

HIERARCHIA VÝBERU BIOREMEDIÁČNYCH TECHNOLOGIÍ: MOŽNOSTI VYUŽITIA POTENCIÁLU BAKTERIÁLNYCH DEGRADÉROV

KATARÍNA DERCOVÁ^a, KATARÍNA
LÁSZLOVÁ^a, HANA DUDÁŠOVÁ^a, SLAVOMÍRA
MURÍNOVÁ^{a,b}, MARTA BALASČÁKOVÁ^a
a JURAJ ŠKARBA^a

^a Oddelenie biochemickej technológie, Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Výskumný ústav vodného hospodárstva, Národné referenčné laboratórium pre oblasť vôd, Nábřežie arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava
katarina.dercova@stuba.sk

Došlo 21.2.14, prijaté 10.4.14.

Kľúčové slová: bioaugmentácia, bioremediácia, biostimulácia, prirodzená atenuácia

Obsah

1. Bioremediácia
2. Monitorovaná prirodzená atenuácia
3. Podporovaná bioremediácia v pôdach
 - 3.1. Biostimulácia
 - 3.2. Bioaugmentácia
 - 3.2.1. Formy bioaugmentácie
 - 3.2.2. Faktory ovplyvňujúce bioaugmentáciu
 - 3.2.3. Technológie pre vnesenie mikroorganizmov do pôdy
 - 3.2.4. Mikroorganizmy využívané pre bioremediáciu
4. Využitie GMO v bioremediáciách
 - 4.1. Nástroje pre biomolekulárne inžinierstvo
5. Záver

1. Bioremediácia

Biologické prístupy k remediácii znečisteného životného prostredia poskytujú významné výhody alternatívnych technológií. Technológia, nazývaná bioremediácia, má nesporné výhody oproti fyzikálno-chemickým remediálnym metódam, ktoré používajú vysoké tlaky, teploty, často aj výbušné plyny a nebezpečné chemikálie. Bioremediácia predstavuje ekologickú a ekonomickú alternatívu fyzikálno-chemických procesov a často dosahuje aj úplnú degradáciu polutantov bez významného narušenia životného prostredia, bez poškodenia flóry a fauny a uľahčuje deštrukciu aj nebezpečných toxických kontaminantov bez tvorby toxických emisií alebo medziproduktov¹.

V súčasnosti je bioremediácia široko akceptovanou remediálnou technológiou považovanou za alternatívu fyzikálno-chemických postupov čistenia kontaminovaných pôd. US EPA (Environmental protection agency v USA)² ju klasifikuje ako jedinečnú technológiu na čistenie miest kontaminovaných nebezpečným odpadom. EPA vynaložila niekoľko miliónov dolárov na biologické metódy dekontaminácie. To pomohlo vytvoriť vedeckú platformu pre bioremediáciu a potvrdilo jej vieryhodnosť a opodstatnenosť.

Bioremediácia je sanačná technológia, ktorá využíva biologické objekty na odstránenie toxických organických chemikálií ako aj toxických kovov z pôd, sedimentov a podzemných vôd, najčastejšie procesmi biodegradácie a biotransformácie. Pod biologickými objektami v tejto súvislosti rozumieme mikroorganizmy, enzýmy, gény kódujúce enzýmy, ale aj rastliny. Cieľom vedeckých tímov je nájsť mikroorganizmy, najčastejšie baktérie, aktinomycéty a huby, ktoré by boli schopné metabolizovať, transformovať alebo prinajmenšom oxidovať ciele kontaminant. Keďže mnohé mikroorganizmy s potenciálnou degradačnou schopnosťou vyskytujúce sa v znečistenom životnom prostredí sú často nekultivovateľné v laboratórnych podmienkach, lepšie pochopenie fungovania a dynamiky mikrobiálnych komunít umožňujú v súčasnosti molekulárne biologické techniky nezávislé na kultivácii³.

V procese mikrobiálnej bioremediácie mikroorganizmy atakujú nebezpečný organický odpad jedným z troch spôsobov: (1) mineralizujú zlúčeninu priamo, čo znamená, že dochádza ku konverzii zlúčeniny na neškodné anorganické molekuly ako napr. oxid uhličitý a soli, (2) mineralizujú alebo transformujú zlúčeninu len ako kometabolit, čo znamená, že mikroorganizmy vyžadujú ďalšie organické zlúčeniny pre rast alebo indukovanú tvorbu enzýmov potrebných pre degradáciu cieľovej zlúčeniny, (3) konverziou zlúčeniny na inú zlúčeninu, ktorá však môže byť tiež toxická a odolná voči ďalšej degradácii.

Sanačné (remediálne) technologické postupy (biologické, chemické i fyzikálno-chemické) sú realizované buď *in situ*, teda priamo na mieste kontaminácie v pôvodnom uložení zemín a hornín alebo *ex situ*, keď odstráneniu či imobilizácii kontaminantov predchádza vyťaženie znečistených materiálov (zemín a sedimentov) a ich preprava na miesto spracovania. Oba prístupy majú svoje pozitíva, ale aj určité obmedzené možnosti použitia^{3–6}.

Biologické remediálne postupy dekontaminácie zemín a sedimentov *ex situ* (mimo miesta kontaminácie) zahŕňujú: čistenie pôdy a sedimentov na dekontaminovaných plochách (angl. landfarming), kompostovanie na biohromadách, alebo v bioreaktoroch. Čisteniu predchádza vyťaženie a odvoz kontaminovanej zeminy, čo proces dekontaminácie značne predražuje. Landfarming, používaný predovšetkým v USA a Austrálii, je využívaný hlavne pre veľmi nízke náklady na elimináciu organického znečis-

tenia zo silne kontaminovaných materiálov. Pre dekontamináciu sedimentov a odstránenie niektorých ťažko rozložiteľných polutantov zo zeminy sa používajú aj biologické suspenzné systémy v bioreaktoroch.

Medzi biologické remedičné postupy *in situ* (priamo na kontaminovanej ploche) patria: bioventing, biostripping, biosparging, bioslurping, permeabilné reaktívne bariéry, prirodzená atenuácia, podporovaná bioremediácia a fytoremediácia. V prípade *in situ* sanačných technológií je možné uvažovať aj so zníženou cenou, keďže kontaminovaná pôda nemusí byť vyťažená, prevezená ani inak sa s ňou nemusí nakladať, nižšie sú aj operačné náklady. Dekontaminačné postupy *in situ* sú viac preferované najmä pre ekologickú obnovu kontaminovanej pôdy a vody v životnom prostredí⁷.

Faktory, ktoré ovplyvňujú úspešnosť bioremediácie možno sumarizovať nasledovne: (a) pôdna permeabilita, (b) prísun kyslíka, (c) koncentrácia a toxicita kontaminantov, koncentrácia a typy živín, (d) pH, (e) prítomnosť ďalších organických zlúčenín, (f) mikroorganizmy (mobilné, stupeň zriadenia populácie nízky), (g) rezistencia k ťažkým kovom a (h) teplota.

Neúspešnosť bioremediácie môže byť zapríčinená týmito faktormi: koncentrácia polutantov je natoľko nízka, že nestačí na rast mikroorganizmov; prirodzené prostredie obsahuje látky, ktoré inhibujú rast alebo aktivitu mikroorganizmov; rastová rýchlosť inokulovaného mikroorganizmu pri nízkych koncentráciách sledovanej látky môže byť nižšia ako rastová rýchlosť jeho prirodzených konkurentov; pridávané mikroorganizmy môžu využívať prednostne ľahko využiteľné organické substráty nachádzajúce sa v pôde na úkor deštrukcie polutantu; mikroorganizmy môžu mať problémy s pohybom cez pôdne póry do miest obsahujúcich polutant – nízka biodostupnosť.

Výhody bioremediácie je možné zhrnúť nasledovne: (i) úplná mineralizácia, (ii) realizácia *in situ* alebo *ex situ*, (iii) environmentálne prijateľná, (iv) ekologická a ekonomická technológia. Za nevýhody bioremediácie možno považovať: (i) nedostatočnú znalosť medziproduktov transformácie, (ii) možnosť výskytu patogénnych kmeňov v heterogénnej mikrobiálnej polykultúre. V rámci bioremediácie je uvažovaná hierarchia *in situ* prístupov dekontaminácie v súvislosti s meniacou sa komplexnosťou typov kontaminantov a ich distribúcie, podmienok týkajúcich sa špecifického miesta (cena a časové obmedzenia) a regulačných faktorov, ktoré jednoznačne určujú, ako má byť remediácia realizovaná^{8,9}:

1. monitorovaná prirodzená atenuácia,
2. podporovaná (asistovaná) bioremediácia:
 - a) biostimulácia, b) bioaugmentácia.

Monitorovaná prirodzená atenuácia

V posledných rokoch je v súvislosti s riešením sanácií ekologických záťaží stále častejšie používaný najmenej invazívny remedičný prístup, tzv. monitorovaná prirodzená atenuácia. Je definovaná tak, že na danom kontami-

novanom území existuje prirodzená populácia mikroorganizmov a za vhodných environmentálnych podmienok degradácia prebieha a je kontinuálna. Jedná sa logicky o prvý výber pre remediáciu, pretože nevyžaduje žiaden zásah okrem monitoringu prirodzeného progresu biodegradácie. Legislatíva US EPA definuje monitorovanú prirodzenú atenuáciu (angl. monitored natural attenuation, skrátené MNA) ako schopnosť prirodzenej atenuácie dosiahnuť ciele špecifickej remediácie v rámci časového rámca, ktoré je možné výsledkami porovnať s tými, ktoré je možné dosiahnuť aktívnejšími postupmi². Tento remedičný prístup je známy pod pojmom „natural attenuation“ alebo „in situ attenuation“, menej často „intrinsic“ alebo „pasívna“ remediácia. Používaným termínom pre MNA je aj bioatenuácia. Súčasný trend je zhrňovať tieto označenia do pojmu remediácia prirodzenou atenuáciou, ktorá začína byť v praxi uvažovaná a aktívne prijímaná ako metóda prirodzeného znižovania koncentrácie kontaminantov v pôde (teda bez asistovanej remediácie), predovšetkým u kontaminantov typu ropných látok a chlórovaných uhľovodíkov. Nasadzovať sanačné technológie má totiž zmysel len na tých lokalitách, kde prírodné procesy problém definovaného rizika znečistenia riešia nedostatočne. Tento postup si vyžaduje pravidelný dlhodobý monitoring a má, ako každá iná sanačná technológia, svoje výhody a limitácie. Výhodou je fakt, že nespôsobuje zmeny v zložení bakteriálnych komunít. Mnohé štúdie potvrdzujú, že monitorovanie mikrobiálnych komunít a degradácie príslušného polutantu predstavuje v mnohých prípadoch účinnú stratégiu bioremediácie. Nevýhodou môže byť často pomalý proces remediácie⁷. Aplikovať ho ako hlavný (a jediný) postup je možné len v určitých prípadoch. V kombinácii s aktívnymi sanačnými technológiami však môže v mnohých prípadoch zjednodušiť sanáciu a znížiť náklady na jej realizáciu. Podpovrchové atenuačné mechanizmy sa delia na nedeštruktívne a deštruktívne. Nedeštruktívne mechanizmy zahŕňajú sorpciu, disperziu, zriadenie a volatilizáciu, ktoré sú priamo ovplyvnené hydrogeologickými charakteristikami prostredia a chemickými vlastnosťami kontaminantov. Základné poznanie týchto procesov je nevyhnutné pre účely zhodnotenia účinnosti procesu.

Najdôležitejším deštruktívnym mechanizmom v rámci prirodzenej atenuácie je biodegradácia. Realizácia a kvantifikácia biodegradácie závisí na interakcii medzi prostredím, cieľovým kontaminantom a prirodzenými mikroorganizmami. Dôležitou súčasťou MNA je systematický monitoring bakteriálnych komunít a koncentrácia príslušných kontaminantov. Poznatky ohľadne mikrobiálnej diverzity a funkcie v pôde neustále pribúdajú v dôsledku dostupnosti celosvetových dát získaných molekulárnymi metódami a metagenomikou pre hodnotenie mikrobiálnej diverzity a funkcií v rhizosfére pôd. MNA si vyžaduje pre implementáciu najkompletnejšie pochopenie biogeochemie zo všetkých *in situ* bioremedičných technológií. Ak nie je dostatočne účinná a bezpečná, sú nasadené asistované a inžinierske technológie⁸.

3. Podporovaná bioremediácia v pôdach

3.1. Biostimulácia

Druhým výberom v bioremediačnej hierarchii je stimulácia degradačnej aktivity prirodzených mikrobiálnych populácií rozkladať, príp. transformovať kontaminanty. Biostimulácia, ako sa táto technologická stratégia nazýva, je aplikovaná v prípade, ak sa degradujúca populácia síce vyskytuje v kontaminovanej zóne, ale živiny a ďalšie podmienky sú nedostatočné pre mikrobiálnu aktivitu. Ide o proces zrýchlenia premeny chemických polutantov, ktorý závisí od teploty, pH pôdy, redoxného potenciálu, typu kontaminantu a jeho koncentrácie. Kyslík je často limitujúcim substrátom a zavedenie kyslíka vo forme peroxidu vodíka, čistého kyslíka, alebo vzduchu môže v mnohých prípadoch indukovať prítomnú prirodzenú populáciu degradovať ciele chemikálie. Biostimulácia je najčastejšie realizovaná nasledovnými procesmi^{10–14}:

- prídavok uhlíka, dusíka alebo fosforu (napr. ako prídavok do pary, vzduchu),
- ohrev podpovrchovej časti za účelom odparenia voľnej fázy znečisťujúcej látky pri vyšších teplotách, a/alebo kde nízka miestna teplota je limitujúca, za účelom pomôcť stimulovať bakteriálnu aktivitu,
- využitie hydro- alebo pneumatikých zlomov za účelom zvýšenia permeability,
- aplikácia extrakcie pôdy parou, vzduchom, prebublávaním podzemnej vody, alebo viacfázovou extrakciou za účelom odstránenia voľných fáz (napr. ropných produktov),
- prídavok nanočastíc nulločného železa za účelom reduktívnej dechlorácie a tým zníženie koncentrácie a toxicity chlórovaných aromatických látok.

Jednou z možností biostimulácie je aj prítomnosť určitých rastlín vhodných pre fytooremediáciu, ktoré stimulujú v okolí svojho koreňového systému pôdne baktérie vylučovaním exudátov, ktoré podporujú rast prítomnej prirodzenej bakteriálnej mikroflóry a tým aj vyššiu degradáciu^{15–19}. Zoznam polutantov, pre ktoré je táto technológia vhodná, narastá. Navyše, biostimulácia môže byť aplikovaná za aeróbnych i anaeróbnych podmienok v závislosti na kontaminantoch a podmienkach na kontaminovanej lokalite. Využívajú sa aj ďalšie remediačné prístupy biostimulácie, siahajúce od jednoduchých systémov, kde jediným požadovaným aditívom je kyslík, surfaktanty, induktory enzýmov, až po zložitejšie kometabolické systémy, ktoré vyžadujú uvedenie do rovnováhy typ a množstvo viacerých aditív aplikovaných za účelom stimulácie špecifických a špecializovaných mikrobiálnych populácií. V oboch prípadoch je výsledkom zmohutnenie prirodzeného mikrobiálneho konzorcia a posilnenie na stabilný a účinný dekontaminačný systém. Relatívne nízka cena a potvrdenie účinnosti procesu pri spracovaní ropných uhľovodíkov a iných kontaminantov robia z biostimulácie metódu vhodnú pre mnohé kontaminované lokality, kde sú vyžadované podobné typy aktívneho zásahu a spracovania.

3.2. Bioaugmentácia

Tretím výberom v hierarchii bioremediačných technológií *in situ* je bioaugmentácia. Zahŕňa prídavok exogénnych organizmov s požadovanými katabolickými schopnosťami do kontaminovaného prostredia za účelom zvýšenia degradácie cieľného kontaminantu²⁰. Bioaugmentácia, ako prídavok mikroorganizmov na zvýšenie špecifickej biologickej aktivity, sa využívala už v minulosti v oblasti poľnohospodárstva a lesníctva a čistenia odpadových vôd. Výskum ohľadne zhodnotenia bioaugmentácie pre pôdnu remediáciu tiež nie je nový²¹, ale prístupy a formy bioaugmentácie sa odvtedy už značne rozšírili. Použitie bioaugmentácie je vhodné, ak prirodzená atenuácia alebo biostimulácia sú nevhodné alebo nefungujú. Biostimulácia môže byť neefektívna napr. ak:

1. kontaminant je kometabolit (nie je vhodný ako substrát pre mikrobiálny rast) a potrebné živiny alebo induktory nie sú prítomné a nemôžu byť pridané do prostredia;
2. kompetentné degradujúce mikroorganizmy nie sú prítomné medzi prirodzenou populáciou, príp. ich množstvo je nedostatočné.

V týchto prípadoch môže byť bioaugmentácia účinnou dekontaminačnou stratégiou. Sú tiež prípady, keď je síce prítomný dostatok prirodzenej populácie, ale je ťažké zvýšiť rýchlosť biodegradácie alebo skrátiť čas remediácie. Spomedzi remediačných techník je bioaugmentácia určite najmenej jednoduchá na kontrolu, ale súčasne vykazuje vysoký potenciál pre čistenie pôd^{22–24}. Najväčšou výzvou postupu je schopnosť správne riadiť proces vo variabilných environmentálnych podmienkach. Preto je pri výbere vhodných kultúr mikroorganizmov potrebné brať do úvahy nasledovné vlastnosti: rýchly rast, ľahkú kultiváciu, odolnosť voči kontaminantom, schopnosť prežívať v širokom rozsahu environmentálnych podmienok, teda aj za nepriaznivých okolností^{25,26}. Pri degradácii hydrofóbných kontaminantov je vhodné, ak degradujúci kmeň produkuje biosurfaktanty a tým ich solubilizuje a sprístupňuje mikroorganizmom a robí ich rozpustnejšími^{27,28}. Mnohé faktory, ako sú selekcia vhodných kmeňov, mikrobiálna ekológia, typ kontaminantu, environmentálne prekážky, spôsob vnesenia inokula do pôdy, môžu viesť k neúspechu. Tieto prekážky spôsobujú rozdiely medzi laboratórnymi výsledkami a aplikáciou v praxi. Účinnosť a limitácie procesu bioaugmentácie ako aj biostimulácie uvádzajú viaceré prehľadné články^{4,29,30}. Vplyv autochtónnej populácie na allochtónnu študovali Simarro a spol.³¹. Z ich pozorovaní vyplynul záver, že bioaugmentácia prináša so sebou zmeny v zložení a štruktúre bakteriálnych komunit. Je potrebné mať na pamäti, že tieto zmeny nie sú vždy prospešné pre degradujúcu komunitu. Z tohto dôvodu je preto potrebné realizovať predbežné experimenty minimálne za laboratórnych podmienok s reálnou pôdou alebo sedimentom (mikrokozmos) alebo ešte vhodnejšie v reálnych podmienkach v menšom rozsahu (mezokozmos).

Boli vyvinuté viaceré prístupy bioaugmentácie. V prvom prístupe sú pridané exogénne mikroorganizmy

s degradačnou schopnosťou na doplnenie existujúcej prirodzenej populácie. Pridané organizmy slúžia ako inokulum, ktoré využíva cieľný kontaminant ako rastový substrát a populácia sa udržiava alebo rastie počas remediačného procesu. Pridané mikroorganizmy môžu byť selektované pre dlhodobé prežívanie a schopnosť kolonizovať kontaminované miesto a stimulanty alebo kosubstráty môžu byť pridané na podporu prežívania. Cieľom tohto prístupu je dosiahnuť predĺžené prežívanie a rast pridaných organizmov a súčasnú predĺženú degradáciu cieľného kontaminantu. Tento prístup môže byť efektívny len vtedy, ak je kontaminant vhodným rastovým substrátom, alebo ak môže byť pridaný selektívny rastový substrát na podporu prežívania pridaného organizmu. Táto technika je však trochu v nesúlade s vývojom potvrdeným rokmi, ktorý naznačuje, že natívne mikroorganizmy sú všeobecne vhodnejšie pre *in situ* dekontamináciu, nakoľko presúť ažia pridané organizmy v boji o rastový substrát. Preto je vhodné izolovať baktérie priamo z danej kontaminovanej lokality, namnožiť ich za laboratórnych podmienok a späť vrátiť v niekoľko-násobne vyššej koncentrácii do danej kontaminovanej lokality. Tento prístup sa tiež nazýva „reinokulácia“ kontaminovaného miesta pôvodnými prirodzenými mikroorganizmami. Je to možné v prípade, ak sú baktérie s degradačnou schopnosťou kultivovateľné.

Druhou možnosťou je selekcia vhodných mikroorganizmov z miest s podobnou kontamináciou, aká je na danej lokalite určenej pre sanáciu. Vo väčšine prípadov boli kmene použité na bioremediáciu izolované z miest kontaminovaných aromatickými alebo z priemyselných čistiarň odpadových vôd^{32–36}. Väčšina bioaugmentačných experimentov bola uskutočnená s použitím gram-negatívnych baktérií, predovšetkým z rodov *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Alcaligenes* a *Achromobacter*. Zvýšená pozornosť je upriamená aj na gram-pozitívne baktérie rodu *Rhodococcus*, *Mycobacterium* a *Bacillus*. V prípade húb, potenciálne využiteľné sú kmene patriace do rodov *Absidia*, *Achremonium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* a *Verticillium*. Neexistujú mikroorganizmy alebo skupiny univerzálne použiteľné pre bioaugmentáciu, nakoľko geologické, environmentálne a iné podmienky v jednotlivých lokalitách sú veľmi odlišné.

3.2.1. Formy bioaugmentácie

Prehľadné práce autorov Gentry a spol.³⁷ a Lebeau²³ opisujú viaceré nové prístupy, ktoré môžu zvýšiť prežívanie a aktivitu exogénnych mikroorganizmov a/alebo génov po zavedení do životného prostredia. Posilnenie kontaminovanej zóny je možné uskutočniť viacerými prístupmi:

- bioaugmentácia individuálnymi kmeňmi (baktérie alebo huby),
- bioaugmentácia mikrobiálnym konzorciom (zmes baktérií príp. húb),
- bioaugmentácia geneticky modifikovanými organizmami (GMO) (najčastejšie geneticky modifikovanými baktériami),
- bioaugmentácia génmi, ktorej cieľom je prídavok vybraného mikroorganizmu za účelom transferu de-

gradačných génov do prirodzene sa vyskytujúcich mikroorganizmov,

- bioaugmentácia s imobilizovanými bunkami (enkapsulovanými do nosičov, napr. do alginátu alebo imobilizovanými adsorpciou na vhodné nosiče),
- bioaugmentácia aktivovanou pôdou, zabezpečenie prežívania mikroorganizmov ich prídavkom spolu s prirodzenou pôdou historicky kontaminovanou daným polutantom,
- bioaugmentácia rhizosféry, kde mikrobiálne inokulum je pridané do kontaminovaného miesta spolu s rastlinou, ktorá slúži ako „útočisko“ pre rast inokula,
- fytoaugmentácia, pri ktorej sú bakteriálne degradačné gény zavedené priamo do rastliny (tzv. transgénne rastliny) pre použitie v remediácii bez mikrobiálneho inokula.

Na biodegradáciu aromatických zlúčenín v kontaminovaných pôdach sa najčastejšie využívajú gram-negatívne baktérie a tiež huby. Viaceré štúdie naznačujú, že použitie mikrobiálnych konzorcií môže byť často účinnejšie ako použitie jednotlivých kmeňov ako dôsledok skutočnosti, že intermediáty katabolických dráh jedného kmeňa môžu byť ďalej degradované metabolickými dráhami iného kmeňa^{38,39}. Samozrejme v prítomnosti viacerých kmeňov, či už prirodzených alebo exogénnych je potrebné počítať buď so synergizmom alebo antagonizmom a tým s kompetíciou o substrát a živiny. Úspech bioaugmentácie výrazne závisí od schopnosti kmeňa prežiť v kontaminovanom prostredí, od zachovania degradačnej schopnosti, t.j. expresie požadovaných enzýmov pre cieľný kontaminant (napr. pri degradácii chlórovaných aromatických sú to hlavne dioxigenázy alebo peroxidázy) a od biodostupnosti kontaminantu pre mikroorganizmus, čiže od ich vzájomného kontaktu⁴⁰. Veľmi cenné je aj poznanie zloženia, priestorovej a časovej distribúcie a populačnej dynamiky autochtónnych komunit vo vzorkovaných spoločenstvách za účelom predikcie potenciálneho účinku pôdnej inokulácie. Bioaugmentácia neustále ostáva podľa niektorých autorov vo veľkej miere experimentálnou metodológiou²⁹, nakoľko dobre zdokumentovaných pôdných aplikácií nie je mnoho^{41,42}. Alvarez a spol.⁴³ zistili, že pri biodegradácii ropných uhľovodíkov v dvoch typoch pôd metódou bioaugmentácie (prídavok exogénnej bakteriálnej populácie alebo prídavok namnožených prirodzene prítomných baktérií) sa preukázali o niečo lepšie výsledky ako metódou MNA. Pridané bakteriálne konzorcium preživalo počas 120-dňového experimentu a nepreukázalo sa narušenie prirodzenej pôdnej mikrobioty, ktorá sa tiež značne podieľala na bioremediácii. Otázkou ostáva, či sa prídavok bakteriálneho konzorcia vypláca z pohľadu ceny bioaugmentácie. Baek a spol.⁴⁴ testovali päť rôznych prístupov: monitorovanú prirodzenú atenuáciu, biostimuláciu, prídavok biosurfaktantov, bioaugmentáciu a kombináciu posledných troch postupov pre bioremediáciu pôdy kontaminovanej ropnými uhľovodíkmi. Zistili, že celkové množstvo ropných uhľovodíkov bolo na konci experimentu rovnaké. A tak sa ako najvhodnejší výber javila MNA, ktorá nespôsobila zmeny v štruktúre bakteriálnej komuni-

ty. Rovnako aj Couto a spol.⁴⁵ potvrdili, že pre kontamináciu ropnými uhl'ovodíkmi sa ako najvhodnejšia bioremediácia z pohľadu cenovo efektívneho prístupu javila MNA.

3.2.2. Faktory ovplyvňujúce bioaugmentáciu

Bioaugmentácia bola potvrdená ako úspešná technológia na čistenie kontaminovaných miest, ale stále čelí mnohým environmentálnym problémom. Jedným z najdôležitejších je prežívanie mikrobiálnych kmeňov vnesených do pôdy. Viaceré štúdie naznačili, že účinnosť bioaugmentácie ovplyvňujú abiotické a biotické faktory⁴⁶. Z abiotických faktorov sa jedná najmä o nasledovné: teplota, vlhkosť, pH, obsah organickej hmoty, aerácia, obsah živín a typ pôdy. Medzi biotické faktory patria: súťaživosť medzi prirodzenými a vnesenými mikroorganizmami o zdroj uhlíka, ako aj antagonisticke interakcie a predátori (protozoa a bakteriofágy). Všetky tieto interakcie potenciálne znižujú počet vnesených buniek.

3.2.3. Technológie pre vnesenie mikroorganizmov do pôdy

Jedným z problémov spojených s inokuláciou je spôsob, ako doručiť vhodné mikroorganizmy na požadované miesto. Je jednoduché rozptýliť inokulanty na povrchu pôdy, ale je takmer nemožné ich rovnomerne rozptýliť pod povrchom. Pôda má potenciál pre mikrobiálny transport, ale adhézia buniek na organickú hmotu výrazne limituje ich distribúciu. Na prekonanie týchto prekážok sa využívajú surfaktanty, peny a kmene rezistentné na adhéziu.

Jednou z najdôležitejších podmienok bioremediačnej účinnosti je udržanie vhodného počtu mikroorganizmov. Je veľa prístupov, ako doručiť bakteriálny kmeň do požadovanej oblasti. Vo väčšine prípadov sú baktérie vnesené v kvapalných médiách. Avšak táto metóda nie vždy garantuje vhodnú distribúciu baktérii v pôdnom profile, jej životnosť a aktivitu. Z týchto dôvodov boli vyvinuté nové techniky. Najslubnejším spôsobom sa javí použitie nosičov, ktoré udržiavajú dostatočnú aktivitu inokulantov aj v predĺženej perióde po vnesení kmeňov. Ideálne charakteristiky nosičov zahŕňajú „zaobstaranie ochranného priestoru“ a dočasnej výživy pre vnesené mikroorganizmy, pričom sú netoxické k inokulantom a pôdnym organizmom (cit.^{47–49}). Úspešnú bioaugmentáciu je možné zvýšiť aj použitím pôdy obsahujúcej populáciu prirodzených degradérov vystavenej už predtým danej kontaminácii, nazývanej aktivovaná pôda. Avšak táto metóda je menej efektívna, než iné metódy bioaugmentácie, aj keď má určité výhody. Zavedenie prirodzene vyvinutých degradujúcich konzorcií mikroorganizmov môže byť efektívnejšie v porovnaní s jednotlivými v laboratóriu kultivovanými kmeňmi. Navyše, pri tomto prístupe nie je potrebná kultivácia mikroorganizmov v laboratórnych podmienkach a tým nestrácajú schopnosť súťažiť v environmentálnych podmienkach³⁷.

Rýchla degradácia arómatov môže byť dosiahnutá vnesením imobilizovaných buniek mikroorganizmov do kontaminovanej pôdy. Takýto prístup poskytuje ochranu inokulovaných organizmov pred nevhodnými environmentálnymi podmienkami a znižuje kompetíciu s prirodzenou

mikroflórou. Navyše, imobilizácia zvyšuje biologickú stabilitu buniek, vrátane plazmidov. Pre účely imobilizácie (adsorpcia na povrchy) sú používané prírodné aj syntetické materiály. Do prvej skupiny patria: dextran, agar, agaróza, alginát, chitosan polyakrylamidy a κ-karagenan. Bionosiče zvyšujú difúziu kyslíka, transfer živín a vodnú kapacitu, čo sú limitujúce faktory pre degradáciu kontaminantov. Druhá skupina je reprezentovaná poly(karbamoyl)sulfonátom, polyakrylamidom a polyvinylalkoholom. Enkapsulácia, ako iný spôsob imobilizácie (napr. uzavretie do PVA gélu) môže tiež zvyšovať mineralizáciu polutantov. Nie vždy však imobilizované bunky zvyšujú degradáciu toxických látok. Vysvetľuje sa to pomalou difúziou molekúl substrátu do guľčiek nosiča, čo koreluje s interakciami medzi negatívne nabitou bakteriálnou membránou a pozitívne nabitým povrchom guľčiek.

Za účelom aplikácie bioaugmentácie je potrebné vyjasniť jej účinnosť a dopad na ekosystém, na prirodzenú mikrobiálnu komunitu. Nevyhnutná je analýza mikrobiálnych komunit, ktorá sa na *in situ* bioremediácii podieľa. Podrobný prehľad molekulárno-biologických techník pre charakterizáciu a identifikáciu environmentálneho mikrobiálneho spoločenstva uvádzajú viaceré prehľadné články (cit.^{3,50–53}).

3.2.4. Mikroorganizmy využívané pre bioremediáciu

Rýchly pokrok molekulárnych mikrobiologických metód uľahčil výskumné aktivity na pochopenie základných mechanizmov biodegradácie. Priamo zo životného prostredia boli izolované bakteriálne kmene schopné metabolizovať environmentálne kontaminanty a analyzované gény kódujúce enzýmy dôležité a aktívne pri degradácii toxických chemikálií. Tieto poznatky súčasne rozširujú potenciál bioremediácie najmä pre rekalcitrantné chemické zlúčeniny. Príklady bioaugmentačných štúdií uvádzajú El Fantroussi a Agathos²⁹ a Dejonghe a spol.⁵⁴. Príklady úspešného využitia transferu génov pre bioaugmentáciu kontaminovaných pôd sumarizuje Dejonghe a spol.⁵⁴. Značný potenciál v praktickej aplikácii bioremediácie organických kontaminantov predstavujú napr. nasledovné typy bakteriálnych degradérov⁵⁵:

Konštitutívne varianty degradačných mikroorganizmov. Mnohé polutanty sú degradované v kometabolizme. Vyžadujú prídavok primárneho substrátu, ktorý slúži ako zdroj uhlíka a energie a je často aj induktorom enzýmovej aktivity. Takže organizmy s konštitutívnou aktivitou enzýmov, nevyžadujúce induktor, môžu byť výhodnejšie.

Kmene deficientné resp. rezistentné na adhéziu. Jednou z hlavných ťažkostí pri remediácii podpovrchovej kontaminácie bioaugmentáciou je transport degradačných organizmov do zóny kontaminácie. Baktérie skôr priľnú na tuhé povrchy porózných materiálov, než by cez ne prechádzali. Takže bioaugmentácia je limitovaná slabou migráciou baktérií cez zvodnenú vrstvu, čiže pohyb baktérií je spomalený. Pretože väčšina prirodzených mikroorganizmov sú vysoko adhezívne kmene, ich transport *in situ* je limitovaný. Použitím adhézne-deficientných organizmov môže byť distribúcia biokatalyzátorov a kontakt

s cieľovým kontaminantom výrazne zlepšený⁵⁶.

Degradatívne organizmy so zvýšenými energetickými rezervami. Okrem problémov s indukciou gén/enzým a adhéziou, mikrobiálne biokatalyzátory zvyčajne vyžadujú pre kometabolické degradácie prídavok živín pre stimuláciu a predĺženie aktivity. Avšak prídavok kosubstrátu často stimuluje rast aj ďalších nedegradujúcich organizmov. Navyše, použitie kosubstrátov navyšuje cenu procesu a môže byť neúčinné, ak mikróby migrujú od kosubstrátu. Alternatívnym prístupom pre zvýšenie biologickej aktivity je použitie biokatalyzátorov, ktoré sú obohatené o energetické rezervy. Produkcia energetických zásobných polymérov baktériami, z ktorých najznámejší je polyhydroxybutyrát (PHB), je najdlhšie študovaný fenomén. PHB je produkovaný viacerými baktériami za podmienok limitácie živinami v prítomnosti nadbytku uhlíka až do výšky 80 % sušiny bakteriálnej biomasy. Využitie PHB ako redukujúceho substrátu pre zvýšenie transformácie polutantov je síce známe, avšak exaktné využitie zásobných polymérov počas bioaugmentácie je ťažké merať a zatiaľ nie je presne objasnené. Je potrebné poznamenať, že okrem pôd, vôd a sedimentov znečistených chlórovanými aromatickými zlúčeninami sa táto stratégia využíva aj na čistenie biotopov kontaminovaných ťažkými kovmi^{57,58} a rádionuklidmi^{59,60}.

Geneticky konštruované mikroorganizmy a gény. Prirodzené mikroorganizmy získali počas dlhodobej existencie v prítomnosti xenobiotík v kontaminovanom území schopnosť degradovať ich. Evolúcia vrátane mutácií a horizontálneho transferu génov (HGT) konštantne prebieha, ale v prírode je relatívne pomalá. A preto je tu potreba zvýšiť degradačnú aktivitu použitím molekulárnej biológie, ktorá poskytuje množstvo technológií pre konštrukciu alebo zlepšenie remediačných génov^{61–63}. Špeciálna pozornosť je v súčasnosti zameraná na biodegradačný potenciál mikroorganizmov transferom katabolických génov z jedného alebo viacerých donorových génov do prirodzenej mikroflóry existujúcej v kontaminovanej oblasti. Mnohé katabolické dráhy sú lokalizované na plazmidoch alebo transpozónoch^{64,65}. Plazmidmi kódované dráhy sú veľmi prospešné, keďže predstavujú geneticky flexibilný systém a môžu byť transportované medzi rôznymi druhmi a rody baktérií^{66,67}. Konjugácia má najväčší význam v rozširovaní katabolických génov vzhľadom k bioaugmentácii. Avšak aj ďalšie mechanizmy HGT ako sú transformácia a transdukcija hrajú dôležitú úlohu vo vývoji a adaptácii mikroorganizmov na stresové podmienky³⁷. Cieľom vedeckých experimentov je zvýšiť schopnosť novovytvorených kmeňov degradovať široký rozsah xenobiotík a zvýšiť degradačnú účinnosť v porovnaní s divými kmeňmi. GMO môžu byť konštruované ako kmene s jedinečnými kombináciami enzýmov na uľahčenie sekvenčnej transformácie alebo biodegradácie kontaminantu. Takéto kmene by mohli byť užitočné pre extrémne rekalcitrantné kontaminanty, ako sú PCB, alebo pre použitie vo výrazne limitovaných podmienkach. Navyše, GMO môžu byť modifikované tak, že sa budú vyznačovať jedinečným prežívaním aj v nepriaznivých podmienkach aplikácie.

4. Využitie geneticky modifikovaných organizmov (GMO) v bioremediáciách

Počas posledných 20 rokov boli rekombinantné DNA techniky veľmi intenzívne študované za účelom zvýšenia degradácie nebezpečných odpadov. Téma aplikácie GMO v bioremediáciách získava síce veľkú pozornosť, avšak experimenty sú zatiaľ obmedzené len na laboratórne podmienky a bioreaktory. V praxi bol úspešne realizovaný iba jeden pôdny test⁶⁶. Dôvodom sú legislatívne zábrany v súvislosti s hodnotením rizík a veľký rozsah nejasností praktického dopadu použitia GMO priamo v životnom prostredí. Rekombinantné baktérie môžu byť získané technikami génového inžinierstva alebo prirodzenou genetikou výmenou medzi baktériami. Molekulárna biotechnológia umožňuje oproti klasickej biotechnológii cieľnú zmenu a/alebo riadenú moduláciu metabolizmu, alebo využitie vhodného druhu mikroorganizmu pre požadovaný typ kontaminantu. Úspešným sa ukázal aj transfer plazmidov z pseudomonád do iných mikroorganizmov tzv. *in vivo* konjugáciou. Plazmidy sú telieska v baktériách, na ktorých môže byť kódovaný gén pre tvorbu príslušného enzýmu podobne ako v chromozomálnej DNA (kyseline deoxyribonukleovej). Avšak na rozdiel od chromozomálnej DNA sa môžu plazmidy vyriedovať, čím sa stráca aj schopnosť bakteriálneho kmeňa degradovať konkrétnu zlúčeninu; zároveň sa však môže tento gén samovoľne odovzdávať iným baktériám, prítomným v danom kontaminovanom prostredí, čím môžu získať degradačnú schopnosť, ktorú predtým nemali. Jedná sa o tzv. horizontálny transfer génov. Ako príklad je možné uviesť modifikovaný mikroorganizmus *Deinococcus radiodurans*, ktorý vďaka svojmu vysoko efektívnemu reparačnému mechanizmu odoláva vysokým dávkam radiácie a je schopný biodegradácie ropných produktov aj v toxickom prostredí (využitie na jadrových strelniciach v Nevade a po havárii v Černobyle). Iní autori preniesli plazmidy z pseudomonád známych širokým asimilačným spektrom do psychrofilných mikroorganizmov, aktívnych pri nízkych teplotách, čím získali účinnjší nástroj na biodegradáciu ropných škvŕn na mori, keďže priemerná teplota oceánu sa pohybuje od 0 do 20 °C a teplotné optimum pseudomonád je od 20 do 40 °C. Viaceré príklady technológie génového inžinierstva za účelom zlepšenia bioremediácie uvádzajú Menn a spol.⁴⁰. Takto pripravené baktérie mali vyššiu degradačnú schopnosť a boli úspešne testované pre rôzne typy kontaminantov a za rôznych podmienok. GMO môžu byť aplikované aj za účelom monitorovania procesu bioremediácie, monitorovania kmeňov mikroorganizmov s degradačnou schopnosťou, odozvy na stres, analýzy koncových produktov a hodnotenia toxicity⁴⁰. Avšak, ekologické a environmentálne obavy a legislatívne obmedzenia sú hlavnými prekážkami pre použitie GMO priamo v kontaminovanom prostredí. Problémy vnesenia GMO do prostredia musia byť vyjasnené a odstránené ešte predtým, ako budú GMO použité na efektívne a nízkonákladové sanačné procesy. Existujú minimálne štyri základné prístupy vývoja GMO (nazývané aj transgénne organizmy) pre bioremediačné aplikácie: mo-

difikácia enzýmovej špecificity a afinity; konštrukcia a regulácia metabolických dráh; vývoj bioprocesu; monitorovanie a kontrola; vývoj bioreportérových systémov pre detekciu kontaminácie a odozvy na environmentálny stres; vývoj biosenzorov, zníženie toxicity a analýza koncových produktov. Od použitia GMO sa očakáva vyriešenie viacerých súčasných problémov rozkladu polutantov:

1. Konštrukcia mikroorganizmov, ktoré sú schopné na danom substráte (kontaminante) rásť, nielen ho katabolicky transformovať. Pri tomto, často pomalom procese, dochádza totiž k hromadeniu koncových produktov, ktoré však môžu byť opäť perzistentné a navyše v mnohých prípadoch aj toxické.
2. Vytvorenie nových katabolických dráh zefektívňujúcich pomalé, alebo málo účinné transformácie, prípadne rozšírenie škály substrátov degradovateľných daným mikroorganizmom v prítomnosti zmesi kontaminujúcich látok.
3. Zvýšenie množstva alebo aktivity produkovaných enzýmov potrebných pre rozklad kontaminantov. Takéto baktérie by sa dali použiť na vytvorenie imobilizovaných systémov (celé bunky alebo enzýmy).
4. Získanie mikroorganizmov, ktoré by okrem deštrukcie cieľového polutantu, boli odolné voči inhibítorom nachádzajúcim sa v konkrétnom prostredí, a ktoré by svojim pôsobením znemožňovali rast prirodzeným mikroorganizmom prítomným na danej kontaminovanej lokalite. Väčšina priemyselných oblastí, v ktorých sa vyskytujú antropogénne organické zlúčeniny, obsahujú napr. aj ťažké a toxické kovy.
5. Prenos metabolickej dráhy do mikroorganizmov schopných existovať a metabolizovať v danom prostredí. V prípade bioremediácie lokality, kde je teplota nižšia ako 20 °C sa jedná o využitie psychrofilných mikroorganizmov namiesto bežne využívaných mezofilných s teplotným optimom okolo 20 °C.
6. Bioremediácia rádioaktivitou zamorených lokalít si vyžaduje využitie mikroorganizmov odolných voči žiareniu, napr. *Deinococcus radiodurans*.

Geneticky modifikované baktérie sú charakteristické vnesenými degradačnými tzv. katabolickými génmi, od ktorých sa očakáva rozklad kontaminantov a reportérovými génmi, ktoré umožňujú monitorovanie aktívnych baktérií v kontaminovanom prostredí. Často sa využívajú napr. bioluminiscenčné gény, ktoré spôsobujú svetielkovanie mikroorganizmov. Ak svetielkujú, značí to, že baktérie sú viabilné a využívajú prítomný uhlík z kontaminantu ako zdroj energie a tým danú látku rozkladajú; ak nesvetielkujú, značí to, že uhynuli v dôsledku inhibície spôsobenej toxickým prostredím, alebo vyčerpali všetok dostupný zdroj uhlíka.

Bioremediáciu je možné realizovať aj pomocou rastlín (fytoremediácia) a húb (mykoremediácia). Geneticky modifikované rastliny, tzv. transgénne rastliny, sa pripravujú vnesením bakteriálnych génov rôznymi technikami. GMO rastliny sa pripravujú nielen za účelom vyššej odolnosti proti škodcom, za účelom vyšších výnosov u poľnohospodárskych rastlín, ale aj na zvýšenie akumuláciu ťažkých

kovov a degradáciu organických polutantov. Existujú však aj prirodzené nemodifikované rastliny, ktoré dokážu rozkladať organické polutanty a tiež extrahovať, sorbovať a kumulovať ťažké a toxické kovy z pôdy do rastliny, tzv. *hyperakumulátory*. Problém spočíva v tom, že často nedosahujú dostatočný rast, čo limituje množstvo prijatých kovov na gram sušiny rastliny. Preto sa potrebné gény kódujúce tieto schopnosti vkladajú do rastlín s vyššou tvorbou biomasy.

Fytoremediácia sa člení na fytodekontamináciu a fytostabilizáciu. Podľa toho, či rastliny kontaminant extrahujú do tela rastliny a bioakumulujú, alebo aj degradujú a zabudovávajú do rastlinných, často nefytotoxických štruktúr, sa jedná o fytoextrakciu alebo fytodegradáciu. Ak rastlina vťahuje kovy a cez listy ich uvoľňuje už v netoxickej forme z dôvodu zmeny oxidačného stupňa, jedná sa o fytovolatilizáciu. Ak sa na degradácii kontaminantov podieľa koreňový systém, jedná sa o rhizodegradáciu. Širokým asimilačným spektrom extracelulárnych enzýmov (napr. peroxidázy, ligninázy, lakkázy) rozkladajúcich zložené aromatické štruktúry sa vyznačujú huby, najmä drevo-kazné (angl. white-rot fungi)⁶⁸. Napriek významnej degradačnej schopnosti overenej v mnohých vedeckých štúdiách je možné konštatovať, že ešte stále nenastal čas pre ich výraznejšiu technologickú aplikáciu. Keďže tento prehľadný článok je zameraný hlavne na mikrobiálnu bioremediáciu s využitím baktérií, fyto- a mykoremediácie presahujú rámec témy a rozsahové možnosti. Detailnejšie opisujú ich princípy a aplikácie mnohé vedecké práce, napr.^{69,70,71,72–75}.

4.1. Nástroje pre biomolekulárne inžinierstvo

Biomolekulárne inžinierstvo je relatívne nová oblasť akademického výskumu a priemyselnej praxe, ktorá je zameraná na konštruovanie biomolekúl, najmä proteínov a nukleových kyselín a na biomolekulárne procesy pre biotechnologické aplikácie. V posledných rokoch boli vyvinuté dve odlišné, ale komplementárne stratégie biomolekulárneho inžinierstva pre existujúce mikroorganizmy a enzýmy pre biodegradáciu – racionálny dizajn a riadená evolúcia⁷⁶.

Racionálny dizajn pristupuje k bioremediácii na dvoch úrovniach. Zahŕňa jednak konštrukciu rekombinantného mikroorganizmu, v ktorom sa skombinujú viaceré biodegradačné enzymatické dráhy zodpovedné za vykonávanie určitých špecifických reakcií za použitia techník rekombinantnej DNA (bunková úroveň), alebo skonštruovanie špecifických enzýmov s požadovanou charakteristikou, využívajúce miestne ciele mutagenézy (proteínová úroveň). Enzýmy sú proteíny, kde aj malé zmeny v sekvencii aminokyselín môžu narušiť proteínovú konfiguráciu a tak znížiť katalytickú aktivitu. Navyše, je takmer nemožné predpovedať vplyv jednej zmeny v reťazci enzýmu na iné biochemické vlastnosti. Úspešná modifikácia enzýmu využívajúca racionálny dizajn vyžaduje obrovské množstvo informácií o štruktúrnych, mechanických a dynamických vlastnostiach proteínu. To si vyžaduje veľké nároky na pracovníkov a laboratórne vybavenie. Možnosti

racionálneho dizajnu sa rýchlo zlepšujú hlavne vďaka pokrokom v technológiách ako RTG-kryštalografia a bioinformatika.

Riadená evolúcia si na rozdiel od racionálneho dizajnu nevyžaduje a priori znalosť štruktúry bielkovín a identifikovanie mutácií, ktoré ovplyvňujú aktivitu enzýmov prostredníctvom rôznych interakcií. Tento prístup simuluje jednoduché algoritmy, ktoré príroda úspešne využíva veľa, t.j. genetickú diverzifikáciu spolu s prírodnou selekciou. Avšak na rozdiel od prirodzenej evolúcie, riadená evolúcia má špecifický cieľ, ktorý je empiricky kontrolovaný v laboratóriu a môže sa zmestiť časovo do jedného mesiaca. Riadená evolúcia v podstate zahŕňa vytvorenie rôznych knižníc génových variantov cez náhodnú mutagénzu alebo techniky rekombinantnej DNA, po ktorých nasleduje skríning enzýmov alebo variantov biochemickej dráhy s požadovanou vlastnosťou. Pre bioremediáciu to značí, že nová generácia mikroorganizmov je schopná kompletnej biodegradácie vybraných zlúčenín.

Úloha rekombinantnej DNA technológie pri konštrukcii GMO je určite prisľubom do budúcnosti. Legislatíva EÚ neumožňuje v súčasnosti zámerné uvoľňovanie GMO do životného prostredia, povolené je len na vymedzených plochách a v uzavretých systémoch^{76,77}. Samozrejme, uvoľnením tohto zákazu by sa mnohé prekážky v degradácii nebezpečných toxických látok v životnom prostredí odstránili, a preto vedci na vývoji GMO pre bioremediáciu pracujú aj v súčasnosti. Prebiehajú intenzívne testy v malom rozsahu, ktoré by mohli objasniť potenciálne nebezpečenstvo, prípadne preukázať bezpečnosť, výhodnosť a viabilitu použitia takýchto mikroorganizmov pri sanácii životného prostredia⁷⁷. Využitie týchto vysoko účinných metód pri dekontaminácii životného prostredia bude aktuálne, keď sa preukáže nielen ich efektívnosť, ale aj bezpečnosť voči biote.

Porovnávaním účinnosti biostimulácie a bioaugmentácie toxických aromatických a ropných látok sa venuje viacero prác^{43,78–80}. Nie je možné jednoznačne uprednostniť jeden z prístupov, nakoľko jeho použitie je závislé od mnohých už vyššie uvedených faktorov. Technológia je často tzv. „šitá na mieru“, pričom zohľadňuje špecifiká kontaminovaného územia a typ kontaminantov. Bioremediačné aplikácie, ktoré boli realizované za posledných 20 rokov, sa týkajú najmä chlórovaných rozpúšťadiel, polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAH), polychlórovaných bifenyllov (PCB), dioxínov, kreozotu, metyltributyléteru (MTBE), toxických a ťažkých kovov. Problém bioaugmentácie spočíva v tom, že je v mnohých podmienkach neodlíšiteľná od biostimulácie, keďže nutrienty sú často injektované s organizmami a mŕtve organizmy sú vynikajúcim zdrojom živín pre väčšinu prirodzených mikroorganizmov. Pre mnohé aplikácie je zložité, ak nie priam nemožné určiť, či pridané organizmy poskytujú významnú výhodu v porovnaní so stimuláciou prirodzených mikroorganizmov prídavkom živín. Vzhľadom na problémy, vysokú cenu v súvislosti s prípravou inokula a vnesením do pôdy, sú bioaugmentačné aplikácie stále mierne limitova-

né. I keď bioaugmentácia sľubuje „dizajnované biodegradéry“, nebolo pri opakovaných pôdnych experimentoch počas posledných dvoch dekád jednoznačne potvrdené, že je účinnejšia ako biostimulácia. V súčasnosti existuje len jedna baktéria, u ktorej bolo jednoznačne preukázané, že jej bioaugmentáciou sú vo väčšine prípadov dosiahnuté lepšie výsledky ako pri biostimulácii, a to *Dehalococcoides ethenogenes* pre dehalorespiráciu chlórovaných rozpúšťadiel⁸¹.

5. Záver

Bioremediácia je interdisciplinárna technológia, vyžadujúca znalosti z mikrobiológie, inžinierstva, ekológie, hydrogeológie, biotechnológie a chémie. Hlavným aktérom tejto technológie sú najmä mikroorganizmy. Súčasná poznávanie biologického príspevku k eliminácii kontaminantov a dopad na ekosystém je ešte stále nedostatočný a prirodzené mikrobiálne konzorciá sú niekedy považované za „čiernu skrinku“. Očakáva sa, že nový pohľad do procesu optimalizácie, validácie a dopadu na ekosystém získaný pomocou molekulárnych mikrobiologických techník vytvorí z bioremediácie spoľahlivú a bezpečnú technológiu.

Výber vhodnej sanačnej technológie pre konkrétnu kontaminovanú lokalitu je determinovaný cenou, lokálnou a národnou legislatívou, vlastnosťami a distribúciou kontaminantov, hydrogeologickými podmienkami, rizikom pre citlivé receptory (napr. zdroje pitnej vody) a prijateľnosťou daných technológií pre verejnosť. Je zrejme, že žiadna jednoduchá remediačná technológia nie je univerzálne vhodná pre všetky kontaminované miesta v dôsledku komplexity faktorov zahrnutých v procese. Práve preto existuje veľký počet potenciálnych remediačných technológií a hierarchia ich využitia. Často sú vyžadované integrované technológie, čiže následné použitie viacerých technológií, aby sa zrealizovali potreby daného miesta a poskytli tak účinnú a cenovo efektívnu dekontamináciu. Reálne skúsenosti s bioremediačnými technológiami pomáhajú lepšie definovať ich limitácie, ale aj rozširovať ich aplikácie.

Táto práca vznikla s podporou Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy a športu Slovenskej republiky na základe projektu VEGA č. 1/0295/15 a s podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0656-12.

LITERATÚRA

1. Timmis K. N., Pieper D. H.: Trends Biotechnol. 17, 201 (1979).
2. US EPA: v zborníku abstraktov konferencie *Bioremediation of Hazardous Waste Sites* Workshop. Washington, DC: CERI-89-11, 1989.
3. Iwamoto T., Nasu M.: J. Biosci. Bioeng. 92, 1 (2001).
4. Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K.,

- Sethunathan N., Naidu R.: *Environ. Int.* 37, 1362 (2011).
5. Tomei C.M., Daugilis A.J.: *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43, 2107 (2013).
 6. Gomes H. I., Dias-Ferreira C., Ribeiro A. B.: *Sci. Tot. Environ.* 445–446, 237 (2013).
 7. Jørgensen K. S., Salminen J. M., Björklöf K.: v knihe: *Bioremediation: Methods in Molecular Biology* (Cummings S.P., ed.), Springer Protocols, zv. 599, str. 217–233, Humana Press, LLC 2010.
 8. Unterman R., DeFlaun M., Steffan R.: v knihe: *Biotechnology* (Rehm H. J., Reed G., ed.), Vol. 11b, 2. vyd. *Environmental Processes II: Soil decontamination* (Klein J., ed.), str. 642. Wiley, Weinheim 2000.
 9. Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Haahtela K.: *Environ. Pollut.* 107, 179 (2000).
 10. Vasilyeva G. K., Strijakova E. R.: *Mikrobiologiya* 76, 725 (2007).
 11. Zanaroli G., Negroni A., Vignola M., Nuzzo A., Shu H.-Y., Fava F.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 1246 (2012).
 12. Dudášová H., Lukáčová L., Zorádová S., Dercová K.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 69, 23 (2012).
 13. Zorádová S., Dudášová H., Lukáčová L., Dercová K., Čertík M., Šilhárová K., Vrana B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1375 (2012).
 14. Ganesh-Kumar S., Kalimuthu K., Jebakumar S. R. D.: *Water Air Soil Pollut.* 224, 1587 (2013).
 15. Macková M., Vrchotová B., Francová K., Sylvestre M., Tomaniová M., Lovecká P., Demnerová K., Macek T.: *Eur. J. Soil. Biol.* 43, 233 (2007).
 16. Parmar N., Dufresne J.: v knihe: *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol* (Sigh A., Parmar N., Kuhad R. C., ed.), *Soil Biology*, zv. 28, str. 27–42, Springer-Verlag, Berlin 2011.
 17. Sylvestre M., Toussaint J. P.: v knihe: *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research* (Koukkou A. I., ed.), str. 280. Caister Academic Press, Norfolk 2011.
 18. Toussaint J. P., Pham T. T. M., Barriault D., Sylvestre M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1589 (2012).
 19. Sylvestre M.: *Environ. Microbiol.* 15, 907 (2013).
 20. Furukawa K.: *Trends Biotechnol.* 21, 187 (2003).
 21. Pritchard P. H.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 232 (1992).
 22. Lebeau T., Braud A., Jezequel K.: *Environ. Pollut.* 153, 497 (2008).
 23. Lebeau T.: v knihe: *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol* (Sigh A., Parmar N., Kuhad R.C., ed.), *Soil Biology*, zv. 28, Part 1, str. 129–186, Springer-Verlag, Berlin 2011.
 24. Egorova D. O., Demakov V. A., Plotnikova E. G.: *J. Hazard. Mater.* 261, 378 (2013).
 25. Singer A. C., van der Gast C. J., Thompson I. P.: *Trends Biotechnol.* 23, 74 (2005).
 26. Thompson I. P., van der Gast C. J., Ciric L., Singer A. C.: *Environ. Microbiol.* 7, 909 (2005).
 27. van der Gast C. J., Whiteley A. S., Starkey M., Knowles C. J., Thompson I. P.: *Biotechnol. Progr.* 19, 1156 (2003).
 28. Gentry T. J., Josephson K. L., Pepper I. L.: *Biodegradation* 15, 67 (2004).
 29. El Fantroussi S., Agathos S.: *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268 (2005).
 30. Tyagi M., da Fonseca M. M. R., de Carvalho C. C. R.: *Biodegradation* 22, 231 (2011).
 31. Simarro R., González N., Bautista L. F., Molina M. C.: *J. Hazard. Mater.* 262, 158 (2013).
 32. Dong X., Hong Q., He L., Jiang X., Li S.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 62, 257 (2008).
 33. Cordova-Rosa S. M., Dams R. I., Corova-Rosa E. V., Radetski M. R., Correa A. X. R., Radetski C. M.: *J. Hazard. Mater.* 164, 61 (2009).
 34. Sebaï T. E., Devers-Lamrani M., Changey F., Rouard N., Martin-Laurent F.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 1249 (2011).
 35. Wang Q.-F., Xie S.-G.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 71, 61 (2012).
 36. Dudášová H., Lukáčová L., Murínová S., Puškárová A., Pangallo D., Dercová K.: *J. Basic Microbiol.* 54, 253 (2014).
 37. Gentry T. J., Rensing C., Pepper I. L.: *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34, 447 (2004).
 38. Goux S., Shapir N., El Fantroussi S., Lelong S., Agathos S. N., Pussemier L.: *Water Air Soil Pollut. Focus* 3, 131 (2003).
 39. Ghazali F. M., Rahman R. N. Z. A., Salleh A. B., Basri M.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 54, 61 (2004).
 40. Menn F. M., Easter J. P., Sayler G. S.: v knihe: *Biotechnology* (Rehm H. J., Reed G., ed.), zv. 11b, 2. vyd., str. 820. Wiley, Weinheim 2000.
 41. Dybas M. J., Hyndman D. W., Heine R., Tiedje J., Linning K., Wiggert D., Voice T., Zhao X., Dybas L., Criddle C. S.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 3635 (2002).
 42. Major D. W., McMaster M. L., Cox E. E., Edwards E. A., Dworatzek S. M., Hendrickson E. R., Starr M. G., Payne J. A., Buonamici L. W.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 5106 (2002).
 43. Alvarez V. M., Marques J. M., Korenblum E., Seldin L.: *Appl. Environ. Soil Sci.*, Volume 2011, Article ID 156320, Hindawi Publishing Corporation, DOI: 10.1155/2011/156320.
 44. Baek K. H., Yoon B. D., Kim B. H., Cho D. H., Lee I. S., Oh H. M., Kim H. S.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 67 (2007).
 45. Couto M. N. P. F. S., Monteiro E., Vasconcelos M. T. S. D.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 1339 (2010).
 46. Backman A., Maraha N., Jansson J. K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2952 (2004).
 47. Chen Y.-M., Lin T.-F., Huang C., Lin J.-C., Hsieh F.-M.: *J. Hazard. Mater.* 148, 660 (2007).
 48. Parameswarappa S., Karigar C., Nagenhalli M.: *Biodegradation* 19, 137 (2008).
 49. Liang Y., Zhang X., Dai D., Li G.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, 80 (2009).
 50. van Elsas J. D., Boersma F. G. H.: *Eur. J. Soil Biol.*

- 47, 77 (2011).
51. Gao D., Tao Y.: *Front. Environ. Sci. Eng.* 6, 82 (2012).
 52. Uhlík O., Wald J., Strejček M., Musilová L., Řídl J., Hroudová M., Vlček Č., Cardenas E., Macková M., Macek T.: *PLoS ONE* 7, e40653 (2012).
 53. Uhlík O., Strejček M., Hroudová M., Demnerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 107, 614 (2013).
 54. Dejonghe W., Boon N., Seghers D., Top E. M., Verstraete W.: *Environ. Microbiol.* 3, 649 (2001).
 55. Mroziak A., Piotrowska-Seget Z.: *Microbiol. Res.* 165, 363 (2010).
 56. Franzetti A., Caredda P., Ruggeri C., La Colla L., Tamburini E., Papacchini M., Bestetti G.: *Chemosphere* 75, 801 (2009).
 57. Lébeau T., Braud A., Jezequel K.: *Environ. Pollut.* 153, 497 (2008).
 58. Beolchini F., Dell'Anno A., De Propriis L., Ubaldini S., Cerrone F., Danovaro R.: *Chemosphere* 74, 1321 (2009).
 59. Kumar R., Singh S., Singh O. V.: *OMICS: J. Integr. Biol.* 11, 295 (2007).
 60. Gavrilescu M., Pavel L. V., Cretescu I.: *J. Hazard. Mater.* 163, 475 (2009).
 61. Rodrigues J. L. M., Kachel A., Aiello M. R., Quensen J. F., Maltseva O. V., Tsoi T. V., Tiedje T. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2476 (2006).
 62. Wittich R.-M., Wolff P.: *Microbiology* 153, 186 (2007).
 63. Wang Q.-F., Xie S.-G., Hu R.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 77, 63 (2013).
 64. Top E. M., Springael D., Boon N.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 199 (2002).
 65. Jussila M. M., Zhao J., Suominen L., Lindström K.: *Environ. Pollut.* 146, 510 (2007).
 66. Sayler G. S., Ripp S.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 286 (2000).
 67. Afendra A. S., Parapouli M., Drinas C.: v knihe: *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research* (Koukkou A. I., ed.), str. 280. Caister Academic Press, Poole 2011.
 68. Bhatt M., Cajthaml T., Šašek V.: *Folia Microbiol.* 47, 255 (2002).
 69. Singh H., v knihe: *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, str. 592. J. Wiley, New York 2006.
 70. Kol. autorov: *Kompéndium sanačnických technologií* (Matejů V., ed.), str. 255. Vodní zdroje Ekomonitor, spol. s.r.o., Chrudim 2006.
 71. Frankovská J., Slaninka I., Kordík J., Jurkovič Ľ., Greif V., Šottník P., Dananaj I., Mikita S., Dercová K., Jánová V.: *Atlas sanačnických metod environmentálnych záťaží* (Frankovská J., Slaninka I., Kordík J., ed.), str. 360. ŠGÚDŠ, Bratislava 2010.
 72. Motřková K., Podlipná R., Vaněk T., Kafka Z.: *Chem. Listy* 108, 586 (2014).
 73. Petrová Š., Soudek P., Vaněk T.: *Chem. Listy* 107, 283 (2013).
 74. Fišer J., Nováková M., Macek T.: *Chem. Listy* 108, 566 (2014).
 75. Musilová L., Uhlík O., Macková M., Macek T.: *Chem. Listy* 106, 1029 (2012).
 76. Valková D., Turňa J., Timko J., v knihe: *Úvod do molekulárnej biotechnológie*, str. 167. Veda, Bratislava 2005.
 77. Ang E. L., Zhao H., Obbard J. P.: *Enzyme Microb. Technol.* 37, 487 (2005).
 78. Ripp S., Nivens D. E., Ahn Y., Werner C., Jarrell J., Easter J. P., Cox C. D., Burlage R. S., Sayler G.: *Environ. Sci. Technol.* 34, 846 (2000).
 79. Watanabe M. E.: *Nat. Biotechnol.* 19, 1111 (2001).
 80. Murínová S., Dercová K., Dudášová H.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 91, 52 (2014).
 81. Ruberto L., Vazquez S. C., Mac Cormack V. P.: *Int. Biodeter. Biodegr.* 52, 115 (2003).
- K. Dercová^a, K. Lászlóvá^a, H. Dudášová^a, S. Murínová^{a,b}, M. Balaščáková^a, and J. Škarba^a** (^a Department of Biochemical Technology, Institute of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology Slovak Technical University, Bratislava; ^b Water Research Institute, Bratislava): **The Hierarchy in Selection of Bioremediation Techniques: The Potentials of Utilizing Bacterial Degraders**

The utilization of degradation ability of microorganisms for decontamination of polluted environment is an intensively expanding area of environmental biotechnology, specifically of remediation technologies using biological approaches. Bioremediation is an attractive low-cost innovative technology, representing a sustainable approach to removing organic and inorganic pollutants. Bioremediation is a prospective and useful technique comprising the use of microorganisms and/or plants for biodegradation or biotransformation of contaminants. The technique can be employed as a monitored natural attenuation or as assisted bioremediation – biostimulation and bioaugmentation. This review describes some novel approaches that may increase the lifetime and activity of microorganisms in adverse environment.