z monitoringu lokality a z laboratorních testů

2.4.1.1. Data 1. typu na lokalitě Choustníkovo Hradiště

Pod pojmem data 1. typu rozumíme historickou databázi údajů o znečištění podzemních vod (případně zemin). Statistickým vyhodnocením časových dat získáme informaci o trendu obsahu koncentrace v jednotlivých odběrových místech. Odběrová místa pro sběr dat 1. typu musí být umístěna v ohnisku znečištění a v místě rozšíření kontaminace ve směru proudění podzemní vody tak, aby bylo možné monitorovat případný pohyb kontaminačního mraku. Nejvhodnější rozmístění monitorovacích vrtů je schematicky znázorněno na obrázku 6.



Obr. 6: Schéma rozmístění monitorovacích objektů pro screening procesů přirozené atenuace (Wiedemeier et al., 1999)

Z odběrových míst popsanych v kapitole 2.3.1.4. bylo na lokalitě Choustníkovo Hradiště možné shromáždit historická data k vrtům CH-2 a HV-3 (jedná se pouze o 3 uplynulé roky u CH-2 a 2 roky u HV-11). Vrt CH-2 se nachází přímo v ohnisku znečištění, vrt HV-3 po směru proudění podzemní vody. Tento počet odběrových míst je pro monitoring horizontálního a vertikálního pohybu

kontaminace nedostačující, ale vzhledem k současným podmínkám na lokalitě nebylo možné ani nutné vystrojit další hydrogeologický vrt.

Statistickým vyhodnocením historických a současných údajů o koncentraci NEL v ohnisku znečištění (vrt CH-2) byl zjištěn trend přirozeného ubývání kontaminace na lokalitě.

Porovnáním historických a současných údajů u vrtu HV-3 bylo zjištěno pravděpodobné ustupování kontaminačního mraku.

Na postupnou redukci celkového objemu znečištění (a nikoliv na únik znečištění do místa, které nebylo monitorováno) usuzujeme z následujících informací:

- nízká propustnost horninového prostředí na lokalitě (koeficient filtrace $k 10^{-5} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) a tedy velmi omezená možnost migrace znečištění
- rozdíly v hydrochemických indikátorech mezi ohniskem znečištění a kontrolními místy, které dokazují intenzívně probíhající proces přirozené biodegradace (viz. následující kapitola).

2.4.1.2. Data 2. typu na lokalitě Choustníkovo Hradiště

Pod pojmem data 2. typu rozumíme hodnoty hydrochemických ukazatelů v podzemní vodě. Změny v koncentracích elektronových akceptorů a dceřinných produktů a pokles oxidačně-redukčního potenciálu dokumentují proces přirozené biodegradace na lokalitě. Data 2. typu již poskytují informaci o tom, jakou měrou se na procesu přirozeného úbytku kontaminace podílí biodegradace.

Na lokalitě Choustníkovo Hradiště byly vztahy mezi sledovanými hydrochemickými indikátory u jednotlivých vrtů následující (kap. 2.3.2.1.2.):

O_2 (elektronový akceptor) ... statisticky významná negativní korelace s obsahem TOC

NO_3^- (elektronový akceptor) ... statisticky významná negativní korelace s obsahem NEL a TOC

SO_4^{2-} (elektronový akceptor) ... statisticky významná negativní korelace s obsahem NEL, RU a TOC

Fe^{II} (dceřinný produkt redukce Fe^{III})... statisticky významná pozitivní korelace s obsahem NEL, RU a TOC

Mn^{II} (dceřinný produkt redukce Mn^{IV})... statisticky významná pozitivní korelace s obsahem NEL, RU a TOC

E_h (oxidačně-redukční potenciál)... statisticky významná negativní korelace s obsahem NEL, RU a TOC

pH... nekoreluje s obsahem znečištění (neutrální pH na lokalitě)

Popsané korelační vztahy jsou jednoznačným důkazem probíhající přirozené biodegradace na lokalitě Choustníkovo Hradiště. Bez podrobné znalosti hydrogeologických poměrů a celkového množství znečištění však nelze tento proces kvantifikovat.

V místě s nejvyšší koncentrací kontaminantu (vrt CH-2 v bezprostřední blízkosti stojanu na stáčení pohonných hmot) dochází zjevně k posunu mikrobiálních procesů do anaerobní oblasti. Dokazuje to záporná hodnota oxidačně-redukčního potenciálu, velmi nízká koncentrace rozpuštěného O_2 a NO_3^- , hromadění rozpustných forem $Fe^{(II)}$ a $Mn^{(II)}$ a snížená koncentrace SO_4^{2-} . Podle zbytkového obsahu SO_4^{2-} a hodnoty oxidačně redukčního potenciálu lze usuzovat, že v současné době probíhá v okolí vrtu CH-2 anaerobní biodegradační proces v podmínkách redukce SO_4^{2-} .

V podzemní vodě byl navíc sledován obsah minerálních živin ve formě NH_4^+ a PO_4^{3-} (kap. 2.3.2.1.2.). Z výsledků stanovení vyplývá, že proces přirozené biodegradace na lokalitě nemůže být limitován nedostatkem minerálních živin. Dusík ve formě NH_4^+ nebyl zjištěn v žádném pozorovacím místě, ale ve formě NO_3^- je přítomen v dostatečném množství. Nízké koncentrace NO_3^- ve vrtu CH-2 (ohnisko znečištění) také nemohou být při současné situaci limitním faktorem, protože v tomto vrtu dochází k biologickému odbourávání za anaerobních podmínek a bylo dokázáno, že při pomalých anaerobních dějích již dochází k recyklaci minerálních živin z odumřelých mikroorganismů (Widemeier et al., 1999).

Z porovnání hydrochemických údajů získaných při statickém a dynamickém způsobu odběru vzorků (kap. 2.3.2.1.2.) zřejmě vyplývá, že ložisko znečištění je v současné době velmi malé – vyčerpané. Zejména na výsledcích analýz podzemní vody z vrtu CH-2 (tab. 15) je patrný posun spíše k požadovým hodnotám u sledovaných parametrů v případě dynamického odběru. Jedná se tedy pravděpodobně o zbytkové znečištění v bezprostřední blízkosti stojanu na stáčení pohonných hmot (vrt CH-2). Při odběru vzorků zemin z vrtu umístěného cca 1 m od CH-2 dne 29.9.1999 byla nejvyšší koncentrace NEL zjištěna v hloubce 5-7 m a to maximálně 560 mg/kg.

2.4.1.3. Data 3. typu na lokalitě Choustníkovo Hradiště

Data 3. typu se opírají o mikrobiologické údaje z lokality a z laboratorních testů. Cílem jejich získávání je zjištění potenciálu místní mikroflóry degradovat daný kontaminant.

Pozitivní výsledky testu adaptovanosti přirozené mikroflóry (kap. 2.3.2.1.3.) dokazují přítomnost mikroorganismů schopných degradovat naftu ve všech odběrových místech saturované i nesaturované zóny.

O potenciálu místní mikroflóry degradovat přítomný kontaminant svědčí také výsledky respiračních testů na vzorcích zemin (kap. 2.3.2.1.3.). Při zajištění ideálních podmínek pro aerobní biodegradační proces došlo k výraznému zvýšení produkce CO_2 a toto zvýšení bylo úměrné obsahu kontaminace v zemině.

Z pouhého porovnání mikrobiologických analýz vzorků podzemních vod (kap. 2.3.2.1.3.) u jednotlivých odběrových míst nelze usuzovat zda proces přirozené biodegradace na lokalitě probíhá. U vzorků podzemní vody z vrtu CH-2 byla naměřena nižší koncentrace aerobních kultivovatelných bakterií o 0,5 - 1 řád oproti ostatním odběrovým místům. Toto snížení lze vysvětlit nedostatkem rozpuštěného kyslíku v ohnisku znečištění a tedy potlačení růstu aerobních bakteriálních kmenů. Při anaerobní kultivaci se však žádný rozdíl mezi ohniskem znečištění a kontrolními místy neprojevil. Kultivační ani přímé stanovení počtu mikroorganismů v odběrových místech nebylo v tomto případě použitelné jako indikátor přirozené biodegradace na lokalitě, přestože by mělo být podle literatury použito jako doplňková metoda jejího určování (Kao et al., 2001). Údaj o počtu bakterií však může poskytnout orientační informaci o výskytu toxických podmínek pro mikroorganismy a proto by měl být zohledněn.

2.4.1.4. Modelové testy sanace ex situ

Vzorek zemin zapáchajících po naftě byl odebrán dne 29.9.1999. Přestože byl vrt situován přímo v ohnisku znečištění (cca 1 m od stojanu na stáčení pohonných hmot, přibližně ve směru proudění podzemní vody), nejvyšší zjištěná koncentrace NEL v hloubce 6 - 7 m představovala 560 mg.kg^{-1} .

Příčinou opožděného odběru vzorků kontaminovaných zemin byla nepoužitelnost penetrační soupravy EIJKAMP pro proražení vrstvy pískovců. Byl proto se zpožděním realizován nevystrojený vrt do hloubky 9 m, jemuž ale předcházela podrobný průzkum stáčiště pohonných hmot. Musela být totiž vyloučena přítomnost elektroinstalací, vodovodních a kanalizačních rozvodů apod. v místě budoucího vrtu.

Plánované testy sanace zemin z lokality Choustníkovo Hradiště tedy bylo nutné realizovat ve zkráceném čase (4 týdny). Simulovaný proces sanace proto probíhal „ve vznosu“, aby byla dosažena maximální rychlost biodegradace.

U všech variant sanačního zásahu (kap. 2.3.2.2.2.) došlo za 4 týdny k poklesu obsahu NEL o více než 50% oproti vstupní hodnotě a variantě bez zásahu. Významné rozdíly mezi jednotlivými variantami s aerací nebyly pozorovány.

Pravděpodobným výsledkem zkrácených testů sanace je závěr, že rychlost procesu úplného dočištění lokality je limitována pouze přísunem kyslíku.

2.4.1.5. Testy degradovatelnosti nafty a bionafty

Smyslem testů degradovatelnosti nafty a bionafty bylo kvalitativní a kvantitativní porovnání uměle kontaminovaných vzorků vod, kdy kontaminant (nafta, resp. bionafta) byl po dobu 5ti měsíců vystaven

- a) biologickým změnám při intenzivní podpoře biodegradace
- d) abiotickým změnám při potlačení biologických procesů přidavkem formaldehydu.

Porovnáním IČ-spekter a chromatogramů a nafty a bionafty na začátku procesu, po biologických a abiotických změnách a původního znečištění v zemině odebrané na lokalitě Choustníkovo Hradiště byly získány následující informace (kap. 2.3.2.2.1., příloha 3):

- Charakter současného znečištění na lokalitě nejvíce odpovídá naftě po dlouhodobém působení oxidačních procesů (pravděpodobně biologických). K nové dotaci znečištění nedochází - přítomnost bionafty, se kterou je na lokalitě manipulováno od r. 1996 nebyla v odebraném vzorku zemin prokázána.
- Byly pozorovány výrazné kvalitativní změny v charakteru IČ - spekter nafty a bionafty vystavené biodegradačnímu procesu oproti variantě b) nebo počátečnímu stavu. Přesto porovnání relativního obsahu CH_3 - a $-\text{CH}_2$ - skupin při vyhodnocování IČ – spekter kontaminantu není dostačující metodou pro odhad stupně degradace kontaminantu.
- Chromatografickým porovnáním relativního obsahu snadno oxidovatelných n-alkánů a perzistentních složek nafty (resp. olejů) jako jsou rozvětvené uhlovodíky pristan (2,6,10,14-tetramethylpentadekan) a fytan (3,7,11,15-tetramethylhexadekan) byly získány informace, které mohou přispět k odhadu stupně degradace kontaminantu při sanaci starých ekologických zátěží s obsahem ropných látek.

2.4.2. Diskuse výsledků podle 5 hlavních cílů řešení projektu

2.4.2.1. Monitoring jednotlivých indikátorů přirozeného biodegradačního procesu na lokalitě

Monitoring hydrochemických indikátorů popsany v kapitole 2.3.1.3.1. probíhal z velké části v souladu s prováděcím projektem. Pouze počet odběrů pozemních vod v průběhu sezóny původně navrhovaný na 8 byl snížen na konečných 6. Ušetřené prostředky byly vynaloženy na vyhloubení nevystrojeného vrtu v měsíci září nezbytného pro odběr kontaminovaných zemin z nenasycené zóny.

Výsledky uskutečněného monitoringu jsou diskutovány v kapitolách 2.4.1.1.- 2. a dále v následujících kapitolách.

2.4.2.2. Porovnání přirozeného procesu s aktivním způsobem dekontaminace

Modelové testy různých stupňů aktivního sanačního zásahu byly naplánovány s úmyslem navrhnout nejefektivnější způsob sanace v případě, že by na lokalitě nebylo prokázáno samovolné ubývání kontaminace vlivem procesu přirozené atenuace.

Vzorek zemin znečištěných ropnými látkami byl odebrán až v měsíci září 1999. Z tohoto důvodu byl navržen zkrácený způsob modelových testů sanace - biodegradace „ve vznosu“. Přestože byl vzorek odebrán z bezprostřední blízkosti původního zdroje znečištění (stojan na čerpání pohonných hmot), maximální koncentrace kontaminantu zastižená v hloubce 6 - 8 m činila pouhých 560 mg.kg⁻¹ zeminy. Z výsledku laboratorního modelu aktivní sanace *ex situ* vyplývá, že pravděpodobně jediným limitujícím faktorem rychlosti kompletního dočištění lokality je rychlost dotace O₂ (kap. 2.3.2.2.2.) do ohniska znečištění.

2.4.2.3. Vyhodnocení použitelnosti zvolených metod indikace přirozených degradačních dějů

Z údajů shromážděných za monitorovací období vyplývají rozdíly v naměřených hodnotách sledovaných ukazatelů při použití různých metod a různých časových intervalů mezi dobou odběru a dobou analýzy.

V tabulce 26 jsou shrnuty nejvhodnější metody pro monitoring sledovaných indikátorů přirozené biodegradace a jejich možná omezení.

Tab. 26: Metody pro monitoring indikátorů přirozené biodegradace

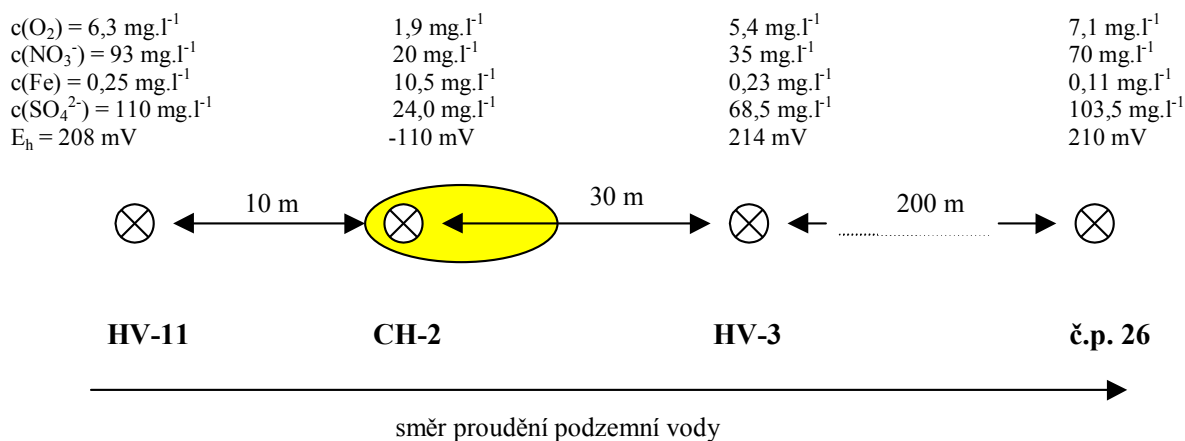
Indikátor	Metoda	Místo a čas provedení analýzy	Možná omezení nebo problémy spojené s měřením
O ₂ v podzemní vodě	Přenosný měřicí přístroj s elektrodou pro měření koncentrace rozpuštěného O ₂	V terénu ihned po odběru	Nevhodně zkalibrovaná elektroda (např. při teplotě výrazně se lišící od teploty vzorku)
NO ₃ ⁻ v podzemní vodě	Běžné metody stanovení nebo pomocí mobilních analytických setů (firmy Macherey Nagel)	Stabilní ukazatel - analýza možná i po 24 h skladování v chladničce	Lépe vyhovují testy firmy Macherey Nagel
Mn (II) v podzemní vodě	Mobilní analytické sady, v případě fixace H ₂ SO ₄ na pH=1 běžnými metodami stanovení, vzorek převážet v lahvi bez vzduchové bubliny	V terénu, při fixaci vzorku raději ihned po převozu do laboratoře	Může rušit zákal vzorku - nutná filtrace před vlastním stanovením, vadí působení vzdušného O ₂
Fe (II) v podzemní vodě	Mobilní analytické sady, v případě fixace H ₂ SO ₄ na pH=1 běžnými metodami stanovení, vzorek převážet v lahvi bez vzduchové bubliny	V terénu, při fixaci vzorku raději ihned po převozu do laboratoře	Při styku se vzdušným O ₂ dochází k vysrážení nerozpustného Fe(III)
SO ₄ ²⁻ v podzemní vodě	Běžné metody stanovení nebo pomocí mobilních analytických setů	Stabilní ukazatel - analýza možná i po 24 h skladování v chladničce	Při použití mobilních analytických setů může rušit zákal - nutná filtrace
E _h podzemní vody	Přenosný měřicí přístroj s elektrodou pro měření oxidačně-redukčního potenciálu	V terénu ihned po odběru	Nevhodně zkalibrovaná elektroda, vzorek nesmí být vystaven působení vzdušného O ₂
pH podzemní vody	Přenosný měřicí přístroj s elektrodou pro měření pH	V terénu ihned po odběru	Nevhodně zkalibrovaná elektroda

Pro odhad adaptovanosti přirozené mikroflóry degradovat kontaminant přítomný na lokalitě se osvědčila jak kultivační metoda stanovení obsahu aerobních bakterií, tak respirometrické testy na vzorcích kontaminovaných zemín (kap. 2.3.2.1.3.).

Naopak monitoring obsahu kultivovatelných aerobních i anaerobních bakterií ve vzorcích podzemních vod z jednotlivých odběrových míst neposkytl použitelné informace pro popis biodegradačního procesu na lokalitě (kap. 2.3.2.1.3.).

2.4.2.4. Důkaz přítomnosti/absence přirozeného biodegradčního procesu na lokalitě na základě naměřených údajů

Na obrázku 7 je schematicky znázorněná situace na lokalitě Choustníkovo Hradiště při screeningu hydrochemických dat (průměr za r. 1999). Skutečná poloha odběrových míst HV-11, CH-2, HV-3 studny v č.p.26 je zakreslena v obrázku 3 (kap. 2.3.1.4.1.).



Obr. 7: Průměrné hodnoty hydrochemických indikátorů za r. 1999 ve sledovaných objektech

Žlutou barvou je znázorněna pravděpodobná současná poloha kontaminačního mraku. Hodnoty hydrochemických ukazatelů v podzemní vodě odebírané z vrtu CH-2 se jednoznačně liší od pozadových hodnot naměřených ve vrtu HV-11. Ukazatele naměřené ve vrtu HV-3 (cca 30 m od CH-2 ve směru proudění podzemní vody) se ještě liší od nekontaminovaného pozadí, ale naměřené hodnoty se již blíží k normálu a biologické procesy zpět do aerobní oblasti. V odběrovém místě na č.p. 26 nebyly pozorovány žádné známky ohrožení zdroje pitné vody migrujícím znečištěním. Statisticky významná korelace sledovaných indikátorů s obsahem ropných látek v jednotlivých vrtech je jednoznačným důkazem probíhajícího procesu již podrobně popsány v kapitolách 2.3.2.1.2. a 2.4.1.2.

Přípravenost místní mikroflóry degradovat přítomný kontaminant za aerobních podmínek je diskutována v kapitole 2.4.1.3. přirozené biodegradace na lokalitě.

Existence procesu *přirozené biodegradace* jako jedné z nejdůležitějších složek *přirozené atenuace* byla na lokalitě Choustníkovo Hradiště jednoznačně prokázána.

O redukci celkové masы kontaminace přítomné na lokalitě vlivem *přirozené atenuace* procesu svědčí statisticky významný trend poklesu hodnot NEL v ohnisku znečištění (CH-2) a ustupování kontaminačního mraku směrem k ohnisku (- dříve prokázaná kontaminace vrtu HV-3 již nebyla zastižena).

2.4.2.5. Návrh nejvhodnějšího sanačního opatření na dočištění lokality

Finanční možnosti a projektu a jeho časové omezení neumožnily provést monitoring lokality v takovém rozsahu, aby bylo možné využít dostupných matematických modelů pro přesnou vizualizaci migrace znečištění a předpověď dalšího vývoje kontaminačního mraku. Hlavní náplní projektu bylo „pouze“ praktické ověření dílčích metod a poskytnutí podkladů pro většinou teoretickou práci na metodické příručce *Monitorovaná přirozená atenuace ropných uhlovodíků a chlorovaných alifatických uhlovodíků v podzemní vodě* (Innemanová et al., 2001).

I přes neexistenci přesného matematického modelu je v případě lokality Rýcholka v Choustníkově Hradišti možné konstatovat:

- ohnisko znečištění na lokalitě je vlivem provedených sanačních opatření a vlivem přirozených atenuačních procesů vyčerpané
- pravděpodobně se jedná o nerozšiřující se kontaminační mrak, případně kontaminační mrak s ustupující tendencí
- riziko zasažení zdrojů pitné vody po směru proudění podzemní vody je minimální.

S vysokou pravděpodobností je možné konstatovat, že proces přirozené atenuace je na lokalitě Choustníkovo Hradiště dostačujícím mechanismem pro odstranění, případně imobilizaci současného zbytkového znečištění.

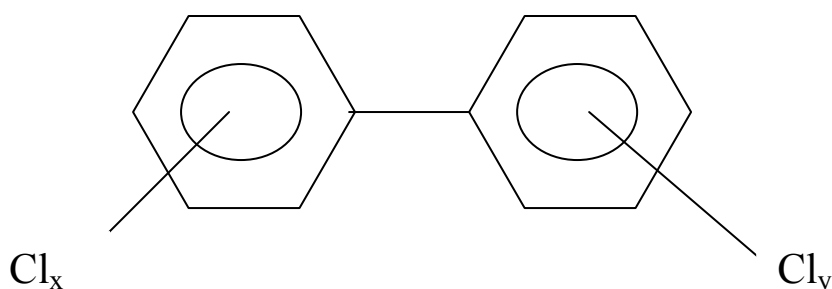
3. SANAČNÍ PŘÍSTUP č. 2 – PODPOROVANÁ BIOLOGICKÁ DEKONTAMINACE *EX SITU* ZEMIN KONTAMINOVANÝCH PCB

3.1. DEKONTAMINACE PCB – TEORETICKÁ ČÁST

Příkladem látek, jejichž odstranění ze životního prostředí vyžaduje sofistikované a přísně řízené procesy, jsou polychlorované bifenyly (PCB). Jejich vlastnosti a nepřírozený původ (PCB byly mimo jiné vyráběny pro jejich vysokou stabilitu a to i vůči mikrobiálnímu ataku) jsou zároveň důvodem, proč PCB v přírodě perzistují velice dlouhou dobu. Zatímco přirozená atenuace těchto látek je velmi pomalá, jejich odstranění ze životního prostředí je - vzhledem k jejich toxicitě a možnosti bioakumulace - problém velmi aktuální.

3.1.1. Charakteristika PCB

Pod název polychlorované bifenyly řadíme velkou skupinu látek, odvozených od bifenyly (difenyly). Bifenyly jsou látky velice reaktivní, lze je nitrovat, sulfonovat, halogenovat. Významné použití měly především chlorované deriváty bifenyly, tedy právě polychlorované bifenyly. Tvoří je skupina látek, které se liší stupněm chlorace a polohou atomů chlóru na bifenylovém jádře. Počet substituentů přitom může být 1 – 10 (obr. 8).



Obr. 8: Obecný strukturní vzorec PCB, kdy $x = 1$ až 5 a $y = 0$ až 5

Podle stupně chlorace se jedná o látky bezbarvé až žluté, méněchlorované PCB jsou kapaliny, vícechlorované jsou pevné látky. Teoreticky lze odvodit 209 izomerů (kongenerů) se sumárním vzorcem $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ ($n = 1$ až 10). Vznik kompletní směsi během chlorace bifenyly je statisticky nepravděpodobný – ve významnějším množství vzniká asi 120 kongenerů, přítomnost přibližně 20 kongenerů nebyla ve známých technických směsích vůbec potvrzena. (Holoubek et al., 1996)

PCB se začaly vyrábět ve 30. letech minulého století a ukončení výroby probíhalo do 2. poloviny 80. let. Distribuovaly se pod různými obchodními názvy, např. AROCLOR (USA a Velká Británie), KANECLOR (Japonsko), Clophen (SRN), DELOR (ČSSR).

3.1.1.1. Technické vlastnosti a použití

Pro vysokou ohnivzdornost a inertnost, vysoký elektrický odpor, nízkou tenzi par a rozpustnost ve vodě, vysokou dielektrickou konstantu a ostatní výhodné vlastnosti našly polychlorované bifenily uplatnění v řadě odvětví průmyslu.

Použití PCB je možné rozdělit na uzavřené a otevřené systémy. Za otevřené považujeme ty, ze kterých úniky PCB nelze zachytit a jejichž používání ve svém důsledku vede ke kontaminaci životního prostředí. Ve většině zemí byla v letech 1970-1973 přijata opatření na omezení, případně zrušení těchto způsobů aplikace PCB. Mezi otevřené systémy můžeme zařadit také použití plastifikátorů na bázi PCB, bezuhlíkový kopírovací papír, lubrifikanty, tuže, impregnační materiály, barvy, lepidla, vosky, aditiva do cementů a omítek, atd.

Použití PCB v uzavřených systémech představují chladicí kapaliny v transformátorech, dielektrické kapaliny v kondenzátorech, ohnivzdorné a teplotnosné antikorozi hydraulické kapaliny v důlních zařízeních a vakuových pumpách, teplotnosná média. V současné době je známa řada úniků z těchto uzavřených systémů do prostředí, především vlivem netěsností. Problém také představují malé kondenzátory, které nejsou recyklovatelné a stávají se tak velice nebezpečným odpadem.

V současné době jsou navíc nezanedbatelnými sekundárními zdroji znečištění spalovací procesy a především znovuvytěkáni PCB ze sedimentů velkých vodních systémů, kam se původně dostaly přímými úniky do vod, případně atmosférickou depozicí. (Holoubek et al., 1996)

3.1.1.2. Toxikologické vlastnosti

PCB patří mezi skupinu perzistentních organických polutantů se silným lipofilním charakterem vedoucím k významné bioakumulaci.

Toxikologické studie na zvířatech prokázaly různé chronické efekty. Vyšší koncentrace bifenylu (10 mg.m^{-3} vzduchu) působí na dýchací cesty a spojivky lidského organismu, je podezření i na karcinogenitu. Již v koncentraci 1 mg.m^{-3} se však vstřebávají i neporušenou pokožkou a pronikají lymfatickým a krevním oběhem až do mízních uzlin a do sleziny.

PCB v organismu mohou způsobit poškození jater, mění obsah vitamínu A a E v játrech, představují i určité riziko genetické poruchy. Kumulované v tukových tkáních organismů přitom téměř nepodléhají

metabolickým přeměnám a ani se tedy z organismu nevyklučují. Naopak přecházejí potravním řetězcem z jednoho organismu do druhého a koncentrace PCB ve vyšších organismech narůstá – akumulace. (Totevová et al., 1997; Holoubek et al., 1996)

Toxicita PCB stále ještě není zcela objasněna, ale zřejmě úzce souvisí se stupněm chlorace (čím vyšší počet substituentů, tím je toxicita vyšší) a také s umístěním chlórů na bifenylu (toxické jsou zejména kongenery substituované v polohách *meta* a *para*).

(Totevová, 2000)

3.1.2. Možnosti odstranění PCB ze životního prostředí

Za dobu masivního používání PCB uniklo do životního prostředí velké množství těchto látek. Studie o jejich výrobě a rozšíření v životním prostředí se značně rozšířily v 70. letech minulého století. Tehdy také byly odhaleny nebezpečné vlastnosti polychlorovaných bifenylů. V 80. letech byla odhadována celková světová produkce na cca milion tun. Zatímco Francie ukončila výrobu PCB v polovině 80. let jako poslední země západní Evropy, východní Evropa naopak v tu dobu zaznamenala významný rozvoj jejich produkce.

Přestože v současnosti již došlo k definitivnímu útlumu výroby PCB, existují stále nové emise těchto látek, které jsou dány jejich předchozím použitím v průmyslových aplikacích.

Vhodná a účinná metoda pro jejich odstranění ze životního prostředí přitom stále nebyla nalezena. Vzhledem k jejich vlastnostem je degradace fyzikálně-chemickými metodami značně náročná a drahá. Jednou z možností je spalování PCB při vysokých teplotách. Tento postup však naráží nejen na problémy technické, ale i legislativní, zejména občansko-právní. I když v určitém regionu existuje zařízení, které splňuje přísné technologické podmínky pro spalování PCB, většinou jsou to různé občanské iniciativy, které nakonec svážení nebezpečného odpadu do regionu zabrání. Metoda spalování je navíc neekonomická, pokud se jedná o velké objemy odpadu (např. zemin) obsahujících pouze nízké koncentrace PCB.

Využití biologických metod může být v určitých případech ekologicky šetrné a z hlediska finančních nákladů výhodné řešení. Je však limitováno jejich omezenou účinností ve srovnání např.

s biodegradací látek ropného původu. Problematika biodegradace PCB bude podrobněji popsána v následujících kapitolách.

Existují dále metody založené na různých fyzikálně-chemických procesech. Například fotolýza, která se zdá být dominantním degradačním procesem v kontaminovaných vodách může být technologicky podpořena přidávkem různých činidel, jako například NaBH_4 . Mezi chemické způsoby degradace můžeme zařadit reakci polyethylenglykolu s KOH (Holoubek et al., 1996) nebo využití různých

redukčních činidel (FeS, Na₂S, thioglykolát sodný) a jejich vzájemných kombinací (McCue et al., 1996). Při dekontaminaci vod s PCB se osvědčila i hnědouhelná škvára (Palatý et al., 1999), případně přímo humínové látky (Williams, 1997). Některé chemické a fyzikálně-chemické metody předúpravy PCB v kombinaci s biodegradací jsou citovány v tabulce 28, kapitoly 3.1.3.2.

Obecně jsou metody dekontaminace vod s obsahem PCB mnohem rozpracovanější a a vykazují vyšší účinnost, než metody dekontaminace zemin. Efekt různých testovaných detergentů, které ve vodném médiu zvyšují rozpustnost polutantů, je při dekontaminaci zemin rozšířen o zpřístupnění PCB pevně sorbovaných na pevné matrice. Ne vždy je tento postup úspěšný, zejména u starých ekologických zátěží. Jako slibná se jeví například metoda promývání zemin roztokem detergentu Spolsapon v koncentraci 40 g.l⁻¹ s následným srážením tenzidu s Ca²⁺ za účelem odstranění PCB z roztoku (Šváb, 2004).

3.1.3. Biologické metody dekontaminace PCB

Přestože je širší využití biologických metod při odstraňování PCB stále diskutabilní, a v ČR dosud nebyla pro tento účel žádná biologická metoda schválena (SZÚ - viz. kap. 3.1.3.3.), existuje řada studií, které myšlenku biodegradace PCB podporují.

V současnosti celosvětově sílí tendence řešit dekontaminace prostředí spíše metodami biologickými, než fyzikálně-chemickými postupy z důvodů jak ekologických, tak ekonomických. Předpokládá se však, že v případě vysoce rezistentních PCB půjde stále spíše o metodu doplňkovou.

3.1.3.1. Hlavní mechanismy biodegradace PCB

Přestože polychlorované bifenyly byly vyrobeny uměle (jedná se o xenobiotika), byla již popsána řada organismů, které jsou schopné tyto látky nějakým způsobem metabolizovat.

V současnosti se za hlavní dráhu metabolického rozkladu PCB považují bakteriální degradace. Byly identifikovány dvě skupiny bakterií, které degradují PCB dvěma různými mechanismy – aerobní degradací a reduktivní dehalogenací za anaerobních podmínek. Zatímco aerobní bakterie atakují nížechlorované PCB oxidativně, štěpením uhlíkového kruhu a následným rozkladem vzniklých sloučenin, anaeroby bifenylové kruhy neštěpí, pouze degradují výšechlorované sloučeniny na méněchlorované.

Celkem existují tři základní mechanismy biodegradace PCB:

- aerobní, kdy PCB slouží přímo jako růstový substrát
- aerobní, kdy PCB jsou degradovány kometabolismem

- anaerobní – reduktivní dehalogenace, kdy atomy chlóru v molekule jsou nahrazovány vodíkem

3.1.3.1.1. Aerobní mechanismus

PCB s nízkým počtem atomů chlóru v molekule (1- 4) mohou sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro mikroorganismy, případně mohou být transformovány kometabolismem s akumulací chlorovaných intermediátů. Kometabolismus musí být indukován přítomností primárního růstového substrátu. V laboratorních podmínkách je nejčastěji používaným primárním substrátem pro kometabolismus PCB bifenylyl (Kim et al., 2001; Totevová et al., 1997), byl ale například vyizolován aerobní bakteriální kmen *Janibacter sp.* schopný kometabolismu PCB (Aroclor 1242) pouze v přítomnosti kvasničného extraktu. Přítomnost bifenylylu naopak degradaci PCB inhibovala. (Sierra et al., 2003). V přírodních procesech se počítá spíše s využitím sloučenin přirozeného původu, např. rostlinných kořenových exudátů fenolické povahy (Chromá, 2003a).

U aerobních bakterií tvoří metabolismus PCB 3 dráhy:

- metabolismus primárního substrátu a kometabolismus PCB na chlorbenzoáty a pětiuhlíkaté chloralifatické kyseliny
- metabolismus chlorbenzoátů
- metabolismus pětiuhlíkatých chloralifatických kyselin.

(Totevová et al., 1997)

Biodegradace PCB aerobními baktériemi je poměrně dobře prostudovaná. Většina bakterií schopných aerobní degradace PCB jsou Gram-negativní tyčky a koky. Někdy jsou to i Gram-pozitivní bakterie a aktinomycety. Schopnost aerobně rozkládat PCB mají i některé houby, které používají odlišný mechanismus – do procesu zapojují enzymy degradace ligninu (Dercová, 2002). Přeměny PCB byly pozorovány také u vyšších rostlin (Chromá et al., 2003b).

Přehled některých organismů používaných v posledních letech při výzkumu biodegradace PCB, případně izolovaných během pokusů je uveden v tabulce 27.

Tab. 27: Organismy účastníci se metabolických přeměn PCB

Organismus	Název	Citace
Baktérie	<i>Comamonas testosteroni</i>	Maltseva et al. (1999)
	<i>Rhodococcus erythreus</i>	
	<i>Rhodococcus sp.</i>	
	<i>Burkholderia sp.</i>	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Ferrer et al. (2003)
	<i>Arthrobacter sp.</i>	Singer et al. (2000, 2001)
	<i>Ralstonia eutrophus</i>	
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Taguchi et al. (2004)
	<i>Pseudomonas aeruginóza</i>	Hamdy et al. (1999)
	<i>Serratia liquefaceius</i>	
	<i>Bacillus</i>	
	<i>Alteromonas macleoctii</i>	Fuse et al. (2003)
	<i>Cycloclasticus pugetii</i>	
<i>Janibacter sp.</i>	Sierra et al. (2003)	
<i>Bacillus lentus</i>	Rojasavelizapa et al. (1999)	
Rody: <i>Acinetobacter</i>	Dercová (2002)	
<i>Achromobacter</i>	Totevová (2000)	
<i>Alcaligenes</i>		
<i>Corynebacterium</i>		
<i>Pseudomonas</i>		
Houby	<i>Trametes versicolor</i>	Beaudette et al. (2000)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Keum et al. (2004)
	<i>Trametes versicolor</i>	
	<i>Glomus intraradices</i>	Chromá (2003a)
<i>Grifola frondosa</i>	Seto et al. (1999)	
Vyšší rostliny	<i>Solanum nigrum</i>	Kučerová et al. (2000)
	<i>Medicago sativa</i>	Chromá (2003a)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	
Vyšší živočichové	<i>Pheretima hawayana</i>	Singer et al. (2001)

3.1.3.1.2. Anaerobní mechanismus

Jednou ze slibných remediačních strategií pro PCB je sekvenčně aerobně-anaerobní systém. Za anoxických podmínek mohou být výšechlorované kongenery reduktivně dehalogenovány za vzniku kongenerů, které mohou být potenciálně degradovány aerobními mikroorganismy (Kim et al., 2001; Furukawa, 2003).

Navzdory intenzivnímu výzkumu biodegradace PCB anaerobními mikroorganismy jde stále o mikrobiální činnost, která je popisována spíše metodami nepřímými.

Fava et al. (2003) na studii v podmínkách reálných kontaminovaných sedimentů prokázal účast sulfát-redukujících a methanogenních bakterií při anaerobní biodegradaci PCB. Kim et al. (1999) dokazuje pomocí inhibičních studií, že methanogeny jsou při dehalogenaci PCB zahrnuty jednak přímo, jako dechlorinující agens a jednak nepřímo, jako esenciální součást dechlorinujícího mikrobiálního konsorcia. Pozitivní efekt pro anaerobní reduktivní dehalogenaci PCB může mít přídavek FeSO_2 , a to hned ze dvou hledisek: Zatímco sulfáty stimulují růst sulfát-redukujících bakterií, Fe^{2+} snižuje biologickou dostupnost (a tedy toxicitu) S^{2-} iontů vznikajících při redukčních procesech za vzniku nerozpustného FeS (Zwiernik et al., 1998).

3.1.3.1.3. Základní principy biodegradace PCB

Různé kongenery se vyznačují různou rezistencí k biodegradaci, což vedlo k formulaci následujících principů založených na vztahu mezi jejich strukturou a biodegradabilitou:

- biodegradabilita klesá se stoupajícím počtem atomů chlóru v molekule
- dva atomy chlóru v polohách *orto* (tzn. 2,6 a 2,2') zvyšují rezistenci k biodegradaci
- kongenery s nesubstituovaným kruhem jsou transformovány rychleji než kongenery se substitucí na obou kruzích
- izomery PCB se dvěma atomy chlóru v pozici 2,3 na jednom kruhu, jsou přístupnější mikrobiální degradaci než ostatní tetra- a pentachlórbifenyly
- iniciační štěpení obvykle probíhá na méně substituovaném kruhu.

(Dercová, 2002; Dercová et al., 1999; Totevová et al., 1997)

Biodegradace jednotlivých kongenerů může být navíc proces závislý na degradujícím organismu, případně na okolních podmínkách. Maltseva et al. (1999) například popisuje přednostní oxidaci *para* substituovaných PCB u *Comamonas testosteroni* a *Rhodococcus erythreus*, zatímco *Rhodococcus*

sp. a *Burholderia sp.* atakovaly přednostně *orto* chlorované kruhy. Závislost typu dehalogenace na hodnotě pH pozoroval Palekar et al. (2003).

3.1.3.1.4. Meziprodukty biodegradace PCB

Vzhledem k rozmanitému metabolismu PCB může během jejich biodegradace vznikat řada toxických meziproduktů. Příkladem jsou hydroxypolychlorované bifenylly, jejichž další degradovatelnost pomocí hub *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* ověřoval Keum et al. (2004). Byla prokázána vyšší rezistence 3-hydroxybifenylů vůči rozkladu *lakázou* jmenovaných hub než u 2- a 4-hydroxybifenylů. Anaerobní dehalogenaci hydroxylovaných PCB bakterií *Desulfitobacterium dehalogenans* studoval Wiegel et al. (1999). Vznik různých typů hydroxychlorbifenylů byl rovněž popsán při konverzi PCB rostlinami (Kučerová et al., 2000).

Při praktické aplikaci biodegradačních technologií nelze vznik meziproduktů identifikovat pouhými analytickými metodami a to vzhledem k jejich možné rozmanitosti. Tento jev je však možné částečně monitorovat nepřímo – pomocí mikrobiologických metod (náhlý pokles koncentrace mikroorganismů v průběhu biodegradace může nasvědčovat vzniku toxického prostředí), případně metod pro stanovení akutní toxicity.

3.1.3.2. Modifikace biodegradačních metod

V mnoha případech se při biodegradaci polychlorovaných bifenylů osvědčila předúprava kontaminovaného média pomocí dalších, nebiologických metod. Různé fyzikálně-chemické, případně chemické procesy v kombinaci s biodegradací často poskytují příznivější výsledky, než biologický proces samotný. Nejlépe zdokumentovány jsou tyto postupy pro kontaminované vody. Dále jsou testovány kombinace různých biologických metod, případně přímo zásahy do genetické výbavy degradujících organismů.

Některé vybrané typy sanačních postupů jsou shrnuty v tabulce 28.

Tab. 28: Různé kombinace metod při dekontaminaci PCB

Metoda	Médium	Citace
UV-dehalogenace + biodegradace	voda	Kaštánek et al. (2004) Kimbara et al. (2004)
Fotokatalýza v přítomnosti TiO ₂	voda	Huang et al. (1996)
Fentonova reakce + biodegradace	zeminy, voda	Dercová et al. (1999) Kaštánek et al. (2004) Manzano et al. (2003)
Fytoremediace + biodegradace	zeminy	Chromá (2003a) Singer et al. (2003)
Genetické zásahy do degradujících mikroorganismů	zeminy, voda	Brenner et al. (2004)
Zvyšování biodostupnosti pomocí surfaktantů	zeminy, voda	Beaudette et al. (2000) Billingsley et al. (1999) Ferrer et al. (2003) Cho et al. (2004) Rojasavelirapa et al. (2000) Singer et al. (2000, 2001) Šváb (2004)

3.1.3.3. Omezení využívání mikroorganismů pro sanační technologie v ČR

V České republice je využití organismů pro reálné biodegradační procesy regulováno povolením hlavního hygienika, které je vydáváno na doporučení Státního zdravotního ústavu. Aplikované mikroorganismy musí splňovat podmínku nepatogenity a netoxicity a dosud nebylo povoleno jakékoliv využívání organismů geneticky modifikovaných.

Je nutné si uvědomit, že atest Státního zdravotního ústavu na daný biologický preparát není zároveň zárukou jeho technologické aplikovatelnosti a účinnosti. Jedná se pouze o konstatování, že jeho aplikace nebude mít negativní účinky ze zdravotního hlediska.

3.1.3.4. Legislativa pro nakládání se zeminami s obsahem PCB

Nakládání s odpadem obsahujícím polychlorované bifenylly je vymezeno Zákonem č. 185/2001 Sb. o odpadech, resp. Vyhláškou MŽP č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady. Zákon umožňuje uložení zemin na skládku inertního odpadu v případě, že obsah PCB nepřekračuje 10 mg.kg^{-1} a uložení na skládku nebezpečného odpadu při obsahu PCB do 100 mg.kg^{-1} .

Rozhodující metodou pro stanovení obsahu PCB v zeminách je podle Vyhlášky Ministerstva životního prostředí 384/2001 Sb., o nakládání s PCB, německá norma DIN 38414-20 "*Schlamm und Sedimente – Bestimmung von 6 polychlorierten Biphenylen (PCB)*". Tato metoda stanovuje obsah PCB jako součet obsahu šesti přesně definovaných kongenerů (jejichž směs je použita jako standard) a zajišťuje, že jsou u standardu a neznámého vzorku vždy porovnávány píky stejných kongenerů bez ohledu na případné změny kongenerového složení analyzovaného vzorku technické směsi.

Jedná se o kongenery uvedené v tabulce 29:

Tab. 29: Struktura kongenerů stanovovaných podle normy DIN 38414-20

Kongener č.	Struktura (poloha atomů chlóru podle názvosloví IUPAC)
28	2 4 4'
52	2 2' 5 5'
101	2 2' 4 5 5'
138	2 2' 3 4 4' 5'
153	2 2' 4 4' 5 5'
180	2 2' 3 4 4' 5 5'

3.2. PODPOROVANÁ BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V ZEMINÁCH – CÍLE PRÁCE

Projekt poloprovozní biotechnologické sanace zemin kontaminovaných PCB vznikl na žádost Státního zdravotního ústavu v r. 2000. Na základě výsledků poloprovozu mělo být rozhodnuto, zda užívání navržené technologie může být povoleno v plném rozsahu a to i ostatním subjektům, které by zažádaly o její schválení. S ohledem na platnou legislativu mělo být dále navrženo, pro jaké maximální hodnoty vstupní koncentrace PCB bude metoda využitelná.

Bylo doporučeno provést poloprovozní sanaci na dvou vzorcích zemin z reálných lokalit kontaminovaných PCB.

Vstupní koncentrace znečištění byla zvolena s ohledem na předpokládanou nižší účinnost metody (ve srovnání s biodegradací např. ropných uhlovodíků) a následné uložení odpadu na skládce podle Zákona č. 185/2001 Sb. o odpadech. Z možných variant a modifikací degradačního postupu byly vybrány takové kroky, které zaručovaly použitelnost finální technologie pro množství odpadů řádově 10^4 tun. Jednalo se zejména o volbu nejvhodnějších aditiv a dále nezbytnou průběžnou manipulaci s odpadem.

Cílem druhé části disertační práce je tedy vyhodnocení použitelnosti biodegradačních metod pro sanaci zemin znečištěných PCB ze dvou konkrétních lokalit. Podkladem pro toto hodnocení jsou výsledky poloprovozních testů, které byly uskutečněny v období květen 2001 až listopad 2003.

3.3. PODPOROVANÁ BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V ZEMINÁCH – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.3.1. Materiál a metody

3.3.1.1. Použitý materiál

Při řešení zadání byly použity následující suroviny a přístroje:

analytické terénní sady pro stanovení NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- , pH (Merck, resp. Macherey Nagel)

Masopeptonový agar č. 2 - *kultivační metody*

syntetické hnojivo NPK- (Lovochemie, Lovosice)

KOH (0,1M), HCl (0,1M), BaCl₂ (nasycený roztok) – *respirometrie*

FeSO₄ · 7H₂O – (Spolana, Neratovice)

inokulum obsahující bakteriální kmeny schválené Státním zdravotním ústavem pro biodegradace

smíšeného znečištění (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas stutzeri*)

aktivovaný kal (ČOV Krušovice)

BIOCIT - kapalné zbytky z organických výrob obsahující biologicky využitelné uhlovodíky a dusíkaté látky (Aktiva, Kaznějov)

detergent AQUASOL (AQUA Plus, s.r.o., Praha)

technické směsi Delor 103 a Delor 106

třepačka LT2

souprava pro ruční odběr vzorků zemin

biologický termostat BT50

2 ocelové nádrže o objemu 15m³

2 kovové přepravní kontejnery o objemu 10 m³

2 plastové barely o objemu 0,05 m³

nepropustná folie

3.3.1.2. Výběr vzorků a místo realizace poloprovozu

Pro poloprovozní testování biotechnologické sanace zemin kontaminovaných polychlorovanými bifenyly byly vybrány odpadní zeminy ze dvou lokalit – Milevsko a Milovice (viz. tab. 30). Jedná se o poměrně exponované případy, jejichž řešení je v současné době velmi aktuální.

Znečištění na obou lokalitách splňuje podmínku pro vstupní koncentraci PCB v rozmezí $10 - 10^2$ mg.kg^{-1} . Toto rozmezí bylo zvoleno s ohledem na podmínky pro konečné uložení dekontaminovaných zemin podle platné legislativy. Nebyla naopak plánována dekontaminace zemin s obsahem PCB 10^3 mg.kg^{-1} a více (jako je běžné například u odpadů s obsahem ropných látek) vzhledem k předpokládané nižší účinnosti metody v případě takto perzistentního polutantu.

Tab. 30: Původ vzorků zemin a naměřené výchozí koncentrace PCB

Název	Lokalita	Vstupní znečištění (celkový obsah PCB)* v mg.kg^{-1}
Milovice	areál bývalého vojenského prostoru v Milovicích	$175,5 \pm 72,1$
Milevsko	bývalá obalovna živičných směsí v Milevsku, nyní areál firmy STRABAG (České Budějovice)	$16,8 \pm 7,3$

* jedná se o průměr ze 6 vzorků

Poloprovozní sanace dvou reálných vzorků zemin kontaminovaných PCB probíhala na jednodruhovém úložišti skládky nebezpečných odpadů SPOLIO, a.s. (nyní DEKONTA, a.s.). Každý ze vzorků o hmotnosti 10 t byl uložen v nepropustné ocelové nádrži o celkovém objemu cca 15 m^3 , která dovozovala celkové zavodnění zemin při anaerobní fázi (obr.9). Aerobní fáze probíhala zpočátku v kovových přepravních kontejnerech (obr. 10), později na nepropustném podkladu jednodruhového úložiště tak, aby byla umožněna důslednější aerace zemin (obr. 11). Kontrolní vzorky o hmotnosti cca 75 kg byly umístěny v barelech o objemu 50l.



Obr. 9: Anaerobní fáze (květen 2001 až květen 2002)



Obr. 10: Aerobní fáze (květen 2002 až listopad 2002)



Obr. 11: Aerobní fáze (duben 2002 až listopad 2003)

3.3.1.3. Volba technologického postupu

Volba každého teoreticky možného technologického kroku byla zvažována jak z ekonomického, tak z ekologického hlediska.

Při dekontaminaci řádově 10^4 tun zemin se může spotřeba různých doplňkových substrátů, minerálních živin nebo detergentů pohybovat v rozmezí $10 - 10^3$ tun. Z finančního hlediska se jedná o nezanedbatelné částky, a proto využití některých (v laboratorních podmínkách prospěšných) aditiv často v reálu nepřipadá v úvahu.

Dále je nutné zvažovat, zda přídavek chemicky čistého aditiva (např. bifenyl), které nemusí být v průběhu procesu zcela vyčerpáno, nepředstavuje další ekologické riziko, případně zda tímto rizikem není již samotná chemická výroba mnoha desítek tun takového aditiva.

Pokud je součástí technologie cílené využívání mikroorganismů, je nutné jejich schválení hlavním hygienikem. Tento souhlas je vydáván na doporučení Státního zdravotního ústavu, který kontroluje zejména hygienickou nezávadnost biopreparátů. V současné době není možné jakékoliv využití geneticky modifikovaných kmenů.

3.3.1.4. Popis navržené technologie

Po zohlednění všech hledisek popsanych v kapitole 3.3.1.3. byl pro poloprovozní testování biologické dekontaminace zemin s obsahem PCB navržen následující postup:

- 1) střídání anaerobní a aerobní fáze procesu (lze v reálu docílit zavodněním a následným odvodněním zemin, přičemž odpadní voda může být využita jako závlahová při aerobní fázi)
- 2) dotace minerálních živin ve formě syntetického hnojiva NPK (obě fáze procesu)
- 3) dotace FeSO_4 pro podporu sulfát-redukujících bakterií (anaerobní fáze)
- 4) inokulace zemin pomocí aktivovaného kalu a bakteriálního preparátu schváleného SZÚ (obě fáze procesu)
- 5) dotace vzdušného kyslíku mechanickou kultivací (aerobní fáze)
- 6) dotace vhodného detergentu pro zvýšení biodostupnosti PCB (obě fáze procesu)
- 7) dotace zbytků z organických výrob obsahujících biologicky využitelné uhlovodíky jako primární substrát pro halorespiraci, případně kometabolismus (obě fáze procesu)

V případě bodů 3 a 7 se jedná o odpady, které by mohly být tímto způsobem současně likvidovány.

Úvodní – anaerobní fáze teoreticky zajišťuje reduktivní dehalogenaci výšesubstituovaných PCB a tedy jejich zpřístupnění pro následující mikrobiální rozklad. Jako primární růstový substrát pro halorespiraci (terminálním akceptorem elektronů jsou PCB) byly použity kapalné zbytky z organických výrob obsahující biologicky využitelné uhlovodíky - sacharidy, alkoholy, mastné kyseliny, aminy apod. (v dalším textu pod názvem BIOKIT).

Růst sulfát-redukujících organismů v anaerobní fázi byl podpořen přidavkem FeSO_4 do znečištěné zeminy, přičemž mohou být v procesu využity i Fe^{2+} ionty, které způsobují vysrážení vznikajícího toxického S^{2-} ve formě nerozpustného FeS .

Minerální živiny (zejména N a P) byly dodány ve formě syntetického hnojiva NPK.

Desorpce PCB měla být usnadněna přidavkem detergentu AQUASOL před zahájením anaerobní i aerobní fáze procesu.

Biodegradační potenciál byl podpořen přidavkem aktivovaného kalu a zároveň inokulací specializovaných bakteriálních kmenů (schválených SZÚ).

Po dobu anaerobní fáze byl dekontaminovaný materiál zformován do vrstvy vysoké minimálně 2m, zcela zakryt vodou a dále nepropustnou polyethylenovou fólií.

Po 12 měsících inkubace byla zahájena aerobní fáze odčerpáním vody a přemístěním zemin do kovových přepravních kontejnerů, které umožňovaly jejich pravidelnou mechanickou kultivaci.

(Později, při prodloužení aerobní fáze, probíhala kultivace přímo na nepropustném podloží jednodruhové skládky odpadů).

Podle potřeby byl do sanovaného materiálu dodáván zdroj minerálních živin (NPK), případně primární biologicky využitelný substrát pro navození kometabolismu PCB (BIOCIT).

Reinokulace byla prováděna 1x měsíčně.

V druhé etapě aerobní fáze procesu byly navíc inokulovány kmeny vyizolované z reakční směsi v průběhu pokusu pro jejich schopnost růstu na komerčních směsích Delor 103 a Delor 106 jako jediném zdroji uhlíku a zároveň splňující kritéria SZÚ.

V této fázi pokusu nebyla prozatím řešena otázka, který z uvedených bodů je nepostradatelný a naopak. Všechny uvedené ekonomicky přijatelné kroky byly aplikovány současně. Pokud by takto navržená technologie vykazala potřebnou účinnost, bylo by v rámci její další optimalizace testováno, který z kroků 1-7 je možné při plněprovozním využití vynechat. Jako podklad by potom sloužily výsledky laboratorních testů, které porovnávaly různé varianty sanačního zásahu (Žáčková, 2003).

3.3.1.4.1. Časový harmonogram prací

Termín zahájení pilotního pokusu byl značně posunut nutností shromáždit řadu souhlasných vyjádření od různých státních institucí (tab. 31). V tomto směru se projevila nedůvěra a velká opatrnost ze strany úředníků státní správy vůči jakékoliv manipulaci s odpadem obsahujícím PCB.

Poloprovozní testování biotechnologické likvidace PCB proto mohlo být zahájeno až 10 měsíců od obdržení povolení ze strany SZÚ.

Tab. 31: Harmonogram prací prováděných v rámci poloprovozu

Datum	Práce provedené k uvedenému datu
červen 2000	schválení poloprovozu biotechnologické likvidace PCB Státním zdravotním ústavem
listopad 2000	schválení poloprovozu Okresní hygienickou stanicí Ústí nad Labem
prosinec 2000	schválení poloprovozu Okresním úřadem Ústí nad Labem
leden 2001	navezení 10,4 t zemin z lokality Milovice
březen 2001	navezení 10,9 t zemin z lokality Milevsko
duben 2001	proškolení obsluhy nakládající s odpadem v areálu SPOLIO, a.s., homogenizace vzorků oddělení kontrolních vzorků (80-100 kg) odběr vzorků na vstupní analýzy přídavek aditiv pro anaerobní fázi procesu homogenizace inokulace zakrytí kontejnerů nepropustnou fólií – zahájení anaerobní fáze pokusu
květen 2002	ukončení anaerobní a zahájení aerobní fáze pokusu: odčerpání přebytečné vody, kultivace materiálu, odběr vzorků pro průběžné analýzy doplnění aditiv pro aerobní fázi procesu inokulace
květen - listopad 2002	podpora a průběžná kontrola aerobního procesu
březen 2003	schválení prodloužení aerobní fáze pokusu Státním zdravotním ústavem
duben – listopad 2003	podpora a průběžná kontrola aerobního procesu
listopad 2003	ukončení poloprovozu závěrečné vzorkování vyhodnocení výsledků

3.3.1.4.2. Použitá aditiva a jejich dávkování

Dávkování živin, elektronových akceptorů, detergentu a mikroorganismů vycházelo ze zkušeností s biologickou dekontaminací jiných druhů organického znečištění. Množství primárního zdroje uhlíku bylo stanoveno tak, aby představovalo řádově stonásobek množství kontaminantu v reakční směsi.

Tab. 32: Seznam aditiv použitých v poloprovozním testu, jejich význam a dávkování

Aditivum	Význam	Množství na 10 t zeminy	Fáze procesu
syntetické hnojivo NPK	zdroj minerálních živin (N a P) pro mikroorganismy	50 kg – anaerobní fáze podle aktuální potřeby – aerobní fáze	anaerobní aerobní
kapalné zbytky z organických výrob s obsahem sacharidů, alkoholů, mastných kyselin atd. – BIOCIT	primární zdroj uhlíku pro navození halorespirace (anaerobní fáze, při které dochází k reduktivní dehalogenaci PCB) a kometabolismu	400 l – anaerobní fáze 400 l – aerobní fáze	anaerobní aerobní
detergent AQUASOL	zvýšení vodorozpustnosti (a tím biologické dostupnosti) znečištění	5 l	anaerobní aerobní
aktivovaný kal	zvýšení biodegradačního potenciálu přítomné mikroflóry	100 kg	anaerobní
bakteriální inokulum, kaly z ČOV	zvýšení biodegradačního potenciálu přítomné mikroflóry	100 l – anaerobní fáze 100 l každý měsíc – aerobní fáze	anaerobní aerobní
Fe SO ₄ .7H ₂ O	stimulace růstu sulfát-redukujících organismů zodpovědných za dehalogenaci PCB ionty SO ₄ ²⁻ a vysrážení vznikajícího S ²⁻ na FeS (potlačení toxicity S ²⁻ vůči mikroorganismům)	50 kg	anaerobní

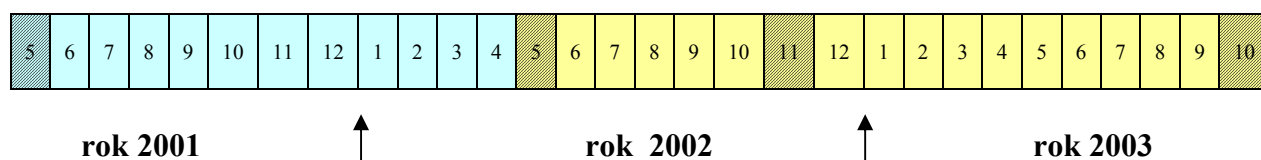
3.3.1.5. Použité metody

Monitorování průběhu pilotního pokusu lze rozdělit na dvě části:

- a) Sledování obsahu a kvality kontaminantu v průběhu degradačního procesu
- b) Analýzy zaměřené na technologickou kontrolu procesu

3.3.1.5.1. Sledování obsahu a kvality kontaminantu v průběhu procesu

Odběry vzorků zemin pro stanovení obsahu a kvality kontaminantu byly uskutečněny v režimu znázorněném na obrázku 12:



Vysvětlivky:

Čísla v rámečcích představují kalendářní měsíce v příslušném roce

- anaerobní fáze procesu
- aerobní fáze procesu
- provedeno vzorkování pro chemické analýzy

Obr. 12: Časový diagram průběhu pilotního pokusu

Poměrně problematickou a diskutovanou otázkou v rámci biodegradace PCB je způsob stanovení polychlorovaných bifenylnů ve sledovaných zeminách. Subdodavatelská laboratoř Analytické laboratoře Plzeň, s.r.o. doporučila stanovení plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD) a s hmotností detekcí (GC/MS). Výstupem je obsah PCB v mg/kg, který je sumou obsahů technických směsí Delor 103 a Delor 106, na jejichž směs je prováděna kalibrace přístroje. V sanovaných zeminách byly nejvíce zastoupeny směsi kongenerů složením odpovídající Deloru 103 a v menším množství Deloru 106. Do výpočtů obsahů dané technické směsi byly uvažovány vždy stejné (u standardu i neznámého vzorku) vybrané píky. Pro sledování změn v kongenerovém zastoupení přítomných PCB byly hodnoceny chromatogramy, které ukazují četnost zastoupení

jednotlivých kongenerů podle počtu substituovaných atomů chlóru na bifenylovém jádře. Tyto metody byly vybrány s ohledem na výzkumný charakter pilotního pokusu.

Dále byly počítány vzájemné poměry obsahu vybraných kongenerů s různým počtem atomů chlóru v molekule (chromatogram s vyznačením sledovaných piků a počtu atomů chlóru v molekule příslušného kongeneru je zařazen v příloze 4).

Rozhodující metoda pro stanovení obsahu PCB v zeminách je však dle Vyhlášky Ministerstva životního prostředí 384/2001 Sb., o nakládání s PCB, dána německou normou DIN 38414-20 "Schlamm und Sedimente – Bestimmung von 6 polychlorierten Biphenylen (PCB)". Tato metoda stanovuje obsah PCB jako součet obsahu šesti přesně definovaných kongenerů (jejichž směs je použita jako standard) a zajišťuje, že jsou u standardu a neznámého vzorku vždy porovnávány píky stejných kongenerů bez ohledu na případné změny kongenerového složení analyzovaného vzorku technické směsi. Stanovení součtu šesti kongenerů (č. 28, 52, 101, 138, 153 a 180) bylo zahrnuto do výsledného hodnocení poloproduktu vzhledem k následnému uložení testovaných zemin na skládce nebezpečného, případně inertního odpadu. Pro toto další nakládání je norma DIN 38414-20 stěžejní.

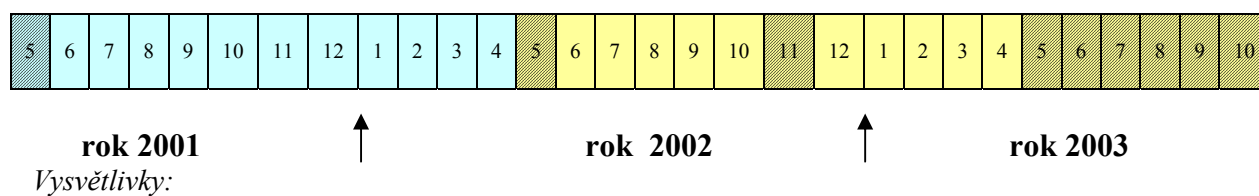
Jako doplňková metoda pro sledování kvalitativních změn, zejména v průběhu procesu reduktivní dehalogenace, bylo navrženo stanovení obsahu extrahovatelných organických halogenů - EOX.

Tab. 33: Sledované ukazatele a metody jejich stanovení

Ukazatel	Metoda stanovení	Laboratoř
obsah PCB, kongenerová analýza	GC-ECD GC-MS	Analytické laboratoře Plzeň, s.r.o.
obsah extrahovatelných organických halogenů (EOX)	spalovací metody	Analytické laboratoře Plzeň, s.r.o.

3.3.1.5.2. Analýzy zaměřené na technologickou kontrolu procesu

Režim odběru vzorků zemin pro analýzy zaměřené na technologickou kontrolu procesu znázorňuje schéma na obrázku 13:



Čísla v rámečcích představují kalendářní měsíce v příslušném roce



anaerobní fáze procesu



aerobní fáze procesu



provedeno vzorkování pro chemické analýzy

Obr. 13: Časový diagram průběhu pilotního pokusu

Mikroorganismy zodpovědné za biodegradační proces musí mít zabezpečený dostatek minerálních živin, vlhkosti a vzdušného kyslíku, případně jiného elektronového akceptoru. Dále musí být zajištěno přijatelné pH a teplota.

Pro technologickou kontrolu procesu dekontaminace zemin znečištěných látkami PCB byly proto navrženy následující chemické a mikrobiologické analýzy:

Tab. 34: Sledované ukazatele a metody jejich stanovení

Ukazatel	Metoda stanovení	Laboratoř
obsah N a P ve formě NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}	analytické sady firmy Macherey – Nagel	DEKONTA, a.s.
obsah SO_4^{2-}	titračně – Ba (gravimetrie)	SPOLIO, a.s.
pH	indikační papírky Quantofix, Macherey-Nagel	DEKONTA, a.s.
intenzita respirace (produkce CO_2)	titračně	DEKONTA, a.s.
obsah aerobních heterotrofních bakterií kultivovatelných na komplexním médiu (MPA č.2)	kultivační metoda	DEKONTA, a.s.

Během aerobní fáze procesu byla u testovaných zemin provedena izolace a následná identifikace bakteriálních kmenů schopných růstu na technických směsích Delor 103 a Delor 106 jako jediném zdroji uhlíku.

V následujícím textu jsou popsány metody prováděné laboratoří DEKONTA, a.s. Popis ostatních metod je součástí provozních řádů subdodavatelských pracovišť.

Izolace bakterií rostoucích na PCB

Vodný výluh zemin obou vzorků byl naředěn tak, aby vstupní koncentrace přítomných mikroorganismů (aerobních, kultivovatelných na MPA) byla řádově 10^3 CFU.ml⁻¹. Pro přípravu výluhu bylo použito sterilní minerální médium.

Tento výluh byl umístěn do sterilních Erlenmaerových baněk společně s 1% hm. Deloru 103 resp. Deloru 106.

Inkubace na třepačce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 14 dní.

Byly izolovány kmeny, jejichž koncentrace přesáhla hodnotu 10^6 CFU.ml⁻¹.

S těmito kmeny byl celý postup ještě jednou zopakován.

Výsledné izoláty byly zaslány k identifikaci do Mezinárodní sbírky mikroorganismů v Brně.

Ostatní analýzy

Stanovení pH a obsahu minerálních živin ve formě NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} pomocí mobilních analytických setů je popsáno v kapitole 2.3.4.3.1.

Měření intenzity respirace v zeminách popisuje kapitola 2.3.4.4.2. a stanovení celkového obsahu aerobních bakterií kultivovatelných na MPA kapitola 2.3.4.3.3.

3.3.2. Výsledky

3.3.2.1. Vstupní parametry poloprovozní části

Vstupní hodnoty sledovaných ukazatelů bezprostředně před zahájením anaerobní fáze procesu jsou uvedeny v tabulce 35.

Tab. 35: Výsledky vstupních analýz vzorků zemin (zeminy před technologickou úpravou)

Ukazatel	MILOVICE		MILEVSKO	
	Průměrná hodnota	Počet stanovení	Průměrná hodnota	Počet stanovení
Obsah PCB* (mg.kg ⁻¹)	175,5 ± 72,1	8	16,8 ± 7,3	8
Obsah NO ₃ ⁻ (mg.kg ⁻¹)	250 ± 0	3	500 ± 0	3
Obsah NO ₂ ⁻ (mg.kg ⁻¹)	2 ± 2,2	3	0	3
Obsah NH ₄ ⁺ (mg.kg ⁻¹)	150 ± 70,7	3	370 ± 47	3
Obsah PO ₄ ³⁻ (mg.kg ⁻¹)	0,57 ± 0,33	3	0,3 ± 0,2	3
Obsah SO ₄ ²⁻ (mg.kg ⁻¹)	63,1	1	97,1	1
pH	7 ± 0	3	7 ± 0	3
obsah aerobních heterotrofních bakterií (CFU.g ⁻¹)	6,9.10 ⁶ ± 3,6.10 ⁶	3	9,4.10 ⁶ ± 1,9.10 ⁶	3
intenzita respirace (mg CO ₂ .100g ⁻¹ .24h ⁻¹)	18,8 ± 1,7	3	25,5 ± 11,6	3
obsah extrahovatelných organických halogenů – EOX (mg.kg ⁻¹)	40,3	1	11,5	1

Výsledky analýz obsahu organicky vázaného chlóru v zeminách (jako EOX) neprokázaly dostatečnou vypovídací schopnost. Při daných koncentracích PCB (řádově 10 – 10² mg.kg⁻¹) se zvyšuje možnost interferencí dalších forem chlóru v zemině. V případě nárůstu obsahu PCB o jeden řád a více význam tohoto parametru pochopitelně vzrůstá. U vzorků zemin z lokalit Milevsko a Milovice však vykazoval pouze orientační charakter, a proto tento ukazatel nebyl dále sledován.

3.3.2.2. Výsledky průběžných analýz obsahu a kvality kontaminantu

Následující tabulky shrnují výsledky analýz prováděných na počátku pokusu a dále v průběhu aerobní fáze biodegradačního procesu u obou testovaných zemin. Jedná se o chemické analýzy zaměřené na obsah kontaminantu.

Tab. 36: Celkový obsah PCB v zeminách

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	obsah PCB (mg.kg ⁻¹)		obsah PCB (mg.kg ⁻¹)	
	sanační proces*	kontrola**	sanační proces*	kontrola**
květen 2001 (vstup)	175,5 ± 72,1		16,8 ± 7,3	
květen 2002	235,4 ± 33,5	163,0 ± 19,0	13,4 ± 4,5	12,3 ± 0,6
listopad 2002	167,5 ± 33,5	119,5 ± 2,5	16,9 ± 3,3	15,0 ± 0,1
říjen 2003	123,0 ± 18,2	131,0 ± 2,0	14,0 ± 3,6	13,3 ± 0,3

* jedná se o průměr z 8 vzorků

** jedná se o průměr ze 2 vzorků

Tab. 37: Obsah šesti vybraných kongenerů podle normy DIN 38414-20 v zeminách (viz. kap.

3.3.1.5.1.)

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	obsah PCB (mg.kg ⁻¹)		obsah PCB (mg.kg ⁻¹)	
	sanační proces*	kontrola	sanační proces*	kontrola
květen 2001 (vstup)	75,6 ± 17,6		10,7 ± 3,5	
květen 2002	77,0 ± 4,0	64,0 ± 7,0*	6,9 ± 0,2	8,7 ± 0,4*
listopad 2002	85,5 ± 18,5	63,0**	7,2 ± 2,4	6,3**
říjen 2003	58,5 ± 13,5	70,0**	7,9 ± 2,7	5,8**

* jedná se o průměr ze 2 vzorků

** bylo provedeno pouze jedno stanovení

Změny v kongenerovém složení vzorků na počátku a na konci anaerobní fáze procesu jsou shrnuty v tabulce 38.

Tab. 38: Poměr obsahu vybraných kongenerů v zeminách na začátku a na konci anaerobní fáze

	vstup*	výstup*	kontrola*
	kongenery se 3 atomy Cl / kongenery se 4 až 7 atomy Cl		
Milovice	1,67 ± 0,43	1,05 ± 0,03	0,78 ± 0,16
Milevsko	1,09 ± 0,41	0,74 ± 0,02	0,58 ± 0,09
	kongenery se 3 a 4 atomy Cl / kongenery s 5 až 7 atomy		
Milovice	56,6 ± 20,0	38,8 ± 1,7	29,9 ± 7,4
Milevsko	36,2 ± 8,6	27,0 ± 1,9	22,1 ± 4,0

* jedná se o průměr ze 3 vzorků

V příloze 5 jsou zařazeny ilustrační chromatogramy znečištění u vzorků Milevsko, Milevsko – kontrola a Milovice, Milovice - kontrola. Trojice chromatogramů vždy reprezentuje vstup, stav po anaerobní fázi a výstup.

3.3.2.3. Výsledky analýz zaměřených na technologickou kontrolu procesu

Hodnoty ukazatelů sledovaných za účelem technologické kontroly biodegradačního procesu jsou uvedeny v tabulkách 39 až 43.

Tab. 39: Obsah mezofilních bakterií v zeminách (aerobní kultivovace na MPA)

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	obsah mezofilních bakterií (CFU.g ⁻¹)		obsah mezofilních bakterií (CFU.g ⁻¹)	
	sanační proces	kontrola	sanační proces	kontrola
květen 2001 (vstup)	6,9.10 ⁶		9,4.10 ⁶	
květen 2002	7,4.10 ⁶	2,0.10 ⁵	3,4.10 ⁶	4,2.10 ⁵
listopad 2002	5,2.10 ⁵	5,3.10 ⁵	3,8.10 ⁶	2,2.10 ⁶
květen 2003	7,8.10 ⁵		9,6.10 ⁵	
červen 2003	6,4.10 ⁵		6,6.10 ⁵	
červenec 2003	1,8.10 ⁶	8,6.10 ⁴	1,5.10 ⁷	1,5.10 ⁶
srpen 2003	4,2.10 ⁶		6,6.10 ⁵	
září 2003	2,0.10 ⁵		3,0.10 ⁵	
říjen 2003	2,6.10 ⁵	1,2.10 ⁵	3,0.10 ⁵	3,2.10 ⁵

Tab. 40: Obsah minerálních živin ve formě NO₃⁻ / NH₄⁺ / PO₄³⁻ v zeminách

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	obsah NO ₃ ⁻ / NH ₄ ⁺ / PO ₄ ³⁻ (mg.kg ⁻¹)		obsah NO ₃ ⁻ / NH ₄ ⁺ / PO ₄ ³⁻ (mg.kg ⁻¹)	
	sanační proces	kontrola	sanační proces	kontrola
květen 2001 (vstup)	250 / 150 / 0,6		500 / 370 / 0,3	
květen 2002	0 / 75 / 0	0 / 0 / 0,3	0 / 200 / 0	0 / 0 / 0,2
listopad 2002	525 / 0 / 0,2	17,5 / 0 / 0,1	545 / 0 / 0,2	25 / 0 / 0,1
květen 2003	500 / 0 / 0,3		500 / 0 / 0,5	
červen 2003	500 / 0 / 0,7		500 / 0 / 0,3	
červenec 2003	500 / 0 / 0,75		500 / 0 / 0,75	
srpen 2003	500 / 0 / 0,3		500 / 0 / 5	
září 2003	500 / 0 / 0,7		500 / 0 / 1	
říjen 2003	500 / 0 / 0,5	5 / 0 / 0	500 / 0 / 0,5	10 / 0 / 0

Tab. 41: Hodota pH v zeminách během sanačního procesu

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	hodnota pH		hodnota pH	
	sanační proces	kontrola	sanační proces	kontrola
květen 2001 (vstup)	7,0		7,0	
květen 2002	8,1	8,8	7,9	7,7
listopad 2002	7,9	6,1	7,6	7,5
květen 2003	7,2		7,1	
červen 2003	6,9		7,2	
červenec 2003	6,8		6,4	
srpen 2003	6,9		5,5	
září 2003	5,4		5,5	
říjen 2003	6,2	6,5	6,5	7,0

Tab. 42: Intenzita respirace v zeminách během sanačního procesu

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	intenzita respirace ($\text{mgCO}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{zeminy}} \cdot 24\text{h}^{-1}$)		intenzita respirace ($\text{mgCO}_2 \cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{zeminy}} \cdot 24\text{h}^{-1}$)	
	sanační proces	kontrola	sanační proces	kontrola
květen 2001 (vstup)	18,8 ± 1,7		25,5 ± 11,6	
květen 2002	67,4	17,8	126	31,6
listopad 2002	28,8	11,2	47,7	10,9
květen 2003	75,9		44,5	
červen 2003	44,7		94	
červenec 2003	13,7		11,6	
září 2003	10,9		8,7	
říjen 2003	29,3	13,4	4,7	9,6

Tab. 43: Obsah SO_4^{2-} v zeminách na počátku a na konci anaerobní fáze procesu

Termín odběru vzorků	Milovice		Milevsko	
	obsah SO_4^{2-} (mg.kg ⁻¹)		obsah SO_4^{2-} (mg.kg ⁻¹)	
	sanační proces	kontrola	sanační proces	kontrola
květen 2001 (vstup)	5063,1*	63,1	5097,1*	97,1
květen 2002	203,7	39,8	254,2	77,4
listopad 2002	126,9	41,4	365,7	97,3

* teoretická hodnota vypočítaná z přídavku $FeSO_4$ a hodnoty pozadí

3.3.2.4. Výsledky izolace bakterií rostoucích na PCB

V průběhu aerobní fáze pilotního pokusu byly izolovány kmeny schopné růstu na technických směsích Delor 103 a Delor 106 v poměru 1:1 jako jediném zdroji. Podařilo se získat 4 Gram-negativní chemoorganotrofní bakteriální kmeny s aerobně respiračním metabolismem. Výsledky jejich identifikace v Mezinárodní sbírce mikroorganismů v Brně jsou uvedeny v tabulce 44.

Tab. 44: Izoláty bakteriálních kmenů rostoucích na PCB

Označení izolátu	Výsledek identifikace
MD1 a MD4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
MD2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
MD3	<i>Pseudomonas fluorescens (atypická)</i>

3.4. PODPOROVANÁ BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ V ZEMINÁCH – DISKUSE VÝSLEDKŮ

Poloprovozní dekontaminace zemin znečištěných polychlorovanými bifenyly ze dvou lokalit – Milevsko a Milovice - byla uspořádána tak, aby v případě prokázané dostačující účinnosti metody bylo možné tímto způsobem dekontaminovat zeminy v množství řádově 10^3 t a více.

- realizace anaerobní fáze je možná dočasným zavodněním kontaminovaných zemin
- všechna použitá aditiva jsou cenově dostupná, takže jednotková cena za sanaci se jejich použitím řádově nemění
- dále byly použity substráty, které jsou v jiných případech považovány za odpad (organické zbytky z výrob, jako primární substrát pro halorespiraci, síran železnatý jako terminální elektronový akceptor pro sulfát-redukující procesy).
- otázkou zůstává volba vhodného substrátu pro kometabolismus PCB. Ten je prokazatelně spojen s metabolismem bifenyly, jehož využití je ale v provozním měřítku přinejmenším diskutabilní.

Navržená metoda jako celek, která vykazovala poměrně slibné výsledky v laboratorních podmínkách, však v případě reálných vzorků a rozměrů nebyla dostatečně účinná.

Vyhodnocení 12 měsíců dlouhé anaerobní fáze ukončené v květnu 2002 ukázalo, že došlo ke změnám v kongenerovém složení kontaminantu, kdy se do vyhodnocované oblasti spektra pravděpodobně dostávají kongenery, které nebyly před zahájením procesu stanovovány a/nebo jejich pík nebyl vyhodnocován. Tím by bylo možné vysvětlit přechodné zvýšení obsahu PCB po ukončení anaerobní fáze (viz. tab. 36 a 37, kap. 3.3.2.2.). Chromatogramy (příloha 5) ukazují na určité změny v kongenerovém složení. Změny však nejsou příliš výrazné, zejména u vzorku Milovice. Navíc nelze jednoznačně prohlásit, že se jedná o posun k méněchlorovaným kongenerům, jak bylo původně předpokládáno. Tabulka 38 v kapitole 3.3.2.2. udává poměrně rozporuplné výsledky porovnání poměrů obsahu kongenerů se 3, 4, a více atomy chlóru v molekule. Po ukončení anaerobní fáze je poměr obsahu nížechlorovaných kongenerů ku obsahu výšechlorovaných vyšší ve srovnání s kontrolou, což by nasvědčovalo určitému nárůstu obsahu tri-, resp. tri- a tetra- chlorovaných PCB na úkor výšesubstituovaných kongenerů. Vstupní hodnoty sledovaných poměrů jsou však nejvyšší, a to jak u vzorku Milevsko, tak u vzorku Milovice. Účinnost anaerobní fáze procesu proto v těchto případech nelze jednoznačně posoudit.

Průběžné výsledky aerobní fáze (uskutečněné od května 2002 do listopadu 2002) také neprokázaly výrazně účinnou mineralizaci přítomných méně chlorovaných bifenyly. Tato skutečnost mohla být důsledkem několika faktorů:

- a) nižší koncentrace specifické mikroflóry, která metabolizuje vzniklé 2 až 3 chlorované bifenyly;
- b) krátká doba trvání aerobní fáze (cca 6 měsíců);
- c) nedostatečná aerace systému (technické problémy během povodňové situace v srpnu 2002);
- d) nízká dostupnost kontaminace pro mikroorganismy způsobená relativně vysokým stářím kontaminace.

Z těchto důvodů bylo rozhodnuto o prodloužení aerobní fáze pokusu do listopadu 2003. Zeminy byly v průběhu této prodloužené aerobní fáze mechanicky kultivovány jednou týdně, aby došlo k jejich dostatečné aeraci, a zavlažovány vodou. Jednou měsíčně probíhala aplikace bakteriálního preparátu, který navíc obsahoval izoláty z testovaných zemín, které byly schopné růstu na technických směsích Delor 103 a Delor 106 jako jediném zdroji uhlíku. Dotace minerálních živin ve formě NPK hnojiva probíhala také jednou měsíčně. V této části aerobní fáze nebyly dodávány organické zbytky z výrob, aby nemohly být příčinou inhibice bakteriálního rozkladu PCB.

Chemické analýzy ukazují na dostatek přítomných minerálních živin potřebných pro růst mikroorganismů. Hodnota pH zemín byla ve vyhovujícím rozmezí 5,4 - 7,5. Izolace 3 bakteriálních kmenů schopných utilizace PCB (kap. 3.3.2.4.) dokazuje přítomnost mikroorganismů adaptovaných na daný kontaminant. S ohledem na tyto výsledky můžeme říci, že podmínky aerobní fáze biodegradace byly dostačující (viz. tab. 40, 41 a 44).

Z vývoje koncentrace PCB v jednotlivých vzorcích vyplývá, že použitý postup přesto neměl zásadní vliv na stav znečištění v zemínách.

Pokud srovnáme vstupní a výstupní hodnoty celkového obsahu PCB (viz. tab. 36 a 37, kap. 3.3.2.2.), můžeme říci, že došlo k mírnému poklesu těchto hodnot u obou zemín. Pro zeminu pocházející z lokality Milevsko poklesl celkový obsah PCB z hodnoty 16,8 na 14,0 mg.kg⁻¹, u zeminy z lokality Milovice došlo k poklesu z 175,5 na 123,0 mg.kg⁻¹. Vzhledem k velikosti směrodatné odchylky však nelze hovořit o významné účinnosti biodegradačního procesu. Může se zde jednat o náhodnou fluktuaci hodnot způsobenou nehomogenitou vzorků. Navíc byl tento pokles pozorován i u kontrolních vzorků, mohl být tedy způsoben existencí přirozené biodegradační kapacity dočasně zvýšené odtěžením kontrolních vzorků zemin a jejich jednorázovým provzdušněním.

Modelové testy bakteriální dekontaminace zemín **uměle** znečištěných polychlorovanými bifenyly (Delor 103 a Delor 106), které probíhaly v období 2001 až 2002, vykazovaly výrazně vyšší účinnost biodegradace PCB (v řádu desítek %), a to u všech variant, jak aerobních, tak anaerobních. (Tyto testy

zde nejsou pro svou obsáhlost publikovány a jsou předmětem interní zprávy laboratoře firmy DEKONTA, a.s.) Potvrzuje se, že **účinnost biodegradace je úzce spojena se stářím kontaminace**, jak upozorňuje například Kuipers et al. (2003). Hlavním problémem tedy není neschopnost přítomných mikroorganismů rozkládat PCB, ale rozdílná biologická dostupnost polutantu. S rostoucím „stářím“ kontaminantu roste zřejmě podíl nevratných sorpcí na pevné struktury a tedy jeho stabilizace v zemině. Desorpce z půdních částic je potom limitující pro rychlost biodegradace. Může tak nastat situace, že pro vlastní biodegradaci není dostatek dostupného kontaminantu, ačkoliv jeho koncentrace v půdě je relativně vysoká. Biodegradační technologie je pak účinná minimálně nebo dokonce zcela neúčinná (Lhotský et al., 1997).

Pokud neuvažujeme sorpci na pevné částice, případně jiný mechanismus snížení biologické dostupnosti kontaminantu, zůstává důležitým faktorem v rychlosti a účinnosti biodegradace hodnota vstupního znečištění. Na rozdíl v kinetice biodegradace vysokých koncentrací PCB v laboratorních podmínkách a v reálu, kde naopak nízké koncentrace PCB často neslouží jako primární zdroj uhlíku, upozorňuje například Ahtiainen et al. (2003).

Tomu nasvědčují výsledky mikrobiologických analýz a měření intenzity respirace vzorků zemin shrnuté v taulce 39, resp. 42 kapitoly 3.3.2.2., které nevykazují zcela jednoznačně zvýšenou aktivitu oproti kontrole (na druhou stranu ani nenasvědčují vzniku prostředí toxického pro mikroorganismy).

Přímá souvislost mezi vstupní koncentrací PCB v zeminách a účinnosti biologických procesů byla Sokolem et al. (1998) pozorována také v případě reduktivní dehalogenace. U hodnot menších než 45 mg .kg⁻¹ byla účinnost tohoto procesu nulová, pro vyšší hodnoty byla funkcí koncentrace PCB.

V případě použitelnosti biodegradačních metod pro dekontaminaci zemin s obsahem PCB tak existuje zásadní rozpor. Při hodnotách znečištění v řádu 10³ mg.kg⁻¹ a více by byla při dodržení stejného technologického pravděpodobně pozorována procentuálně vyšší účinnost metody. Na druhé straně by tato účinnost v žádném případě neumožnila dosažení sanačních limitů pro následné uložení na skládku. Pokud bychom však chtěli biodegradaci využít jako dočišťovací metodu pro vstupní koncentrace PCB v řádu 10² mg.kg⁻¹ a méně, tedy v případě, kdy je použití ostatních metod (spalování, atd.) značně neekonomické, je tento postup znemožněn velmi nízkou účinností.

Z tohoto hlediska se jako perspektivní stále více jeví využití různých kombinací metod biodegradačních a fyzikálně-chemických (viz. tab. 28, kap. 3.1.3.2.), kombinace biodegradace s fytoremediací (Chromá, 2003a), apod. V poslední době byla úspěšně odzkoušena metoda promývání zemin detergentem Spolsapon (Šváb, 2004) a to konkrétně na zeminách z lokalit Milevsko a Milovice.

4. ZÁVĚR

Monitorovaná přirozená atenuace je v poslední době stále více uznávanou alternativou k běžně využívaným sanačním technologiím. A to zejména v případech, kdy využití různých technologicky závislých metod vede k neúměrnému zvyšování nákladů na sanaci (např. pokud je nutné odstranit nadzemní stavby, apod.). Ministerstvo životního prostředí bylo iniciátorem a zadavatelem projektu ověření metod indikace přirozené biodegradace (jako stěžejní součásti procesu přirozené atenuace) v reálných podmínkách lokality kontaminované ropnými uhlovodíky. Tyto praktické zkušenosti sloužily mimo jiné jako podklad pro vypracování ucelené metodiky pro využívání monitorované přirozené atenuace jako možného sanačního přístupu (Innemanová et al., 2001).

Vedlejším, ale přesto důležitým výsledkem projektu bylo podrobné zhodnocení stavu znečištění na zvolené lokalitě (zemědělský podnik Rýcholka, Choustníkovo Hradiště) a návrh dalšího nakládání s přítomnou zbytkovou kontaminací. V kapitole 2.4. – *Diskuse výsledků* jsou vyhodnoceny výsledky a důkazy vedoucí k úvaze, že v tomto konkrétním případě se jedná o vyčerpané ložisko znečištění, pravděpodobně dále ustupující vlivem přirozených procesů. Byl doporučen dlouhodobý monitoring procesu přirozené atenuace, přičemž jakýkoliv aktivní sanační zásah je v tomto případě s vysokou pravděpodobností zbytečný. To představuje nezanedbatelné snížení nákladů na dočištění lokality Rýcholka.

Poloprovozní testování metody řízené biodegradace zemin kontaminovaných polychlorovanými bifenyly bylo realizováno z popudu Státního zdravotního ústavu jako reakce na žádost různých podnikatelských subjektů o schválení metody biodegradace PCB. Na základě výsledků poloprovozu mělo být rozhodnuto, zda se jedná o metodu perspektivní a obecně využitelnou.

Přestože četné laboratorní modely prokázaly poměrně vysokou účinnost metody pro zeminy uměle kontaminované PCB, po její aplikaci na konkrétní ekologické zátěže lokalit Milevsko (bývalá obalovna živičných směsí) a Milovice (areál bývalého vojenského prostoru) nemohla být její využitelnost jednoznačně potvrzena.

Podle stávající legislativy není možné uložit na skládku nebezpečného odpadu zeminy s obsahem PCB převyšujícím 100 mg.kg^{-1} . Odpad s jakoukoliv vyšší koncentrací PCB je nutné dekontaminovat.

Biologické metody nejsou v případě PCB využitelné pro koncentrace 10^3 mg.kg^{-1} a více z důvodu jejich omezené účinnosti. V ČR však existuje řada ekologických zátěží, kde se obsah PCB pohybuje v řádu 10 až 10^2 mg.kg^{-1} . Pokud by se navíc podařilo dosáhnout snížení koncentrace PCB pod 10 mg.kg^{-1} , bylo by možné další uložení materiálu na skládce inertního odpadu, což představuje opět nezanedbatelné ušetření nákladů. Tato skutečnost je však v rozporu s vlastním principem biodegradačních metod. Zbytkové koncentrace, se kterými bylo pracováno, jsou již pravděpodobně

pro mikroorganismy málo využitelné. Navíc se zde silně projevují procesy „stárnutí“ kontaminátu, kdy dochází k nevrtným sorpcím na pevné částice a tedy dalšímu snižování biologické dostupnosti. Přes tyto negativní výsledky nelze jednoznačně prohlásit, že biodegradace je pro dekontaminaci zemin s obsahem PCB zcela nepoužitelná. V případě PCB jsou však mnohem více, než u jiných typů znečištění, opodstatněné podrobné testy proveditelnosti pro každou konkrétní lokalitu zvlášť. Nelze vyloučit, že v některých konkrétních případech bude možné uvedenou technologii využít, případně využít kombinaci biologických metod s různými způsoby nebiologické předúpravy.

Základní výzkum na poli biodegradačních metod, resp. sanačních technologií, produkuje stále nové cenné poznatky, potenciálně využitelné v praxi. Úkolem sanačního technologa je poskládat tyto informace tak, aby vytvořily ucelenou, prakticky využitelnou dekontaminační metodu. Není vždy možné odhadnout předem všechny komplikace, které přenos nové metody z laboratorních podmínek do reálného procesu doprovázejí. Realizace poloprovozních testů je zde proto nezbytná.

Cílem této disertační práce není pouhé vyhodnocení poloprovozního ověřování dvou principiálně zcela odlišných sanačních přístupů. Jedná se o nastínění problematiky přechodu od laboratorních podmínek k praxi v širších souvislostech a možné vodítko i pro jiné absolventy „uvržené“ z laboratoře přímo do praxe.

5. LITERATURA

- Ahtiainen, J., Aalto, M., Pessala, P. (2003): *Chemosphere* 51:6, p. 529-537
- Aziz, C. E., Newell, C. J., Gonzales, J.R., Haas, P., Clement, T. P. a Sun, Y. (2000): *BIOCHLOR Natural attenuation decision support system*. User's manual: Cincinnati, EPA.
- Beaudette, L.A., Ward, O.P., Pickard, M.A., Fedorak, P.M. (2000): *Letters in Applied Microbiology* 30:2, p.155-160
- Billingsley, K.A., Backus, S.K., Ward, O.P. (1999): *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:2, p.255-260
- Boopathy, R. (2004): *Bioresource Technology* 94 : 2, p. 143 - 151
- Brenner, V., Rucka, L., Totevova, S., Tomeraas, K., Demnerova, K. (2004): *Journal of Applied Microbiology* 96:3, p.430-436
- Carey, G. R. (1999): *MoNA Tool Kit User Manual: Waterloo*, Waterloo Hydrogeologic, Inc.,
- Clement, T. P. (1997): *RT3D A Modular Computer Code for Simulation Reactive Multispecies Transport in 3-Dimensional Groundwater Systems: Richland*, Pacific Northwest National Laboratory, 60 pages.
- Cushman, D.J., Ball, S.D. (1993): *Ground Water Monitoring and Remediation*, Fall Issue, p. 162-172
- Dercová, K.(2002): *Odpady* 7-8, p. 9-10
- Dercová, K., Vrána, B., Baláž, S. (1999): *Chemosphere* 38:6, p. 1391-1400
- EPA 510-B-95-007 (1998): *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers*
- EPA 540-S-99001 (1999a): *Ground Water Issue*
- EPA Directive nr. 9200.4-17P (1999b): *Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites*
- Essaid, H. I. a Bekins, B. A. (1997): *BIOMOC, A multispecies solute-transport model with biodegradation*: USGS Water Resources Investigation Report 97-4022, 68 str.
- Fava, F., Gentilucci, S., Zanaroli, G. (2003): *Chemosphere* 53:2, p. 101 – 109
- Ferrer, M., Golyshin, P., Timmis, K.N. (2003): *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19:6, p.637-643
- Furukawa, K. (2003): *Trends in Biotechnology* 21:5, p. 187-190
- Fuse, H., Takimura, O., Murakami, K., Inoue, H., Yamaoka, Y. (2003): *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67:5, p.1121-1125
- Grishchenkov, V.G., porosend, R.T., Mcdonald, T.J., Autenreith, R.L., Bowner, J.S., Boronin, A.M. (2000): *Process Biochemistry* 35 :9, p. 889 – 896
- Hamdy, M.K., Lin, Y.C., Toledo, R.(1999): *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 7:4, p.233-249

- Harder, H., Hopner, T. (1991): *Hydrocarbons Technology*, p. 329-333
- Hillel, D. (1989): *Remediation Techniques and Environmental Fate Risk Assessment*. Chelsea, MI: Lewis Publishers, vol. 1
- Holoubek, I., Petrik, J., Kohoutek, J., Velek, K., Ansorgová, A. (1996): Sborník referátů ze semináře *Polutanty v ekosystému z cyklu Aktuální ekologické otázky E'96*, Praha
- Huang, I.W., Hong, Ch.S., Bush, B. (1996): *Chemosphere* 32:9, p.1869-1881
- Hurst, Ch., Knudsen, G., McInerey, M., Stetzenbach, L., Walter, M. (1997): *Manual of Environmental Microbiolog.*, Library of Congress Cataloging-in Publication Data, USA,
- Cho, Y.C., Ostrofsky, E.B., Rhee, G.Y. (2004): *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:6, p.1425-1430
- Chromá, L. (2003a): Disertační práce *Úloha mikroorganismů a rostlin při přeměně a odstraňování xenobiotik z životního prostředí*, VŠCHT Praha
- Chromá, L., Moeder, M., Kučerová, P., Macek, T., Macková, M (2003b): *Fresenius Environmental Bulletin* 12:3, p. 291-295
- Innemanová, P., Vencelides, Z., Šráček, O. (2001): *Monitorovaná přirozená atenuace ropných uhlovodíků a chlorovaných alifatických uhlovodíků v podzemní vodě*, MŽP, Praha
- Jackson, W.A., Pardue, J.H. (1999): *Wetlands* 19 :1, p. 28-34
- Kao, C.M., Chen, S.C., Liu, J.K., Wang, Y.S. (2001): *Water Research*, 35:8, p. 1951-1960
- Kaštánek, F., Kaštánek, P., Demnerová, K., Maletelrvá, Y. (2004): *Water science and Technology* 50:2, p.131-138
- Kaufmann, K., Christophersen, M., Buttler, A., Harms, H., Hohener, P. (2004): *Fems Microbiology Ecology* 48:3, p.387-399
- Kennedy, L., Everett, J.W., Gonrales, J. (2004): *Journal of Environmental Engineering – Aice* 130:9, p. 942-950
- Keum, Y.S., Li, Q.X. (2004): *Chemosphere* 56:1, p.23-30
- Kim, J., Rhee, G. (1999): *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:12, p. 2696-2702
- Kim, S., Picardal, F. (2001): *Applied and Environmental Microbiology, Apr.*, p.1953-1955
- Kimbara, K., Ushioji, T., Kyotani, T., Shimura, M., Haykawa, T. (2004): *Seibutsu Kaishi* 82:2, p.56-62
- Kučerová, P., Macková, M., Chromá, L., Burkhard, J., Tříška, J. (2000): *Plant and Soil* 225:1-2, p. 109-115
- Kuipers, B., Cullen, W.R., Mohn, W.W. (2003): *Canadian Journal of Microbiology* 49:1, p. 9-14
- Lahvis, M.A., Bachr, A.L., Baker, R.J. (1999): *Water Resources Research* 35: 3, p. 753-765
- Lhotský, R., Koranda, K. (1997): *Odpady* 2, p. 11-14
- Lyman, W.J. a kol. (1982): *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behavior of Organic Compounds*, McGraw-Hill Book Company, New York

- Maltseva, O.V., Tsoi, T.V., Quensen, J.F., Fukuda, M., Tiedje, J.M. (1999): *Biodegradation* 10:5, p. 363-371
- Manzano, M.A., Perales, J.A., Sales, D., Quiroga, J.M. (2003): *Environmental Engineering Science* 20:2, p.91-101
- Margesin, R., Schinner, F. (1999): *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:5, p. 615-620
- McCue, J.J., Gauger, W.K., Holsen, T.H., Kelly, R.L., Cha, D.K. (1996): *Environmental Toxicology and chemistry* 15:7, p. 1071-1082
- Meloun, M., Militký, J. (1994): *Statistické zpracování experimentálních dat*, Plus, Praha
- Newell, C. J., McLeod, R. K. a Gonzales, J.R. (1996): *BIOSCREEN Natural attenuation decision support system. User's manual*: Cincinnati, EPA.
- Norris, R.D., a kol. (1994): *Handbook of Bioremediation*. Boca Raton, FL: CRC Press
- Palatý, J., Burkhard, J., Koller, J. (1999): *sborník semináře Sanační technologie II*, Seč
- Palekar, L.D., Maruya, K.A., Kostka, J.E., Wiegel, J. (2003): *Chemosphere* 53:6, p. 593-600
- Rifai, H. S., Bedient, P. B., Borden, R. C. a Haasbeek, J. F. (1987): *BIOPLUME II Computer model of two-dimensional contaminant transport under the influence of oxygen limited biodegradation in ground water; User's Manual - Version 1.0*: Houston, National Center for Ground Water Research
- Rifai, H. S., Newell, Ch. J., Gonzales, J. R., Dendrou, S., Kennedy, L. a Wilson, J. T. (1998): *BIOPLUME III Natural Attenuation Decision Support System. Users Manual*: Cincinnati, EPA
- Rojasavelizapa, N.G., Rodriguezvazques, R., Martinezcruz, J., Esparzagarcia, F., Deocagarcia, A.M., Riosleal, E., Fernandezvillagomez, G. (1999): *Folia Microbiologica* 44:3, p. 317-321
- Rojasavelizapa, N.G., Rodriguezvazques, R., Savalbohorquez, S., Alvarez, P.J.J. (2000): *World Journal of Microbiology & Biochemistry* 16:4, p. 319-324
- Seto, M., Nishibori, K., Masai, E., Fukuda, M., Ohdaira, Y. (1999): *Biotechnology Letters* 21:1, p. 27-31
- Sierra, I., Valera, J.L., Marina, M.L., Laborda, F. (2003): *Chemosphere* 53:6, p.609-6018
- Singer, A.C., Gilbert, E.S., Luepromchai, E., Crowley, D.E. (2000): *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:6, p.838-843
- Singer, A.C., Jury, W., Luepromchai, E., Yahng, C.S., Crowley, D.E. (2001): *Soil Biology & Biochemistry* 33:6, p.765-776
- Singer, A.C., Smith, D., Jury, W.A., Hathuc, K., Crowley, D.E. (2003): *Environmental Technology and Chemistry* 22:9, p.1998-2004
- Sokol, R.C., Bethoney, Ch.M., Rhee, G-Y. (1998): *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:10, p. 1922-1926
- Solanoserena, F., Marchal, R., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P. (1998): *Biodegradation* 9:5, p. 319-326

- Šráček, O., Datel, J., Mls, J. (2000a): Kontaminační hydrogeologie, UK Praha, Nakladatelství Karolinum, 210 str.
- Šráček, O., Datel, J., Kozubek, P., Němeček, J., Říha, V., Černá, M., Zýma, Z., Vencelides, Z., (2000b): Přírodní atenuace oragnických kontaminantů, Sborník příspěvků workshopu, ČAH/UK Praha, listopad 2000
- Šváb, M. (2004): Disertační práce Využití technologie promývání při sanaci starých ekologických zátěží, VŠCHT Praha
- Taguchi, K., Motoyama, M., Kudo, T. (2004): Bioscience Biotechnology and Biochemistry 68:4, p.787-795
- Totevová, S., Prouza, M., Brenner, V., Demnerová, K. (1997): Chemické listy 91, p. 858-866
- Totevová, S. (2000): Skriptum Biotechnologie životního prostředí, VŠCHT Praha
- Wiedemeier, T.H., a kol. (1994).: Proposed Air Force Guidelines for Successfully Supporting the Intrinsic Remediation (Natural Attenuation) Option at Fuel Hydrocarbons-Contaminated Sites. Outdoor Action Conference, May 23-25, Minneapolis
- Wiedermeier, T.H., Newell, Ch.J., Rifai, H.S., Wilson, J.T. (1999): Natutal Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface, Wiley&Sons, Inc., USA
- Wiedemeier, T.H., Lucas, M. A., Haas, P.E. (2000): Designing Monitoring Programs to Effectively Evaluate the Performance of Natural Attenuation, AFCEE, USA
- Wiegel, J., Zhang, X.M., Wu, Q.Z. (1999): Applied and Environmental Microbiology 65:5, p.2217-2221
- Wiliams, W.A (1997): Chemosphere 34:3, p. 655-669
- Zwiernik, M.J., Quensen III, J.F., Boyd, S.A. (1998): Environmental Science & Technology 32:21, p. 3360-3365
- Žáčková, P. (2003): Výsledky modelových testů biotechnologické sanace zemin s obsahem PCB, interní zpráva firmy DEKONTA, a.s., Praha

