

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kateřina Šírová

**Aktivity enzymů podílejících se na transformaci polycyklických
aromatických uhlovodíků v průběhu kompostování**

**Activities of enzymes involved in transformation of polycyclic
aromatic hydrocarbons during composting**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2020

Kateřina Šírová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D., DSc. za odborné vedení i trpělivý přístup. Dále děkuji zejména Mgr. Lucii Linhartové za cenné rady a pomoc, kdykoliv jsem ji potřebovala. Poděkování patří též Mgr. Aleně Filipové za pomoc při analýze PLFA a celému kolektivu Laboratoře environmentální biotechnologie za podporu a spolupráci během přípravy mé diplomové práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia a byla mi velkou oporou.

Abstrakt

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou rekalcitrantní organické polutanty široce rozšířené v životním prostředí. Některé PAU mají karcinogenní účinky a mohou být i jinak toxické, proto je věnována značná pozornost výzkumu vhodných bioremediačních technologií. Jednou ze slibných metod použitelných pro bioremediaci pevných materiálů kontaminovaných PAU je kompostování. V rámci této práce byly studovány změny vybraných enzymových aktivit během kompostování půdy kontaminované PAU (součet koncentrací všech analyzovaných PAU $1065 \pm 86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Stanovované aktivity reprezentovaly známé klíčové enzymy transformace PAU nebo katecholu jakožto ústředního metabolitu mikrobiální degradace PAU. Nejprve byla optimalizována metoda extrakce enzymů z kompostovaného materiálu. Tento postup byl poté použit k extrakci enzymů ze vzorků kompostu odebraných v jednotlivých teplotních fázích kompostování. V počáteční mesofilní fázi byla detekována pouze aktivita mangan-dependentní peroxidasy, zatímco během chladnutí a na počátku maturace byla kromě toho detekována i aktivita lakasy, tyrosinasy a katechol-2,3-dioxygenasy. Aktivita katechol-1,2-dioxygenasy a ligninperoxidasy nebyla zaznamenána při žádném odběru. Vzhledem ke srovnání s kontrolním kompostem, který neobsahoval kontaminovanou půdu, nebyl pozorován žádný vliv přítomnosti PAU v kompostu na stanovované enzymové aktivity, přestože jejich degradace zde prokazatelně probíhala. Bylo zjištěno, že během 42 dnů kompostování se celková koncentrace PAU snížila na 11–15 % počáteční koncentrace v reaktoru.

Klíčová slova: stanovení enzymové aktivity, katechol-2,3-dioxygenasa, ligninolytické enzymy, kompostování, polycyklické aromatické uhlovodíky

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are recalcitrant organic pollutants, which occur widely in the environment. Some of these compounds are carcinogenic and toxic, many studies therefore focus on suitable remediation technologies. It has been shown that composting is an efficient treatment for contaminated solid matrices. Changes in several enzyme activities during co-composting of PAH-contaminated soil were studied in this thesis. The total initial concentration of analyzed PAHs in the soil was $1065 \pm 86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The chosen activities represented well-known key enzymes involved in the transformation of PAHs or catechol as the central metabolite of PAH microbial degradation. At first, a method for extraction of the selected enzymes from the compost matrix was optimized. This approach was then used for the extraction of the enzymes from compost samples collected at each phase of composting. The activity of manganese peroxidase, laccase, tyrosinase and catechol-2,3-dioxygenase was detected during the cooling and the maturation phase. The only detected activity during the initial mesophilic phase was that of manganese peroxidase. The activities of catechol-1,2-dioxygenase and lignin peroxidase were not detected at all. Despite the fact that PAHs were substantially degraded, no influence of PAHs on the enzyme activities in compost was observed comparing to the control without contaminated soil. After 42 days of composting, the initial concentration of total PAHs in the reactor was reduced to 11–15 % of the original amount.

Keywords: enzyme assay, catechol 2,3-dioxygenase, ligninolytic enzymes, composting, polycyclic aromatic hydrocarbons

[IN CZECH]

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	9
1 Úvod.....	11
2 Literární přehled	12
2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	12
2.1.1 Zdroje polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich osud v prostředí...	13
2.2 Mikrobiální degradace polycyklických aromatických uhlovodíků	14
2.2.1 Bakteriální degradace polycyklických aromatických uhlovodíků.....	16
2.2.2 Houbová degradace polycyklických aromatických uhlovodíků.....	17
2.3 Enzymy podílející se na aerobní transformaci polycyklických aromatických	
uhlovodíků	18
2.3.1 Dioxygenasy hydroxylující aromatické cykly	18
2.3.2 Dioxygenasy štěpící aromatické cykly	19
2.3.3 Ligninolytické enzymy	21
2.3.4 Další enzymy	29
2.4 Bioremediace půd kontaminovaných polycyklickými aromatickými	
uhlovodíky	32
2.4.1 Kompostování.....	33
3 Cíl práce.....	35
4 Materiál a metody	36
4.1 Použité chemikálie.....	36
4.2 Použité přístroje a materiál	37
4.3 Složení pufrů a roztoků.....	38
4.4 Použité metody	39
4.4.1 Kompostování.....	39
4.4.2 Příprava extraktů kompostu pro stanovení enzymové aktivity.....	42
4.4.3 Stanovení enzymové aktivity v extraktech kompostu	43
4.4.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradforda.....	48
4.4.5 Stanovení fosfolipidových mastných kyselin	48
4.4.6 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků.....	50
5 Výsledky	53
5.1 Optimalizace extrakce enzymů z kompostovaného materiálu.....	53
5.2 Změny enzymových aktivit během kompostování	54
5.2.1 Ligninolytické enzymy	54
5.2.2 Katechol-1,2-dioxygenasa a katechol-2,3-dioxygenasa	57
5.2.3 Tyrosinasa.....	58
5.3 Koncentrace proteinů ve vzorcích kompostu.....	59

5.4	Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin	59
5.5	Koncentrace polycyklických aromatických uhlovodíků	63
6	Diskuse	65
6.1	Optimalizace extrakce enzymů z kompostovaného materiálu	65
6.2	Změny enzymové aktivity během kompostování.....	66
6.2.1	Ligninolytické enzymy.....	67
6.2.2	Katechol-1,2-dioxygenasa a katechol-2,3-dioxygenasa.....	69
6.2.3	Tyrosinasa	70
6.3	Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin	71
6.4	Koncentrace polycyklických aromatických uhlovodíků	72
7	Závěr.....	74
	Seznam použité literatury	75

Seznam zkratek a symbolů

1-MET	1-methylnaftalen
2-MET	2-methylnaftalen
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ACL	acenaftylen
ANT	anthracen
BaA	benzo[<i>a</i>]anthracen
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
BbF	benzo[<i>b</i>]fluoranthren
BghiP	benzo[<i>ghi</i>]perylene
BkF	benzo[<i>k</i>]fluoranthren
C12O	katechol-1,2-dioxygenasa (z angl. catechol 1,2-dioxygenase)
C23O	katechol-2,3-dioxygenasa (z angl. catechol 2,3-dioxygenase)
CHD	cyklus-hydroxylující dioxygenasy
CŠD	cyklus-štěpící dioxygenasy
DBA	dibenzo[<i>a,h</i>]anthracen
DMAB	3-(dimethylamino)benzoová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FLO	fluoren
FLT	fluoranthren
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHR	chrysen
IPY	indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
LiP	ligninperoxidasa
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon
MIP	mangan-independentní peroxidasová aktivita
MnP	mangan-dependentní peroxidasa
M_r	relativní molekulová hmotnost
OX	oxidasová aktivita
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PHE	fenanthren
PLFA	fosfolipidové mastné kyseliny (z angl. phospholipid fatty acids)
PLFA _{skupina}	fosfolipidové mastné kyseliny charakteristické pro danou skupinu mikroorganismů
PR _{enzym}	pracovní roztok pro stanovení aktivity určitého enzymu
PYR	pyren
VA	veratrylalkohol

VAD veratraldehyd
VP versatilní peroxidasa

1 Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) tvoří skupinu obtížně rozložitelných organických polutantů. Jedná se o látky hydrofobní povahy, které mají tendenci se sorbovat na pevné částice a mají bioakumulační potenciál. Byly popsány karcinogenní i jiné toxické účinky [1]. Tyto látky mohou mít přirozený původ, avšak hlavním zdrojem PAU v životním prostředí je antropogenní činnost.

Existují různé bioremediační technologie k odstranění PAU ze znečištěného prostředí. Jedná se o technologie, které využívají degradačních schopností mikroorganismů. Mikroorganismy transformují PAU třemi hlavními způsoby. Bakterie jsou schopné pomocí cyklus-hydroxylujících dioxygenas přeměnit PAU na polárnější dihydrodioly a sledem dalších reakcí, z nichž některé jsou katalyzovány cyklus-štěpícími dioxygenasami, postupně odbourat aromatické cykly v molekule. Ústředním metabolitem těchto drah je katechol, který je dále metabolizován působením enzymů následných drah. Eukaryotické organismy přeměňují PAU na polárnější sloučeniny především pomocí systému cytochromu P450. Tímto způsobem může docházet ke vzniku meziproductů toxicitějších než původní látky. Ligninolytické houby mohou PAU transformovat také prostřednictvím převážně extracelulárních ligninolytických enzymů (lakasy, mangan-dependentní peroxidasy a ligninperoxidasy).

Jednou z efektivních bioremediačních technologií je kompostování [2] [3], [4], při němž se materiál kontaminovaný PAU smíchá se snadno kompostovatelným substrátem. Polutanty jsou během procesu kompostování degradovány díky přítomnému mikrobiálnímu konsorciu. Existuje řada studií zabývajících se různými parametry kompostování PAU [5] i přítomnými mikroorganismy [6]. Existuje nicméně poměrně málo informací o vývoji enzymových aktivit během celého procesu, zejména co se týče bakteriálních enzymů.

Cílem předkládané diplomové práce bylo nejprve optimalizovat metodu extrakce vybraných enzymů podílejících se na transformaci PAU z kompostové matrice. Následně byl tento extrakční postup použit při studiu změn v aktivitách některých klíčových enzymů (ligninolytické enzymy, katechol-1,2-dioxygenasa, katechol-2,3-dioxygenasa, tyrosinasa) v závislosti na teplotním průběhu kompostování půdy kontaminované PAU. Srovnáním s kontrolním kompostem bez znečištěné půdy byl posouzen vliv přítomnosti těchto polutantů na zmíněné enzymové aktivity. Úspěšnost degradace byla ověřena stanovením koncentrace PAU kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí. Mikrobiální konsorcium bylo charakterizováno také pomocí analýzy charakteristických mastných kyselin uvolněných během hydrolyzy membránových fosfolipidů.

2 Literární přehled

2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Do skupiny látek označovaných jako polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou obvykle řazeny uhlovodíky sestávající ze dvou a více kondenzovaných benzenových jader, které neobsahují v molekule žádné heteroatomy [7]. Fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých PAU se liší podle počtu aromatických cyklů v molekule (a tedy molekulové hmotnosti) a uspořádání benzenových jader. To může být lineární, klastrové, nebo angulární (Obr. 2.1), přičemž za nejstabilnější je považováno klastrové uspořádání. Na základě počtu aromatických kruhů v molekule a z toho vyplývajících vlastností se PAU rozděluje na dvě skupiny: PAU s nízkou relativní molekulovou hmotností (M_r), které obsahují dva nebo tři aromatické cykly a PAU s vysokou M_r se čtyřmi a více aromatickými cykly [8]. Některými autory jsou zvláště vyčleněny PAU se čtyřmi cykly jako PAU se střední M_r [3].



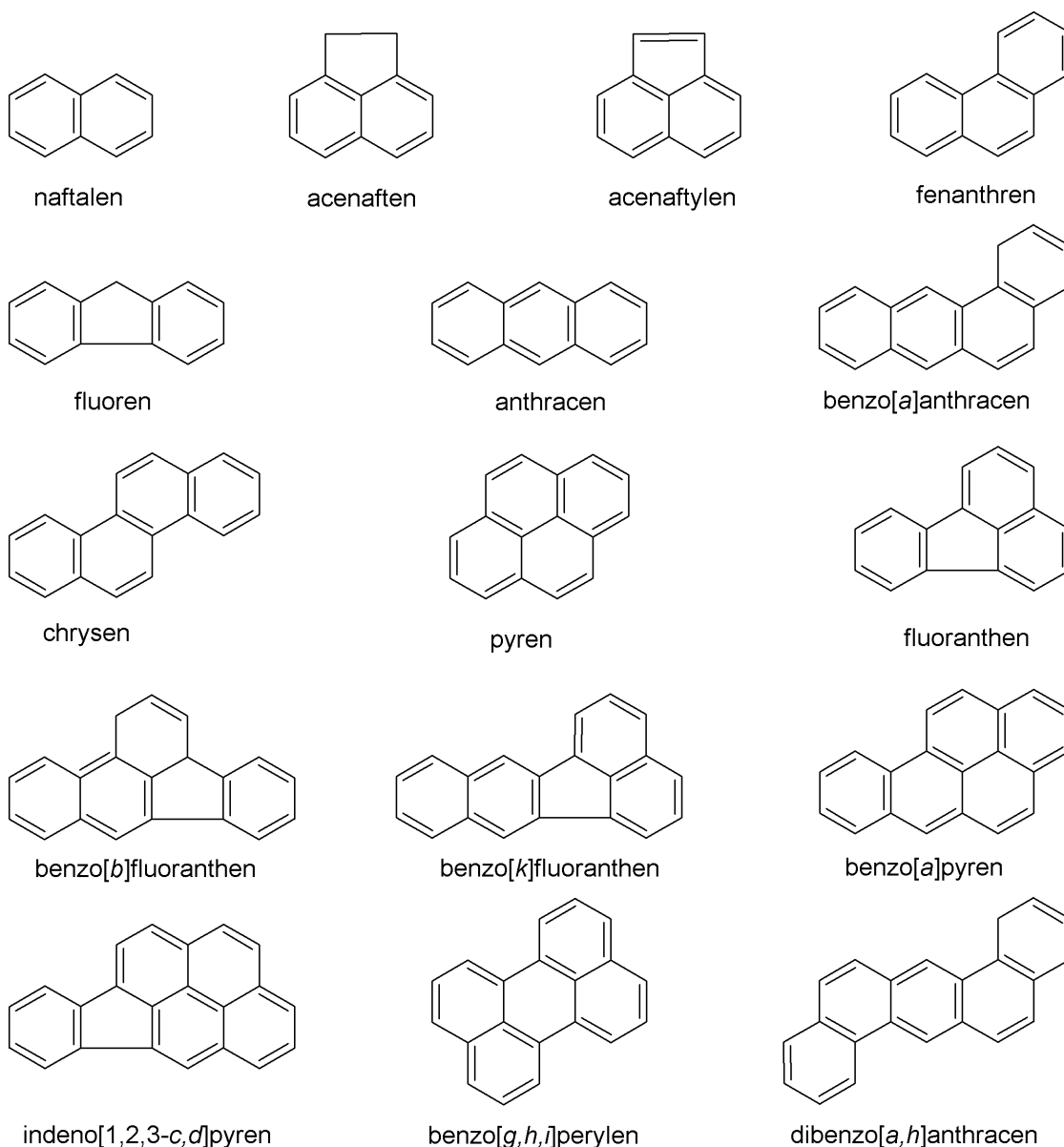
Obr. 2.1 Různé typy uspořádání benzenových jader v molekule PAU

Za standardních podmínek se v čisté podobě jedná o bezbarvé, bílé nebo nažloutlé pevné látky slabého zápachu, které jsou omezeně rozpustné ve vodě [7]. Mají obecně vysoké teploty tání a varu, které rostou s rostoucí velikostí molekuly, zatímco tenze par a rozpustnost ve vodě naopak klesají. Jsou to chemicky odolné, stabilní sloučeniny. Vzhledem ke své struktuře vykazují PAU charakteristická spektra v UV oblasti, čehož je často využíváno při jejich identifikaci. Většina z nich je také schopna fluorescence [9].

Toxicita PAU byla rozpoznána již v 18. století; PAU s nízkou M_r jsou především akutně toxické, zatímco v souvislosti s PAU s vysokou M_r je nejčastěji zmiňována jejich chronická toxicita [10]. Řada z nich je považována za mutagenní a karcinogenní látky. V některých případech mohou být transformační produkty toxičtější než původní molekula PAU; jako příklad lze uvést vysoce reaktivní epoxidy vzniklé oxidací PAU systémem cytochromu P450 [1]. Mezi nejvíce sledované a zkoumané PAU patří benzo(*a*)pyren (BaP), který je podle klasifikace Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny prokázaným karcinogenem (skupina 1) [11]. Popsány byly také jeho neurotoxické [12] a imunotoxické [13] účinky.

2.1.1 Zdroje polycyklických aromatických uhlovdíků a jejich osud v prostředí

Označení PAU se používá pro skupinu zhruba stovky látek, které mohou mít přirozený i antropogenní původ [14]. Patří mezi typické obtížně rozložitelné organické polutanty a jsou zastoupeny na seznamu Prioritních polutantů americké vládní Agentury pro ochranu životního prostředí [15] (na seznamu je uvedeno 16 zástupců PAU (Obr. 2.2)).



Obr. 2.2 Šestnáct PAU zařazených na seznam Prioritních polutantů americké vládní Agentury pro ochranu životního prostředí.

Nejčastěji vznikají nedokonalým spalováním nebo pyrolýzou organického materiálu, přičemž v závislosti na povaze materiálu a teplotě mohou vznikat směsi s různým zastoupením PAU s nízkou a vysokou M_r [8]. Kromě toho jsou součástí ropy a černouhelného dehtu, proto se vyskytují i v běžně používaných materiálech jako je asfalt nebo nafta.

Přírodním zdrojem PAU v životním prostředí jsou požáry, vulkanická činnost, přirozené průsaky ropy, ale i biochemické dráhy rostlin a bakterií [16]. Ve větší míře se však dostávají do prostředí vlivem lidské činnosti, např. při spalování fosilních paliv v průmyslu a dopravě, během ropných havárií, úniků z průmyslových závodů nebo uvolňováním z materiálů obsahujících PAU (asfalt atd.). Některé PAU (např. naftalen, anthracen) mají uplatnění v různých průmyslových odvětvích (např. výroba barviv, léčiv, výbušnin), většina z nich ale není cíleně syntetizována.

Vzhledem ke způsobu, kterým PAU vznikají, se tedy ve většině případů v životním prostředí nacházejí jako komplexní směsi o různém složení, což může komplikovat volbu vhodných sanačních technologií [17]. Nacházejí se prakticky ve všech oblastech životního prostředí, mají tendenci se sorbovat na pevné částice a obecně obtížně podléhají degradaci. Tato tendence ještě vzrůstá s molekulovou hmotností a klastrovým uspořádáním struktury.

2.2 Mikrobiální degradace polycyklických aromatických uhlovodíků

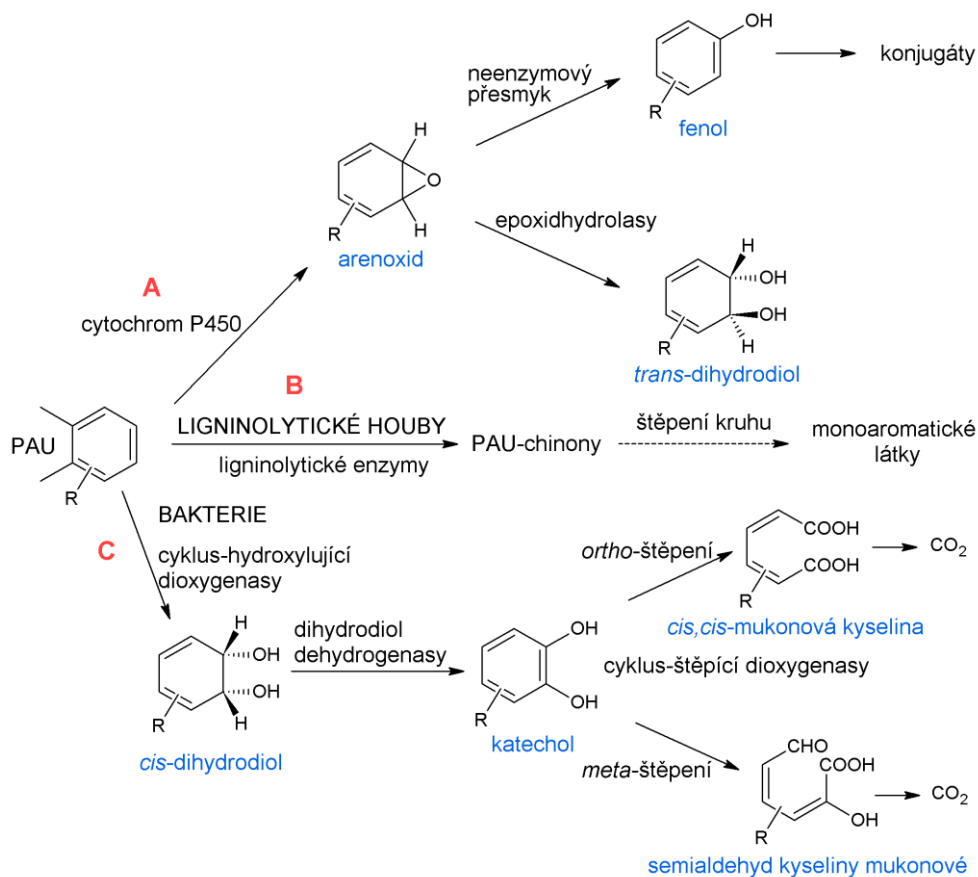
Mikrobiální degradace je klíčovým procesem degradace PAU v životním prostředí. Kromě toho však PAU mohou podléhat i různým abiotickým procesům vedoucím ke snížení jejich koncentrace v daném prostředí (např. fotooxidace, chemická oxidace, volatilizace) [7]. Mezi mikroorganismy schopné degradovat PAU patří některé bakterie, archea, houby a řasy, i když většina eukaryot je schopna PAU pouze transformovat prostřednictvím systému cytochromu P450 [18]. Biodegradace PAU obecně zahrnuje biotransformaci a rozklad aromatické molekuly PAU na méně komplexní metabolity, které se mohou začlenit do základních metabolických drah a mohou být dále přeměněny až na vodu a oxid uhličitý (v případě aerobní degradace), nebo metan (v případě anaerobní degradace) [7].

Biodegradace PAU je závislá na velikosti a tvaru molekuly, typu mikroorganismu a vnějších podmínkách prostředí (teplota, pH, množství kyslíku aj.) [19]. Těkavější a méně hydrofobní PAU s nízkou M_r lépe podléhají biodegradaci než PAU s vysokou M_r . Záleží také na stáří kontaminace a již zmíněné míře sorpce na pevné částice.

Důležitou roli v mikrobiální degradaci polutantů obecně hraje proces označovaný jako kometabolismus [20]. Látka (např. PAU) je při něm přeměňována na základě strukturní podobnosti s přirozenými substráty enzymů. Tyto enzymy mají širší substrátovou specifitu, větší flexibilitu aktivního místa, nebo jsou schopné používat v interakci s velkou molekulou substrátu nízkomolekulární mediátory. Obvykle z toho však pro organismus neplyne energetický zisk ani jiný užitek. V některých případech navíc dochází k hromadění potenciálně toxických metabolitů, neboť enzymy následných drah už nemusejí být

schopny vzniklý metabolit dále transformovat. V případě PAU se kometabolismus uplatňuje hlavně u sloučenin s více aromatickými cykly [21].

S ohledem na odlišný enzymový aparát různých typů mikroorganismů existují tři hlavní způsoby biodegradace PAU (Obr. 2.3, dráha A–C) [19], [10]. Zatímco bakterie k oxygenaci molekuly PAU využívají dioxygenasy, které jsou schopné do molekuly substrátu začlenit oba atomy molekulárního kyslíku najednou (dráha C), většina eukaryot transformuje PAU působením monooxygenas se smíšenou funkcí. Tím pádem nejprve vzniká epoxid PAU, z něhož posléze může vzniknout *trans*-dihydrodiol (dráha A). Výjimkou jsou ligninolytické houby, které jsou schopné přeměňovat PAU na příslušné chinony díky produkci ligninolytických enzymů (dráha B). U řas, jakožto velmi heterogenní skupiny organismů, byly identifikovány oba typy oxygenasových reakcí (dioxygenasová reakce za vzniku *cis*-dihydrodiolů i monooxygenasová reakce umožňující vznik *trans*-dihydrodiolů).



Obr. 2.3 Schéma mikrobiální degradace PAU. Upraveno podle [22].

V životním prostředí jsou PAU často degradovány působením celého konsorcia mikroorganismů, které se navzájem ovlivňují a doplňují [17]. Často bývají popisována společenství ligninolytických hub a bakterií. Působením extracelulárních houbových enzymů jsou PAU s vysokou M_r přeměňovány na polárnější a dostupnější meziprodukty,

kteře mohou být dále degradovány bakteriemi, neboť je bakterie mohou do buněk transportovat snáze než původní molekuly. Některé organismy také zvyšují dostupnost PAU produkcí biosurfaktantů.

2.2.1 Bakteriální degradace polycyklických aromatických uhlovdíků

Bakterie na rozdíl od eukaryot jsou schopné za určitých podmínek využívat PAU jako jediný zdroj energie a uhlíku [18], [23]. Bakteriální degradace PAU je zahájena inkorporací obou atomů molekulárního kyslíku do molekuly PAU prostřednictvím cyklus-hydroxytujících dioxygenas (CHD) za vzniku příslušného *cis*-dihydrodiolu (Obr. 2.3, str. 15, dráha C). Ten je následně dehydrogenován působením stereospecifické dihydrodioldehydrogenasy, což vede k obnovení aromaticity modifikovaného cyklu. Produktem této reakce je intermediát se dvěma hydroxylovými skupinami (v podstatě substituovaný katechol), který dále podléhá intradiolovému (*ortho*) nebo extradiolovému (*meta*) štěpení katalyzovanému cyklus-štěpícími dioxygenasami (CŠD). Tyto enzymy inkorporují oba atomy molekulárního kyslíku do molekuly substrátu za současného štěpení aromatického cyklu.

Intradiolovým štěpením dihydroxylovaného derivátu PAU vznikají aromatické dikarboxylové kyseliny [18]. Naproti tomu extradiolovým štěpením dihydroxylovaného derivátu PAU ve většině případů vzniká aromatický derivát 2-keto-3-butenové kyseliny. Ten je dále štěpen za vzniku pyruvátu a derivátu PAU, který je o jeden aromatický cyklus menší než původní molekula.

Sledem dalších oxidativních reakcí, při nichž jsou postupně odbourávány jednotlivé aromatické cykly molekuly PAU, vzniká katechol jakožto ústřední metabolit biodegradace PAU [10]. Katechol může podlehnout intradiolovému štěpení, jež je katalyzováno katechol-1,2-dioxygenasou (C12O, z angl. catechol 1,2-dioxygenase), za vzniku *cis,cis*-mukonové kyseliny, nebo extradiolovému štěpení prostřednictvím katechol-2,3-dioxygenasy (C23O, z angl. catechol 2,3-dioxygenase), při němž vzniká semialdehyd kyseliny 2-hydroxy-*cis,cis*-mukonové. Produkty těchto reakcí se mohou zapojit do energetického metabolismu především přes citrátový cyklus.

Bakteriální enzymy participující na degradaci PAU jsou velmi často inducibilní [24]. Pokud je však koncentrace těchto polutantů v prostředí tak nízká, že nedosahuje hodnoty tzv. koncentračního degradačního prahu, degradace může probíhat velmi pomalu, případně vůbec [25].

Bakterie mohou v některých případech transformovat PAU i prostřednictvím systému cytochromu P450 podobně jako eukaryota (viz dále) [17]. Kromě toho jsou významnou skupinou organismů podílejících se na anaerobní degradaci PAU (sulfát-redukující, methanogenní, nitrát-redukující bakterie).

2.2.2 Houbová degradace polycyklických aromatických uhlovodíků

Houby i ostatní eukaryotické organismy obecně dokáží transformovat PAU prostřednictvím intracelulárního systému cytochromu P450 [10]. Ligninolytické houby však mohou využít také svůj extracelulární enzymový aparát, tzv. ligninolytické enzymy (viz dále). Většina hub není schopna PAU využívat jako jediný zdroj energie a uhlíku, přesto jsou schopné PAU kometabolicky přeměnit na řadu polárnějších produktů. Výjimečně jsou houby schopné degradovat PAU až na oxid uhličitý a vodu. Způsob, jakým houby PAU přeměňují, obecně závisí na konkrétním druhu, ale také na vlastnostech jednotlivých PAU.

Jak bylo zmíněno, transformace PAU houbami i jinými eukaryotickými organismy je zahájena oxygenací jednoho z aromatických cyklů v molekule PAU [19]. Na rozdíl od zahájení bakteriální degradace je do molekuly PAU inkorporován pouze jeden atom molekulárního kyslíku, zatímco druhý je redukován na vodu (Obr. 2.3, str. 15, dráha A). Tato reakce je katalyzována oxidasami se smíšenou funkcí, které jako terminální oxygenasu využívají cytochrom P450. Vzniká nestabilní epoxidový meziprodukt, který může buď podlehnout přesmyku na fenol bez účasti enzymů, nebo je působením epoxidhydro-lasy přeměněn na *trans*-dihydrodiol.

Fenoly mohou u některých organismů dále podléhat konjugaci s endogenními látkami (kyselina glukuronová, sulfát, glukosa apod.) katalyzované specializovanými konjugáč-ními enzymy, přičemž vzniklé konjugáty jsou již v porovnání s původními molekulami PAU dostatečně rozpustné ve vodě a mohou být vyloučeny [1]. Naproti tomu *trans*-di-hydrodioly sice mohou být též konjugovány s endogenními látkami, ale mohou také vstu-povat do dalších oxygenačních reakcí, kterými vznikají vysoce reaktivní epoxidy. Epoxi-dový kruh se může spontánně rozpadnout a vzniklé transformační produkty PAU intera-gují s řadou látek a buněčných struktur. Mohou se vytvářet adukty DNA, z čehož plyne vyšší karcinogenita některých transformačních produktů ve srovnání s původními PAU (např. BaP [26]).

Ligninolytické houby

Některé ligninolytické houby jsou schopné vedle výše popsaného mechanismu přeměňo-vat PAU také prostřednictvím extracelulárních ligninolytických enzymů (peroxidasy a fenoloxidas – lakasa) (Obr. 2.3, str. 15, dráha B) [27]. Tyto enzymy mají širokou sub-strátovou specifitu a jsou schopné oxidovat kromě ligninových struktur také řadu jiných aromatických substrátů včetně PAU.

Prostřednictvím ligninolytických enzymů jsou PAU přeměněny na příslušné chinony, či dikarboxylové kyseliny, které mohou být dále modifikovány [28]. Rovněž může do-cházet ke štěpení aromatického skeletu za vzniku metabolitů jako je např. kyselina fta-lová, benzoová, kumarin nebo katechol, které mohou být dále degradovány. Celý mecha-nismus tohoto procesu není dobře popsán a v různé míře jsou do něj zapojeny rovněž

další „neligninolytické“ enzymy (např. jiné peroxidasy nebo cytochrom P450). Byly zaznamenány i případy, kdy došlo k úplné mineralizaci malé části vstupního množství PAU až na oxid uhličitý [29].

2.3 Enzymy podílející se na aerobní transformaci polycyklických aromatických uhlovodíků

2.3.1 Dioxygenasy hydroxylující aromatické cykly

Cyklus-hydroxylující dioxygenasy patří mezi aromatické dioxygenasy, tedy enzymy, které katalyzují inkorporaci dvou atomů kyslíku do molekuly aromatického substrátu [30]. Na rozdíl od CŠD, které rovněž patří mezi aromatické dioxygenasy, nedochází u tohoto typu enzymů během oxygenace substrátu k rozštěpení jeho základní struktury. Produktem reakce je příslušný *cis*-dihydrodiol. Jde o regio- a stereospecifické enzymy klíčové pro transformaci nepolárních a málo reaktivních aromatických sloučenin, mezi něž patří i řada environmentálních polutantů (např. PAU, benzen, toluen, nitrobenzen, bifenyl).

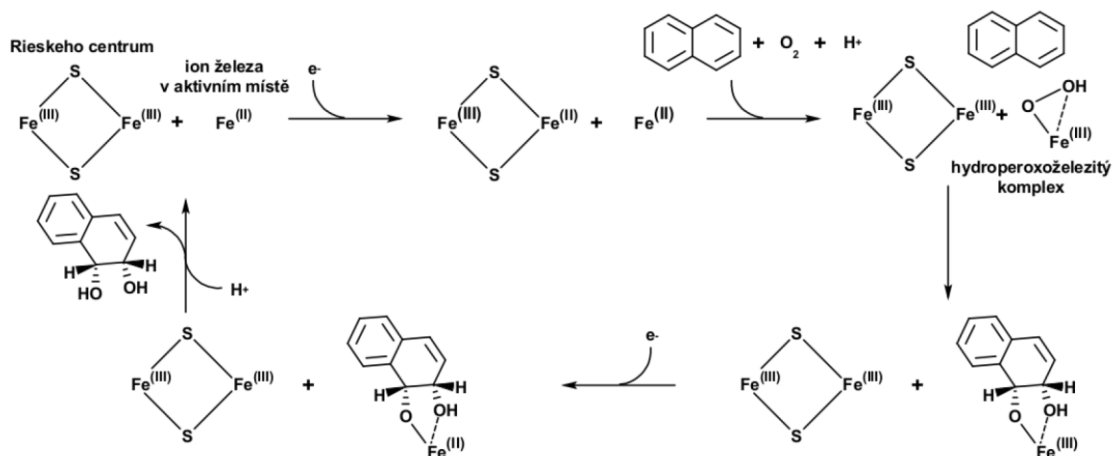
Jedná se o vícekomponentové systémy složené ze dvou, nebo tří proteinů, které tvoří elektron-transportní řetězec a terminální oxygenasu [31]. V případě dvoukomponentových systémů elektrony putují z reduktasy obsahující vazebné místo pro NADH rovnou na terminální oxygenasu, kdežto u tříkomponentových systémů jsou elektrony transportovány z reduktasy na oxygenasu prostřednictvím ferredoxinu.

Zmíněné proteiny patří až na výjimky mezi nehemové FeS proteiny, které obsahují [2Fe-2S] nebo [3Fe-4S] centra, přičemž podle aminokyselin podílejících se na koordinaci [2Fe-2S] centra lze rozlišit Rieskeho a rostlinný typ [30].

Terminální oxygenasy mohou být tvořené jedním, nebo dvěma typy podjednotek. Ty, které jsou tvořené jedním typem podjednotek (α), jsou obvykle trimerní [30]. Oxygenasy tvořené podjednotkami α i β mají strukturu $\alpha_3\beta_3$ -hexameru složeného ze tří $\alpha\beta$ -protomerů. Existují různé klasifikační systémy CHD podle struktury jednotlivých komponent systému [32], [33]. Za rozpoznání a vazbu substrátu je nejvíce zodpovědná α -podjednotka skládající se z Rieskeho domény obsahující [2Fe-2S] centrum a katalytické domény, která obsahuje jeden nehemový ion železa vázaný v aktivním místě.

Modelovým příkladem Rieskeho CHD je naftalen-1,2-dioxygenasa (EC 1.14.12.12), jejíž reakční cyklus byl dobře popsán [34] (Obr. 2.4, str. 19). Při dihydroxylaci aromatického substrátu se celkově spotřebují dva atomy kyslíku, dva elektrony a dva protony. Elektrony pocházející z oxidace NADH jsou reduktasou předány ferredoxinu, od něhož je přijímá Rieskeho centrum α -podjednotky terminální oxygenasy. Při správné konformaci může mezi Rieskeho centrem a iontem železa nacházejícím se v aktivním místě sousední α -podjednotky probíhat přenos elektronů.

Počáteční redukce Rieskeho centra externím elektronem umožňuje navázání substrátu a následně také molekuly kyslíku do aktivního centra enzymu (Obr. 2.4) [34]. Molekula kyslíku se zde ze strany váže na železnatý ion za vzniku intermediárního hydroperoxoželezitého komplexu [35]. Tato aktivace kyslíku vyžaduje dva elektrony. Jeden elektron pochází z oxidace centrálního železnatého kationtu na železitý, druhý pochází z NADH [34]. Aktivovaný kyslík poté atakuje aromatický substrát za vzniku *cis*-diolu, zůstává však navázan na ion železa. K uvolnění dihydroxylovaného substrátu je třeba, aby proběhla redukce železa a protonace kyslíkových atomů.



Obr. 2.4 Schématické znázornění reakčního cyklu naftalen-1,2-dioxygenasy, při němž dochází k aktivaci kyslíku prostřednictvím tvorby intermediárního hydroperoxoželezitého komplexu. Aktivovaný kyslík atakuje naftalen, vzniká *cis*-diol, který se následně uvolňuje z aktivního místa, čímž je zároveň obnoven nativní stav enzymu. Produktem reakce je *cis*-(1R, 2S)-1,2-dihydronaftalen-1,2-diol. Upraveno podle [34].

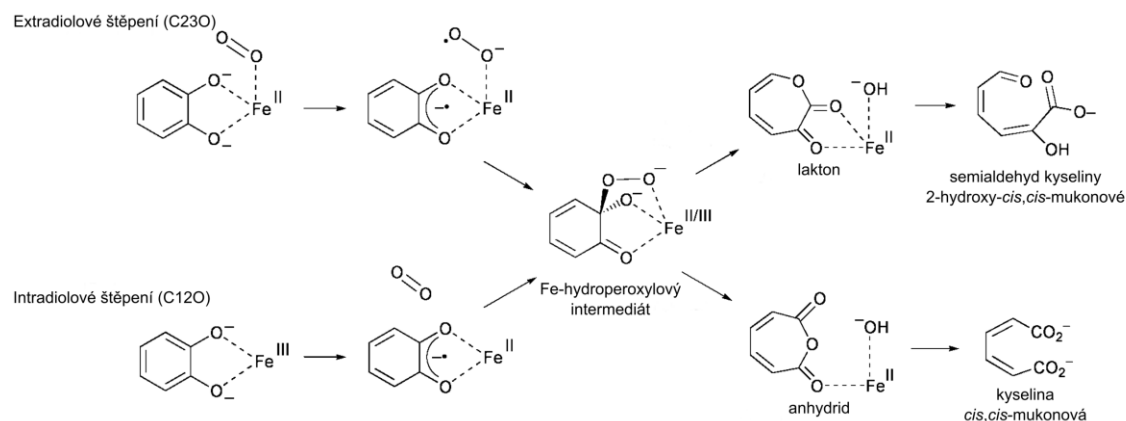
Substrátová specifita CHD je závislá především na struktuře terminální oxygenasy, resp. na aminokyselinách přítomných v aktivním centru a na tvaru, velikosti i flexibilitě kavity aktivního místa, jakož i na flexibilitě vstupu do této kavity [36], [37]. Za určitých podmínek mohou CHD katalyzovat i jiné reakce. Pokud např. sterické uspořádání kavity aktivního místa neumožňuje správnou orientaci substrátu vůči aktivovanému kyslíku, dochází pouze k monohydroxylaci namísto dihydroxylace [31].

2.3.2 Dioxygenasy štěpící aromatické cykly

Cyklus-štěpící dioxygenasy patří spolu s CHD mezi aromatické dioxygenasy [30]. Na rozdíl od CHD katalyzují inkorporaci dvou atomů kyslíku do molekuly substrátu za současného rozštěpení aromatického cyklu, což je klíčový krok při degradaci aromatických sloučenin. Substráty CŠD jsou dihydroxyderiváty aromatických sloučenin. Reakční schéma obvykle zahrnuje iniciační aktivaci termodynamicky stabilního aromatického cyklu a samotné štěpení aromatické struktury.

Aromatické dihydroxysloučeniny s hydroxylovými skupinami umístěnými vůči sobě v poloze *ortho* (např. katechol) mohou podléhat štěpení intradiolovými dioxygenasami

(např. katechol-1,2-dioxygenasa), nebo extradiolovými dioxygenasami (např. katechol-2,3-dioxygenasa) [38]. Přestože jsou oba typy enzymů sekvenčně i strukturně odlišné, zdá se, že obě reakce probíhají přes podobný Fe-hydroperoxylový intermediát (Obr. 2.5) [39].



Obr. 2.5 Schematické znázornění reakce katalyzované katechol-2,3-dioxygenasou (C23O), resp. katechol-1,2-dioxygenasou (C12O). Obě reakce probíhají přes podobný Fe-hydroperoxylový intermediát. Upraveno podle [39].

Různé mikroorganismy používají při degradaci katecholu a substituovaných katecholů vznikajících při degradaci PAU, fenolů apod. různé strategie. Existují bakterie, které mají geny pro obě katecholdioxygenasy [40], [41], [24]. Byly zaznamenány i případy, kdy určitý bakteriální kmen schopný simultánní produkce C12O i C23O v závislosti na vnějších podmínkách produkoval pouze jednu katecholdioxygenasu [23]. Faktory rozhodující o tom, zda bude probíhat intradiolové či extradiolové štěpení nejsou dosud zcela objasněné [39], [42].

Bylo popsáno mnoho příkladů indukce těchto enzymů vlivem přítomnosti různých aromatických polutantů [43], [44].

Katechol-1,2-dioxygenasa

Katechol-1,2-dioxygenasy (EC 1.13.11.1; katechol:O₂ 1,2-oxidoreduktasy) katalyzují intradiolové štěpení aromatického kruhu katecholu a některých jeho derivátů za vzniku (substituované) kyseliny *cis,cis*-mukonové, která může být dále metabolizována na acetylkoenzym A a sukcinylkoenzym A [38]. Stejně jako ostatní intradiolové CŠD využívají C12O jako prostetickou skupinu nehemové železo v oxidačním stavu +III. Přestože jsou C12O produkovány především bakteriemi, byly nalezeny také u několika druhů kvasinek [45] nebo hub [46], [47].

Jedná se o homodimerní, případně heterodimerní proteiny [38]. Každá z podjednotek obsahuje navázané fosfolipidové molekuly, jejichž úloha zatím není zcela jasná, a vazebné místo pro železitý kation, který je koordinován dvěma tyrosiny, dvěma histidiny a molekulou vody [48].

Katechol-2,3-dioxygenasa

Katechol-2,3-dioxygenasy (EC 1.13.11.2; katechol:O₂ 2,3-oxidoreduktasy) katalyzují extradiolové štěpení katecholu a některých jeho derivátů [38]. Reakčním produktem je v tomto případě semialdehyd kyseliny 2-hydroxy-*cis,cis*-mukonové, jenž je dále přeměňován na pyruvát a acetaldehyd. Prostetickou skupinou C23O a jiných extradiolových CŠD je nehemové železo v oxidačním stavu +II, ovšem byly identifikovány i C23O využívající jiné dvojmocné ionty (např. manganaté). Schopnost produkovat C23O mají mnohé gramnegativní i grampozitivní bakterie včetně aktinobakterií [23].

Ve většině případů se jedná o homotetramerní proteiny [23]. Každá podjednotka enzymu obsahuje železnatý kation koordinovaný dvěma histidiny a jedním glutamátem [49].

2.3.3 Ligninolytické enzymy

Hlavními ligninolytickými enzymy jsou lakasa (EC 1.10.3.2), mangan-dependentní peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13), ligninperoxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), a versatilní peroxidasa (VP; EC 1.11.1.16) [50]. Do systému enzymů degradujících lignin se řadí i další enzymy, které se spolupodílejí na degradaci ligninu, i když jako takové nemají schopnost rozkládat lignin (pomocné enzymy). Patří mezi ně mimo jiné enzymy produkující peroxid vodíku (např. superoxiddismutasa, EC 1.15.1.1).

Ligninolytické enzymy jsou oxidasy, jejichž substrátem je lignin [50]. Jako lignin se označuje skupina heterogenních amorfních aromatických biopolymerů, jejichž prekurzory jsou 4-hydroxyfenylpropanoidy [51]. Hlavními stavebními jednotkami jsou koniferylalkohol, sinapylalkohol a méně zastoupený *p*-kumarylalkohol, jejichž propojováním vznikají různé typy strukturních jednotek, které tvoří komplexní prostorovou strukturu ligninu. Lignin se nejvíce vyskytuje v sekundární buněčné stěně rostlinných buněk. Zajišťuje pevnost, nepropustnost a chrání polysacharidy buněčných stěn před mikrobiální degradací.

Vzhledem k velikosti molekul ligninu a jejich heterogenitě jsou ligninolytické enzymy produkovány extracelulárně (hlavně peroxidasy) a mají poměrně širokou substrátovou specifitu [50]. Díky těmto vlastnostem jsou za určitých podmínek schopné transformovat různé (aromatické) organopolutanty životního prostředí (PAU [52], polychlorované bifenylly [53], některá syntetická barviva [54] aj.), z čehož plyne jejich velký bioremediační potenciál. Na rozdíl od bakteriálních dioxygenas však nejsou ligninolytické enzymy v přítomnosti PAU indukovány [55]. V kontextu biotechnologických a bioremediačních aplikací je nejvíce studována lakasa [56].

Ligninolytické enzymy dřevokazných hub bývají kódovány několika geny, což zajišťuje produkci různých izoenzymů, které se svými katalytickými schopnostmi mohou podle podmínek mírně lišit [50]. Nejvýznamnější, i když ne jediní, degradátoři ligninu

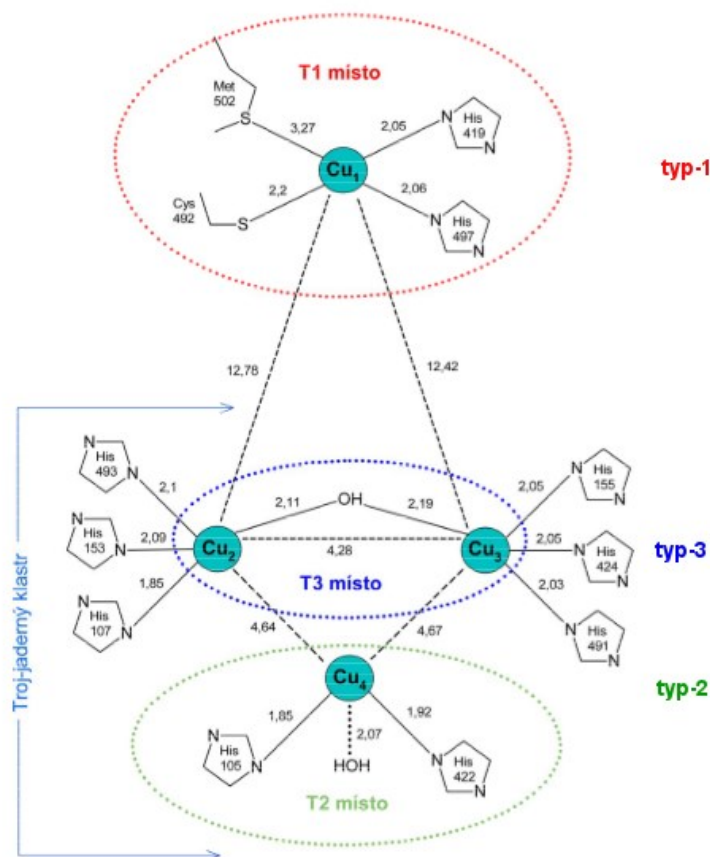
jsou tzv. houby bílé hniloby, které patří mezi basidiomycety (např. *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*) [57].

Lakasa

Lakasy (benzendiol:kyslík oxidoreduktasy) představují skupinu fenoloxidas obsahujících několik iontů mědi. Katalyzují oxidaci fenolického (za určitých podmínek i nefenolického) substrátu, přičemž jako terminální akceptor elektronů slouží kyslík [56]. Oxidace substrátu vede ke vzniku reaktivních radikálů, které dále podléhají neenzymovým reakcím (polymerizace, depolymerizace, demethylace aj.). Ve většině případů jde o monomerní, dimerní, nebo tetramerní glykoproteiny, jež obsahují čtyři měďnaté kationty rozmístěné mezi třemi místy v katalytickém centru (ozn. T1, T2, T3), přičemž lze lakasy rozdělit do tří skupin podle redoxního potenciálu místa T1.

Kromě podílu na degradaci ligninu mohou mít lakasy i zcela jinou funkci, která se u různých organismů liší [58]. Mezi organismy produkující lakasu patří nejen dřevokazné houby (basidiomycety, askomycety), ale také rostliny, bakterie a hmyz. Podle toho se liší též struktura, velikost, glykosylace (nejvíce glykosylované jsou rostlinné lakasy, kdežto bakteriální glykosylované nejsou) a lokalizace enzymu. Zatímco lakasy hub mohou být v závislosti na vnějších podmínkách a funkci enzymu extracelulární, intracelulární, nebo vázané na buněčnou stěnu, bakteriální lakasy jsou intracelulární nebo periplazmatické proteiny. Rostlinné lakasy bývají produkovány extracelulárně do apoplastu a u hmyzu byla identifikována lakasa v kutikule [59]. Struktura aktivního místa znázorněná na Obr. 2.6, str. 23 je však u všech typů podobná.

Lakasy obsahují tři typy měďnatých kationtů. Měď v místě T1 (typ-1) je kovalentně vázána s cysteinem, což způsobuje typickou modrou barvu lakasy [56], [58]. Typ-1 je koordinován dvěma histidiny, methioninem a cysteinem, čímž se vytváří pokrivená trigonální struktura. Měď v místě T2 (typ-2) je koordinována dvěma histidiny a molekulou vody, kdežto dva ionty mědi (typ-3) přítomné v místě T3 jsou koordinované dohromady šesti histidiny. Ion mědi typu-2 spolu s dvěma ionty typu-3 vytváří trojjaderný klastr.

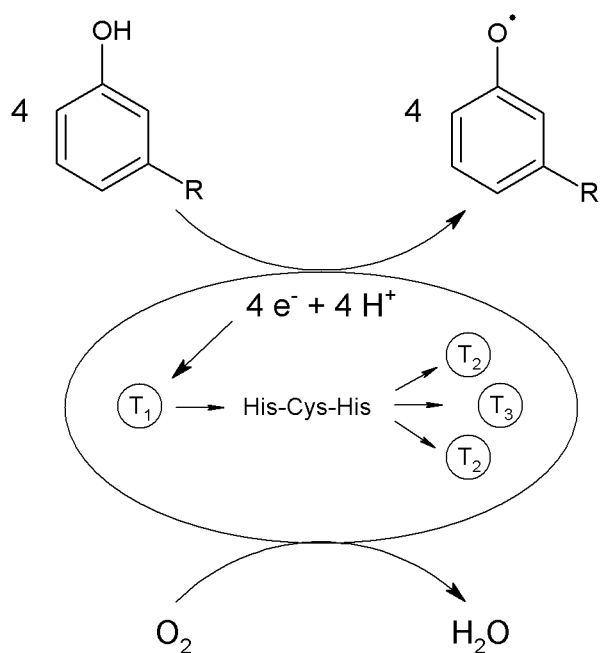


Obr. 2.6 Schématické znázornění aktivního místa lakasy CotA z *Bacillus subtilis* včetně meziatomových vzdáleností. Aktivní místo obsahuje různým způsobem koordinované tři typy měďnatých kationtů. Upraveno podle [56].

Oxidace substrátu lakasou může být buď přímá, nebo nepřímá, zprostředkovaná mediátorem [60]. Celkovou reakci katalyzovanou lakasou lze shrnout rovnicí 2.1.



Při přímé oxidaci je substrát oxidován v místě T1 na příslušný radikál, zatímco měďnatý kation je redukován na měďný. Uvolněný elektron se přenesne na trojjaderný klastr, kde probíhá redukce molekulárního kyslíku na vodu, meziproduktem této redukce je peroxid vodíku. Někdy může radikál substrátu podlehnout další oxidaci na chinon. Katalytický cyklus lakasy (Obr. 2.7, str. 24) tedy propojuje čtyřelektronovou redukci molekulárního kyslíku na vodu s jednoelektronovou oxidací substrátu. Široká substrátová specifita lakasy může být ještě rozšířena prostřednictvím mediátoru (např. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS), 2,6-dimethoxyfenol), který je lakasou oxidován a sám poté oxiduje substrát. Tímto způsobem často probíhá i depolymerizace ligninu.



Obr. 2.7 Reakční cyklus lakasy zahrnující čtyřelektronovou redukci molekulárního kyslíku na vodu a čtyři jednoelektronové oxidace fenolického substrátu. Katalytický esenciální jsou čtyři ionty mědi nacházející se v místech T1, T2, T3. Převzato z [58].

Lakasa může být inhibována některými anionty (např. F^- , CN^- , N_3^-), které jsou schopné se navázat do místa T2, případně můstku mezi T2 a T3, a přerušit tak vnitřní přenos elektronů [60]. Kationty těžkých kovů (např. Hg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) mohou nahradit ve vazbě měď, což rovněž vede k inaktivaci enzymu. Katalytická účinnost lakasy může být také nepříznivě ovlivněna působením chelatačního činidla (např. kyselina ethylendi-amintetraoctová (EDTA)) nebo vyšší koncentrace organického rozpouštědla.

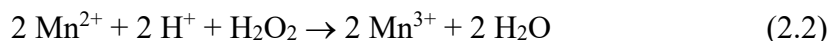
Lakasy mívají pH optimum většinou v kyselé oblasti, konkrétní hodnoty se liší podle oxidovaného substrátu a zdroje lakasy [58]. I když byly identifikovány lakasy s optimem mezi 25–35 °C, teplotní optimum lakas produkovaných houbami je většinou mezi 50–70 °C. Při těchto vyšších teplotách však nebývají dlouhodobě stabilní. Bakteriální lakasy jsou proti vyšším teplotám často odolnější a mají vyšší pH optimum.

Mangan-dependentní peroxidasa

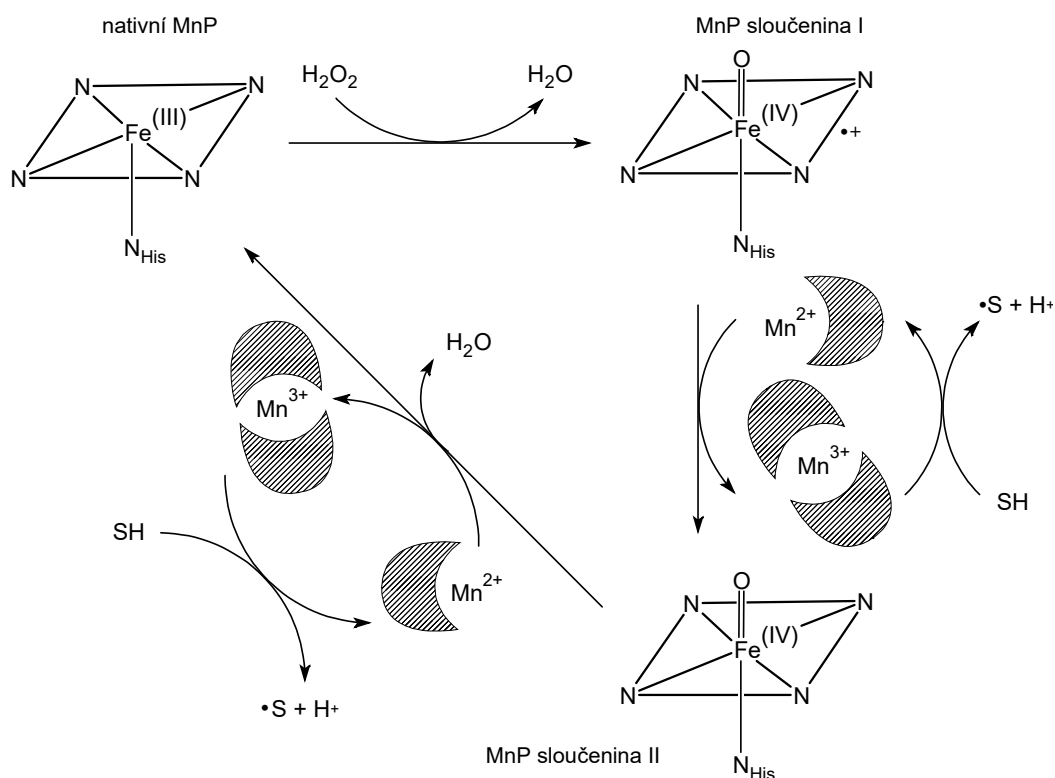
Mangan-dependentní peroxidasy ($Mn^{2+}:H_2O_2$ oxidoreduktasy) jsou extracelulární glykoproteiny obsahující hem [60]. Katalyzují oxidaci manganatého kationtu na manganitý za přítomnosti peroxidu vodíku. Manganitý kation je vysoce reaktivní a je schopný oxidovat různé (zejména fenolické) látky, jedná se tedy v podstatě o nepřímou oxidaci substrátu. Tento způsob oxidace substrátu je výhodný vzhledem k rozměrné struktuře ligninu, do níž by relativně velká molekula peroxidasy obtížně pronikala. Kromě ligninolytických hub mohou MnP produkovat také některé bakterie nebo řasy.

Molekula MnP sestává ze dvou domén uprostřed s hemovou strukturou obsahující ion železa v oxidačním stavu +III [61]. V molekule jsou přítomné také dva vápenaté ionty a pět disulfidových můstků, které stabilizují strukturu aktivního místa enzymu. Součástí struktury MnP je jedno vazebné místo pro manganatý kation.

Reakci katalyzovanou MnP lze shrnout do rovnice 2.2 [60].



Katalytický cyklus MnP (Obr. 2.8) je zahájen vazbou endogenně produkovaného peroxidu vodíku na enzym v nativním stavu (Fe^{3+}), dochází k heterolytickému rozštěpení peroxidové vazby za vzniku nestabilní MnP sloučeniny I a molekuly vody [60], [62]. Sloučenina I (oxoferriporfyrinový π -kation-radikál) váže monochelátovaný manganatý kation, což vede k jeho oxidaci na manganitý kation a vzniku stabilnější MnP sloučeniny II, která je prostřednictvím druhého manganatého kationtu redukována zpět do nativního stavu enzymu, přičemž se uvolňuje druhá molekula vody.



Obr. 2.8 Reakční cyklus mangan-dependentní peroxidasy (MnP), při němž v přítomnosti peroxidu vodíku vznikají postupně dva manganité kationty, které jsou stabilizovány chelatačními činidly (šrafované půlměsíce), aby nedocházelo k jejich disproportionaci. Manganité kationty se z enzymu uvolňují a mohou oxidovat fenolický substrát (SH) za vzniku příslušného radikálu. Upraveno podle [63].

Při vysoké koncentraci peroxidu vodíku, reakcí nativní peroxidasy se superoxidovým anion-radikálem, nebo působením kyslíku na redukovanou formu peroxidasy (Fe^{2+}) se může vytvářet katalyticky neaktivní MnP sloučenina III, což brání dokončení katalytic-

kého cyklu [60], [62]. Sloučenina III se v přítomnosti substrátu může přeměnit na sloučeninu II za současné oxidace substrátu, čímž je umožněno dokončení katalytického cyklu.

Vysoce reaktivní manganité kationty jsou z aktivního místa enzymu uvolněny a stabilizovány endogenně produkovanými chelátory (kyselina šťavelová, malonová aj.), které zabraňují disproportionaci na manganaté a nerozpustné manganičité kationty [61]. Vzniklé cheláty pak mohou oxidovat jedoelektronovou oxidací fenolického substrátu za vzniku fenoxi-radikálu. V přítomnosti mediátoru může docházet i k oxidaci nefenolického substrátu.

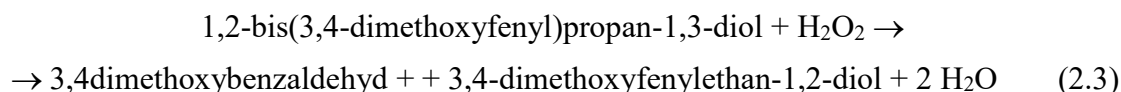
Optimum pH MnP se nachází většinou v kyselé oblasti (pH 4–7) [61]. Byly identifikovány různé MnP aktivní při 5–70 °C, obvykle se ale teplotní optimum MnP pohybuje v rozmezí 50–60 °C, při vyšších teplotách však jsou méně stabilní.

Ligninperoxidasa

Ligninperoxidasy (1,2-bis(3,4-dimethoxyfenyl)propan-1,3-diol:H₂O₂ oxidoreduktasy) jsou extracelulární peroxidasy obsahující hem, které se vyskytují u některých dřevokazných hub, bakterií a několika druhů hmyzu [64]. Katalyzují oxidaci nefenolických methoxy-substituovaných struktur ligninu v přítomnosti peroxidu vodíku za vzniku aryl-kationtových radikálů. Vzniklé radikály podléhají dalším neenzymovým reakcím, které mohou vést k rozštěpení vazby, demethylaci, intramolekulární adici nebo přesmyku. Dále jsou s aktivitou LiP typicky spojovány např. oxidace benzylalkoholů na příslušné aldehydy nebo ketony. Příkladem takové reakce je oxidace veratrylalkoholu (VA; (3,4-dimethoxyfenyl)methanol) na veratraldehyd (VAD). Za určitých podmínek jsou LiP schopné oxidovat i fenolické aromatické substráty (např. katechol).

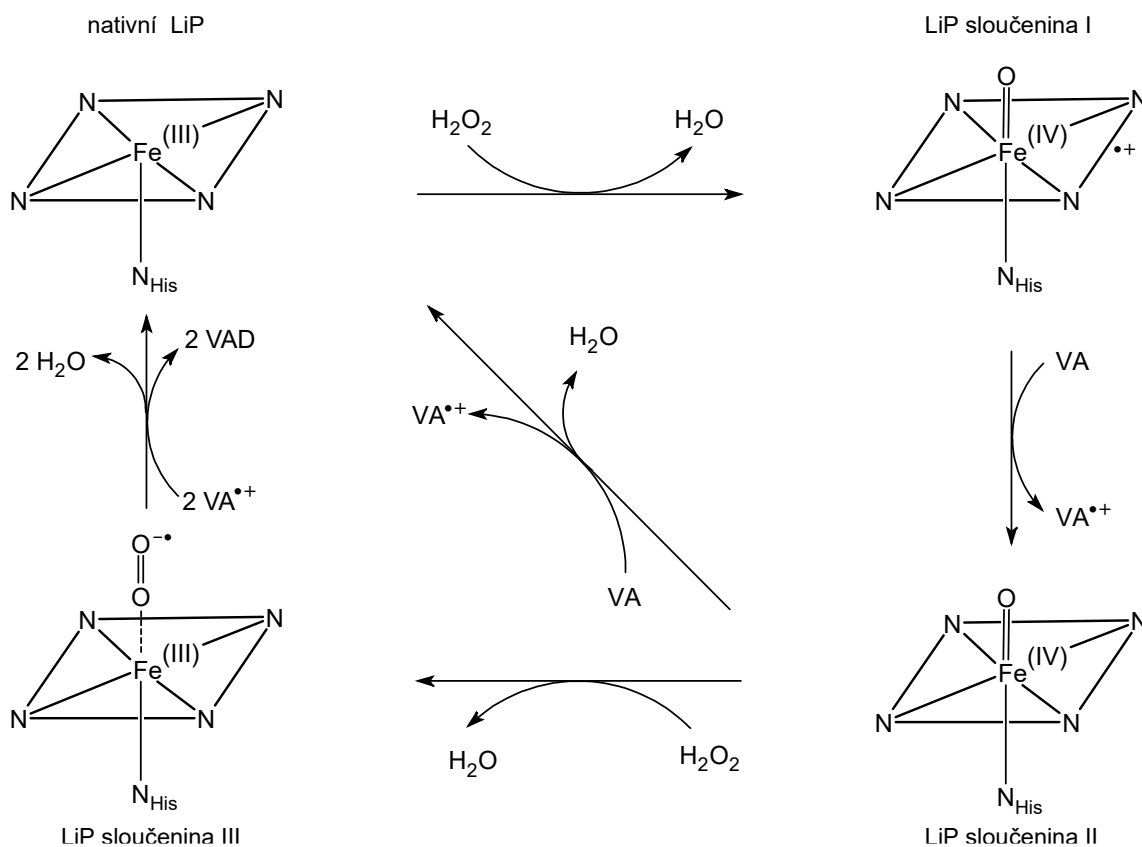
Jedná se o monomerní helikální glykoproteiny složené ze dvou domén, mezi nimiž se nachází hem obklopený dvěma kanálky [65]. Každá doména obsahuje vápenatý kationt stabilizující aktivní místo enzymu. Na rozdíl od MnP je místo pro vazbu substrátu přístupnější, takže je enzym schopen i přímé interakce s ligninem bez účasti mediátoru (např. VA).

Celkovou reakci lze shrnout rovnicí 2.3.



Mechanismus reakce katalyzované LiP je podobný jako katalytický mechanismus MnP [50], [60]. Pro přehlednost je v katalytickém cyklu na Obr. 2.9, str. 27 jako substrát uveden VA. Nejprve je LiP v nativním stavu oxidována peroxidem vodíku za vzniku LiP sloučeniny I a vody. Následně je sloučenina I jedoelektronovou redukcí za účasti substrátu (VA) přeměněna na sloučeninu II, zatímco VA je oxidován na příslušný kationt-radikál. Enzym ve formě sloučeniny II může být prostřednictvím další molekuly substrátu redukován zpět do nativního stavu. Podobně jako u MnP se v případě nedostatku

substrátu a vysoké koncentrace peroxidu vodíku sloučenina II může přeměnit na katalyticky neaktivní LiP sloučeninu III. Vzniku sloučeniny III brání přítomnost nízkomolekulárních aromatických látek (např. tryptofan, VA), které jsou pro LiP vhodnějšími substráty. Enzym v podobě sloučeniny III se může vrátit zpět do nativního stavu reakcí s kation-radikálem VA za vzniku VAD a dvou molekul vody.



Obr. 2.9 Reakční cyklus ligninperoxidasy (LiP), při němž je v přítomnosti peroxidu vodíku oxidován veratrylalkohol (VA) na příslušný kation-radikál. Při vysoké koncentraci peroxidu vodíku může vznikat katalyticky neaktivní sloučenina III; zastavení katalytického cyklu v tomto případě může zabránit přítomnost VA, který je oxidován na veratraldehyd (VAD), přičemž se LiP ve formě sloučeniny III přeměňuje zpět do nativního stavu. Upraveno podle [62], [66].

Redukce sloučeniny I na sloučeninu II za účasti VA je závislá na pH, přičemž její rychlost s rostoucí hodnotou pH prostředí klesá [64]. Tím je dáno také pH optimum LiP okolo pH 3.

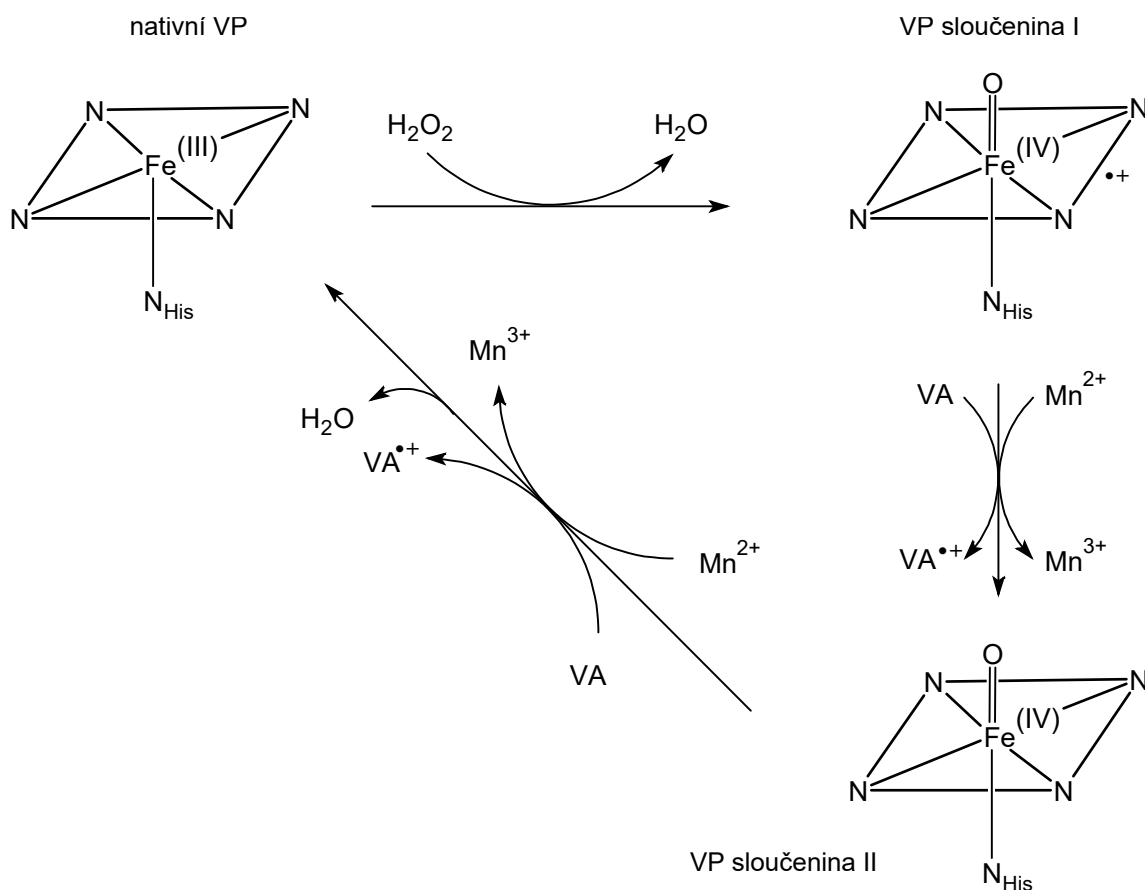
Versatilní peroxidasa

Versatilní peroxidasy jsou glykosylované hemové peroxidasy, které kombinují substrátovou specifitu MnP a LiP [60]. Jsou schopné katalyzovat oxidaci Mn²⁺ na Mn³⁺ charakteristickou pro MnP i oxidaci nefenolických aromatických substrátů včetně VA, typického substrátu LiP, za vzniku aryl-kationtových radikálů. K oxidaci substrátu nevyžadují přítomnost nízkomolekulárních redoxních mediátorů a vykazují také mangan-indepen-

dentní aktivitu. Díky těmto vlastnostem bývají VP označovány též jako hybridní peroxidasy, nebo LiP-MnP hybridy. Mezi substráty VP patří fenolické a nefenolické aromatické sloučeniny, substituované fenoly, hydrochinony a některá azo- či antrachinonová barviva. Produkce těchto enzymů byla zaznamenána u ligninolytických hub rodů *Pleurotus* a *Bjerkandera* a u některých bakterií.

Ve struktuře molekuly VP byly zaznamenány struktury typické pro MnP i LiP [67]. Jde o helikální glykoproteiny s několika disulfidovými můstky a centrální kapsou obsahující hem, která je stabilizována dvěma helikálními doménami s vápenatými kationty, podobně jako u ostatních příbuzných peroxidas. V blízkosti hemu jsou vazebná místa pro manganaté kationty i substráty s nízkým redoxním potenciálem (oxidace substrátů s vysokým redoxním potenciálem pravděpodobně probíhá složitějším mechanismem). Pro vazbu vysokomolekulárních substrátů slouží specifická místa na povrchu enzymu, kde vznikají (degradační) intermediáty, které mohou proniknout do aktivního místa v blízkosti hemu a jsou zde klasickým peroxidasovým mechanismem oxidovány na konečné produkty enzymové reakce.

Katalytický cyklus VP je stejně jako u MnP a LiP zahájen dvouelektronovou oxidací v přítomnosti peroxidu vodíku za vzniku VP sloučeniny I a vody (Obr. 2.10, str. 29) [60]. Enzym se vrací do nativního stavu prostřednictvím dvou jednoelektronových redukcí, při nichž jsou postupně oxidovány dvě molekuly substrátu. Stejně jako u LiP může docházet ke vzniku katalyticky neaktivní VP sloučeniny III, před jejímž vznikem enzym chrání přítomnost VA a podobných látek. Oxidace substrátů s vysokým redoxním potenciálem je nekompetitivně inhibována manganatými kationty.



Obr. 2.10 Reakční cyklus versatile peroxidasy (VP), který demonstruje hybridní vlastnosti tohoto enzymu kombinující katalytické schopnosti mangan-dependentní peroxidasy (oxidace manganatých kationtů) a ligninperoxidasy (oxidace veratrylalkoholu (VA) na příslušný kation-radikál, resp. veratraldehyd (VAD)). Upraveno podle [60].

V souladu s uvedenými hybridními vlastnostmi VP bylo popsáno i různé pH optimum pro oxidaci manganatých kationtů (kolem pH 5, podobně jako u MnP) a aromatických substrátů (okolo pH 3, podobně jako u LiP), přičemž redoxní potenciál VP vzrůstá v kyselém prostředí stejně jako u jiných hemových peroxidas [67]. Teplotní stabilita VP je závislá na druhu mikroorganismu, který ji produkuje. V porovnání s LiP vykazují VP vyšší stabilitu v přítomnosti fenolických látek, jejichž vysoká koncentrace LiP deaktivuje.

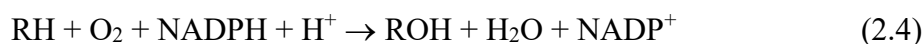
2.3.4 Další enzymy

Cytochromy P450

Monooxygenasy je možné rozdělit na dvě hlavní skupiny [68]. První skupinou jsou flavinové monooxygenasy, které v rámci této práce nejsou dále rozebírány. Druhou skupinou jsou oxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí, které jako terminální oxidasu obsahují cytochrom P450 (EC 1.14.14.1). Oxygenasy se smíšenou funkcí jsou vícesložkové systémy, které katalyzují inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu.

Na rozdíl od bakteriálních cytochromů P450, které jsou rozpustné, je eukaryotický systém cytochromu P450 vázán v membráně hladkého endoplasmatického retikula nebo mitochondrií [69]. Jde o hemoproteiny, jejichž prostetická skupina (protoporfyrin IX s inkorporovaným Fe³⁺) je kromě hydrofobních sil v apoproteinu kovalentně vázána thiolátovou sírou proximálního cysteinu, který zde figuruje jako pátý ligand hemového železa [70]. Šestým ligandem železa je atom kyslíku z molekuly vody. Toto uspořádání do jisté míry předurčuje specifické spektrální a katalytické vlastnosti cytochromů P450 v porovnání s jinými hemoproteiny. Zmíněný cystein a některé další aminokyseliny v blízkosti hemu tvoří vysoce konzervovanou oblast, jež se nachází prakticky ve všech známých proteinech patřících do superrodiny cytochromů P450.

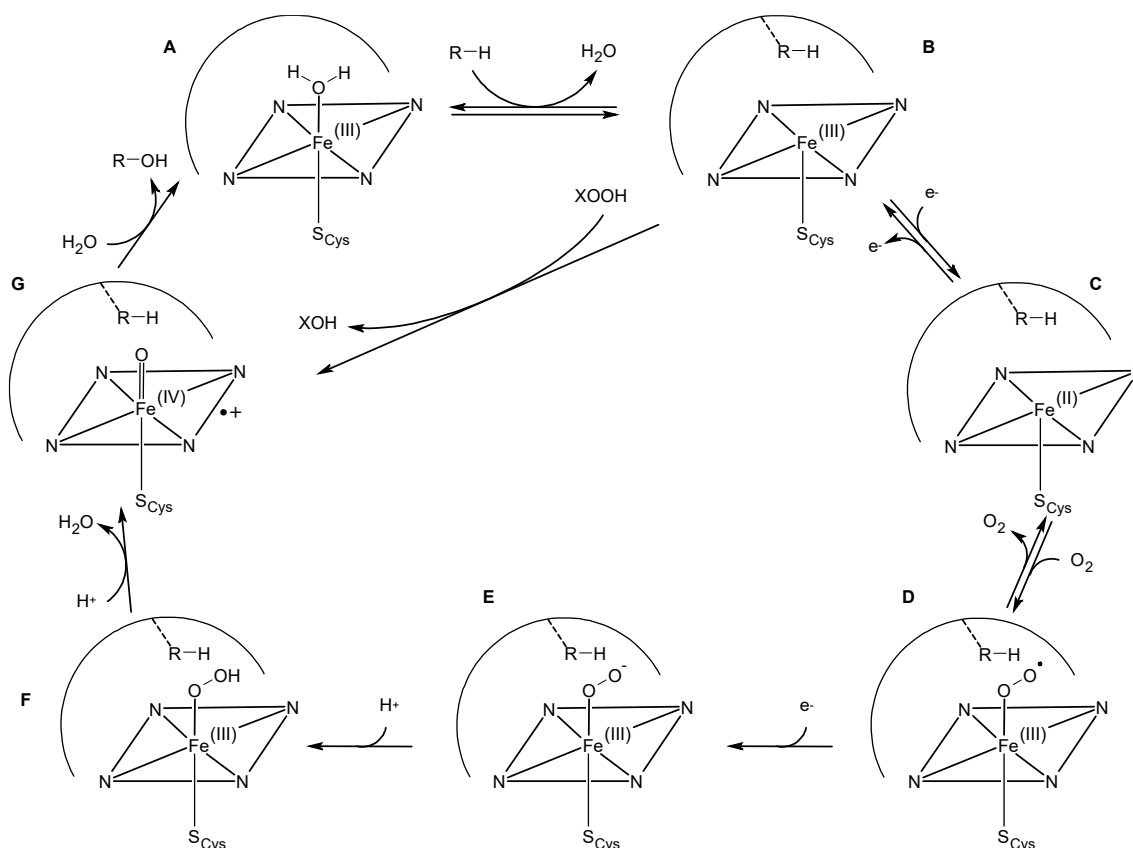
Celkovou reakci katalyzovanou systémem cytochromu P450 lze zapsat rovnicí 2.4, kde RH je substrát hydrofobního charakteru a ROH je vznikající hydroxyderivát substrátu [62].



Jak je naznačeno v rovnici 2.4, externím zdrojem elektronů v reakčním cyklu je NADPH. Elektrony jsou nejprve přeneseny z NADPH na NADPH:cytochrom P450 reduktasu (endoplasmatické retikulum), nebo na ferredoxin a posléze Fe-S protein (mitochondrie). Odtud je pak elektron přenesen na samotný cytochrom P450.

Katalytický cyklus (Obr. 2.11, str. 31, A–G) začíná vazbou substrátu na nativní formu cytochromu P450 (ferri forma, hexakoordinované železo; A) [68]. Tím se mění konformace v aktivním místě enzymu a hemové železo zůstává pentakoordinované (B). Následně dojde k redukci železitého kationtu jedním elektronem z NADPH na železnatý kation (C), čímž je umožněna vazba molekuly kyslíku. Vytváří se ternární ferri-superoxidový komplex (D), v němž je železo opět hexakoordinované. Ferri-superoxidový komplex je redukován druhým externím elektronem, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (E) a tzv. aktivační fáze cyklu tím končí. Pokud k redukci nedojde dostatečně rychle, může se původní komplex rozpadnout za vzniku superoxidového anion-radikálu, který superoxidodismutasa přeměňuje na peroxid vodíku.

V této plně aktivované formě cytochromu P450 (E) dochází ke štěpení vazby v molekule kyslíku [68], [70]. Jeden atom kyslíku přijme dva protony (F) a uvolní se molekula vody. Druhý kyslík zůstává vázán na hemové železo, čímž vzniká ferrioxenový komplex (G). Posunem elektronu z thiolátové síry vzniká reaktivní kyslíkový radikál schopný odštěpit vodík z molekuly substrátu. Vytváří se tak radikál substrátu a hydroxylový radikál, který zůstane navázán na hemovém železe. Rekombinací radikálů dojde k uvolnění hydroxylované molekuly substrátu a cytochrom P450 se vrací zpět do nativní formy.



Obr. 2.11 Katalytický cyklus cytochromu P450, při němž dochází k monohydroxylaci substrátu (RH) za vzniku produktu (ROH). Zdrojem kyslíku v reakci může být molekula kyslíku, nebo peroxosloučenina (XOOH). Upraveno podle [68], [70].

Donorem atomu kyslíku v popsané reakci nemusí být jen molekula kyslíku, ale také peroxid nebo peroxokyselina [69]. Reakce s peroxidem probíhá neuspořádaným mechanismem, při kterém není vazba peroxidu závislá na vazbě substrátu. Cytochromy P450 navíc mohou kromě hydroxylace substrátu katalyzovat řadu jiných reakcí (např. epoxidace, deaminace, dealkylace).

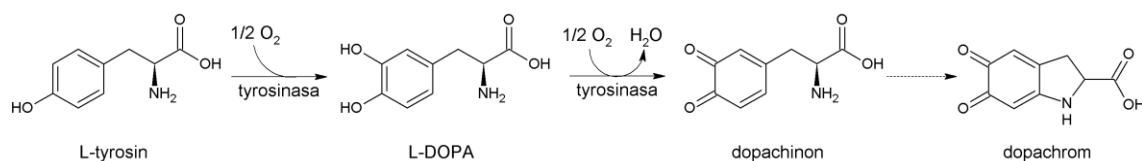
Cytochromy P450 byly nalezeny v mnoha eukaryotických i prokaryotických organismech, přičemž primární struktura různých izoform se může až z 90 % lišit [69]. Podle stupně sekvenční homologie se cytochromy P450 dělí do rodin (více než 40% homologie) a podrodin (více než 55% homologie) [71]. Substrátová specifita cytochromů P450 je obecně poměrně široká. Jednotlivé izoformy však přeměňují substráty odlišné, i když v některých případech se může substrátová specifita částečně překrývat. Cytochromy P450 se významně podílí na metabolismu endogenních i exogenních látek včetně environmentálních polutantů, dokonce jimi mohou být indukovány [1], [72]. Bylo např. prokázáno, že mezi induktory cytochromů P450 1A1, 1A2 a 1B1 patří BaP a některé další PAU. Tyto látky mohou být enzymem aktivovány, tzn. přeměněny na reaktivní metabolity schopné vytvářet adukty DNA.

Tyrosinasa

Tyrosinasy (EC 1.14.18.1), stejně jako lakasy, patří mezi fenoloxidasy obsahující měď [73]. Na rozdíl od lakas však obsahují v aktivním centru pouze dva ionty mědi, z nichž každý je koordinován třemi histidiny. Mezi fenoloxidasy patří také katecholoxidas (EC 1.10.3.1), které katalyzují oxidaci katecholu (*o*-difenu) na příslušný chinon, nejsou však schopné hydroxylace monofenolů. Tyrosinasy jsou někdy v literatuře označovány jako polyfenoloxidas [74].

Tyrosinasy katalyzují *ortho*-hydroxylaci monofenolů za vzniku *o*-difenu (monofenolasová, resp. kresolásová aktivita) a jejich následnou oxidaci na příslušné *o*-chinony (difenolasová, resp. katecholasová aktivita) [73]. Atom kyslíku inkorporovaný do struktury monofenolu pochází z molekuly kyslíku. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu, přičemž vznikající *o*-chinon slouží jako donor vodíku.

Na Obr. 2.12 je znázorněna hydroxylace tyrosinu katalyzovaná tyrosinase za vzniku L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) a následná oxidace na dopachinon [75]. Dopachinon může podléhat spontánním reakcím, které vedou ke vzniku dopachromu. Popsaný děj je součástí biosyntézy melaninu.



Obr. 2.12 Hydroxylace tyrosinu za vzniku L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) (monofenolasová aktivita tyrosinasy) a oxidace L-DOPA na dopachinon (difenolasová aktivita tyrosinasy). Dopachinon se poté sledem dalších reakcí může přeměnit na dopachrom. Upraveno podle [76].

Tyrosinasy byly identifikovány u mnoha organismů včetně bakterií, hub, rostlin a živočichů. Jejich funkce i lokalizace se však může u různých organismů lišit. Většina těchto enzymů je lokalizována intracelulárně, u některých hub a bakterií však byly popsány také extracelulárně produkované tyrosinasy [77], [78].

2.4 Bioremediace půd kontaminovaných polycyklickými aromatickými uhlovodíky

Jak bylo zmíněno v kap. 2.1, str. 12, PAU patří mezi významné rekalitrantní polutanty [7]. Vzhledem k jejich toxicitě a bioakumulačním potenciálu, který vyplývá z fyzikálně-chemických vlastností PAU, je věnována značná pozornost monitoringu znečištění i rozvoji vhodných dekontaminačních technologií. Přestože PAU jsou rozšířeny prakticky do všech oblastí životního prostředí, značná část těchto látek končí kvůli svým fyzikálně-chemickým vlastnostem v půdě a sedimentech.

V současné době se rozvíjejí především bioremediační technologie, které jsou v porovnání s fyzikálně-chemickými metodami většinou levnější a šetrnější k životnímu prostředí [17]. Bioremediační technologie jsou metody, které využívají k degradaci polutantů biologické systémy (živé mikroorganismy nebo jejich součásti, např. enzymy). Úspěšnost bioremediace závisí na vlastnostech polutantů, povaze kontaminovaného materiálu, degradačních schopnostech mikroorganismů i vnějších podmínkách (např. teplota, pH, dostupnost živin pro mikroorganismy).

Existuje celá řada organismů, u nichž byla zaznamenána schopnost transformovat či degradovat některé PAU [19]. Patří mezi ně např. gramnegativní bakterie rodu *Pseudomonas* [79], *Sphingomonas* [80], grampozitivní bakterie *Bacillus* [81] a aktinobakterie *Rhodococcus* [82] či *Mycobacterium* [83], některé termofilní bakterie [84] a dále ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* [85], *Lentinus tigrinus* [86], *Bjerkandera* sp. [87]. Jak již bylo zmíněno, míra degradability PAU obvykle klesá s rostoucím počtem aromatických cyklů v molekule [7]. Bakterie často nejsou schopné velké molekuly transportovat do buňky, kde degradace probíhá, a houby samy o sobě obvykle nemají schopnost úplné mineralizace PAU. Pro dosažení dostatečné míry biodegradace komplexních směsí PAU je často třeba působení celého mikrobiálního společenstva, jako je tomu např. při kompostování materiálů kontaminovaných PAU.

2.4.1 Kompostování

Kompostování je proces, při němž dochází k aerobní degradaci organického materiálu působením mikrobiální komunity za vzniku oxidu uhličitého, vody, minerálů a stabilizované organické hmoty [88].

Na degradaci organických materiálů během tzv. kompostování s termogenezí se podílí velké množství mikroorganismů [88], [89]. Složení mikrobiálního konsorcia se v důsledku měnících se podmínek během celého procesu proměňuje. V počáteční mesofilní fázi (25–40 °C) je přítomno množství snadno dostupných živin (sacharidy, proteiny atd.), které jsou rozkládány primárními rozkladači, jejichž metabolická aktivita vede k tvorbě velkého množství tepla. To má za následek růst teploty a proces vyústí do termofilní fáze (40–70 °C). Této fázi dominují termofilní organismy, hlavně bakterie, neboť teploty vyšší než 55 °C obvykle inhibují růst většiny termofilních hub. Po vyčerpání dostupných substrátů dochází ke snížení aktivity termofilních organismů, což vede k poklesu teploty a nastává druhá mesofilní fáze neboli fáze chladnutí. Materiál je rekolonizován mesofilními organismy, jejichž složení se však od počáteční mesofilní fáze liší. Jedná se o organismy, které byly schopné přežít termofilní fázi např. ve formě spor. Zároveň jsou to především organismy schopné degradovat škrob a celulosu. Poslední fází kompostování je maturace. V tomto období obvykle narůstá množství hub, kdežto množství bakterií naopak klesá, což je způsobeno vysokým podílem obtížněji degradovatelných substrátů, např. ligninu.

Dříve bylo kompostování využíváno pouze ke zpracování zemědělských odpadů, zbytků potravy, kalů apod. [90]. V 80. letech však začal výzkum kompostování v kontextu vysokého degradačního potenciálu přítomných mikroorganismů. Bylo zjištěno, že při kompostování mohou být efektivně degradovány některé environmentální organopolutanty včetně PAU [5]. Kontaminovaný materiál je před samotným kompostováním obvykle smíchán se snadno kompostovatelným substrátem (nasekaná tráva, rostlinný odpad, materiál pro komerční pěstování hub apod.) [89]. Odlišným přístupem je přimíchání stabilizovaného organického materiálu („maturovaného kompostu“), který procesem kompostování již prošel, s kontaminovanou matricí. V takovém případě již neprobíhá klasický proces kompostování zahrnující všechny výše popsané teplotní fáze.

Úspěšnost kompostování z hlediska úbytku PAU kromě druhu použitého kompostovacího substrátu [3] a podmínek kompostování závisí i na typu půdy, složení výchozí směsi PAU [91], či stáří kontaminace a s tím související dostupnost PAU pro přítomné mikroorganismy [92].

V literatuře je popsáno mnoho studií, které se zabývají kompostováním materiálů znečištěných PAU (půda [2], [93], dřevo [3], popílek [94] aj.; pro shrnutí např. [89] [91]). Často je sledován především remediační potenciál kompostování s ohledem na typ kompostovaného substrátu, kontaminované matrice a parametry procesu (pH, teplotní průběh, poměr C:N, přídavky dalších látek). Existují však také studie, které se zabývají mechanismem fungování celého systému. Tyto práce se nejčastěji zaměřují na změny ve složení mikrobiální komunity během kompostování PAU. Přitom jsou využívány metody jako je např. analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA, z angl. phospholipid fatty acid) [6]) a techniky zahrnující izolaci a charakterizaci mikrobiální DNA [3], [95]. Kromě identifikace přítomných mikroorganismů např. na základě sekvenování mikrobiální DNA je v některých studiích zkoumána přítomnost tzv. degradačních genů [96]. Jde o geny kódující známé klíčové enzymy, tedy např. naftalendioxygenasy, C12O, C23O). Je však stále třeba mít na paměti, že vzhledem k delšímu poločasu rozpadu molekul DNA nemusí přítomnost charakteristických sekvencí mikrobiální DNA znamenat nutně i přítomnost daného mikroorganismu v určitém okamžiku. Podobně identifikace degradačních genů sice naznačuje degradační potenciál daných mikroorganismů, geny však nemusí být za všech okolností exprimovány [23].

Proces kompostování byl několika autory studován také z hlediska přítomných enzymových aktivit (extracelulárních) hydrolytických a ligninolytických enzymů [97], [98], [99]. Je však poměrně málo informací o vývoji enzymových aktivit v kontextu degradace PAU, zejména v případě bakteriálních enzymů (CHD, CŠD aj.).

3 Cíl práce

- optimalizace extrakce a stanovení vybraných enzymových aktivit významných pro degradaci polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) během kompostovacího procesu
- použití optimalizované metody pro sledování zvolených enzymových aktivit v průběhu kompostovacího procesu s reálnou kontaminovanou půdou

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

aceton pro HPLC	VWR, ČR
acetonitril pro HPLC	VWR, ČR
L-askorbát sodný ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich, ČR
diamonná sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.	Lach-Ner, ČR
L-3,4-dihydroxyfenylalanin ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
3-(dimethylamino)benzoová kyselina (98%)	Alfa Aesar, USA
disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, dihydrát, p.a.	PENTA, ČR
ethanol, p. a. (96%)	Lach-Ner, ČR
n-hexan pro HPLC	VWR, ČR
hovězí sérový albumin ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
hydrogenfosforečnan disodný, dodekahydrát, p.a.	Lach-Ner, ČR
hydroxid draselný, p.a.	PENTA, ČR
hydroxid sodný, p.a.	PENTA, ČR
chloroform pro HPLC	VWR, ČR
inhibitory proteas (cOmplete Tablets EDTA-free, easy pack, REF 04693132001, exp. 09/2019)	Roche, ČR
kyselina dusičná, p.a. ($\geq 65\%$)	Chemapol, ČR
kyselina fosforečná, p.a. (84–85%)	Fluka Chemica, Švýcarsko
kyselina jantarová ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
kyselina octová, p.a. (99%)	Lach-Ner, ČR
kyselina vinná (99%)	Alfa Aesar, USA
DL-laktát sodný, roztok (60%)	Sigma-Aldrich, ČR
methanol pro HPLC	VWR, ČR
3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochlorid, monohydrát (98%)	Acros Organics, USA
methylester kyseliny tridekanové	Sigma-Aldrich, ČR
octan sodný, bezvodý ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
PAU standard pro HPLC (Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in acetonitrile, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Accu Standard [®] , USA
peroxid vodíku, p.a. ($\geq 30\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
pyrokatechol ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich, ČR

síran manganatý, monohydrát, p.a.
standardy pro PLFA
toluen pro HPLC
veratrylalkohol (97%)

Sigma-Aldrich, ČR
Matreya LLC, USA
VWR, ČR
Alfa Aesar, USA

4.2 Použité přístroje a materiál

analytická váha AE 240	Mettler Toledo GmbH, Německo
automatický extraktor ASE 200	Dionex, USA
autosampler CP-8400	Varian, USA
biologický termostat BT 120M	Laboratorní přístroje Praha, ČR
centrifuga EBA 20	Hettich Zentrifugen, Německo
centrifuga Medifriger BL osazená výkyvným rotorem 7009079 nebo úhlovým rotorem 7001083	JP Selecta, Itálie
centrifuga Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Německo
dusík (99,99%)	Linde Gas a. s., ČR
filtrační papír	Verkon, ČR
fluorescenční detektor Waters 2475	Waters, USA
helium (99,999%)	Linde Gas a. s., ČR
hmotnostní detektor 240-MS	Varian, USA
homogenizátor Ultra-Turrax® T 18 basic	IKA, Německo
HPLC systém Waters Alliance 2695	Waters, USA
kolona DB-5MS (30 m × 0,25 mm, tloušťka stationární fáze 0,25 μm)	Agilent, USA
kolona LiChroCart (250 mm × 5 mm) s náplní LiChrospher® PAH (5 μm, velikost pórů 150 Å)	Merck, Německo
kolony LiChrolut® Si (25–40 μm), 200 mg, 3 ml	Merck, Německo
laboratorní váha KERN EG	Kern & Sohn GmbH, Německo
lyofilizátor	Labio, ČR
magnetická míchačka	VELP Scientifica Srl, Itálie
mikrotitrační destičky UV-STAR, 96 jamek	Greiner Bio-One, Rakousko
mikrotitrační destičky, 96 jamek	Thermo Fisher Scientific, USA
mixér Mira	ETA, ČR
mořský písek čištěný	PENTA, ČR
orbitální třepačka KS-15	Edmund Bühler GmbH, Německo
pec	LAC, ČR
pH metr inoLab® 7110	WTW, měřicí a analytická technika, s. r. o., ČR

plynový chromatograf 450-GC	Varian, USA
podlahový zásyp – perlit (zrnitost do 6 mm)	Karl Bachl GmbH & Co., Německo
půdoznalecké síto (průměr 5,0 mm)	Stavební stroje n. p. Zličín, ČR
purifikační systém Direct-Q® 3 UV	Merck, Německo
síto půdoznalecké (průměr 2,0 mm)	Stavební stroje n. p. Zličín, ČR
síto půdoznalecké (průměr 5,0 mm)	Stavební stroje n. p. Zličín, ČR
skleněné kuličky 0,25–0,50 mm	Carl Roth GmbH, Německo
spektrofotometr Infinite M200 Pro NanoQuant	Tecan, Švýcarsko
ultrasonická lázeň	Ecoson, Slovensko
ultrasonický homogenizátor Sonopuls HD 2070	Bandelin, Německo
UV-detektor s fotodiodovým polem Waters 2996	Waters, USA
vodní lázeň Julabo UC	Julabo, Německo
vortex MX-S	DLAB Scientific Inc., USA
vzduchové čerpadlo AK ² -30	Aquaking, Nizozemsko
zelený substrát pro pěstování pečárky dvouvý- trusé	Jedlé houby (Jiří Václavík), ČR

4.3 Složení pufrů a roztoků

Bradfordovo činidlo

Coomassie Brilliant Blue G-250	10 mg
ethanol (96%)	5,0 ml
kyselina fosforečná (85%)	10,0 ml
deionizovaná voda	do 100 ml

Extrakční fosfátový pufr: 50 mM, pH 7,0

KH ₂ PO ₄	2,80 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	10,47 g
deionizovaná voda	do 1000 ml

Fosfátový pufr pro PLFA: 50 mM, pH 7,4

KH ₂ PO ₄	0,680 g
1 M NaOH	pro úpravu pH
deionizovaná voda	do 100 ml

Fosfátový pufr pro stanovení aktivity C12O a C23O: 50 mM, pH 7,5

KH ₂ PO ₄	0,680 g
1 M NaOH	pro úpravu pH
deionizovaná voda	do 100 ml

Fosfátový pufr pro stanovení aktivity tyrosinasy: 50 mM, pH 6,5

KH ₂ PO ₄	0,680 g
1 M NaOH	pro úpravu pH
deionizovaná voda	do 100 ml

Fosfátový pufr pro přípravu roztoku 3-(dimethylamino)benzoové kyseliny (DMAB): 100 mM, pH 6,5

KH ₂ PO ₄	0,902 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	1,207 g
deionizovaná voda	do 100 ml

Octanový pufr pro stanovení aktivity lakasy: 120 mM, pH 5,0

octan sodný, bezvodý	0,984 g
octová kyselina (99%)	pro úpravu pH
deionizovaná voda	do 100 ml

Sukcinát-laktátový pufr pro stanovení aktivity MnP: 100 mM, pH 4,5

jantarová kyselina	0,146 g
DL-laktát sodný (60% roztok)	1,640 g
deionizovaná voda	do 100 ml

Vínanový pufr pro stanovení aktivity LiP: 100 mM, pH 3,0

kyselina vinná	1,500 g
1 M NaOH	pro úpravu pH
deionizovaná voda	do 100 ml

4.4 Použité metody

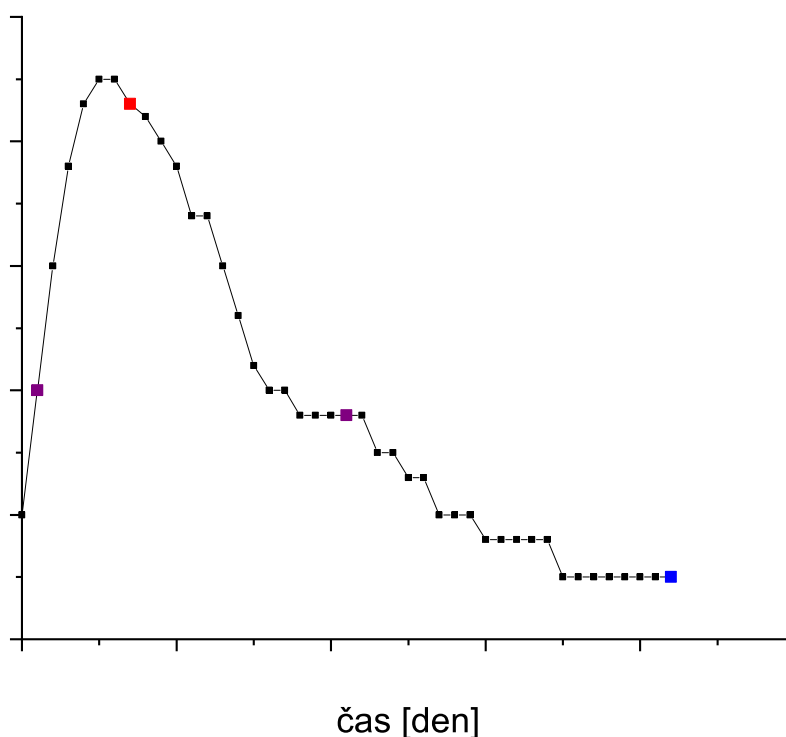
4.4.1 Kompostování

V rámci experimentu byla kompostována půda kontaminovaná PAU (lokalita: Jihočeské dřevařské závody Soběslav) poskytnutá firmou EarthTech (ČR), usušená na vzduchu a přesátá přes jemné síto (průměr 2 mm). Kompostování znečištěné půdy bylo za stejných podmínek provedeno paralelně ve třech reaktorech (ozn. PAU1, PAU2, PAU3), v dalších třech reaktorech probíhalo kompostování samotného tzv. zeleného substrátu od lokálního

dodavatele Jedlé houby (ozn. SUB1, SUB2, SUB3). Z důvodu kontroly úbytku PAU v samotné půdě vlivem zvýšené teploty byla část suché půdy po dobu experimentu ponechána v otevřené skleněné nádobě v kompostéru.

Příprava, uspořádání a podmínky experimentu

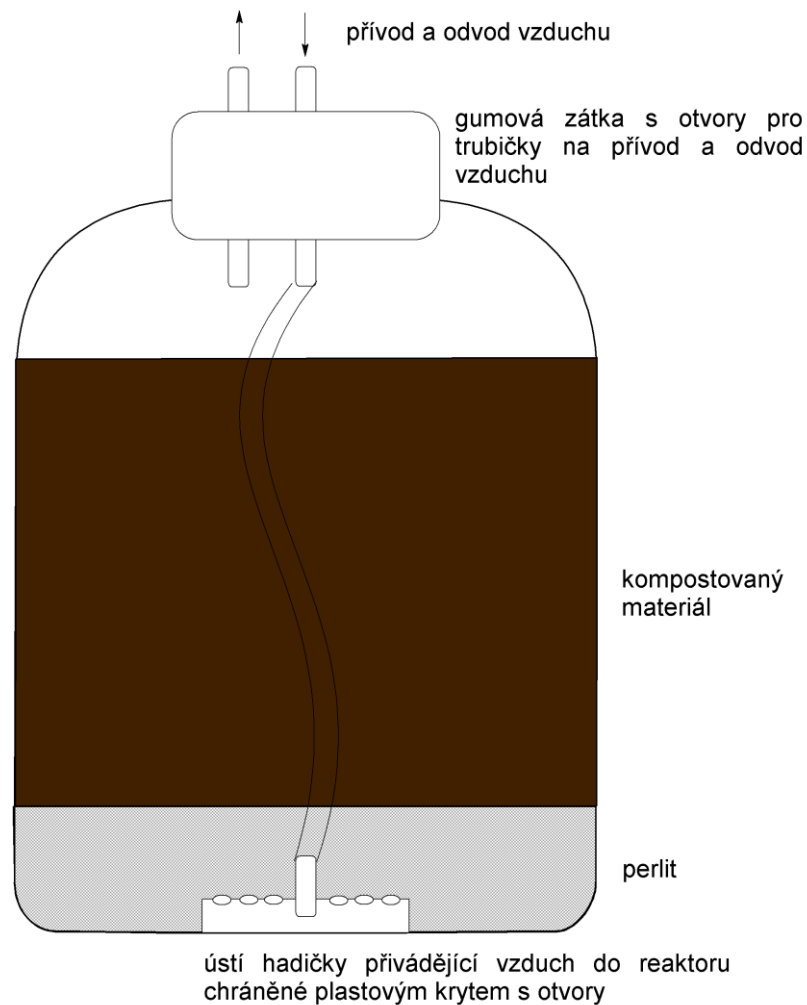
Kompostování probíhalo ve skleněných reaktorech o objemu 4 l umístěných ve speciálně upraveném biologickém termostatu (dále jen kompostéru), který zajišťoval optimální teplotní průběh kompostování [100] i při malém objemu materiálu (Obr. 4.1). Reaktory byly utěsněny gumovou zátkou a opatřeny vzduchováním.



Obr. 4.1 Teplotní program 0.–42. den kompostování. Barevné tečky označují časy odběrů (den 1, 7, 21, 42).

Na dně každého reaktoru (Obr. 4.2, str. 41) byla vrstva perlitu předem zbaveného jemné frakce přesátím přes 5mm půdoznalecké síto. Pod perlit byl hadičkou přiváděn vzduch, který před vstupem do reaktoru procházel deionizovanou vodou. Vrstva perlitu sloužila jednak k zajištění rovnoměrného provzdušnění, jednak k odvedení případné přebytečné vlhkosti z kompostovaného materiálu. Vzduch odváděný z reaktorů byl přes odpadní baňky sloužící ke sběru kondenzátu sveden do digestoře a kondenzát byl průběžně likvidován. Průtok vzduchu byl po celou dobu experimentu udržován zhruba na hodnotě $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (vzduchové čerpadlo AK²-30, Aquaking).

Po 42 dnech byly reaktory z kompostéru vyndány a ponechány odzátkované při laboratorní teplotě bez čerpadlem zajištěného vzduchování, pouze s průběžnou kontrolou vlhkosti.



Obr. 4.2 Schéma kompostovacího reaktoru

Jako substrát byl použit tzv. zelený substrát určený pro komerční pěstování pečárky dvouvýtrusé (*Agaricus bisporus*) složený z nasekané pšeničné slámy, drůbeží kejdy a sádry (obsah dusíku 1,7 %) [2]. K suchému substrátu byla nejprve přidána odstátá koňaková voda v poměru 1 : 3 (w/w) a směs byla míchána tak dlouho, dokud substrát vodu nevstřebal. Do SUB reaktorů bylo postupně napěchováno přibližně 1000 g připraveného vlhkého materiálu. Obsah PAU reaktorů byl tvořen střídajícími se vrstvami substrátu a půdy. Spodní vrstvu tvořilo 100 g vlhkého substrátu, na kterou bylo nasypáno 25 g půdy. Další vrstvy pak byly tvořeny střídavě 75 g substrátu a 25 g půdy, přičemž vrchní vrstvu tvořil substrát. Vlhkost byla v průběhu experimentu udržována na 75 % (w/w).

Odběr vzorků

Vzorky byly pravidelně odebírány ze všech reaktorů ve dnech 1, 7, 21, 42. Vždy byla odebrána „výseč“ z dosud neporušené části reaktoru zahrnující celou jeho výšku (tzn. všechny vrstvy); vzniklý otvor v kompostované směsi byl částečně zahrnut a materiál kolem opět patřičně upěchován, aby později nedocházelo k nerovnoměrnému provzdušnění. Odběry vzorků byly načasovány tak, aby reprezentovaly jednotlivé teplotní fáze (Obr. 4.1, str. 40): den 1 počáteční mesofilní fázi, den 7 termofilní fázi, den 21 chladnutí, den 42 počátek zrání.

Pro stanovení enzymové aktivity byly vzorky uchovány při 4 °C a zpracovány v den odběru. Ke stanovení obsahu PAU byly vzorky usušeny v digestoři a uchovány v suchém stavu za laboratorní teploty. Vzorky na analýzu PLFA byly ihned zmrazeny a až do zpracování uchovány při teplotě -20 °C.

4.4.2 Příprava extraktů kompostu pro stanovení enzymové aktivity

Pokud není uvedeno jinak, vzorky kompostu byly extrahovány předchlazeným extrakčním fosfátovým pufrem (kap. 4.3, str. 38) při 4 °C, vždy nejdéle 12 h po odběru z reaktoru. Vlhký materiál z reaktoru byl pro docilení větší homogenity nastřílán nůžkami na cca 1 cm dlouhé kusy. Poté byly odděleny tři paralelní vzorky, které byly extrahovány stejným postupem.

Postup extrakce I

Postup byl proveden dle metody Zeng a kol. [101].

V 50ml zkumavce byly smíchány 4 g vlhkého kompostu s 20 ml extrakčního fosfátového pufru. Zkumavka byla umístěna v ledové lázni na orbitální třepačku (100 RPM, 2 h; 400 × 300 mm, Edmund Bühler GmbH). Poté byl pevný podíl odstraněn centrifugací (4000× g, 10 min, 4 °C; Medifriger BL s výkyvným rotorem, JP Selecta) a následnou filtrací přes filtrační papír. Filtrát byl použit pro stanovení enzymové aktivity ligninolytických enzymů a tyrosinasy.

Stejný postup byl proveden také s deionizovanou vodou (pH 5,5), resp. 120 mM octanovým pufrem (pH 5,0; kap. 4.3, str. 38) jako extrakčním činidlem.

Postup extrakce II

Postup II byl upraven podle metody extrakce extracelulárních enzymů z vyplozeného houbového substrátu podle Singh a kol. [102].

Ke 4 g vlhkého kompostu v 50ml zkumavce bylo přidáno 15 ml extrakčního pufru. Vzorek byl rozmělněn pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax® T 18 basic (IKA): 30 s homogenizace, 10 min chlazení na ledu, 30 s homogenizace. Po dalších 10 min byla směs filtrována přes vatou a drobnější pevné nečistoty byly odstraněny centrifugací (4 000× g,

20 min, 4 °C; Medifriger BL s výkyvným rotorem, JP Selecta). Odebraný supernatant sloužil jako vzorek pro všechna stanovení enzymové aktivity uvedená v této práci.

Postup extrakce III

Na základě podobnosti výchozích materiálů byl postup III odvozen z metody podle Gaudinové a kol. [103] pro extrakci cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas z rostlinných pletiv. Metoda zahrnuje mechanickou desintegraci buněk v kapalném dusíku.

V třecí misce byly v tekutém dusíku homogenizovány 4 g vlhkého kompostu s 1,5 g skleněných kuliček (Carl Roth GmbH). Následně byl vzorek převeden do centrifugační zkumavky a smíchán s 15 ml extrakčního pufru. Po 10 min extrakce/inkubace byla suspenze centrifugována (15 000× g, 28 min, 4 °C; Medifriger BL s úhlovým rotorem, JP Selecta), supernatant byl odebrán a použit pro všechna stanovení enzymové aktivity uvedená v této práci.

Postup extrakce IV

Do postupu IV byla pro desintegraci buněk kromě kapalného dusíku použita také sonikace dle Silva a kol. [104].

Do třecí misky byly naváženy 4 g vlhkého kompostu, který byl dále homogenizován pomocí 1,5 g skleněných kuliček a tekutého dusíku. Vzorek byl smíchán s 15 ml extrakčního pufru, do něhož byla přidána komerční směs inhibitorů proteas (Roche) podle návodu výrobce. Suspenze byla sonikována (Sonopuls HD 2070, Bandelin) za současného chlazení po dobu dvakrát 40 s. Sonikace byla na 60 s přerušena, aby se zamezilo nadměrnému zahřátí suspenze. Zbytky buněk a pevné částice byly odstraněny centrifugací (15 000× g, 28 min, 4 °C; Medifriger BL s úhlovým rotorem, JP Selecta). V odebraném supernatantu byla stanovována aktivita C12O, C23O a tyrosinasy.

4.4.3 Stanovení enzymové aktivity v extraktech kompostu

Enzymová aktivita v připravených extraktech (kap. 4.4.2, str. 42) byla stanovována spektrofotometricky při 40 °C na přístroji Infinite M200 Pro (Tecan) v 96 jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem (destičky Thermo Fisher Scientific pro spektrofotometrii ve viditelné oblasti spektra, destičky Greiner Bio-One pro UV oblast). Absorbance při dané vlnové délce byla změřena na počátku reakce a poté každých cca 60 s po dobu 12 min. Pro výpočet byly použity pouze ty hodnoty, které splňovaly předpoklad lineární závislosti absorbance na čase.

Všechna měření byla provedena v triplicátech nejpozději 12 h po extrakci vzorku; extrakt byl po celou dobu uchováván při 4 °C. Ve všech případech bylo provedeno také kontrolní stanovení, při němž byl testovaný vzorek nahrazen extrakčním fosfátovým pufrem (tj. slepý vzorek).

Při všech stanoveních byla enzymová reakce zahájena přidáním pracovního roztoku (PR_{enzym}) ke vzorku v jamce mikrotitrační destičky. Pracovní roztok byl připraven bezprostředně před měřením z pufru a zásobních roztoků činidel a substrátu potřebných pro dané stanovení enzymové aktivity, a to v poměru daném složením reakční směsi. Složení pufrů je uvedeno v kap. 4.3, str. 38, složení pracovních roztoků, resp. reakčních směsí je uvedeno u konkrétních stanovení. Pokud není uvedeno jinak, zásobní roztoky činidel a substrátů byly připraveny rozpuštěním dané látky v deionizované vodě.

Aktivita a [$U \cdot ml^{-1}$] ligninolytických enzymů byla stanovena dle vzorce 4.1

$$a = \frac{\Delta A_{\lambda} / \Delta t \cdot V_{rs}}{\epsilon_{\lambda} \cdot V_{vz}}, \quad (4.1)$$

kde ΔA_{λ} je změna absorbance v reakční směsi při dané vlnové délce za čas Δt [min], ϵ_{λ} je molární absorpční koeficient sledovaného reakčního produktu při dané vlnové délce [$mM^{-1} \cdot cm^{-1}$], V_{rs} je objem reakční směsi [μl] a V_{vz} objem vzorku [μl], tzn. enzymového preparátu. Jednotka enzymové aktivity U je definována jako množství enzymu, které přemění 1 μmol substrátu za 1 min.

Aktivita C12O, C23O a tyrosinasy stanovované dopachromovou metodou byla vypočítána podle vztahu 4.2. Při výpočtu byla od změny absorbance vzorku ΔA_{vzorek} za čas Δt odečtena průměrná hodnota změny absorbance slepého vzorku ΔA_{blank} za čas Δt .

$$a = \frac{\Delta A_{vzorek} / \Delta t - \Delta A_{blank} / \Delta t}{\epsilon_{\lambda}} \cdot \frac{V_{rs}}{V_{vz}} \quad (4.2)$$

Specifická aktivita enzymu ve vzorku [$U \cdot mg^{-1}$] byla vypočítána dle vzorce 4.3

$$a_{sp} = \frac{a}{c_{pr}}, \quad (4.3)$$

kde a je enzymová aktivita [$U \cdot ml^{-1}$] a c_{pr} je koncentrace proteinů [$mg \cdot ml^{-1}$].

Data byla zpracována programem Microsoft Excel.

Stanovení aktivity lakasy

Pro měření aktivity lakasy (EC 1.10.3.2) byla jako substrát zvolena ABTS; míru oxidace substrátu lze sledovat prostřednictvím nárůstu absorbance při 420 nm ($\epsilon_{420} = 3,6 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) [105]. Reakce byla zahájena přidáním 180 μl PR_{lakasa} k 20 μl kompostového extraktu. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4.1.

Tab. 4.1 Složení reakční směsi pro stanovení aktivity lakasy

složka reakční směsi	objem v jamce [μl]
vzorek	20
120 mM acátový pufr (pH 5,0)	160
50 mM ABTS	20

Stanovení aktivity mangan-dependentní peroxidasy

Měření aktivity MnP (EC 1.11.1.13) využívá schopnosti tohoto enzymu katalyzovat oxidační vznik vazby mezi DMAB a 3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonom (MBTH) za přítomnosti peroxidu vodíku [106]. Vzniklý barevný produkt má absorpční maximum při 590 nm ($\epsilon_{590} = 32,9 \cdot M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Pro účely stanovení MnP byly připraveny tři reakční směsi (I, II, III), jejichž složení je uvedeno v Tab. 4.2. Potřebná činidla i substráty byly přidány k 50 μl kompostového extraktu ve formě PR. Celkový objem reakční směsi byl 250 μl .

Tab. 4.2 Složení reakčních směsí I, II a III pro stanovení aktivity MnP

složka reakční směsi	směs I	směs II	směs III
	objem v jamce [μl]		
vzorek	50	50	50
100 mM sukcinát-laktátový pufr (pH 4,5)	150	150	150
25 mM DMAB ve 100 mM fosfátovém pufru (pH 6,5)	20	20	20
1 mM MBTH	10	10	10
2 mM EDTA	10	–	10
2 mM MnSO_4	–	10	–
peroxid vodíku, 0,018 % (w/w)	–	10	10
deionizovaná voda	10	–	–

Enzymová aktivita reakční směsi II $a(\text{II})$ vypočítaná podle rovnice 4.1, str. 44 zahrnuje veškerou peroxidasovou aktivitu včetně MnP, neboť v této reakční směsi jsou přítomny manganaté ionty. Aktivita reakční směsi III $a(\text{III})$ zahrnuje pouze peroxidasovou aktivitu nezávislou na přítomnosti těchto iontů (MIP z mangan-independentní peroxidasová aktivita); roztok Mn^{2+} je zde nahrazen ekvivalentním množstvím EDTA. Aktivitu reakční směsi I $a(\text{I})$ lze označit jako zbytkovou oxidasovou aktivitu (OX), neboť v této směsi není přítomen peroxid vodíku. Výsledná aktivita MnP byla vypočítána dle vztahu 4.4. Zbytková mangan-independentní peroxidasová aktivita (MIP) byla vypočítána podle vztahu 4.5.

$$a(\text{MnP}) = a(\text{II}) - a(\text{III}) \quad (4.4)$$

$$a(\text{MIP}) = a(\text{III}) - a(\text{I}) \quad (4.5)$$

Stanovení aktivity ligninperoxidasy

Princip stanovení aktivity ligninperoxidasy spočívá ve sledování oxidace VA na VAD ($\epsilon_{310} = 9,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), která se projevuje nárůstem absorbance při 310 nm [107]. Reakce byla zahájena přidáním 170 μl PR_{LiP} ke 30 μl vzorku. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4.3.

Tab. 4.3 Složení reakční směsi pro stanovení aktivity LiP

složka reakční směsi	objem v jamce [μl]
vzorek	30
100 mM vínanový pufr (pH 3,0)	155
25 mM VA	5
54 mM H ₂ O ₂	10

Stanovení aktivity katechol-1,2-dioxygenasy

Aktivita C12O (EC 1.13.11.1) byla stanovena na základě oxidativního štěpení katecholu za vzniku *cis,cis*-mukonové kyseliny ($\epsilon_{260} = 16,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), což se projevuje nárůstem absorbance při 260 nm [108]. Reakce byla zahájena přidáním 245 μl PR_{C12O} ke vzorku. Finální objem reakční směsi, jejíž složení uvádí Tab. 4.4, činil 250 μl .

Tab. 4.4 Složení reakční směsi pro stanovení aktivity C12O

složka reakční směsi	objem v jamce [μl]
vzorek	5
50 mM fosfátový pufr (pH 7,5)	223
50 mM katechol	5
20 mM EDTA	17

Stanovení aktivity katechol-2,3-dioxygenasy

Stanovení aktivity C23O (EC 1.13.11.2) je založeno na sledování vzniku semialdehydu kyseliny 2-hydroxy-*cis,cis*-mukonové ($\epsilon_{375} = 3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) z katecholu jako nárůst absorbance při 375 nm [23]. Reakce byla zahájena přidáním 245 μl PR_{C12O} ke vzorku. Celkový objem reakční směsi byl 250 μl ; složení uvádí Tab. 4.5.

Tab. 4.5 Složení reakční směsi pro stanovení aktivity C23O

složka reakční směsi	objem v jamce [μl]
vzorek	5
50 mM fosfátový pufr (pH 7,5)	240
50 mM katechol	5

Stanovení aktivity tyrosinasy dopachromovou metodou

Jako substrát při měření aktivity tyrosinasy (EC 1.14.18.1) dopachromovou metodou byl použit L-DOPA, který je při enzymové reakci oxidován na dopachinon. Ten podléhá samovolné konverzi na dopachrom, což se projevuje nárůstem absorbance při 475 nm ($\epsilon_{475} = 3,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

K 15 μl vzorku bylo přidáno 210 μl 10mM roztoku L-DOPA ve fosfátovém pufru (50 mM, pH 6,5), ihned poté započalo měření absorbance [109].

Stanovení aktivity tyrosinasy v přítomnosti askorbátu

Toto stanovení aktivity tyrosinasy (EC 1.14.18.1) využívá její schopnosti katalyzovat oxidaci L-DOPA za vzniku dopachinonu, který se však v přítomnosti redukčního činidla (např. kyseliny askorbové) přeměňuje zpět na L-DOPA [110], [111]. Za těchto předpokladů lze aktivitu tyrosinasy stanovit spektrofotometricky měřením úbytku absorbance při 265 nm, což je způsobeno oxidací askorbátu ($\epsilon_{265} = 14,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) na dehydroaskorbát, která doprovází zpětnou přeměnu dopachinonu na L-DOPA [112].

Čerstvě připravený $\text{PR}_{\text{tyrosinasa}}$ byl až do ustálení absorbance (A_{265}) ponechán při laboratorní teplotě (10 min). Poté bylo 290 μl $\text{PR}_{\text{tyrosinasa}}$ přidáno k 10 μl vzorku a ihned bylo zahájeno měření absorbance. Přesné složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4.6. Všechny zásobní roztoky byly připraveny ve fosfátovém pufru (50 mM, pH 6,5).

Tab. 4.6 Složení reakční směsi pro stanovení aktivity tyrosinasy

složka reakční směsi	objem v jamce [μl]
vzorek	10
50 mM fosfátový pufr (pH 6,5)	260
5 mM L-DOPA	10
2,1 mM L-askorbát sodný	10
0,065 mM EDTA	10

Aktivita tyrosinasy a [$\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$] byla určena podle vzorce 4.6 ze změny absorbance ΔA_{vzorek} reakční směsi za čas Δt [min^{-1}] a průměrné hodnoty změny absorbance slepého vzorku za čas Δt (ΔA_{blank})

$$a = \frac{-(\Delta A_{\text{vzorek}}/\Delta t - \Delta A_{\text{blank}}/\Delta t)}{\epsilon_{265}} \cdot \frac{V_{\text{rs}}}{V_{\text{vz}}}, \quad (4.6)$$

kde ϵ_{265} je molární absorpční koeficient askorbátu [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], V_{rs} je celkový objem reakční směsi [μl] a V_{vz} objem vzorku [μl].

4.4.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradforda

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou podle Bradforda založenou na interakci barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s polypeptidovým řetězcem. Vlivem této interakce dochází k posunu absorpčního maxima barviva v komplexu s proteinem (465 nm) oproti volnému barvivu (595 nm) [113].

Kalibrační přímka byla sestrojena z dat získaných měřeními absorbance roztoku hovězího sérového albuminu v deionizované vodě při 595 nm v rozsahu koncentrací 0, 1, 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Ke 20 μl vzorku, nebo standardu v mikrotitrační destičce bylo přidáno 180 μl Bradfordova činidla (kap. 4.3, str. 38) a po 5 min inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 595 nm. Koncentrace proteinů byla vypočítána z rozdílu absorbancí současně měřeného vzorku a slepého vzorku dosazením do rovnice kalibrační přímky. Ve slepém vzorku byl roztok proteinu nahrazen extrakčním fosfátovým pufrem.

Data byla zpracována programem Microsoft Excel.

4.4.5 Stanovení fosfolipidových mastných kyselin

Extrakce lipidů

Odebrané vzorky kompostu ze všech reaktorů (PAU1–3 a SUB1–3) i vzorek půdy (použité pro kompostování) byly předem lyofilizovány a uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky kompostu byly před samotnou extrakcí opatrně rozmixovány (mixér Mira, ETA). Stanovení bylo provedeno ve třech paralelách.

Do vypálených ($400\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h) zkumavek bylo naváženo 0,2–0,5 g kompostu, resp. 1,5 g půdy a bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru pro PLFA (kap. 4.3, str. 38). Následně bylo do zkumavky přidáno extrakční činidlo (1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu). Po promíchání pomocí vortexu probíhala extrakce vzorku při laboratorní teplotě v uzavřené zkumavce ve tmě. Po 1 h byl roztok centrifugací ($1178\times\text{ g}$, 5 min; EBA 20, Hettich Zentrifugen) oddělen od pevného podílu. Supernatant byl skleněnou Pasteurovou pipetou odebrán do nové vypálené zkumavky a uchován ve tmě, peleta byla znovu extrahována. Extrakce vzorku směsí methanolu a chloroformu byla provedena celkem třikrát za stejných podmínek, supernatant ze všech tří cyklů byl sbírán do stejné zkumavky.

Získaný extrakt byl roztřepán na vortexu s 1,9 ml fosfátového pufru pro PLFA a 1,9 ml chloroformu a ponechán 1 h při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po oddělení fází následovala centrifugace ($1178\times\text{ g}$, 5 min). Spodní fáze s chloroformem obsahující rozpuštěné látky lipidové povahy byla Pasteurovou pipetou odebrána do nové vypálené skleněné vialy. Vodná fáze byla znovu extrahována 1,9 ml chloroformu a následný postup byl ještě jednou zopakován. Odebrané chloroformové fáze byly spojeny a volně odpařeny do sucha.

Fracionace lipidů

Vzorky byly po odpaření znovu rozpuštěny v 300 μl chloroformu. Lipidy přítomné ve vzorku byly frakcionovány na kolonce LiChrolut® Si (24–40 μm) (Merck). Před aplikací vzorku byl sorbent promyt 1,5 ml chloroformu. Eluce probíhala ve třech krocích: 2 ml chloroformu (neutrální lipidy), 6 ml acetonu (glykolipidy) a 2 ml methanolu (fosfolipidy), přičemž sbírána byla pouze poslední frakce obsahující fosfolipidy. Získaný přečištěný vzorek ve vypálené vialy byl pod proudem dusíku odpařen do sucha.

Mírná alkalická methanolýza

Vzorek byl rozpuštěn v 1 ml směsi toluenu a methanolu (1 : 1, v/v) a 1 min míchán na vortexu. Následně byl přidán 1 ml 0,2M hydroxidu draselného v bezvodém methanolu. Směs byla inkubována ve vodní lázni při 37 °C, čímž byly ve fosfolipidech vázané mastné kyseliny uvolněny a převedeny na methylestery. Po 15 min bylo ke vzorku přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml 1M kyseliny octové a 2 ml deionizované vody. Směs byla po 1 min třepání vortexem centrifugována (601 \times g, 5 min). Horní fáze byla Pasteurovou pipetou odebrána do nové vypálené vialy a zbytek směsi byl za stejných podmínek ještě dvakrát extrahován 1,6 ml hexanu a 0,4 ml chloroformu. Roztok vzniklý spojením odebraných chloroformových fází byl odpařen do sucha. Do vzorku, který byl znovu rozpuštěn v 950 μl hexanu, bylo přidáno 50 μl vnitřního standardu (C13:0 methyltridekanoát) o koncentraci 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Stanovení fosfolipidových mastných kyselin plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí

Analýza byla provedena na plynovém chromatografu 450-GC (Varian) s hmotnostním detektorem 240-MS (Varian). Analyty byly separovány na koloně DB-5MS (30 m \times 0,25 mm, tloušťka stacionární fáze 0,25 μm), na kterou byl autosamplerem CP-8400 (Varian) dávkován 1 μl vzorku (teplota injektoru 240 °C). Průtok nosného plynu, helia, byl 1,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Cyklus začal isothermálně (60 °C) se zavřeným děličem po dobu 1 min, následně byl dělič otevřen (split ratio 1 : 50) a cyklus pokračoval lineárním růstem teploty nejprve do 120 °C (25 °C/min) a potom až do 240 °C (2,5 °/min). Teplota 240 °C byla udržována po dobu 10 min. Ionizační technikou byla elektronová ionizace (70 eV), měřen byl celkový iontový proud v rozmezí 50–400 m/z. Methylestery mastných kyselin uvolněných z fosfolipidů byly identifikovány na základě retenčních časů porovnáním s příslušnými standardy. Kalibrační závislosti pro jednotlivé analyty byly sestaveny ze sedmi bodů v rozsahu koncentrací 0,1–10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Vyhodnocení

Skupiny mikroorganismů ve vzorcích byly kvantifikovány jako součet koncentrací daných charakteristických PLFA (PLFA_{skupina}) (Tab. 4.7) [114]. Množství PLFA bylo vztaženo na hmotnost lyofilizovaného vzorku naváženého pro extrakci lipidů.

Byl určován také poměr koncentrací PLFA charakteristických pro houby a bakterie (PLFA_{houby}/PLFA_{bakt}) a poměr koncentrací PLFA gram pozitivních bakterií ku PLFA gram negativních bakterií (PLFA_{G+}/PLFA_{G-}). K vyhodnocení dat byl použit program Microsoft Excel.

Tab. 4.7 Charakteristické PLFA sloužící pro kvantifikaci různých skupin mikroorganismů

skupina mikroorganismů (označení)	charakteristické PLFA
gram pozitivní bakterie (PLFA _{G+})	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0
gram negativní bakterie (PLFA _{G-})	16:1 ω 5, 16:1 ω 7, cy17:0, 18:1 ω 7, cy19:0
aktinobakterie (PLFA _{aktinobakt})	10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0
bakterie (PLFA _{bakt})	i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, i17:0, a17:0, 16:1 ω 5, 16:1 ω 7, cy17:0, 18:1 ω 7, cy19:0, 10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0, 15:0, 17:0
houby, eukaryota (PLFA _{houby})	18:2 ω 6,9
ostatní	18:1 ω 9, 16:0

4.4.6 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků

Vzorky kompostů z reaktorů PAU1–3 (kap. 4.4.1, str. 39) byly nejprve na vzduchu usušeny a následně rozmixovány v mixéru Mira (ETA). Z každého reaktoru, stejně jako z kontaminované půdy, byly metodou vysokotlaké extrakce rozpouštědlem extrahovány tři paralelní vzorky, v nichž byla následně změřena koncentrace PAU vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční detekcí.

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Do extrakční patry o objemu 11 ml byl vložen papírový filtr a cca 2,5 g mořského písku (PENTA). Na tuto vrstvu byly naváženy přesně asi 3 g rozmixovaného vzorku kompostu, nebo 5 g půdy (kap. 4.4.1, str. 39) a mrtvý objem patry byl doplněn mořským pískem, na který byl opět vložen papírový filtr. Vzorek byl od vrstev písku oddělen papírovými filtry.

Extrakce vzorků probíhala v automatickém extraktoru ASE 200 (Dionex) směsí hexanu a acetonu (3 : 1, v/v) při 150 °C a tlaku 10 MPa [92]. Po počátečním přehřátí extrakční patry (6 min) následovaly tři extrakční cykly (5 min), mezi nimiž byla patra naplněna vždy novým extrakčním činidlem.

Stanovení množství suché půdy ve vzorku

Všechny pevné vzorky byly po extrakci odděleny od mořského písku a spáleny (600 °C, 6 h). Vzniklý popel odpovídal obsahu anorganických látek v daném vzorku [2].

Za stejných podmínek byly spáleny tři zvážené vzorky čistého, usušeného a rozmixovaného kompostovacího substrátu, oddělené od vlhkého substrátu při založení kompostu (kap. 4.4.1, str. 39). Z hmotnosti nespáleného substrátu $m_1(\text{sub})$ [g] a hmotnosti substrátu po spálení $m_2(\text{sub})$ [g] byl podle vzorce 4.7 vypočítán podíl organické složky $w_{\text{org}}(\text{sub})$ [%] v samotném substrátu.

$$w_{\text{org}}(\text{sub}) = \frac{m_1(\text{sub}) - m_2(\text{sub})}{m_1(\text{sub})} \cdot 100 \quad (4.7)$$

Obsah půdy $m(\text{půda})$ [g] ve vzorku kompostu (složeného ze substrátu a půdy) byl určen podle vztahu 4.8 z rozdílu počáteční navážky vzorku m_1 [g] v extrakční patroně a hmotnosti vzorku po spálení m_2 [g]. Množství organických látek pocházejících z půdy bylo zanedbáno.

$$m(\text{půda}) = m_1 - \frac{100}{w_{\text{org}}(\text{sub})} \cdot (m_1 - m_2) \quad (4.8)$$

Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí

Získané extrakty byly odpařeny do sucha a rozpuštěny v 10 ml acetonitrilu. Rozpuštění bylo urychleno třepáním na vortexu a ponořením do ultrazvukové lázně (dvakrát 15 min). Poté byl odebrán aliquot o objemu 1,0 ml, se kterým se dále pracovalo.

Pevné nečistoty byly odstraněny centrifugací (9503× g, 15 min; Mikro 120, Hettich Zentrifugen). Supernatant byl odebrán a vhodně naředěn pro stanovení PAU na chromatografu Alliance 2695 (Waters) vybaveném UV detektorem PDA 2996 (Waters) a fluorescenčním detektorem FLD 2475 (Waters).

Analyty byly separovány na koloně LiChroCart (250 mm × 5 mm; Merck) s náplní LiChrospher® PAH (velikost částic 5 μm, velikost pórů 150 Å), proces trval celkem 55 minut. Pro separaci byla použita gradientová eluce (průtok 1 ml·min⁻¹, teplota kolony 25 °C) s mobilními fázemi A (100% acetonitril) a B (10% acetonitril v Mili-Q vodě). Program začal isokraticky 4 min (40 % A). Do 15. min následoval lineární růst poměru mobilních fází od 40 % do 100 % A. Tento poměr byl zachován do 35. min, během následujících 20 min došlo k ustálení výchozích podmínek (40 % A).

Vybraných 16 PAU ve vzorcích bylo identifikováno porovnáním retenčních časů a UV spekter s příslušnými standardy z komerčně připravené směsi PAU pro HPLC (Accu Standard®). Kvantifikace byla provedena na základě odezvy fluorescenčního detektoru. Excitační/emisní vlnové délky byly pro jednotlivé analyty následující: $\lambda = 250/390$ nm pro fenanthren (PHE), anthracen (ANT), indeno[1,2,3-*cd*]pyren (IPY); $\lambda = 280/340$ nm pro naftalen (NAP), 1-methylnaftalen (1-MET), 2-methylnaftalen

(2-MET), acenaftýlen (ACL), fluoren (FLO), fluoranthen (FLT), pyren (PYR), benzo[*a*]anthracen (BaA), chrysen (CHR); $\lambda = 305/430$ nm pro benzo[*b*]fluoranthen (BbF), benzo[*k*]fluoranthen (BkF), benzo[*a*]pyren (BaP), dibenzo[*a,h*]anthracen (DBA) benzo[*ghi*]perýlen (BghiP) [115]. Kalibrační přímky pro dané PAU byly sestrojeny ze sedmi bodů s použitím uvedené směsi standardů v rozsahu $0,05\text{--}5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. K vyhodnocení dat byl použit software Empower Pro (Waters) a Microsoft Excel.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace extrakce enzymů z kompostovaného materiálu

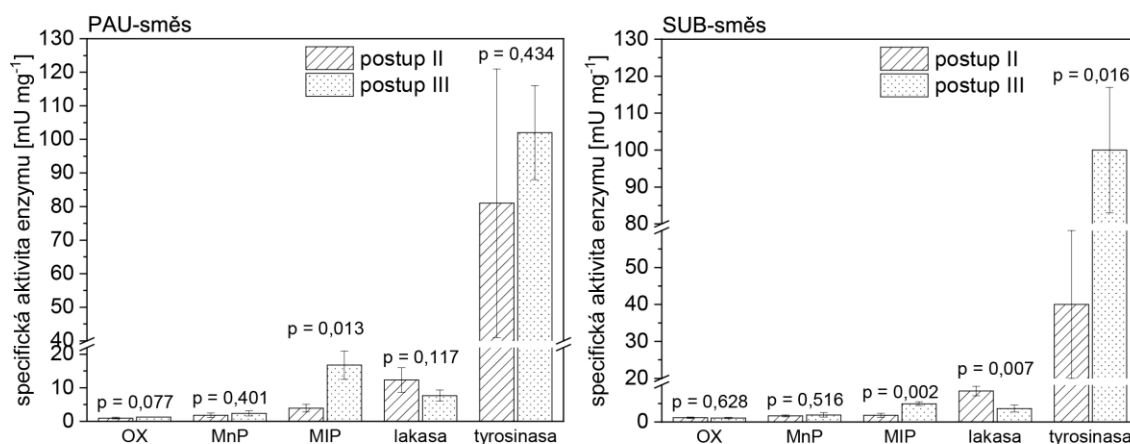
Na optimalizaci metod extrakce enzymů z kompostovaného materiálu byly odebírány vzorky z reaktorů založených pouze pro tento účel. Podmínky kompostování byly shodné s těmi popsány v kap 4.4.1, str. 39. Kromě dne odběru a odpovídající teploty zde proto další charakterizace těchto vzorků není uvedena. Čerstvý materiál odebraný z dvojice kompostovacích reaktorů s kontaminovanou půdou, resp. samotným zeleným substrátem byl spojen, promíchán a označen jako PAU-směs či SUB-směs. PAU-směs a SUB-směs pak sloužily jako výchozí materiál pro optimalizaci extrakčních postupů.

Pro přípravu enzymových preparátů ze vzorků kompostu bylo na základě odborné literatury vybráno několik metod. Ve většině případů bylo i tak nutné původní metody přizpůsobit výchozímu materiálu, zejména co se týče způsobu homogenizace a odstranění pevného podílu vzorku od extraktu. Výsledkem byly extrakční postupy I–IV uvedené v kap. 4.4.2, str. 42.

Postup I zahrnoval inkubaci s extrakčním činidlem na orbitální třepače a následné oddělení pevného podílu od extraktu centrifugací. V takto připravených extraktech ze vzorků PAU-směs i SUB-směs (den 54, laboratorní teplota) nebyla naměřena žádná enzymová aktivita ligninolytických enzymů ani tyrosinasy bez ohledu na použité extrakční činidlo (50 mM fosfátový pufr, pH 7,0; 120 mM acetátový pufr, pH 5,0; deionizovaná voda, pH 5,5). Postup byl zopakován (PAU-směs a SUB-směs, den 64, laboratorní teplota) se stejným výsledkem.

V extraktech připravených postupem II (PAU-směs a SUB-směs, den 42, 25 °C) nebo III (PAU-směs a SUB-směs, den 112, laboratorní teplota) byla naměřena aktivita lakasy, MnP a tyrosinasy (stanovení v přítomnosti askorbátu). Následně bylo provedeno porovnání obou postupů (PAU-směs a SUB-směs, den 127, laboratorní teplota).

Jak je patrné z Obr. 5.1, str. 54, v obou typech extraktů byla zaznamenána téměř shodná specifická aktivita MnP i OX (měřená v rámci stanovení aktivity MnP). V extraktech připravených postupem III ze vzorků SUB-směs byla naměřena signifikantně vyšší specifická MIP i specifická aktivita tyrosinasy (nepárový dvouvýběrový t-test, $\alpha = 0,05$). Ve vzorcích extrahovaných postupem II byla naproti tomu oproti postupu III signifikantně vyšší pouze specifická aktivita lakasy. Rozdíly ve specifických aktivitách v různých extraktech ze vzorků PAU-směs byly menší než u SUB-směs. Signifikantně se lišila pouze specifická MIP, která byla vyšší v extraktu z postupu III.



Obr. 5.1 Specifická aktivita lakasy, mangan-dependentní peroxidasy (MnP) a tyrosinasy stanovená v extraktech ze vzorků PAU-směs a SUB-směs (den 127, laboratorní teplota) při porovnání postupů extrakce II a III. V rámci stanovení MnP byla stanovena také celková mangan-independentní peroxidasová aktivita (MIP) a zbytková oxidasová aktivita (OX). V grafu jsou vynešeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Data byla statisticky vyhodnocena pomocí nepárového dvouvýběrového t-testu ($\alpha = 0,05$).

Ačkoliv aktivita C23O byla detekována v extraktech připravených postupem III i IV (PAU-směs a SUB-směs, den 25, 33 °C), průměrné hodnoty specifické aktivity C23O v extraktech připravených postupem IV byly v porovnání s extrakty z postupu III většinou nižší. U postupu IV byl navíc větší rozptyl hodnot specifické aktivity C23O z jednotlivých paralelních stanovení.

Aktivita C12O ani LiP nebyla detekována v žádném extraktu bez ohledu na použitý postup jeho přípravy.

5.2 Změny enzymových aktivit během kompostování

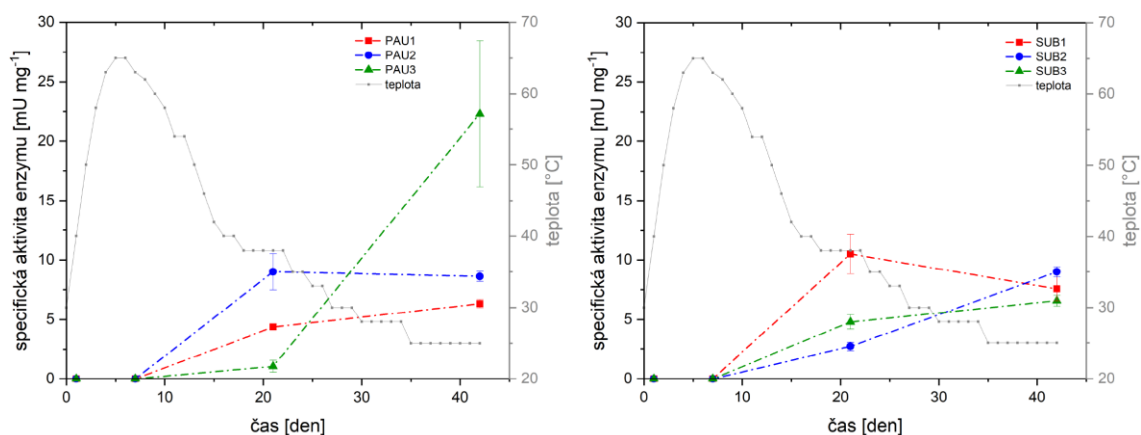
Specifická enzymová aktivita vybraných ligninolytických enzymů (lakasa, MnP, LiP), C12O, C23O a tyrosinasy byla stanovována ve všech kompostovacích reaktorech ve dnech 1, 7, 21 a 42. Uvedené dny odběrů byly vybrány tak, aby reprezentovaly jednotlivé teplotní fáze během experimentu (mesofilní, termofilní, chladnutí, zrání). Pro spektrofotometrická stanovení enzymové aktivity byly použity čerstvé extrakty připravené postupem III.

5.2.1 Ligninolytické enzymy

V průběhu experimentu byla v různých fázích kompostování detekována aktivita lakasy a MnP (viz dále). Aktivita LiP však nebyla zaznamenána v žádné fázi kompostování.

Lakasa

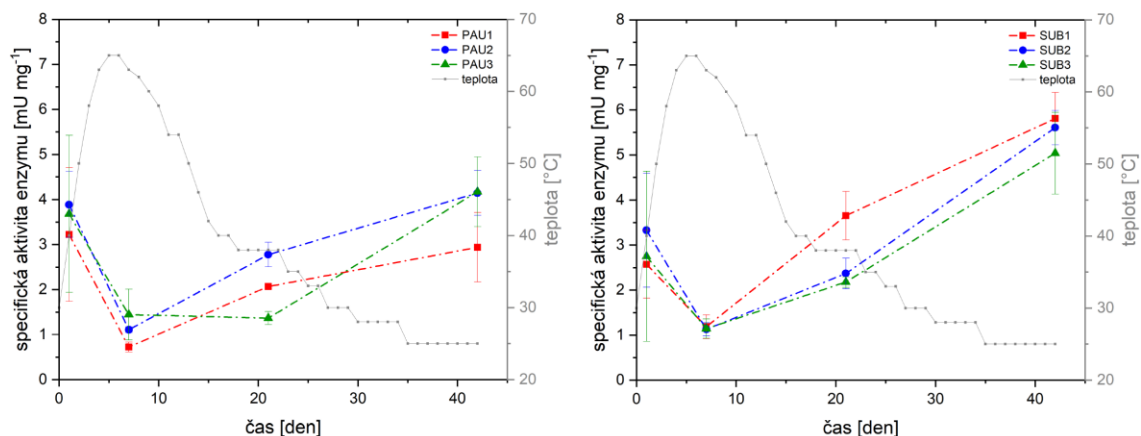
Aktivita lakasy byla detekována pouze ve dnech 21 (38 °C) a 42 (25 °C) (Obr. 5.2). V reaktorech PAU1, PAU3, SUB2 a SUB3 měla specifická aktivita vzrůstající tendenci.



Obr. 5.2 Specifická aktivita lakasy v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebráných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky (n = 3). Šedě je znázorněn průběh teplot.

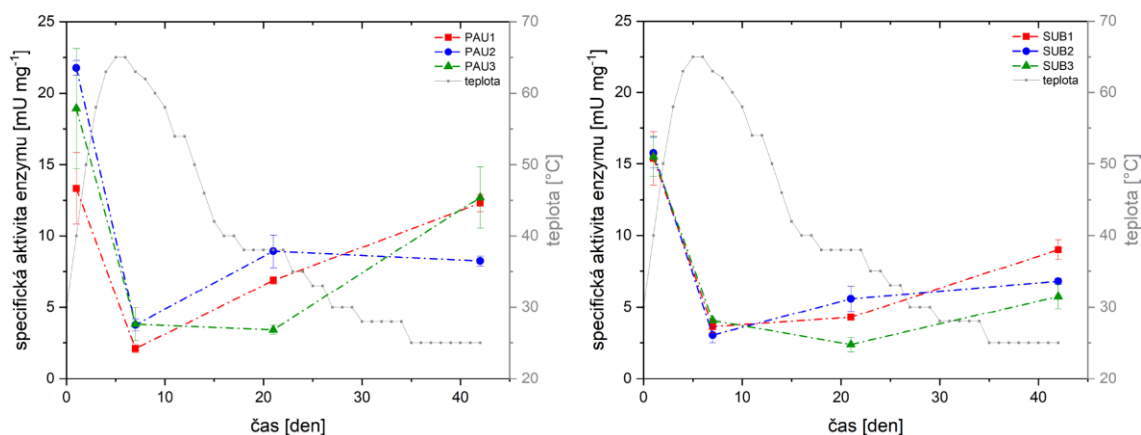
Mangan-dependentní peroxidasa

Aktivita MnP byla detekována při všech odběrech. Ve všech reaktorech byl mezi prvním (den 1, 40 °C) a druhým (den 7, 63 °C) odběrem zaznamenán pokles aktivity MnP, 7. den byla aktivita z celého experimentu nejnižší (Obr. 5.3, str. 56). Následně 21. (38 °C) i 42. den (25 °C) vždy oproti předchozímu odběru vzrostla. Výjimkou byl pouze reaktor PAU3, v němž sice aktivita MnP mezi 1. a 7. dnem klesla, ale 21. den ($1,45 \pm 0,57 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$) byla podle získaných výsledků podobná jako 7. den ($1,37 \pm 0,15 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$). V reaktorech PAU1–3 byla hodnota specifické aktivity 42. den srovnatelná s aktivitou na počátku kompostování (v rámci daného reaktoru), zatímco v reaktorech SUB1–3 byla specifická aktivita 42. den nejvyšší.



Obr. 5.3 Specifická aktivita mangan-dependentní peroxidasy (MnP) v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Šedě je znázorněn průběh teplot.

Součástí stanovení aktivity MnP bylo také stanovení MIP, tzn. zbytkové peroxidasové aktivity měřené v nepřítomnosti manganatých iontů. Jak je vidět z grafu na Obr. 5.4, ve všech reaktorech byl pozorován shodný trend ve změnách specifické MIP mezi 1. (40 °C) a 7. (63 °C) dnem. Nejvyšší hodnota MIP byla zaznamenána při prvním odběru (den 1). Při druhém odběru (den 7), který reprezentuje termofilní fázi kompostování, byl zaznamenán výrazný pokles této zbytkové aktivity. S výjimkou reaktorů PAU3 a SUB3 byl 21. den oproti 7. dni pozorován mírný nárůst specifické MIP, který pokračoval až do dne 42.

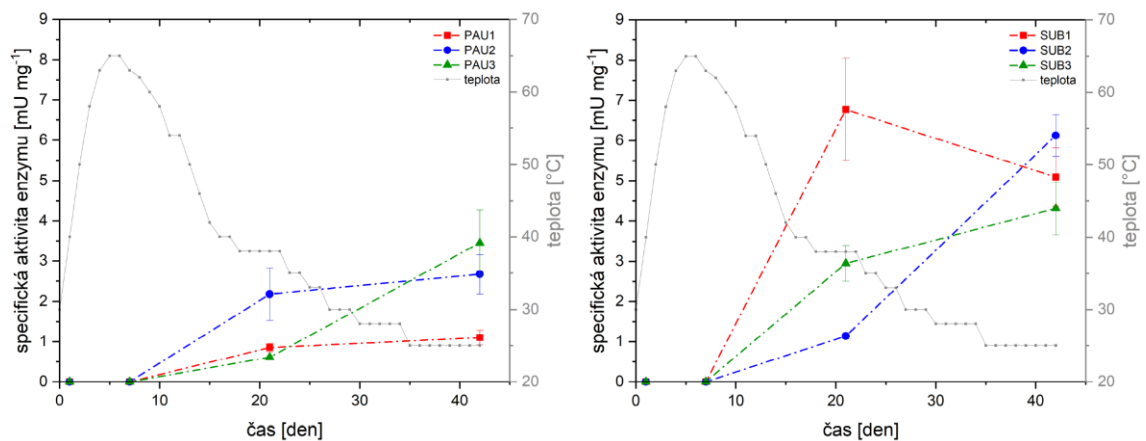


Obr. 5.4 Specifická mangan-independentní peroxidasová aktivita (MIP) detekovaná při stanovení aktivity mangan-dependentní peroxidasy v nepřítomnosti Mn^{2+} . Aktivita byla měřena v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Šedě je znázorněn průběh teplot.

V rámci měření aktivity MnP v extraktech kompostu byla stanovována rovněž OX, tzn. enzymová aktivita měřená za stejných podmínek jako aktivita MIP, ale v nepřítomnosti peroxidu vodíku. Tato aktivita byla detekována pouze při třetím (den 21, 38 °C)

a čtvrtém (den 42, 25 °C) odběru (Obr. 5.5). Kromě reaktoru SUB1, kde ale byla specifická aktivita OX 21. den stanovena s vyšší směrodatnou odchylkou, byly výsledné hodnoty v určitém reaktoru 42. den srovnatelné nebo vyšší než 21. den.

V rámci každého reaktoru byla vyhodnocena korelace (Pearsonův korelační koeficient ρ) mezi hodnotami specifické lakasové aktivity a specifické OX v průběhu experimentu. Pro PAU1–3 vždy platilo, že $\rho > 0,97$; $p < 9,1 \cdot 10^{-8}$ a pro SUB1–3 vždy platilo, že $\rho > 0,99$; $p < 4,3 \cdot 10^{-10}$.

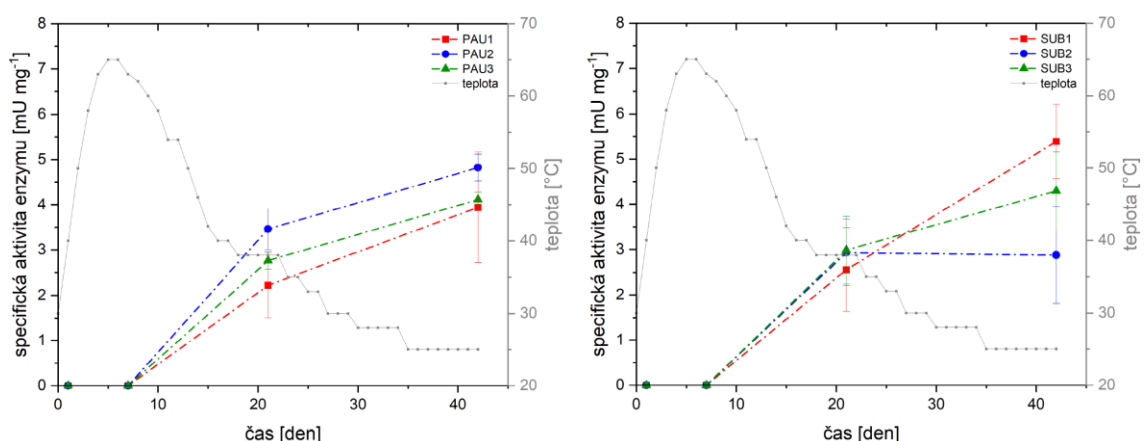


Obr. 5.5 Specifická oxidasová aktivita (OX) detekovaná při stanovení mangan-dependentní peroxidasy v nepřítomnosti peroxidu vodíku. Aktivita byla měřena v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Šedě je znázorněn průběh teplot.

5.2.2 Katechol-1,2-dioxygenasa a katechol-2,3-dioxygenasa

Aktivita C12O ve vzorcích kompostu nebyla v rámci experimentu detekována.

Oproti tomu aktivita C23O byla detekována 21. den (38 °C) experimentu a následně převážně stoupala až do 42. dne (25 °C) (Obr. 5.6).

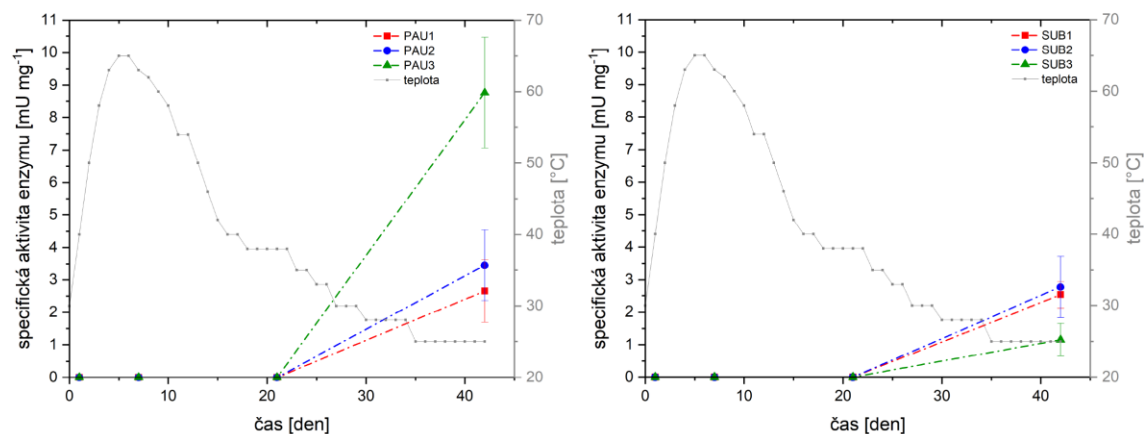


Obr. 5.6 Specifická aktivita katechol-2,3-dioxygenasy (C23O) v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Šedě je znázorněn průběh teplot.

5.2.3 Tyrosinasa

Stanovení aktivity tyrosinasy dopachromovou metodou

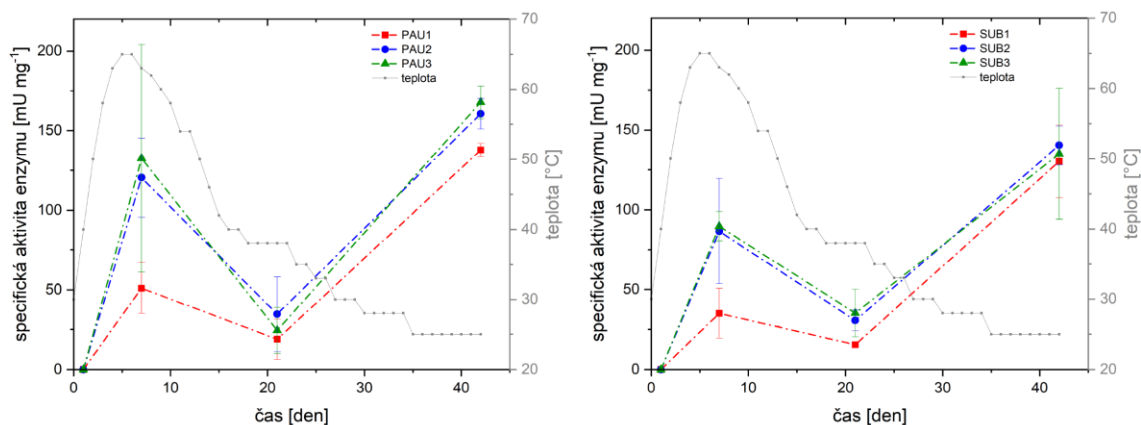
Dopachromovou metodou byla aktivita tyrosinasy detekována pouze 42. den (25 °C) kompostování. Specifická aktivita v reaktorech PAU1, PAU2 a SUB1, SUB2 se pohybovala přibližně v rozmezí 2,53–3,45 mU · mg⁻¹. V PAU3 byla naměřena nejvyšší hodnota tyrosinasové aktivity (8,77 ± 1,70 mU · mg⁻¹), v SUB3 naopak nejnižší (1,15 ± 0,50 mU · mg⁻¹) (Obr. 5.7).



Obr. 5.7 Specifická aktivita tyrosinasy měřená dopachromovou metodou v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky (n = 3). Šedě je znázorněn průběh teplot.

Stanovení aktivity tyrosinasy v přítomnosti askorbátu

Změny aktivity tyrosinasy měřené v přítomnosti askorbátu jsou znázorněny v grafu na Obr. 5.8, str. 59. Při prvním odběru (den 1, 40 °C) nebyla aktivita detekována v žádném extraktu. Ve dnech 7 (63 °C) a 42 (25 °C) byla specifická aktivita tyrosinasy stanovena touto metodou řádově vyšší než specifická enzymová aktivita ostatních enzymů. Nejnižší aktivita tyrosinasy byla zaznamenána 21. den (PAU1–3: 19–35 mU · mg⁻¹; SUB1–3: 15–35 mU · mg⁻¹).

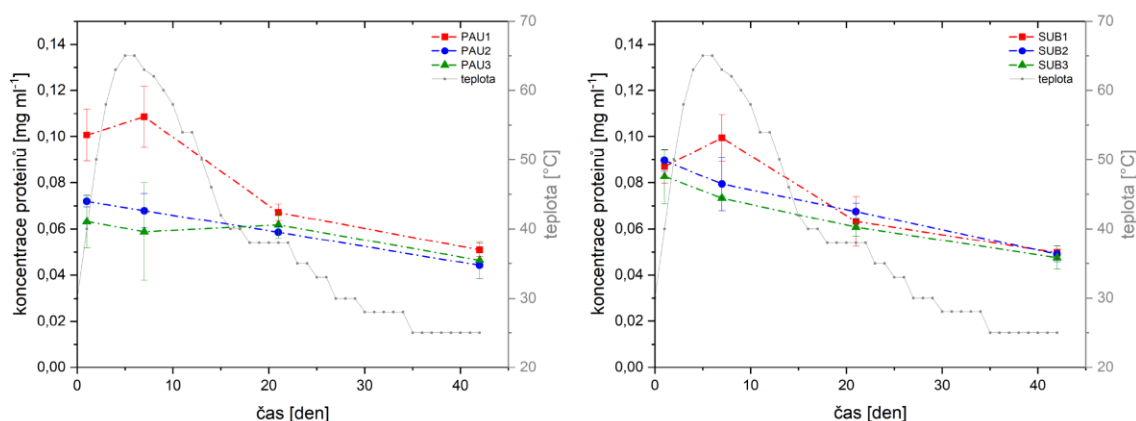


Obr. 5.8 Specifická aktivita tyrosinasy měřená v přítomnosti askorbátu v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Šedě je znázorněn průběh teplot.

5.3 Koncentrace proteinů ve vzorcích kompostu

Koncentrace proteinů v extraktech ze vzorků kompostu byla stanovena Bradfordovou metodou.

Ve většině případů byla koncentrace proteinů ve vzorcích z reaktorů při prvních dvou odběrech (den 1, 7) vyšší než při následujících dvou (den 21, 42) (Obr. 5.9). Nejnižší koncentrace proteinů v extraktech byla zaznamenána 42. den.



Obr. 5.9 Koncentrace proteinů v extraktech připravených postupem III ze vzorků kompostu odebíraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Šedě je znázorněn průběh teplot.

5.4 Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin

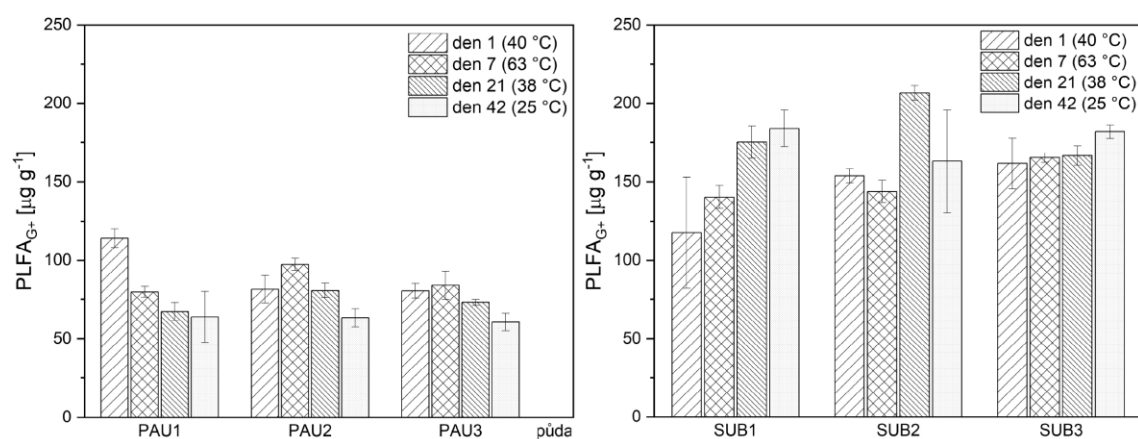
Mikrobiální biomasa přítomná ve vzorcích kompostu byla charakterizována pomocí analýzy PLFA, což jsou mastné kyseliny hydrolyticky uvolněné z fosfoacylglycerolů (fosfo-

lipidů) přítomných v membránách mikroorganismů. Seznam stanovovaných charakteristických PLFA je uveden v 4.4.5, str. 48. Množství PLFA bylo vztaženo na hmotnost vzorku.

Ze získaných dat byla určena koncentrace $PLFA_{G+}$, $PLFA_{G-}$, $PLFA_{aktinobakt.}$ a $PLFA_{houby}$ jako součet koncentrací příslušných charakteristických PLFA. Dále byl vypočítán poměr koncentrací $PLFA_{G+}/PLFA_{G-}$ a $PLFA_{houby}/PLFA_{bakt.}$ Limit kvantifikace byl $0,02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ pro každý detekovaný methylester mastné kyseliny.

Množství biomasy bakterií a hub bylo v půdě oproti kompostovanému substrátu (SUB1–3) i kompostům se substrátem proloženým kontaminovanou půdou (PAU1–3) zanedbatelné (Obr. 5.10–Obr. 5.14).

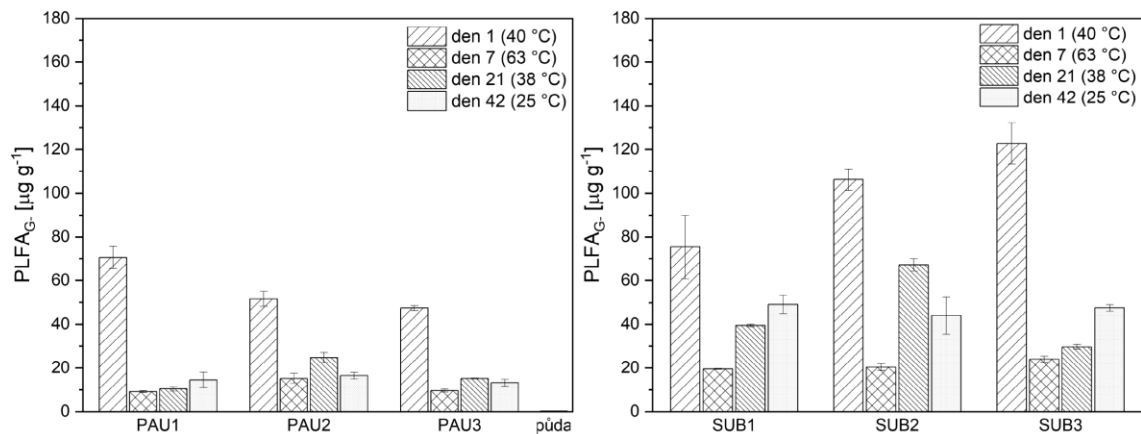
Koncentrace $PLFA_{G+}$ v závislosti na fázi kompostování se u jednotlivých reaktorů měnily různě. Celkově nižší hodnoty byly zaznamenány v reaktorech PAU1–3 (Obr. 5.10). V půdě byla koncentrace $PLFA_{G+}$ $0,17 \pm 0,02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.



Obr. 5.10 Biomasa grampozitivních bakterií ve vzorcích kompostu odebraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a v půdě určená jako součet koncentrací charakteristických fosfolipidových mastných kyselin ($PLFA_{G+}$). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky koncentrací PLFA stanovených plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí ($n = 3$).

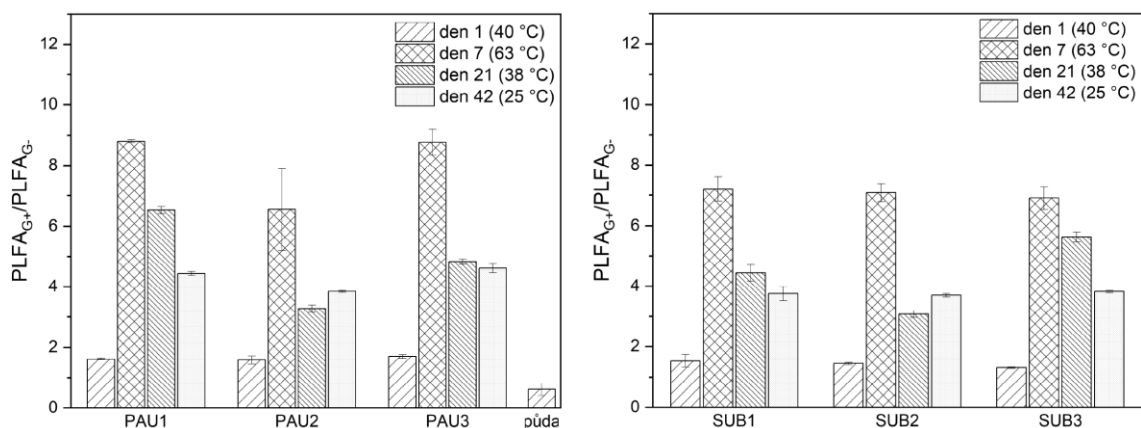
Nejvyšší koncentrace $PLFA_{G-}$ byly zaznamenány ve vzorcích z prvního odběru (den 1, 40 °C) (Obr. 5.11, str. 61). Následně hodnoty 7. den (63 °C) výrazně poklesly a 21. den (38 °C) v některých reaktorech opět vzrostly (nárůst byl patrný hlavně v SUB1 a SUB2, méně také v SUB3 a PAU2, PAU3). Koncentrace $PLFA_{G-}$ 42. den v rektorech PAU1–3 byla přibližně stejná jako 7. den. V reaktorech SUB1–3 byla koncentrace $PLFA_{G-}$ 42. den vyšší než 7. den a mimo SUB2 také vyšší než 21. den.

Stejně jako $PLFA_{G+}$ i hodnoty koncentrace $PLFA_{G-}$ byly celkově vyšší v reaktorech SUB1–3 v porovnání s PAU1–3. V půdě byla koncentrace $PLFA_{G-}$ $0,30 \pm 0,13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.



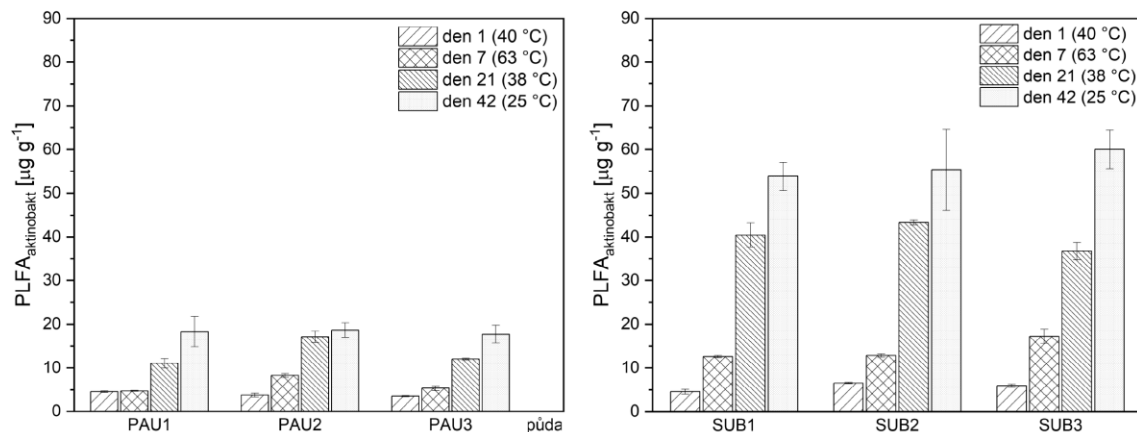
Obr. 5.11 Biomasa gramnegativních bakterií ve vzorcích kompostu odebraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a v půdě určená jako součet koncentrací charakteristických fosfolipidových mastných kyselin (PLFA_{G-}). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky koncentrací PLFA stanovených plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (n = 3).

Výsledný poměr množství PLFA_{G+}/PLFA_{G-} byl nejvyšší při druhém odběru (den 7, 63 °C) a naopak nejnižší při prvním odběru (den 1, 40 °C) (Obr. 5.12). V reaktorech PAU2, PAU3 a SUB1, SUB2 byly rozdíly v relativním zastoupení obou skupin bakterií 21. (38 °C) a 42. den (25 °C) malé, zatímco v reaktorech PAU1 a SUB3 byla hodnota poměru vyšší 21. den.



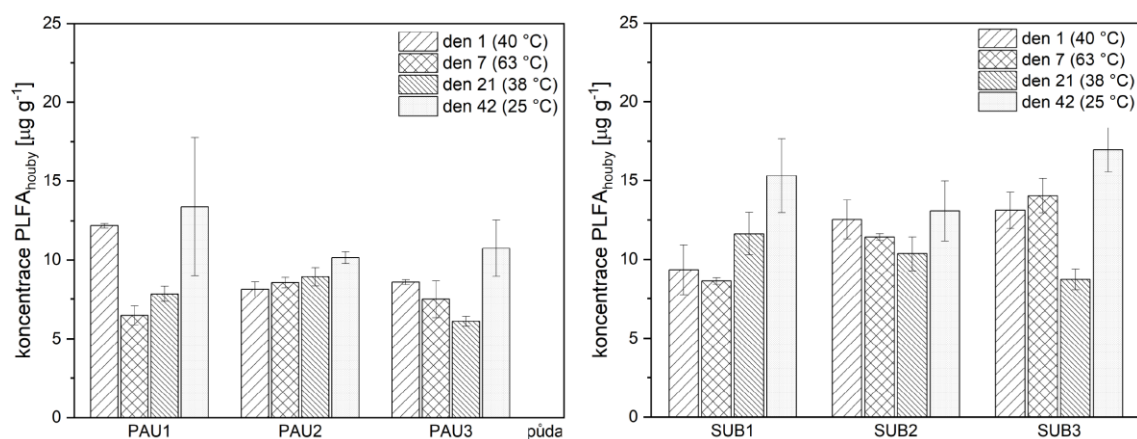
Obr. 5.12 Poměr sum koncentrací fosfolipidových mastných kyselin charakteristických pro grampozitivní a gramnegativní bakterie (PLFA_{G+}/PLFA_{G-}) ve vzorcích kompostu odebraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a v půdě. V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky (n = 3).

Koncentrace PLFA_{aktinobakt} během celého experimentu postupně vzrůstala. Nejvyšší byla koncentrace 42. den (25 °C), kdy bylo detekováno 17,75–18,69 µg · g⁻¹ v PAU1–3 a 53,83–60,00 µg · g⁻¹ v SUB1–3 (Obr. 5.13, str. 62). Výsledné koncentrace PLFA_{aktinobakt} ve vzorcích z reaktorů PAU1–3 byly nižší ve srovnání se SUB1–3, a to zejména 21. (38 °C) a 42. den. V reaktorech SUB1–3 byl totiž zaznamenán mnohem výraznější nárůst koncentrace PLFA_{aktinobakt} od 7. (63 °C) k 21. dni kompostování než v reaktorech PAU1–3. V půdě byla koncentrace PLFA_{aktinobakt} pod detekčním limitem.



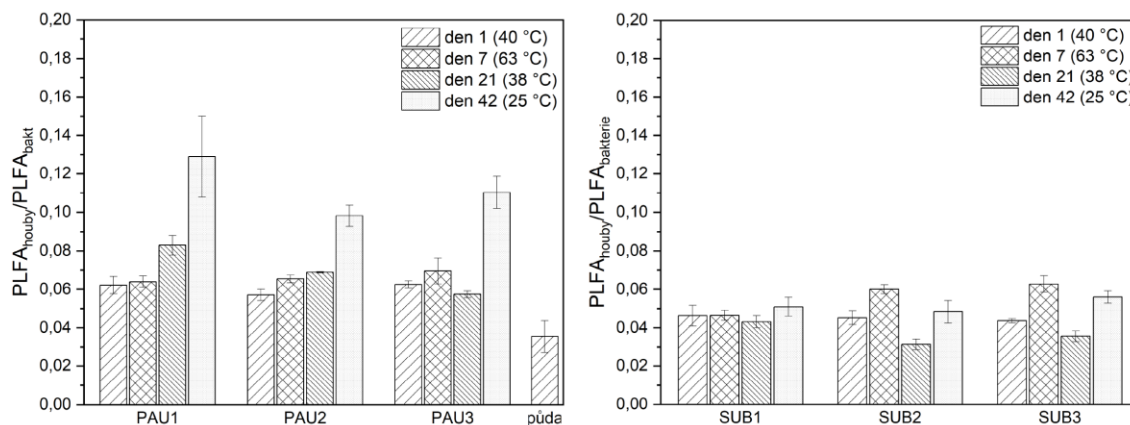
Obr. 5.13 Biomasa aktinobakterií ve vzorcích kompostu odebraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a v půdě určená jako součet koncentrací charakteristických fosfolipidových mastných kyselin (PLFA_{aktinobakt}). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky koncentrací PLFA stanovených plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (n = 3).

Naměřená koncentrace PLFA_{houby} (Obr. 5.14) v reaktorech PAU1–3 se pohybovala v rozmezí 6,11–13,37 μg · g⁻¹ a v reaktorech SUB1–3 v rozmezí 8,62–16,96 μg · g⁻¹. V půdě byla koncentrace PLFA_{houby} 0,03 ± 0,01 μg · g⁻¹.



Obr. 5.14 Biomasa hub ve vzorcích kompostu odebraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a v půdě určená jako koncentrace charakteristické fosfolipidové mastné kyseliny 18:2ω6,9 (PLFA_{houby}). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky koncentrací PLFA stanovených plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (n = 3).

Poměr koncentrací PLFA_{houby}/PLFA_{bakt} v reaktorech PAU1–3 dosahoval nejvyšších hodnot (0,1 a více) při čtvrtém odběru (den 42, 25 °C) (Obr. 5.15, str. 63), při ostatních odběrech se pohyboval kolem hodnoty 0,06. V reaktoru SUB1 byly hodnoty po celou dobu experimentu téměř konstantní (kolem 0,05), zatímco v reaktorech SUB2 a SUB3 dosahoval poměr koncentrací PLFA_{houby}/PLFA_{bakt} maximální hodnoty (kolem 0,06) 7. den (63 °C), a minimální hodnoty (zhruba 0,03) 21. den (38 °C).



Obr. 5.15 Poměr sum koncentrací fosfolipidových mastných kyselin charakteristických pro houby a bakterie ($PLFA_{\text{houby}}/PLFA_{\text{bakterie}}$) ve vzorcích kompostu odebraných v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a v půdě. V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$).

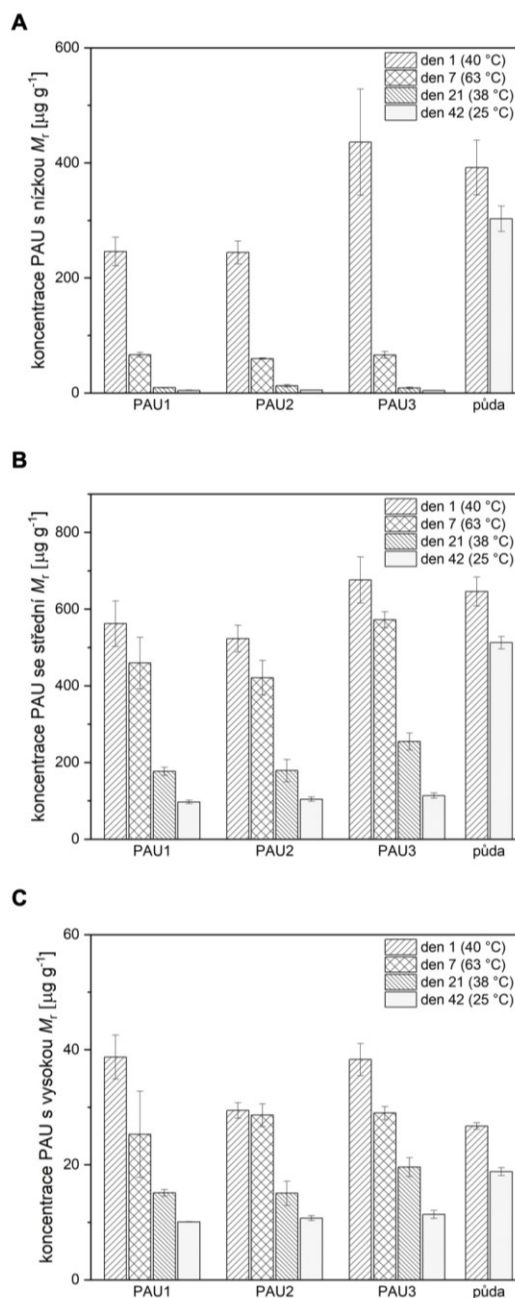
5.5 Koncentrace polycyklických aromatických uhlovodíků

Z usušených vzorků kompostu z reaktorů PAU1–3 (dny 1, 7, 21, 42) a kontaminované půdy byly metodou vysokotlaké extrakce rozpouštědlem extrahovány PAU. Ve vzniklých extraktech bylo metodou HPLC s fluorescenční detekcí stanoveno množství 17 vybraných zástupců PAU (kap. 4.4.6, str. 50), které byly na základě počtu aromatických jader rozděleny do tří skupin: PAU s nízkou (NAP, 1-MET, 2-MET, ACL, FLO, PHE, ANT; 2–3 aromatické kruhy), střední (FLT, PYR, CHR, BaA; 4 aromatické kruhy) a vysokou (BbF, BkF, BaP, IPY, BghiP; 5–6 aromatických kruhů) M_r . V extraktech nebyl detekován DBA. Aby bylo možné mezi sebou výsledky porovnat, množství PAU bylo vztaženo na obsah suché půdy v příslušném vzorku, resp. na hmotnost vzorku po spálení v případě analýzy půdy.

Bylo zjištěno, že v průběhu kompostování se celková koncentrace stanovovaných PAU (tzn. součet koncentrací všech analytů) ve všech reaktorech postupně snižovala (Obr. 5.16 A–C, str. 64). Největší pokles byl zaznamenán v prvních 21 dnech experimentu.

V reaktoru PAU1 byla koncentrace PAU na počátku (den 1) $847 \pm 64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 42. den $112 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, což odpovídalo 13 % počáteční koncentrace. V reaktoru PAU2 se celkový obsah snížil ze $797 \pm 56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (den 1) na $120 \pm 6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (den 42), reziduální koncentrace tedy byla 15 %. V reaktoru PAU3 byla naměřena počáteční koncentrace $1150 \pm 152 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, která klesla na $129 \pm 8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (11 %). Pro kontrolu byl stanoven rovněž úbytek PAU v samotné kontaminované půdě, která byla ponechána po celou dobu experimentu v kompostéru společně s reaktory. Před začátkem kompostování byla naměřena koncentrace PAU $1065 \pm 86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a po 42 dnech v kompostéru $834 \pm 39 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, což odpovídalo reziduální koncentraci 78 %.

V grafech na Obr. 5.16 A–C, je podrobněji uvedeno zastoupení PAU s nízkou, střední a vysokou M_r v jednotlivých fázích experimentu. V kompostované půdě byla nejvyšší suma koncentrace PAU se střední M_r (A) a nejnižší koncentrace PAU s vysokou M_r (C). Ve všech reaktorech byla 42. den pozorována nejmenší relativní reziduální koncentrace PAU s nízkou M_r (1–2 % počátečního množství) naproti tomu nejvyšší u PAU s vysokou M_r (26–36 % počátečního množství).



Obr. 5.16 Koncentrace PAU s nízkou M_r (část A; NAP, 1-MET, 2-MET, ACL, FLO, PHE, ANT), střední M_r (část B; FLT, PYR, CHR, BaA), resp. vysokou M_r (část C; BbF, BkF, BaP, IPY, BghiP) ve vzorcích kompostu odebraných z reaktorů PAU1, PAU2, PAU3 v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) a ve vzorku půdy (den 1 a 42). V grafu jsou vyneseny průměry a směrodatné odchylky koncentrací PAU měřených metodou HPLC s fluorescenční detekcí (3 paralely).

6 Diskuse

6.1 Optimalizace extrakce enzymů z kompostovaného materiálu

Cílem této části práce bylo optimalizovat metodu extrakce vybraných enzymů z kompostové matrice. Nutnost změn extrakčního postupu oproti metodám popsaným v literatuře vyplývala z povahy vybraných enzymů, ale také z heterogenity extrahovaného materiálu a odlišné matrice.

Kromě kousků slámy obsahoval materiál i jemné částice, které by v případě, že by se je nepodařilo odstranit, pravděpodobně ovlivňovaly spektrofotometrické stanovení. Jejich odstranění některými postupy však bylo časově natolik náročné (nebo by vyžadovalo zařazení účinnějšího filtru a podtlaku), že by mohlo vést k denuraci enzymů.

Většina prací popisujících stanovení enzymové aktivity v kompostu nebo strukturně podobném materiálu (vyplozený houbový substrát, půda aj.) se navíc týká extracelulárních enzymů (především hydrolytických a ligninolytických) [102], [94], [116]. Naším cílem však bylo stanovit nejen enzymovou aktivitu extracelulárních ligninolytických enzymů, ale také C12O a C23O, které patří mezi intracelulární enzymy, a tyrosinasy, jež může být některými mikroorganismy sice sekretována i extracelulárně, ve většině případů se ale jedná o intracelulární enzym [74], [73].

Jako extrakční činidlo byl zvolen fosfátový pufr (50 mM, pH 7). Uvedený pufr má pH blízké hodnotě, při níž se stanovuje enzymová aktivita C12O, C23O i tyrosinasy a zároveň je často používán při extrakci hydrolytických a ligninolytických enzymů z různých typů půdy [117].

Postup I byl sestaven podle Zeng a kol. [101], kteří extrahovali extracelulární enzymy z kompostovaných rostlinných odpadů. Jednalo se o nejjednodušší vyzkoušenou metodu (kap. 4.4.2, str. 42), která zahrnovala pouze inkubaci s extrakčním činidlem na orbitální třepačce a následné oddělení pevného podílu od roztoku. Na rozdíl od postupů II–IV neobsahovala žádné desintegrační kroky.

U tohoto postupu byla vyzkoušena různá extrakční činidla (50 mM fosfátový pufr, pH 7,0; 120 mM acetátový pufr, pH 5,0; deionizovaná voda, pH 5,5). Podmínky extrakce byly upraveny na základě výsledků Singh a kol. [102], kteří se zabývali optimalizací extrakce lakasy a dalších extracelulárních enzymů z vyplozeného houbového substrátu. Vzhledem k tomu, že v extraktech připravených postupem I se ani v jednom případě nepodařilo detekovat zvolené enzymové aktivity, nebyl tento postup dále používán. Neúčinnost tohoto způsobu extrakce (oproti literatuře) mohla být částečně způsobena také odlišným typem matrice vzorku, která může mít vliv na výtěžnost extrakce, ale také na celkové množství enzymů produkovaných mikroorganismy.

Postup II byl založen na metodách popsaných v člancích Singh a kol. [102] (extrakce lakasy z vyplozeného houbového substrátu) a Štursově a Baldriana [118] (extrakce MnP a lakasy z půdy). Na rozdíl od postupu I zahrnoval postup II homogenizaci výchozího materiálu homogenizátorem Ultra-Turrax®, při níž by mohlo alespoň částečně docházet k desintegraci buněk. Jedna z nevýhod postupu II spočívala v časové náročnosti homogenizace (cca 25 min/6 vzorků) a filtrace (cca 1–1,5 h/6 vzorků) oproti postupu III (viz dále). V extraktech připravených postupem II byla naměřena enzymová aktivita lakasy, MnP a tyrosinasy (stanovením v přítomnosti askorbátu).

Postup III byl sestaven dle Gaudinové a kol. [103], kteří popsali extrakci intracelulárních enzymů z rostlinných pletiv. Do postupu III byla zařazena homogenizace materiálu skleněnými kuličkami v prostředí kapalného dusíku, přičemž by opět mělo docházet alespoň k částečné desintegraci buněk. Ve srovnání s postupem II byl tento způsob homogenizace rychlejší (cca 15 min/6 vzorků) a pevný podíl bylo možné odstranit pouze centrifugací, aniž by bylo třeba suspenzi filtrovat. V extraktech připravených postupem III byla naměřena enzymová aktivita lakasy, MnP, tyrosinasy (stanovení s askorbátem) a C23O.

Postup IV zahrnoval kromě homogenizace výchozího materiálu v tekutém dusíku také sonikaci podle Silva a kol. [104], neboť jsme předpokládali, že při důkladnější desintegraci buněk by spíše bylo možné detekovat, resp. stanovit vyšší aktivitu C12O, C23O a tyrosinasy. Tento předpoklad se však nepotvrdil, neboť aktivita C12O nebyla detekována ani v preparátech připravených tímto způsobem a výsledky stanovení specifické aktivity C23O a tyrosinasy nepřinesly oproti výsledkům stanovení v extraktech III výrazné zlepšení. Postup IV proto nebyl dále používán.

Pro experimenty v druhé části práce, zaměřené na sledování změn vybraných enzymových aktivit během kompostování, byl vybrán postup III. Jednalo se o nejvhodnější postup, neboť v extraktech připravených tímto způsobem bylo možné stanovit všechny enzymové aktivity, které se v průběhu optimalizace podařilo detekovat. Do postupu III také na rozdíl od postupu II nebylo nutné zařadit filtraci, která celý proces přípravy extraktu prodlužovala (rychlé ucpání filtru) a zvyšovala tím riziko denaturace extrahovaných enzymů. Z výsledků stanovení specifických aktivit v extraktech připravených ze stejných vzorků PAU-směs a SUB-směs (den 127, laboratorní teplota; Obr. 5.1, str. 54) je patrné, že téměř ve všech případech byly ve srovnání s extrakty II naměřeny v extraktech III buď shodné, nebo signifikantně vyšší hodnoty specifické enzymové aktivity.

6.2 Změny enzymové aktivity během kompostování

Během 42 dnů experimentu, kdy byly kompostovací reaktory umístěny v kompostéru se zavedeným vzduchováním a řízeným teplotním režimem, byly odebírány vzorky kompo-

stu za účelem sledování změn vybraných enzymových aktivit v závislosti na probíhajících fázích procesu kompostování. Každá ze čtyř fází byla reprezentována jedním odběrem: úvodní mesofilní fáze odběrem 1. den (40 °C), termofilní fáze odběrem 7. den (63 °C), fáze chladnutí, tj. druhá mesofilní fáze odběrem 21 den (38 °C) a počátek zrání odběrem 42. den (25 °C). Z odebraných vzorků byly postupem III připraveny extrakty, v nichž byly následně stanovovány specifické aktivity některých enzymů zapojených do transformace PAU a jejich metabolitů (hlavně katecholu) [10]. Konkrétně se jednalo o aktivity ligninolytických enzymů (lakasa, MnP, LiP), C12O, C23O a tyrosinasy. Je třeba zdůraznit, že substrátová specifita uvedených enzymů, především ligninolytických, je poměrně široká a může se překrývat se substrátovou specifikou jiných enzymů, jež katalyzují reakce stejného nebo podobného typu. Z toho plynoucí riziko interference aktivit nelze při všech stanoveních zcela zanedbat [73], [119].

Aby bylo možné zhodnotit případný vliv přítomnosti PAU na dané enzymové aktivity, byl ve třech reaktorech kompostován tzv. zelený substrát proložený vrstvami kontaminované půdy (reaktory PAU1–3) a ve třech samotný substrát (reaktory SUB1–3).

6.2.1 Ligninolytické enzymy

V kompostových extraktech se podařilo detekovat enzymovou aktivitu lakasy a MnP, aktivita LiP detekována nebyla. Aktivita MnP byla zaznamenána při všech čtyřech odběrech což se u ostatních stanovovaných enzymů nepodařilo. Lakasa byla detekována až při třetím odběru (den 21, 38 °C).

Výsledné specifické aktivity ligninolytických enzymů v kompostových extraktech byly oproti některým experimentům uváděným v literatuře (např. [101], [120]) nízké. Nadia a kol. [121] nebo Goyal a kol. [122] však při kompostování substrátu obsahujícího drůbeží kejdu, která je obsažena i v zeleném substrátu, zaznamenali podobně nízké hodnoty specifické aktivity ligninolytických enzymů.

U MnP i MIP byly pozorovány nízké hodnoty specifické aktivity (Obr. 5.3 a Obr. 5.4, str. 56) v termofilní fázi kompostování (den 7, 63 °C), což bylo ve shodě s Nadia a kol. [121] nebo Yang a kol. [120], kteří popsali podobný pokles v aktivitě MnP během kompostování stonků tabáku. Ve všech reaktorech byla při každém odběru vyšší MIP než aktivita MnP. Ve změnách aktivity MnP v průběhu kompostování však byla pozorována větší shoda mezi reaktory jednoho typu (s kontaminovanou půdou, resp. bez ní). Ani v jednom případě nelze z výsledků vyvodit, že by byla enzymová aktivita výrazněji ovlivněna přítomností půdy kontaminované PAU.

Z dostupných dat nelze určit, které enzymy jsou zodpovědné za MIP. Zřejmě se však nejedná o LiP. Nejspíše ani o VP, neboť VP je také schopna katalyzovat oxidaci VA, která s kompostovými extrakty nebyla zaznamenána [67]. Stanovení založené na oxidačním „couplingu“ DMAB a MBTH však není specifické pouze pro tyto ligninolytické

peroxidasy, ale může být použito též např. pro stanovení aktivity křenové peroxidasy [106]. Vzhledem k detekované aktivitě MIP v termofilní fázi (den 7) se zřejmě jednalo o relativně termostabilní enzymy. Bližší charakterizace těchto peroxidas by však vyžadovala další výzkum.

Není zcela jasné, proč nebyla detekována aktivita LiP, podobné pozorování však učinili také Košnář a kol. [94] při kompostování popílku s obsahem PAU vzniklého spalováním biomasy. Je možné, že v houbové biomase dominovaly houby patřící do skupiny, která se vyznačuje produkcí MnP a lakasy, případně houby produkující VP. To by se však pravděpodobně projevilo ve stanovení peroxidasové aktivity s VA.

Jak již bylo uvedeno, aktivita lakasy (Obr. 5.2, str. 55) byla detekována až ve fázi chladnutí kompostu (den 21, 38 °C), což je ve shodě s pozorováním Bohacz [123] při kompostování lignocelulosového odpadu v reaktorech o malém objemu. Rovněž v případě lakasy není patrný vliv přítomnosti PAU na enzymovou aktivitu. Přestože nejvyšší naměřená hodnota specifické lakasové aktivity byla v reaktoru PAU3 (den 42, 25 °C), vzhledem k vyšší směrodatné odchylce a výsledkům z reaktorů PAU1 a PAU2 se spíše jednalo o chybu způsobenou během extrakce. Zdrojem nepřesností může být také nesprávně provedený odběr, tzn. takový, který by nezahrnoval všechny vrstvy materiálu v reaktoru (na rozdíl od reaktorů se substrátem (SUB1–3) nebyl materiál v reaktorech PAU1–3 homogenně promísen, ale substrát byl prokládán vrstvami kontaminované půdy).

Změny v lakasové aktivitě pozitivně korelovaly se změnami OX (Obr. 5.5, str. 57) měřené v rámci stanovení MnP v nepřítomnosti peroxidu vodíku a manganatých iontů. Hodnoty specifické aktivity lakasy však byly vyšší než hodnoty specifické OX. Korelace pravděpodobně souvisí s tím, že lakasy jakožto fenoloxidas mohou katalyzovat oxidativní vznik vazby mezi DMAB a MBTH [124]. Stanovení lakasové aktivity využívající jako substrát ABTS je však citlivější (zejména v nepřečištěných extraktech), proto byla vyšší specifická aktivita detekována právě při stanovení oxidace ABTS [119]. Stanovení lakasové aktivity s ABTS má navíc oproti použití jiných substrátů (2,6-dimethoxyfenol, L-DOPA) také tu výhodu, že při něm nebyla pozorována interference s aktivitou tyrosinasy [119].

Je třeba dodat, že množství i vývoj enzymové aktivity lakasy a MnP měřené v rámci různých experimentů s kompostováním se v literatuře značně liší v závislosti na použitém kompostovaném materiálu [101], teplotním průběhu, délce kompostování [94] a dalších podmínkách či aditivech (např. inokulace houbovou kulturou [6]), ale také na volbě dnů odběrů a zpracování vzorku [123]. Někteří autoři ([120], [125]) navíc uvádějí enzymovou aktivitu vztaženou na hmotnost suchého vzorku, nikoliv na obsah proteinů ve vzorku, takže výsledné hodnoty enzymové aktivity nejsou dobře porovnatelné.

6.2.2 Katechol-1,2-dioxygenasa a katechol-2,3-dioxygenasa

Z CŠD byla v extraktech ze vzorků kompostu detekována pouze aktivita C23O ve dnech 21 (38 °C) a 42 (25 °C).

Specifická aktivita C23O 42. den (Obr. 5.6, str. 57) byla ve všech reaktorech vyšší, nebo srovnatelná (s ohledem na směrodatné odchylky měření) s aktivitou 21. den. Důvod, proč nebyla aktivita C23O detekována v počátečních fázích kompostování, zatím není zcela jasný. Mohlo by jít o nedostatek termofilních organismů, které jsou schopny syntetizovat tento enzym, i když termofilní mikroorganismy mající gen pro C23O byly identifikovány [126]. Přesto však vliv teploty nelze vyloučit.

Další možností je nepřítomnost, resp. příliš nízká koncentrace substrátu C23O, tedy katecholu. Ve dnech 21 a 42 by v kompostu ve srovnání s prvními odběry (dny 1 a 7) mohlo být přítomno více katecholů (vzniklých např. během degradace PAU), jejichž koncentrace by tak mohly převýšit koncentrační práh (kap. 2.2.1, str. 16). Pro posouzení platnosti této hypotézy by bylo nezbytné provést důkladnější analýzu degradačních produktů PAU, případně degradační experimenty v jednodušším systému, než je kompostový reaktor.

Na rozdíl od ligninolytických enzymů by C23O mohla být v přítomnosti PAU či jejich metabolitů indukována. Vzhledem ke srovnání s reaktory SUB1–3 však v rámci experimentu k indukci pravděpodobně nedocházelo, neboť výsledky stanovení aktivity v reaktorech PAU1–3 jsou srovnatelné se SUB1–3. V průběhu experimentu nebyl pozorován žádný vliv přítomnosti PAU na aktivitu C23O.

Důvodů, proč nebyla v extraktech ze vzorků kompostu detekována aktivita C12O, přestože aktivita C23O detekována byla, může být řada. V tomto ohledu se nelze opřít ani o literaturu, neboť data z podobných experimentů, v nichž by byla v kompostu stanovována aktivita C12O nebo C23O nebyla dosud publikována. Nepřítomnost enzymu C12O by mohla být dána prostou absencí příslušných genů, i když Pandey a kol. [127] popsali z kompostu izolovanou bakterii *Serratia marcescens* (kmen L-11), která byla schopná produkovat enzym C12O a degradovat PAU. I kdyby však přítomné mikroorganismy měly geny pro C12O, nemusí být v dostatečné míře exprimovány. Kromě toho může samozřejmě příčina spočívat také ve způsobu extrakce či stanovení enzymové aktivity C12O.

Dokonce byly popsány i bakterie, které mají geny současně pro obě CŠD [40]. Vaillancourt a kol. [38] ovšem uvádí, že dioxygenasy katalyzující extradiolové štěpení (tzn. C23O) jsou z pohledu variability substrátu všestrannější než obdobné dioxygenasy katalyzující intradiolové štěpení (tzn. C12O), což by mohlo mít vliv na regulaci obou drah. Vliv mohou mít také vnější podmínky, např. koncentrace PAU. Hupert-Kocurek a kol. [23] zaznamenali v extraktu z kultury *Planococcus* (kmen S5) indukované různými koncentracemi fenolu aktivitu C12O i C23O při koncentracích fenolu v růstovém médiu 1–2 mM, zatímco při koncentraci 3–4 mM fenolu detekovali pouze aktivitu C23O.

V uvedené studii byla pro měření aktivity obou enzymů použita stejná metoda stanovení jako v této diplomové práci. Wang a kol [42] uvádějí do souvislosti vysokou koncentraci směsi benzen – toluen – ethylbenzen – xyleny ve zkoumané odpadní vodě s dominancí genů pro C23O (resp. převažujícím růstem bakterií produkujících C23O).

6.2.3 Tyrosinasa

Ke stanovení aktivity tyrosinasy bylo využito dvou rozdílných metod. Dopachromová metoda je založená na stanovení dopachromu, který vzniká přeměnou dopachinonu, tedy produktu oxidace L-DOPA katalyzované tyrosinase. V rámci stanovení se předpokládá, že konverze dopachinonu na dopachrom je prakticky úplná, což nemusí být vždy splněno [128]. Dopachrom navíc není stabilní a může podléhat dalším reakcím [129]. Proto bylo toto běžné stanovení aktivity tyrosinasy, často používané např. pro půdní vzorky [129], porovnáno s jiným spektrofotometrickým stanovením [110], [111]. To vychází ze skutečnosti, že se produkt tyrosinase, dopachinon, v přítomnosti redukčního činidla, askorbátu, přeměňuje zpět na L-DOPA a askorbát je zároveň oxidován na dehydroaskorbát, což lze spektrofotometricky kvantifikovat.

Ani jednou ze zvolených metod nebyla detekována aktivita tyrosinasy 1. den (40 °C) experimentu, ale další výsledky obou stanovení se značně lišily. První rozdíl spočíval v tom, že dopachromovou metodou byla aktivita detekovatelná pouze 42. den (25 °C) (Obr. 5.7, str. 58), zatímco pomocí stanovení v přítomnosti askorbátu byla zaznamenána aktivita i ve dnech 7 (63 °C) a 21 (38 °C) (Obr. 5.8, str. 59). Navíc byly hodnoty specifické aktivity tyrosinasy stanovené pomocí oxidace askorbátu řádově vyšší.

Oxidaci L-DOPA může katalyzovat také lakasa (fenoloxidas) obecně [129]; tato interference by se však promítla do stanovení aktivity tyrosinasy oběma metodami. Interference s lakasou tedy pravděpodobně není příčinou rozdílných výsledků obou metod. Je však možné, že kompostové extrakty obsahují látky nebo enzymy, které mohou oxidovat askorbát. To by s dopachromovou metodou interferovat nemělo, ale při nepřímém stanovením založeném právě na oxidaci askorbátu by se interference projevila. Tím by také bylo možné vysvětlit řádově vyšší hodnoty specifické aktivity tyrosinasy stanovené tímto způsobem. Mimo to se hodnoty molárního absorpčního koeficientu askorbátu uváděné v literatuře v některých případech výrazně liší [112]. Řešení by mohlo spočívat ve využití zcela jiného principu stanovení aktivity tyrosinasy. Jako příklad je možné uvést stanovení podle Winder a Harris [128] založené na „zachycení“ dopachinonu (jakožto přímého produktu oxidace L-DOPA katalyzované tyrosinase) reakcí s MBTH za vzniku stabilního růžového pigmentu.

Ani v případě aktivity tyrosinasy nebyl pozorován vliv přítomnosti PAU. Dopachromovou metodou byla sice nejvyšší specifická aktivita naměřena v reaktoru PAU3, avšak s velkou směrodatnou odchylkou. Výsledné aktivity v reaktorech PAU1 a PAU2 se od

hodnot z reaktorů SUB1–3 výrazně neodlišovaly. Výsledky stanovení v přítomnosti askorbátu též nevykazovaly výrazné odlišnosti mezi PAU1–3 a SUB1–3.

6.3 Koncentrace fosfolipidových mastných kyselin

Metodou analýzy PLFA byla kvantifikována biomasa ve vzorcích ze všech reaktorů v průběhu experimentu (den 1, 7, 21, 42) i v půdě. V environmentálních studiích jde o široce používanou techniku při zkoumání mikrobiální biomasy a změn v jejím složení, případně může analýza PLFA sloužit jako ukazatel stresu a metabolické aktivity [130]. Je třeba zdůraznit, že koncentrace PLFA nelze přímo porovnávat napříč různými skupinami mikroorganismů, neboť pro různé mikroorganismy je dostupné různé množství charakteristických PLFA, což je obecně jednou ze slabin této metody [131].

Většinou byla nižší mikrobiální biomasa zaznamenána v reaktorech PAU1–3. To je pravděpodobně převážně způsobeno tím, že výsledné hodnoty jsou vztažené na celkovou hmotnost vzorku bez ohledu na to, zda půdu obsahoval, nebo ne. Vzorky odebrané z reaktorů SUB1–3 obsahovaly pouze zelený substrát, ale vzorky z reaktorů PAU1–3 obsahovaly substrát smíchaný s půdou (v poměru cca 1 : 1 v suchém stavu). Podle výsledků stanovení byl ale hlavním „nosičem mikrobiální biomasy“ substrát, nikoliv půda. Koncentrace PLFA v půdě byly oproti substrátu zcela zanedbatelné, což mohlo být způsobeno vysokou koncentrací PAU.

Zatímco změny koncentrace $PLFA_{G+}$ (Obr. 5.10, str. 60) v jednotlivých reaktorech v závislosti na teplotních fázích kompostování nevykazovaly shodné trendy. V případě koncentrací $PLFA_{G-}$ (Obr. 5.11, str. 61) byly nejvyšší hodnoty ve všech reaktorech shodně zaznamenány při prvním odběru (den 1, 40 °C), kdy byly také pozorovány nejmenší hodnoty poměru koncentrací $PLFA_{G+}/PLFA_{G-}$ (Obr. 5.12, str. 61). Naopak nejmenší koncentrace $PLFA_{G-}$ byla naměřena v termofilní fázi (den 7, 63 °C), což se projevovalo v prudkém nárůstu poměru koncentrací $PLFA_{G+}$ ku $PLFA_{G-}$. Pozorované změny v relativním zastoupení obou skupin bakterií je možné do značné míry vysvětlit tím, že mezi termofilními bakteriemi v kompostu obvykle dominují grampozitivní bakterie (zejména aktinobakterie a bakterie rodu *Bacillus*) [93].

Výrazný nárůst biomasy aktinobakterií (Obr. 5.13, str. 62) byl pozorovaný především v reaktorech SUB1–3 21. den (38 °C), což se shodovalo s pozorováním některých autorů, že aktinobakterie patří mezi významné skupiny mikroorganismů v této teplotní fázi kompostování [93], [132]. Zaznamenaný nárůst by teoreticky mohl souviset s detekovaným růstem aktivity C23O. Mezi bakterie schopné produkovat C23O však patří i řada gramnegativních bakterií, jichž však bylo nejvíce na počátku kompostování. Tento zdánlivý rozpor by mohl souviset s výše uvedenou hypotézou o příliš malé koncentraci katecholů (kap. 6.2.2, str. 69), která by mohla vysvětlit fakt, že aktivita C23O při prvních dvou odběrech (den 1 a 7) nebyla detekována.

V kompostovacích reaktorech nebyl v průběhu experimentu pozorován žádný trend ve vývoji množství PLFA_{houby} (Obr. 5.14, str. 62) v závislosti na změnách teploty, avšak po celou dobu byly houby stabilní součástí biomasy. Na rozdíl od koncentrací ostatních charakteristických PLFA (nejvíce PLFA_{G+} a PLFA_{aktinobakt}) nebyl významný rozdíl mezi výslednými hodnotami koncentrace PLFA_{houby} v PAU1–3 a SUB1–3.

Výrazně vyšší hodnota PLFA_{houby}/PLFA_{bakt} (Obr. 5.15, str. 63) byla zaznamenána ve všech reaktorech PAU1–3 42. den experimentu, což je ve shodě s pozorováním Covino a kol. [3] při kompostování dřeva kontaminovaného kreosotem se stejným kompostovacím substrátem. V reaktorech SUB1–3 tento nárůst poměru koncentrací PLFA_{houby}/PLFA_{bakt} pozorován nebyl. Hodnoty byly navíc v reaktorech SUB1–3 nižší než v reaktorech PAU1–3, což je dáno hlavně tím, že množství biomasy hub bylo ve všech reaktorech srovnatelné, kdežto koncentrace bakteriálních PLFA byla v SUB1–3 vyšší než v PAU1–3.

6.4 Koncentrace polycyklických aromatických uhlovodíků

Během experimentu byl zaznamenán postupný úbytek koncentrace PAU v reaktorech PAU1–3 (Obr. 5.16, str. 64). Reziduální koncentrace 42. den v kompostu dosahovala pouze 11–15 % počáteční koncentrace (tzn. koncentrace 1. den v daném reaktoru) oproti 78 % v půdě umístěné volně v kompostéru. Z uvedeného je zřejmé, že proces kompostování kontaminované půdy se zeleným substrátem byl výrazně účinnější metodou pro odstraňování PAU než pouhé působení zvýšené teploty na půdu v kompostéru.

Výrazný pokles koncentrace PAU byl zaznamenán mezi 7. a 21. dnem experimentu, kdy byl pozorován také nárůst biomasy aktinobakterií, mezi něž patří někteří významní degradátoři PAU [19]. Jak uvádějí různí autoři [89], pro degradaci PAU v kompostu je však pravděpodobně důležité celé mikrobiální společenství. To také dokládá fakt, že ačkoliv mezi 1. a 7. dnem výrazně poklesla biomasa gramnegativních bakterií, mezi něž rovněž patří řada organismů schopných rozkládat tyto polutanty [19], koncentrace PAU byla 7. den oproti počátku experimentu výrazně nižší.

Mezi 7. a 21. dnem navíc byla detekována aktivita C23O, což rovněž může souviset s výrazným poklesem koncentrace PAU mezi těmito odběry.

K ještě většímu úbytku PAU by mohlo dojít během maturace [3], [5], [94], nicméně pro potvrzení bude třeba z reaktorů PAU1–3 ještě odebrat další vzorky ke stanovení PAU po cca 100 dnech maturace, což do této práce nebylo možné zahrnout.

Ve shodě se studii Covino a kol. [3], Cajthaml a kol. [2], v nichž byl použit stejný kompostovací substrát, byla zaznamenána nejnižší relativní reziduální koncentraci u PAU s nízkou M_r (1–2 % v PAU reaktorech, 77 % v půdě). To bývá obvykle vysvětlováno tím, že hydrofobicita, chemická stabilita a odolnost vůči mikrobiální degradaci se

zvyšují s rostoucí velikostí molekuly PAU [10]. Tomu odpovídal i pozorovaný nižší relativní úbytek PAU s vysokou M_r (reziduální koncentrace 26–36 % v PAU reaktorech, 70 % v půdě).

7 Závěr

Polycyklické aromatické uhlovodíky představují důležitou skupinu obtížně rozložitelných organopolutantů. Jednou z perspektivních bioremediačních technologií použitelných pro pevné materiály (např. půdy) kontaminované PAU je kompostování. Během kompostování jsou PAU transformovány a degradovány enzymy produkovanými širokým konsorciem mikroorganismů. Popsání změn v aktivitě těchto enzymů v závislosti na teplotním průběhu kompostování může pomoci hlubšímu pochopení celého procesu, případně také napomoci posouzení úspěšnosti degradace PAU.

V rámci této diplomové práce byla optimalizována metoda pro extrakci vybraných enzymů z kompostovaného materiálu. Tento postup byl poté použit v rámci zkoumání změn v aktivitě ligninolytických enzymů (lakasa, MnP, LiP), dvou CŠD (C12O, C23O) a tyrosinasy. Pro posouzení případného vlivu přítomnosti PAU na zmíněné enzymové aktivity byly srovnávány reaktory, v nichž probíhalo kompostování tzv. zeleného substrátu proloženého kontaminovanou půdou, s reaktory, v nichž byl kompostován pouze substrát.

Bylo ověřeno, že během kompostování docházelo ve všech reaktorech k úbytku PAU a to z 85–89 %. Kompost byl dále charakterizován analýzou PLFA.

V úvodní mesofilní fázi byla detekována pouze aktivita MnP, v termofilní fázi byla zaznamenána jak aktivita MnP, tak aktivita tyrosinasy stanovením v přítomnosti askorbátu. Ve fázi chladnutí a na počátku maturace byly zaznamenány aktivity lakasy, MnP, C23O a tyrosinasy. Aktivita LiP ani C12O nebyla během kompostování detekována.

Výsledky zaznamenané v rámci jednoho typu reaktorů (PAU1–3, resp. SUB1–3) si v pozorovaných změnách enzymových aktivit navzájem odpovídaly, je však třeba zdůraznit, že se zejména v případě reaktorů PAU1–3 jednalo o značně nehomogenní matici. Právě heterogenita materiálu byla jedním z úskalí, které bylo třeba vyřešit při optimalizaci extrakčního postupu.

V rámci práce byly také srovnány dvě metody stanovení tyrosinasy v kompostových extraktech. Při porovnání dopachromové metody stanovení aktivity tyrosinasy se stanovením v přítomnosti askorbátu se ukázalo, že výsledky získané těmito metodami se podstatně liší. Dopachromová metoda pravděpodobně pro měření v extraktech kompostu není dostatečně citlivá. Naproti tomu stanovení aktivity tyrosinasy v přítomnosti askorbátu není zřejmě dostatečně specifické vzhledem ke komplexnosti kompostových extraktů. Pro další studium tyrosinasové aktivity v kompostu by tudíž bylo vhodné vybrat a případně optimalizovat stanovení založené na jiném principu.

Nebyl zaznamenán žádný vliv PAU na enzymovou aktivitu. Pro další posouzení vlivu těchto organopolutantů na zkoumané enzymové aktivity by pravděpodobně bylo nezbytné pokusit se určit vliv přítomnosti PAU na expresi příslušných genů prostřednictvím izolace mRNA. Vzhledem k heterogenitě kompostovaného materiálu by však pravděpodobně bylo třeba provést další optimalizaci metod.

Seznam použité literatury

- 1 Shimada, T. (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**, 257–276.
- 2 Cajthaml, T., Bhatt, M., Šašek, V. and Matějů, V. (2002) Bioremediation of PAH-contaminated soil by composting: A case study. *Folia Microbiol. (Praha)*. **47**, 696–700.
- 3 Covino, S., Fabianová, T., Křesinová, Z., Čvančarová, M., Burianová, E., Filipová, A., Voříšková, J., Baldrian, P. and Cajthaml, T. (2016) Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and microbial community shifts during co-composting of creosote-treated wood. *J. Hazard. Mater.* **301**, 17–26.
- 4 Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J. and Beck, A. J. (2006) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in an aged coal-tar-contaminated soil using different in-vessel composting approaches. *J. Hazard. Mater.* **137**, 1583–1588.
- 5 Šašek, V., Bhatt, M., Cajthaml, T., Malachová, K. and Lednická, D. (2003) Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **44**, 336–342.
- 6 Bellino, A., Baldantoni, D., Picariello, E., Morelli, R., Alfani, A. and De Nicola, F. (2019) Role of different microorganisms in remediating PAH-contaminated soils treated with compost or fungi. *J. Environ. Manage.* **252**, 109675.
- 7 Haritash, A. K. and Kaushik, C. P. (2019) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* **169**, 1–15.
- 8 Wang, C., Wu, S., Zhou, S., Shi, Y. and Song, J. (2017) Characteristics and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils: A review. *Pedosphere* **27**, 17–26.
- 9 Fetzer, J. C. (2007) The chemistry and analysis of large PAHs. *Polycycl. Aromat. Compd.* **27**, 143–162.
- 10 Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K. and Ahn, Y. (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Front. Microbiol.* **7**, 1369.
- 11 International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–127 – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. dostupné z: <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>. 07/27/2020.
- 12 Saunders, C. R., Das, S. K., Ramesh, A., Shockley, D. C. and Mukherjee, S. (2006) Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: Role of oxidative stress. *J. Appl. Toxicol.* **26**, 427–438.
- 13 De Jong, W. H., Dinant Kroese, E., Vos, J. G. and Loveren, H. Van. (1999) Detection of Immunotoxicity of Benzo[a]pyrene in a Subacute Toxicity Study after Oral Exposure in Rats. *Toxicol. Sci.* **50**, 214–220.
- 14 Sakshi and Haritash, A. K. (2020) A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation. *Arch. Microbiol.* 1–26.
- 15 Environmental Protection Agency. (2014) Priority Pollutant List. dostupné z: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>. 07/27/2020.
- 16 Aichner, B., Glaser, B. and Zech, W. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in urban soils from Kathmandu, Nepal. *Org. Geochem.* **38**, 700–715.

- 17 Shahsavari, E., Schwarz, A., Aburto-Medina, A. and Ball, A. S. (2019) Biological Degradation of Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs) in Soil: A current perspective. *Curr. Pollut. Reports* **5**, 84–92.
- 18 Baboshin, M. A. and Golovleva, L. A. (2012) Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Mikrobiologiya* **81**, 639–650.
- 19 Cerniglia, C. E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351–368.
- 20 Dalton, H. and Stirling, D. I. (1982) Co-metabolism. *Philos. Trans. R. Soc. London* **297**, 481–496.
- 21 Bouchez, M., Blanchet, D. and Vandecasteele, -J-P. (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 156–164.
- 22 Shahsavari, E., Adetutu, E. M. and Ball, A. S. (2015) Phytoremediation and necrophytoremediation of petrogenic hydrocarbon-contaminated soils. In *Phytoremediation* (Ansari, A., Gill, S., Gill, R., Lanza, G., and Newman, L., eds.), pp 321–334, Springer.
- 23 Hupert-Kocurek, K., Guzik, U. and Wojcieszynska, D. (2012) Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 345–351.
- 24 Mawad, A. M. M., Abdel-Mageed, W. S. and Hesham, A. E.-L. (2020) Quantification of Naphthalene Dioxygenase (*NahAC*) and Catechol Dioxygenase (*C23O*) Catabolic Genes Produced by Phenanthrene-Degrading *Pseudomonas fluorescens* AH-40. *Curr. Genomics* **21**, 111–118.
- 25 Cajthaml, T. (2019) Mechanismy biodegradace perzistentních organických polutantů a nově se objevujících mikropolutantů ligninolytickými houbami.
- 26 Briedé, J. J., Godschalk, R. W. L., Emans, M. T. G., De Kok, T. M. C. M., Van Agen, E., Van Maanen, J. M. S., Van Schooten, F. J. and Kleinjans, J. C. S. (2004) In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic. Res.* **38**, 995–1002.
- 27 Novotný, Č., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. and Šašek, V. (2004) Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1545–1551.
- 28 Pozdnyakova, N., Dubrovskaya, E., Chernyshova, M., Makarov, O., Golubev, S., Balandina, S. and Turkovskaya, O. (2018) The degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus*. *Fungal Biol.* **122**, 363–372.
- 29 May, R., Schröder, P. and Sandermann, H. J. (1997) Ex-Situ Process for Treating PAH-Contaminated Soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2626–2633.
- 30 Čapek, J., Musilová, L., Macek, T. and Uhlík, O. (2014) Dioxygenasy hydroxylující aromatické kruhy – vztah struktury a substrátové specifity. *Chem. List.* **108**, 182–190.
- 31 Ferraro, D. J., Okerlund, A., Brown, E., Ramaswamy, S. and Tas, B. (2017) One enzyme, many reactions: structural basis for the various reactions catalyzed by naphthalene 1,2-dioxygenase. *IUCrJ* **4**, 648–656.

- 32 Kweon, O., Kim, S.-J., Baek, S., Chae, J.-C., Adjei, M. D., Baek, D.-H., Kim, Y.-C. and Cerniglia, C. E. (2008) A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochem.* **9**.
- 33 Colbert, C. L., Agar, N. Y. R., Kumar, P., Chakko, M. N., Sinha, S. C., Powlowski, J. B., Eltis, L. D. and Bolin, J. T. (2013) Structural Characterization of *Pandoraea pnomenus* B-356 Biphenyl Dioxygenase Reveals Features of Potent Polychlorinated Biphenyl-Degrading Enzymes. *PLoS One* **8**, e52550.
- 34 Bassan, A., Blomberg, M. R. A. and Siegbahn, P. E. M. (2004) A theoretical study of the cis-dihydroxylation mechanism in naphthalene 1,2-dioxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 439–452.
- 35 Neese, F. and Solomon, E. I. (1998) Detailed Spectroscopic and Theoretical Studies on $[\text{Fe}(\text{EDTA})(\text{O}_2)]^{3-}$: Electronic Structure of the Side-on Ferric-Peroxide Bond and Its Relevance to Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12829–12848.
- 36 Musumeci, M. A., Loviso, C. L., Lozada, M., Ferreira, F. V. and Dionisi, H. M. (2019) Substrate specificities of aromatic ring-hydroxylating oxygenases of an uncultured gammaproteobacterium from chronically-polluted subantarctic sediments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **137**, 127–136.
- 37 Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V. and Gaillard, J. (2006) Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry* **45**, 12380–12391.
- 38 Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T. and Eltis, L. D. (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 241–267.
- 39 Bugg, T. D. H. and Lin, G. (2001) Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: How do enzymes control hydroperoxide rearrangements? *Chem. Commun.* 941–952.
- 40 Ngoc Tuan, N., Hsieh, H.-C., Lin, Y.-W. and Huang, S.-L. (2011) Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresour. Technol.* **102**, 4232–4240.
- 41 Sangkharak, K., Choonut, A., Rakkan, T. and Prasertsan, P. (2020) The degradation of phenanthrene, pyrene, and fluoranthene and its conversion into medium-chain-length polyhydroxyalkanoate by novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Curren Microbiol.* **77**, 897–909.
- 42 Wang, Z., Li, J., Hesham, A. E. L., He, S., Zhang, Y., Wang, Z. and Yang, M. (2007) Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *Sci. Total Environ.* **373**, 356–362.
- 43 Singh, S. N., Kumari, B., Upadhyay, S. K., Mishra, S. and Kumar, D. (2013) Bacterial degradation of pyrene in minimal salt medium mediated by catechol dioxygenases: Enzyme purification and molecular size determination. *Bioresour. Technol.* **133**, 293–300.
- 44 Mishra, S. and Singh, S. N. (2013) Biodegradation of benzo(a)pyrene mediated by catabolic enzymes of bacteria. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **11**, 1571–1580.
- 45 Ahuatzi-Chacón, D., Ordorica-Morales, G., Ruiz-Ordaz, N., Cristiani-Urbina, E., Juárez-Ramírez, C. and Galíndez-Mayer, J. (2004) Kinetic study of phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase biosynthesis by *Candida tropicalis* cells grown on different phenolic substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 695–702.

- 46 Semana, P. and Powlowski, J. (2019) Four aromatic intradiol ring cleavage dioxygenases from *Aspergillus Niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 01786–19.
- 47 Hadibarata, T., Tachibana, S. and Itoh, K. (2009) Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium. *J. Hazard. Mater.* **164**, 911–917.
- 48 Guzik, U., Hupert-Kocurek, K. and Wojcieszysk, D. (2013) Intradiol Dioxygenases — The Key Enzymes in Xenobiotics Degradation. In *Biodegradation of Hazardous and Special Products* (Chamy, R., ed.), pp 129–153, IntechOpen, London.
- 49 Ishida, T., Kita, A., Miki, K., Nozaki, M. and Horiike, K. (2003) Structure and reaction mechanism of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase). *Int. Congr. Ser.* **1233**, 213–220.
- 50 Šušla, M. and Svobodová, K. (2006) Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chem. List.* **100**, 889–895.
- 51 Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**, 895–905.
- 52 Anastasi, A., Coppola, T., Prigione, V. and Varese, G. C. (2009) Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *J. Hazard. Mater.* **165**, 1229–1233.
- 53 Čvančarová, M., Křesinová, Z., Filipová, A., Covino, S. and Cajthaml, T. (2012) Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* **88**, 1317–1323.
- 54 Merino-Restrepo, A., Mejía-Otálvaro, F., Velásquez-Quintero, C. and Hormaza-Anaguano, A. (2020) Evaluation of several white-rot fungi for the decolorization of a binary mixture of anionic dyes and characterization of the residual biomass as potential organic soil amendment. *J. Environ. Manage.* **254**, 109805.
- 55 Verdin, A., Sahraoui, A. L. H. and Durand, R. (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **53**, 65–70.
- 56 Jořenek, M. and Zajoncová, L. (2013) Biotechnologický význam lakasy a její charakteristika. *Chem. List.* **107**, 921–928.
- 57 Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R. and Šantek, B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* **18**, 768–778.
- 58 Baldrian, P. (2006) Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215–242.
- 59 Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., et al. (2019) Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb. Cell Fact.* **18**, 1–33.
- 60 Kumar, A. and Chandra, R. (2020) Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon* **6**, e03170.
- 61 Chowdhary, P., Shukla, G., Raj, G., Luiz, , Ferreira, F. R. and Bharagava, R. N. (2019) Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Appl. Sci.* **1**, 45.
- 62 Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V. and Stiborová, M. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. List.* **95**, 212–222.

- 63 Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 454–466.
- 64 Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V. and Okoh, A. I. (2017) Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen* **6**, e00394.
- 65 Higuchi, T. (2004) Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **80**, 204–214.
- 66 Kulikova, N. A., Klein, O. I., Stepanova, E. V. and Koroleva, O. V. (2011) Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: Fundamental and applied aspects (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **47**, 565–579.
- 67 Ravichandran, A. and Sridhar, M. (2017) Insights into the mechanism of lignocellulose degradation by versatile peroxidases. *Curr. Sci.* **113**, 35–42.
- 68 Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. and Martínek, V. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. List.* **98**, 876–890.
- 69 Coon, M. J., Ding, X., Pernecky, S. J. and Vaz, A. D. N. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6**, 669–673.
- 70 Meunier, B., De Visser, S. P. and Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947–3980.
- 71 Baldwin, W. S., Marko, P. B. and Nelson, D. R. (2009) The cytochrome P450 (CYP) gene superfamily in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics* **10**, 1–12.
- 72 Baird, W. M., Hooven, L. A. and Mahadevan, B. (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* **45**, 106–114.
- 73 Claus, H. and Decker, H. (2006) Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 3–14.
- 74 Mayer, A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67**, 2318–2331.
- 75 Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F. and García-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1–11.
- 76 Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M. and Thöny-Meyer, L. (2012) Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochem.* **47**, 1749–1760.
- 77 Gasparetti, C., Nordlund, E., Jänis, J., Buchert, J. and Kruus, K. (2012) Extracellular tyrosinase from the fungus *Trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 598–607.
- 78 Yang, H.-Y. and Chen, C. W. (2009) Extracellular and intracellular polyphenol oxidases cause opposite effects on sensitivity of *streptomyces* to phenolics: A case of double-edged sword. *PLoS One* **4**, e7462.
- 79 Isaac, P., Lozada, M., Dionisi, H. M., Estévez, M. C. and Ferrero, M. A. (2015) Differential expression of the catabolic *nahAc* gene and its effect on PAH degradation in *Pseudomonas* strains isolated from contaminated Patagonian coasts. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **105**, 1–6.
- 80 Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Top, E. M., Verstraete, W. and Springael, D. (2005) Culture independent detection of *Sphingomonas* sp. EPA 505 related strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Microb. Ecol.* **49**, 443–450.

- 81 Kuppusamy, S., Thavamani, P., Singh, S., Naidu, R. and Megharaj, M. (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation potential, surfactant production, metal resistance and enzymatic activity of two novel cellulose-degrading bacteria isolated from koala faeces. *Environ. Earth Sci.* **76**, 1–12.
- 82 Pizzul, L., Castillo, M. del P. and Stenström, J. (2007) Effect of rapeseed oil on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by *Rhodococcus wratislaviensis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **59**, 111–118.
- 83 Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P. and Cerniglia, C. E. (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 340–345.
- 84 Mehetre, G. T., Dastager, S. G. and Dharne, M. S. (2019) Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Sci. Total Environ.* **679**, 52–60.
- 85 Polcaro, C. M., Brancaleoni, E., Donati, E., Frattoni, M., Galli, E., Migliore, L. and Rapanà, P. (2008) Fungal bioremediation of creosote-treated wood: A laboratory scale study on creosote components degradation by *Pleurotus ostreatus* mycelium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **81**, 180–184.
- 86 Covino, S., Svobodová, K., Křesinová, Z., Petruccioli, M., Federici, F., D'annibale, A., Čvančarová, M. and Cajthaml, T. (2010) *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* **101**, 3004–3012.
- 87 Valentín, L., Lu-Chau, T. A., López, C., Feijoo, G., Moreira, M. T. and Lema, J. M. (2007) Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Process Biochem.* **42**, 641–648.
- 88 Insam, H. and de Bertoldi, M. (2007) Microbiology of the Composting Process. In *Compost Science and Technology* (Diaz, L. F., de Bertoldi, M., Bidlingmaier, W., and Stentiford, E., eds.), pp 26–48, Elsevier Ltd., Amsterdam.
- 89 Kästner, M. and Miltner, A. (2016) Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3433–3449.
- 90 Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J. M. and Beck, A. J. (2004) Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Contaminated Waste Using Composting Approaches. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, Taylor & Francis Group **34**, 249–289.
- 91 Loick, N., Hobbs, P. J., Hale, M. D. C. and Jones, D. L. (2009) Bioremediation of Poly-Aromatic Hydrocarbon (PAH)-contaminated soil by composting. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **39**, 271–332.
- 92 Čvančarová, M., Křesinová, Z. and Cajthaml, T. (2013) Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* **254–255**, 116–124.
- 93 Antizar-Ladislao, B., Spanova, K., Beck, A. J. and Russell, N. J. (2008) Microbial community structure changes during bioremediation of PAHs in an aged coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **61**, 357–364.
- 94 Košnář, Z., Wiesnerová, L., Částková, T., Kroulíková, S., Bouček, J., Mercl, F. and Tlustoš, P. (2019) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in biomass fly ash by co-composting and co-vermicomposting. *J. Hazard. Mater.* **369**, 79–86.

- 95 Obi, L., Atagana, H., Adeleke, R., Maila, M. and Bamuza-Pemu, E. (2020) Potential microbial drivers of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil sludge using a composting technique. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **95**, 1569–1579.
- 96 Obi, L., Atagana, H. and Adeleke, R. (2016) Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *Springerplus* **5**, 1946.
- 97 Tiquia, S. M. (2002) Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 764–775.
- 98 Bono, J. J., Chalaux, N. and Chabbert, B. (1992) Bench-scale composting of two agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* **40**, 119–124.
- 99 Košnář, Z., Částková, T., Wiesnerová, L., Praus, L., Jablonský, I., Koudela, M. and Tlustoš, P. (2019) Comparing the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil after different bioremediation approaches in relation to the extracellular enzyme activities. *J. Environ. Sci.* **76**, 249–258.
- 100 Roy, A. (2013) Měření teploty kompostu – primárního indikátoru průběhu kompostovacího procesu. dostupné z: <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/mereni-teploty-kompostu-primarniho-indikatoru-prubehu-kompostovaciho-procesu>. 07/17/2020.
- 101 Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., Jiang, R. and Yu, Z. (2009) Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting. *Bioresour. Technol.* **101**, 222–227.
- 102 Singh, A. D., Abdullah, N. and Vikineswary, S. (2003) Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **78**, 743–752.
- 103 Gaudinová, A., Vaňková, R., Dobrev, P. and Motyka, V. (2003) Extrakce a stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas v rostlinných pletivech. *Biol. Listy* **68**, 176–179.
- 104 Silva, A. S., De Oliveira Camargo, F. A., Andrezza, R., Jacques, R. J. S., Baldoni, D. B. and Bento, F. M. (2012) Enzymatic activity of catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase produced by *Gordonia Polyisoprenivorans*. *Quim. Nova* **35**, 1587–1592.
- 105 Bourbonnais, R. and Paice, M. G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **267**, 99–102.
- 106 Ngo, T. T. and Lenhoff, H. M. (1980) A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal. Biochem.* **105**, 389–397.
- 107 Tien, M. and Kirk, T. K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 2280–2284.
- 108 Hegeman, G. D. (1966) Synthesis of the Enzymes of the Mandelate Pathway by *Pseudomonas putida* I. Synthesis of Enzymes by the Wild Type Downloaded from. *J. Bacteriol.* **91**, 1140–1154.
- 109 Zamorano, J.-P., Martínez-Álvarez, O., Montero, P. and Del Carmen Gómez-Guillén, M. (2009) Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chem.* **112**, 104–111.
- 110 Marumo, K. and Waite, J. H. (1986) Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mol. Enzymol.* **872**, 98–103.

- 111 Sigma Aldrich. Enzymatic Assay of polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1). dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/polyphenol_oxidase.pdf. 11/19/2018.
- 112 Witmer, J. R., Wetherell, B. J., Wagner, B. A., Du, J., Cullen, J. J. and Buettner, G. R. (2016) Direct spectrophotometric measurement of supra-physiological levels of ascorbate in plasma. *Redox Biol.* **8**, 298–304.
- 113 Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- 114 Stella, T., Covino, S., Burianová, E., Filipová, A., Křesinová, Z., Voříšková, J., Větrovský, T., Baldrian, P. and Cajthaml, T. (2015) Chemical and microbiological characterization of an aged PCB-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* **533**, 177–186.
- 115 Covino, S., Čvančarová, M., Muzikář, M., Svobodová, K., D'annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Křesinová, Z. and Cajthaml, T. (2010) An efficient PAH-degrading *Lentinus* (*Panus*) *tigrinus* strain: Effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices. *J. Hazard. Mater.* **183**, 669–676.
- 116 Estrella-González, M. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A. and Moreno, J. (2019) Enzymatic profiles associated with the evolution of the lignocellulosic fraction during industrial-scale composting of anthropogenic waste: Comparative analysis. *J. Environ. Manage.* **248**.
- 117 Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Herinková, J., Cajthaml, T. and Baldrian, P. (2008) Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 2068–2075.
- 118 Štursová, M. and Baldrian, P. (2011) Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil* **338**, 99–110.
- 119 Eichlerová, I., Šnajdr, J. and Baldrian, P. (2012) Laccase activity in soils: Considerations for the measurement of enzyme activity. *Chemosphere* **88**, 1154–1160.
- 120 Yang, L., Yuan, H., Yang, Y., Wang, R., Wang, C., Wei, X., Chen, S., Yu, J. and Ma, X. (2020) Enhanced lignin degradation in tobacco stalk composting with inoculation of white-rot fungi *Trametes hirsuta* and *Pleurotus ostreatus*. *Waste and Biomass Valorization* **11**, 3525–3535.
- 121 Farah Nadia, O., Yu Xiang, L., Yei Lie, L., Chairil Anuar, D., Mohd Afandi, M. P. and Azhari Baharuddin, S. (2015) Investigation of physico-chemical properties and microbial community during poultry manure co-composting process. *J. Environ. Sci.* **28**, 81–94.
- 122 Goyal, S., Dhull, S. K. and Kapoor, K. K. (2005) Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresour. Technol.* **96**, 1584–1591.
- 123 Bohacz, J. (2017) Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. *Sci. Total Environ.* **580**, 744–754.
- 124 Jordaan, J. and Leukes, W. D. (2003) Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 212–219.

- 125 Zeng, Z., Song, B., Xiao, R., Zeng, G., Gong, J., Chen, M., Xu, P., Zhang, P., Shen, M. and Yi, H. (2019) Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. *Environ. Int.* **126**, 598–610.
- 126 Ali, S., Fernandez-Lafuente, R. and Cowan, D. A. (1998) Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic Bacilli. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 462–468.
- 127 Pandey, A. K., Chaudhary, P., Singh, S. B., Arora, A., Kumar, K., Chaudhry, S. and Nain, L. (2012) Deciphering the traits associated with PAH degradation by a novel *Serratia marcescens* L-11 strain Deciphering the traits associated with PAH degradation by a novel *Serratia marcescens* L-11 strain. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **47**, 755–765.
- 128 Winder, A. J. and Harris, H. (1991) New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **198**, 317–326.
- 129 Sinsabaugh, R. L. (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 391–404.
- 130 Willers, C., Jansen van Rensburg, P. J. and Claassens, S. (2015) Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities-a review of interpretations and recent applications. *J. Appl. Microbiol.* **119**, 1207–1218.
- 131 Frostegård, Å., Tunlid, A. and Bååth, E. (2011) Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 1621–1625.
- 132 Strom, P. F. (1985) Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 906–913.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka