

Abstrakt

Remediace persistentních chlorovaných aromatických sloučenin se stala prioritou vzhledem k teratogenním, karcinogenním a endokrinním účinkům těchto xenobiotik. V současné době si získává při sanacích znečištěných lokalit stále větší pozornost použití biologických remediačních technologií, souhrnně označovaných jako bioremediace. Představují efektivní, cenově konkurenceschopnou alternativu šetrnou k životnímu prostředí ve srovnání s fyzikálně-chemickými dekontaminačními postupy. Jako vhodný kandidát pro vytvoření remediační technologie se jeví skupina ligninolytických basidiomycetních hub tzv. houby bílé hniloby (mykoremediace). Doposud však nebyly pro své metabolické schopnosti široce využívány a mechanismus, jakým jsou schopny degradovat výše zmíněné polutanty, není rovněž plně prozkoumán.

Tato disertační práce byla zaměřena na:

i) zhodnocení účinnosti různých mykoremediačních strategií při odstraňování polychlorovaných bifenyly (PCB) z kontaminované půdy,

ii) porozumění mechanismu specifických houbových degradačních drah PCB a jejich hlavních metabolitů (CBA, chlorbenzoové kyseliny a OH-PCB, hydroxylované polychlorované bifenyly).

i) K vyhodnocení technické proveditelnosti vybraných remediačních strategií byla použita kombinace chemických, toxikologických a molekulárně-biologických technologií. Před uskutečněním samotné bioaugmentace (založenou na aplikaci ligninolytických hub *Pleurotus ostreatus* nebo *Irpex lacteus*) a biostimulace (přídavek lignocelulosového substrátu) byly u tří různých vzorků půdních horizontů (A – humusový horizont, B – půdní horizont, C – matečná hornina) ze skládky zeminy kontaminované PCB sloučeninami stanoveny fyzikálně-chemické vlastnosti (pH, struktura půdy, obsah organických látek atd.) a rovněž biodostupnost kontaminantu. Z hlediska schopnosti degradace a detoxifikace PCB byla nejúspěšnější strategie aplikující druh *P. ostreatus* do druhého typu půdního horizontu. Identifikace několika meziproductů při odbourávání PCB (jako například chlorbenzoáty, chlorbenzaldehydy, chlorokresoly, hydroxylované a methoxylované PCB) demonstrovala zapojení jak intracelulárních, tak extracelulárních houbových enzymů při biotransformaci PCB. Kromě toho, za použití kombinace kultivačně nezávislých metod analýzy fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) a 454-pyrosekvenace byl získán nový pohled na strukturu mikrobiální komunity, její divergenci a dynamiku v průběhu celého bioremediačního procesu. Pomocí PLFA metody se ukázalo, že buď zavedení alochtonních hub nebo přidání lignocelulosového substrátu podporovalo růst bakteriálních populací, zatímco největší houbové koncentrace bylo dosaženo u druhu *P. ostreatus* a prvního typu půdního horizontu, ve střední fázi inkubace. Metagenomická analýza bakteriálního společenstva odhalila, že relativní výskyt kmene *Firmicutes* vzrostl při aplikaci druhu *P. ostreatus* v prostředí druhého a třetího půdního horizontu. Naproti tomu při aplikaci druhu *I. lacteus* byl pozorován zvýšený výskyt kmene *Proteobacteria* v počáteční fázi inkubace a dominantní nástup kmene *Bacteroidetes* na konci inkubace. Co se týče analýzy houbového společenství, *P. ostreatus* vykazoval vyšší schopnost konkurovat původnímu houbovému osazení než *I. lacteus*. Ve skutečnosti více než 90 % analyzovaných sekvencí bylo identifikováno jako *P. ostreatus* po celou dobu inkubace, což dokazuje vynikající schopnost tohoto druhu účinně růst v půdách kontaminovaných PCB za nesterilních podmínek. Naproti tomu velká většina analyzovaných sekvencí v případě biostimulace patřila ke kmenům *Ascomycota* a *Zygomycota*, s výjimkou pozdní inkubační fáze u prvního typu půdního horizontu, kde dominoval kmen *Basidiomycota*.

ii) Mikrosomální frakce bohaté na cytochrom P450 monooxygenasu (CYP450) byly izolovány u hub bílé hniloby *Lentinus tigrinus* a *Pleurotus ostreatus* za účelem posouzení jejich zapojení do biotransformace CBA a PCB. V obou případech, byla nejdříve CYP450 detekována pomocí spektra v komplexu s oxidem uhelnatým, a poté byla použita na in vitro degradační testy s vybranými sloučeninami. Takovýto intracelulární enzymatický systém byl schopný degradovat buď CBA (*L. tigrinus*), nebo PCB (*P. ostreatus*). Konkrétně, klíčová úloha CYP450 v počáteční fázi transformace CBA byla potvrzena identifikováním hydroxylovaných CBA. Kromě toho nedokonale přečištěná lakasa získaná z druhu *P. ostreatus* byla schopna degradovat mono- a dichlorované hydroxylované bifenyly, v různé míře, buď za optimalizovaných, nebo neoptimalizovaných podmínek. Hlavním faktorem, který ovlivňoval rozsah degradace jak intracelulárních, tak extracelulárních houbových enzymů, byla chemická struktura chlorovaných organických kontaminantů, jako je počet a poloha substituentů.

Klíčová slova: houby bílé hniloby, mykoremediace, polychlorované bifenyly, ligninolytické enzymy, cytochrom P450 monooxygenasový systém, 454-pyrosekvenace.