

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

BIODEGRADACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH
UHLOVODÍKŮ V ŽELEZNIČNÍCH PRAŽCÍCH

Bakalářská práce

studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2008

Tereza Fabiánová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele 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 28.srpna 2008.

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Tomáši Cajthamlovi, PhD. za odborné vedení a konzultace, které mi vždy s ochotou poskytoval v průběhu zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat dr. Pavle Erbanové za pomoc při realizaci experimentů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANT	anthracen
B(a)A	chrysen
B(a)P	benzo(a)pyren
B(b)F	benzo(b)fluoranthren
B(ghi)P	benzo(g,h,i)perylen
B(k)F	benzo(k)fluoranthren
CCBAS	Culture Colection of Basidiomycetes, MBÚ AV ČR
DBA	dibenzo(a,h)anthracen
FLT	fluoranthren
CHR	benzo(a)anthracen
IPY	Indenol(1,2,3-cd)pyren
MM	mrtvé mycelium
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PHE	fenanthren
PYR	pyren
US EPA	Environmental Protection Agency, USA

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	9
3.1.1	Fyzikálně chemické vlastnosti	9
3.1.2	PAU v životním prostředí	11
3.1.3	Biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků	12
3.2	Metody analýzy PAU	13
3.2.1	Izolace PAU	13
3.2.2	Příprava a přečištění vzorku	14
3.2.3	Stanovení PAU	14
3.3	Kapalinová chromatografie	15
3.3.1	Separace	16
3.3.2	Optimalizace v kapalinové chromatografii	17
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1	Houbové kmeny	19
4.2	Materiál a chemikálie	19
4.2.1	Rozpouštědla	19
4.2.2	Standardy	19
4.2.3	Kontaminované dřevo (pražce)	20
4.3	Analytická instrumentace	20
4.3.1	Kapalinový chromatograf	20
4.4	Příprava vzorků	20
4.4.1	Biodegradace PAU v železničních pražcích	20
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	22
5.1	Kalibrační křivky PAU	22
5.2	Biodegradace PAU	23

6	ZÁVĚR.....	29
7	POUŽITÁ LITERATURA	30

1 Úvod

Znečištění biosféry škodlivými látkami je jeden z nejdůležitějších problémů ochrany životního prostředí. Zvláště závažná je kontaminace látkami, které již při nízké koncentraci vykazují toxické, mutagenní a karcinogenní účinky. Sem patří například některé těžké kovy a řada organických látek, mimo jiné i polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Hlavním problémem v případě PAU je to, že vznikají neustále (přírodní i antropogenní zdroje viz. níže) a protože se jedná o látky neschopné odbouratelné mají tendenci kumulovat se v životním prostředí.

Odstranění PAU z prostředí je nesnadné 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. Moderní a slibná metoda je použití dřevokazných hub při dekontaminaci. Biodegradace je prováděna pomocí extracelulárních enzymů, což usnadňuje styk s látkou. Přežití hub v půdě lze dobře limitovat množstvím přidaného zdroje uhlíku (slámy, hoblin atd.). Dřevokazné houby jsou eukaryotní organismy, a proto nepodléhají tak snadno genetickým změnám a tak je menší riziko kontaminace prostředí nežádoucími organismy.

Důležitým aspektem při provádění biodegradačních 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.

Tato práce byla prováděna v Laboratoři experimentální mykologie v Mikrobiologickém ústavu AVČR v rámci projektu NPV II Biorem 2B06156 od MŠMT ČR.

2 Cíl bakalářské práce

Vlastním záměrem této práce bylo otestovat schopnosti dvou perspektivních zástupců ligninolytických hub (*Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*) pro biodegradaci polycyklických aromatických uhlovodíků v kontaminovaném dřevě (železničních pražcích). V případě pozitivních výsledků by se tato metoda dala použít v praxi pro bioremediační aplikace.

Důležitou součástí této bakalářské práce byla částečná optimalizace a aplikace analytických metod, zejména HPLC, pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků. Správné použití analytických metod je nezbytným předpokladem pro vyhodnocení biodegradačního experimentu.

3 Teoretická část

3.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

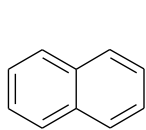
3.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) představují toxické organické látky, které se skládají ze dvou a více kondenzovaných benzenových jader. Počet sloučenin patřících do této skupiny je značný, jen nesubstituovaných (tj. základních) PAU bylo izolováno přes 100 [1]. Struktury nejsledovanějších 16 představitelů PAU jsou uvedeny na obrázku 1 na straně 10.

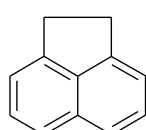
PAU jsou za normálních podmínek tuhé látky s relativně vysokými body tání a varu, které závisejí na počtu benzenových jader a na struktuře molekuly. Vzhledem k nepolárnímu charakteru PAU je jejich rozpustnost ve vodě nízká a mezi jednotlivými představiteli se řádově liší. Rozpustnost v povrchových a jiných přírodních vodách se může lišit vzhledem k různému obsahu solí a organických látek obsažených ve vodách. V odpadních vodách se může rozpustnost některých PAU zvýšit až řádově, naopak v mořské vodě díky obsahu anorganických solí je tato rozpustnost nižší. PAU jsou dobře rozpustné v nepolárních alifatických i aromatických uhlovodících (pentan, hexan, benzen, toluen) i v polárních rozpouštědlech (methanol, dichlormethan) [2].

Mezi další významné vlastnosti PAU řadíme jejich schopnost adsorpce na pevných sorbentech nebo částicích, která je nepřímo úměrná parciálnímu tlaku par. Jejich schopnost sorpce je jeden z hlavních faktorů ovlivňujících pohyb a kumulaci PAU v životním prostředí (viz. kap. 2.1.2.).

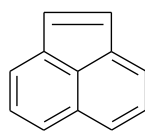
U řady PAU byly prokázány karcinogenní účinky a u mnoha existuje na karcinogenitu podezření. Karcinogenita jednotlivých PAU se značně liší, například benzo(e)pyren je málo karcinogenní, oproti tomu benzo(a)pyren je jeden z nejsilnějších karcinogenů. To je dáno tím, že tato vlastnost souvisí se strukturou molekuly.



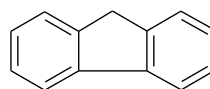
Naftalen



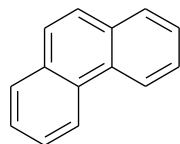
Acenaftthen



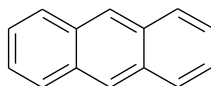
Acenaftylen



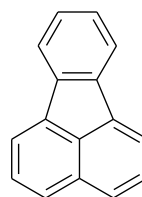
Fluoren



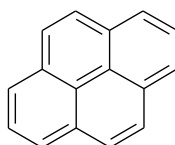
Fenanthren



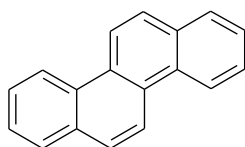
Anthracen



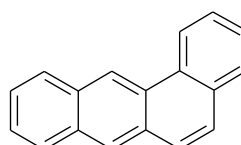
Fluoranthen



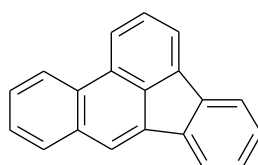
Pyren



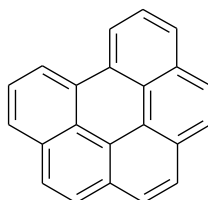
Chrysen



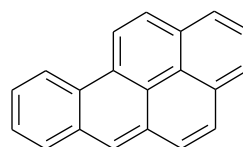
Benzo(a)anthracen



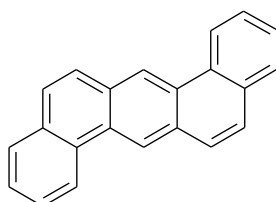
Benzo(b)fluoranthen



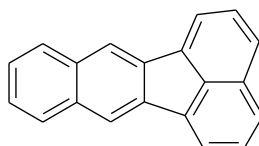
Benzo(g,h,i)perylen



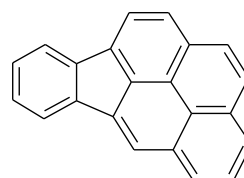
Benzo(a)pyren



Dibenzo(a,h)anthracen



Benzo(k)fluoranthen

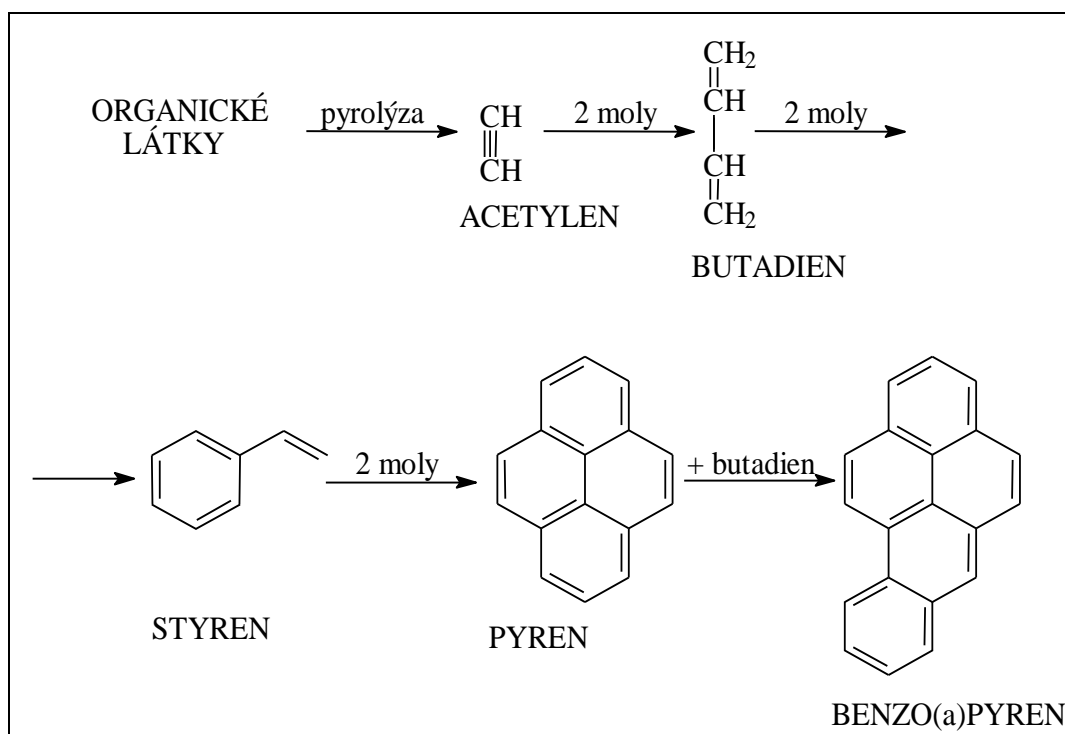


Indeno(1,2,3-c,d)pyren

Obr. 1: 16 hlavních představitelů PAU

3.1.2 PAU v životním prostředí

Přirozený vznik polycyklických aromatických uhlovodíků jako zdroj znečištění je z globálního hlediska zanedbatelný. Přirozeně se PAU vyskytují v ropě, uhlí, asfaltu a v některých uhlíkatých minerálech. Významným zdrojem PAU mohou být také lesní požáry [2]. Dále mohou PAU vznikat jako produkty metabolismu některých bakterií, plísní a vyšších rostlin. Dominantním zdrojem PAU je činnost člověka. Mezi nejvýznamnější zdroje, z nichž se PAU dostávají do životního prostředí, patří spalování fosilních paliv (především při nedostatku kyslíku), koksárenský průmysl, ropné havárie, automobilová doprava a další [3]. Průběh pyrosyntézy PAU z organických látek při nedokonalém spalování je na obrázku 2.



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

Výskyt PAU v životním prostředí je ovlivňován především jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Šíření atmosférou je zajištěno jednak ve formě par (jedná se zejména o PAU s nízkou molární hmotností) a hlavně ve formě malých polétavých částic prachu a sazí, na které jsou PAU adsorbovány.

PAU se vyskytují v celé hydrosféře a pomocí planktonu a ryb vstupují do potravních řetězců. Kontaminace vod pochází z dopadu transportních částic, z kontaminovaných podzemních vod, nebo přímo z řek kontaminovaných městskými nebo průmyslovými splašky.

Kontaminace PAU se však vyskytuje i v půdách. Zdrojem kontaminace může být například ropná havárie. Dále ke kontaminaci dochází v okolí plynáren, koksáren či tepelných elektráren, kde se sládkoval popílek nebo kde docházelo k jeho spádu. Úrovně kontaminace v půdách takto postižených se pohybují od desítek miligramů na kilogram až po stovky miligramů. Kontaminace půd je vážným problémem, neboť PAU jsou sice málo rozpustné ve vodě, ale přesto takto znečištěná půda je riziková a dále nepoužitelná. Nezanedbatelnou položku tvoří rovněž technické dřevo, např. pražce, které byly v minulosti impregnovány kreosotovým olejem a v současné době jsou odstraňovány a nákladně likvidovány.

3.1.3 *Biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků*

Jev, při kterém se stávají PAU součástí metabolismu mikroorganismu a tím jsou odbourávány, je možno využít při odstraňování PAU z biosféry. Výhodou takové technologie je její snadnost, případná nízká cena, malý dopad na životní prostředí a hlavně možnost provádět remediace "in situ". V současnosti používané fyzikální a chemické metody jsou nákladné a ne vždy úspěšné.

PAU jsou metabolizovány nejrůznějšími mikroorganismy zahrnujícími bakterie, houby i řasy [4]. Mikroorganismy degradující PAU využívají kyslík k iniciaci enzymového ataku na kruhy PAU, čímž dochází k hydroxylaci aromatických jader. Zvláštní skupinu tvoří ligninolytické houby. Tyto houby jsou dřevokazné a rozkládají hlavně ligninovou složku dřeva. Tím dochází k vybělení dřeva a proto se tato skupina organismů nazývá také houby bílé hniloby. Při degradaci PAU pomocí ligninolytických enzymů dochází k oxidaci za vzniku

chinonů [5]. Tyto enzymy existují tři, lignin peroxidasa, mangan peroxidasa, lakáza. Pomocí pokusů in vitro byla prokázána jejich schopnost degradovat PAU [6, 7].

Aktivity ligninolytických enzymů byly testovány u více než 2000 druhů známých ligninolytických hub [8], z tohoto množství bylo pro biodegradační účely otestováno méně než 20. Biodegradační schopnost byla prokázána např. u *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* a *Trametes versicolor* [9, 10, 11, 12].

Při biodegradačních experimentech je nejdříve nutno provést preselekcii kmenů a z velkého množství vybrat nějakou časově nenáročnou metodou takové kmeny, u kterých byla pozorována enzymová aktivita. U vybraných druhů je dalším krokem zjištění degradační účinnosti v tekutém živném médiu kontaminovaném PAU [13]. Poté následuje degradační pokus v kontaminované zemině, či jiném materiálu. Z těchto důvodů je nutné optimalizovat analytické metody vhodné pro stanovení PAU.

3.2 Metody analýzy PAU

Analýzu je možno rozdělit na několik kroků:

- izolace PAU z matrice
- přečištění a příprava vzorku pro analýzu
- vlastní analýza

3.2.1 Izolace PAU

Pro izolaci PAU z pevných matric máme několik možností. Jsou to jednak metody klasické jako je sonifikace, nebo extrakce v Soxhletově přístroji nebo modernější způsoby, což jsou extrakce za pomoci mikrovlnné energie, automatizovaná Soxhletova extrakce (tzv. Soxtec) a tzv. ASE metoda (accelerated solvent extraction) [14]. Při porovnání těchto metod dojdeme k závěru, že moderní metody spotřebovávají mnohem menší množství rozpouštědel a času a že jsou tudíž levnější a ekologičtější.

3.2.2 *Příprava a přečištění vzorku*

Vyextrahované vzorky je obvykle potřeba přečistit a oddělit (zcela nebo částečně) od ostatních látek, které by mohly rušit vlastní stanovení. To závisí zejména na použití metody stanovení, protože například u plynové chromatografie je přečištění potřeba i z důvodu možné kontaminace a zničení kolony. K odstranění koextrahovaných látek se používá zejména klasická nízkotlaká kolonová chromatografie, kde se jako náplně kolon používají hlavně Sephadex LH-50, silikagel, fluorisil a octadecylsilikagel [2].

3.2.3 *Stanovení PAU*

Při separaci a kvantifikaci jednotlivých PAU zcela dominují chromatografické metody. Dříve převažovala chromatografie na tenké vrstvě (TLC), která je považována za semikvantitativní metodu. Zavedení vysokoúčinné chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC) výrazně zlepšilo možnosti metody. HPTLC se používá pro stanovení PAU ve vodných vzorcích a je akceptována společností AOAC (Association of Official Analytical Chemist) [15].

V dnešní době však úplně převládají plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V případě plynové chromatografie se používaly náplňové i kapilární kolony, dnes však převládají kapilární [16]. Stacionární fáze bývá nepolární. Pro dávkování se používají různé metody např. s děličem, bez děliče nebo přímé na kolonu (on-column), což závisí na čistotě vzorku a koncentraci analytu. K detekci se v případě GC používá nejčastěji plamenový ionizační detektor (FID) nebo hmotnostní detektor (MS), přičemž spojení GC-MS lze dosáhnout vůbec nejvyšší citlivosti.

Výhodnou metodou v případě kapalinové chromatografie je přímé spojení LC/GC, nebo LC/LC/GC, které zahrnuje LC izolaci hrubého extraktu PAU na velké koloně, odpaření jedné frakce v přímém (on-line) odpařovacím zařízení, na druhé LC se separují PAU v jiné mobilní fázi a jednotlivé frakce jsou převedeny na GC [16]. Aplikace této metody umožňuje eliminovat dobu přípravy vzorků. U HPLC PAU jsou nejrozšířenější spektrofotometrický a fluorescenční detektor [2].

Srovnání detekčních limitů pro PAU různými metodami vzhledem k rušivému vlivu matric je v tabulce 1.

Tab. 1: Detekční limity metod PAU ve vodách a sedimentech (převzato z [2])

Metoda	Voda (ng/l)	Sediment (mg/kg)
HPLC s UV detekcí	5 – 50	10 – 50
HPLC s fluorescenční det.	0,1 – 1,0	0,01 – 0,1
GC-MS	1 - 5	0,05 – 1,0
GC-FID	20 - 50	

3.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdělování látek mezi kapalnou matricí a pevnou stacionární fází. Podle typu interakcí se dělí na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, vylučovací a afinitní chromatografii. Rozdělovací chromatografie se dělí dále podle polaritity použitých fází na systém s normálními a obrácenými fázemi, kde za normální se považuje systém s polární stacionární a nepolární mobilní fází.

Jako stacionární fáze v kapalinové chromatografii (LC) se využívá především systém obrácených fází, ale také se používá HPLC s normálními fázemi (např. fázemi s chemicky vázanými nitrilo-, či amino- skupinami). Jako mobilní fáze se používá směs vody a organického polárního rozpouštědla. Nejčastěji se používají tetrahydrofuran, acetonitril a methanol. Z důvodu ovlivnění disociačních rovnováh a selektivity se přidávají do mobilní fáze pufrů, kyseliny, báze, iontově párová činidla apod. Mobilní fáze musí být vybrána tak, aby byla chemicky inertní, měla co nejnižší viskozitu, neinterferovala v detekčním zařízení a separované látky v ní byly dobře rozpustné. Stacionární fází tvoří nejčastěji silikagel s navázanou nepolární stacionární fází.

3.3.1 Separace

Vzhledem k tomu, že interakce v kapalinách jsou mnohem silnější než v plynech, je i mechanismus zadržování látek složitější u kapalinové chromatografie než u plynové a není zcela objasněn. Hlavními ději, které ovlivňují retenci solutů jsou interakce se stacionární fází, interakce s mobilní fází a interakce mobilní fáze se stacionární fází. K popisu dějů v reversní chromatografii se používá solvofóbní teorie. Podle této teorie má polární mobilní fáze tendenci snižovat objem dutiny obklopené solvatačním obalem a vypudit solut do stacionární fáze.

Po nástřiku zóny do mobilní fáze dochází v koloně k separaci jednotlivých složek. Každá ze složek totiž může být popsána distribuční konstantou K_d [17]:

$$K_d = x_s / x_m \quad (1)$$

kde x_s je koncentrace látky ve stacionární fázi a x_m je koncentrace v mobilní fázi. Na základě rozdílných K_d jsou složky zadržovány rozdílně. To se projeví na rozdílnosti retenčních časů t_R a tedy i retenčních (kapacitních) faktorů k . Retenční faktor je definován [17]:

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad (2)$$

kde t_M je tzv. mrtvý retenční čas.

Během setrvávání vzorku v chromatografickém systému dochází k rozšiřování zóny. Za optimálních podmínek má zóna tvar Gaussovy křivky. Celkové rozšíření lze popsat pomocí rozptylu σ^2 . Příspěvky rozptylů jednotlivých částí chromatografického systému jsou aditivní a proto platí [16]:

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{dávkač}}^2 + \sigma_{\text{kolona}}^2 + \sigma_{\text{spoj. kapiláry}}^2 + \sigma_{\text{detektor}}^2 + \sigma_{\text{elektrická část}}^2 \quad (3)$$

Rozptyl eluční zóny vyjádřený pomocí směrodatné odchylky σ ($1/2$ šířky píku v inflexním bodě) je nepřímo úměrný účinnosti kolony n . Tato veličina je převzata z teorie destilace, vyjadřuje počet teoretických pater a tedy charakterizuje kvalitu kolony [17]:

$$n = t_R^2 / \sigma_t^2 = V_R^2 / \sigma_V^2 \quad (4)$$

kde V_R je retenční objem, σ_V^2 a σ_t^2 jsou rozptyly v časových a objemových jednotkách.

Další veličinou popisující účinnost separační kolony je výškový ekvivalent teoretického patra H [17]:

$$H = L/n \quad (5)$$

kde L je délka kolony.

Vliv na rozšíření zóny během chromatografického procesu mají nezávisle tyto faktory:

1) Vířivá difúze (A), která nezávisí na průtokové rychlosti mobilní fáze, ale je přímo úměrná velikosti částic a nepřímo jejich uniformitě.

2) Molekulová difúze (B), která se v kapalinové chromatografii projevuje méně než u plynové chromatografie a má větší vliv při nižších průtokových rychlostech mobilní fáze.

3) Odpor proti převodu hmoty, který charakterizuje omezenou rychlost transportu solutu mezi mobilní (C_M) a stacionární fází (C_S). Grafickým znázorněním této rovnice je hyperbola, v jejíž minimu lze odečíst hodnotu optimální rychlosti, kdy je účinnost maximální.

3.3.2 *Optimalizace v kapalinové chromatografii*

Pro vyhledávání optimálních podmínek v kapalinové chromatografii je možno použít některý z matematických postupů jako jsou simplexová metoda, metoda experimentálního designu, metodu mapování oblasti překryvu nebo prosté proměrování vlivů experimentálních parametrů na separaci při změně hodnoty jedné veličiny.

Při optimálních podmínkách jsou všechny složky směsi rozděleny a eluují v nejkratším čase. Rozlišení a doba analýzy jsou však ještě závislé na kapacitě kolony. Proto nelze najít optimální podmínky pro obě veličiny, ale pouze kompromis vyhovující dané situaci, tedy přijatelné rozlišení v přijatelném časovém intervalu.

Veličiny které můžeme optimalizovat, jsou průtoková rychlost a složení mobilní fáze, druh stacionární fáze, teplota kolony, eventuelně iontová síla, koncentrace a druh párového činidla, pH.

V případě systému s reversními fázemi tvoří mobilní fázi směs vody nebo pufru a organického rozpouštědla o různých elučních silách. Nejčastěji používaná rozpouštědla lze

seřadit podle stoupající eluční síly: voda < methanol < acetonitril \approx ethanol < 1-propanol \approx isopropanol < dioxan < tetrahydrofuran.

V případě směsi látek s odlišnou polaritou se používá gradientová eluce. Při ní dochází během analýzy ke změně složení mobilní fáze a tak se mění (zvyšuje) eluční síla fáze.

Další důležitou vlastností mobilní fáze je její selektivita. Rozpouštědla byla rozdělena do osmi skupin selektivity [18] na základě vypočtení parametrů polaroty a selektivity. Nejčastěji bývá selektivita ovlivňována methanolem z II. skupiny, acetonitrem z VI. skupiny nebo tetrahydrofuranem z III. skupiny selektivity.

V případě PAU platí vztah mezi polarizovatelností a retenčními daty [16]:

$$\log k = l\alpha + m \quad (6)$$

kde α je polarizovatelnost PAU a l, m jsou konstanty závislé na použité stacionární fázi.

Teplota má také vliv na retenci látek. Pro závislost retenčního faktoru na teplotě platí:

$$\log k = a + b/T \quad (7)$$

kde T je teplota a a, b experimentální konstanty.

V případě analýzy slabých kyselin a bází v reverzní HPLC je rovněž důležité pracovat při takovém pH, aby byla potlačena disociace solutu.

4 Experimentální část

4.1 Houbové kmeny

V této práci byly použity následující kmeny ligninolytických hub ze sbírky CCBAS Mikrobiologického ústavu AV ČR:

- *Irpex lacteus*, (Fr.:Fr.) Fr. 617/93
- *Pleurotus ostreatus*, (Jacq.:Fr.) Kumm., 670/93

4.2 Materiál a chemikálie

4.2.1 Rozpouštědla

- acetonitril pro HPLC, Chromapur G.G, Chromservis s.r.o
- methanol pro HPLC, Chromapur G.G, Chromservis s.r.o
- aceton p.a Lachema
- hexan p.a Lachema
- deionizovaná filtrovaná voda

4.2.2 Standardy

Směs 16 PAU z toho vybráno 12 PAU (PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP, IPY) od Dr. Ehrenstorfer (US EPA, method 610).

4.2.3 *Kontaminované dřevo (pražce)*

Kontaminované nadrcené železniční pražce jsme získali od firmy EKO-BIO Vysočina, spol s.r.o.

4.3 *Analytická instrumentace*

4.3.1 *Kapalinový chromatograf*

Všechny vzorky byly analyzovány kapalinovým chromatografem Alliance (Waters, USA) vybaveným separačním modulem 2695, UV detektorem s diodovým polem, multifuorescenčním detektorem 2475, termostatovanou pecí pro kolony, softwarem Empower 2. Byla použita kolona Lichrocart se sorbentem Lichrospher – PAH (5 μ m); 250 – 4 mm (Merck).

Pro separaci 12 PAU byla použita gradientová eluce: rozpouštědlo (A) deionizovaná voda a (B) směs acetonitril:methanol v poměru 1:1. Program začal isokraticky 5 min. při použití 70% B. Poté se poměry měnily lineárně do 100% B v 25 min. a opět následoval isokratický krok 10min. Vzorky byly rozpuštěny směsí aceton-acetonitril, dávkovací objem byl 5 μ l. PAU byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány byly fluorescenčním detektorem při excitačních a emisních vlnových délkách ex250/em390 nm (PHE, ANT, IPY), při ex280/em340 nm (FLT, PYR, BaA, CHR) a při ex305/em430 nm (BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP).

4.4 *Příprava vzorků*

4.4.1 *Biodegradace PAU v železničních pražcích*

V tomto experimentu byly použity houby *Pleurotus ostreatus 3004* a *Irpex lacteus* získané ze sbírky CCBAS AV ČR. Tyto kmeny byly přechovávány na Petriho miskách s agarem při teplotě 5°C. První experiment byl vyhodnocen po 3, 6 a 9 týdnech, poté znovu založen a vyhodnocen po 4 a 8 měsících.

Příprava inokula:

Do 6 Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml se sterilní autoklávovanou pšeničnou štípanou slámou (50 g suché hmotnosti), která byla zvlhčena vodou (1 díl slámy a 2 díly vody), byly vneseny dva terčíky kultury *Pleurotus ostreatus 3004* vyříznuté sterilním korkovrtem z inokulační misky. Stejný postup byl i pro kulturu *Irpex lacteus*. Houba byla kultivována 19 dní při teplotě 24°C.

Postup přípravy vzorků:

Do 6 Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml bylo vneseno 10 g inokula (slámy prorostlé houbou kmene *Irpex lacteus*), dále 5 g kontaminovaných železničních pražců (zvlhčeny 10 ml vody) a poslední vrstva opět 10 g slámy prorostlé houbou kmene *Irpex lacteus*. Vše bylo promícháno a baňky byly zváženy z důvodu následného dovlhčování. Pro houbu *Pleurotus ostreatus* stejný postup jako u *Irpex lacteus*. Kontroly s mrtvým myceliem: Do 3 Erlenmayerových baněk bylo vneseno 10 g mrtvého mycelia na slámě (usmrceno autoklávem při 121°C po dobu 20 min), dále 5 g kontaminovaných železničních pražců (zvlhčeny 10 ml vody), poslední vrstva opět 10 g mrtvého mycelia. Vše bylo promícháno a baňky byly zváženy z důvodu následného dovlhčování. Kontroly s pražci: Do 3 Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml bylo vneseno 5 g kontaminovaných železničních pražců, které byly zvlhčeny 10 ml vody. Všechny vzorky byly vlhčeny po 1 měsíci.

Příprava vzorku před analýzou:

Vzorky byly usušeny při 40°C. Celý obsah vzorku byl vložen do soxhletova extrakčního nástavce a extrahován po dobu 12 hodin směsí hexan:aceton 3:1. Poté byly vzorky odpařeny na laboratorní vakuové odparce RVO 200A (INGOS, ČR) při 40°C a tlaku 30 kPa do sucha a rozpuštěny 15 ml acetonu s 15 ml acetonitrilu. Pro dostatečné rozpuštění byly vzorky umístěny do ultrazvukové lázně po dobu 5 minut. Z každého vzorku se odebral 1 ml do centrifugační zkumavky a centrifugovalo se po dobu 5 minut při 6000 rpm. Z centrifugovaného vzorku bylo odebráno pro analýzu 0,75 ml do vialky.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Kalibrační křivky PAU

Pro zhotovení kalibračních křivek byly připraveny koncentrační řady roztoků PAU v acetonitrilu. Použity byly následující koncentrace: pro PHE, FLT, PYR, IPY v rozmezí hodnot 100 – 0,01 mg/kg, pro ANT, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP v rozmezí hodnot 10 – 0,01 mg/kg. Parametry kalibračních křivek, limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce 2. Koeficient korelace se pohybuje v rozmezí od 0,99995 do 0,99999, z toho vyplývá, že všechny kalibrační závislosti jsou lineární.

Tab. 2: Parametry kalibračních křivek, regresní koeficient, limity detekce a kvantifikace

Názvy PAU	Rozsah (mg/kg)	Rovnice regrese	r^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
PHE	100 - 0,01	$6,82 \cdot 10^4 x - 1,19 \cdot 10^4$	0,99998	0,463	1,403
ANT	10 - 0,01	$1,44 \cdot 10^5 x + 1,15 \cdot 10^4$	0,99999	0,22	0,66
FLT	100 - 0,01	$1,46 \cdot 10^7 x + 3,28 \cdot 10^6$	0,99995	1,34	4,06
PYR	100 - 0,01	$4,27 \cdot 10^7 x + 5,97 \cdot 10^6$	0,99997	0,86	2,61
BaA	10 - 0,01	$2,18 \cdot 10^8 x + 1,75 \cdot 10^6$	0,99999	0,05	0,14
CHR	10 - 0,01	$3,47 \cdot 10^8 x + 6,70 \cdot 10^6$	0,99997	0,11	0,33
BbF	10 - 0,01	$6,64 \cdot 10^4 x - 9,62 \cdot 10^3$	0,99998	0,01	0,03
BkF	10 - 0,01	$3,15 \cdot 10^4 x - 5,05 \cdot 10^3$	0,99999	0,007	0,022
BaP	10 - 0,01	$4,62 \cdot 10^4 x - 8,81 \cdot 10^3$	0,99998	0,04	0,11
DBA	10 - 0,01	$9,39 \cdot 10^3 x - 3,38 \cdot 10^3$	0,99998	0,004	0,012
BghiP	10 - 0,01	$1,75 \cdot 10^4 x - 6,59 \cdot 10^3$	0,99999	0,02	0,07
IPY	100 - 0,01	$3,88 \cdot 10^4 x - 1,69 \cdot 10^4$	0,99998	0,29	0,89

($LOD = 3s_d/b$ kde s_d je směrodatná odchylka a b je směrnice kalibrační přímky, $LOQ = 10s_d/b$ kde s_d je směrodatná odchylka a b je směrnice kalibrační přímky)

5.2 Biodegradace PAU

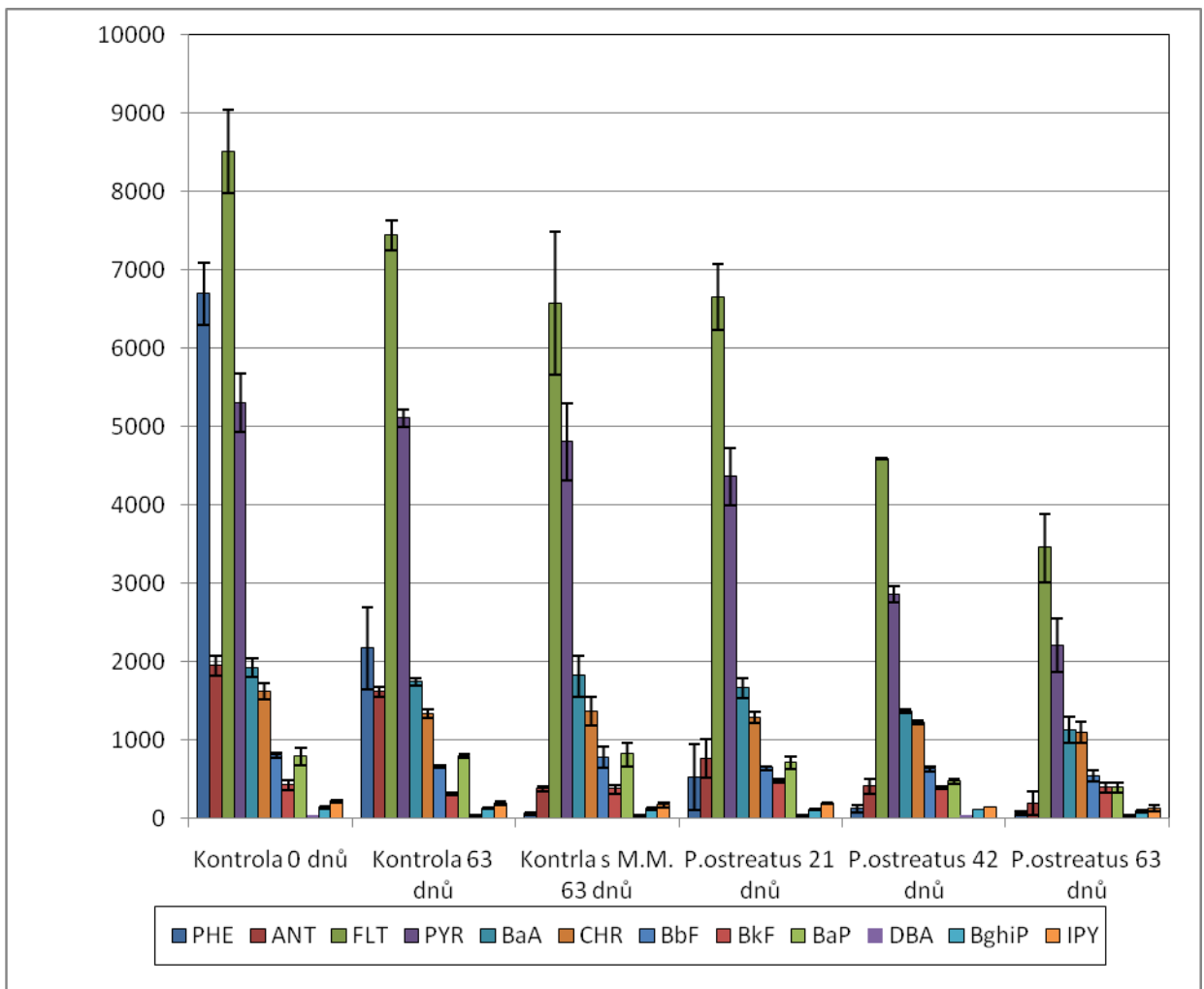
V prvním degradačním experimentu byly vzorky odebrány po 3, 6 a 9 týdnech a následně vyhodnoceny. Výsledky degradace vybraných PAU jsou uvedeny na obrázku 3 a 4 na straně 25-26. V grafu je vynesena na ose y koncentrace 12 PAU (PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP, IPY) a chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Na ose x jsou skupiny sloupců reprezentující jednotlivé houbové kmeny a příslušné kontroly. V kontrole s pražci došlo k úbytku PAU o 24%, zatímco v kontrole s mrtvým myceliem došlo k úbytku o 39%. Tento pokles je možno přičíst jednak volatilizaci v případě PHE (vyšší tenze par) a zejména k mikrobiální degradaci původní autochtoní mikroflórou podpořené přidavkem mrtvého mycelia a ligninocelulosového substrátu. Z výsledků vyplývá, že houba *P. ostreatus* se na degradaci podílela ze 42% a *I. lacteus* se na degradaci podílel z 24% (rozdíl mezi experimentálními vzorky a kontrolou s mrtvým myceliem). Zbývající úbytek tj. 24% byl způsoben degradací původní mikroflórou. V případě obou hub docházelo výrazně k degradaci PAU s nižší molekulovou hmotností. Například PHE a ANT byly degradovány z 60-70% oproti BkF, který byl degradován pouze z 10%. Pravděpodobným vysvětlením je nízká biologická dostupnost více-kruhových PAU. Zajímavým výsledkem je, že hlavní část degradace se odehrála po 42 dnech. Zpomalení degradace může být důsledkem několika vlivů, jako je vyčerpání některých živin nebo odstraněním degradovatelné části PAU (ostatní nejsou biologicky dostupné). Z grafu je možné pozorovat, že kmen *P. ostreatus* vykazoval lepší degradační aktivitu a to vyšší než kmen *I. lacteus*.

Ve druhém degradačním experimentu byly vzorky odebrány po 4 a 8 měsících a následně vyhodnoceny. Výsledky degradace druhého experimentu jsou uvedeny na obrázku 4 a 5 na straně 27-28. V grafu je vynesena na ose y koncentrace 12 PAU (PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP a IPY), chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Na ose x jsou skupiny sloupců reprezentující jednotlivé houbové kmeny a příslušné kontroly. V kontrole s pražci došlo k úbytku PAU o 42% a v kontrole s mrtvým myceliem o 56%. Pokles je opět pravděpodobně způsoben tím, že došlo částečně k volatilizaci a k mikrobiální degradaci původní autochtoní mikroflórou. Z tohoto experimentu je zřejmé, že

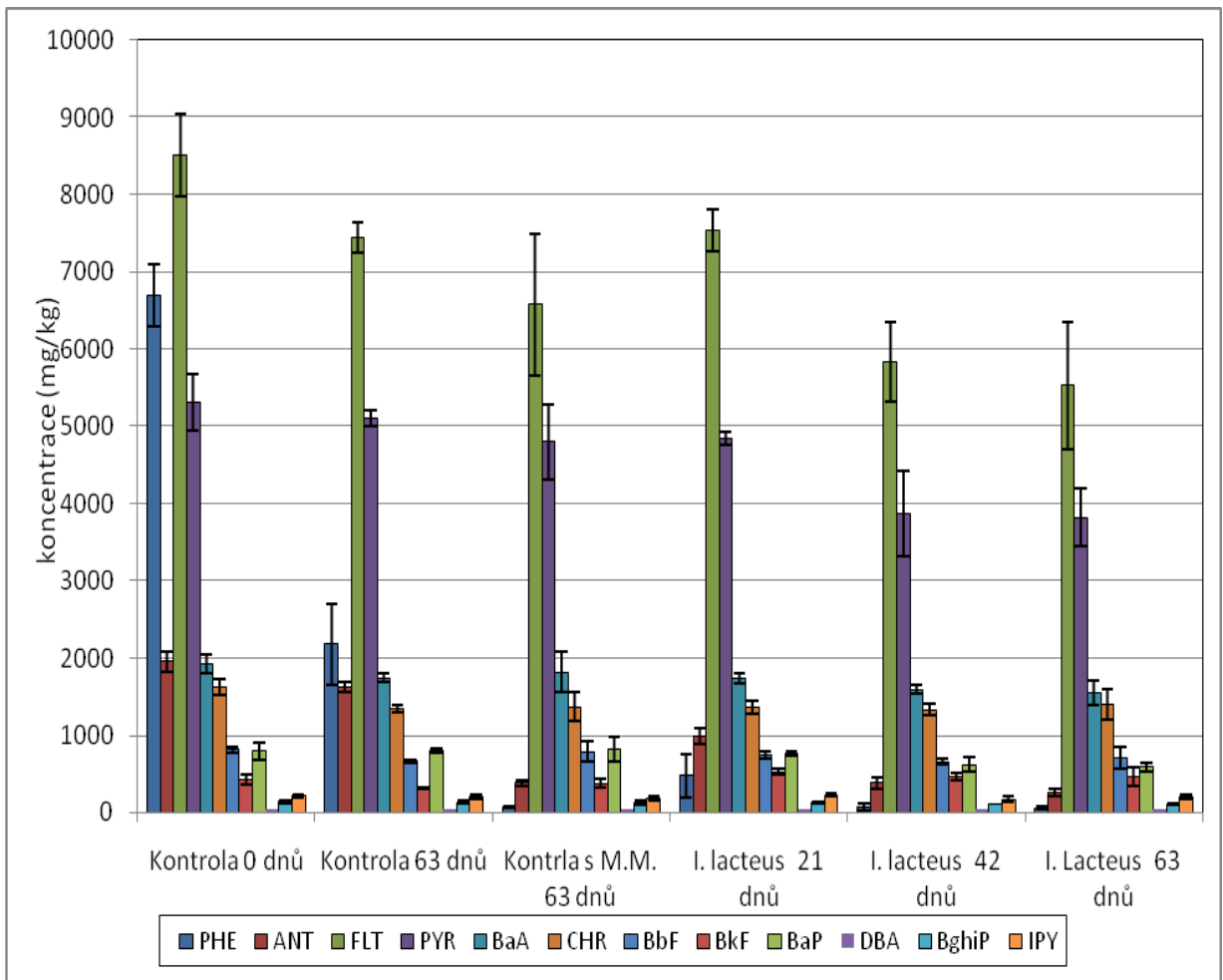
P. ostreatus vykazoval lepší degradační schopnost a to o 35% a kmen houby *I. lacteus* o 28% (rozdíl mezi experimentálními vzorky a kontrolou s mrtvým myceliem). Zbývající úbytek tj. 42% byl způsoben degradací původní mikroflórou. Opět i v tomto experimentu docházelo výrazně k degradaci PAU s nižší molekulovou hmotností (např. PHE a ANT degradovány ze 70-90%) a hlavní část degradace se odehrála po 4 měsících. Lepší degradační aktivitu vykazoval kmen *P. ostreatus* než kmen *I. lacteus*.

V literatuře lze v podstatě nalézt jen jednu publikaci, kdy byly houby bílé hniloby použity pro biodegradaci PAU v kontaminovaném dřevě [19]. Mycelium houby *P. ostreatus* SMR684 rostlo na Petriho miskách na různých směsích odštěpků dřeva ošetřených kreosotovým olejem a pšeničné slámě. Výsledek po 30. dnu ukázal výrazný úbytek fenolů (více než 75%), heterocyklických sloučenin (od 40% do 80% v závislosti na molekulární struktuře) i celkových polycyklických aromatických uhlovodíků (65%).

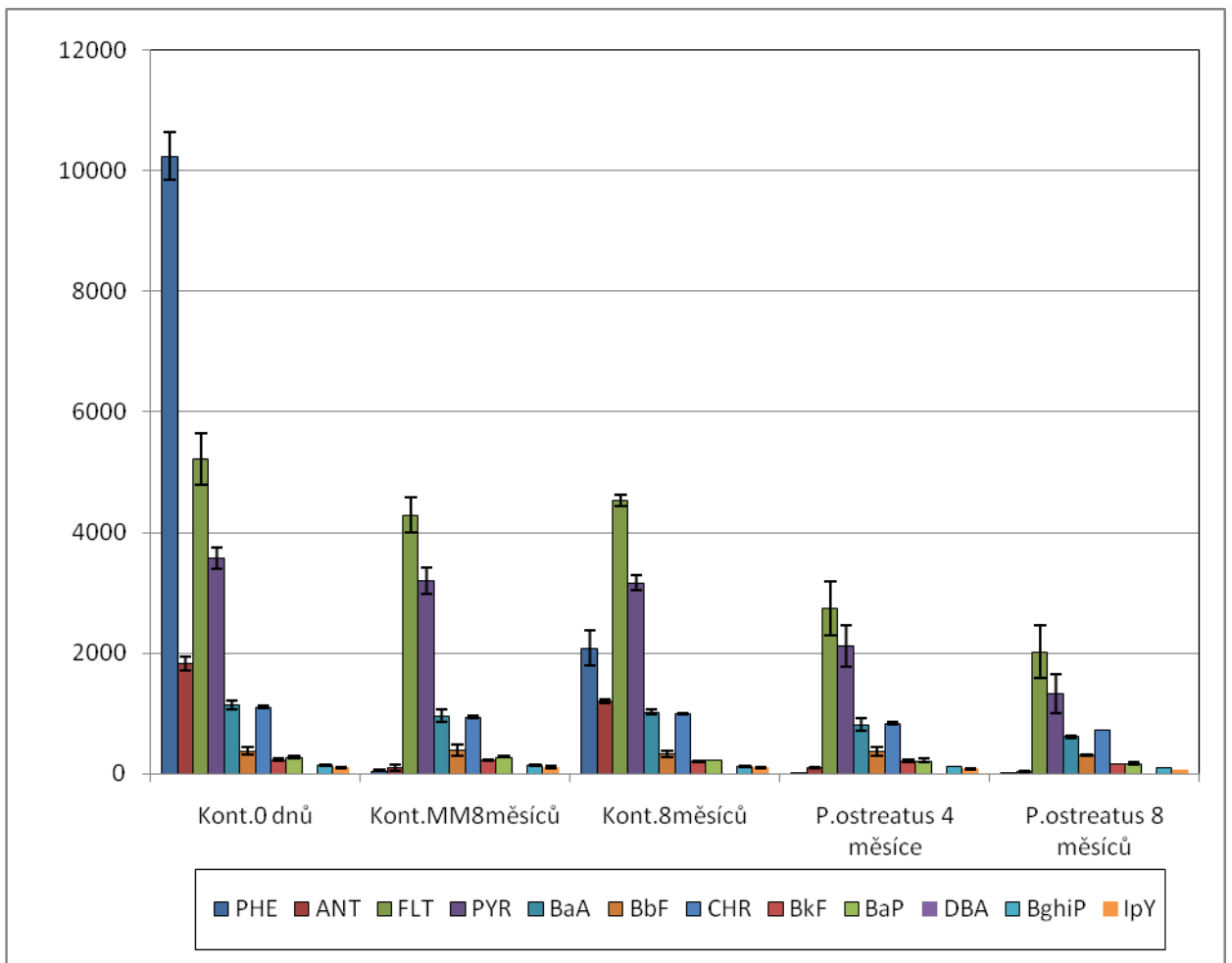
Od té doby, co je ze zákona uloženo odstranění polutantů, je detoxikace dřeva namořeného kreosotovým olejem problémem. Vhodnou cestou mohou být biotechnologie, které používají jako základ houby bílé hniloby (např: *P. ostreatus*, *I. lacteus*), jejichž mycelia jsou schopny růst na ligninolytických materiálech a oxidovat aromatické organické molekuly prostřednictvím extracelulárních enzymů (lignin peroxidasa, mangan-dependentní peroxidasa a lakáza). Technologie pěstování kmene *P. ostreatus* ve velkém měřítku je značně prozkoumána, neboť se jedná o jedlou houbu Hlívu ústříčnou. Navíc tzv. vyplozený substrát (sláma prorostlá myceliem po sklizni plodnic) je v současnosti považován za odpad. Houby bílé hniloby je možné v praxi použít, avšak je potřeba zvýšit účinnost biodegradace k dosažení legislativních limitů pro PAU. Bez zvýšené účinnosti tato metoda nemá význam a je zapotřebí zvolit jinou remediační metodu (např. bioremediace v hromadách „biopile“, bioremediace ve vrstvě „land farming“, kompostování aj.)



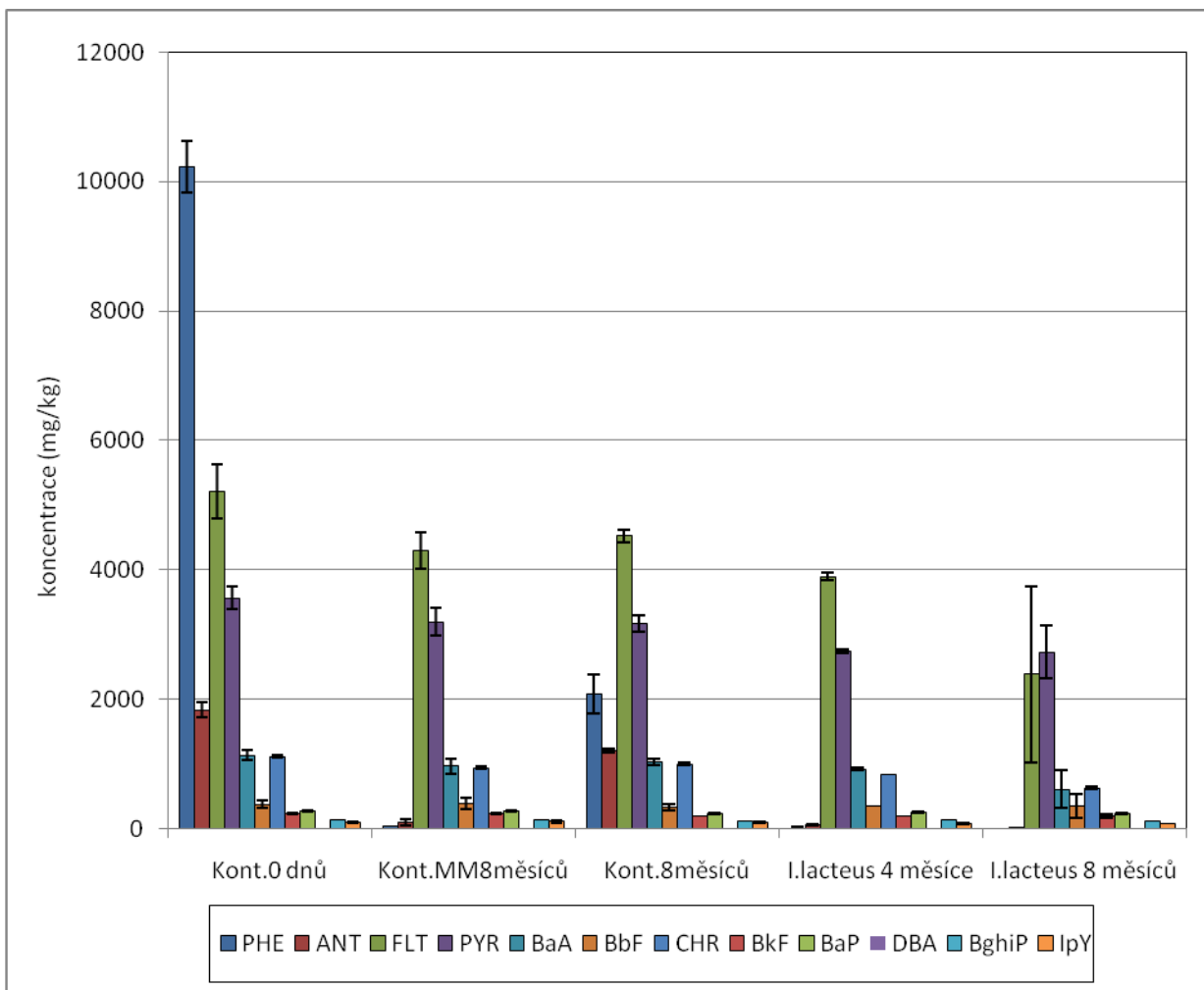
Obr. 3: Degradace jednotlivých PAU houbou *P. ostreatus* v železničních pražcích první experiment



Obr. 4: Degradace jednotlivých PAU houbou *I. lacteus* v železničních pražcích první experiment



Obr. 5: Degradace jednotlivých PAU houbou *P. ostreatus* v železničních pražcích druhý experiment



Obr. 6: Degradace jednotlivých PAU houbou *I. lacteus* v železničních pražcích druhý experiment

6 Závěr

Z výsledků této bakalářské práce vyplývá, že houba *Pleurotus ostreatus* měla vyšší degradační schopnost v prvním i druhém experimentu než *Irpex lacteus*. *P. ostreatus* se v prvním degradačním experimentu podílel na degradaci PAU z 42% a *I. lacteus* podstatně méně a to z 24%. Ve druhém experimentu samotná houba *P. ostreatus* degradovala PAU z 35% a *I. lacteus* z 28%. V obou případech se na degradaci PAU podílela i původní autochtoní mikroflóra. V této práci se potvrdilo, že houby bílé hniloby jsou perspektivními organismy pro bioremediační metody, které jsou schopny rozluk značného množství PAU. Je však nutné zvýšit účinnost biodegradace PAU k dosažení legislativních limitů. Možné způsoby spočívají ve výběru vhodnějšího inokulačního substrátu, použití induktorů ligninolytického systému, či zvýšení biodostupnosti PAU. Tyto experimenty však přesahují rámec této bakalářské práce. Výhodou případné houbové technologie je možnost provádět bioremediace in situ a především její nižší cena.

7 Použitá literatura

- [1] Jehličková, Z., Žilka, L. (1994) Polycyklické aromatické uhlovodíky. Chemmagazin 4, 17-21.
- [2] Kužilek, V. (1994) Polycyklické aromatické uhlovodíky v hydrosféře. Výzkumná zpráva, VÚV TGM, ISBN 80-901181-6-X.
- [3] Dyremark, A., Westerholm, R., Overvik, E. a Gustavsson (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) emission from charcoal grilling. J.A. Atmosp. Environ. 29, 1553-1558.
- [4] Cerniglia, C. E. (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351-368.
- [5] Paszcynski, A., Crawford, R. L. (1995) Potential for bioremediation of xenobiotic compound by the white rot fungus. *Phanerochaete chrysosporium*, Biotechnol. Prog. 11, 368-379.
- [6] Hammel, K. E., Green, B., Gai W. Z. (1991) Ring fission of anthracene by eucaryote. Protl. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10605-10608.
- [7] Sutherland, J. B., Selby, A. L., Freeman, J. P., Evans, F. E., Cerniglia C. E. (1991) Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 3310-3316.
- [8] Golovleva, L. A., Leontievskii, A. A. (1998) Ligninolytic activity of wood-decaying fungi. Microbiology 67, 581-587.
- [9] Bogan, B. W., Lamar, R. T., Hammel, K. E. (1996) Fluorene oxidation in vitro by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. App. Environ. Microbiol. 62, 1788-1792.
- [10] Sack, U., Gunther, T. (1993) Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. J. Basic Microbiol. 33, 269-277.
- [11] Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K. D., Gunther, Th., Fritsche, W. (1999) Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in the liquid cultures of fifty-eight

- fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol. Res.* 103, 1009-1018.
- [12] Šašek, V., Novotný, Č., Vampola, P. (1998) Screening for efficient fungal degraders by decolorization. *Czech Mycol.* 50, 303-311.
- [13] Šašek, V.; Erbanová P.; Novotný Č.; Cajthaml T. (1996) sborník abstraktů, Minysymposium on Biosorption and Microbial Degradation. Praha.
- [14] Holoubek, I. (1996) Polycyklycké aromatické uhlovodíky, ISBN 80-85087-44-8.
- [15] Official methods of analysis (1970) 11. Vydání, AOAC, Washington D.C., Scs.21.CO1.21.CO9.
- [16] Cajthaml, T. (1998) Aplikace analytických metod při studiu biodegradací polycyklických aromatických uhlovodíků. Diplomová práce, Univerzita Karlova.
- [17] Gertz, C. (1990) *HPLC – Tips and Tricks*. LDC Analytical, England.
- [18] Pacáková V., Štulík K. (1986) Vysokoučinná kapalinová chromatografie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 62.
- [19] Galli, E., Rapana, P., Tomati, U., Polcaro, C. M., Brancaleoni, E., Frattoni, M. (2006) Degradation of creosote by *Pleurotus ostreatus* mycelium in creosote-treated wood, *Fresenius Environ. Bull.*, 15, 720-723.