

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

BIODEGRADACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH
UHLOVODÍKŮ VE DŘEVĚ OŠETŘENÉM KREOZOTOVÝM
OLEJEM

BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBON IN WOOD TREATED WITH CREOSOTE OIL

Diplomová práce
studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2010

Bc. Tereza Fabiánová

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři environmentální biotechnologie v Mikrobiologickém ústavu AVČR v rámci projektu 2B06156 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky z ústavního výzkumného záměru č. AV0Z0200510.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením vedoucí práce Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a konzultanta RNDr. Tomáše Cajthamla, PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Bc. Tereza Fabiánová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala školiteli RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, PhD. za odborné vedení a konzultace, které mi vždy s ochotou poskytoval v průběhu zpracování diplomové práce.

.....

Bc. Tereza Fabiánová

ABSTRAKT

Odpadní dřevo kontaminované polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAU) je v dnešní době vážný environmentální problém. Jako vhodná metoda dekontaminace tohoto materiálu se jeví metoda kompostování. PAU jsou rozkládány převážně aerobně a efektivita tohoto procesu závisí na podmínkách kompostování. V této práci byla sledována účinnost procesu kompostování kontaminovaného dřeva po dobu 340 dnů v laboratorním kompostéru a 240 dnů v pilotním měřítku. Jako kompostovací substráty byly použity tzv. „zelený substrát“, který je dodáván pro komerční pěstování žampionů a travní substrát. Byl pozorován vliv rozdílných kompostovacích substrátů na účinnost degradace PAU. Travní substrát vykazoval lepší výsledky a k poklesu koncentrace sum PAU zde došlo o 97 % z původního množství. Při použití „zeleného substrátu“ došlo k celkovému snížení PAU o 81 %. Dále byl prokázán vliv velikosti částic kontaminovaného dřeva na degradaci PAU. Analýza fosfolipidických markerových mastných kyselin prokázala zvýšený výskyt Gram-negativních bakterií a hub při degradaci. Také byla sledována aktivita extracelulárních enzymů v průběhu kompostování, ale detekována byla pouze aktivita enzymu lakasy. Pro sledování degradačního procesu byly také použity testy ekotoxicity. Test akutní toxicity s bakteriemi *Vibrio fischeri* a test fyto toxicity založený na principu sledování klíčivosti semen (*Hordeum vulgare* L.) ukázaly, že nedocházelo pravděpodobně k tvorbě toxických produktů degradace.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioremediace; Kompostování; HPLC; Polycyklické aromatické uhlovodíky

ABSTRACT

Wood contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) represent a serious environmental risk. Composting seems to be an effective method for decontamination of such waste material. PAHs are degraded mainly under aerobic conditions the efficiency of composting could be strongly affected by the process conditions. This work is aimed at the comparison of PAH removal by a 340-days-long composting in laboratory scale composting pilots and a 240-days-long process in a pilot scale. To set up composting piles a „green substrate“ commercially used for button-mushroom production and a grass substrate were used. The use of the grass substrate led to a higher PAHs removal (97% of the initial sum of PAHs) in comparison to the green substrate (81% of the initial sum of PAHs). Further, the effect of the size of wood particles on the PAHs removal efficiency was demonstrated. Analysis of phospholipid fatty acids showed an enhanced growth of gram-negative bacteria and fungi during the composting processes. During the degradation process the enzyme activity of laccase was detected. The ecotoxicological test using a bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* and a seed germination test using seeds of *Hordeum vulgare* L. showed that probably no toxic products were formed during the PAHs degradation in these experiments.

KEYWORDS

Bioremediation; Composting; HPLC; Polycyclic aromatic hydrocarbon

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-----------------|--|
| ABTS | 2,2-azinodi-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonát |
| ASE | Accelerated Solvent Extraction |
| BAC | benz(a)anthracen-7,12-dion |
| DAD | detektor s diodovým polem |
| DMP | 2,6-dimethoxyfenol |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| EI | elektronová ionizace |
| GC | plynová chromatografie |
| HPLC | vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| ISO | International Organization for Standardization |
| JZD | Jednotné zemědělské družstvo |
| K _{oc} | rozdělovací koeficient půdní organický uhlík/voda |
| K _{ow} | rozdělovací koeficient n-oktanol/voda |
| Lac | lakasa |
| LiP | ligninperoxidasa |
| MiP | mangan-independentní peroxidasa |
| MnP | mangan-dependentní peroxidasa |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| PAU | polycyklické aromatické uhlovodíky |
| rpm | otáčky za minutu |
| SDS | sodium dodecyl sulfát |
| US EPA | Environmental Protection Agency of the United States |
| VA | veratryl alkohol |

Obsah

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1. | ÚVOD | 9 |
| 2. | TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 2.1. | Polycyklické aromatické uhlovodíky..... | 10 |
| 2.1.1. | Fyzikálně chemické vlastnosti..... | 10 |
| 2.1.2. | Výskyt PAU v životním prostředí..... | 12 |
| 2.1.3. | Toxicita PAU..... | 15 |
| 2.1.4. | Výskyt PAU v impregnačním kreosotovém oleji..... | 17 |
| 2.2. | Remediace prostředí kontaminovaného PAU..... | 18 |
| 2.2.1. | Fyzikální a chemické metody..... | 19 |
| 2.2.2. | Metody tepelného ošetření..... | 19 |
| 2.2.3. | Bioremediační metody..... | 20 |
| 2.3. | Biodegradace PAU..... | 22 |
| 2.3.1. | Bakteriální degradace PAU..... | 24 |
| 2.3.2. | Houbová degradace PAU..... | 27 |
| 2.4. | Kompostování materiálů kontaminovaných PAU..... | 29 |
| 3. | CÍL PRÁCE | 31 |
| 4. | MATERIÁL A METODY | 32 |
| 4.1. | Použité chemikálie..... | 32 |
| 4.1.1. | Standardy..... | 32 |
| 4.1.2. | Rozpouštědla..... | 32 |
| 4.1.3. | Další chemikálie..... | 32 |
| 4.1.4. | Organismy pro testy toxicity..... | 33 |
| 4.1.5. | Kontaminované dřevo (pražce)..... | 33 |
| 4.1.6. | Kompostovací substráty..... | 33 |
| 4.2. | Přístrojové vybavení..... | 33 |
| 4.3. | Stanovení PAU..... | 34 |
| 4.3.1. | Extrakce PAU metodou ASE..... | 34 |
| 4.3.2. | Stanovení PAU vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií..... | 34 |
| 4.3.3. | Vyhodnocení výsledků..... | 35 |
| 4.4. | Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin (metodou PLFA)..... | 36 |
| 4.4.1. | Příprava vzorků..... | 36 |
| 4.4.2. | Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí..... | 38 |
| 4.5. | Stanovení ergosterolu..... | 39 |
| 4.5.1. | Příprava vzorků..... | 39 |
| 4.5.2. | Stanovení ergosterolu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií..... | 39 |
| 4.6. | Stanovení aktivity ligninolytických enzymů..... | 40 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.6.1. | Lakasa vázaná na matrici vzorku..... | 40 |
| 4.6.2. | Lakasa v extraktu..... | 41 |
| 4.6.3. | Lignin peroxidasa v extraktu | 41 |
| 4.6.4. | Mangan-dependentní peroxidasa v extraktu..... | 41 |
| 4.7. | Testy ekotoxicity..... | 42 |
| 4.7.1. | Test inhibice bioluminiscence bakterií <i>Vibrio fischeri</i> | 42 |
| 4.7.2. | Test klíčivosti semen ječmene (<i>Hordeum vulgare</i> L.)..... | 44 |
| 4.8. | Schéma experimentů..... | 45 |
| 4.8.1. | První kompostovací experiment | 45 |
| 4.8.2. | Druhý kompostovací experiment..... | 46 |
| 4.8.3. | Třetí kompostovací experiment | 46 |
| 5. | VÝSLEDKY | 47 |
| 5.1. | Biodegradace PAU pomocí laboratorního modelového kompostéru - první kompostovací experiment..... | 47 |
| 5.1.1. | Degradace PAU | 47 |
| 5.1.2. | Srovnání vlivu velikosti částic kontaminovaného dřeva na účinnost degradace PAU | 47 |
| 5.1.3. | Stanovení aktivity ligninolytických enzymů | 49 |
| 5.1.4. | Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin | 50 |
| 5.1.5. | Stanovení ergosterolu | 52 |
| 5.1.6. | Stanovení akutní toxicity | 53 |
| 5.1.7. | Stanovení fytotoxicity..... | 54 |
| 5.2. | Bioremediace kontaminovaného dřeva (pražců) pomocí kompostování v pilotním měřítku - druhý kompostovací experiment | 55 |
| 5.2.1. | Degradace PAU | 55 |
| 5.2.2. | Stanovení aktivity ligninolytických enzymů | 56 |
| 5.2.3. | Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin | 57 |
| 5.2.4. | Stanovení ergosterolu | 58 |
| 5.2.5. | Stanovení akutní toxicity | 59 |
| 5.2.6. | Stanovení fytotoxicity..... | 60 |
| 5.3. | Bioremediace kontaminovaného dřeva (pražců) pomocí kompostování v pilotním měřítku - třetí kompostovací experiment..... | 61 |
| 5.3.1. | Degradace PAU | 61 |
| 5.3.2. | Stanovení aktivity ligninolytických enzymů | 62 |
| 5.3.3. | Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin | 63 |
| 5.3.4. | Stanovení ergosterolu | 64 |
| 5.3.5. | Stanovení akutní toxicity | 64 |
| 5.3.6. | Stanovení fytotoxicity..... | 65 |
| 6. | DISKUSE..... | 66 |
| 7. | ZÁVĚR | 71 |
| 8. | LITERATURA..... | 73 |

1. Úvod

Jeden z nejzávažnějších problémů ochrany životního prostředí je znečištění biosféry škodlivými látkami. Mezi látky, které již při nízkých koncentracích vykazují toxické, mutagenní a karcinogenní účinky, patří těžké kovy, řada organických látek a zejména pak i polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Hlavním problémem v případě PAU je fakt, že vznikají neustále (přírozené i antropogenní zdroje viz. níže). PAU jsou nejrozšířenější persistentní organické polutanty na Zemi a protože mají nízkou rozpustnost ve vodě, je jim věnována zvláštní pozornost. Představují významné riziko nejen pro životní prostředí, ale také pro zdraví lidí a zvířat.

Odstranění PAU z prostředí není snadné a ne vždy proveditelné. Fyzikální a chemické metody jsou nákladné a mnohdy nevhodné. Proto se v poslední době vyskytují snahy remediovat kontaminovaná místa použitím biologických metod, zejména pomocí mikroorganismů. Metody různých typů kompostování jsou rychle se rozvíjejícími a moderními postupy. Degradace při nich probíhá pomocí mikroorganismů přítomných v průběhu kompostovacího procesu. Jedná se o činnost nespecifické půdní mikroflory, která je stimulována přidávkou živin, aerací a vhodným zvlhčením kompostu. Jako vhodný proces pro degradaci PAU se jeví klasické kompostování, kde se kontaminované dřevo z železničních pražců (nebo půda) smíchá s kompostovacím substrátem. Kompostovací proces poté prochází čtyřmi fázemi, které se odlišují teplotou a tedy i přítomnou mikroflórou. Vysoká teplota, která uvnitř kompostu dosahuje až 70 °C, může také přispět k desorpci PAU z kontaminované matrice a tím zvýšit jejich biologickou dostupnost.

Důležitým aspektem při provádění biodegradčních pokusů je správné použití analytických metod a vyhodnocení výsledků. To se týká zejména metod separace, kde bychom nedostatečně účinnou metodou mohli získat falešně pozitivní výsledky.

2. Teoretická část

2.1. Polycyklické aromatické uhlovodíky

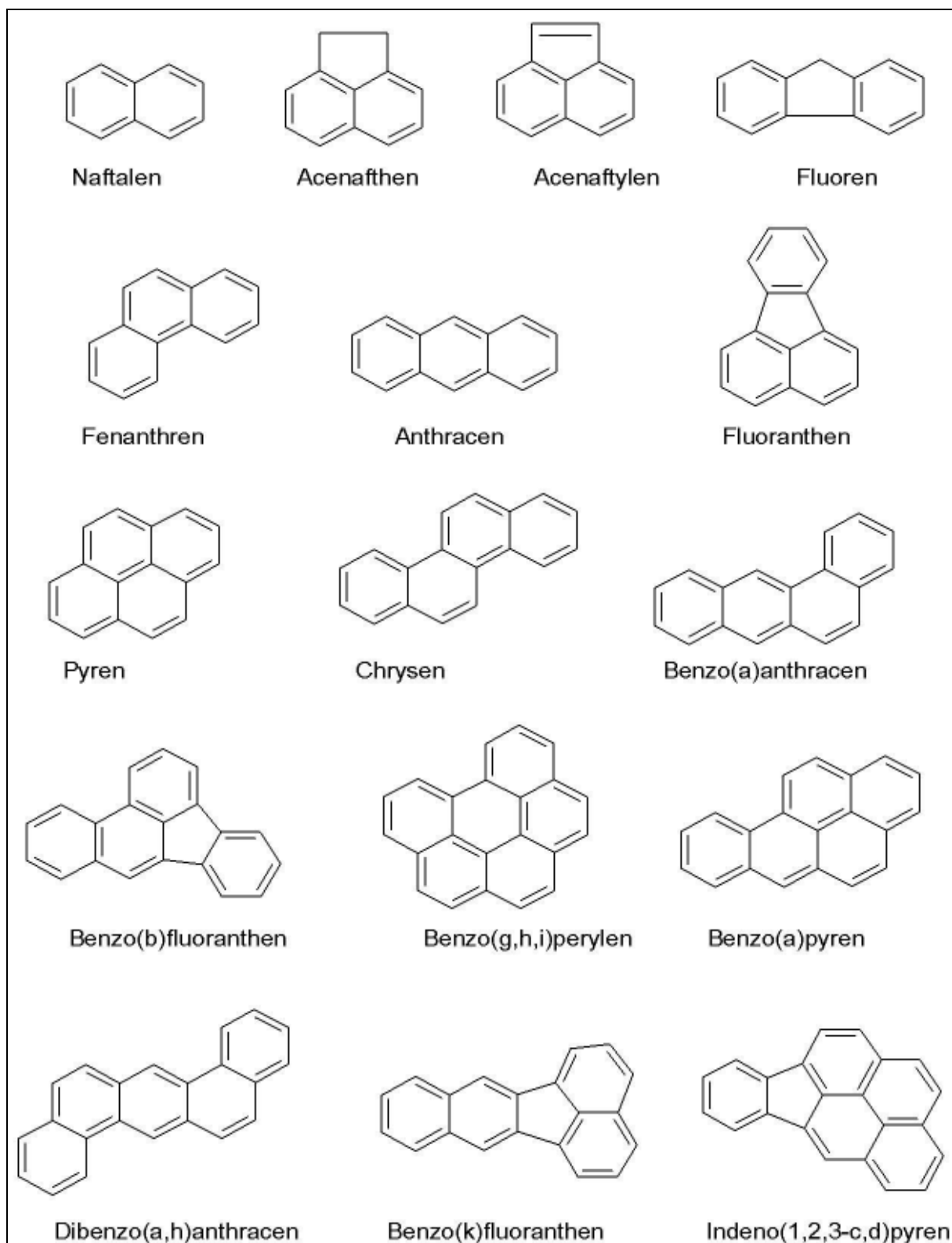
2.1.1. Fyzikálně chemické vlastnosti

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou organické látky, které se skládají ze dvou a více kondenzovaných benzenových jader. S narůstajícím počtem benzenových kruhů narůstá i počet izomerů těchto látek [1]. PAU mohou být různě substituovány. Nejčastěji se vyskytují halogen-, amino-, sulfo-, nitro- a hydroxyderiváty. Sloučenin, které patří do této skupiny, je mnoho. Jen nesubstituovaných (tj. základních) PAU bylo izolováno přes 100 [2]. Organizace United States Environmental Protection Agency (US EPA) zařadila na seznam prioritních polutantů 16 PAU. Struktury nejsledovanějších 16ti představitelů PAU jsou uvedeny na obrázku 1 na straně 11.

PAU jsou hydrofóbní sloučeniny, za normálních podmínek tuhé látky s relativně vysokými body tání a varu. Jejich setrvání v životním prostředí je ovlivněno zejména nízkou rozpustností ve vodě. S rostoucím počtem kondenzovaných benzenových jader v molekule klesá rozpustnost a tenze par, roste bod tání, bod varu a K_{ow} [3]. Stabilita struktur PAU roste od lineárního, přes klastrové k angulárnímu uspořádání. PAU jsou dobře rozpustné v nepolárních alifatických i aromatických uhlovodících (pentan, hexan, benzen, toluen) a v polárních rozpouštědlech (methanol, dichlormethan) [4].

Mezi další významné vlastnosti PAU řadíme jejich schopnost adsorpce na pevné sorbenty nebo jejich částice. Vzhledem k jejich hydrofóbnímu charakteru se PAU nejvíce váží na částice v půdě a sedimentech, které je činí méně dostupné pro organismy. Jejich schopnost sorpce je jeden z hlavních faktorů ovlivňující kumulaci PAU v životním prostředí. V tabulce 1 na straně 12 jsou uvedeny molekulové hmotnosti M_r , teplota tání t_t , teplota varu t_v , rozpustnost ve vodě m_{vaq} , tenze par p , rozdělovací koeficient půdní organický uhlík/voda K_{oc} a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda K_{ow} vybraných PAU.

PAU vykazují charakteristická spektra v ultrafialové oblasti. Jeví také výraznou fluorescenci a některé sloučeniny dokonce fosforescenci. S rostoucí velikostí molekuly PAU jsou absorpční maxima posunuta směrem k delším vlnovým délkám.



Obr. 1: 16 hlavních představitelů PAU (dle US EPA).

Tabulka 1: Základní fyzikálně-chemické vlastnosti PAU [1].

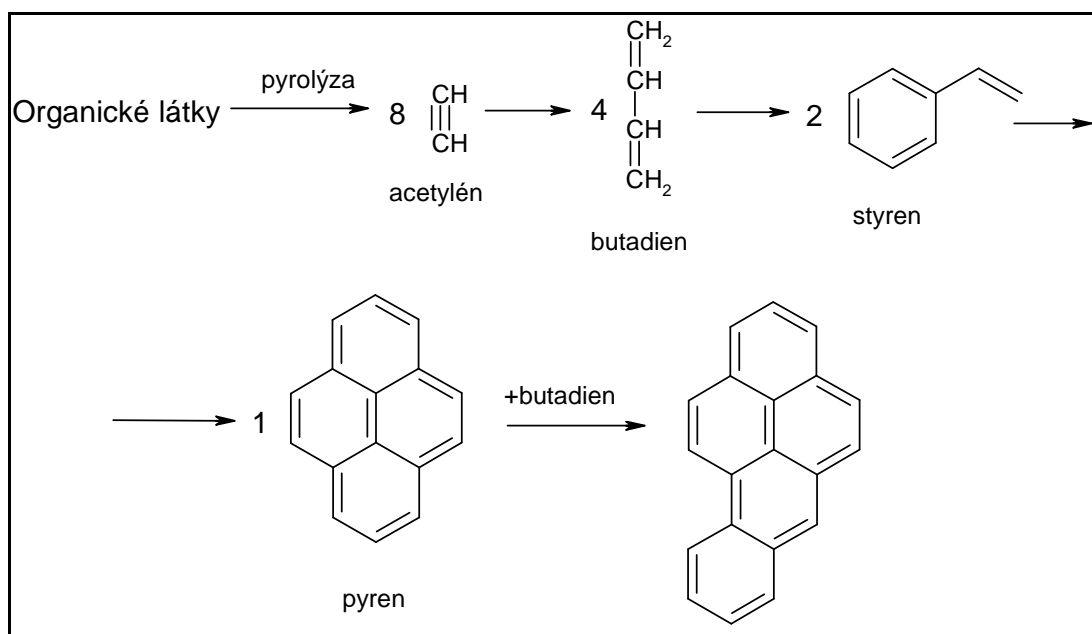
| sloučenina | Mr [g·mol ⁻¹] | t _v [°C] | t _t [°C] | m _{vaq} [g·m ⁻³] | p [Pa] | Log K _{oc} | Log K _{ow} |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|--|-----------------------|---------------------|---------------------|
| naftalen | 128,19 | 218 | 81 | 31 | 10,4 | 2,38-5,00 | 3,37 |
| acenaftnen | 154,10 | 278 | 96 | 3,8 | 3,0·10 ⁻¹ | 3,59-5,38 | 3,92 |
| acenaftylen | 150,20 | – | 92 | 16,1 | 9,0·10 ⁻¹ | 3,40-3,83 | 4,00 |
| fluoren | 166,20 | 295 | 116 | 1,9 | 9,0·10 ⁻² | – | 4,18 |
| fenanthren | 178,20 | 339 | 101 | 1,1 | 2,0·10 ⁻² | 3,90-4,60 | 4,57 |
| anthracen | 178,20 | 340 | 216 | 45·10 ⁻² | 1,0·10 ⁻³ | 2,96-5,76 | 4,54 |
| fluoranthren | 202,30 | 375 | 111 | 2,6·10 ⁻¹ | 1,2·10 ⁻³ | 4,00-6,38 | 5,22 |
| Pyren | 202,30 | 360 | 156 | 1,32·10 ⁻¹ | 6,0·10 ⁻⁴ | 3,11-6,51 | 5,18 |
| chrysen | 228,30 | 448 | 255 | 1,65 | 5,7·10 ⁻⁷ | 3,66-6,90 | 5,86 |
| Benzo(a)anthracen | 228,30 | 435 | 160 | 1,1·10 ⁻² | 2,8·10 ⁻⁵ | 4,00-7,30 | 5,91 |
| Benzo(b)fluoranthren | 252,30 | 481 | 168 | 1,5·10 ⁻³ | – | 5,70-5,74 | 5,80 |
| Benzo(k)fluoranthren | 252,30 | 481 | 217 | 8,0·10 ⁻⁴ | 5,2·10 ⁻⁸ | 4,00-7,00 | 6,00 |
| beno(a)pyren | 252,30 | 495 | 175 | 3,8·10 ⁻³ | 7,0·10 ⁻⁷ | 4,00-8,30 | 6,04 |
| dibenzo(a,h)anthracen | 278,35 | 524 | 267 | 6,0·10 ⁻⁴ | 3,7·10 ⁻¹⁰ | 5,20-7,80 | 6,75 |
| Benzo(g,h,i)perylen | 268,36 | – | 277 | 2,6·10 ⁻⁴ | – | 6,20-6,26 | 6,50 |

2.1.2. Výskyt PAU v životním prostředí

PAU jsou všudypřítomné sloučeniny, které vznikají z přírodních i antropogenních zdrojů. Řada těchto sloučenin byla zahrnuta mezi prioritní znečišťující látky v důsledku jejich toxických, mutagenních a karcinogenních vlastností [5]. Přírozený postup, kterým PAU vznikají, je diagenese, tj. ohřev organických materiálů, ke kterému dochází za relativně nízkých teplot (100 °C až 150 °C) po delší dobu [6]. Dále mohou PAU vznikat jako produkty metabolismu některých bakterií, plísní a vyšších rostlin. Předpokládá se, že lesní požáry mohou být také významným zdrojem PAU [4]. Množství PAU z přírodních zdrojů je v životním prostředí zanedbatelné ve srovnání s množstvím pocházejícím z antropogenní činnosti.

Mezi nejvýznamnější zdroje, z nichž se PAU dostávají do životního prostředí lidskou činností patří průmyslové procesy. Mezi ně patří především výroba uhlí, ropy, elektrárny a teplárny (nejvyšší podíl na emisích PAU až 90 %), spalovny komunálního odpadu, impregnace dřeva, spalování fosilních paliv (zejména při nedostatku kyslíku) nebo organického materiálu a ropné havárie. Nejvyšší obsah PAU byl dosud zjištěn při zplyňování uhlí [7].

PAU kontaminované lokality jsou obvykle spojeny s již uzavřenými nebo stále fungujícími průmyslovými zařízeními. Stejně tak závažné jsou i další neprůmyslové zdroje PAU. Mezi ně patří vytápění domácností a výfukové plyny z automobilů. Průběh pyrosyntézy PAU z organických látek při nedokonalém spalování je na obrázku 2.



Obr. 2: Průběh pyrosyntézy PAU z organických látek při nedokonalém spalování [4].

Výskyt PAU v životním prostředí je ovlivňován především jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. PAU, které mají nízkou molární hmotnost se mohou šířit atmosférou ve formě par a zejména ve formě malých polétavých částic prachu a sazí, na které se PAU sorbují. PAU se vyskytují v plynné fázi obvykle při teplotě vyšší než 150 °C a rychle kondenzují a sorbují se na polétavé částice sazí. Bylo zjištěno, že 85 % PAU v městské atmosféře bylo adsorbováno na částice menší než 5 μm , které jsou definovány jako respirovatelné a mohou proniknout přes horní cesty dýchací do dolních a dokonce i do alveol. Hodnoty PAU

v ovzduší se ve venkovských sídlech pohybují mezi 0,2-1,2 mg·m⁻³ a v městských oblastech mezi 15-19,2 mg·m⁻³ [8].

Nezanedbatelné jsou také koncentrace PAU v potravinách. Koncentrační úrovně některých PAU shrnuje tabulka 2.

Tab. 2: Výskyt představitelů PAU v některých potravinách (μg·kg⁻¹ v sušině) [9].

| potravina | benzo(a)anthracene | chrysen | benzo(a)pyren |
|----------------|--------------------|----------|---------------|
| cereálie | 0,4-6,8 | 0,8-14,5 | 0,25-0,84 |
| špenát | 16,1 | 28 | 7,4 |
| čaj | - | 4,6-6,3 | 3,9-21 |
| jedlý olej | 0,5-13,5 | 0,5-129 | 0,9-1 |
| rajská jablka | 0,3 | 0,5 | 0,2 |
| pečené maso | 0,2-31 | 0,5-25 | 0,2-11 |
| uzené maso | 0,02-189 | 0,3-123 | - |
| pražená káva | 0,5-14 | 0,6-19 | 0,1-4 |
| hlávkový salát | 4,6-15,4 | 5,7-26,5 | 2,8-5,3 |

Kontaminace půd PAU je velice závažná a proto je neustálým předmětem studií z hlediska degradace. Ke kontaminaci půd může dojít během ropné havárie, v okolí plynáren, koksáren či tepelných elektráren, kde se sládkoval popílek nebo kde docházelo k jeho spadu. Hromadění PAU v půdě může vést ke kontaminaci potravního řetězce, která pak vede k přímé nebo nepřímé expozici lidí. Koncentrace PAU v kontaminovaných půdách a sedimentech se mohou pohybovat od μg·kg⁻¹ až po více než 300 g·kg⁻¹ v závislosti na zdroji kontaminace [10]. Kontaminace půd je vážný problém, protože PAU se díky svému hydrofóbnímu charakteru sorbují na pevných částicích v půdě. Takto sorbované jsou méně biologicky dostupné pro biodegradční procesy. Znečištěná půda je znehodnocená a dále již nevyužitelná. Nezanedbatelný zdroj kontaminace tvoří rovněž technické dřevo, např. železniční pražce, které byly v minulosti impregnovány kreosotovým olejem a v současné době jsou odstraňovány a nákladně likvidovány.

Ke kontaminaci vody dochází zejména kontaminovanou podzemní vodou a vodou z řek kontaminovaných průmyslovými nebo městskými splašky. Podle 252/2004 Sb. o hygienických požadavcích na pitnou a teplou vodu a četnost kontrol jsou stanovené limitní koncentrace pro benzo(a)pyren $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (nejvyšší mezní hodnota) a pro sumu PAU $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (nejvyšší mezní hodnota). Limitní hodnota se vztahuje na součet kvantitativně stanovených následujících specifických látek: benzo(b)fluoranthen, benzo(k)fluoranthen, benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyren [11].

2.1.3. Toxicita PAU

Mnohé PAU mohou způsobovat rakovinu, nežádoucí účinky na reprodukci a imunitní systém. Tyto účinky byly prokázány nejen u člověka a savců, ale také u dalších organismů (zejména ptáků, bezobratlých, obojživelníků, ryb a rostlin). U savců může dojít k absorpci PAU dýcháním, stykem s kůží nebo požitím [12], [13].

Karcinogenita a mutagenita PAU úzce souvisí s jejich strukturou, např. benzo(e)pyren je málo karcinogenní oproti benzo(a)pyrenu, který je jeden z nejsilnějších karcinogenů [14]. Obecně je známo, že karcinogenita a mutagenita stoupá se vzrůstajícím počtem kondenzovaných aromatických jader a maxima dosahuje pro PAU s pěti aromatickými kruhy. V roce 2008 bylo organizací US EPA prokázáno, že benzo(a)pyren způsobuje reprodukční problémy, vrozené vady, u březích samic úbytek tělesné hmotnosti potomka, kožní problémy a problémy spojené s vylučovacím systémem. Nicméně tyto účinky nebyly u lidí pozorovány [15].

PAU jsou v organismu distribuovány do tkání a mají tendenci lokalizovat se v tělesném tuku [16]. PAU jsou eukaryotickými organismy metabolizovány prostřednictvím cytochromu P450 monooxygenasy a epoxid hydrolasy, dochází k aktivaci PAU jejich převedením na fenoly a trans-dihydrodioly. Ty se dále mohou přeměnit na diol-epoxydy, které jsou vysoce karcinogenní [12], [17].

Faktory karcinogenity vybraných PAU vyjádřeny ve vztahu k benzo(a)pyrenu jsou shrnuty v tabulce 3 na straně 16.

Tab. 3: Faktor karcinogenity u 16 PAU vybraných organizací US EPA [18].

| PAU | Faktor karcinogenity | PAU | Faktor karcinogenity |
|---------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| naftalen | 0,001 | benzo(a)anthracen | 0,1 |
| acenaftthen | 0,001 | chrysen | 0,01 |
| acenaftthylen | 0,001 | benzo(b)fluoranthen | 0, 1 |
| Fluoren | 0,001 | benzo(k)fluoranthen | 0,1 |
| fenanthren | 0,001 | benzo(a)pyren | 1 |
| anthracen | 0,01 | indeno(1,2,3-c,d)pyren | 0,1 |
| fluoranthen | 0,001 | dibenzo(a,h)anthracen | 5 |
| Pyren | 0,001 | benzo(g,h,i)perylene | 0,1 |

Příklady vybraných PAU podle US EPA a jejich účinků na organismus [15]:

Naftalen se do těla dostává dýcháním kontaminovaného vzduchu, pokožkou při styku s kontaminovanou půdou, požíváním kontaminovaných potravin nebo vody a vdechováním tabákového kouře. Kovalentně se váže na molekuly v játrech, ledvinách a plicních tkáních. Dále je to inhibitor mitochondriálního dýchání [19]. Akutní otrava naftalenum u lidí může vést k hemolytické anémii a nefrotoxicitě, kromě toho jsou také známé kožní problémy a oční vady.

Fenanthren se do těla dostává dýcháním kontaminovaného vzduchu, pokožkou při styku s kontaminovanou půdou, požíváním kontaminovaných potravin nebo vody a vdechováním tabákového kouře. Je klasifikován jako mírný alergen a poškozují kůži.

Anthracen se do těla dostává stejným způsobem jako fenanthren a naftalen. Vystavení vysokým dávkám anthracenu po krátkou dobu může způsobit poškození kůže, to se projeví jejím pálením, svěděním a otokem. Lidé vystavení vysokým dávkám anthracenu trpěli pocitem slabosti, bolestí hlavy, nevolností, ztrátou chuti k jídlu, záněty žaludku a střev.

Prozatím není dostatek informací o toxických účincích na savce pro ostatní PAU jako je acenaftthen, flluoranthen a fluoren. Dále byla sledována toxicita u benzo(a)pyrenu, benzo(a)anthracenu, benzo(b)fluoranthenu, benzo(k)fluranthenu, dibenzo(a,h)anthracenu a indeno(1,2,3-c,d)pyrenu, ale pro nedostatek experimentálních důkazů nemohou být prokázány jako karcinogeny [20].

2.1.4. Výskyt PAU v impregnačním kreosotovém oleji

Kreosot je vedlejším produktem destilace ropy. Destilační rozmezí kreosotu je od 200-400 °C. Je to směs několika set až tisíce chemických sloučenin. Obsah sloučenin v kreosotu se rozděluje do 6ti hlavních tříd [21]:

- aromatické uhlovodíky, včetně PAU a alkylovaných PAU (až 90 % složení kreosotu)
- dehtové kyseliny/fenoly
- dehtové báze/heterocykly obsahující dusík
- aromatické aminy
- heterocykly obsahující síru
- heterocykly obsahující kyslík včetně dibenzofuranů

Dále kreosot obsahuje vysoké koncentrace těžkých kovů.

Kreosot se používá k impregnaci dřeva, např. železničních pražců, telegrafních sloupů, dřeva pro stavbu v lagunách, řekách a na pobřežích. Takto ošetřené dřevo je odolné vůči vnějším podmínkám a napadení hmyzem. Také je zpomalen přírodní rozklad dřeva a jeho životnost se prodlouží o 10 až 30 let v závislosti na typu dřeva a stupni impregnace. Dřevo ošetřené kreosotem by nemělo být používáno při výrobě zahradního nábytku, kde dochází ke styku s holou kůží, v interiérech obytných a hospodářských budov, kde může dojít ke styku s domácími nebo hospodářskými zvířaty, při výstavbě včelích úlů, při výrobě prostor pro skladování siláže, potravin apod. [22].

Charakteristické pro impregnované dřevo je tzv. „krvácení“ neboli výron kreosotu. Tento výron zůstává v kapalném stavu, nebo ztuhne do polotvrdého stavu a může docházet k vypařování chemických sloučenin do atmosféry. Výron kreosotu trvá po mnoho let a je podpořen teplým a slunečným počasím [21].

Chemické sloučeniny kreosotu se v atmosféře vyskytují v plynné formě a ve formě částic. Rozdělení mezi dvěma fázemi závisí na tlaku par různých složek kreosotu. Sloučeniny, které mají tlaky par vyšší než 10^{-9} kPa se vyskytují převážně v plynné fázi a sloučeniny s nižšími tlaky par než 10^{-5} kPa se vyskytují ve formě částic [23].

Ke kontaminaci podzemních a povrchových vod dochází například únikem nebo rozlitím kreosotu z přepravních nebo skladovacích nádob. Za pomoci průzkumných vrtů bylo zjištěno, že oblak kreosotu se pohyboval svisle půdním horizontem a následně ve směru proudění podzemních vod. PAU a další organické sloučeniny byly přepravovány podzemními vodami, které tekly u ústí řek a při pobřežních vodách [24]. Kontaminace kreosotem byla zjištěna u ryb a mořských živočichů. V některých případech, především u ryb, byl prokázán výskyt metabolitů PAU [25].

Některé chemické sloučeniny kreosotu jsou snadno odbouratelné prostřednictvím biotických (aerobně, anaerobně) a abiotických procesů, i přesto mnoho vysokomolekulárních látek zůstává v životním prostředí po celá desetiletí. Mezi hlavní kontaminanty životního prostředí pocházející z kreosotu patří nejen PAU, ale také heterocyklické aromatické a fenolické sloučeniny [22]. Impregnace technického dřeva kreosotem mohou mít negativní dopady na životní prostředí. Loužení kreosotu z takto ošetřeného dřeva je hlavní zdroj emisí a s tím jsou spojena i potencionální rizika.

2.2. Remediací prostředí kontaminovaného PAU

Ministerstvo životního prostředí ČR v roce 1997 vydalo vyhlášku 338/1997 o podrobnostech nakládání s odpady, kde půda kontaminovaná PAU podléhá pravidlům o nakládání s nebezpečným odpadem. Pokud koncentrace PAU v půdě přesáhne stanovený limit, musí dojít k sanaci takto kontaminovaného prostředí. Rozvoj sanačních technologií, výzkum a vývoj nových technik a jejich zavedení do praxe zaznamenal největší rozvoj ve druhé polovině 20. století. Optimální sanační postupy a nové technologie mohou významně ovlivnit průběh sanací, snížit finanční náročnost a zkrátit potřebný čas.

Moderní postupy sanačních technologií mají za cíl úplné odstranění PAU, nebo alespoň jejich převedení na méně toxické látky. Sanační technologie se dají rozdělit na:

Technologie „*in situ*“ – kontaminovaná půda je ošetřena v místě znečištění, ale průběh sanace je obtížněji kontrolovatelný, náklady jsou nižší.

Technologie „*ex situ*“ – kontaminovaná půda je v místě znečištění vytěžena a k sanaci dochází buď na místě vytěžení („*on site*“), nebo je převezena na jiné místo vhodné k sanaci („*off site*“).

2.2.1. Fyzikální a chemické metody

Fyzikálně chemické procesy jsou většinou procesy extrakční, které se používají také *in situ*. Míra použití se liší vzhledem k technické a ekonomické náročnosti.

- Chemická oxidace spočívá v infiltraci vodného roztoku oxidačního činidla do nenasycované zóny tak, aby došlo k destrukci přítomných PAU. Jako oxidační činidla se používají manganistan draselný, peroxid vodíku a ozón [26]. Konečné produkty oxidačních reakcí jsou oxid uhličitý, voda, sloučeniny železa a oxidy manganu, které se v přírodě zcela běžně vyskytují. Metoda je rychlá a účinná i v případě malé propustnosti prostředí.
- Vymývání půdy je metoda, která spočívá v aplikaci vymývacího roztoku do znečištěného prostředí. Dochází k uvolnění kontaminujících látek a jejich převedení do roztoku. Vymývací roztok může být voda, pokud jsou látky ve vodě dobře rozpustné, nebo se pro zvýšení účinnosti používají vodné roztoky kyselin, zásad či povrchově aktivních látek.
- Venting se řadí mezi levné a účinné základní sanační technologie. Princip této metody je založen na odsávání znečištěného půdního vzduchu ventingovou čistící stanicí. Vzduch je poté na povrchu přečištěn a vypuštěn do atmosféry. Venting se používá jak ve formě *in situ* tak *ex situ*.
- Solidifikace a stabilizace je metoda vhodná jak pro technologii *in situ* tak *ex situ*. Metoda spočívá v promíchání dekontaminovaného materiálu s pojivem (cement, popílek, vysokopecní struska nebo vápený hydrát) nebo podpůrnými chemickými činidly. Při stabilizaci dochází k chemické reakci s pojivem a tím ke snížení nebo odstranění toxických vlastností. Při solidifikaci dochází k uzavření již méně toxických látek do inertní a málo propustné matrice [27].

2.2.2. Metody tepelného ošetření

Metody jsou mnohdy nákladné, ale také jedny z neúčinnějších. Zvýšením teploty se zvýší rozpustnost PAU a tím se také zvýší desorpce PAU z povrchu půdy [28].

- Termická desorpce se používá především pro technologie *ex situ*. Kontaminovaná půda je vystavena vysokým teplotám do 600 °C, dochází k desorpci PAU z půdy a jejich převedení do plynné fáze. Dekontaminovaný materiál si zachovává své mechanické vlastnosti a může být opětovně použit na zásyp sanované lokality. Podle

provozní teploty desorbéru se termická desorpce dělí na: nízkoteplotní termickou desorpci (90 °C až 320 °C) a vysokoteplotní termickou desorpci (320 °C až 600 °C) [28].

- Spalování (za přítomnosti kyslíku) kontaminované půdy probíhá při vysokých teplotách 870 °C až 1200 °C, k podpoře hoření jsou často používána podpůrná paliva. Spaliny se před vypouštěním do atmosféry čistí podobně jako v tepelných elektrárnách.
- Vstřikování vodní páry je metoda, která uvolňuje PAU z matrice, a ty mohou být odsávány vakuovou extrakcí půdního vzduchu nebo odčerpávány jako volná fáze z hladiny podzemní vody. Tato metoda je vhodná pro zeminy s nízkou propustností a s mělkou kontaminací [27].

2.2.3. Bioremediační metody

Bioremediační metody jsou postupy využívající jevu biodegradace polutantů pomocí organismů (viz. kapitola 2.3. Biodegradace PAU). Výhodou takové technologie je její snadnost, případná nízká cena, malý dopad pro životní prostředí a rovněž možnost provádět remediaci *in situ*.

Bioremediační metody mají však rovněž limitující faktory, mezi které patří, že polutant musí být biologicky dostupný a v kontaminovaném prostředí nesmí působit inhibiční faktory znemožňující biologický rozklad. Dále musí být zajištěny vhodné podmínky pro mikroorganismy jako je dostatek vlhkosti, pH a redox potenciál prostředí, vhodná teplota a dostatek živin. Velice důležitá je dostatečná areace, protože PAU mohou být rozkládány téměř výlučně aerobně.

Mezi nejčastější bioremediační metody patří:

- Bioventing se řadí mezi technologie *in situ*. Principem této metody je vhánění kyslíku do kontaminované půdy pro usnadnění aerobní mikrobiální degradace. Vháněné množství vzduchu je velmi malé, a proto nedochází ke strhávání a odnášení polutantů do atmosféry. Aby bioventing mohl být úspěšný, je potřeba dodržet dvě základní podmínky. Průtok vzduchu musí mít dostatečnou rychlost pro zajištění aerobních podmínek v půdě a v kontaminované lokalitě se musí nacházet mikroorganismy schopné degradovat příslušné PAU [27].
- Podporovaná bioremediace je metoda, při které se vpravují živiny (kyslík, nitráty, dusík, fosfáty a uhlík jako zdroj energie) do kontaminované půdy pro podporu

autochtonních mikroorganismů. Podporovaná bioremediace zajišťuje zvýšenou rychlost a účinnost biologického rozkladu polutantů.

- Fytoremediace jsou také nazývány jako „zelené remediace“. Některé rostlinné druhy jsou schopné degradace, extrakce či imobilizace kontaminantů v půdě či vodě. Fytoremediace jsou pomalejší než klasické remediační metody, a proto je nelze použít tam, kde je třeba dosáhnout limitů sanace za krátkou dobu. Rostliny odstraňují organické sloučeniny přímým příjmem kontaminantů, poté následuje transformace, transport a akumulace nefytotoxických produktů [29]. Fytoremediace se většinou využívají *in situ*, ale mohou být také použity i pro dekontaminaci vytěženého materiálu.
- Kompostování je řízený biologický proces, kdy se vytěžená kontaminovaná zemina, sediment nebo jiný materiál smíchá s vhodným kompostovacím substrátem, jako je dřevná štěpka, piliny, sláma, kůra a zelený odpad. Musí být dosaženo dobré porozity a vhodného poměru C : N. Tento poměr musí být optimální pro termofilní biologický rozklad (většinou 30 : 1). Základka je intenzivně provzdušňována a přítomné polutanty jsou aerobně biologicky rozkládány nebo transformovány za termofilních podmínek a částečně také sorbovány na vznikající huminové látky. Investičně náročnější, ale nejefektivnější je kompostování v uzavřené řízené kompostovací jednotce. Jsou to většinou tunely nebo boxy s nuceným provzdušňováním. Dále kompostování může probíhat ve statických hromadách s nuceným provzdušňováním, ale zde jsou jisté nedostatky. Dochází k nehomogenní distribuci kyslíku a to má za následek lokální vysušování kompostu [27]. Tato metoda se řadí mezi technologie *ex situ*.
- Landfarming je proces založený na aerobním biologickém rozkladu polutantů v tenké vrstvě. Na plochu, k tomu určenou, se naveze kontaminovaný materiál, který se rozprostře do tenké vrstvy (25 až 30 cm). Dále je materiál orán nebo kypřen a zásobován živinami. V průběhu procesu se upravuje pH, které by mělo být v rozmezí 6 až 8 [30]. Landfarming je jednoduchý a účinný proces především pro odstraňování ropných produktů a některých derivátů PAU. Mezi nevýhody tohoto procesu patří omezená hloubka ošetřované vrstvy, nemožnost zachytu těkavých složek a jejich únik do atmosféry. Nelze kontrolovat podmínky procesu, a proto je nejvhodnější pouze pro teplé oblasti. Tato metoda se řadí mezi *on situ* metody, protože kontaminovaná půda je zpracovávána v blízkosti svého vytěžení.

- Mykoremediace patří do specifického odvětví augmentačních bioremediačních postupů. Název napovídá, že k degradaci polutantů se využívají různé druhy hub. Velmi slibnou metodou se zdá být použití hub bílé hniloby, které produkují extracelulární enzymy. Kromě svého přirozeného substrátu jsou tyto enzymy schopné degradovat a do určité míry mineralizovat široké spektrum organických a cizorodých látek.

2.3. *Biodegradace PAU*

Biodegradace je jev, při kterém se PAU stávají součástí metabolismu mikroorganismů a tím jsou odbourávány. PAU jsou metabolizovány nejrůznějšími mikroorganismy jako jsou bakterie, houby a řasy. V ideálním případě dochází k mineralizaci PAU, tedy k úplnému rozkladu až na oxid uhličitý a vodu.

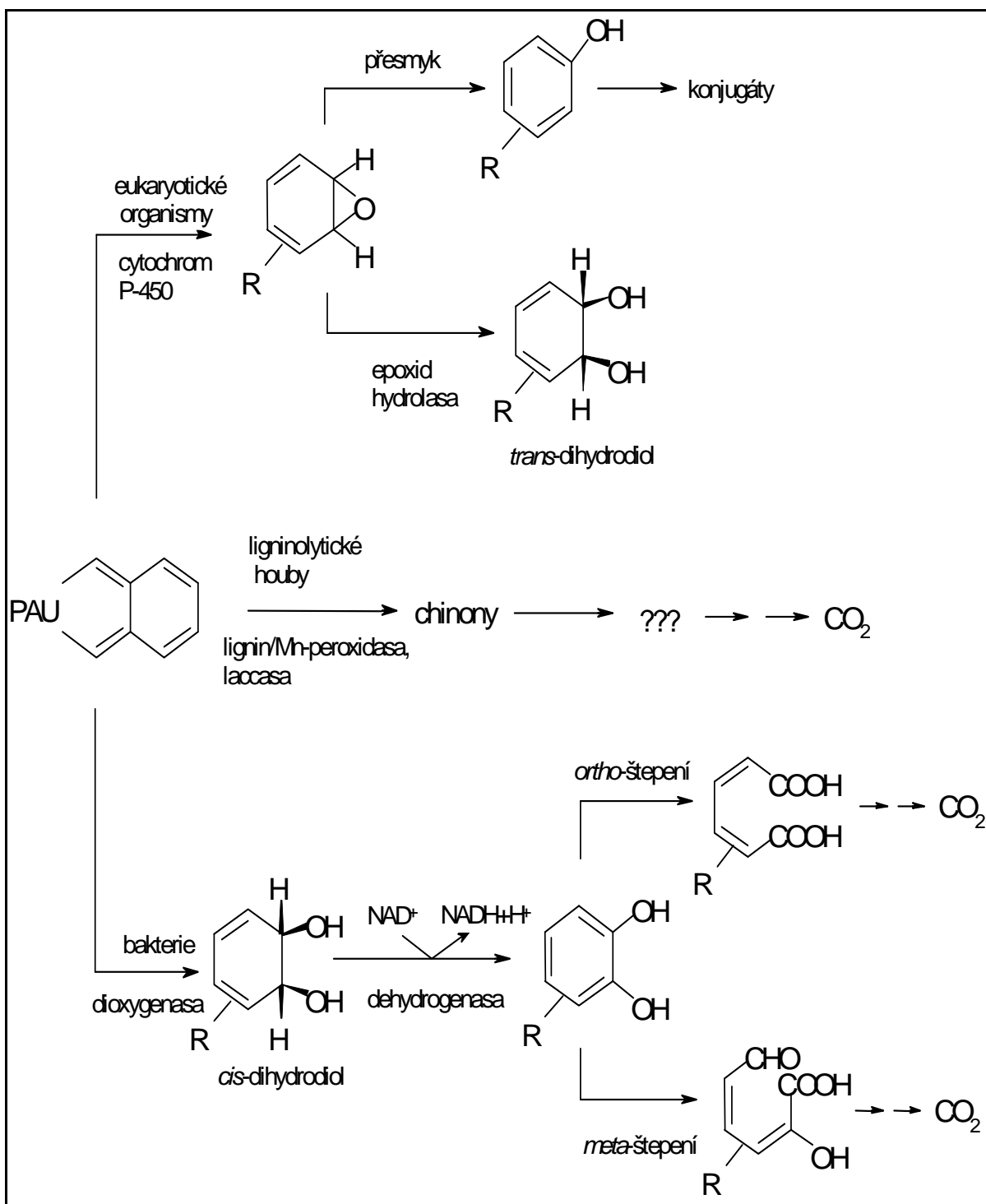
Degradace PAU závisí na podmínkách prostředí, počtu a druhu mikroorganismů, struktuře chemických sloučenin a na míře kontaminace prostředí [3]. Rychlost biologického rozkladu závisí na pH, teplotě, kyslíku, mikrobiální populaci a stupni její aklimatizace a dostupnosti živin. Na obrázku 3 na straně 23 jsou uvedeny tři hlavní způsoby mikrobiálního metabolismu PAU [31].

Některé druhy vláknitých hub využívají cytochrom P450 k oxidaci PAU [32]. Vzniká arenoxid, který je hydrolyzován epoxid hydrolasou na *trans*-dihydrodiol nebo je přeměněn na hydroxy derivát, který může podlehnout konjugaci s jinými látkami [33].

Zvláštní skupinou jsou tzv. „houby bílé hniloby“. Při degradaci PAU pomocí jimi produkováných ligninolytických enzymů dochází k nespecifické radikálové jednoelektronové oxidaci za vzniku chinonů [34]. Mezi tyto enzymy patří lignin peroxidasa, mangan dependentní peroxidasa a lakasa [35].

Bakteriální degradace je zahájena intracelulárním enzymem dioxygenasou, kdy dochází k navázání dvou atomů kyslíku za vzniku *cis*-dihydrodiolu. Vzniklé látky jsou dále dehydrogenovány enzymem *cis*-dihydrodiol dehydrogenasa za vzniku dihydroxylovaného aromatického jádra. Poté dochází k dalšímu štěpení aromatického jádra katalyzovanému v poloze *ortho* intradiol-dioxygenasami nebo v poloze *meta* pomocí extradiol-dioxygenas [33], [36].

Bakterie, které jsou schopny degradovat PAU, byly opakovaně izolovány především ze vzorků půdy. Většina z nich patří k rodu *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus* [37], [38].



Obr. 3: Obecné schéma biodegradace PAU.

2.3.1. Bakteriální degradace PAU

Nejvíce prostudovaným organismem pro bakteriální degradace PAU jsou bakterie rodu *Pseudomonas*, které již dříve byly použity při studiu degradace benzenu a jeho derivátů [39]. Postup degradace je znázorněn na obrázku 4 na straně 25. Principy těchto drah jsou obecné a platí i pro degradace polycyklických systémů.

Na obrázku 5 na straně 26 je znázorněn postup odbourávání naftalenu bakteriemi. Jak bylo již výše uvedeno, degradace je zahájena pomocí multienzymového komplexu naftalen dioxygenasy v poloze 1,2 za vzniku *cis*-1,2-dihydronaftalen diolu. Ten je dále dehydrogenován za vzniku 1,2-dihydroxy naftalenu. Aromatický kruh je poté rozštěpen extradiol dioxygenasou. Aldolasa odštěpuje pyruvát, vzniká salicylaldehyd, který je oxidován na salicylovou kyselinu.

Tato kyselina může být oxidována pomocí monooxygenasy za vzniku *o*-katecholu, který podléhá *ortho* nebo *meta* rozštěpení [31], [36].

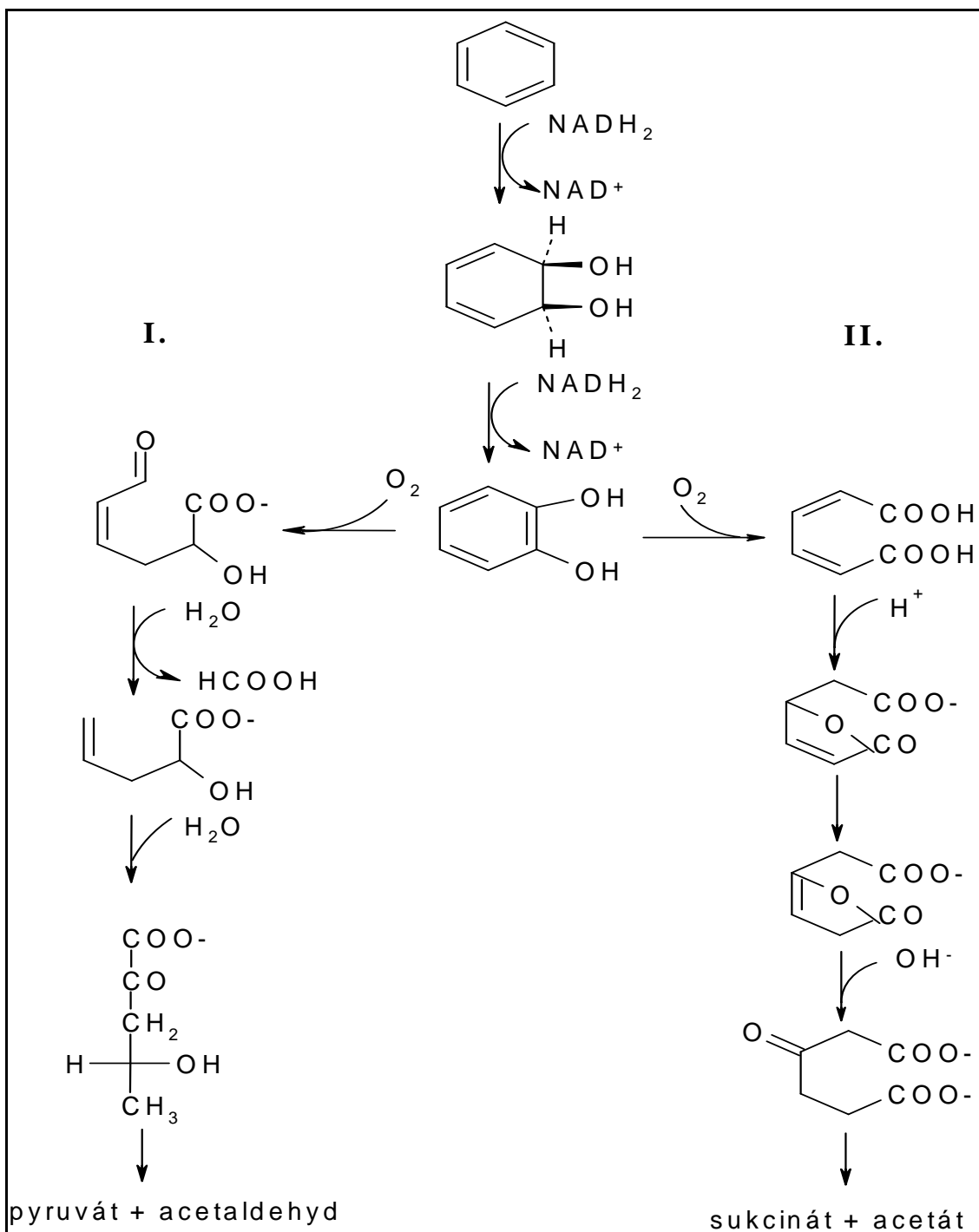
Antracen může být zcela mineralizován bakteriemi rodu *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Beijerinckia*, *Rhodococcus* a *Mycobacterium* [40]. Postup odbourávání je obdobný jako u naftalenu, ale po dekarboxylaci 2-hydroxy-3-naftalen karboxylové kyseliny vzniká 2,3-dihydroxy naftalen. Nejspíš probíhá opět *meta* štěpení a dochází k tvorbě kyseliny ftalové, která je dekarboxylována na kyselinu salicylovou a degradace probíhá opět přes katechol [38].

Různé druhy bakterií rodu *Mycobacterium* metabolizují fenanthren na různých místech molekuly. Například bakterie rodu *Pseudomonas* a *Nocardia* oxidují fenantren v poloze 3,4, u jiných začíná atak v poloze 1,2. Studie drah metabolismu fenantrenu byly prováděny s mnoha druhy bakterií rodu *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium* a *Nocardia* [38].

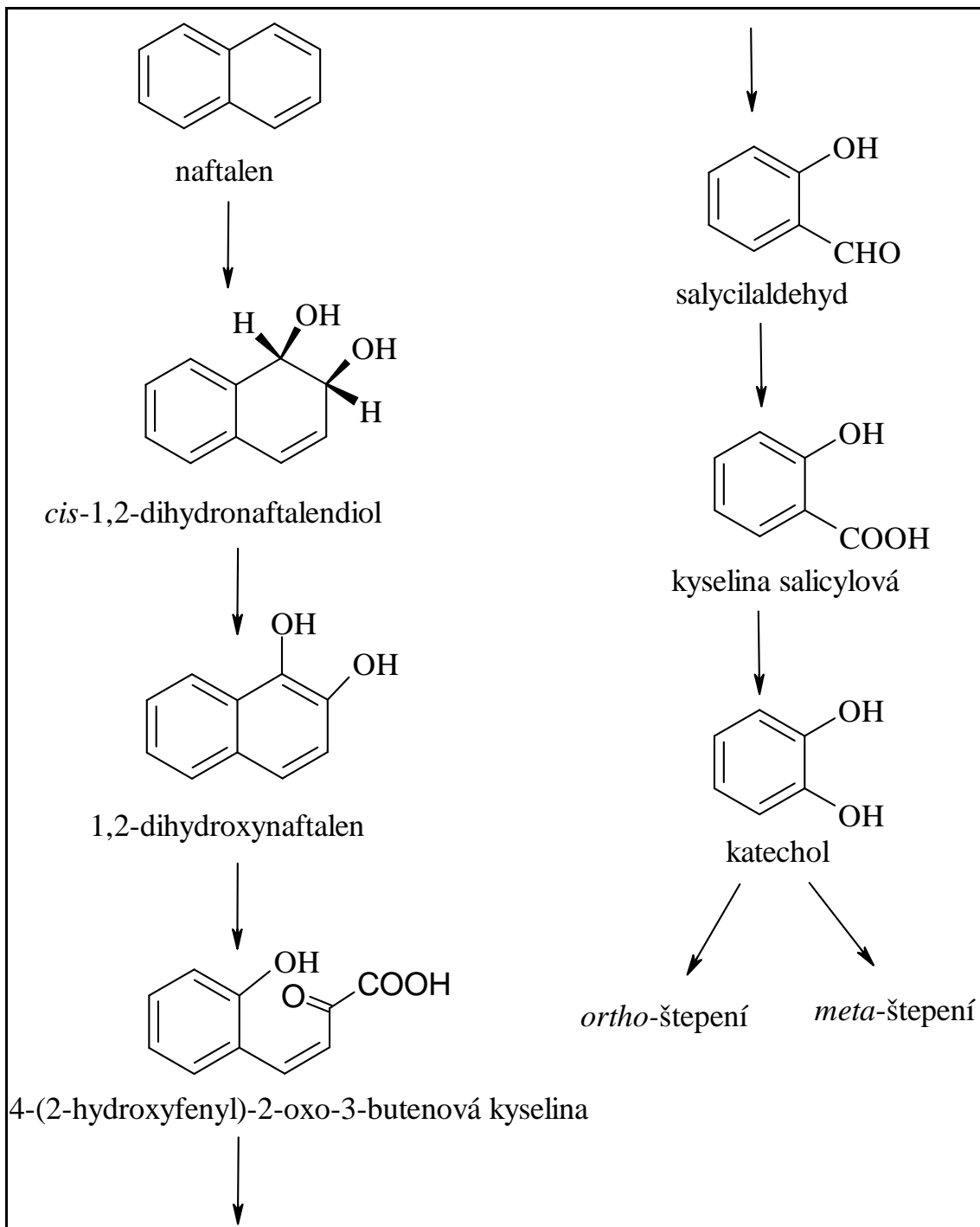
Degradace fluorenu může probíhat třemi různými způsoby. U jednoho způsobu se kumuluje 4-hydroxo-9-fluorenol a u zbylých způsobů se tvoří 2-formyl-1-indanon [3].

Fluoranthren je především degradován bakteriemi rodu *Mycobacterium* a *Alcaligenes*. Začátek degradace je zahájen opět dioxygenasou v poloze 7,8 a vzniká 7-acetnaftenon nebo v poloze 1,2 a vzniká 9-fluorenol [38].

Bakterie využívají PAU jako zdroj uhlíku a mohou být také využity pro výstavbu biomasy. Pro mnohé bakterie nebyla dosud objasněna kompletní metabolická dráha. Je nutné neustálé sledování průběhu degradace PAU, aby nedocházelo ke kontaminaci prostředí toxicitějšími produkty degradace



Obr. 4: Mechanismus degradace benzenu bakteriemi (I.- *meta* štěpení, II. – *ortho* štěpení).



Obr. 5: Postup odbourávání naftalenu bakteriemi.

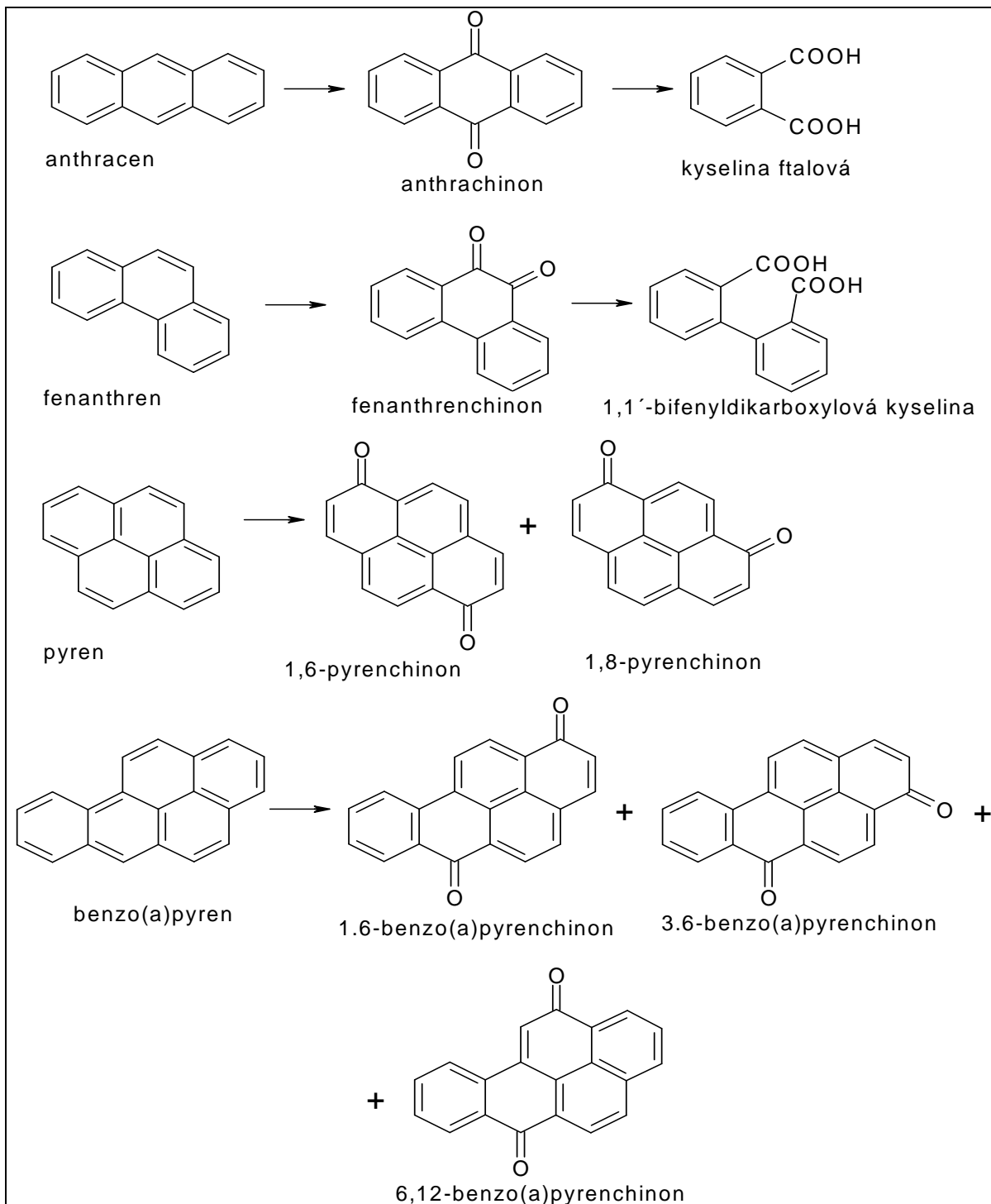
2.3.2. Houbová degradace PAU

Houby jsou eukaryotní, heterotrofní organismy. Neobsahují chlorofyl a proto přijímají živiny z prostředí ve formě organických látek. Je prokázáno, že houby používají k oxidaci PAU cytochrom P450 stejně jako například savci. Děj je součástí sekundárního metabolismu hub a nevede k získání energie nebo zdroje dusíku. Jde o děj detoxifikační a nedochází při něm k rozštěpení aromatického kruhu. Dochází k oxidaci za vzniku reaktivního arenoxidu, ze kterého vznikají hydrolyzou *trans*-dioly, ze kterých může přesmykem vzniknout hydroxy derivát. Ten může být detoxifikován jako glukuronid, glukosid, sulfát atd. [41]. Z hydroxylovaných derivátů mohou v některých případech vzniknout také chinony, které jsou prokázané mutageny [42]. *Trans*-dioly byly zjištěny v případě houby *Cunninghamella elegans*, a to pro naftalen (v poloze 1,2), fenanthren (1,2; 3,4 a 9,10), fluoranthen (2,3), benzo(a)anthracen (8,9; 10,11 a 3,4) a benzo(a)pyren (4,5; 9,10 a 7,8) [32]. V případě *Cunninghamella elegans* a benzo(a)anthracenu byly detekovány i 8,9,10,11-tetraoly [43].

Jak již bylo zmíněno, zvláštní skupina dřevokazných hub, které jsou také označovány jako houby bílé hniloby, produkují ligninolytické enzymy, které degradují lignin. Rozložení ligninu u napadeného dřeva vede k jeho vybělení, odtud také název „houby bílé hniloby“ [44].

Díky nízké substrátové specifitě mohou ligninolytické enzymy hub bílé hniloby degradovat perzistentní aromatické polutanty podobné strukturou ligninu. Mezi tyto polutanty patří PAU, chlorfanoly, chloraniliny, polychlorované bifenyly, dioxiny, nitroaromáty, herbicidy a pesticidy [45]. Při degradaci za pomoci těchto enzymů dochází k nespecifické radikálové jednoelektronové oxidaci. Ligninolytické enzymy vyprodukují kation-radikál, který difunduje do prostředí a funguje jako mediátor mezi enzymem a substrátem [46]. Produkty degradace některých PAU houbou *Phanerochaete chrysosporium*, která je nejvíce prostudovaná, jsou uvedeny na obrázku 6 na straně 28 [47]. V literatuře lze také nalézt publikace, kde byly houby bílé hniloby použity pro biodegradaci PAU v kontaminovaném dřevě [48], [49].

Mezi nejprostudovanější ligninolytické enzymy patří lignin peroxidasa (E.C. 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidasa (E.C. 1.11.1.13), lakasa (E.C. 1.10.3.2) a versatilní peroxidasa (E.C. 1.11.1.16) [35].



Obr. 6: Produkty degradace některých PAU ligninolytickou houbou *Phanerochaete chrysosporium*.

2.4. *Kompostování materiálů kontaminovaných PAU*

Kompostování je považováno za vhodnou technologii pro bioremediace kontaminovaných půd, sedimentů, kalů a jiných materiálů jako je například kontaminované dřevo. Fyzikální, chemické a biologické faktory ovlivňují proces kompostování a určují biologickou dostupnost kontaminujících látek [50]. Autoři Cajthaml a kol. (2002), Cajthaml a kol. (2005) a Cai a kol. (2007) prokázali, že kompostování je efektivní metoda degradace PAU jak v laboratorním, tak pilotním měřítku [51], [52], [53].

Kompostování je řízený biologický proces, kterým se mohou odbourávat organické polutanty při aerobních i anaerobních podmínkách. Jak již bylo výše zmíněno, kontaminovaný materiál se smíchá s vhodným kompostovacím substrátem, jehož výběr je důležitý pro zajištění vhodné porozitosti kompostu a také pro zajištění potřebného poměru C : N. Důležité je také udržování teploty a především vlhkosti kompostu (optimální vlhkost se pohybuje v rozmezí 40 % až 60 % m/m). Pokud je zajištěn dostatečný přísun kyslíku v systému a vyšší přídavek organických materiálů, tak kompost snadněji dosáhne termofilních podmínek v základce. Přítomnost snadno rozložitelných organických materiálů v základce stimuluje aktivitu mikroorganismů a podporuje biologický rozklad PAU. Na biologickém rozkladu polutantů se podílí komplexní mikrobiální konsorcium obsahující bakterie, aktinomycety, nižší houby, kvasinky a některé další organismy. Změny mikrobiálních společenstev v průběhu kompostování kontaminované zeminy PAU sledovali autoři Blanca Antizar-Ladislao a kol. (2005) a Blanca Antizar-Ladislao a kol. (2008) [54], [55]. Stanovením fosfolipidických markerových mastných kyselin (PLFA) zjistili, že mikrobiální společenstva jsou ovlivněna teplotou v průběhu kompostovacího procesu. Kompostovací proces lze z teplotního hlediska rozdělit do čtyř fází: mezofilní (35 – 45 °C, výskyt mezofilních organismů), termofilní (45 – 75 °C, výskyt termofilních sporulujících bakterií a termofilních hub), chladnutí (výskyt mezofilních hub a bakterií, jejichž spory přetrvávají termofilní fázi) a zrání, kdy se kompost jeví jako stabilní.

Většina publikací je zaměřena na degradaci PAU v kontaminovaných půdách a kalech [56], [57], [58]. V literatuře lze v podstatě nalézt pouze jednu publikaci, kde se Löser a kol. (2004) zabývali degradací PAU v odpadním dřevě metodou kompostování [59]. Sledovali vliv teploty, přídávku močoviny a dusičnanů na degradaci PAU v průběhu kompostování. Zjistili, že k nejrychlejší a nejrozsáhlejší degradaci PAU a mineralizaci dřeva došlo při teplotě 30 °C. S přídávkem močoviny jako zdroje dusíku došlo opět ke zrychlení degradace PAU. Nicméně s přídávkem dusíku (větším než 2 g·kg⁻¹) ve formě dusičnanu byl zaznamenán

výrazný pokles degradace PAU. Jiní autoři se zabývali degradací PAU v kontaminované půdě uhelným dehtem v okolí plynáren ve Velké Británii [60]. Půda byla smíchána se substrátem, který byl připraven ze směsi potravin (mrkev, okurka, hlávkový salát, cibule, brambory a rajčata vše ve stejném poměru), pilin (sušina 38 % m/m), listů (sušina 17 % m/m), trávy (sušina 27 % m/m) a pšeničné slámy (sušina 14 % m/m). Tento experiment prokázal, že teplota 38 °C a vlhkost v rozmezí od 60 % - 80 % (m/m) jsou optimální parametry kompostování pro degradaci lehkých i těžkých PAU.

Kompostování kontaminovaných zemín bylo v 90. letech zkoušeno i v ČR jako způsob odstranění ropných uhlovodíků. V současnosti se spíše využívá ke snížení jejich koncentrací v kalech a dosažení limitů pro jejich uložení na skládky [27].

3. Cíl práce

- Sledování efektivity odstranění PAU z kontaminovaného dřeva (pražce) kompostováním
- Srovnání vlivu dvou různých kompostovacích substrátů na degradaci PAU
- Srovnání vlivu velikosti kontaminovaného dřeva na účinnost degradace PAU
- Analýza mikrobiálního společenstva přítomného v průběhu kompostování PAU (stanovení růstu mikroorganismů metodou PLFA a stanovení ergosterolu; stanovení enzymových aktivit v průběhu degradačního procesu)
- Sledování ekotoxicity kompostovaného materiálu v průběhu kompostovacího procesu

4. Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Standardy

- směs 16 PAU od Dr. Ehrenstorfer (US EPA, Metod 610)
- benz(a)anthracen-7,12-dion (BAC) min. 97%, Sigma-Aldrich, USA
- methyl nonadecanoate $\geq 99,5\%$, Fluka, D
- standardy methylesterů mastných kyselin (i14:0; i15:0; a15:0; 15:0; i16:0; 16:1 ω 7; 16:1 ω 9; 16:1 ω 5; 10Me-16:0; i17:0; a17:0; cy17:0; 17:0; 10Me-17:0; 18:1 ω 7; 18:1 ω 9; 18:2 ω 6,9; 10Me-18:0; cy19:0), Matreya LLC, USA.

4.1.2. Rozpouštědla

- aceton pro HPLC, Chromservis, ČR
- acetonitril pro HPLC, Chromservis, ČR
- cyklohexan pestapur, Chromservis, ČR
- deionizovaná filtrovaná voda
- dimethylsulfoxid pro HPLC, Chromservis, ČR
- ethyl-acetát pro HPLC, Chromservis, ČR
- hexan pestapur, Chromservis, ČR
- chloroform pestapur, Chromservis, ČR
- methanol pro HPLC, Chromservis, ČR
- toluen pestapur, Chromservis, ČR

4.1.3. Další chemikálie

- ABTS $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA
- CH₃COOH p.a., Penta, ČR
- CH₃COONa p.a., Penta, ČR
- DMSO $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, USA
- H₂O₂ p.a., Sigma-Aldrich, USA
- KOH p.a., Lach-Ner, ČR

- KH_2PO_4 p.a., Lach-Ner, ČR
- mořský písek praný, Penta, ČR
- N_2 99,99%, Linde, ČR
- NaCl min. 99,5%, Sigma-Aldrich, USA
- NaH_2PO_4 p.a., Lach-Ner, ČR
- SDS \geq 98,5%, Sigma-Aldrich, USA
- Veratryl alkohol, Sigma-Aldrich, USA
- Vínan sodný p.a., Lachema, ČR

4.1.4. *Organismy pro testy toxicity*

- luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri* NRLL-B-11177, od Ing. R. Musial, ČR
- rostlinná semena ječmene (*Hordeum vulgare* L.), od firmy Semena Vaněk s.r.o., ČR

4.1.5. *Kontaminované dřevo (pražce)*

V kompostovacích experimentech byly použity kontaminované nadrcené železniční pražce od firmy EKO-BIO Vysočina, spol s.r.o., ČR.

4.1.6. *Kompostovací substráty*

Jako kompostovací materiál byl použit tzv. „zelený substrát“ od Jiřího Václavíka, Biotechnologie výroby substrátů a žampionů s.r.o., ČR. Suroviny pro výrobu substrátu jsou: sláma pšeničná řezaná, drůbeží trus (jako zdroj dusíku), sádrovec (pro snížení pH) a voda.

Další použitý kompostovací materiál byla čerstvě posečená tráva z pokusné plochy v areálu MBÚ AV ČR.

4.2. *Přístrojové vybavení*

- Analytické váhy AE 240, Mettler, CH
- ASE 200, Dionex, USA
- Autosampler CombiPAL, Varian, USA
- Centrifuga 5415D, Eppendorf, D
- Centrifuga ERA20, Hettich, D

- DAD detektor, Waters 2996, USA
- Hmotnostní detektor 240-MS, Varian, USA
- Homogenizátor Ultra-Turrax T25, Janke & Kukel, IKA-Labortechnik, D
- Kapalinový chromatograf, Waters 2695, USA
- Luminometr Lumino M90a, JDZ Obránců míru, Dolní Újezd u Litomyšle, ČR
- pH metr IQ 140, IQ Scientific Instrument, USA
- Plynový chromatograf 450-GC, Varian, USA
- Spektrofotometr SPECTRA max PLUS384, Molecular Devices Corporation, USA
- Vakuová odparka RVO 400, INGOS, ČR

4.3. Stanovení PAU

4.3.1. Extrakce PAU metodou ASE

Metoda ASE (Accelerated Solvent Extraction) pracuje za zvýšeného tlaku a teploty. Extrakce byla prováděna přístrojem ASE 200. Parametry extrakce PAU metodou ASE jsou: teplota 150 °C, tlak N₂ 10,34 MPa a rozpouštědlo hexan-aceton (3:1 v/v). Vzorky byly nejprve usušeny v digestoři za laboratorní teploty a poté byly homogenizovány homogenizátor Ultra-Turrax T25.

Na dno extrakční patrony byl vložen filtrační papír a přidán 1 g mořského písku. Pak bylo odváženo 2 g vzorku a mrtvý objem patrony byl doplněn mořským pískem. Vzorky obsahující PAU byly extrahovány ve třech krocích. Poté byly všechny vzorky odpařeny na polovinu svého objemu (z důvodu minimalizování ztrát lehkých PAU) pomocí vakuové odparky RVO 400 při teplotě 40 °C a tlaku 40 kPa. Po odpaření poloviny objemu vzorku bylo přidáno 25 ml ethyl-acetátu a poté byl odpařen hexan při teplotě 40 °C a tlaku 25 kPa. Z takto upravených vzorků bylo odebráno 20 ml vzorku na ekotoxikologické testy. Ke zbývajícím množství vzorku byl přidán 1 ml vnitřního standardu BAC (připraven v ethyl-acetátu) o koncentraci 3000 ppm. Vzorky byly zředěny 10krát nebo 20krát acetonotriem před analýzou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

4.3.2. Stanovení PAU vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Všechny vzorky byly analyzovány kapalinovým chromatografem Waters 2695 s UV detektorem s diodovým polem Waters 2995, multifuorescenčním detektorem Waters 2475 a termostatovanou pecí pro kolony. Pro separaci látek byla použita kolona LiChnospher PAH

(5 µm) o délce 250 mm při teplotě 25 °C. Dávkovací objem vzorku byl 5 µl. Pro analýzu 16 PAU byla použita gradientová eluce. Mobilní fáze obsahovala směs rozpouštědel methanol-acetonitril (1:1, v/v) (A) a deionizovanou vodu (B). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml·min⁻¹. Program začal isokraticky 5 min při použití 70 % (A). Poté se poměry měnily lineárně do 100 % (A) v 20 min a opět následoval isokratický krok 20 min. PAU byly detekovány při vlnové délce 254 nm, kde má většina PAU absorpční maximum. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byl použit fluorescenční detektor. Nastavení excitačních a emisních vlnových délek jednotlivých kanálů: kanál A ex250/em390 nm (pro PHE, ANT, IPY), kanál B ex280/em340 nm (NAP, ACL, FLO, FLT, PYR, BaA, CHR), kanál C ex305/em390 nm (BbF, BkF, BaP, BghiP, DBA). Chromatogramy byly vyhodnoceny softwarem Empower. Jednotlivé píky byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů a UV spekter. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byly použity plochy píků. Koncentrace PAU byly stanovovány pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny z 5ti bodů v koncentračním rozsahu 0,1 - 10 µg·l⁻¹. Regresní koeficient se pohyboval v rozmezí 0,9998-0,9999.

4.3.3. Vyhodnocení výsledků

Skutečné množství pražců ve 2 g vzorku kompostu bylo stanoveno na základě koncentrace těžkých kovů (Pb a Co) vyskytujících se v pražcích nebo substrátu metodou vnitřního standardu. Analýza těžkých kovů v kompostovacích substrátech a vzorcích kompostu byla provedena v Analytických laboratořích Plzeň a.s. Tabulka 4 shrnuje výskyt těžkých kovů v substrátech a pražcích.

Tab.4: Výskyt těžkých kovů v travním substrátu, „zeleném substrátu“ a pražcích.

| kov | jednotka | travní substrát | Zelený substrát | pražce |
|-----|---------------------|-----------------|-----------------|--------|
| Pb | mg·kg ⁻¹ | 21,7 | 2,5 | 12,7 |
| Co | mg·kg ⁻¹ | 11 | 4,1 | 0,7 |

Pro výpočet hmotnosti pražců ve vzorku byly použity kovy: Pb pro kompost se „zeleným substrátem“ a Co pro kompost s travním substrátem. Množství pražců ve vzorku odběru kompostu (se „zeleným substrátem“) bylo vypočteno podle vzorce:

$$m_{\text{pražce}} = (c_{\text{TKV}} / c_{\text{TKS}}) \cdot m_{\text{vz}} \quad (1)$$

kde

$m_{\text{pražce}}$ je skutečná hmotnost pražců ve vzorku kompostu [g]

c_{TKV} je koncentrace příslušného kovu ve vzorku kompostu [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

c_{TKS} je koncentrace příslušného kovu v kompostovacím substrátu [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

m_{vz} je hmotnost vzorku kompostu [g]

Množství pražců ve vzorku odběru kompostu (s travním substrátem) bylo vypočteno podle vzorce:

$$m_{\text{pražce}} = m_{\text{vz}} - (c_{\text{TKV}} / c_{\text{TKS}}) \quad (2)$$

kde

$m_{\text{pražce}}$ je skutečná hmotnost pražců ve vzorku kompostu [g]

c_{TKV} je koncentrace příslušného kovu ve vzorku kompostu [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

c_{TKS} je koncentrace příslušného kovu v kompostovacím substrátu [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

m_{vz} je hmotnost vzorku kompostu [g]

4.4. Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin (metodou PLFA)

Analýza fosfolipidických mastných kyselin je jeden z prostředků charakterizace půdní mikroflóry. Membránové fosfolipidy představují pouze živou mikrobiální biomasu. Princip metody spočívá v extrakci lipidů ze vzorku a následné izolaci fosfolipidů, které jsou součástí buněčných membrán a stěn, dále dochází k uvolnění mastných kyselin z fosfolipidů a jejich převedení na methylestery. Methylestery jsou detekovány a stanovovány pomocí plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS).

4.4.1. Příprava vzorků

Extrakce lipidů

Do zkumavky byl odvážen 1 g vzorku a přidáno 0,5 ml fosfátového pufru (50 mM, pH=7,4), 1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu. Vzorky byly protřepány

1 min a poté byly extrahovány ve tmě 1 hod při pokojové teplotě. Po extrakci byly vzorky centrifugovány na centrifuze Centrifuga ERA205 min při 3500 otáčkách za minutu (rpm) při pokojové teplotě. Ze vzorků byly získány dvě fáze: 1. fáze (spodní) chloroformová, která obsahuje lipidy a 2. fáze (horní) skládající se z vody a methanolu, která obsahuje ve vodě rozpustné substance. Supernatant (spodní chloroformová fáze) byl odebrán do čisté zkumavky, uzavřen víčkem s teflonovou vložkou a uchováván ve tmě. K sedimentu bylo opět přidáno 1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu, poté následovalo protřepání vzorků 1 min, extrakce 1 hod za stejných podmínek, centrifugování vzorků (5 min, 3500 rpm při pokojové teplotě). Vzniklý supernatant byl spojen s předchozím. Reextrakce byla provedena ještě 1krát. Poté bylo k supernatantu přidáno 1,88 ml fosfátového pufru (50 mM, pH=7,4) a 1,88 ml chloroformu. Směs byla třepána 1 min a ponechána v ledničce přes noc. Odstátá směs byla centrifugována (5 min, 3500 rpm při pokojové teplotě) a pasterovanou pipetou přenesena spodní chloroformová část do vzorkovnice (8 ml). K vodní části bylo přidáno 1,88 ml chloroformu, opět následovalo třepání (1 min), centrifugace (5 min, 3500 rpm při pokojové teplotě) a spodní chloroformová část byla spojena s předchozí. Zbýlý pevný materiál byl usušen v sušárně při teplotě 50 °C.

Frakcionace lipidů

Vzorky z předchozích extrakcí byly odpařeny proudem dusíku a naředěny 100 µl chloroformu. Kolona Lichlorut Si 60 (Merk, 200 mg) byla před nanášením vzorků promyta 1,5 ml chloroformu. Vzorky byly nanесeny na kolonu a vzorkovnice ještě vypláchnuty 100 µl chloroformu a roztok také nanесen na kolonu. Vymytí vzorkovnice chloroformem bylo provedeno ještě 1krát. K vymývání neutrálních lipidů bylo použito 2 ml chloroformu (tato frakce nebyla odchyťována k analýze), glykolipidů bylo použito 6 ml acetonu (tato frakce nebyla odchyťována k analýze) a k vymývání fosfolipidů bylo použito 2 ml methanolu (tato frakce byla jímána do 8 ml vzorkovnice).

Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace)

Mastné kyseliny, které jsou vázány ve fosfolipidech jsou uvolněny a převedeny na methylestery.

Vzorky byly odpařeny proudem dusíku do sucha a následně rozpuštěny v 50 µl vnitřního standardu methyl nonadecanoatu (připraven v hexanu) o koncentraci 200 ppm. Vzorky byly opět jemně odpařeny dusíkem. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 0,5 ml toluenu a 0,5 ml methanolu, vše bylo třepáno 1 min. Dále byl přidán 1 ml čerstvě připraveného 0,2 M KOH v bezvodém methanolu a vzorky byly inkubovány 15 min při 37 °C. Po inkubaci v teplé lázni bylo přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml

1M kyseliny octové a 2 ml čerstvé redestilované vody. Vše bylo třepáno 1 min a centrifugováno (10 min, 2500 rpm při pokojové teplotě). Horní fáze byla přenesena do vzorkovnice a spodní fáze byla znovu promyta 1,6 ml hexanu a 0,4 ml chloroformu. Opět následovalo třepání 1 min a centrifugace (10 min, 2500 rpm při pokojové teplotě). Horní fáze byla odebrána a spojena s předchozí. Promytí spodní fáze bylo zopakováno podle posledního kroku. Poslední horní fáze byla spojena s předchozími. Před měřením na plynovém chromatografu byly vzorky odpařeny proudem dusíku do sucha a naředěny 1 ml hexanu, směs byla třepána 30 s a poté byl 1 ml vzorku přenesen do 2 ml vzorkovnice a připraven k analýze.

4.4.2. Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí

K analýze methylesterů z mastných kyselin fosfolipidů byl použit plynový chromatograf Varian 450-GC s hmotnostním detektorem Varian 240-MS. Látky byly separovány na kapilární koloně DB-5MS o délce 60 m, průměru 0,25 mm a stacionární fázi 0,25 μm . Byl dávkován 1 μl vzorku pomocí autosampleru Combi Pal. Nosným plynem bylo He o průtoku 1,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplotní program začal isotermálně při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$ a trval 1 min při zavřeném děliči. Potom byl dělič otevřen (1:50) a teplota stoupala lineárně do 160 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a poté do 280 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 2,5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, tato teplota byla udržována 10 min. Detekce byla spuštěna 8 min po startu. Teplota injektoru byla nastavena na 280 $^{\circ}\text{C}$. Byla používána EI ionizace (70 eV). Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu 50-350 m/z. Methylované mastné kyseliny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů se standardy a kvantifikovány za pomoci ploch píků. Koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin byly stanovovány pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny z 5ti bodů v koncentračním rozsahu 0,1-10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Regresní koeficient se pohyboval v rozmezí 0,9997-0,9999.

4.5. Stanovení ergosterolu

Ergosterol je součástí buněčných membrán hub a je používán jako ukazatel houbové biomasy v půdě.

4.5.1. Příprava vzorků

Do 8 ml vzorkovnic bylo naváženo 0,5 g vzorku kompostovaného materiálu. Poté byl přidán 1 ml cyklohexanu a 3 ml 10% KOH v methanolu. Směs vzorku a rozpouštědel byla inkubována v ultrazvukové lázni o teplotě 70 °C 90 min. Poté byl přidán 1 ml čerstvé destilované vody a 2 ml cyklohexanu. Vzorky byly třepány 30 s a centrifugovány (5 min, 3500 rpm při pokojové teplotě). Supernatant (horní vrstva) byl přenesen do vzorkovnic. Ke vzorkům bylo opět přidáno 2 ml cyklohexanu, směs byla třepána 30 s a centrifugována (5 min, 3500 rpm při pokojové teplotě). Odebraný supernatant byl spojen s předchozím. Reextrakce byla provedena ještě jednou podle posledního kroku a odebraný supernatant byl spojen s předchozími. Sediment byl po extrakci usušen v sušárně při teplotě 55 °C. Cyklohexan byl ze supernatantu odpařen dusíkem do sucha (cca 1 hod) a poté byly vzorky rozpuštěny v 1 ml methanolu. Směs byla třepána 30 s a inkubována ve vodní lázni o teplotě 40 °C 15 min. Po inkubaci byly vzorky opět třepány 30 s. Celý objem vzorků byl přenesen do 1,5 ml uzavíratelných zkumavek a centrifugován (3 min, 6000 rpm). Ze supernatantu bylo odebráno 800 µl k analýze HPLC.

4.5.2. Stanovení ergosterolu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií

Ke stanovení ergosterolu byl použit kapalinový chromatograf Biotek Instruments vybavený autosamplerm Biotek Instruments 465 a DAD detektorem Biotek Instruments 540+. Byl dávkován objem 20 µl. Ergosterol byl separován na reverzní fázi kolony LiChrosorb C18 (5 µm). Eluce byla provedena 100 % methanolu a průtok mobilní fáze byl 1 ml·min⁻¹. Ergosterol byl detekován UV detekcí při vlnové délce 282 nm. Kvantifikován byl za pomoci ploch píků. Koncentrace ergosterolu byly stanovovány pomocí kalibračních křivek, které byly sestaveny z 5ti bodů v koncentračním rozsahu 0,1-20 µg·l⁻¹. Regresní koeficient se pohyboval v rozmezí 0,9998-0,9999.

4.6. Stanovení aktivity ligninolytických enzymů

Princip spektrofotometrických metod měření enzymových aktivit spočívá v měření změny absorbance reakční směsi způsobené tvorbou barevného produktu během enzymem katalyzované reakce probíhající v dané reakční směsi. 1 jednotka enzymu je definována jako aktivita, která vyprodukuje 1 μmol barevného produktu za 1 min. Všechna stanovení aktivity ligninolytických enzymů byla měřena na spektrofotometru SPECTRAMax PLUS384.

4.6.1. Lakasa vázaná na matrici vzorku

V tomto experimentu byla stanovována aktivita lakasy (Lac) pomocí oxidace ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)). Absorbance byla měřena při 420 nm. Molární absorpční koeficient ABTS ϵ_{420} činí $36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

K odváženému vzorku kompostovaného materiálu (0,05 g) bylo přidáno 0,9 ml 120 mM sodnooctanového pufru (pH = 5,0) a 0,1 ml 50 mM ABTS. Poté byly vzorky inkubovány 2 min při pokojové teplotě za stálého třepání a následně centrifugovány na centrifuze Centrifuga 5415D (1 min při 16000 g). Pro měření na spektrofotometru bylo odebráno 200 μl supernatantu. Jako slepý vzorek byl použit sodnooctanový pufr (900 μl) a 50 mM ABTS (100 μl). Vzorek kompostu byl poté usušen při 50°C a zvážen. Zjištěná enzymová aktivita byla vztažena na mg suchého kompostu.

Výpočet enzymové aktivity:

$$EA = \Delta A \cdot V / t \cdot \epsilon_{420} \quad (3)$$

kde

EA je enzymová aktivita [U]

ΔA je absorbance vzorku mínus absorbance slepého vzorku

V je objem reakční směsi [l]

t je čas reakce [min]

ϵ je molární absorpční koeficient

Před stanovením aktivity Lac, LiP a MnP v extraktu z kompostovaného materiálu byly odebrané vzorky kompostu (0,3 g) inkubovány s 2 ml 10mM sodnofosfátovým pufr (pH = 6,0) s 1% SDS (sodium dodecyl sulfát) na třepačce (2 h, 200 rpm) a extrakty byly následně odsoleny pomocí kolonky HiTrap Desalting (GE Healthcare, Švédsko).

4.6.2. *Lakasa v extraktu*

Aktivita volné lakasy byla stanovena na základě změny absorbance během oxidace ABTS při vlnové délce 420 nm. Reakce byla odstartována přidavkem ABTS do reakční směsi. Molární absorpční koeficient ϵ_{420} ABTS činí $36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Složení reakční směsi:

- 20 μl vzorku
- 160 μl 120 mM sodnooctanového pufru (pH = 5,0)
- 20 μl 50 mM ABTS

4.6.3. *Lignin peroxidasa v extraktu*

Aktivita lignin peroxidasy (LiP) byla stanovena na základě změny spektrofotometrických vlastností VA (veratryl alkohol) po jeho přidání do reakční směsi při vlnové délce 310 nm. Reakce byla odstartována přidavkem VA do reakční směsi. Molární absorpční koeficient ϵ_{310} VA činí $9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Složení reakční směsi:

- 30 μl vzorku
- 155 μl 0,1 M sodnovínanového pufru (pH = 3,0)
- 10 μl 54 mM H_2O_2
- 5 μl 25 mM VA

4.6.4. *Mangan-dependentní peroxidasa v extraktu*

Aktivita mangan-dependentní peroxidasy (MnP) byla stanovena na základě změny spektrofotometrických vlastností DMP (2,6-dimethoxyfenol) po jeho přidání do reakční směsi při vlnové délce 469 nm. Reakce byla odstartována přidavkem DMP do reakční směsi. Molární absorpční koeficient ϵ_{469} DMP činí $49600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Pro stanovení enzymových aktivit MnP byly připraveny tři reakční směsi (I, II, III).

Složení reakční směsi (I):

- 20 μl vzorku
- 170 μl 65,8 mM Na-malonátového pufru (pH = 4,5)
- 10 μl 20 mM DMP

Hodnoty enzymových aktivit Lac naměřených v reakční směsi I odpovídají hodnotám aktivity lakasy: I = Lac

Složení reakční směsi (II):

- 20 µl vzorku
- 152 µl 65,8 mM Na-malonátového pufru (pH = 4,5)
- 10 µl MnSO₄
- 8 µl 10 mM H₂O₂
- 10 µl 20 mM DMP

Složení reakční směsi (III):

- 20 µl vzorku
- 152 µl 65,8 mM Na-malonátového pufru (pH = 4,5)
- 10 µl EDTA
- 8 µl 10 mM H₂O₂
- 10 µl 20 mM DMP

Enzymové aktivity MnP a mangan independentní peroxidasy (MiP) byly určeny jako rozdíl naměřených enzymových aktivit pro reakční směsi **I**, **II**, **III**. Hodnoty enzymových aktivit MnP byly vypočteny podle vztahu: **MnP = II–III**. Hodnoty enzymových aktivit (MiP) byly vypočteny podle vztahu **MiP = III – I**.

4.7. Testy ekotoxicity

Testy ekotoxicity byly prováděny na extraktech ze vzorků kompostů, které byly odebrány 40., 140. a 240. nebo 340. den (po ukončení termofilní fáze kompostu).

4.7.1. Test inhibice bioluminiscence bakterií *Vibrio fischeri*

Stanovení inhibice bioluminiscence bakterií *Vibrio fischeri*, která je způsobená toxickými látkami rozpuštěnými ve vodě nebo ve výluhu popisuje ČSN EN ISO 2000 [61]. K testování se používá mořská, gramnegativní bakterie *Vibrio fischeri*, která přirozeně emituje světlo, jež vzniká v organismu při chemické reakci katalyzované enzymem luciferasou.



Princip testu spočívá ve srovnání bioluminiscence před a po expozici toxickou látkou. V tomto experimentu byly testovacím organismem luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*

kmen NRLL–B–11177. Vzorky byly měřeny na jednozkumavkovém manuálním luminometru LUMINO M90a.

Příprava bakterií (pracovní suspenze):

Lyofilizované bakterie byly uchovávány při teplotě – 18 °C. Do ampule s bakteriemi bylo rychle nalito 550 µl ledově vychlazeného 2% NaCl. Suspenze byla ponechána za občasného promíchávání pootáčením v ledové lázni (0-2 °C) 15 min. Poté byla připravena pracovní suspenze smícháním 200 µl resuscitovaných bakterií s 6 ml 2% NaCl chlazeného na 15 °C. Takto připravená pracovní suspenze pak byla vložena na 1 hod do vodní lázně s teplotou 15 °C.

Příprava vzorku:

Ze vzorků (extraktů) bylo odměřeno potřebné množství (100 µl) do 8 ml vzorkovnice a odpařeno proudem dusíku do sucha. Poté byly vzorky rozpuštěny ve 4% DMSO (dimethylsulfoxid), zředěny na příslušnou koncentraci a vloženy do vodní lázně s teplotou 15 °C.

Postup měření:

Do měřicí kyvety bylo napipetováno 500 µl promíchané pracovní suspenze bakterií (vytemperované na 15 °C) a byla změřena hodnota luminiscence. Poté bylo k pracovní suspenzi přidáno 500 µl vzorku (vytemperované na 15 °C) a po 15 a 30 min byla změřena hodnota luminiscence.

Postup měření netoxických kontrol:

Do měřicí kyvety bylo napipetováno 500 µl pracovní suspenze bakterií (vytemperované na 15 °C) a byla změřena hodnota luminiscence. Poté bylo k pracovní suspenzi přidáno 500 µl 4% DMSO (vytemperovaného na 15 °C) a po 15 a 30 min byla změřena hodnota luminiscence.

Vyhodnocení testu:

Výpočet předběžného korekčního faktoru f_p , jehož hodnota by měla být 0,8-1,2:

$$f_p = L_p/L_{i0} \quad (5)$$

kde

L_p je intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií po expozici v čase t [V]

L_{i0} je intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií na počátku měření [V]

Výpočet hodnoty korekčního faktoru f , jehož hodnota by měla být po 30 min 0,6-1,8 (pokud je faktor v tomto rozsahu test je platný):

$$f = L_{kt}/L_{i0} \quad (6)$$

kde

L_{kt} je intenzita luminiscence netoxické kontroly po expozici v čase t [V]

L_{i0} je intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií na počátku měření [V]

Vypočet inhibice I_{it} luminiscence v každém vzorku:

$$I_{it} = 100 - (L_{it}/f \cdot L_{i0}) \cdot 100 \quad (7)$$

kde

I_{it} je inhibice luminiscence po čase t [%]

L_{it} - intenzita luminiscence ve vzorku po čase t [V]

L_{i0} je intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií na počátku měření [V]

f je korekční faktor

4.7.2. Test klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.)

V tomto testu byla zjištěna inhibice klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Test byl prováděn po dobu tří dnů na skleněných Petriho miskách za laboratorní teploty v tmavém prostředí.

Postup:

Na dno Petriho misek byl vložen filtrační papír, na který byl rovnoměrně nanesen příslušný objem extraktu vzorku kompostovaného materiálu. Rozpouštědlo z extraktu (ethyl-acetát) se nechalo přes noc odpařit v digestoři. Po odpaření rozpouštědla bylo na každý filtrační papír rovnoměrně nanášeno 2 ml destilované vody a rozprostřeno 50 semen ječmene. Semena byla ponechána klíčit po dobu tří dnů a každý den byla ke vzorkům přidávána destilovaná voda (2 ml), aby se rehydratoval filtrační papír. Stejným způsobem byly připraveny i kontroly nedegradovaného vzorku (pouze kontaminované pražce) a netoxické kontroly, které byly připraveny ze 2 ml destilované vody.

Vyhodnocení:

Po třech dnech byl u každého vzorku spočítán počet naklíčených semen a vypočtena inhibice I podle rovnice:

$$I = (1 - G/G_c) \cdot 100 \quad (8)$$

kde

I je inhibice klíčivosti semen [%]

G je počet naklíčených semen v extraktech vzorků kompostu

G_c je počet naklíčených semen v netoxické kontrole (pouze destilovaná voda)

4.8. Schéma experimentů

4.8.1. První kompostovací experiment

V prvním kompostovacím experimentu byly použity nadrcené pražce o velikosti 1 cm a 3 cm. Jako kompostovací substrát byl použit „zelený substrát“. Tento experiment byl prováděn v tepelně izolované kompostovací jednotce s řízeným provzdušňováním a teplotou.

Kompostování probíhalo v devíti paralelních celách o objemu 3 l. Do kompostovací cely 1 až 3 byl na dno nasypán perlit (700 ml) a do něj byla vložena aerační deska s hadicí pro přívod vzduchu. První vrstvu kompostu tvořilo 100 g substrátu, na to bylo vrstveno 50 g zvlhčených jemně prosetých pražců o velikosti 1 cm, třetí vrstva byl opět substrát (75 g). Vrstvy se střídaly pražce-substrát a poslední 12. vrstva byla 100 g substrátu. Pro přípravu kompostů 4 až 6 byl použit stejný postup jako pro komposty 1 až 4 s tím rozdílem, že byla použita frakce pražců a velikosti 3 cm. Komposty 7 až 9 sloužily jako netoxické kontroly a pro jejich přípravu bylo použito 800 g kompostovacího substrátu. Takto připravené komposty byly zvlhčeny destilovanou vodou (60 % m/m) a poté dovlhčovány podle potřeby. Automatické provzdušňování v kompostovací jednotce bylo nastaveno na průtok vzduchu $130 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Vzorky pro analýzu byly z kompostu odebírány 6. den (65 °C), 12. den (45 °C), 15. den (55 °C), 20. den (38 °C), 27. den (29 °C), 40. den (25 °C), 140., 240. a 340. den (20 °C). Po 40. dnu kompostování bylo odpojeno provzdušňování a kompost se nechal zrát 300 dní.

V tomto kompostovacím experimentu byla sledována degradace PAU v průběhu kompostovacího procesu a výsledky degradace byly také vyhodnoceny pomocí testů toxicity:

- 1) Test inhibice bioluminiscence bakterií *Vibrio fischeri*
- 2) Test klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.)

Pro relativní kvantifikaci mikrobiální biomasy byla použita metoda stanovení PLFA (vzorky musí být zpracovány bezprostředně po odběru), další metodou pro zjištění množství houbové biomasy v průběhu kompostování bylo stanovení ergosterolu. Dále byla stanovena enzymová aktivita v průběhu degradačního procesu. A také byl sledován vliv různé velikosti prosetých pražců (1 cm a 3 cm) na degradaci PAU.

4.8.2. Druhý kompostovací experiment

Ve druhém kompostovacím experimentu byly použity nadrcené proseté pražce o velikosti 3 cm a jako kompostovací substrát byl použit „zelený substrát“. Tento experiment byl prováděn v zahradním kompostéru o objemu 400 l na pokusné ploše MBÚ AV ČR.

Dno kompostéru bylo vyloženo nepropustnou vrstvou, aby se zabránilo možným průsakům do půdy. První vrstvu kompostu tvořil substrát (14 kg), na ni byly přidány pražce (5 kg). Vrstvilo se střídavě substrát-pražce a poslední 12. vrstva byla substrát (14 kg). Kompost byl zvlhčen (60 % m/m). Kompostovací proces byl monitorován denně (teplota). Vzorky pro analýzy byly odebírány 5. den (52 °C), 12. den (35 °C), 40. den (25 °C), 140., 150. a 240. den při okolní teplotě.

Druhý kompostovací experiment byl prováděn v letních měsících a měl ukázat, zda tento postup venkovního kompostování je vhodný pro degradaci PAU v kontaminovaném dřevě. Podobně jako u předcházejícího experimentu výsledky degradace PAU byly také vyhodnoceny pomocí testů toxicity:

- 1) Test inhibice bioluminiscence bakterií *Vibrio fischeri*
- 2) Test klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.)

Dále byly stanovovány fosfolipidické markerové mastné kyseliny metodou PLFA, ergosterol a také byla stanovena enzymová aktivita v průběhu degradačního procesu.

4.8.3. Třetí kompostovací experiment

V tomto experimentu byly použity nadrcené proseté pražce o velikosti 3 cm a jako kompostovací substrát byla použita čerstvě posečená tráva z pokusné plochy Mikrobiologického ústavu AV ČR. Tento experiment byl prováděn v zahradním kompostéru o objemu 400 l na pokusné ploše MBÚ AV ČR.

Postup přípravy kompostu je totožný s druhým kompostovacím experimentem. Vzorky pro analýzu byly odebírány 2. den (69 °C), 5. den (55 °C), 7. den (43 °C), 13. den (30 °C), 40. den (20 °C), 140. a 240. den při okolní teplotě. Kompost byl denně monitorován (teplota). Tento experiment byl prováděn také v letních měsících.

V tomto kompostovacím experimentu byla prováděna stejná stanovení a analýzy jako ve druhém kompostovacím experimentu.

5. Výsledky

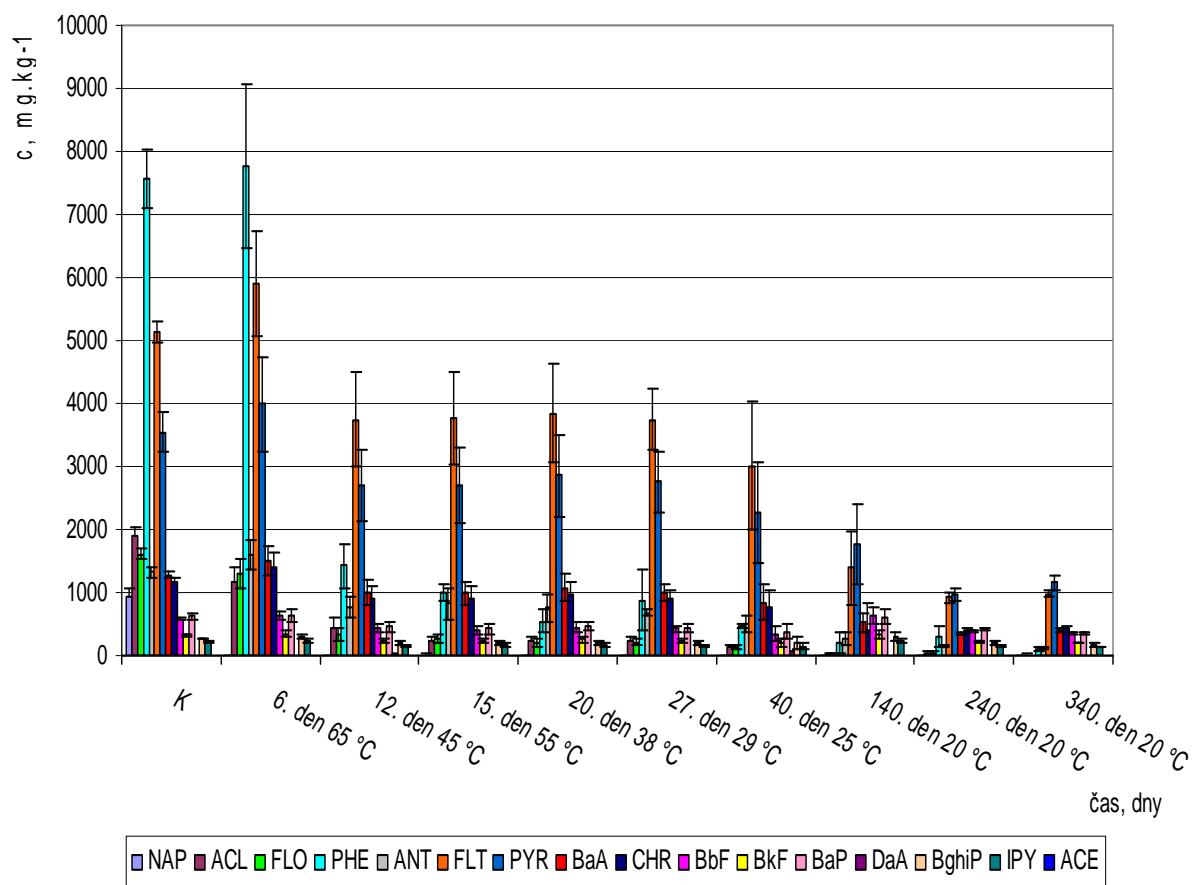
5.1. Biodegradace PAU pomocí laboratorního modelového kompostéru - první kompostovací experiment

5.1.1. Degradace PAU

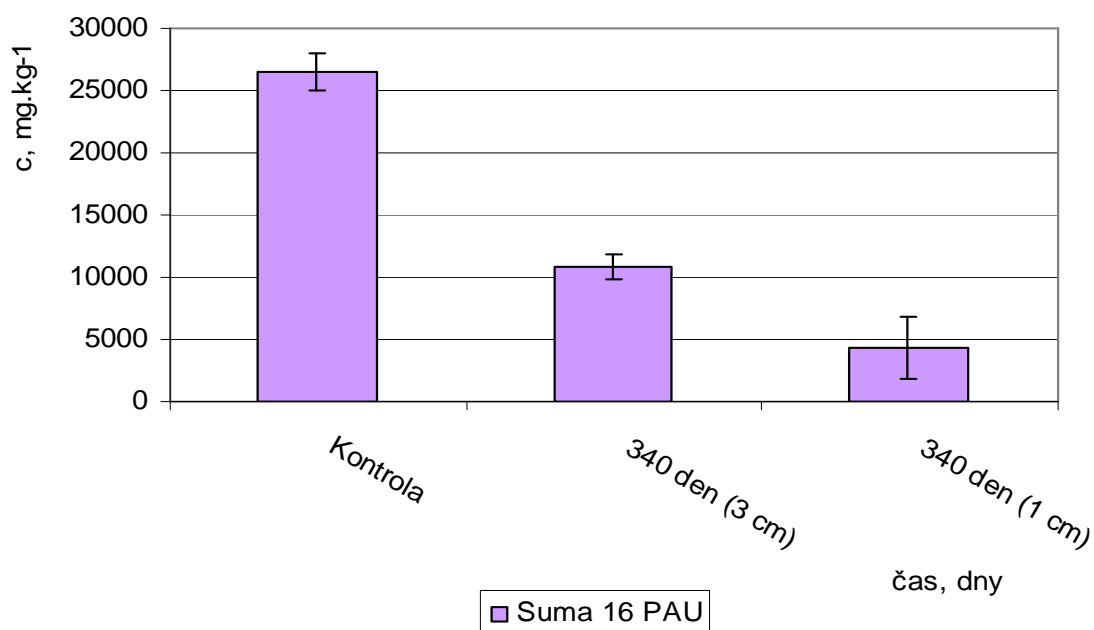
V prvním degradačním experimentu byly vzorky kompostovaného materiálu odebírány 6., 12., 15., 20., 27., 40., 140., 240. a 340. den a následně vyhodnoceny. Na obrázku 7 na straně 48 jsou znázorněny výsledky degradace PAU v kontaminovaném dřevě. V grafu je na ose y vynesena koncentrace 16 PAU [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]. Osa x popisuje skupiny sloupců reprezentující jednotlivé odběry, příslušnou kontrolu (K-kontaminované pražce) a časový průběh odběrů vzorků kompostovaného materiálu s aktuálními teplotami. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Z výsledků vyplývá, že k degradaci došlo u všech představitelů PAU. Z porovnání sum PAU u jednotlivých odběrů je zřejmé, že k poklesu PAU došlo o 83 % z původního množství, které reprezentuje K. K největšímu poklesu koncentrace PAU došlo v termofilní fázi kompostování. Nejrychleji degradovány byly nízkomolekulární PAU (NAP, ACE, ACL, FLO a PHE). Například u PHE došlo k poklesu o 98 % z původního množství oproti BkF, kde k degradaci došlo pouze o 37 %.

5.1.2. Srovnání vlivu velikosti částic kontaminovaného dřeva na účinnost degradace PAU

Na obrázku 8 na straně 48 jsou znázorněny výsledky degradace PAU kompostováním dvou různých velikostí odštěpků kontaminovaného dřeva. Osa y popisuje koncentrace sum 16 PAU [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]. Osa x znázorňuje sloupce reprezentující sumy PAU, příslušný den odběru a velikost odštěpků kontaminovaného dřeva. K tomuto srovnání byly vyhodnoceny vzorky, které byly odebírány 340. den. Jak je z grafu zřejmé, k nejvýraznějšímu poklesu PAU došlo při kompostování odštěpků o velikosti 1 cm a to o 83 % z původního množství oproti odštěpkům o velikosti 3 cm, kde došlo k poklesu o 59 % z původního množství. Rozdíl mezi těmito výsledky po 300 dnech maturace jsou statisticky významně odlišné.



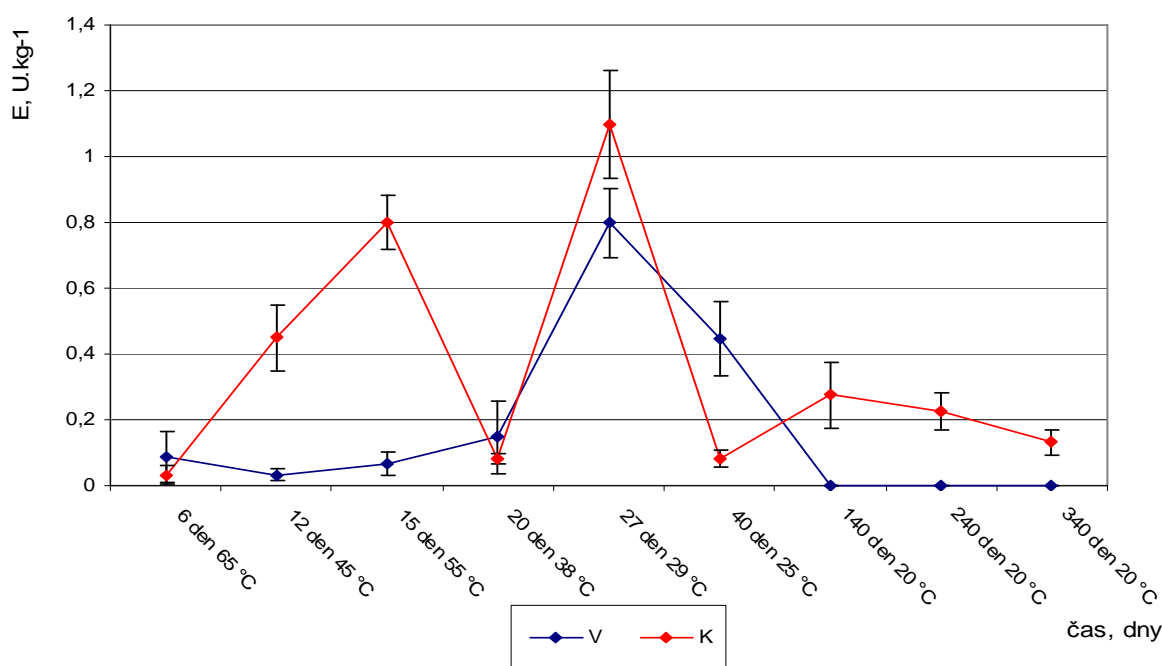
Obr. 7: Degradace jednotlivých PAU kompostováním kontaminovaného dřeva.



Obr. 8: Vliv různé velikosti částic kontaminovaného dřeva na degradaci PAU.

5.1.3. Stanovení aktivity ligninolytických enzymů

Lakasová aktivita byla měřena u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebírány 6., 12., 15., 20., 27., 40., 140., 240. a 340. den. Obrázek 9 znázorňuje průběh aktivity lakasy vázané na matrici vzorku. Osa y popisuje aktivitu lakasy vázané na matrici vzorku [$\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$] a osa x den odběru vzorku kompostu s příslušnou teplotou. Z grafu je zřejmé, že nejvyšší hladina lakasové aktivity ($1,1 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) u netoxické kontroly (K-kompostovací substrát) byla 27. den kompostování. V tomto období byla lakasová aktivita u vzorku kompostovaného materiálu (V) menší ($0,78 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$). Po 300 dnech maturace kompostu byla lakasová aktivita naměřena pouze u netoxické kontroly ($0,13 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$). Aktivity ostatních ligninolytických enzymů (volná Lac, LiP a MnP) nebyly během kompostovacího procesu detekovány.

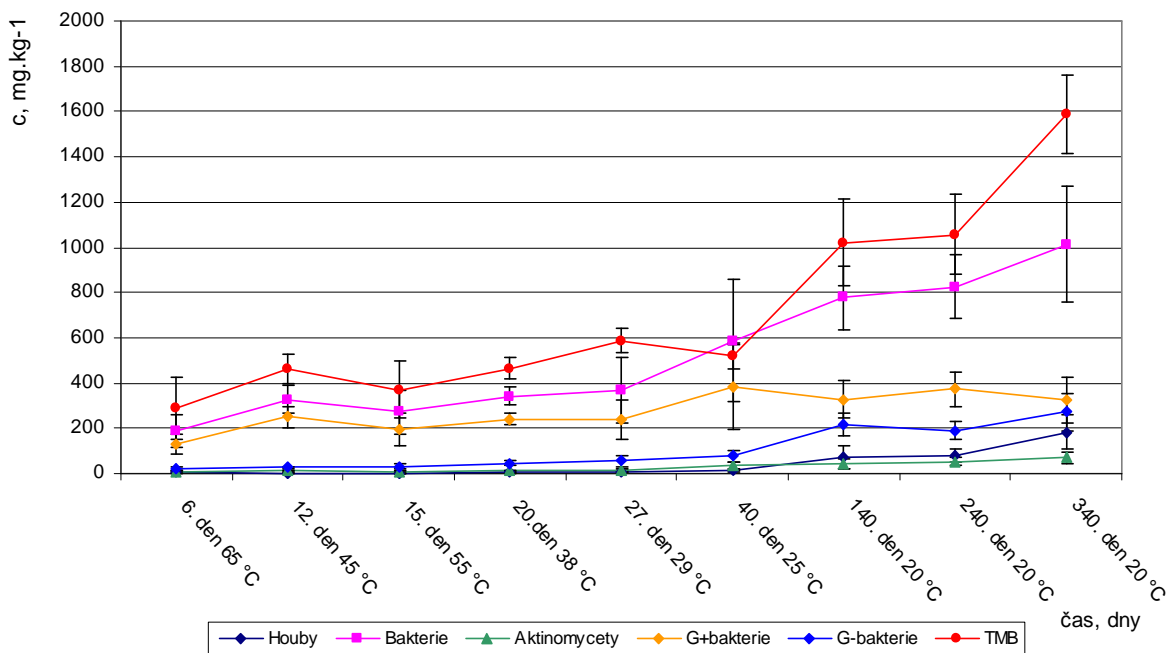


Obr. 9: Průběh aktivity lakasy vázané na matrici vzorku.

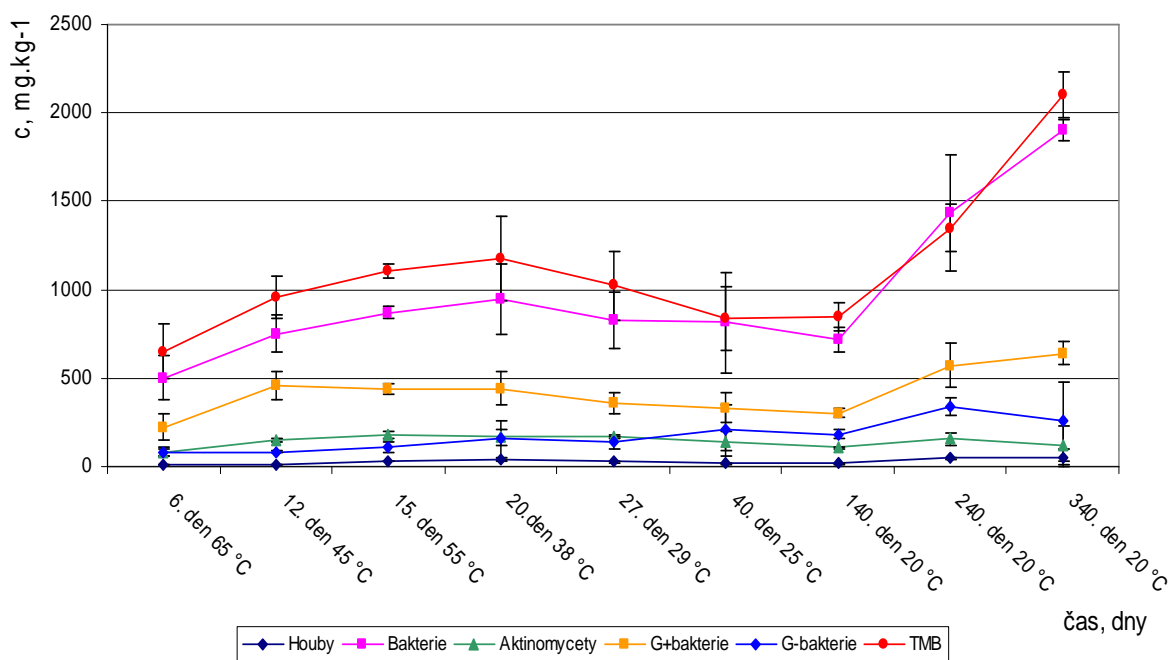
5.1.4. Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin

Vzorky pro analýzu fosfolipidických mastných kyselin byly odebírány 6., 12., 15., 20., 27., 40., 140., 240. a 340. den. Jednotlivé skupiny byly charakterizovány součtem koncentrací specifických mastných kyselin podle následujícího klíče [62]: houby – 18:2 ω 6,9; bakterie – i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 7, 16:1 ω 9, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 18:1 ω 9, 10Me-18:0, cy19:0; celková mikrobiální biomasa – i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 7, 16:1 ω 9, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6,9, 10Me-18:0, cy19:0; Gram-negativní bakterie – 18:1 ω 7, 16:1 ω 7, cy17:0, cy19:0, 16:1 ω 5; Gram-pozitivní bakterie – i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0; aktinomycety – 10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0. Obrázek 10 na straně 51 popisuje změny růstu mikroorganismů v průběhu kompostovacího procesu. Na ose y je vyznačena koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] a na ose x jsou znázorněny dny odběrů kompostovaného materiálu s příslušnou teplotou. Z grafu je zřejmé, že množství biomasy všech sledovaných skupin stoupala v průběhu kompostování, a to zejména v maturační fázi. Výjimku tvoří Gram-pozitivní bakterie, které dosáhly maxima již po termických fázích a jejichž biomasa se s časem dále výrazně neměnila. Nevýraznější nárůst biomasy oproti prvnímu analyzovanému vzorku byl sledován u hub, kdy se celkové množství v průběhu experimentu zvýšilo 36krát a u Gram-negativních bakterií bylo zaznamenáno 14ti násobné navýšení.

Obrázek 11 na straně 51 popisuje změny růstu mikroorganismů v průběhu kompostovacího procesu u netoxické kontroly (pouze kompostovací substrát). Růst všech skupin mikroorganismů byl zaznamenán v rozmezí teplot od 65 °C do 38 °C. Dvacátý den dosahovaly tyto mikroorganismy maxima svého růstu v termické fázi kompostování, kdy nárůst biomasy představoval zhruba dvojnásobek, kromě hub u kterých byl zaznamenán 5ti násobný růst biomasy. Po termické fázi docházelo k poklesu biomasy u všech skupin. Po 100 dnech maturace až do ukončení experimentu byl opět zaznamenán růst biomasy, kdy po ukončení maturační fáze kompostu dosáhly nejvyššího nárůstu biomasy opět houby (7krát oproti prvnímu analyzovanému vzorku).



Obr. 10: Koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin v průběhu kompostování.

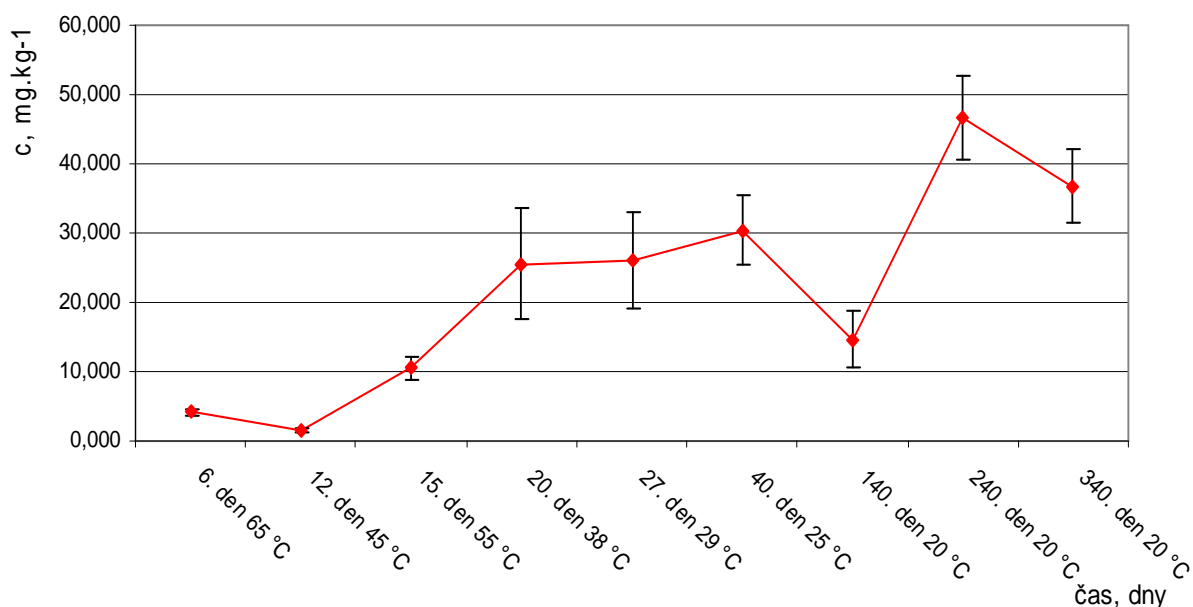


Obr. 11: Koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin v průběhu kompostování (netoxická kontrola).

5.1.5. Stanovení ergosterolu

Ergosterol byl stanovován u vzorků, které byly odebírány 6., 12., 15., 20., 27., 40., 140., 240. a 340. den. Koncentrace ergosterolu naměřené v netoxické kontrole (kompostovací substrát) jsou znázorněny na obrázku 12. Na ose y je znázorněna koncentrace ergosterolu [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]. Osa x popisuje dny odběrů s příslušnými teplotami. Z výsledku tohoto experimentu je patrné, že k nárůstu houbové biomasy sledované tímto markerem docházelo na počátku chladnoucí (mezofilní) fáze kompostování. Po této fázi došlo k poklesu koncentrace ergosterolu (z $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na $14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Po 100 dnech maturace byl pozorován opět nárůst koncentrace a po 240. dnu kompostování byla stanovena nejvyšší koncentrace ergosterolu ($47 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

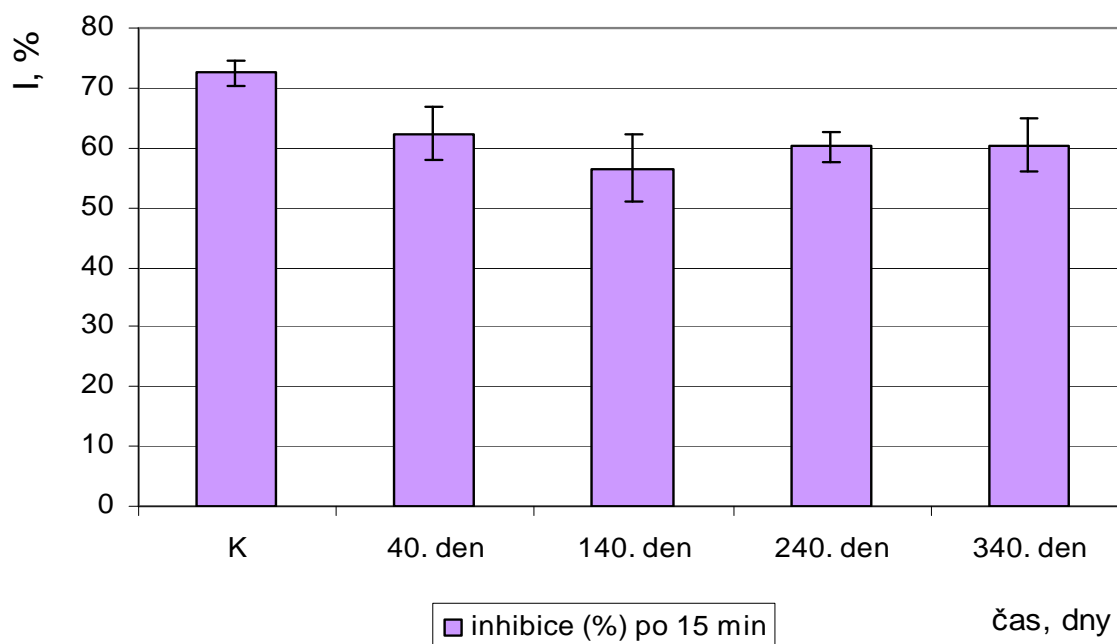
U ostatních vzorků kompostu nebyl ergosterol detekován.



Obr. 12: Koncentrace ergosterolu netoxické kontroly v průběhu kompostovacího procesu.

5.1.6. Stanovení akutní toxicity

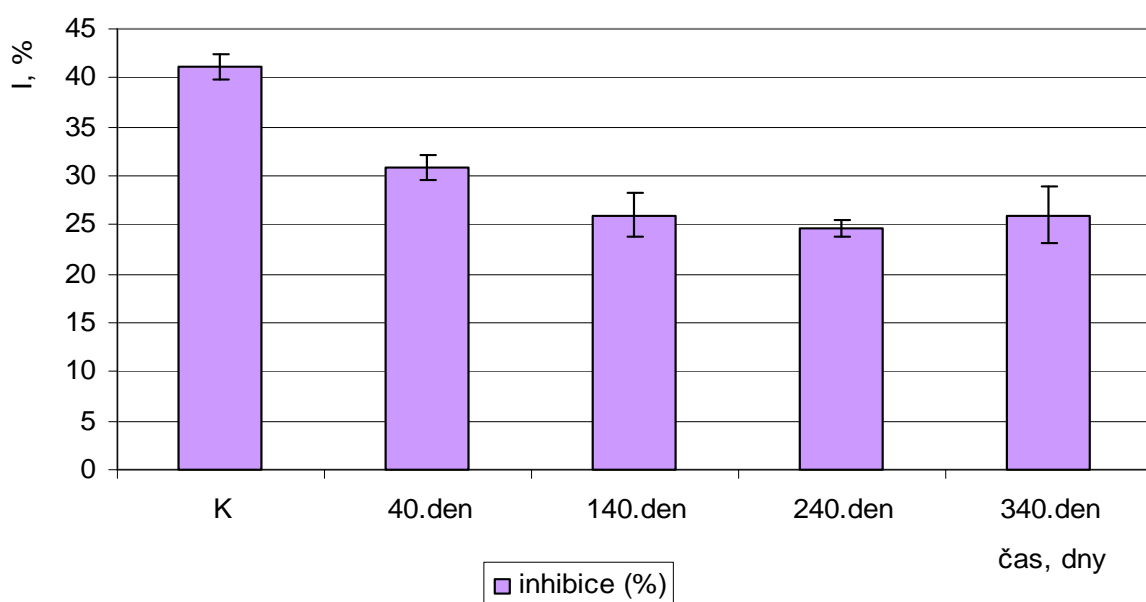
Stanovení akutní toxicity bylo vyhodnoceno u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebírány 40., 140., 240. a 340. den. Na obrázku 13 jsou uvedeny výsledky inhibice luminiscence emitované bakteriemi *Vibrio fischeri*. Na ose y je vyznačena inhibice luminiscence (%). Osa x označuje toxickou kontrolu (K-kontaminované dřevo) a příslušný odběr vzorků kompostovaného materiálu. Z výsledků testu vyplývá, že došlo ke snížení toxicity kompostu oproti kontrole. U této kontroly byla naměřena inhibice luminiscence 73 ± 4 %. Inhibice luminiscence po 140. dnech kompostování byla nejnižší 57 ± 6 %. V průběhu maturace kompostu (po 240ti a 340ti dnech) byl zaznamenán menší vzrůst toxicity oproti 140. dni odběru, avšak toto zvýšení nebylo statisticky významné (1-faktorová ANOVA, $\alpha = 0,05$). Po 300 dnech maturace byla naměřena inhibice luminiscence 60 ± 2 %, toxicita kompostu po ukončení experimentu klesla o 18 ± 2 % oproti kontrole.



Obr. 13: Stanovení inhibice luminiscence pomocí bakterií *Vibrio fischeri*.

5.1.7. Stanovení fytotoxicity

Fytotoxicita byla vyhodnocena u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebrány 40., 140., 240. a 340. den. Na obrázku 14 je znázorněna inhibice klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Na ose y je vyznačena inhibice klíčivosti (%). Osa x označuje toxickou kontrolu (K-kontaminované dřevo) a příslušný den odběrů vzorků kompostovaného materiálu. Inhibice klíčivosti u toxické kontroly byla 41 ± 5 %. Pokles toxicity byl zaznamenán v každé fázi maturace kompostu. Po 300 dnech maturace byla inhibice klíčivosti 26 ± 4 %. K celkovému poklesu toxicity na konci kompostovacího procesu došlo o 37 ± 7 %.

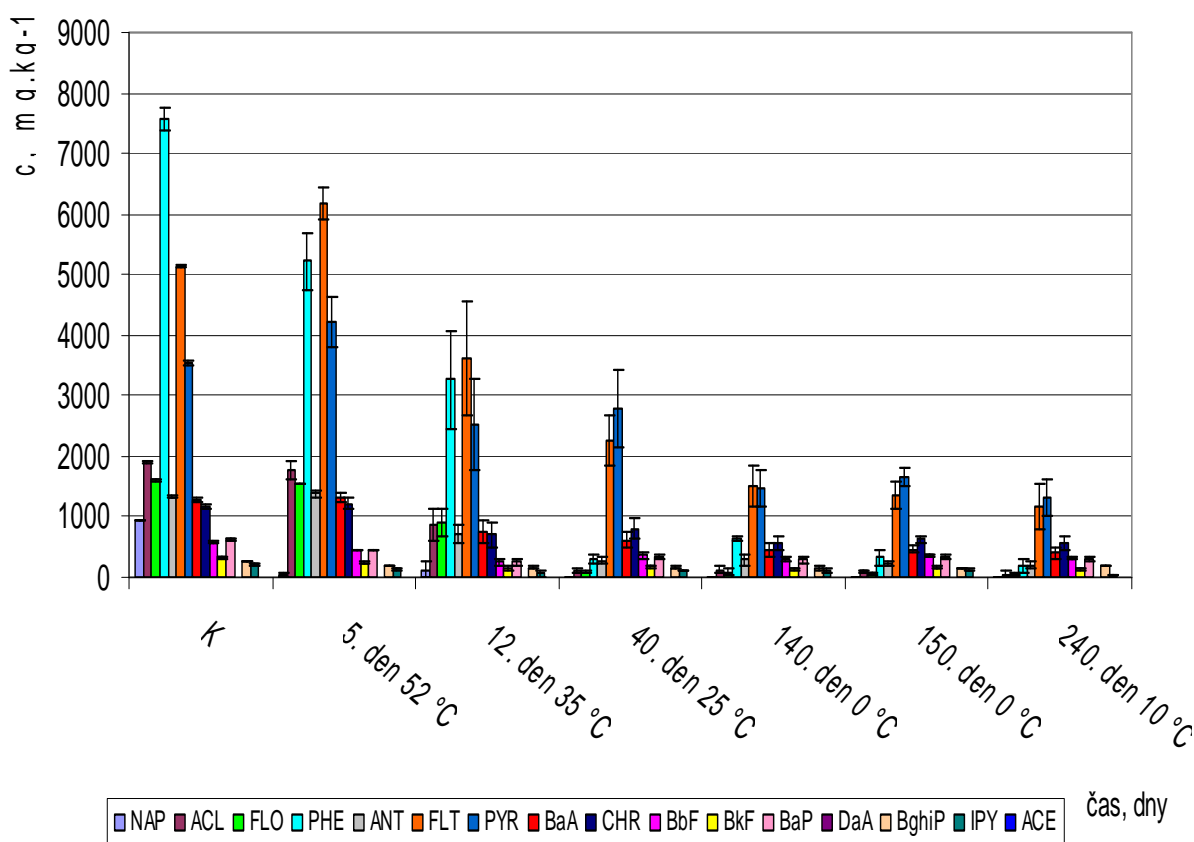


Obr. 14: Stanovení inhibice klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.).

5.2. Bioremediace kontaminovaného dřeva (pražců) pomocí kompostování v pilotním měřítku - druhý kompostovací experiment

5.2.1. Degradace PAU

Ve druhém degradačním experimentu byly vzorky kompostovaného materiálu odebírány 5., 12., 40., 140., 150. a 240. den a následně vyhodnoceny. Obrázek 15 popisuje výsledky degradace PAU pomocí kompostování kontaminovaného dřeva. V grafu je na ose y vynesena koncentrace 16 PAU [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]. Osa x popisuje skupiny sloupců reprezentující jednotlivé PAU, příslušnou kontrolu (K-kontaminované pražce) a časový průběh odběrů vzorků kompostovaného materiálu s aktuálními teplotami. Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že hlavní část degradace se uskutečnila v mezofilní fázi kompostování. Nejrychleji degradovány byly nízkomolekulární PAU a to do 40. dne kompostování, kde množství PHE bylo sníženo o 96 % z původních hodnot, ANT byl snížen o 95 % a FLO o 94 % z původních hodnot. Po 200 dnech maturace kompostu došlo ke snížení sum PAU o 81 % z původního množství.

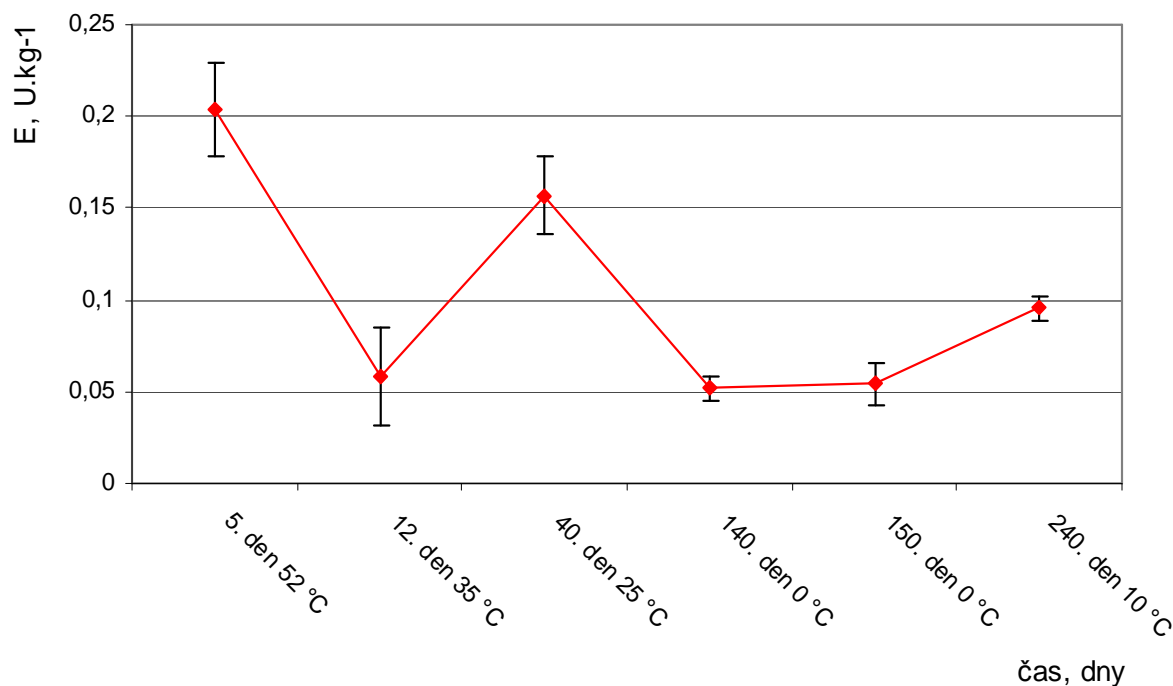


Obr. 15: Degradace jednotlivých PAU kompostováním kontaminovaného dřeva.

5.2.2. Stanovení aktivity ligninolytických enzymů

Lakasová aktivita byla měřena u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebrány 5., 12., 40., 140., 150. a 240. den. Změřené aktivity enzymu Lac vázané na matrici vzorku jsou zobrazeny na obrázku 16. Osa y popisuje lakasovou aktivitu [$\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$] a osa x den odběru vzorků kompostu s příslušnou teplotou. Nejvyšší hladina lakasové aktivity ($0,2 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) byla zaznamenána 5. den odběru. V termofilní fázi kompostování byl zaznamenán pokles aktivity ($0,06 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) a po skončení této fáze docházelo opět k nárůstu lakasové aktivity ($0,16 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$). V průběhu maturace kompostu aktivita lakasy klesala a po skončení druhé fáze maturace byl zaznamenán její růst.

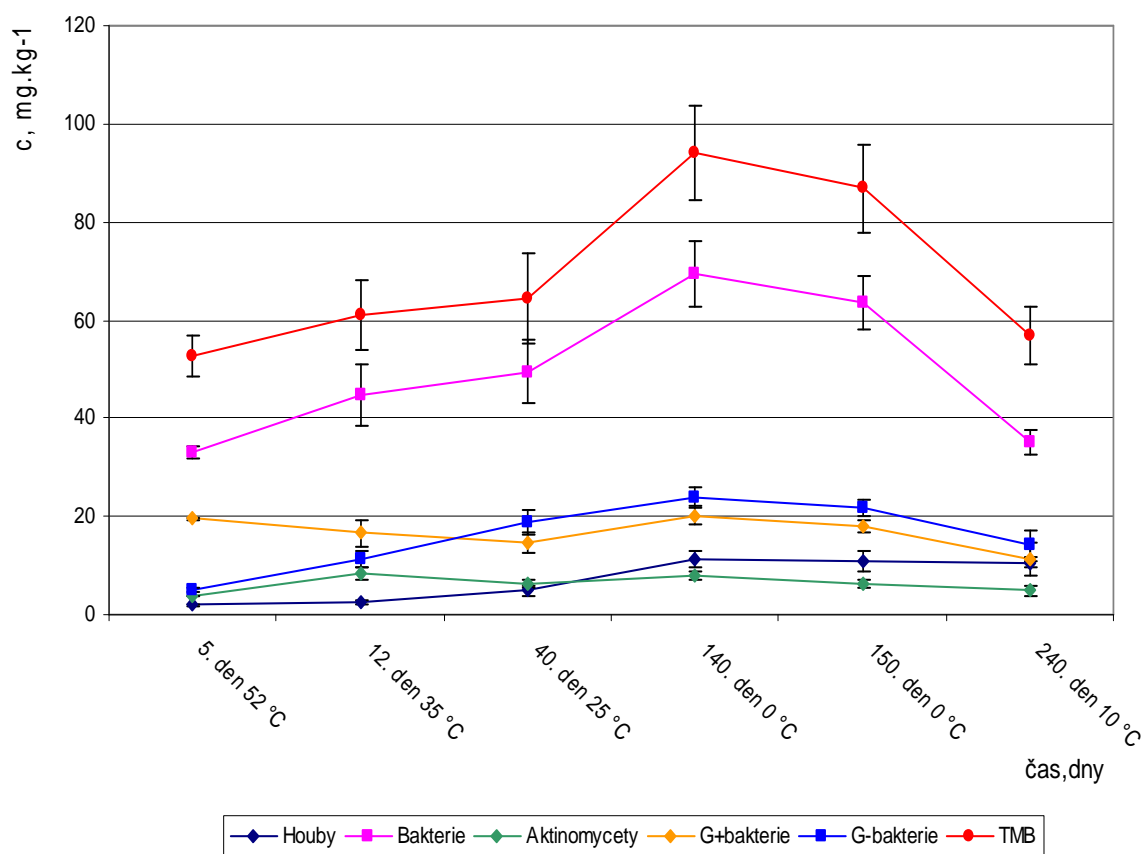
Aktivity ostatních ligninolytických enzymů (Lac, LiP a MnP) nebyly během kompostovacího procesu detekovány.



Obr. 16: Průběh aktivity lakasy vázané na matrici vzorku.

5.2.3. Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin

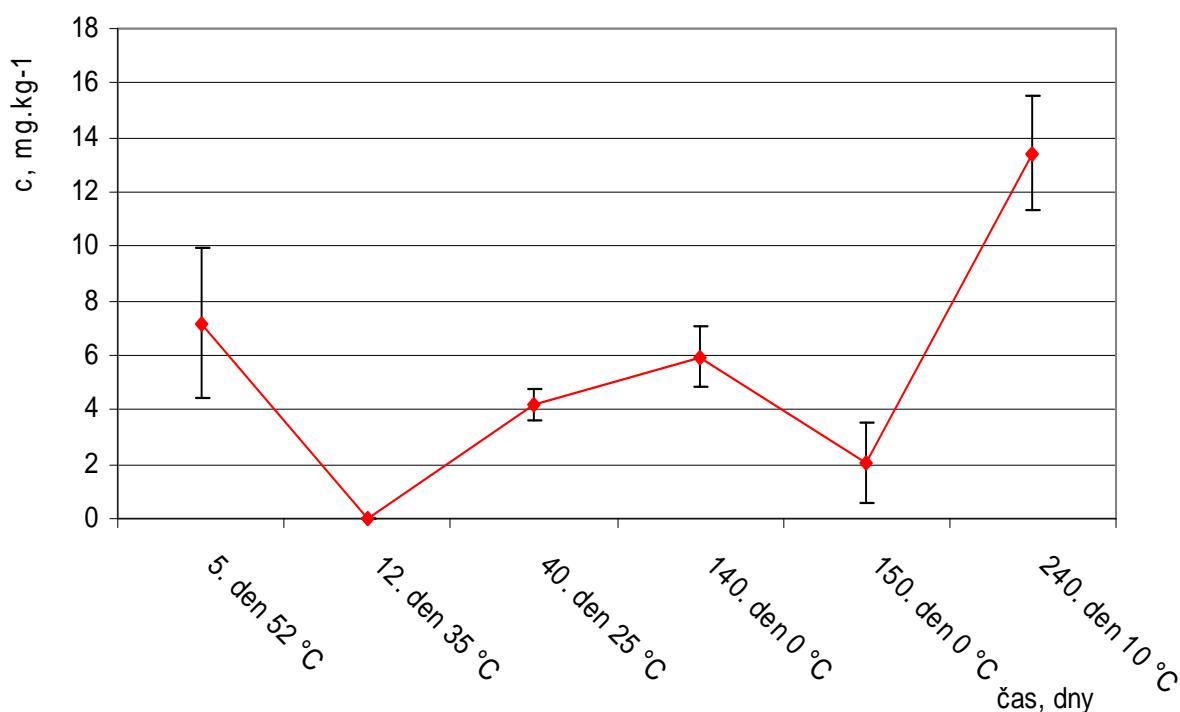
Analýza fosfolipidických mastných kyselin byla prováděna u vzorků kompostovaného materiálu odebíraných 5., 12., 40., 140., 150. a 240. den. Obrázek 17 popisuje změny růstu mikroorganismů v průběhu kompostovacího procesu. Na ose y je vyznačena koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$], a na ose x jsou znázorněny dny odběrů kompostovaného materiálu s příslušnými teplotami. Po 5. dni kompostování docházelo k vzestupu růstu v podstatě všech sledovaných skupin kromě Gram-pozitivních bakterií a biomasa dosáhla maxima po 100 dnech maturace. K nejvyššímu nárůstu biomasy došlo u hub, kdy se množství biomasy znásobilo 6krát při srovnání s prvním analyzovaným vzorkem. V dalších odběrech následoval opět pokles, kdy vyjma Gram-negativních bakterií a hub dosáhla množství biomasy úrovně detekované v prvním vzorku.



Obr. 17: Koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin v průběhu kompostování.

5.2.4. Stanovení ergosterolu

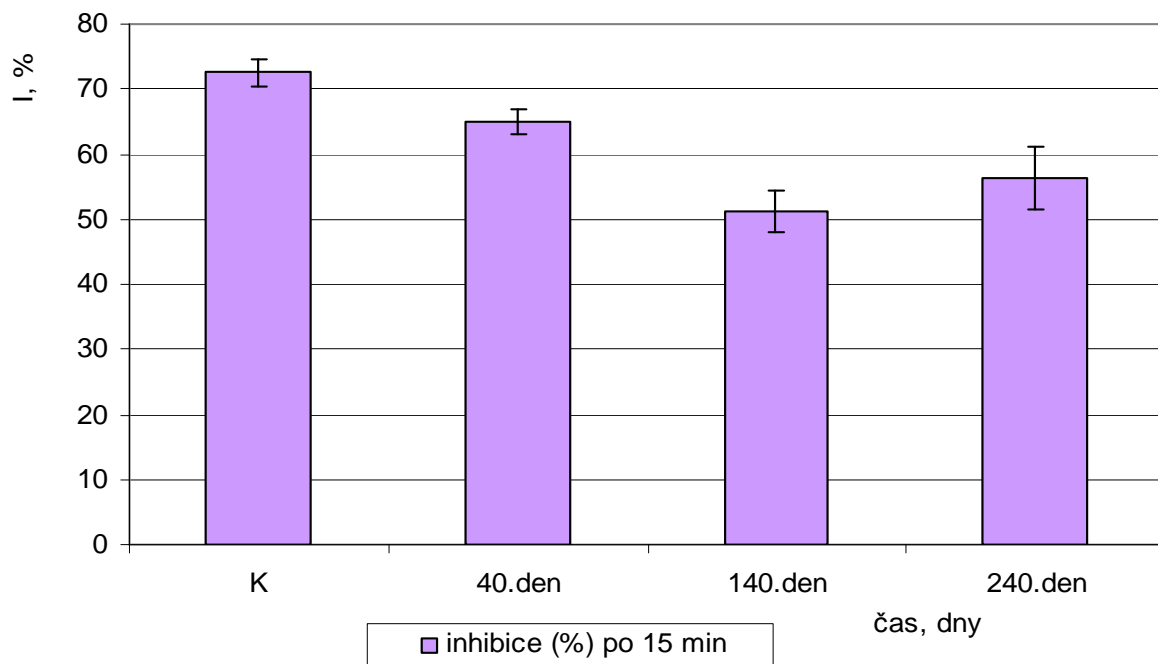
Ergosterol byl stanovován u vzorků, které byly odebrány 5., 12., 40., 140., 150. a 240. den. Koncentrace ergosterolu naměřené ve vzorku kompostovaného materiálu jsou znázorněny na obrázku 18. Osa y popisuje koncentrace ergosterolu [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] a osa x dny odběrů s příslušnými teplotami. Z grafu je zřejmé, že po 5. dni kompostování docházelo k poklesu koncentrace až pod mez detekce a po 12. dnu k mírnému růstu koncentrace ergosterolu. Maximální růst houbové biomasy byl zaznamenán po 200 dnech maturace kompostu ($13,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).



Obr. 18: Koncentrace ergosterolu ve vzorku kompostovaného materiálu.

5.2.5. Stanovení akutní toxicity

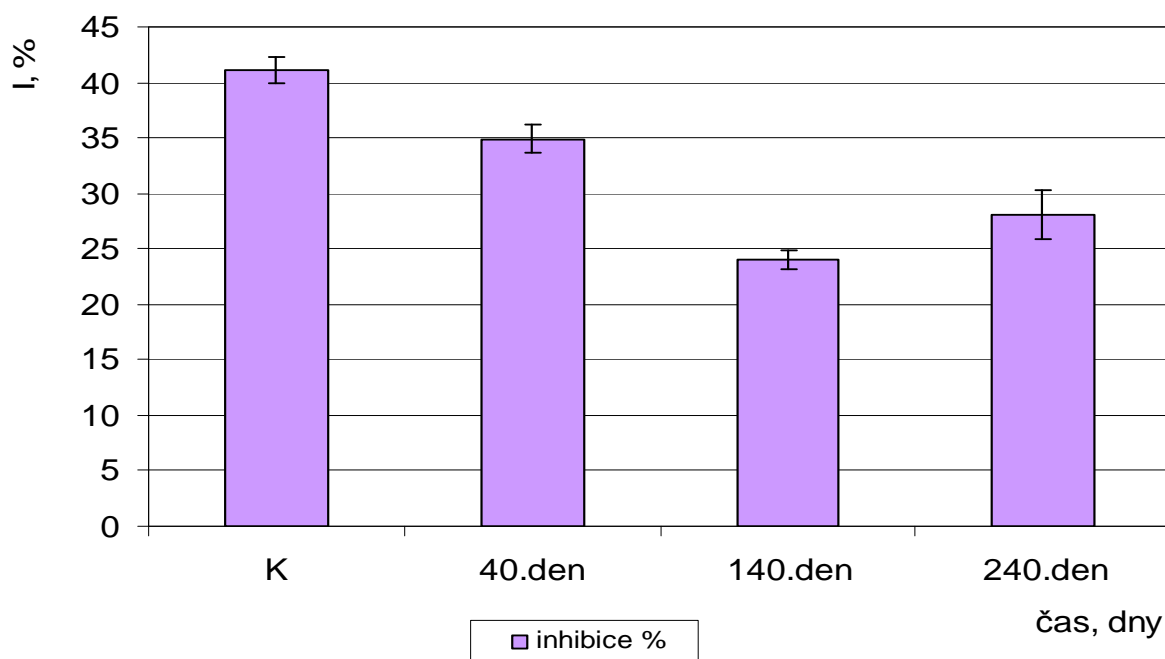
Akutní toxicita vzorků kompostovaného materiálu byla vyhodnocena 40., 140. a 240. den odběrů. Obrázek 19 popisuje inhibici luminiscence emitované bakteriemi *Vibrio fischeri*. Na ose y je vyznačena inhibice luminiscence (%). Osa x označuje toxickou kontrolu (K-kontaminované dřevo) a příslušný odběr vzorků kompostovaného materiálu. Jak je z výsledků patrné, toxicita kompostovaného materiálu klesala v průběhu kompostování a 200. den maturace kompostu byla naměřena hodnota inhibice luminiscence (56 ± 4 %). Mezi 140. a 240. dnem došlo k mírnému nárůstu, avšak tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní (t-test, $\alpha = 0,05$). Ke snížení toxicity došlo o 23 ± 5 % oproti původní hodnotě. Inhibice luminiscence kontroly byla naměřena 73 ± 4 %.



Obr. 19: Stanovení inhibice luminiscence pomocí bakterií *Vibrio fischeri*.

5.2.6. Stanovení fytotoxicity

Fytotoxicita byla stanovována u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebrány 40., 140. a 240. den. Osa y popisuje inhibici klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare L.*) a osa x toxickou kontrolu (K-kontaminované dřevo) s příslušnými odběry. Z grafu je zřejmé, že v průběhu kompostovacího procesu došlo ke snížení toxicity kompostu. Inhibice klíčivosti v toxické kontrole (K-kontaminované dřevo) byla 41 ± 4 %. Po 40ti dnech kompostování došlo k poklesu toxicity o 15 ± 6 % oproti kontrole. Nejnižší inhibice klíčivosti byla zaznamenána 140. den, kde došlo ke snížení toxicity o 41 ± 5 % oproti kontrole. Po 200 dnech maturace kompostu byla inhibice klíčivosti 28 ± 5 %, tedy toxicita kompostu klesla o 32 ± 6 % oproti kontrole.

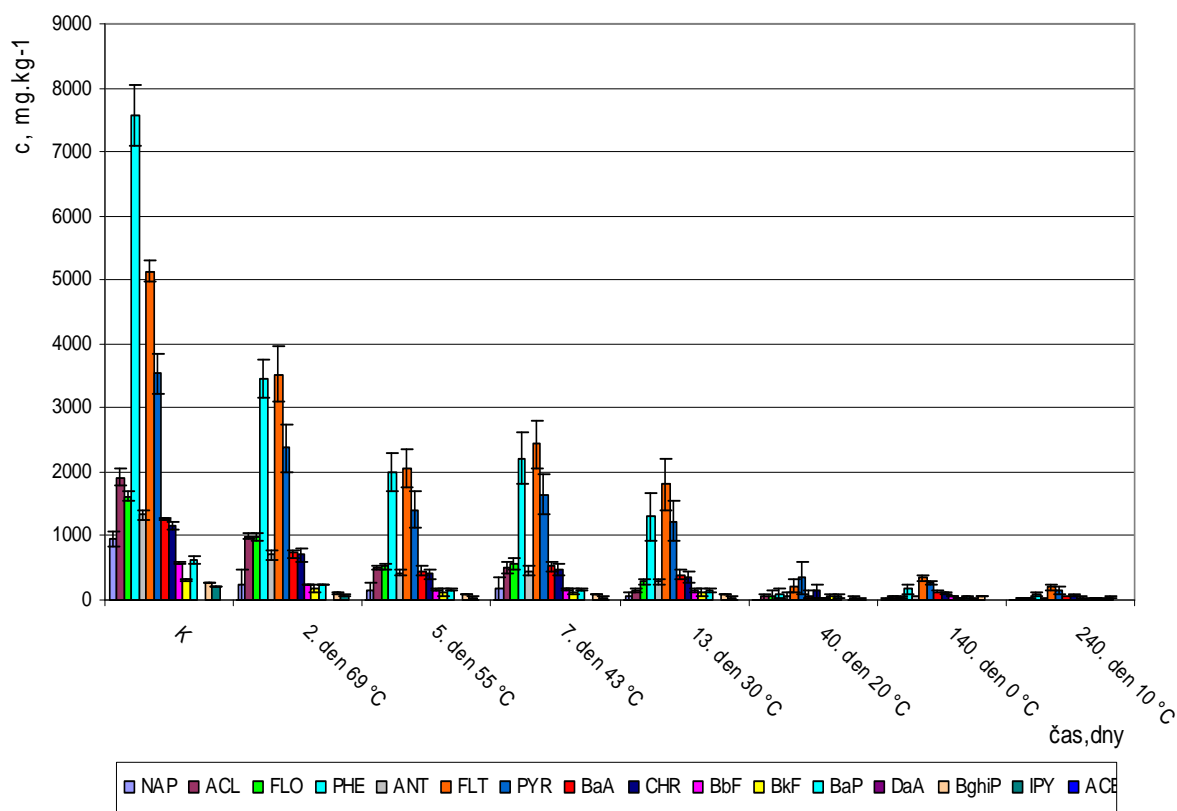


Obr. 20: Stanovení inhibice klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare L.*).

5.3. Bioremediace kontaminovaného dřeva (pražců) pomocí kompostování v pilotním měřítku - třetí kompostovací experiment

5.3.1. Degradace PAU

Ve třetím degradačním experimentu byly vzorky kompostovaného materiálu odebírány 2., 5., 7., 13., 40., 140. a 240. den následně vyhodnoceny. Na obrázku 21 jsou znázorněny výsledky degradace PAU pomocí kompostování kontaminovaného dřeva. V grafu je na ose y vynesena koncentrace 16 PAU [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]. Osa x popisuje skupiny sloupců reprezentující jednotlivé PAU, příslušnou kontrolu (K-kontaminované pražce) a časový průběh odběrů vzorků kompostovaného materiálu s aktuálními teplotami. K nejvýraznějšímu poklesu koncentrace sum PAU došlo v termofilní a mezofilní části kompostování. Porovnáním sum PAU toxické kontroly ($26497,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a sum PAU vzorků kompostovaného materiálu ($1238,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) po 40ti dnech kompostování bylo zjištěno, že k degradaci PAU došlo o 95 % z původní hodnoty. Po skončení experimentu (200 dní maturace) byla naměřená koncentrace všech sum PAU $796,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. K celkové degradaci PAU došlo z 97 % původních hodnot.

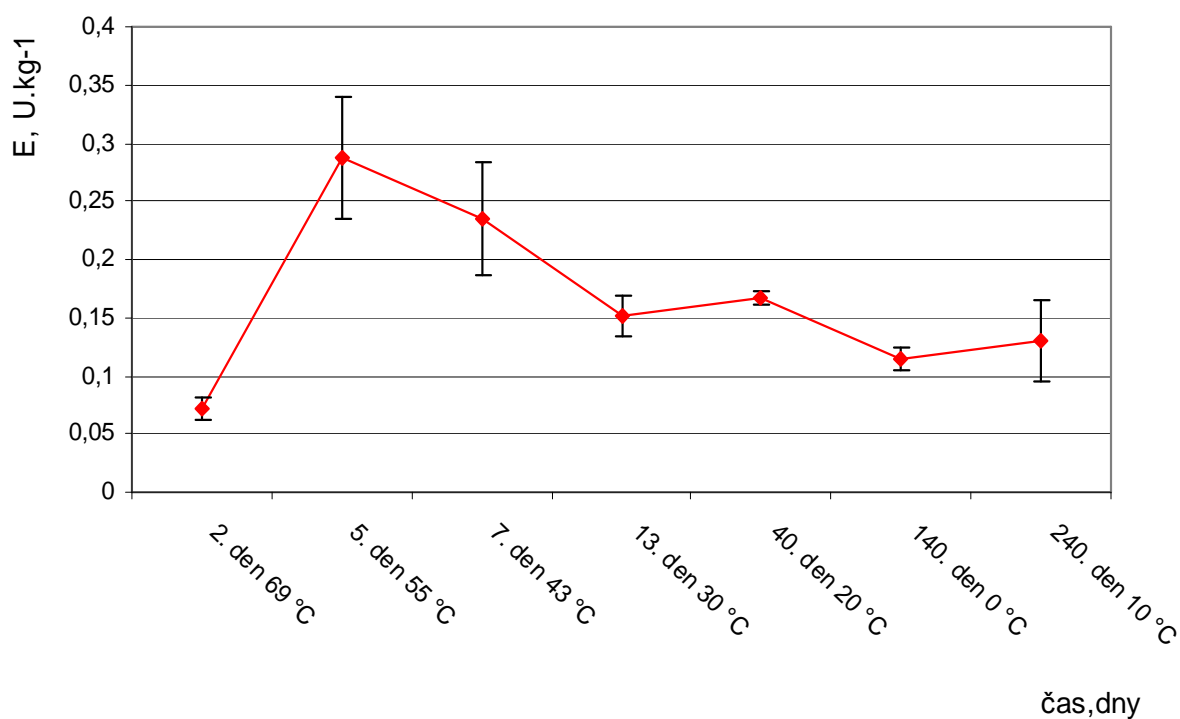


Obr. 21: Degradace jednotlivých PAU kompostováním kontaminovaného dřeva.

5.3.2. Stanovení aktivity ligninolytických enzymů

Lakasová aktivita byla měřena u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebrány 2., 5., 7., 13., 40., 140. a 240. den Obrázek 22 znázorňuje aktivity enzymu Lac vázané na matrici vzorku. Osa y popisuje lakasovou aktivitu [$\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$] a osa x den odběru vzorku kompostu s příslušnou teplotou. V termofilní fázi kompostování byl zaznamenán růst lakasové aktivity a svého maxima ($0,29 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) dosáhla aktivita 5.den kompostování. Poté docházelo k poklesu aktivity a po 13. dni kompostování opět k mírnému vzestup. Po 200 dnech maturace kompostu byla hodnota lakasové aktivity $0,13 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$.

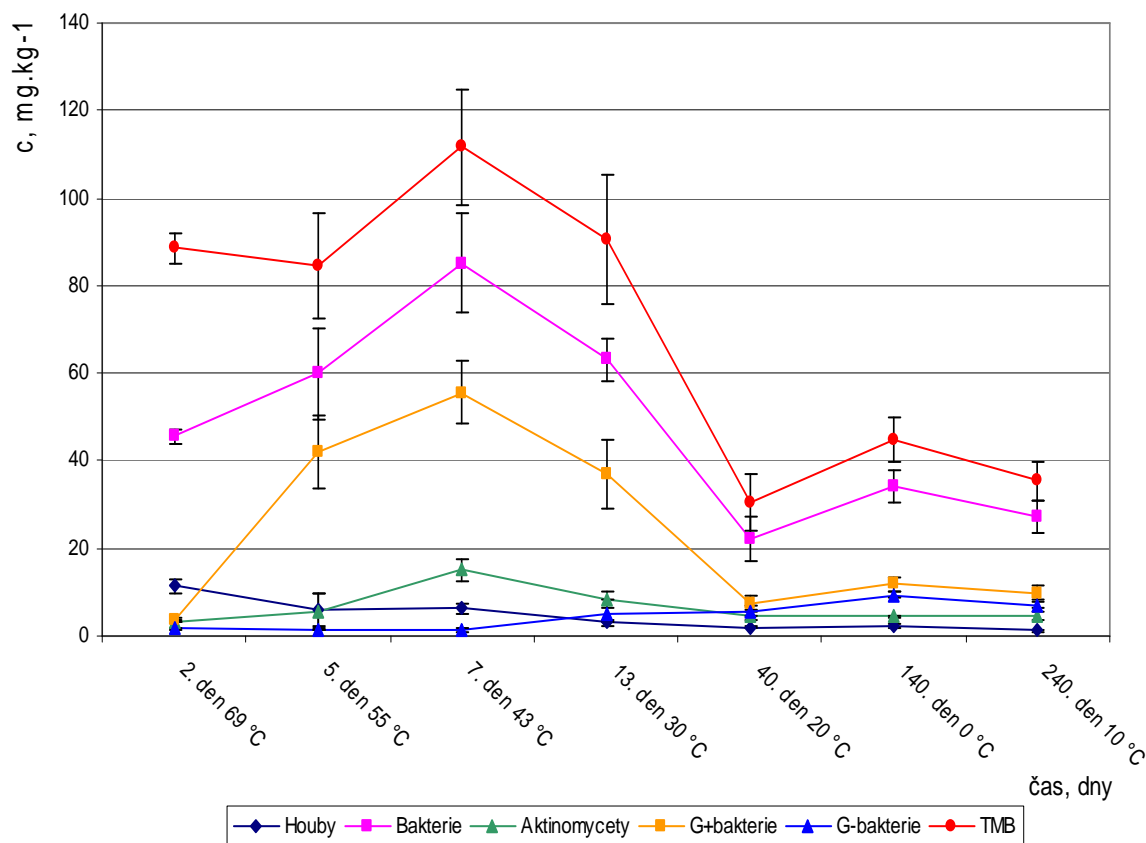
Aktivity ostatních ligninolytických enzymů (Lac, LiP a MnP) nebyly během kompostovacího procesu detekovány



Obr. 22: Průběh aktivity lakasy vázané na matrici vzorku.

5.3.3. Stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin

Fosfolipidické mastné kyseliny byly stanovovány u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebírány 2., 5., 7., 13., 40., 140. a 240. den. Obrázek 23 popisuje změny růstu mikroorganismů v průběhu kompostovacího procesu. Na ose y je vyznačena koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] a na ose x jsou znázorněny dny odběrů kompostovaného materiálu s příslušnými teplotami. Růst biomasy některých skupin byl zaznamenán od počátku kompostovacího procesu. V termické fázi (7. den) dosahovaly bakterie, aktinomycety, Gram-pozitivní bakterie a TMB (totální mikrobiální biomasa) maxima svého růstu. Poté docházelo k poklesu všech zástupců mikroorganismů. Na počátku 1. fáze maturace při teplotě 20 °C byl zaznamenán opět nárůst především Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií.



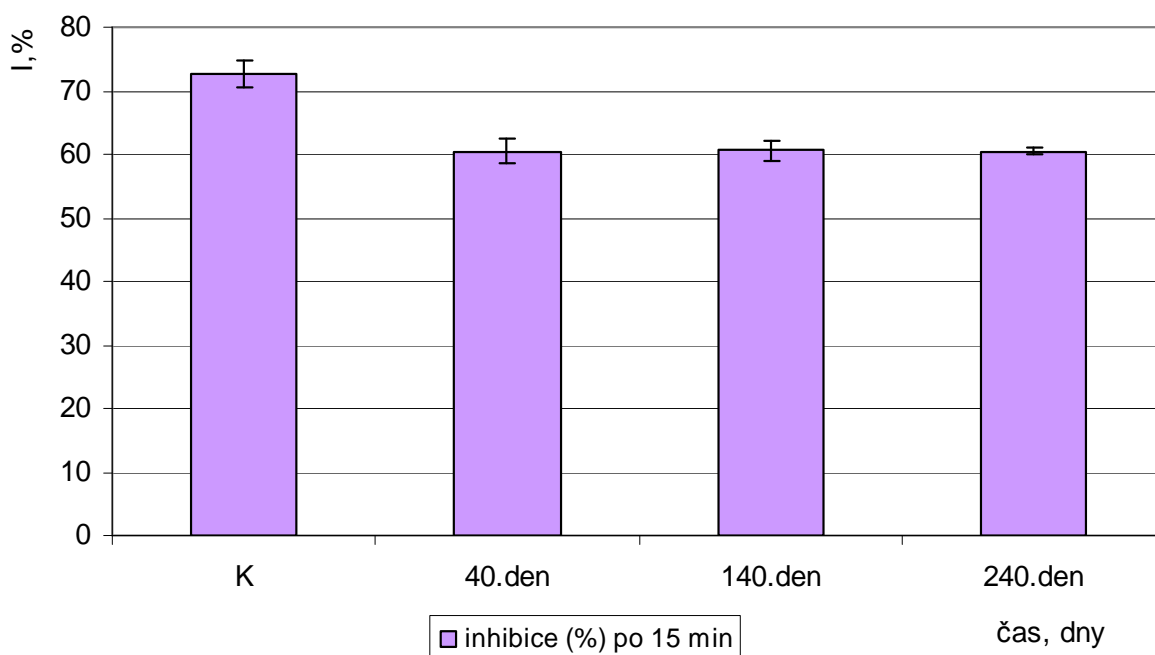
Obr. 23: Koncentrace fosfolipidických markerových mastných kyselin v průběhu kompostování.

5.3.4. Stanovení ergosterolu

Ukazatel houbové biomasy ergosterol byl stanovován u vzorků, které byly odebrány 2., 5., 7., 13., 40., 140. a 240. den. V tomto kompostovacím experimentu nebyly detekovány žádné koncentrace ergosterolu.

5.3.5. Stanovení akutní toxicity

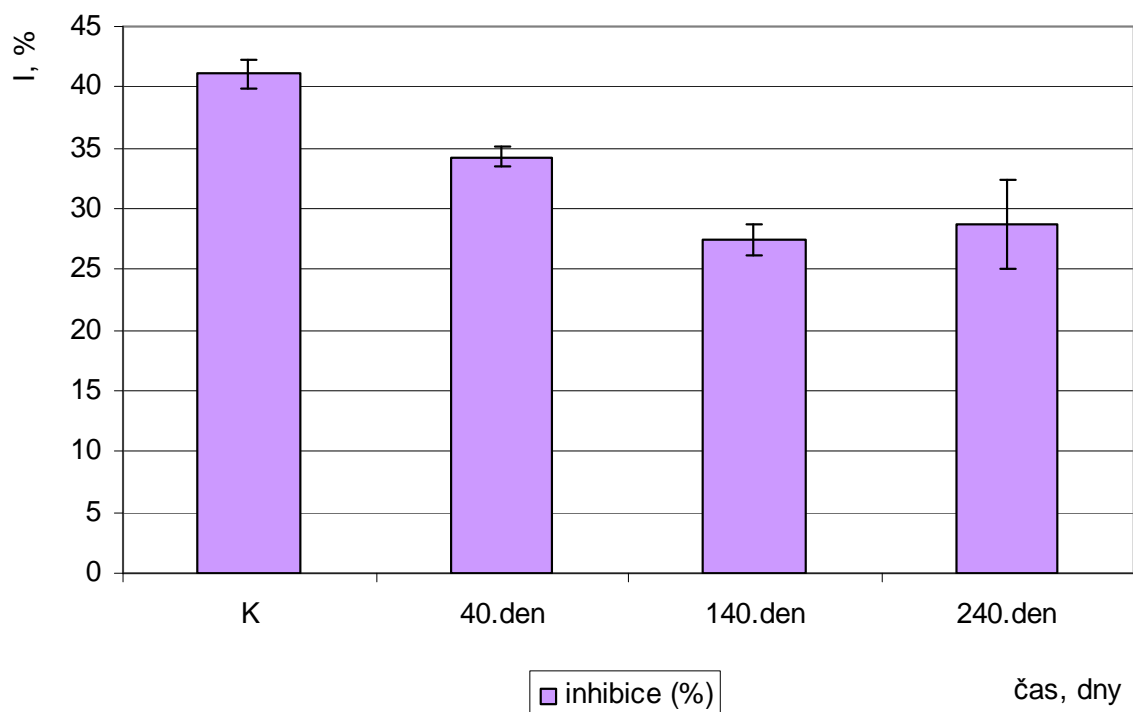
Akutní toxicita vzorků kompostovaného materiálu byla stanovována 40., 140. a 240. den odběru. Na obrázku 24 je znázorněna inhibice luminiscence emitované bakteriemi *Vibrio fischeri*. Na ose y je vyznačena inhibice luminiscence (%). Osa x označuje toxickou kontrolu (K-kontaminované dřevo) a příslušný odběr vzorků kompostovaného materiálu. Inhibice luminiscence v toxické kontrole byla 73 ± 4 %. Po 40. dnu kompostování klesla toxicita kompostu o 15 ± 5 % a do konce kompostovacího experimentu více neklesala.



Obr. 24: Stanovení inhibice luminiscence pomocí bakterií *Vibrio fischeri*.

5.3.6. Stanovení fytotoxicity

Fytotoxicita byla stanovována u vzorků kompostovaného materiálu, které byly odebrány 40., 140. a 240. den. Výsledky testu jsou zobrazeny na obrázku 25. Osa y popisuje inhibici klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a osa x toxicitou kontrolu (K-kontaminované dřevo) s danými odběry. Z grafu je zřejmé, že k poklesu toxicity docházelo až do 1. fáze maturace kompostu. Po této fázi byl zaznamenán mírný růst toxicity, který však nebyl statisticky signifikantní (t-test, $\alpha = 0,05$). Inhibice klíčivosti u toxické kontroly byla 41 ± 5 % a k celkovému poklesu toxicity na konci kompostovacího procesu došlo o 29 ± 4 %.



Obr. 25: Stanovení inhibice klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.)

6. Diskuse

Metoda kompostování byla v mnoha publikacích prokázána jako vhodná metoda k odstranění PAU z kontaminovaného materiálu životního prostředí a to zejména z půd, sedimentů a čistírenských kalů [57], [60], [63], [64]. Prvním cílem této práce bylo sledování efektivity odstranění PAU z kontaminovaného dřeva (železniční pražce) metodou kompostování.

V prvním degradačním experimentu byl jako kompostovací materiál zvolen tzv. „zelený substrát“. V průběhu kompostování kontaminovaného dřeva (velikost odštěpků 1 cm) došlo k významnému snížení všech zástupců 16 PAU. Především v průběhu termofilní a mezofilní fáze byl zaznamenán výrazný pokles nízkomolekulárních PAU. Jako příklad je uveden PHE, kde došlo k poklesu o 98 % z původního množství oproti BkF, který byl degradován pouze z 37 %. Pravděpodobným vysvětlením je nízká biologická dostupnost vysokomolekulárních PAU a také možná volatilizace v případě nízkomolekulárních PAU. K celkové degradaci PAU došlo o 83 % z původních hodnot. Současně byly založeny 3 paralely kompostů, které se lišily velikostí částic kontaminovaného dřeva (3 cm) a k celkové degradaci zde došlo o 59 %. Tento výsledek dokazuje, že velikost kompostovaných pražců měla zásadní vliv na degradaci PAU. Vysvětlením může být opět nižší biologická dostupnost pro mikroorganismy, kdy jsou PAU uzavřeny ve větších částicích dřeva, jejichž rozklad je pro mikroorganismy obtížnější a rovněž je pravděpodobně snížena mobilita PAU způsobená difúzí.

Ve druhém degradačním experimentu byl opět použit pro venkovní kompostování tzv. „zelený substrát“ a ve třetím degradačním experimentu byla jako kompostovací substrát použita čerstvě posečená tráva. Oba experimenty byly založeny v letních měsících. Ve druhém experimentu došlo k celkovému snížení PAU o 81 %. Ve třetím experimentu došlo ke snížení PAU o 98 % z původního množství. Tento experiment dosahoval lepších degradačních výsledků. To mohlo být způsobeno použitím trávnického substrátu, který byl více homogenní a kde se jedná o snadněji rozložitelný substrát s menším obsahem ligninu a větším množstvím dostupných živin. Hlavní část degradace se odehrála v průběhu termofilní a následné mezofilní fáze, kde u třetího experimentu došlo k degradaci z 95 % a u druhého experimentu došlo ke snížení z 68 %. V této fázi kompostování může hrát významnou úlohu vysoká teplota, která zřejmě napomáhá desorpci PAU z matrice vzorku [65].

Po dobu 19ti měsíců autoři Atagana a kol. (2004) kompostovali půdu kontaminovanou kreosotem, která obsahovala $30000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PAU [58]. Popsali, že ideální teplota

pro kompostování silně znečištěných půd PAU je v rozmezí od 35 °C do 65 °C. Výsledky experimentu ukázaly, že metodou kompostování při daných teplotách lze odstranit i vysokomolekulární PAU pod koncentrací 1 mg·kg⁻¹. K rozdílným závěrům došli autoři Löser a kol. (2004), kteří popsali studii degradace PAU v kontaminovaném dřevě [59]. Výsledky degradace vyhodnotily 14. a 28. den kompostování. Zjistily že teplota 30 °C se zdá být optimální teplotou pro nejrychlejší degradaci PAU. Při vyšších teplotách došlo k výraznému úbytku pouze PHE oproti úbytku ANT a PYR. Tyto závěry se neshodují se závěry této diplomové práce, protože i při vyšších teplotách nad 30 °C docházelo k významnému poklesu jak ANT (od 85 % do 97 % z původního množství) tak PYR (od 67 % do 95 % z původního množství). Výsledky této diplomové práce se shodují s výsledky publikace Atagana a kol. (2004), ačkoliv tito autoři degradovali PAU v kontaminované půdě.

V literatuře existují rozdílné výsledky degradace PAU metodou kompostování, kde autoři popsali, že efektivně byly rozkládány PAU s 2-3 aromatickými kruhy, některé se 4 aromatickými kruhy a velmi málo nebo žádné PAU s 5-6 aromatickými kruhy [66], [67]. Autoři publikací se domnívají, že degradace PAU je limitována řadou faktorů, především strukturou matrice a možnou adsorpcí na humusové látky kompostu.

Dále byla studována ekotoxicita vzorků kompostovaného materiálu. Pro stanovení ekotoxicity mohou být využívány například testy fyto toxicity spolu s testy akutní toxicity s bakteriemi [68]. V prvním experimentu byla vyhodnocena akutní toxicita měřením inhibice luminiscence pomocí bakterií *Vibrio fischeri* a fyto toxicity měřením inhibice klíčivosti semen ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Z porovnání výsledků obou testů je zřejmé, že ke snížení toxicity došlo už po 40ti dnech kompostování, kde došlo také k významnému poklesu koncentrace PAU. Z inhibice luminiscence bylo vypočítáno, že na konci experimentu došlo ke snížení toxicity o 22±5 %. Po 100 dnech maturace byl zaznamenán menší růst toxicity. Test fyto toxicity prokázal pokles toxicity o 37±7 %.

Ve druhém a třetím experimentu byly použity stejné testy ekotoxicity jako u prvního experimentu. Pokles toxicity byl opět zaznamenán po 40ti dnech kompostování a mírný nárůst po 100 dnech maturace. Z výsledků testů ve všech třech experimentech vyplývá, že mírný nárůst toxicity, ke kterému došlo u obou testů nebyl statisticky významný. Vzhledem k faktu, že pro testování byl použit extrakt organickým rozpouštědlem, lze usuzovat, že tyto výsledky nebyly ovlivněny případným výskytem těžkých kovů a v průběhu kompostování nedocházelo k významné tvorbě toxických produktů degradace PAU.

Dalším cílem této práce bylo sledovat změny mikrobiálního společenstva v průběhu kompostovacího procesu. Zvýšení teploty kompostu během počáteční fáze je důsledek činnosti a růstu mezofilních organismů (bakterie mléčného kvašení, Gram-negativní bakterie, kvasinky, houby), v následující fázi se procesu degradace účastní termofilní organismy a ve fázi chladnutí a zrání dochází k růstu a rozvoji nových mezofilních společenstev [69].

V prvním experimentu byly porovnány výsledky ze vzorků s přítomným kontaminovaným materiálem a vzorků netoxické kontroly (pouze kompostovací substrát). U vzorků s kontaminovaným materiálem bylo sledováno mnohonásobné zvýšení nárůstu biomasy především u hub (36krát) a Gram-negativních bakterií (14krát) ve srovnání s prvním analyzovaným vzorkem. Výrazný nárůst biomasy všech sledovaných skupin byl zaznamenán v maturační fázi kompostování, kromě Gram-pozitivních bakterií, které již po 40. dnu kompostování (po termické fázi) dosahovaly svého maxima a v průběhu maturace kompostu již nedocházelo k výrazným změnám jejich biomasy. Podobný trend růstu biomasy lze sledovat také u vzorků netoxické kontroly. Růst biomasy všech sledovaných skupin byl pozorován v termické fázi kompostování, kde k nárůstu došlo většinou dvojnásobně. Nejvýraznější růst biomasy v této fázi vykazovaly opět houby, jejichž nárůst byl 5ti násobný. Po ukončení experimentu byl nejvyšší nárůst biomasy pozorován opět u hub (7krát).

Ve druhém experimentu byl zaznamenán růst biomasy všech sledovaných skupin po 5. dnu kompostování, kromě Gram-pozitivních bakterií, kde byl pozorován menší pokles. Maxima růstu biomasy byla zaznamenána po 100 dnech maturace kompostu, kde došlo k 6ti násobnému nárůstu biomasy hub a 5ti násobnému nárůstu Gram-negativních bakterií.

Ve třetím kompostovacím experimentu docházelo k růstu biomasy většiny skupin do 7. dne kompostování, kde také dosahovaly svého maxima. Nejvýraznější nárůst biomasy byl zaznamenán u Gram-negativních bakterií (15krát). Avšak u biomasy hub byl zaznamenán pokles pod úroveň detekované v prvním odběru až do konce experimentu. Na počátku maturační fáze byl zaznamenán nárůst především Gram-negativních bakterií (7krát).

Ze srovnání výsledků všech kompostovacích experimentů je patrné, že profily jednotlivých skupin se značně liší a ačkoliv byl v prvním a druhém experimentu použit stejný substrát, absolutní množství biomasy se značně lišilo, kdy v modelových laboratorních kompostérech byla detekována značně vyšší mikrobiální biomasa. Tyto rozdíly však neměly patrný vliv na rozsah degradace.

Rozdílné výsledky mezi druhým a třetím experimentem mohou být způsobené volbou jiného kompostovacího substrátu. Výsledky ukázaly, že použití travního substrátu mělo za následek zvýšenou degradaci PAU a s tím byla spojena vysoká produkce mikrobiální

biomasy především v termofilní a mezofilní části kompostování. Rychlý nárůst biomasy na počátku třetího experimentu by mohl vysvětlovat i rychlejší úbytek PAU v termofilní fázi. Biomasa hub od počátku kompostování až do konce experimentu klesala a tudíž lze předpokládat, že se na degradaci PAU v tomto případě neúčastnily houby v takovém rozsahu jako v prvním a druhém experimentu.

Blanca Antizar-Ladislao a kol. (2008) popsali, že vysoké teploty nad 60 °C inhibují růst mikroorganismů, které by mohly efektivně rozkládat PAU a tak k jejich odstranění mohlo dojít především vypařováním [54]. Dále popsali, že pokud docházelo k růstu Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií, docházelo také ke snížení koncentrace PAU v kontaminované půdě. Dospěli k závěru, že Gram-pozitivní bakterie byly pravděpodobně zodpovědné za degradaci PAU. V této diplomové práci bylo prokázáno, že i v termofilní fázi kompostování docházelo k nárůstu mikroorganismů v případě prvního a druhého experimentu a to především hub, které se významně účastnily degradace PAU.

Srovnáním výsledků těchto analýz mezi jednotlivými experimenty nelze jednoznačně usoudit v jaké míře jednotlivé organismy participovaly na degradaci PAU. Pro další usuzování vlivu skupin, či jednotlivých druhů mikroorganismů by bylo zapotřebí použít molekulárně-biologické analýzy diverzity mikroorganismů, či případně přímé metagenomické metody. Tyto přístupy však byly nad rámec této diplomové práce.

Analýzy ergosterolu jakožto alternativního markeru houbové biomasy ukázaly nevhodnost této metody v případě vzorků silně kontaminovaných kreosotem. Ačkoliv byly detekovány houby pomocí analýz fosfolipidických mastných kyselin, v případě vzorků s kreosotem docházelo pravděpodobně k chromatografické interferenci s matricí vzorku a ergosterol nebyl detekován. Tento problém by bylo možno vyřešit případným zařazením dalšího preparativního kroku.

Dalším cílem této práce byla detekce enzymové aktivity ligninolytických enzymů v průběhu degradace, které jsou známy svými výraznými schopnostmi rozkládat PAU [48]. Naměřena byla pouze aktivita Lac vázané na matrici vzorku, ostatní enzymy (Lac, LiP a MnP) nebyly detekovány.

V prvním degradačním experimentu byla aktivita Lac měřena u netoxické kontroly (pouze kompostovací substrát) a vzorků kompostovaného materiálu. U netoxické kontroly byly detekovány zvýšené aktivity Lac již 15. den kompostování, po termické fázi docházelo k poklesu a 27. den aktivita dosahovala svého maxima (1,1 U·kg⁻¹). U vzorků kompostovaného materiálu byla zvýšená aktivita pozorována 27. den kompostování, kdy dosahovala svého maxima (0,8 U·kg⁻¹). V maturační fázi nebyla aktivita detekována. Tento

pokus ukázal, že aktivita Lac je ovlivněna přítomností kreosotu, protože netoxická kontrola vykazovala mnohonásobně vyšší aktivity Lac v termické i mezofilní fázi kompostování. Možným vysvětlením může být obsah toxických látek jako například těžkých kovů, které způsobují inhibici tohoto enzymu [70] a které byly ve vzorcích kontaminovaného dřeva a travního substrátu detekovány.

Ve druhém degradačním experimentu byla maximální aktivita Lac ($0,2 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) naměřena již 5. den kompostování (termofilní fáze). Poté byl zaznamenán pokles a opět zvýšená aktivita 40. den kompostování. V maturační fázi nedocházelo již k výraznějším změnám aktivity. Tento trend nárůstu aktivity byl detekován také ve třetím experimentu, kde byla maximální aktivita Lac naměřena 5. den kompostování ($0,3 \text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$) a do ukončení kompostovacího experimentu byla detekována nižší hladina aktivity. Ačkoliv tento enzym je znám pro svoje schopnosti oxidace PAU, z výsledků těchto experimentů vyplývá, že nelze jednoznačně přisoudit rozsah participace lakasy na degradaci PAU, neboť v prvním kompostování experimentu byl zaznamenán signifikantní úbytek PAU mezi 6. a 12. dnem, přesto, že aktivita lakasy byla relativně malá a rovněž mezi 140. a 240. dnem, kdy aktivita nebyla detekována.

7. Závěr

Hlavními cíly této práce bylo otestovat možnost použití kompostovacího procesu pro degradaci PAU ve dřevě kontaminovaném kreosotovým olejem, otestovat změny ekotoxicity v průběhu procesu a provést analýzy mikrobiálních společenstev v průběhu kompostování. V této diplomové práci bylo potvrzeno, že degradace PAU kompostováním je perspektivní metoda z hlediska bioremediací. Koncentrace PAU byly významně sníženy ve všech experimentech a tento fakt potvrdil, že použité kompostovací substráty tzv. „zelený substrát“ a především čerstvě posečená tráva jsou vhodné materiály pro biodegradace PAU v kontaminovaném dřevě. Analýzy PAU ukázaly, že po 340 dnech v laboratorním kompostéru při použití tzv. „zeleného substrátu“, který je používán pro komerční pěstování žampionů, došlo v případě štěpů dřeva o velikosti 1 cm k degradaci PAU v rozsahu 83 % a v případě štěpů o velikosti 3 cm k degradaci 59 % sumy PAU. Těmito experimenty byl prokázán negativní vliv větších částic kontaminovaného materiálu na degradaci PAU. Kompostování bylo testováno i v pilotním měřítku se štěpy o velikosti 3 cm. V tomto případě byl sledován také vliv rozdílných kompostovacích substrátů na účinnost degradace PAU. Jako kompostovací substráty byly použity „zelený substrát“ a travní substrát. Travní substrát vykazoval lepší výsledky a k poklesu koncentrace sum PAU zde došlo o 97 % z původního množství a při použití „zeleného substrátu“ došlo k celkovému snížení PAU o 81 % po 240 dnech.

Dále byly sledovány změny ve společenstvech mikroorganismů v průběhu kompostování. Z výsledků stanovení fosfolipidických markerových mastných kyselin byl pozorován významný nárůst Gram-negativních bakterií a hub především v termofilní a mezofilní fázi kompostování, ve kterých také docházelo k výraznému poklesu PAU. A však z těchto výsledků se nepodařilo vysvětlit do jaké míry jednotlivé skupiny organismů participovaly na degradaci PAU.

Byly sledovány aktivity extracelulárních enzymů v průběhu kompostování, ale detekována byla pouze aktivita enzymu lakasy a to ve všech třech experimentech.

V průběhu degradačního procesu byly také použity testy ekotoxicity. Test akutní toxicity s bakteriemi *Vibrio fischeri* a test fyto toxicity založený na principu sledování klíčivosti semen (*Hordeum vulgare* L.) ukázaly, že docházelo ke snížení ekotoxicity v průběhu experimentů, a tedy nedocházelo pravděpodobně k tvorbě toxických produktů degradace.

Z výsledků této práce vyplývá, že kompostovací proces je perspektivní z hlediska bioremediací, neboť vykazoval značný biodegradační potenciál PAU. Avšak i přes pozitivní výsledky degradace v této práci, nelze kompostování kontaminovaných pražců usuzovat jako konečné řešení jak nakládat s tímto nebezpečným odpadem. Výsledky dále naznačují, že je nezbytné další studium této metody, kdy zejména pochopení úloh jednotlivých skupin organismů a enzymů podílejících se na degradaci umožní další cílené optimalizace pro zvýšení účinnosti tohoto procesu.

8. Literatura

- [1] Pecka K.: *Polycyklické aromatické uhlovodíky – vznik, složení, chování, vlastnosti*. In: *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), sborník referátu ze semináře*. Čížek Z. (ed.). Praha, BIJO TC 1995, p. 11–22.
- [2] Jehličková, Z.; Žilka, L.: Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Chemmagazin* **4**, 17–21 (1994).
- [3] Cerniglia C. E.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351–368 (1992).
- [4] Kužílek, V.: *Polycyklické aromatické uhlovodíky v hydrosféře*. Výzkumná zpráva, VÚV TGM, ISBN 80-901181-6-X (1994).
- [5] Haritash, A. K.; Kaushik, C. P.: Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**, 1–15 (2009).
- [6] Covino, S.: *In vivo and in vitro degradation of aromatic contaminants by white rot fungi. A case study: Panus tigrinus CBS 577.79.*: PhD Course, Tuscia University–Viterbo-Italy (2009).
- [7] Bamforth, S. M.; Singleton, I.: Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **80**: 723–736 (2005).
- [8] Cajthaml, T.: *Biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků ligninolytickými houbami a metodou kompostování*. Disertační práce, Univerzita Karlova, Praha (2002).
- [9] Baum, E. J.: Occurrence and surveillance of polycyclic aromatic. In: *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*. Gelboin and, H.V. and Ts'o P.O.P. (ed.). New York: Academic Press, 1978, p. 45.
- [10] Kanaly, R. A.; Shigeaki, H.: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* **182**: 2059–2067 (2000).
- [11] Ministerstvo zdravotnictví ČR: 252/2004 Sb. *Hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost kontrol*. Dostupné z URL: <http://portal.gov.cz/zakon/252/2004> [cit. 5.8.2010]

- [12] Goldman, R.; Enewold, L.; Pellizzari, E.; Beach, J. B.; Bowman, E. D.; Krishnan, S. S.; Shields, P. G.: Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *American Association for Cancer Research* **61**: 6367–6371 (2001).
- [13] Eisler, R.: Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service*: 85–81 (1987).
- [14] Juhasz, A. L.; Naidu, R.: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration Biodegradation* **45**: 57–88 (2000).
- [15] United States Environmental Protection Agency. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) 2008*: Dostupné z URL: <http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm> [cit. 5.8.2010]
- [16] Samanta, S. K.; Singh, O. V.; Jain, R. K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **20**: 243–248 (2002).
- [17] Stegeman, J. J.; Schlezinger J. J.; Craddock K. E.; Tillitt D. E.: Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones. *Environmental Science and Technology* **35**: 54–62 (2001).
- [18] Nisbet, C.; LaGoy, P.: Toxic equivalency factors TEFs for polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs . *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **16**: 290–300 (1992).
- [19] Falahatpisheh, M. H.; Donnelly, K. C.; Ramos, K. S.: Antagonisti interactions among nephrotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **62**: 543–560 (2001).
- [20] Liu, K.; Han, W. J.; Pan, W. P.; Riley J. T.: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal fired pilot FBC system. *Journal of Hazardous Materials* **84**: 75–188 (2001).
- [21] World Health Organization: *Coal Tar Creosote*. Geneva, 2004. Dostupné z URL: < <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/CICAD62.pdf>> [cit. 1.8.2010]
- [22] Koppers: *Creosote Treated Wood*. Dostupné z URL: <http://www.koppers.com/htm/Citiz_SHaE_CIS_CTW.html> [cit. 1.8.2010]

- [23] Eisenreich, S. J.; Looney, B. B.; Thornton, J. D.: Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem. *Environmental Science and Technology* **15**: 30–38 (1981).
- [24] Bedient, P.; Rodgers, A.; Bouvette, T.: Groundwater quality at a creosote waste site. *Ground Water* **22**: 318–329 (1984).
- [25] Mohammed, S.; Sorensen, D.; Sims, D.: Pentachlorophenol and phenanthrene biodegradation in creosote contaminated aquifer material. *Chemosphere* **37**: 103–111 (1998).
- [26] Ekosystem: *Výzkum a pilotní ověřování nových sanačních technologií a způsobů průzkumných postupů při odstraňování SEZ*. Dostupné z URL: <<http://www.ekosystem.cz/vav/x/2.htm>> [cit. 1.8.2010]
- [27] Burkhard, J.; Černá, M.; Černík, M.; Demnerová, K.; Dubán, V.; Hanuš, P. a kol.: *Kompendium*. Chrudim, Havlíček Brain Team 2006.
- [28] US EPA: *A Citizen's Guide to Thermal Desorption*. Dostupné z URL: <<http://www.clu-in.org/download/citizens/citthermal.pdf>> [cit. 1.8.2010]
- [29] Macek, T.; Macáková, M.; Pavlíková, D.; Száková, J.; Truska, M.; Singh-Cundy: Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnologica* **22**: 101–106 (2002).
- [30] Straube, W. L.; Nestler, C. C.; Hansen, L. D.; Ringleberg, D.; Pritchard P. H.; Jones-Meehan, J.: Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnologica* **23**: 179–196 (2003).
- [31] Cerniglia, C. E.: Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology* **30**: 31–71 (1984).
- [32] Sutherland, J. B.: Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology* **9**: 53–61 (1992).
- [33] Sutherland, J. B.; Selby, A. L.; Freeman, J. P.; Evans, F. E.; Cerniglia, C. E.: Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 3310–3316 (1991).
- [34] Paszcynski, A.; Crawford, R. L.: Potential for bioremediation of xenobiotic compound by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress* **11**: 368–379 (1995).

- [35] Tuor, U.; Winterhalter, K.; Fiechter, A.: Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* **41**: 1–17 (1995).
- [36] Smith, M. R.: The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* **1**: 191–206 (1990).
- [37] Annweiler, E.; Richnow, H. H.; Antranikian, G.; Hebenbrock, S.; Garms, C.; Franke, S.; Francke, W.; Michaelis, W.: Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 518–523 (2000).
- [38] Mroziak, A.; Piotrowska-Seget, Z.; Labuzek, S.: Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies* **12**: 15–25 (2003).
- [39] Providenti, M. A.; Lee, H.; Trevors, J. T.: Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology* **12**: 379–395 (1993).
- [41] Cajthaml, T.; Pacáková, V.; Šašek, V.: Mikrobiální degradace polycyklických aromatických uhlovodíků. *Chemické Listy* **95**: 404–410 (2001).
- [42] Wunder, T.; Kremer, S.; Sterner, O.; Anke, H.: Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 636–641 (1994).
- [43] Šušla, M.; Svobodová, K.: Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chemické Listy* **100**: 889–895 (2006).
- [44] KIRK, T. K.; FARREL, R. L.: Enzymatic „combustion“: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* **41**: 465–505 (1987).
- [45] Rabinovich, M. L.; Bolobova, A. V.; Vasilchenko, L. G.: Decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics by fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology* **40**: 5–23 (2004).
- [46] Sack, U.; Heinze, T. M.; Deck, J.; Cerniglia, C. E.; Marten, R.; Zadrazil, F.; Fritsche, W.: Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3919–3925 (1997).

- [47] Johannes, C.; Majcherczyk, A.: Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 524–528 (2000).
- [48] Galli, E.; Rapana, P.; Tomati, U.; Polcaro, C. M.; Brancaleoni, E.; Frattoni, M.: Degradation of creosote by *Pleurotus ostreatus* mycelium in creosote-treated wood. *Fresenius Environmental Bulletin* **15**: 720–723 (2006).
- [49] Polcaro, C. M.; Brancaleoni, E.; Donati, E.; Frattoni, M.; Galli, E.; Migliore, L.; Rapana, P.: Fungal bioremediation of creosote-treated wood: A laboratory scale study on creosote components degradation by *Pleurotus ostreatus* mycelium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **81**: 180–184 (2008).
- [50] Sayara, T.; Sarrà, M.; Sánchez, A.: Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *Journal of Hazardous Materials* **179**: 999–1006 (2010).
- [51] Cajthaml, T.; Bhatt, M.; Šašek, V.; Matějů, V.: Bioremediation of PAH-contaminated soil by composting: A case study. *Folia Microbiologica* **47**: 696–700 (2002).
- [52] Cajthaml, T.; Šašek V.: Application of supercritical fluid extraction (SFE) to predict bioremediation efficacy of long-term composting of PAH-contaminated soil. *Environmental Science and Technology* **39**: 8448–8452 (2005).
- [53] Cai, Q. Y.; Mo, C. H.; Wu, Q. T.; Zeng, Q. Y.; Katsoyiannis, A.; Ferard, J. F.: Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. *Journal of Hazardous Materials* **142**: 535–542 (2007).
- [54] Antizar-Ladislao, B.; Spanova, K.; Beck, A. J.; Russell, N. J.: Microbial community structure changes during bioremediation of PAHs in an aged coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *International Biodeterioration and Biodegradation* **61**: 357–364 (2008).
- [55] Antizar-Ladislao, B.; Lopez-Real, J.; Beck, A. J.: In-vessel composting-bioremediation of aged coal tar soil: effect of temperature and soil/green waste amendment ratio. *Environment International* **31**: 173–178 (2005).

- [56] Oleszczuk, P.: Changes of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of sewage sludges with chosen physico-chemical properties and PAHs content. *Chemosphere* **67**: 582–591 (2007).
- [57] Hafidi, M.; Amir, S.; Jouraiphy, A.; Winterton, P.; El Gharous, M.; Merlina, G.; Revel, J. C.: Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of activated sewage sludge with green waste. *Bioresource Technology* **99**: 8819–8823 (2008).
- [58] Atagana, H. I.: Co-composting of PAH-contaminated soil with poultry manure. *Letters in Applied Microbiology* **39**: 163–168 (2004).
- [59] Löser, Ch.; Ulbricht, H.; Heinz, S.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in waste wood. *Compost Science and Utilization* **12**: 335–341 (2004).
- [60] Antizar-Ladislao, B.; Lopez-Real, J.; Beck, A. J.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions. *Environmental Pollution* **141**: 459–468 (2006).
- [61] ČSN EN ISO 11348–2: 2000 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorku vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi.
- [62] Šnajdr, J.; Valášková, V.; Merhautová, V.; Cajthaml, T.; Baldrian, P.: Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology* **43**: 186–192 (2008).
- [63] Wong, J. W. C.; Wan, C. K.; Fang, M.: Pig manure as a co-composting material for biodegradation of PAH-contaminated soil. *Environmental Science and Technology* **23**: 15–26 (2000).
- [64] Poulsen, T. G.; Bester, K.: Organic micropollutant degradation in sewage sludge during composting under thermophilic conditions. *Environmental Science and Technology* **44**: 5086–5091 (2010).
- [65] Antizar-Ladislao, M.; Lopez-Real, J. M.; Beck, A. J.: Bioremediation of polycyclic Aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. A reviews. *Environmental Science and Technology* **34**: 1–41 (2004).

- [66] Potter, C. L.; Glaser, J. A.; Chang, L. W.; Meier, J. R.; Dosani, M. A.; Herrmann, R.F.: Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. *Environmental Science and Technology* **33**: 1717–1725 (1999).
- [67] Amir, S.; Hafidi, M.; Merlina, G.; Hamdi, H.; Revel, J.C.: Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge. *Chemosphere* **58**: 449–458 (2005).
- [68] Eom, I. C.; Rast, C.; Veber, A. M.; Vasseur, P.: Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**: 190–205 (2007).
- [69] Steger, K.; Eklind, Y.; Olsson, J.; Sundh, I.: Microbial community growth and utilization of carbon constituents during thermophilic composting at different oxygen levels. *Microbial Ecology* **50**: 163–171 (2005).
- [70] Baldrian P. C.; Wiesche, J.; Gabriel, F.; Nerud, F.; Zadražil, F.: Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2471–2478 (2000).