

Laboratorní respirační testy a jejich význam v rámci nápravy ekologických zátěží

Jana CHUMCHALOVÁ^a, Martin KUBAL^b, Tomáš LANK^b, Lucie ORAVOVÁ^b, Andrey BULKIN^a, Natálie JUSTOVÁ^c, Patricie MALÁ^c, Jiří HENDRYCH^c

^a Ústav udržitelnosti a produktové ekologie, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

^b Katedra environmentální chemie a technologie, Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Pasteurova 3632/15, 400 96 Ústí nad Labem

^c Ústav chemie ochrany prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: jana.chumchalova@vscht.cz

Souhrn

V práci bylo na základě relevantních technických norem navrženo experimentální uspořádání laboratorního respiračního testu určeného pro ověření proveditelnosti aerobní bioremediace kontaminované zeminy. Na tomto zařízení byl proveden 42-denní respirační test, kde vstupní kontaminovaný materiál představovala zemina s uměle přidaným dodekanem. V rámci testu byla sledována jednak varianta aerobní bioremediace s pouze přidanými živinami a dále varianta aerobní bioremediace s přidanými živinami a současně také degradujícími mikroorganismy. Průběžným sledováním produkovaného oxidu uhličitého a provedením dalších doplňkových analýz byl získán rozsáhlý soubor experimentálních dat, na jehož základě byla následně sestavena rovnice kinetiky biodegradace přítomného dodekanu. Rovnice byla poté použita pro odhad časové náročnosti dosažení hypotetického sanačního limitu.

Klíčová slova: biodegradace, horninové prostředí, kontaminace, zemina, respirační test

Úvod

Termín „laboratorní respirační test“ je v širším rámci technické péče o životní prostředí obecně používán pro označení analytické procedury, jejímž prostřednictvím je kvantifikována biologická stabilita organického materiálu v aerobních podmínkách. Při omezení na tuhé zvodnělé matrice je tento termín odborné veřejnosti známý ze dvou oblastí - 1) hodnocení charakteristik zemědělské půdy a 2) hodnocení biologické rozložitelnosti odpadů¹⁻⁴. V první z uvedených oblastí jsou respirační testy používány například pro posouzení rozložitelnosti organického podílu v půdách, vyžrálosti kompostu nebo jiných aplikovaných produktů, případně dostupnosti fyziologicky využitelného dusíku. Ve druhé oblasti (při značném zjednodušení) slouží respirační testy k rozlišení odpadu biologicky stabilního od odpadu s významným podílem organické složky a malou biologickou stabilitou. Výsledek respiračního testu tak například umožní nebo naopak znemožní uložení určitého odpadu na skládku s nižším stupněm technického zabezpečení. Pro první uvedený případ jsou k dispozici předpisy a metodiky vycházející ze zákona 334/1992 Sb. (ochrana zemědělského půdního fondu). Druhá oblast je potom legislativně zakotvena zejména zákonem 541/2020 Sb. (zákonem o odpadech). Technické podrobnosti laboratorních respiračních testů jsou u obou výše uvedených a legislativně zakotvených oblastí specifikovány až do úrovně technických norem.

Mimo dvě výše vymezené oblasti a citované legislativní podklady je ovšem termín „respirační test“ používán v rámci nápravy ekologických zátěží vázaných na horninové prostředí, specificky potom v případě lokalit kontaminovaných organickými biodegradovatelnými látkami.

Teoretická část

V České republice není k dispozici specifický zákon pro oblast nápravy ekologických zátěží a termín „ekologická zátěž“ zde tedy nemá legislativně zakotvenou definici. Obecně je přijímán výklad MŽP ČR⁵, který tímto termínem označuje závažnou kontaminaci horninového prostředí, ke které došlo nevhodným nakládáním s rizikovými látkami (včetně aktuálních havarijních situací). Zjištěná kontaminace je považována za „starou ekologickou zátěž“, pokud vznikla před platností zákona o velké privatizaci (zákon č. 92/1991 Sb.) nebo původce kontaminace již neexistuje či není znám. Z čistě technického pohledu není ale mezi oběma terminologickými variantami žádný rozdíl.

Česká republika se vyznačuje mimořádně vysokým počtem lokalit nesoucích ekologickou zátěž, což je důsledkem dlouhodobé intenzivní průmyslové činnosti soustředěné na relativně malém území. Průzkum provedený již před dvěma dekádami v rámci 38 evropských států⁶ (včetně členských zemí EU) identifikoval přibližně 342 000 lokalit s prokázanou kontaminací a více než 2 500 000 potenciálně kontaminovaných míst. Celoevropský průměr počtu prokazatelně kontaminovaných lokalit na 10 000 obyvatel je zde uváděn hodnotou 2,46, pro samotnou Českou republiku potom hodnotou 13,2. V systému evidence kontaminovaných míst (SEKM) bylo v době přípravy tohoto textu k dispozici více než 16 000 záznamů⁷. Významná část z výše uvedených počtů lokalit je kontaminována ropnými látkami a aromatickými nebo polyaromatickými uhlovodíky, při jejichž odstraňování bývá typicky využíván proces aerobní bioremediace⁶.

Při absenci zákonem podložených limitních hodnot kontaminace horninového prostředí je pro každou lokalitu nezbytné v přípravné fázi nápravného opatření vypracovat expertní stanovisko - tzv. analýzu rizika, kde je stanovena a zdůvodněna míra, do které je zapotřebí přítomnou kontaminaci odstranit (tzv. sanační limit). Rozhodnutí o nápravě pak vydá Česká inspekce životního prostředí při využití některého z příbuzných zákonů, nejčastěji zákona č. 254/2001 Sb. (§ 42). V praxi bývá ale bohužel běžné, že se stanovený sanační limit ukáže být v předepsaném čase technologicky nedosažitelný a musí být zvyšován, případně dochází ke změně použité sanační technologie. Problémy s dokončováním nápravných opatření jsou v odborné veřejnosti známé a reflektuje je například také NKÚ⁸. Jedním z dosud opomíjených nástrojů ke zvýšení spolehlivosti závěrů rizikových analýz je podle autorů tohoto textu zásadní opomíjení laboratorních sanačních testů.

K otázce laboratorního zkoumání bioremediačních procesů bylo již publikováno značné množství textů, jejichž kritické zhodnocení bylo autory tohoto textu prezentováno na jiném místě⁹. Pouze tedy ve zkratce lze uvést, že za cíle laboratorních bioremediačních testů je typicky považováno 1) prokázání přítomnosti degradujících mikroorganismů; 2) posouzení toxických účinků přítomných kontaminantů vůči degradujícím mikroorganismům; 3) určení spektra potřebných živin a stanovení jejich množství; 4) posouzení případných rizik při aplikaci živin na dané lokalitě. Naplnění těchto cílů vyžaduje nemalé a nikoli krátkodobé úsilí multioborového týmu s velmi dobrým a drahým vybavením. Nad rámec výše specifikovaného a obecně uznávaného smyslu laboratorních bioremediačních testů ovšem existuje ještě další dílčí cíl, který bývá v literatuře reflektován jen zcela okrajově¹⁰⁻¹³. Tímto cílem je prokázání technologické proveditelnosti nápravného opatření v idealizovaných laboratorních podmínkách a nástrojem pro jeho dosažení je právě laboratorní respirační test.

Pro sestavení laboratorní aparatury a nastavení podmínek respiračního testu a jeho vyhodnocení lze využít několik technických norem. Podrobný popis základních principů laboratorních testů aerobního rozkladu organických látek v zeminách přináší norma ČSN EN ISO 11266¹⁴. Zde jsou specifikovány požadavky na 1) výběr, vzorkování a popis zkušební zeminy; 2) způsob umělé kontaminace; 3) nastavení podmínek laboratorního testu (teplota, obsah vody, doba, monitoring); 4) způsob vyhodnocení výsledků. Současně tato norma ponechává značný prostor ohledně konkrétního provedení testu. Přesnější technická vodítka k provedení testu aerobního rozkladu organických látek poskytuje norma ISO 14239¹⁵, která specifikuje šest možných laboratorních a instrumentálních uspořádání: 1) průtokové uspořádání; 2) kolonový test se zachytem ve směsi hydroxidu sodného a vápenatého; 3) biometrický test; 4) radiorespirometrický test; 5) mikroradiorespirometrický test a 6) test s miniaturizovaným respiometrem. U každého typu testu jsou zde přehledně doloženy výhody a nevýhody. Postupem pro stanovení mikrobiální respirace v aerobních zeminách se dále specificky zabývá norma ISO 16072¹⁶ z roku 2002, ve které jsou popsány chemické a instrumentální postupy pro

stanovení úbytku kyslíku nebo vzniku oxidu uhličitého v průběhu respiračního testu. Konečně potom norma ISO 17155¹⁷ definuje výpočetní vztahy, s jejichž pomocí lze na základě laboratorních respiračních testů vyjádřit kinetiku rozkladu degradované organické látky.

K výše naznačeným teoretickým podkladům náleží dále také rozsáhlý znalostní aparát související s konceptem biodostupnosti a s procesy stárnutí kontaminace. Oba tyto významné faktory jsou v práci zmíněny pouze ve zkratce, neboť v daném kontextu není bohužel prostor pro jejich obsáhlejší rozbor a navíc zde nabývají velmi specifické podoby.

Biodostupný podíl kontaminantu bývá ve vodných systémech (bez přítomnosti tuhé fáze) totožný s analyticky zjištěným množstvím pouze v ideálním případě, kdy je kontaminant zcela přístupný mikrobiálnímu (obecněji biochemickému) přeměně. V praxi bývá u čistě vodných systémů biodostupný podíl typicky nižší oproti analytické hodnotě, ale nemůže být vyšší. V kontaminovaných zemínách k této situaci dojít může. Při vstupu kontaminantu do zeminy se jeho část naváže na tuhou matici tak silně, že se stane pro analytickou proceduru (zejména předúpravu vzorku) nedostupnou. Přítomné mikroorganismy si ovšem cestu i k takto silně vázanému kontaminantu najít mohou a potom může nastat situace, kdy je biodostupné množství větší oproti analyticky zjištěné hodnotě. V případě laboratorních respiračních testů by se taková situace projevila nadstechiometrickou produkcí oxidu uhličitého, pokud bychom jako základ vzali právě analytickou koncentraci a respirační test by probíhal dostatečně dlouhou dobu. Otázka stárnutí kontaminace je u znečištěných zemín rovněž mimořádně důležitá. Doba mezi vstupem kontaminantu do zeminy a dosažením ustáleného stavu bývá na většině kontaminovaných lokalit typicky velmi dlouhá, běžně i v řádu desítek let. Procesy stárnutí jsou mimořádně komplexní a z hlediska biodostupnosti mohou mít pozitivní a negativní účinek. V kontextu této práce bylo považováno za zásadní, aby byl charakter kontaminace do té míry ustálený, aby se v průběhu respiračního testu (tedy v řádu desítek dnů) neměnil. Modelový kontaminant byl vnesen do zeminy v přebytku těkavého rozpouštědla, což podle dlouhodobých zkušeností autorů zajišťuje po odpaření rozpouštědla v čase již stabilní distribuci kontaminantu v systému zemina – voda – vzduch.

Technické provedení laboratorního respiračního testu nemá dosud v rámci České republiky ustálenou podobu. V obecném povědomí současně existuje málo podložený názor, že tento typ testu lze provést v krátkém čase, například během několika málo dnů (podobně jako BSK₅ či AT₄). Cílem této práce tedy bylo vypracování a ověření přesné metodiky laboratorního respiračního testu aerobní bioremediace v souladu s ustanovením výše uvedených ISO norem a racionálně vyhodnotit potřebnou dobu jeho trvání. Specifický důraz byl zde kladen na zjištění technologicky zásadních parametrů – tedy určení ideální kinetiky rozkladu kontaminantu a identifikace případných meziproductů rozkladu.

Experimentální část

Pro modelový laboratorní respirační test byl na pozemku určeném pro residenční výstavbu domu (po sejmutí orniční vrstvy) odebrán vzorek zeminy o hmotnosti 20 kg. Odebraný materiál byl typově označen jako sprašový sediment. Vzorek byl v laboratoři vysoušen po dobu 5 dnů při teplotě okolí a následně separován s pomocí síta o velikosti oka 2 mm. Podsítná frakce o hmotnosti cca 6 kg při zbytkovém obsahu vody 2,0 % hm. byla použita jako dobře homogenizovatelný základ pro respirační test a na tomto materiálu bylo provedeno stanovení prvkového složení metodou XRF a stanovení celkového organického uhlíku metodou elementární analýzy. Z uvedeného množství podsítné frakce byly 4 kg určeny pro umělou kontaminaci a 2 kg sloužily jako referenční materiál.

Umělá kontaminace byla provedena přidáním dodekanu (C₁₂H₂₆, p.a. čistota) v množství 7 000 mg/kg sušiny, přičemž dodekan byl do zeminy pro zajištění rovnoměrné distribuce přidán v pětinasobném objemovém množství hexanu. Přidaný hexan byl následně odpařen v digestoři při laboratorní teplotě. Do osmi umělohmotných vzduchotěsných vzorkovnic typu Lock-Lock o objemu 1000 ml bylo naváženo vždy 0,5 kg kontaminované zeminy, do jedné další vzorkovnice bylo naváženo opět 0,5 kg referenční zeminy bez kontaminace. Experimentální podmínky v jednotlivých vzorkovnicích byly poté nastaveny přidáním vody, živin a bakteriální kultury *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, jak je specifikováno v tabulce 1. Před zahájením respiračních testů byla provedena analytická kontrola kontaminace metodou C₁₀-C₄₀, kde zjištěné hodnoty jsou rovněž ukázány v tabulce 1.

Tabulka 1: Výchozí parametry modelového laboratorního respiračního testu

Stanovení Přídavek	Zemina							
	kontaminovaná							nekontaminovaná
	číslo vzorku							
	1	2	3	4	5	6	7	8
analýza C ₁₀ -C ₄₀ * (mg/kg)	4 650	4 680	4 580	4 080	5 260	4 860	4 790	< 20
živiny**	---	ano	ano	ano	ano	ano	ano	---
kultura***	---	---	---	---	ano	ano	ano	---
voda (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50

*Stanovení metodou plynové chromatografie, podle ČSN EN 14039

**Přídavek živin v poměru C:N:P = 120:10:1 (přídavek do jedné vzorkovnice činil 0,987 g NH₄Cl, 1,865 g KNO₃, 0,502 g KH₂PO₄).

*** Zemina byla inokulována bakteriální kulturou *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Do zeminy byl pipetován 1 ml suspenze o koncentraci 10¹⁰ KTJ/ml. Suspenze byla připravena po dvoudenní kultivaci kmene na agarové plotně se ztuhlou kultivační půdou „Trypton sójový agar“ při 25 °C spláchnutím do fyziologického roztoku.

Vzorkovnice podle výše uvedených specifikací byly uzavřeny vzduchotěsnými víčky. Do každého víčka byly napevno instalovány dvě polyethylenové hadičky pro monitoring koncentrace oxidu uhličitého, který byl předpokládán jako finální produkt biodegradace zvoleného kontaminantu. Zvlhčený vzorek zeminy zabíral přibližně třetinu objemu vzorkovnice, zbylý objem byl vyplněn vzduchem. Každá z hadiček byla uzavřena zátkou a navíc ještě ocelovou tlačkou. Ve zvolených časových intervalech (~ 2 – 3denních) byly měřeny koncentrace oxidu uhličitého a kyslíku v head-space vzorkovnic (napojením přístroje Greisinger G 1910-02 nebo Multitec 540 na hadičky). Po každém měření byla vzorkovnice otevřena, zemina pečlivě promíchána skleněnou tyčinkou a opět vzduchotěsně uzavřena. Běžná pozadřová koncentrace oxidu uhličitého (~ 500 ppm) byla odečítána od změřených hodnot. Celková doba trvání laboratorního respiračního testu byla určena na 42 dnů, přičemž teplota byla během této doby udržována na hodnotě 21 ± 1 °C. Pro udržení nastaveného obsahu vody (10 % hmot.) byly vzorkovnice průběžně převažovány a zjištěné úbytky doplňovány (toto ale bylo zapotřebí až ke konci testu. Na začátku a konci laboratorního respiračního testu byly odebrány vzorky na analýzu C₁₀ – C₄₀, na identifikaci a kvantifikaci případných meziproduktů aerobního rozkladu a rovněž na stanovení počtu kultivovatelných mikroorganismů. Na počátečním referenčním nekontaminovaném vzorku byla rovněž provedena analýza TOC a XRF. Nastavená vlhkost zeminy se v průběhu respiračního testu neměnila.

Pro stanovení počtu mikroorganismů byla použita metoda opírající se o tři zdroje^{18, 19, 20}. Do předvážené sterilní Duran Schott lahvičky (objem 250 ml) se navážilo 3 g zeminy. Do lahvičky byl napipetován Ringerův roztok o čtvrtinové koncentraci (R1/4 roztok) v poměru 1 : 9. Následně byl vzorek homogenizován na třepačce 10 min, 400 rpm. Těsně před odběrem inokula byl vzorek ručně rozmíchán, ponechán stát 2 min. Poté byl pipetován 1 ml vzorku těsně pod hladinou a použit pro přípravu desítkového ředění opět do roztoku R1/4. Na agarové plotny se ztuhlou kultivační půdou „Živný agar“ bylo rozetřeno inokulum. Kultivace probíhala za aerobních podmínek při 25 °C po dobu 7 dní. Počítání kolonií a stanovení celkového počtu bylo provedeno normovaným postupem²¹. Stanovení počtu *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 bylo provedeno ze suspenze po rozmíchání na vortexu, následně byla připravena řada desítkového ředění do roztoku R1/4. Dále stanovení počtu probíhalo stejným způsobem jako u vzorků zemín²¹.

Výsledky a diskuse

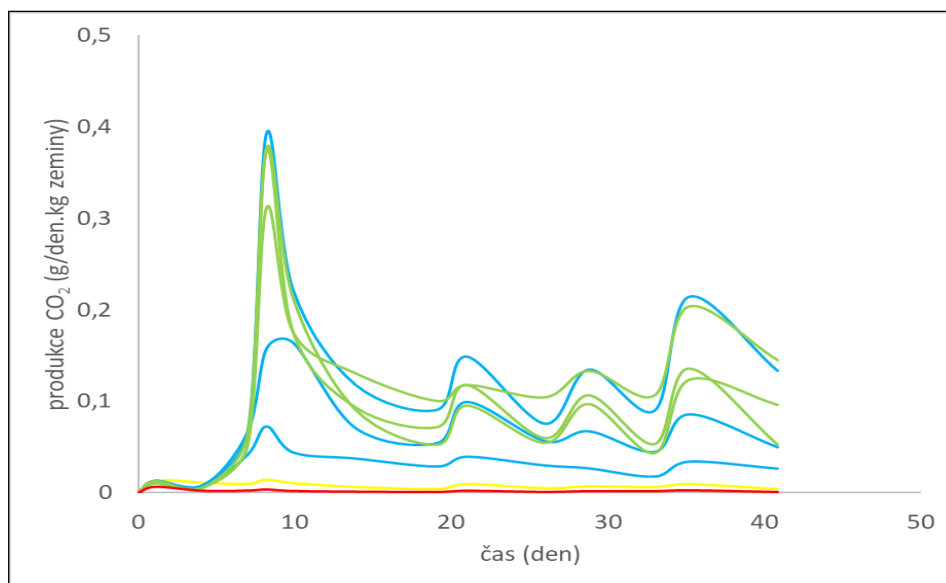
Výchozí složení použité zeminy před nadávkováním kontaminantu (6 kg podsítné frakce < 2 mm) je sumarizováno v tabulce 2. Při odběru byla reflektována snaha získat testovací materiál bez zvýšeného obsahu toxických kovů, aby tak později vnesená organická látka představovala jediný a dobře definovaný antropogenní faktor. Data v tabulce 2 dokládají pouze nevýznamné obsahy minoritních toxických prvků, které nenaznačují překročení hodnot přirozeného pozadí. Obsah celkového organického uhlíku je dán rozdílem mezi TC a TIC₄₀₀ a činí tedy 0,36 % hmot..

Tabulka 2: Obsah majoritních a minoritních prvků v použité modelové zemině

Majoritní prvky (% hmot.)										
Si	Al	Fe	Na	K	Ca	Mg	P	Ti	TIC ₄₀₀	TC
36,1	5,84	3,25	0,58	2,74	3,31	0,47	0,13	0,56	0,54	0,90
Minoritní prvky (mg/kg sušiny)										
S	Cl	V	Cr	Ni	Zn	Ba	Mn	As	Sr	W
372	89	103	< 30	64	62	810	690	< 30	220	130

Při umělé kontaminaci byl do zeminy přidán dodekan v množství 7 000 mg/kg sušiny, přičemž analytická kontrola provedená stanovením parametru C₁₀-C₄₀ při zahájení vlastního respiračního testu ukázala hodnotu 4 700 mg/kg sušiny. I přes zřejmý číselný rozdíl se ve skutečnosti jedná o dobrou shodu mezi přidáním množství dodekanu a zjištěnou analytickou odezvou. Skutečnost, že část organického kontaminantu uměle vneseného do zeminy se při následné analytické kontrole „ztratí“ je dlouhodobě známá a je vysvětlována zejména chemisorpcí, při které se určitý podíl přivedeného kontaminantu naváže na danou matici tak silně, že se vůči analytické proceduře (typicky ve fázi předúpravy vzorku) stane „neviditelným“. U zemin bývá schopnost chemisorpce přisuzována přirozeným organickým látkám a jílovým minerálům.

Průběžné monitorování respiračního testu spočívalo ve sledování koncentrace oxidu uhličitého, který byl uvažován za koncový produkt aerobního rozkladu. Celková doba trvání respiračního testu činila 42 dnů a v průběhu této doby bylo provedeno 13 měření koncentrace oxidu uhličitého v head-space vzorkovnic. Časové průběhy produkce oxidu uhličitého v rámci celého respiračního testu jsou pro jednotlivé vzorkovnice ukázány v souhrnné formě na Obr. 1, kde jsou barevně rozlišeny čtyři různé podmínky aerobního rozkladu dodekanu, jehož koncovým produktem je oxid uhličitý.



Obrázek 1: Tvorba oxidu uhličitého v průběhu laboratorního respiračního testu pro kontaminovanou zeminu bez přidavku živin a degradérů (vzorek 1 ■); kontaminovanou zeminu s přidavkem živin (vzorek 2, 3, 4 ■); kontaminovanou zeminu s přidavkem živin a degradérů (vzorek 5, 6, 7 ■); nekontaminovanou zeminu (vzorek 8 ■).

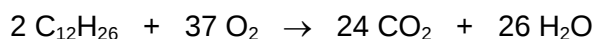
Červená barva odpovídá pozadové koncentraci oxidu uhličitého v nekontaminované zemině, kterou z hlediska aerobní bioremediace považujeme za referenční systém. Hodnoty měřené v této vzorkovnici se pohybovaly v rozmezí ~ 600 - 900 ppm a byly tak vždy sice jen mírně, ale přesto měřitelně vyšší oproti obvyklé koncentraci v prostoru laboratoře, která se pohybovala průměrně na hodnotě 500 ppm a byla v rámci následných bilančních výpočtů od měřených hodnot odečítána. V případě

nekontaminované zeminy se její přirozená organická hmota považuje obecně již za stabilizovanou a další rozklad se již neočekává vůbec nebo pouze s nevýznamnou intenzitou. Žlutá linie na obrázku 1 odpovídá produkci oxidu uhličitého v kontaminované zemině bez přidavku živin a degradujících mikroorganismů, měřené hodnoty se zde během testu pohybovaly v rozmezí 1400 – 3500 ppm. Jedná se o hodnoty odpovídající velmi pomalému rozkladu, při kterém kontaminant může setrvávat v zemině po dobu vyšších jednotek nebo až nižších desítek let.

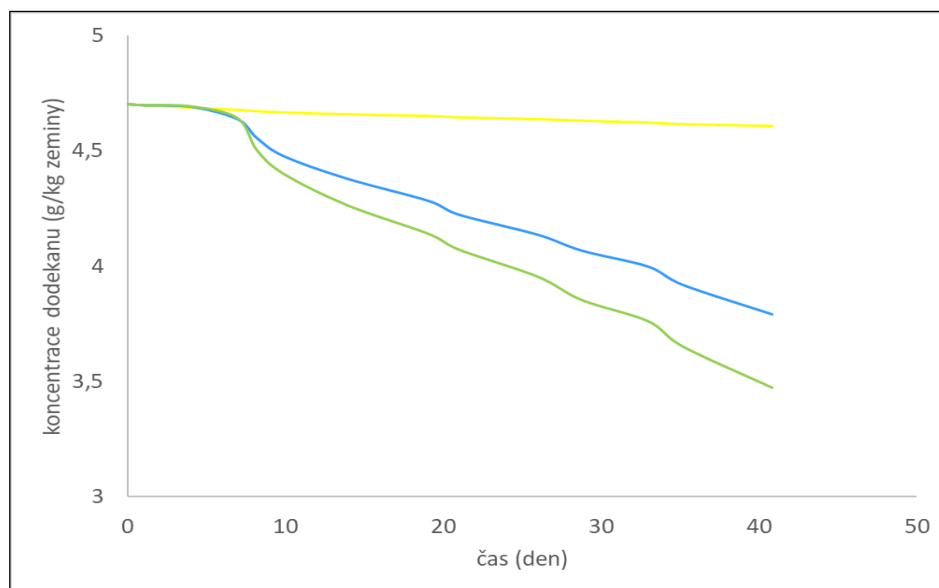
Tři modré linie na obrázku 1 odpovídají aerobnímu rozkladu po přidání živin, ale bez přidáných degradérů. Dobře jsou zde zřejmé trendy popsané v teoretickém mechanismu respirace zeminy kontaminované biodegradovatelnou organickou látkou¹⁷. Jedná se zejména o 1) exponenciální nárůst rychlosti po zhruba pětidenní indukční prodlevě a identifikaci maximální respirační aktivity; 2) pokles respirační aktivity na dlouhodobě vcelku ustálenou hodnotu po dalších zhruba deseti dnech; 3) značný rozptyl hodnot u třech opakování. Podrobná interpretace mechanismu produkce oxidu uhličitého není pouze na základě výsledků na obrázku 1 možná a nebyla ani cílem práce. Je nicméně zřejmé, že biodegradace dodekanu na oxid uhličitý zde byla výsledkem komplexního působení mnoha biochemických, chemických a transportních procesů ve složitém třífázovém systému. V experimentální zemině nemohl během testu nastat nedostatek živin a kyslíku a průběžně byl odváděn také vzniklý oxid uhličitý. V okamžiku dosažení maximální respirační rychlosti (mezi 10 – 15 dnem testu) byl degradován teprve velmi malý podíl dodekanu. Výrazný nástup biodegradace rychlosti a její následný pokles tak s největší pravděpodobností souvisel s dostupností kontaminantu (povrch – objem částic) případně transportními jevy. K velkému zjištěnému rozptylu měřených dat je zapotřebí uvést, že respirační testy byly prováděny s využitím dlouholetých zkušeností v laboratorním výzkumu a s maximální pečlivostí. Podle dřívějších zkušeností autorů není tato úroveň rozptylu u opakovaných mikrobiologických experimentů nijak výjimečná a problém lze řešit větším počtem opakování.

Zelené linie na obrázku 1 potom ukazují produkci oxidu uhličitého ve vzorkovnicích, do kterých byly přidány živiny a současně kultura mikroorganismů s prokázanou schopností degradovat ropné uhlovodíky. Časový průběh zjištěných závislostí je v tomto případě podobný jako u vzorkovnic bez degradérů a jejich interpretace je tedy v podstatě stejná. Zřejmým rozdílem je zde pouze menší rozptyl mezi třemi prezentovanými liniemi. Jelikož varianta s přidávanými degradéry je technicky výrazně složitější než varianta pouze s přidávanými živinami, je velmi důležité vyhodnotit a porovnat obě tato uspořádání z hlediska času potřebného pro dosažení zvolené zbytkové koncentrace kontaminantu (v technologické praxi tedy odhad doby potřebné pro dosažení sanačního limitu).

Pro porovnání obou variant aerobní biodegradace byly tedy hodnoty měřené vždy ve třech stejných vzorkovnicích (2, 3, 4; 5, 6, 7) nejprve zprůměrovány a posléze přepočítány na množství degradovaného dodekanu podle stechiometrické rovnice:



Úbytek koncentrace dodekanu v průběhu respiračního testu je potom v souhrnné formě ukázán na obrázku 2, kde je dobře zřejmý rozdíl v rychlosti biodegradace v samotné kontaminované zemině a v zemině po přidavku živin nebo živin a degradérů. Referenční časová závislost pro kontaminovanou zeminu bez přidavku živin a degradérů (žlutá linie) prezentuje výsledky pouze z jednoho měření a má tedy spíše indikativní charakter. V praxi by tato referenční linie odpovídala situaci, kdy je rozklad kontaminantu v zemině ponechán pouze na působení přirozených dějů. Časové závislosti na obrázku 2 byly následně vyhodnoceny prostřednictvím kinetiky prvního řádu a výsledné kinetické rovnice jsou prezentovány v tabulce 3. Současně jsou zde uvedeny teoretické doby potřebné pro dosažení dvou hypotetických sanačních limitů - 2000 mg/kg a 1000 mg/kg sušiny. Vyhodnocení biodegradace dodekanu prostřednictvím kinetiky prvního řádu představuje velmi zjednodušenou formu interpretace. V kontextu této práce jde ovšem o akceptovatelný postup, neboť laboratorní respirační test je zde chápán jako nástroj zásadního potvrzení nebo vyloučení technologické proveditelnosti. Pro podrobnější poznání složitých biodegradčních mechanismů potom slouží experimenty výrazně komplexnější a instrumentálně sofistikovanější.



Obrázek 2: Pokles koncentrace dodekanu v průběhu laboratorního respiračního testu pro kontaminovanou zeminu bez přísady živin a degradérů (vzorek 1 ■); kontaminovanou zeminu s přísadou živin (vzorek 2, 3, 4 ■); kontaminovanou zeminu s přísadou živin a degradérů (vzorek 5, 6, 7 ■).

Tabulka 3: Vyhodnocení laboratorního respiračního testu s pomocí kinetiky prvního řádu

Varianta testu	Kinetická rovnice*	Teoretický čas pro dosažení sanačního limitu 2000 mg/kg	Teoretický čas pro dosažení sanačního limitu 1000 mg/kg
kont. zem.	$y = 4,7 \cdot e^{-0,0005 \cdot t}$	1708 dnů	3095 dnů
kont. zem. + ŽIV	$y = 4,7 \cdot e^{-0,005 \cdot t}$	171 dnů	310 dnů
kont. zem. + ŽIV + DG	$y = 4,7 \cdot e^{-0,008 \cdot t}$	107 dnů	193 dnů

* y = koncentrace dodekanu v zemině (mg/kg zeminy); t = čas (den)

Analýza $C_{10} - C_{40}$, která byla provedena na začátku testu u všech vzorkovnic a na konci testu u vzorkovnic 2 – 7 neukázala přítomnost jiných látek než dodekanu. Bylo tedy zřejmé, že původní chemikálie byla dodána v řádné p.a. čistotě a dále, že v průběhu aerobního rozkladu nevznikaly stabilní meziprodukty.

V rámci respiračního testu bylo dále provedeno stanovení celkového počtu kultivovatelných mikroorganismů na začátku respiračního testu a ve třicátý den jeho trvání. Získané výsledky jsou v souhrnné formě ukázány v tabulce 4. Na počátku testu se počty kultivovatelných mikroorganismů pohybovaly v řádu 10^5 až 10^6 KTJ/g zeminy, což je obvyklá úroveň pro nekontaminovanou nebo málo kontaminovanou zeminu s nízkým obsahem živin. Odběr vzorku pro počáteční mikrobiologické stanovení byl proveden pouze několik hodin po vmíchání kultury do zeminy, což byla příliš krátká doba pro adaptaci. Jak je zřejmé z obrázku 1, projevil se nástup degradační schopnosti přítomných mikroorganismů (ať již autochtonních nebo vnesených) až přibližně po pěti dnech od zahájení testu. Odběr provedený třicátého dne respiračního testu (tedy při vcelku již ustálené degradační rychlosti) ukázal jasný řádový rozdíl v kvantitě mikrobiálního osídlení mezi referenčními vzorky 1 a 8 a podporovanými vzorky 2 – 7. Číselné rozdíly prezentované pro tripplikovaná stanovení 2 – 4 a 5 – 7 jsou pro náročná mikrobiologická stanovení v zeminách běžná.

Tabulka 4: Výsledky stanovení počtů mikroorganismů ve vzorcích na začátku a na konci pokusu

	Zemina							
	kontaminovaná							nekontam.
	Číslo vzorku***							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	CPM [KTJ/g zeminy]							
počáteční stanovení**	$3,4 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
průměr		$1,0 \times 10^6$			$1,3 \times 10^6$			
stanovení 30. den testu	$2,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9$	$6,9 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$2,9 \times 10^6$
průměr		$1,3 \times 10^9$			$1,8 \times 10^9$			
nárůst oproti počátku	6,2	3521	627	508	1211	2653	1133	1,12
nárůst proti nekontam.	0,72	862	238	210	793	448	586	1

* CPM = celkový počet mikroorganismů; KTJ = jednotky tvořící kolonie

**ve stejný den, kdy bylo provedeno přidání kultury

***barevná označení odpovídají logice Obr. 1 a 2

Pokud interpretujeme výstupy prezentované výše na obrázcích 1 a 2 a v tabulkách 1 – 4 v logice hlavního cíle tohoto textu (doložení praktického významu laboratorních respiračních testů v přípravné fázi bioremediačního zásahu), vzniká potřeba upřesnit následující technické aspekty:

- 1) Jak dlouho má (musí) respirační test trvat?
- 2) Jaké technické uspořádání respiračního testu je pro daný účel vhodné?
- 3) Jaké parametry je nutné v rámci respiračního testu sledovat?
- 4) Jakým způsobem má být respirační test interpretován?

Ad. 1: Potřebná doba trvání respiračního testu

Laboratorní respirační test ukázaný v této práci během zhruba jednoho měsíce trvání dobře zachytil tři fáze biodegradačního děje (adaptační, exponenciální, stacionární). Test probíhal v podmínkách, které v realitě nápravy ekologických zátěží můžeme považovat za ideální a kde za prvotní úspěch nutno považovat již fakt, že biodegradace vůbec probíhá. Existuje mnoho důvodů, proč tomu tak nemusí být a doložitelné skutečnosti v teoretické části textu ukazují, že tomu tak v mnoha reálných situacích také nebývá. Relevantní technický předpis EN ISO 11266 minimální dobu respiračního testu nedefinuje, pouze dává doporučení, aby test netrval déle než 120 dnů.

Obvyklá praxe nápravy ekologických zátěží poskytuje pro realizaci nápravného opatření dobu tří let. Hlavním cílem laboratorního respiračního testu je objektivní doložení skutečnosti, že biodegradace (v idealizovaných podmínkách) alespoň v nějaké míře probíhá. Sekundárním cílem je potom stanovení kinetiky biodegradačního procesu. Pro doložení tohoto hlavního cíle musí probíhat respirační test nejméně po dobu adaptace. Ta bývá v odborné literatuře dokumentována pro časové úseky od několika desítek hodin až po několik desítek dnů. Minimální časová hranice respiračního testu se tedy definuje jen velmi těžko. Podle autorů tohoto textu by ale tato hranice neměla být kratší než jeden měsíc. Pro doložení výše uvedeného sekundárního cíle je potom zapotřebí získat takové množství dat k produkci oxidu uhličitého, aby bylo možné rozumně vykreslit kinetickou rovnici a extrapolovat ji na předpokládanou dobu nápravného opatření. Jako vhodné časové rozmezí se zde ukazuje interval 1 – 4 měsíce.

Ad. 2: Technické uspořádání respiračního testu

Způsob provedení respiračního testu použitý v této práci (viz Obr. 1) vycházel z technických norem EN ISO 14239 a EN ISO 16072. Podle názoru autorů byly z obou technických norem vybrány a zkombinovány nejvýhodnější dílčí konstrukční a měřicí prvky a principy. Mezi šesti konstrukčními principy respiračního testu, které nabízí norma EN ISO 14239, byl vybrán průtočný systém (flow-through incubation system), který byl zjednodušen tak, aby kladl minimální nároky na laboratorní zázemí a při zachování výhod tohoto systému (zejména jeho vhodnost pro dlouhodobé testování). Zjednodušení zde spočívalo zejména v použití semi-kontinuálního průtokového režimu a absenci zachytu oxidu uhličitého ve vstupním vzduchu. Semikontinuální režim (oproti plně kontinuálnímu) lépe vystihuje proces bioremediace v horninovém prostředí a klade menší nároky na instrumentální vybavení. Vynechání zachytu oxidu uhličitého ve vstupním vzduchu je umožněno skutečností, že běžné pozadové koncentrace v ovzduší (400 – 500 ppm) nejsou v daném kontextu nijak významné a bylo takto dosaženo významného zjednodušení aparatury.

Ad. 3: Sledované parametry

Nejdůležitějším sledovaným parametrem respiračního testu je koncentrace oxidu uhličitého v head-space vzorkovnic, přičemž je vhodné sledovat také o obsahy kyslíku, methanu a sirovodíku. U kyslíku jde o doložení jeho výrazného přebytku v průběhu testu, v případě methanu a sirovodíku potom o vyloučení jejich přítomnosti, které by případně indikovalo jiný než aerobní režim. Vstupní analýza použité zeminy zde zahrnuje prvkovou analýzu s důrazem na toxické prvky a stanovení C, H, N. Minimálně na počátku a konci respiračního testu je nutná analýza kontaminace, kde úkolem koncové analýzy je také prokázání či vyloučení meziproduktů biodegradace. Podobně na začátku a konci testu by mělo být provedeno stanovení kultivovatelných mikroorganismů.

Ad. 4: Interpretace respiračního testu

Základem pro vyhodnocení laboratorního respiračního testu je matematický popis teoretické respirační křivky specifikovaný v technické normě EN-ISO 17155¹⁷. Produkci oxidu uhličitého ve vzorkovnicích je pro tento účel nutné nejprve normalizovat (vyjádřit v gramech na kilogram zeminy a den – viz obrázek 1) a následně vyhodnotit vztahem pro kinetiku prvního řádu. Na tomto místě je nutné připomenout hlavní smysl respiračního testu – tedy zjištění proveditelnosti bioremediačního zásahu a odhadu časové náročnosti tohoto zásahu. Vypočítaná kinetická rovnice v tomto směru slouží k extrapolaci naměřených dat a přesnost odhadu bude tím větší, čím déle laboratorní respirační test poběží. Zejména je důležité, aby test běžel dostatečně dlouho v ustálené fázi produkce oxidu uhličitého.

Závěr

Laboratorní aerobní biodegradace zeminy uměle kontaminované dodekanem prokazatelně doložila značnou časovou náročnost potřebnou pro řádné provedení laboratorního respiračního testu. Spolehlivá interpretace respiračního testu je možná až po dosažení ustálené rychlosti biodegradace a dostatečně dlouhém ponechání testované zeminy v této fázi procesu. Jako vhodný časový rámec pro provedení respiračního testu je na základě zde prezentovaných výsledků navrženo rozmezí 1 – 4 měsíce.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci projektu OP JAK - ESURET (CZ.02.01.01/00/23_021/0009163).

Literatura

- 1) Adani F., Confalonieri R., Tambone F.: J. Environ. Qual. 33,1866 (2004).
- 2) Barrena R., Vázquez F., Sánchez A.: Waste Manage. Res. 24, 37 (2006).
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.02.008>
- 3) Urban J., Šarapatka B. a kol. v knize: *Ekologické zemědělství: učebnice pro školy i praxi, I. díl*, str. 79 – 80, 1. vyd. MŽP ČR, Praha 2003.
- 4) Roy A., Holubová K., Plíva P., Dolan A.: AgritechScience 17, 1 (2011).
- 5) <https://mzp.gov.cz/cz/agenda/rizika-pro-zivotni-prostredi/kontaminovana-mista>, staženo 12.9.2025.
- 6) Panagos P., Van Liedekerke M., Yigini Y., Montanarella L.: J. Environ. Public Health 2013, 158764 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/158764>
- 7) Suchánek Z., Kubal M., Cajthaml T., Kopecká I.: WASTE FORUM 2, 151 (2024).
- 8) Nejvyšší kontrolní úřad: *Tisková zpráva ke kontrolní akci č. 23/01*. Praha, Česká republika 2024, <https://www.nku.cz/scripts/rka/detail.asp?cisloakce=23/01>, staženo 12.9.2025.
- 9) Chumchalová J., Kubal M.: Plant Soil Environ. 5, 191 (2020). <https://doi.org/10.17221/673/2019-PSE>
- 10) Adeyemo A.J.: Asian J. Adv. Agric. Res. 9(2), 1 (2019). <https://doi.org/10.9734/ajaar/2019/v9i229996>
- 11) Mariano A., Kataoka A.P.A. , de Franceschi de Angelis D., Bonotto D.: Braz. J. Microbiol. 38, 346 (2007). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200030>
- 12) el-Din Sharabi N., Bartha R.: Appl. Environ. Microbiol. 59(4), 1201 (1993).
<https://doi.org/10.1128/aem.59.4.1201-1205.1993>.
- 13) Soler-Rovira P., Fernández-Calviño D., Arias-Estévez M., Plaza C., Polo A.: Sci. Total Environ. 447, 25 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.077>
- 14) EN ISO 11266: Kvalita půdy - Návod pro laboratorní zkoušení biologického rozkladu organických chemikálií v půdě za aerobních podmínek (listopad 2020).
- 15) EN ISO 14239: Kvalita půdy - Laboratorní inkubační systémy pro měření mineralizace organických chemikálií v půdě za aerobních podmínek (listopad 2020).
- 16) EN ISO 16072: Kvalita půdy - Laboratorní metody pro stanovení mikrobiální půdní respirace (prosinec 2011).
- 17) EN ISO 17155: Kvalita půdy - Stanovení abundance a aktivity půdní mikroflóry s použitím respiračních křivek (listopad 2020).
- 18) Chen Y.: *Master's thesis*. University of Helsinki, Helsinki 2013.
- 19) Jiang Y., Brassington K.J., Prpich G., Paton G.I., Semple K.T., Pollard S.J.T., Coulon F.: Chemosphere 161, 300 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.032>
- 20) Chen F., Li X., Zhu Q., Ma J., Hou H., Zhang S.: Chemosphere 222, 98 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.122>
- 21) EN ISO 7218: Mikrobiologie potravinového řetězce - Obecné požadavky a návod pro mikrobiologické zkoušení (červenec 2025).

Laboratory-scale respiratory tests and their importance in reducing the environmental burden

Jana CHUMCHALOVÁ^a, Martin KUBAL^b, Tomáš LANK^b, Lucie ORAVOVÁ^b, Andrey BULKIN^a, Natálie JUSTOVÁ^c, Patricie MALÁ^c, Jiří HENDRYCH^c

^a Department of Sustainability and Product Ecology, Faculty of Environmental Technology, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

^b Department of Environmental Chemistry and Technology, Faculty of Environment, J. E. Purkyně University, Pasteurova 3632/15, 400 96 Ústí nad Labem, Czech Republic

^c Department of Environmental Chemistry, Faculty of Environmental Technology, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

corresponding author: e-mail: jana.chumchalova@vscht.cz

Summary

Based on relevant technical standards, the work proposed an experimental setup for a laboratory respiration test designed to verify the feasibility of aerobic biodegradation of contaminated soil. A 42-day respiration test was performed on this experimental system, where the input contaminated material was soil with artificially added dodecane. Through semi-continuous monitoring of the carbon dioxide produced and additional analyses, a set of data was obtained, on the basis of which an equation for the kinetics of dodecane degradation was compiled. The equation was then applied to estimate the time required to reach a hypothetical remediation limit.

Keywords: biodegradation, rock environment, contamination, soil, respiration test

Acknowledgment

The work was supported by OP JAK programme, project ESURET (CZ.02.01.01/00/23_021/0009163).