

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Fytomykoremediace půdy kontaminované rizikovými  
prvky po aplikaci kalů z čistíren odpadních vod**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Remutová Štěpánka**

**Ochrana krajiny a využívání přírodních zdrojů**

**Vedoucí práce: Ing. Zdeněk Košnář, Ph.D.**

© 2024 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Fytomykoremediace půdy kontaminované rizikovými prvky po aplikaci kalů z čistíren odpadních vod" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4. 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Zdeňku Košnářovi, Ph.D. za cenné rady a věcné připomínky, bez kterých by se vypracování této práce neobešlo. Také bych ráda poděkovala za trpělivost a ochotu při konzultacích a zpracování této práce.

# Fytomykoremediace půdy kontaminované rizikovými prvky po aplikaci kalů z čistíren odpadních vod

## Souhrn

V dnešní době přibývá snaha o využití veškerých odpadů, ať už komunálních odpadů, odpadních vod či s nimi spojených čistírenských kalů.

Ani v případě kalů tato vize není vzdálená realitě, avšak také má svá úskalí. Čistírenské kaly lze využít jako náhradu organických hnojiv. Půda je tak obohacena o potřebné živiny, ale hrozí zde riziko kontaminace půdy či povrchové a podzemní vody rizikovými prvky (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn), které mnohdy kaly obsahují i ve významném množství.

Tato rizika lze však snížit aplikací vhodných bioremediačních opatření, jako jsou rostliny (v tomto případě se jedná o fytoremediaci), houby (mykoremediace) či jejich kombinace (fyto-mykoremediace). Rostliny a houby, stejně jako jsou schopné přijímat živiny, mají schopnost akumulovat z prostředí i zmíněné rizikové prvky. Přijaté prvky mohou bez svého ohrožení zabudovat do svých tkání nebo jsou schopné produkovat takové látky, které z toxických forem těchto prvků vytvoří netoxické.

V případě rostlin je velká část rizikových prvků přijata kořenovým systémem, avšak dále do nadzemní části rostliny, jak ukazují výsledky této práce, je transportováno pouze malé množství, a to zejména mobilních prvků (Cu, Ni, Zn).

Co se týče hub, důležitou roli hraje mycelium vylučující řadu látek (extracelulární enzymy a kyseliny, intracelulární ligandy), díky kterým je houba schopna rizikové prvky buď přijmout nebo je v půdě imobilizovat, čímž je zabráněno šíření kontaminace dále do půdního profilu. Existují dokonce druhy mikroskopických hub, které svým myceliem prorůstají buněčnou stěnou kořenů rostlin, čímž vytvoří aktivní výměnu látek, a to i v případě rizikových prvků, které mohou být v půdě ve formě pro rostliny nedostupné.

V této práci bylo zkoumáno chování ligninolytických hub, konkrétně *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná) a rostlin *Zea mays* L. (kukuřice setá) v půdě kontaminované právě těmito rizikovými prvky (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn). Samostatné použití rostliny bylo v otázce bioremediace zhruba na stejné úrovni efektivity jako samostatné použití houby. Avšak jejich kombinace poukázala na vysoký potenciál tohoto bioremediačního opatření. Příjem rizikových prvků rostlinou byl v několika případech významně podpořen právě aplikací houbového substrátu. Do budoucna je zapotřebí výzkum více druhů rostlin a hub, ale i přesto lze tuto bioremediační technologii považovat za velmi efektivní.

Současný tlak na ekologické chování nejen v průmyslu, dopravě či právě zemědělství také hraje do karet prosazení této bioremediační technologie zejména proto, že je šetrná k životnímu prostředí.

**Klíčová slova:** rizikové prvky, bioremediace, čistírenský kal, kontaminace, půda



# Phytomycoremediation of soil contaminated with risk elements after application of sewage sludge

## Summary

Nowadays, there is an increasing effort to use all waste, whether it is municipal waste, wastewater or associated sewage sludge.

Even in the case of sludge, this vision is not far from reality, but it also has its pitfalls. Sewage sludge can be used as a substitute for organic fertilizers. The soil is thus enriched with the necessary nutrients, but there is a risk of contamination of the soil or surface and underground water with risk elements (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn), which the sludge often contains in significant quantities.

However, these risks can be reduced by applying appropriate bioremediation measures, such as plants (in this case it is phytoremediation), fungi (mycoremediation) or their combination (phytomycoremediation). Plants and fungi, just as they are capable of receiving nutrients, have the ability to accumulate the aforementioned risk elements from the environment. Accepted elements can be incorporated into their tissues without endangering themselves, or they are able to produce such substances that create non-toxic ones from toxic forms of these elements.

In the case of plants, a large part of the risk elements is taken up by the root system, but further to the above-ground part of the plant, as the results of this work show, only a small amount is transported, especially mobile elements (Cu, Ni, Zn).

As far as fungi are concerned, an important role is played by the mycelium, which secretes a number of substances (extracellular enzymes and acids, intracellular ligands), thanks to which the fungus is able to either accept risk elements or immobilize them in the soil, thereby preventing the contamination from spreading further into the soil profile. There are even species of microscopic fungi that use their mycelium to grow through the cell wall of plant roots, thereby creating an active exchange of substances, even in the case of risky elements that may be unavailable to plants in the soil.

In this work, the behavior of ligninolytic fungi, namely *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) and *Zea mays* L. plants (corn seed) was investigated in soil contaminated with precisely these risk elements (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn). The separate use of the plant was roughly at the same level of effectiveness as the separate use of the sponge in terms of bioremediation. However, their combination pointed to the high potential of this bioremediation measure. The intake of risk elements by the plant was in several cases significantly supported precisely by the application of the fungal substrate. In the future, research on more species of plants and fungi is needed, but even so, this bioremediation technology can be considered very effective.

The current pressure on ecological behavior not only in industry, transport or agriculture also plays into the cards for the promotion of this bioremediation technology, especially because it is environmentally friendly.

**Keywords:** risk elements, bioremediation, sewage sludge, contamination, soil

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>Cíl práce</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>3. Odpadní čistírenský kal</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>3.1 Vznik kalu při čištění odpadních vod</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>3.2 Charakteristika kalu z ČOV</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>3.3 Využití</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>3.4 Rizika</b> .....	<b>- 8 -</b>
3.4.1 Rtuť .....	- 9 -
3.4.2 Kadmium .....	- 10 -
3.4.3 Olovo .....	- 10 -
3.4.4 Arsen .....	- 11 -
3.4.5 Chrom .....	- 12 -
3.4.6 Nikl .....	- 13 -
3.4.7 Zinek .....	- 13 -
3.4.8 Měď .....	- 14 -
<b>4 Kontaminace půdy rizikovými prvky po aplikaci kalů na zemědělskou půdu</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>4.1 Kontaminace půd rizikovými prvky ve světě a v ČR</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>4.2 Legislativní limity</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>5 Remediacce půd kontaminovaných rizikovými prvky</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>5.1 Bioremediace</b> .....	<b>- 20 -</b>
5.1.1 Fytoremediace .....	- 21 -
5.1.2 Bioremediace pomocí bakterií .....	- 23 -
5.1.3 Mykoremediace .....	- 25 -
<b>5.4 Kombinace fytoremediace a mykoremediace</b> .....	<b>- 28 -</b>
<b>6. Metodika</b> .....	<b>- 29 -</b>
<b>6.1 Popis experimentu</b> .....	<b>- 29 -</b>
6.1.1 Charakteristika experimentální půdy .....	- 29 -
6.1.2 Charakteristika experimentálního čistírenského kalu .....	- 30 -
6.1.3 Charakteristika experimentální rostliny a lignocelulózního substrátu .....	- 31 -
6.1.4 Založení experimentu .....	- 32 -
<b>6.2 Extrakce – rozklad a stanovení rizikových prvků</b> .....	<b>- 34 -</b>
<b>6.3 Statistické vyhodnocení dat</b> .....	<b>- 35 -</b>
<b>Výsledky</b> .....	<b>- 36 -</b>

<b>Diskuse.....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>Závěr.....</b>	<b>- 45 -</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>- 46 -</b>

## Úvod

S růstem lidské populace, roste také množství vyprodukovaných odpadů, ať už se jedná o odpad komunální nebo o odpadní vody. Odpadní vody mnohdy obsahují spoustu látek, jejichž odstranění je relativně nákladné z důvodu nutnosti využití speciálních technologií. Látky, které odstranit nelze, se následně akumulují ve vznikajícím odpadním čistírenském kalu.

Čistírenský kal lze považovat za nehomogenní směs organických a anorganických látek, která vznikla při technologických procesech čištění odpadních vod. Obsahuje základní živiny jako je dusík, fosfor či draslík, dále organickou hmotu a mikroorganismy. V případě využití kalu v zemědělství kromě pozitivně působících složek obsahuje také stopové prvky toxické pro životní prostředí.

Aktuálním trendem v zemědělství je snaha o využití, jakkoliv vzniklých organických odpadů, ať už se jedná o biomasu vzniklou z rostlinné produkce využitou pro výrobu bioplynu nebo čistírenský kal, jakožto alternativní zdroj minerálních a organických hnojiv. V případě čistírenského kalu nám jeho aplikaci na zemědělskou půdu komplikuje obsah stopových prvků (zejména As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn atd.), které jsou ve větších či menších koncentracích pro životní prostředí toxické.

Aplikací tohoto čistírenského kalu sice dosáhneme v půdě požadovaného obohacujícího výsledku o potřebné živiny a organickou hmotu, ale zároveň hrozí riziko kontaminace půdy, případně povrchových a podzemních vod. Avšak máme k dispozici několik metod ke zmírnění těchto negativních dopadů. Je také žádoucí, aby tyto metody byly šetrné k životnímu prostředí.

Jedním ze způsobů, jak z půdy obohacené o čistírenský kal šetrně odstranit rizikové prvky, může být remediace. Remediační metody mají velký potenciál a výběr z několika odvětví. K odstranění rizikových prvků lze využít různé bioremediační metody například bakterie, houby nebo samostatně specifické druhy rostlin či jejich kombinace.

V této bakalářské práci se budu zabývat využitím kombinace rostlinné a fungální složky při odstraňování rizikových prvků obsažených v čistírenském kalu po jeho aplikaci na půdu. Bude založen vegetační experiment, kde budou stanoveny koncentrace vybraných rizikových prvků v půdě, po pěstování kukuřice seté, aplikaci substrátu prorostlého hlívou ústřičnou a jejich kombinaci.

## **Cíl práce**

- 1) Cílem literární rešerše bude popsat chování vybraných rizikových prvků v systému půda – kal – ligninolytická houba – rostlina.
- 2) Práce obsahuje také praktickou část. Cílem praktické části práce bude stanovit změny celkových obsahů rizikových prvků v kontaminované půdě obohacené o kaly s přísávkou ligninolytických hub, bez rostlin a s rostlinami kukuřice.
- 3) Cílem bude vyhodnotit odběr rizikových prvků rostlinami z půdy obohacené o kaly.

### 3. Odpadní čistírenský kal

Čistírenské kaly jsou heterogenní směsí organických a anorganických látek pocházejících z odpadních vod nebo vzniklých při technologických procesech jejich čištění. Ve významném množství obsahují základní živiny, zejména dusík a fosfor, dále organickou hmotu, stopové prvky, mikroorganismy, ale zároveň obsahuje potenciálně rizikové prvky jako jsou např. těžké kovy a polokovy (Pb, Cr, As, Hg apod.), polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, dioxiny a celou řadu dalších emergentních (tzv. „nových“) organických polutantů (rezidua léčiv a látek osobní potřeby, pesticidů, perfluorovaných sloučenin a jiných).

Aplikací na zemědělskou půdu lze zlepšit její fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti. I přesto, že je možné aplikovat na zemědělskou půdu pouze kal upravený a vyhovující mezním hodnotám koncentrací vybraných rizikových prvků, může docházet k její sekundární kontaminaci. Např. přítomnost hliníku v půdě může mobilizovat toxický arsen a u jiných může docházet k podpoře sorpce (Kotovicová, 2012).

**Tabulka č.1** – Mezní hodnoty koncentrací těžkých kovů v kalech (pro použití na zemědělské půdě) dle – vyhlášky 437/2016 Sb.

<b>Riziková látka</b>	<b>Mezní (maximální) hodnoty koncentrací v kalech (mg/kg sušiny)</b>
As	30
Cd	5
Cr	200
Cu	500
Hg	4
Ni	100
Pb	200
Zn	2500

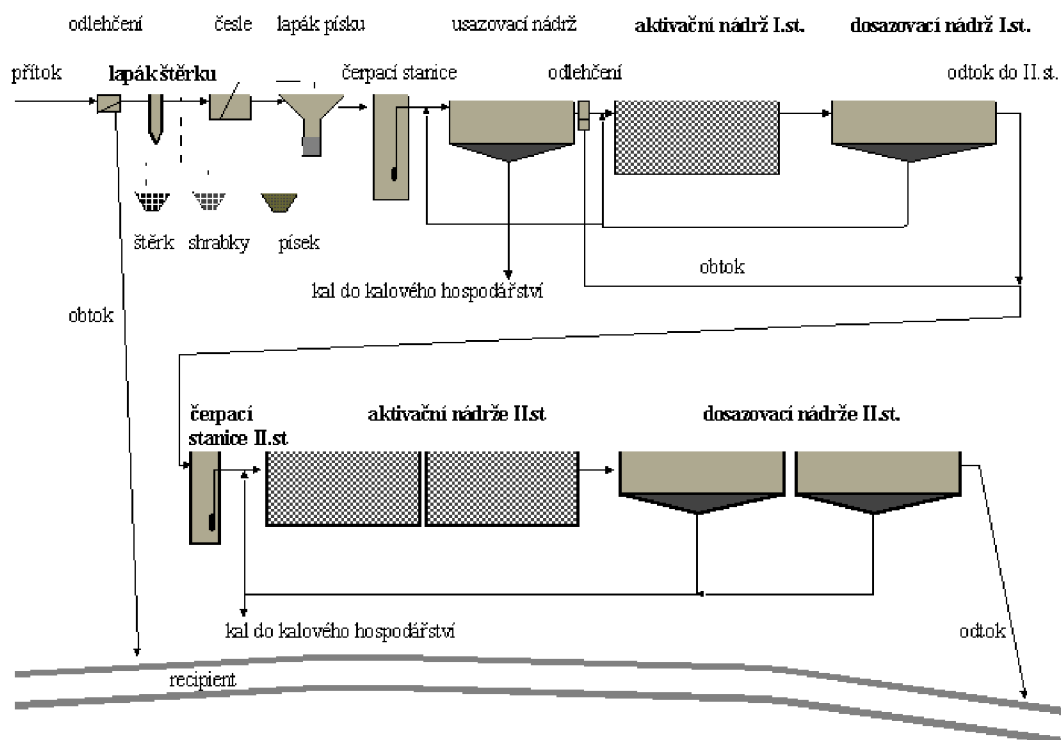
#### 3.1 Vznik kalu při čištění odpadních vod

Kaly v čistírnách odpadních vod (ČOV) vznikají ve dvou formách, a to ve formě kalu primárního a sekundárního nebo-li aktivovaného.

Primární kal vzniká v procesu hrubého předčištění, kdy se od surové odpadní vody oddělují hrubé nečistoty. Hrubší materiál je zachytáván na česlích. Částice těžší jsou usazovány na lapácích písku. Lapáky zpomalují proudění odpadní vody, čímž sedimentaci umožňují. Látky nerozpuštěné, které projdou lapáky i česlemi sedimentují v usazovacích nádržích a tvoří primární kal. Tento kal má zrnitou strukturu.

Následuje mechanický stupeň čištění. Zde je cílem z nerozpuštěných látek separovat jemnější částice, které se usazují v dalších usazovacích nádržích (Procházková & Miklová 2013).

Následuje biologický stupeň čištění odpadních vod, při kterém vzniká sekundární (aktivovaný) kal. Při biologickém stupni čištění se odstraňují rozpuštěné organické látky biochemickým (biologickým) rozkladem, a to díky heterotrofním mikroorganismům. Proces probíhá v aktivační nádrži. Aktivační nádrž je vybavena provzdušňovacím zařízením zajišťující přívod kyslíku. Do aktivačních nádrží se přidávají koagulanty (chlorid železitý, síran hlinitý), které narušují elektrické náboje částic. Dochází tak ke vzniku prvotních agregátů aktivovaného kalu. Rychlé proudění v aktivačních nádržích má za následek, že struktura kalu je vločkovitá. Obsah sušiny zpravidla dosahuje pouze 1–3 %. Aktivační kal je tvořen převážně houbami, plísněmi, kvasinkami a bakteriemi. Lze pozorovat některé jednobuněčné prvky, háďátka, nálevníky, bičíkovce či měňavky. Z aktivačních nádrží je směs přečerpána do nádrží dosazovacích. Zde dochází k oddělení vyčištěné vody od kalu. Kal usazený na dně nádrže je stírán nejčastěji pojezdovým mostem, stejně tak kal plovoucí na hladině. Usazený kal lze rozdělit na kal vratný, který je přečerpán zpět do aktivační nádrže a na kal přebytečný, který je smíchán s kalem primárním. Spolu vytváří tzv. kal surový. Surový kal je následně odváděn do objektů kalového hospodářství, kde dochází k jeho zahuštění, odvodnění a aerobní či anaerobní stabilizaci (Rosendorfová 2008).



**Obr. č.1** – Schéma části ČOV Jihlava s biologickým stupněm čištění (Pazdera 1996)

### 3.2 Charakteristika kalu z ČOV

V procesu mechanického čištění vzniká primární kal, skládá se zejména z nerozpuštěných organických látek. V navazujícím biologickém čištění vzniká v aktivační nádrži aktivovaný čistírenský kal. Aktivovaný kal je směsnou kulturou mikroorganismů zodpovědnou za čištění odpadních vod v biologickém stupni čištění. Pro získání této kultury je zapotřebí zajistit vhodné podmínky pro růst mikroorganismů. Důležité je zejména provzdušňování surové odpadní vody. Další způsob, jak získat kulturu mikroorganismů je její převzetí a inokulací z aktivovaného kalu jiné čistírny odpadních vod.

Aktivovaný kal obsahuje širokou škálu bakterií. Nejčastěji se jedná o rody: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*), *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* *Lophomonas* aj. Častá je také přítomnost nitrifikačních bakterií *Nitrosomonas* či *Nitrobacter*. Kromě bakterií se v kalu vyskytují v menším množství i houby, plísňe, kvasinky, z vyšších organismů pak hlístice, prvoci či vířníci.

Aktivační nádrže, kde probíhá proces biologického čištění, jsou v závislosti na probíhajících procesech rozděleny na několik částí v rozdílnými podmínkami prostředí.

V aerobní části, probíhá nitrifikace. Přítomnost kyslíku je zde bezpodmínečně nutná. Dochází zde k oxidaci amoniakálního dusíku ( $\text{NH}_3$ ) na dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ) a dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ). V závislosti na pH se nitrifikace účastí odlišné druhy bakterií. Pro hodnoty pH v rozmezí 7,9 až 8,2 se uvádí činnost rodu *Nitrobacter*. Pro pH v rozmezí 7,2 až 7,6 je přítomen rod *Nitromonas*. V oblasti s anoxickými podmínkami rozpuštěný kyslík přítomen není. Probíhá zde proces denitrifikace, při kterém se dusitany a dusičnany redukuje na elementární plynný dusík. V poslední oblasti aktivační nádrže jsou podmínky anaerobní. Není zde přítomen ani rozpuštěný kyslík, ani dusitanový či dusičnanový dusík. Mezi procesy, které probíhají za těchto podmínek patří acidogeneze, acetogeneze, metanogeneze či depolymerace fosfátů. V závislosti na teplotních podmínkách lze rozdělit bakterie účastníci se anaerobních procesů na psychrofilní (15 až 20 °C), mezofilní (30 až 40 °C) a termofilní (50 až 60 °C). Nejčastěji se využívá mezofilních teplotních podmínek (Švehla a kol. 2007).

V dosazovací nádrži je aktivovaný kal oddělován od vyčištěné odpadní vody. Část se navrácí do aktivační nádrže jakožto aktivační směs potřebná pro biologický rozklad organických látek a přebytečný kal je ve většině případech smíchán s kalem primárním a odváděn do kalového hospodářství. Takto vzniklý kal se nazývá směsný surový kal. První úprava surového kalu je jeho zahuštění. Vstupní kal obsahuje zhruba 1 % sušiny. Zahuštěním se obsah sušiny zvýší až na 3–10 %. Zahuštění probíhá v zahušťovacích nádržích nebo strojově centrifugou.

Zahuštěný kal je dále podroben nejčastěji anaerobní stabilizaci. Anaerobní stabilizace probíhá ve stejných fázích jako anaerobní rozklad organických látek, tedy ve fázích hydrolyza, acidogeneze, acetogeneze a metanogeneze. Ve fázi metanogeneze vzniká bioplyn ( $\text{CH}_4$  a  $\text{CO}_2$ ), který je zachytáván v plynojemu. Během procesu zahuštění vzniká kalová voda, která se vrací na začátek samotného čištění odpadních vod. Anaerobně



stabilizovaný kal je následně odvodňován nejčastěji v kalolisech, sítopásech či centrifugách. Odvodněním se zvýší obsah sušiny až na 20–30 % a vznikne tak již relativně pevná hmota (odvodněný anaerobně stabilizovaný kal) a opět kalová voda. Takto upravený kal se již dá využít pro účely zemědělství, energetiky či zakomponování do stavebních materiálů (Chudoba a kol. 1991).



**Obr. č. 2** – Sušený čistírenský kal z kontaktní lopatkové sušárny (Raček a kol. 2018)

### 3.3 Využití

Napříč světem je kladen důraz na ochranu životního prostředí a s ní spojenou i minimalizaci a recyklaci odpadů. Kalové hospodářství není výjimkou. Vzniku čistírenského kalu, jakožto odpadního produktu z čistírenských procesů, zabránit nelze. Jako vhodný způsob zpracování se jeví recyklace či využití kalu v destrukčních metodách zpracování.

Recyklace je možná formou aplikace upraveného kalu na zemědělskou půdu či kompostování. V případě aplikace na zemědělskou půdu slouží kal jako alternativa organického hnojiva. Se soustavnou potřebou používání organických hnojiv v zemědělství však klesá dostupnost zdrojů některých jeho složek. Jedním z ubývajících prvků hnojiv je fosfor. Nejen v EU jsou horniny obsahující fosfor považovány za kritickou surovinu. Existují technologie, pomocí kterých je fosfor opětovně získáván právě z čistírenského kalu. Jedná se například o extrakci fosforečnanů za působení kyseliny a jejich následnou separaci od těžkých kovů. Recyklace fosforu právě z čistírenských kalů by mohlo být jedno z řešení tohoto problému (Kotovicová 2012; Kecskésová 2020).

Díky relativně vysokému obsahu živin se kal může uplatnit i v rámci rekultivací. Pro vegetaci nacházející se na chudých stanovištích zrekultivovaných území se aplikace čistírenského kalu na tuto půdu jeví jako vhodný zdroj živin.

Mezi destrukční metody zpracování čistírenského kalu patří jeho spalování, a to bez či s využitím energie, dále zplyňování či pyrolýza (Kos 2016).

Pyrolýza se řadí k fyzikálně-chemickým procesům, které probíhají za zvýšené teploty a bez přístupu vzduchu. Zároveň patří mezi endotermní termické procesy, kdy dochází

k rozkladu organických látek. Produktem pyrolýzy bývá pevný zbytek, označován jako biouhel (biochar), kapalná fáze ve formě pyrolýzního oleje a plyn. V závislosti na teplotě a době zdržení se rozlišují tři hlavní druhy pyrolýzních procesů.

Prvním je torefakce probíhající v rozmezí teplot 200–300 °C. Zahřívání je oproti samotné pyrolýze pomalé, a to zhruba 50 °C/min. Cílem je maximalizovat hmotnost a energetickou hustotu výsledného produktu, kterým je především pevný zbytek. V průběhu nereaktivního sušení, které probíhá při nižších teplotách (50–120 °C) dochází pouze ke ztrátě fyzikální vlhkosti, a to bez chemických změn. Ve fázi reaktivního sušení při teplotách 150–200 °C dochází k porušení vodíkových můstků a počátku rozkladu hemicelulózy. Následuje samotná torefakce, která probíhá při teplotách 200–250 °C. Nastává rozpad vodíkových můstků i mezimolekulárních vazeb, počátek uvolňování těkavých látek a vznik kondenzovatelných kapalin a nekondenzovatelných plynů. Při teplotě 250–300 °C, a tedy konečné fázi dochází k rozpadu hemicelulózy na volatilní látky a pevný zbytek. Torifikovaná biomasa má hydrofobní charakter a je stlačována do pelet.

Dalším druhem je samotný proces klasické pyrolýzy probíhá při teplotách 300–650 °C. Ohřev na požadovanou teplotu je relativně rychlý. Cílem je maximalizovat výnos kapalného zbytku, tedy pyrolýzního oleje. V první fázi vzniká kondenzovatelný plyn a pevný uhlíkatý zbytek. Ve fázi následující se kondenzovatelné plyny rozpadají na plyny nekondenzovatelné (CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>), kondenzovatelnou složku (pyrolýzní olej). Pyrolýzní olej bývá často nestabilní, viskózní a korozivní. Lze jej využít pro výrobu tepla či elektřiny, a to spalováním. Ovšem kvůli vysokému podílu O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O má pyrolýzní olej menší výhřevnost. Posledním druhem pyrolýzních procesů je tzv. karbonizace probíhající při teplotě až 800 °C. Cílem je produkce pevného zbytku, a to dřevěného uhlí (Moško a kol. 2017).

Zpracování čistírenského kalu procesem pyrolýzy má několik výhod i z globálního hlediska. Tímto procesem lze transformovat kal do formy biouhlu (biocharu). Základní složkou biocharu je chemicky stabilní uhlík. Nepodléhá tedy dalšímu rozkladu ani oxidaci. Při aplikaci biocharu na půdu dochází tedy k sekvestraci (uložení) uhlíku v přirozené stabilní formě. Sekvestrací této formy uhlíku v půdě se významně snižuje uhlíková stopa a emise skleníkových plynů. Mezi další pozitiva transformace kalů do formy biocharu a jeho následné aplikaci na půdu patří omezení průniku dusíku a fosforu do podzemních vod, díky zvýšení kapacity iontové výměny dochází ke zúrodnění půd. Biochar v půdě také zvyšuje schopnost půdy zadržet vodu.

Další z vhodných způsobů zpracování čistírenského kalu je jeho použití jako biopaliva druhé generace. Součástí mnoha čistíren odpadních vod jsou i bioplynové jímky. V těchto jímkách se akumuluje methan a CO<sub>2</sub>, tedy bioplyn, který vzniká v důsledku mikrobiální činnosti probíhající v kalu. Vzniklý bioplyn lze následně využít jako biopalivo, či z něj získat energii spalováním (Dohányos 2006).

**Tabulka č. 2** – Produkce a nakládání s čistírenskými kaly v ČR v roce 2022  
(Český statistický úřad, 2022)

Území, kraj	Kaly produkované v ČOV celkem	Způsob zneškodnění kalu (tuny sušiny)				
		přímá aplikace a rekultivace	kompostování	skládkování	spalování	jiný
<b>Česká republika</b>	<b>197 991</b>	<b>63 260</b>	<b>79 777</b>	<b>19 444</b>	<b>25 100</b>	<b>10 410</b>
Hl. město Praha	22 022	19 262	2 760	0	0	0
Středočeský	23 255	6 546	14 127	2 290	47	245
Jihočeský	10 411	5 997	618	3 508	26	262
Plzeňský	8 749	5 351	3 040	242	3	113
Karlovarský	3 077	0	1 931	95	1 035	16
Ústecký	31 218	1	9 158	1 395	19 796	868
Liberecký	5 548	0	5 271	242	1	34
Královéhradecký	7 481	2 776	4 542	131	0	32
Pardubický	7 726	455	2 691	392	0	4 188
Vysočina	11 034	1 689	8 104	69	0	1 172
Jihomoravský	18 054	1 113	12 179	156	2 959	1 647
Olomoucký	9 885	5 622	2 269	249	1 015	730
Zlínský	16 970	4 704	1 402	10 592	198	74
Moravskoslezský	22 561	9 744	11 685	83	20	1 029

### 3.4 Rizika

Aplikací kalů, obsahujících rizikové prvky, může docházet ke kontaminaci nejen zemědělské půdy, ale také ke kontaminaci ovzduší, podzemních a povrchových vod, a to průsakem či splachem. Za těžké kovy jsou považovány takové kovy, jejichž specifická hmotnost přesahuje 0,5 mg/cm<sup>3</sup>.

Největší riziko pro lidské zdraví představuje kontaminace vod. V případě povrchových vod jsou vystaveny těžkým kovům primárně vodní organismy. V mnoha případech jsou tyto vodní organismy, převážně ryby, vyloveny a zpracovány pro účel potravy. V rozvojových zemích, kde často nejsou potraviny podrobeny kontrole kvality, mohou být intoxikaci těžkými kovy vystaveni i zdejší obyvatelé. Kontaminace podzemních vod představuje riziko zanesení těžkých kovů do studní, využívaných jako zdroj užitkové nebo v některých případech i pitné vody. Primárně kontaminovaná užitková voda využívaná např. pro závlahy může způsobit sekundární kontaminaci půdy či plodin v této půdě pěstovaných (Greger 2004).

**Tabulka č. 3** – Pozad'ové koncentrace rizikových prvků v přírodní vodě a sedimentech a horní hranice neznečištěné půdy (Greger 2004)

Prvek	Přírodní voda µg/g		Půda µg/g		Sedimenty µg/g	
	Mořská voda	Sladká voda	Písčitá	Hlinitá	Jezerní	Mořské
Cd	0,01-0,07	0,07	1	1	0,14-2,5	0,02-0,43
Cr	0,08-0,15	0,5	15	30	7,0-77	11,0-90
Co	0,04	0,05	5	15	-	0,1-74
Cu	0,04-0,1	1,8	15	25	16-44	4-250
Hg	0,01	0,01	0,15	0,15	0,004-0,2	0,001-0,4
Mn	0,2	< 5	500	800	-	390-6700
Mo	10	1	5	5	-	0,2-27
Ni	0,2-0,7	0,3	1	1	34-55	2-225
Pb	0,001-0,015	0,2	50	50	14-40	7,0-80
Zn	0,01-0,62	10	100	150	7,0-124	16-165

### 3.4.1 Rtuť

V případě kontaminace vod, jsou ohroženy nejen vodní organismy, ale také ekosystémy vázané na zasažené vodní útvary, zejména pomalu tekoucí řeky či stojaté vody. Rizikovost rtuti tkví v její schopnosti dobře se akumulovat v sedimentech a ve tkáních živých organismů. Koncentrace v sedimentech závisí především na charakteru dna vodního útvaru. Vyšší obsahy byly zjištěny v sedimentech organického původu než v písčitých sedimentech. Do organismů ryb se rtuť dostává zejména trávicím traktem, skrze kůži či žábry. Vyšší koncentrace rtuti byly prokázány ve tkáních dravých ryb, jakožto posledním článku potravního řetězce ve vodním prostředí. Sloučeniny rtuti mají v organismech ryb za následek poškození jater a dalších důležitých orgánů, dochází k poškození svalové tkáně a ovlivněná je také jejich reprodukce. Ve vodním prostředí může docházet k transformaci elementární rtuti na methylrtuť. K transformaci elementární rtuti na methylrtuť dochází díky tzv. metylaci. Tento proces provádí pravděpodobně sulfid redukující bakterie nacházející se v biofilmu či svrchních vrstvách sedimentů (Man 2011).

V návaznosti na vodní útvary je dotčená zvěř živící se intoxikovanými rybami a dalšími vodními organismy. Kromě dravé zvěře je intoxikaci tímto kovem vystavena i lidská populace. Téměř 100 % methylrtuti obsažené ve zkonsumovaném mase se dostává do krevního řečiště, jater, nervové soustavy, ledvin a částečně i do mozku. Ve vysokých koncentracích je methylrtuť neurotoxickou látkou. Methylrtuť se velmi pomalu rozkládá a v lidském organismu je relativně stabilní. V našem těle může přetrvávat 44 až 80 dní. Další její nebezpečí spočívá ve snadné propustnosti placentou a hematoencefalickou bariérou mezi krví a mozkem. Vystavení methylrtuti v průběhu těhotenství může vést k poškození plodu natolik závažnému, že dojde k vývinu mozkové obrny jakožto vrozené vady (Wu 2014).

### 3.4.2 Kadmium

Dobrou bioakumulační schopnost má také kadmium. V organismech setrvává relativně dlouho a narozdíl od rtuti netvoří těkavé alkylderiváty. Přítomnost kadmia v půdách zesiluje toxické účinky jiných kovů jako je např. zinek či měď. Naopak ve vodním prostředí se zvyšující se koncentrací vápníku a hořčíku toxicita kadmia klesá.

Významným antropogenním zdrojem kadmia v zemědělských půdách jsou kromě čistírenských kalů také fosforečná hnojiva. Tato hnojiva mohou obsahovat až 170 mg/kg Cd. Významný obsah kadmia nalezneme v odpadních vodách z galvanického pokovování či z výroby Ni-Cd baterií.

V tělech obratlovců se kadmium akumuluje ve vnitřních orgánech, a to především v ledvinách, nadledvinkách a játrech. V důsledku toho dochází k poškození těchto orgánů a jejich případné dysfunkci. Mimo to dochází k dekalifikaci kostí. Díky svým vlastnostem se kadmium řadí mezi teratogenní.

První zmínky o intoxikaci kadmii pocházejí z roku 1969 z Japonska. Zde byly k zavlažování rýžových polí využívány odpadní vody pocházející z čistírny odpadních vod závodu na výrobu kadmiových pigmentů. Rýže vypěstovaná v takto kontaminovaném půdním prostředí vykazovala vysoké koncentrace kadmia i ve své biomase (Pitter 2009).

Rozpustnost kadmia a tím i jeho přístupnost pro rostliny je závislá především na pH půdy. Nejvyšší mobilita kadmia je v kyselých půdách s pH v rozmezí od 4,5 do 5,5. V půdách alkalických je kadmium méně mobilní a má tendenci precipitovat na povrchu jílových minerálů (Makovníková a kol. 2006).

### 3.4.3 Olovo

Zdrojem olova v čistírenských kalech jsou převážně odpadní vody ze zpracoven rud jako je např. galenit, dále z průmyslu barevné metalurgie či z výroby akumulátorů. Sloučeniny olova nalezneme také v odpadních vodách sklářského průmyslu, kde jsou součástí glazur.

Dalším zdrojem olova v odpadních vodách může být koroze olovených částí vodovodního potrubí. Vzhledem k současnému převládajícímu využití mnohem vhodnějších materiálů pro výrobu vodovodního potrubí (plasty, ocel) je však tento zdroj kontaminace olovem zanedbatelný.

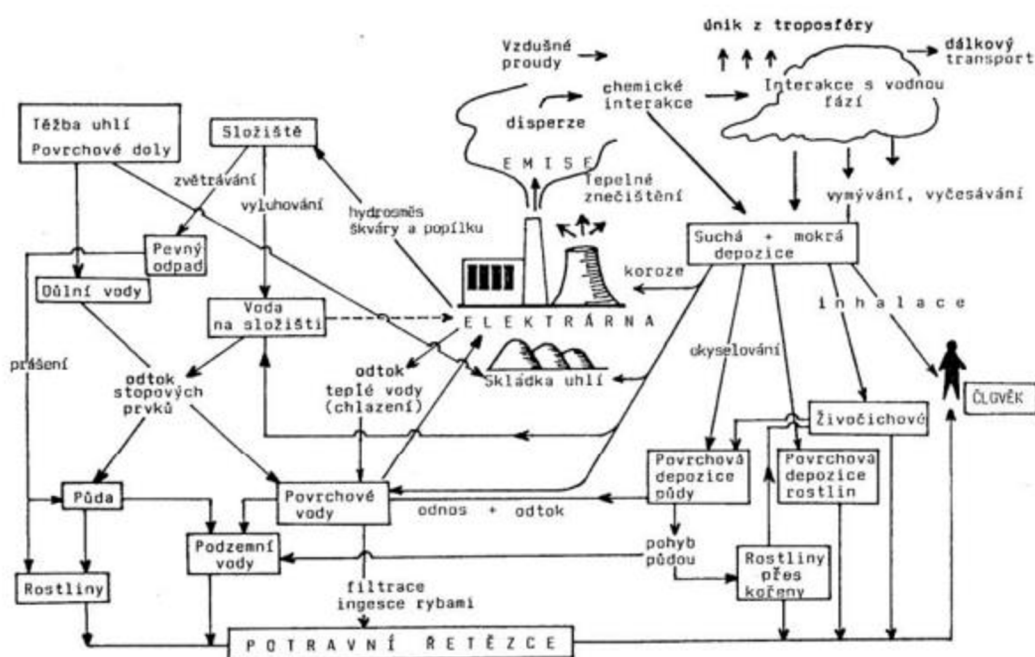
Díky vysokému akumulačnímu koeficientu se olovo velmi dobře akumuluje nejen v sedimentech a kalech, ale také v tělech rostlin, živočichů či mikroorganismů. V případě olova je zde pravděpodobnost tvorby toxických organických methylderivátů.

Olovo se vyznačuje dobrou schopností tvořit silné vazby s -SH skupinou v thiolech. Thioly se vyskytují v některých enzymech, inhibují tvorbu hemoglobinu a mají negativní vliv na červené krvinky či nervový systém. V lidském organismu se olovo akumuluje zejména v kostech, má neurotoxické účinky a řadí se mezi potenciální karcinogeny (Pitter 2009).

Ve vodním prostředí dosahuje koncentrace olova nejvyšších hodnot v sedimentech dna. Zde může být koncentrace až o 4 řády vyšší než v okolní vodě. Toxicita olova je závislá na rozpustnosti sloučenin olova a na množství přítomného hořčíku a vápníku. Se zvyšující

se hodnotou pH rozpustnost sloučenin olova klesá. Pro jednotlivé druhy ryb se smrtící koncentrace olova pohybují v rozmezí 0,1 až 10 mg/l. Akutní intoxikace se u ryb projevuje poškozením epitelu žaber a následným úhynem v důsledku udušení. Při chornické intoxikaci dochází ke změně krevního obrazu, především k poškození erytrocytů a leukocytů. Je doprovázena degenerativními změnami parenchymatózních orgánů a poškozením nervové soustavy (Svobodová 1993).

Jako nejvyšší mezní hodnota olova v pitné vodě v ČR se uvádí 0,01 mg/l. Pro kojeneckou vodu jsou stanoveny přísnější limity, a to 0,005 mg/l (Vyhláška MŽP č.252/2004 Sb.).



**Obr. č. 3** – Schéma distribuce a pohybu olova, kadmia a rtuti v okolí klasické tepelné elektrárny (Cibulka 1991)

### 3.4.4 Arsen

Toxicita arsenu spočívá v jeho vysoké afinitě pro vazbu s -SH skupinami aminokyselin. Antropogenními zdroji arsenu jsou především odpadní vody z těžebního průmyslu a zpracování rud, dále z tepelných elektráren, výroby barviv či aplikace určitých insekticidů a herbicidů. Do životního prostředí se arsen dostává i přirozenou cestou, a to zvětváváním sulfidických hornin (např. arsenopyrit  $FeAsS$ , realgar  $As_4S_4$ ) (Čelechovská a kol. 2005).

V přírodě se arsen nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu V+ a v méně stabilní formě v oxidačním stupni III+. Dalšími oxidačními stavy arsenu jsou stavy 0 a -III. Sloučeniny arsenu v oxidačním stupni III+ jsou do organismu vstřebávány rychleji, čímž se stávají více toxickými. Podobně jako u rtuti se mohou biochemickými procesy vytvářet methylderiváty jako např. methylarsen  $CH_3AsH_2$ , dimethylarsen  $(CH_3)_2AsH$  či trimethylarsen  $(CH_3)_3As$ . Tyto formy jsou těkavé.



Charakteristické příznaky chronické otravy arsenem se nejčastěji projevují dermatologickými onemocněními. U intoxikovaných jedinců se vyskytují záněty kůže s následnou tvorbou hlubokých vředů, ekzémy, otoky, či melanosa. Výjimkou není ani ztráta vlasů, nehtů či otoky očních víček. Objevit se mohou také neurologické změny jako spavost, ztráta paměti, zmatenost či zhoršení sluchu.

Při akutní intoxikaci vysokou dávkou může dojít ke zhroucení krevního oběhu a k úmrtí může dojít již během několika hodin. V případě akutní intoxikace nižší dávkou se mohou objevit bolesti hlavy, závratě, palčivá bolest v hrdle, v pokročilém stádiu se objevuje silná bolest břicha, zvracení či vodnaté a krvavé průjmy. Během pár hodin tak může dojít k dehydrataci, poklesu krevního tlaku, k selhání oběhu či cyanóze. V případě, že intoxikovaný jedinec tuto akutní fázi přežije, dochází k vážnému poškození ledvin a jater (Pitter 2009).

Nejvyšší mezní hodnota arsenu v pitných vodách v ČR je 0,01 mg/l. Pro kojeneckou vodu tato hodnota činí 0,005 mg/l (Patočka 2013).

### 3.4.5 Chrom

Výskyt chromu v přírodě je spojen zejména s mafickými a ultramafickými horninami. Složení těchto hornin je převážně železanto-hořečnaté, vyznačují se tmavou až černou barvou a vyšší hustotou (amfiboly, pyroxeny, olivín, slídy). Chrom se vyznačuje širokou škálou oxidačních stavů od II- do VI+. Přirozeně se sloučeniny chromu vyskytují zejména v oxidačních stavech III+ a VI+. Vyšší oxidační stav znamená pro chrom nižší stabilitu a tím vyšší toxicitu. Většina Cr<sup>III+</sup> je obsažena v minerálu chromit (FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) či v dalších spinelových strukturách, kde nahrazuje hliník nebo železo. Obecně se Cr<sup>III+</sup> svou velikostí iontů podobá Fe<sup>III+</sup> a Al<sup>III+</sup>.

Do skupiny spinelidů patří včetně chromitu také magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), spinel (MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) či jakobsit (MnFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

Vzhledem k tomu, že Cr<sup>III+</sup> je mobilní pouze ve velmi kyselém prostředí a při pH 5,5 se téměř zcela vysráží, jeho sloučeniny bývají v půdách velmi stabilní. Naopak Cr<sup>VI+</sup> je velmi mobilní jak v kyselých, tak zásaditých půdách a jeho sloučeniny jsou proto považovány za vysoce nestabilní (Kabata-Pendias 2010).

Antropogenními zdroji chromu ve vodě jsou odpadní vody především z metalurgického, chemického či kožedělného průmyslu pracujícího s Cr. Ke kontaminaci půd může docházet během manipulace s odpady obsahující chrom (komunální odpad, odpady z pokovování či zpracování chromu) či v důsledku průsaku ze špatně zabezpečených skládek. Do ovzduší se chrom dostává spalováním fosilních paliv či obecně organického materiálu (Weiner 2010).

Trojmocný chrom představuje pro lidský organismus esenciální mikroprvek. Jeho toxicita se oproti ostatním esenciálním prvkům (Zn, Cu, I, Se, Mn) projevuje až při mimořádně vysokých dávkách (Pechová 2007).

Pro trojmocný chrom je NOAEL (hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku) stanovena na 1000 µg/den (Gropper 2005).

Akutní intoxikace chromem se projevuje zvracením, hemoragickou diatézou, dochází k poškození jater a ledvin či krvácení do gastrointestinálního traktu vedoucím ke

kardiogennímu šoku. Při chronické otravě dochází k selhání ledvin a jater, hemolýze a anémii (Reliene 2006).

Nejvyšší mezní hodnota chromu v pitné vodě v ČR je 0,05 mg/l. Pro kojeneckou vodu je tento limit stanoven na 0,025 mg/l (Vyhláška MŽP č.252/2004 Sb.).

### 3.4.6 Nikl

V přírodě se nikl nejhojněji vyskytuje v ultramafických horninách (1400-2000 mg/kg). S rostoucí kyselostí hornin se jeho koncentrace snižuje až na 5-15 mg/kg, a to např. v granitech. Nikl se díky své velké afinitě k síře často vyskytuje ve formě sulfidů (millerit, NiS). Dále se objevuje také v horninách s antimonem (breithauptit, NiSb) či arsenem (niklelín, NiAs).

Během zvětrávání hornin nikl se snadno mobilizuje a následně koprecipituje s železem či manganem. Avšak na rozdíl od  $Fe^{II+}$  a  $Mn^{II+}$  je  $Ni^{II+}$  relativně stabilní ve vodním prostředí a v případě tekoucích vod je schopný transportu i na velké vzdálenosti.

Existuje obecná podobnost mezi distribucí Ni, Co a Fe v zemské kůře. Avšak poměrně vysoké procento extrahovaného niklu z půdy pomocí EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová) naznačuje, že je v půdě fixován méně než např. kobalt. V povrchových půdních horizontech se Ni vyskytuje převážně v organicky vázaných formách, jejichž části mohou být snadno rozpustné cheláty (Kabata-Pendias 2010).

Antropogenními zdroji niklu jsou odpaní vody především z metalurgického, sklářského či keramického průmyslu. Dále je nikl využíván jako katalyzátor při některých chemických syntézách či galvanickém pokovování částí zařízení, které přicházejí do styku s vodou (např. rozvodné sítě).

Toxické účinky niklu byly zaznamenány ve velké míře při jeho vdechování. Dlouhodobá expozice vdechování niklu zvyšuje riziko rakoviny dýchacích cest. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny klasifikovala sloučeniny niklu jako lidský karcinogen skupiny 1. Stopové koncentrace niklu ve vzorcích vody a potravinách jsou měřeny pomocí atomové absorpční spektrometrie či spektrofotometrií (Chiou 2014).

Nejvyšší mezní hodnota niklu pro pitnou vodu a vodu kojeneckou v ČR je 0,02 mg/l (Vyhláška MŽP č.252/2004 Sb.).

### 3.4.7 Zinek

V přírodě se zinek vyskytuje zejména ve formě jednotlivých sulfidů (ZnS) nebo je vázán v mřížce jiných minerálů (augit, biotit, amfibol). Vyšší obsahy zinku jsou zaznamenány v bazických horninách, jelikož v kyselém prostředí jsou sloučeniny zinku snadněji rozpustné. Je také známo, že v silikátech nahrazuje  $Mg^{II+}$ . Díky jeho snadné adsorpci minerálními a organickými látkami se akumuluje především v humózních svrchních vrstvách půdního horizontu. Průměrný obsah zinku ve svrchních vrstvách půd v různých zemích se pohybuje od 17 do 125 mg/kg.

Mezi antropogenní zdroje zinku patří především průmysl barevné metalurgie, zpracování zinečnatých rud či hnojiva obsahující zinek jako znečišťující příměs. Do ovzduší se zinek dostává spalováním fosilních paliv či z mořiren mosazi. Ke zvýšené koncentraci zinku ve vodách může docházet v důsledku styku vody s pozinkovanými



komponenty (okapy, plechy, nádoby). Rozpustné organické komplexy zinku jsou obsaženy ve větší míře také v čistírenských kalech a jsou v půdě velmi mobilní (Kabata-Pendias 2010; Pitter 2009).

Zinek patří mezi esenciální stopové prvky, a to nejen pro lidi, ale také zvířata a rostliny. Doporučený denní příjem zinku pro dospělého člověka činí 20–25 mg (Krejsek 2020).

V případě dlouhodobé expozice inhalace par oxidu zinečnatého se mohou projevit zdravotní potíže. Jedná se zejména o bolesti hlavy, únavu, vysoké teploty, kašel, dehydrataci či výskytem bílkovin v moči. Rizikové jsou také rozpustné sloučeniny zinku (síran zinečnatý, chlorid zinečnatý), které mají leptavé účinky (Kafka 2002).

V pitné ani kojenecké vodě v ČR není obsah zinku legislativně limitován.

### 3.4.8 Měď

Měď patří mezi základní mikroživiny nejen pro rostliny a zvířata, ale také pro lidský organismus. Běžné koncentrace Cu v rostlinách se pohybují v rozmezí 5 až 20 mg/l. Skrze kořeny jsou rostliny schopné přijímat měď v dvojmocné formě ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) a redukovat ji na monovalentní formu ( $\text{Cu}^+$ ). Cu má v rostlině mnoho důležitých funkcí. Podílí se na tvorbě ligninu v buněčných stěnách nebo na tvorbě životaschopného pylu a semen.

Celková Cu v půdách se běžně pohybuje mezi 1 až 40 mg/l. Měď je v organické hmotě vázána pevněji než kterákoliv jiná mikroživina. Dostupnost Cu pro rostliny závisí na několika půdních vlastnostech. Na základě textury půdy bylo zjištěno, že rostliny rostoucí v písčitéch půdách více trpí nedostatkem Cu oproti rostlinám rostoucím v půdách hlinitých a jílovitých. Dále hraje zásadní roli pH půdy. Rozpustnost mědi klesá s rostoucím pH nad hodnotu 7. Se zvyšujícím se pH roste síla, jakou je měď v půdě vázána. Důležitá je také vyváženost živin v půdě. Vysoké koncentrace zinku, železa, fosforu či hliníku mohou vstřebávání Cu rostlinami potlačit (Norton 2015).

Mezi nejčastější formy mědi v přírodě patří sulfidy jako je např. chalkopyrit ( $\text{CuFeS}_2$ ) nebo chalkosin ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ). V důsledku zvětrávání se značné množství mědi dostává do povrchových a podzemních vod. Antropogenními zdroji mědi ve vodním prostředí bývají zejména odpadní vody z průmyslu povrchové úpravy kovů, aplikace algicidních přípravků či svodem vody z mědnatých střech a okapů. Do ovzduší je měď uvolňována především v okolí hutních závodů.

Intoxikace mědi se vyskytuje velmi vzácně, vzhledem k výrazné chuti je téměř nepoživatelná. Denní příjem mědi pro člověka činí 2–5 mg. Chronické intoxikace byly zaznamenány převážně v místech, kde se nacházelo měděné vodovodní potrubí. Mezi příznaky otravy mědi patří horečka, bolest svalů, pocení, průjem či lehká dušnost. Při vyšších koncentracích může docházet k poškození jater a ledvin. Za letální dávku se považuje 1–2 g (Pitter 2009).

## 4 Kontaminace půdy rizikovými prvky po aplikaci kalů na zemědělskou půdu

Aplikace čistírenských kalů na zemědělskou půdu představuje riziko zejména u půd, které obsahují zvýšené množství rizikových prvků. Použitím kalu, který obsahuje rizikové prvky, může jejich koncentrace v půdě překročit povolené mezní hodnoty. V České republice se nachází několik lokalit již kontaminovaných. Jedná se zejména o oblasti bývalého či současného těžebního průmyslu.

### 4.1 Kontaminace půd rizikovými prvky ve světě a v ČR

V České republice v okolí Kutné Hory se nacházela naleziště stříbra, které se zde také těžilo. V důsledku těžební činnosti zde byly hlášeny vysoké koncentrace rizikových prvků v půdách v blízkém okolí. Hodnoty v půdách překročily mezní hodnoty představující 30 mg/kg As, 1,0 mg/kg Cd, 200 mg/kg Cr, 80 mg/kg Ni, 140 mg/kg Pb a 200 mg/kg Zn. Zinek tuto hodnotu překročil 15krát, kadmium až 30krát a arsen dokonce 80krát. Hlavním zdrojem kontaminace rizikovými prvky je zvětrávání rudních zbytků či důlních hlušín.

Bez ohledu na extrémně vysoké obsahy arsenu ve hnědém uhlí těženém a spalovaném v ČR ve srovnání s jinými světovými lokalitami nepředstavuje jeho koncentrace v zemědělských půdách závažný ekologický problém. Mezi lokality v ČR potýkající se vysokými hodnotami arsenu v půdě patří např. ložisko zlata Mokrsko, Kasejovice, Jílové, Libčice, Kašperské Hory či Roudný. Koncentrace arsenu v těchto oblastech dosahovaly v půdách v rozmezí 50 až 330 mg/kg. Pro srovnání hodnoty arsenu v jiných oblastech ve světě, např. Florida (USA), nepřesahují 7,6 mg/kg (Králova a kol. 2010; Filippi 2004).

Dotčenou oblastí rizikovými prvky v důsledku průmyslové činnosti je také CHKO Brdy. Dříve než byla oblast zařazena na seznam CHKO se v oblasti Hořovicka již od středověku provozoval hutní průmysl zpracovávající železnou rudu. V menší míře zde byla zpracovávána i ruda rtuti, a to zejména cinabarit (HgS). Železná ruda byla těžena také na Příbramsku a Rožmitálsku. Významnou imisní zátěž pro CHKO Brdy představoval především hutní průmysl na Příbramsku, kde byly zpracovávány rudy olova a stříbra, též doprovázené přítomností rtuti. Koncentrace Hg v lesním humusu se na území CHKO Brdy pohybují v rozmezí od 132 do 1408 µg/kg (Navrátil a kol. 2019).

**Tabulka č. 4** – Podíl vzorků (%) s obsahem uvedeného prvku vyšším, než je požadovaná hodnota pro ČR (tzv. preventivní) (lehké a ostatní půdy celkem) (Kubík & Němec 2016)

	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
Jihočeský	9,6	10,7	2,7	0,5	15,9	0,6	2,2	0,5	0,0	2,2	0,2
Jihomoravský	0,4	1,8	1,2	1,4	3,4	4,5	6,5	0,2	0,0	1,3	1,3
Karlovarský	35,5	40,3	10,3	13,2	5,3	9,2	2,1	7,4	13,2	13,2	4,8
Královehradecký	7,3	3,9	10,1	3,1	5,3	0,8	1,7	3,6	1,4	7,0	0,7
Liberecký	14,8	1,2	10,9	0,7	1,2	0,5	1,0	4,9	0,2	7,1	4,6
Moravskoslezský	5,6	0,1	19,0	0,3	0,1	0,0	0,1	2,6	0,3	5,8	5,6
Olomoucký	7,9	0,6	9,2	0,1	2,3	0,8	1,4	3,0	0,4	4,0	0,3
Pardubický	4,1	0,8	2,9	0,2	1,1	0,0	1,1	0,9	0,0	0,8	0,5
Plzeňský	16,3	2,0	14,8	3,3	4,2	1,8	1,0	3,5	2,2	9,4	3,7
Středočeský	12,3	4,1	11,5	0,4	3,8	2,8	2,3	3,8	1,9	5,5	1,7
Ústecký	10,4	8,6	17,5	11,0	4,7	22,0	7,4	9,3	15,3	13,3	2,0
Vysočina	6,2	10,1	5,8	1,1	11,7	0,4	6,5	4,1	0,0	7,1	0,4
Zlínský	0,0	0,6	5,3	0,5	5,1	1,6	17,7	0,2	0,0	2,4	2,8

Rtuť se ve značném množství nachází v oblastech nalezišť uhlí. Obecně má Hg velmi silnou afinitu k organické i anorganické uhelné hmotě. Je pozorována její kumulace v rašelinách a lignitech. Bohaté na uhlí s vysokým obsahem rtuti jsou oblasti Donbas-Doněcké pánve (Ukrajina, Rusko), Apalačské pánve a Texasu (USA) (Yudovich & Ketris 2005).

V poslední době se Cu dostává do kultivovaných půd s aplikací hnojiv, kalů a dalšími chemikáliemi určených např. k ochraně rostlin. Aplikace čistírenských kalů obsahujících Cu může být zdrojem kontaminace půd a případně podzemních vod zejména v suchších oblastech. Ve Francii dosahuje Cu v půdě od 100 do 1500 mg/kg. V zemědělské půdě obecně se může měď akumulovat v hodnotách dosahujících až 1170 mg/kg.

Povrchové půdy mají velkou afinitu tento kov akumulovat. V důsledku toho se jeho obsah v půdách zvýšil v některých případech na extrémní hodnotu až 3500 mg/kg, a to vlivem průmyslového znečištění. Nejvyšší naměřená hodnota dosáhla 4500 mg/kg v okolí huti na poloostrově Kola. Znepokojující je také nebezpečný nadbytek Cu v půdách tropických plantáží, využívaných k pěstování kávy, kakaa, citrusů, čaje či oliv. Na starších plantážích byl zaznamenán nárůst koncentrace Cu v částech rostlin určených ke spotřebě. Jako příklad lze uvést koncentrace Cu v čajových lístcích. Čajové lístky pocházející z Keni obsahovaly do 80 mg/kg Cu a z Japonska do 20 mg/kg. Až 30 % Cu zde obsažených lze snadno extrahovat horkou vodou. Zvýšené koncentrace Cu v půdách ovlivňují také růst a vývoj rostlin. Může docházet k pomalému růstu rostliny, zpomalení klíčení semen a vývoji semenáčků či kořenů (Kabata-Pendias 2010).

V Japonsku byly naměřeny také vysoké koncentrace olova, stejně jako v Anglii, Walesu, Polsku a Irsku, a to nad 100 mg/kg. Hodnoty naměřené v Norsku se liší v závislosti na geografické poloze. Na jihu Norska se koncentrace Pb pohybovala okolo

111,3 mg/kg, zatímco na severu tato hodnota dosahovala 8,5 mg/kg. Tento fenomén pravděpodobně zapříčiněný transportem znečištění atmosférou z jiných částí Evropy.

Významně kontaminované půdy olovem se dále vyskytují v Austrálii. Konkrétně nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v australském městě Port Pirie, kde střední hodnota tohoto kovu dosahovala 437 mg/kg. Téměř poloviční hodnoty byly naměřeny v Novém jižním Walesu, a to 256 mg/kg. Naopak nejnižší koncentrace 4,7 mg/kg byla zjištěna ve městě Perth (Markus & McBratney 2001).

Co se světového znečištění kadmíem týče, podstatným zdrojem emisí je průmysl. Konkrétně se jedná o výrobu kovových Cd galvanických desek používaných v nikl-kadmiových bateriích. V relativně velké míře přispívá ke kontaminaci i závlaha zemědělské půdy odpadními vodami, a to především v Číně. Zde plocha kontaminovaná kadmíem dosáhla výměry 27,86 x 104 km<sup>2</sup>. Mezi další zdroje vstupů kadmia do půdy patří fosfátová hnojiva, která obsahují Cd v rozmezí od 0,1 až do 120 mg.

V čistírenských kalech, které se v odvětví zemědělství používají jako hnojivo, koncentrace kadmia může dosahovat okolo 3,4 mg/kg. V případě použití takového kalu by se při ekvivalentní dávce N 250 kg/ha přidalo do půdy 19 g Cd ha/rok.

Nejvyšší koncentrace kadmia v půdě byly naměřeny ve Francii (16,7 mg/kg), dále v Belgii (7,61 mg/kg) a Číně (7,43 mg/kg) (Khan a kol. 2017).

## 4.2 Legislativní limity

V následujících tabulkách jsou uvedeny indikační hodnoty rizikových prvků v půdě dle přílohy č. 2 k Vyhlášce č. 153/2016 Sb.

**Tabulka č.5** – Indikační hodnoty obsahů rizikových prvků v půdě, při jejichž překročení může být ohrožena zdravotní nezávadnost potravin a krmiv (mg/kg sušiny)

Rizikový prvek	Půdní druh	pH/CaCl <sub>2</sub>	Indikační hodnota	
			extrakce lučavkou královskou	extrakce NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
As	-	-	40	1,00
Cd	Běžné půdy	≤6,5	1,5	-
		> 6,5	2,0	0,1
	Lehké půdy	> 6,5	2,0	0,04
Ni	-	≤ 6,5	150	-
	-	> 6,5	200	-
	-	-	-	1,0
Pb	-	-	300	1,5
Hg	-	-	1,5	-

**Tabulka č.6** – Indikační hodnoty obsahů rizikových prvků v půdě, při jejichž překročení může vzniknout podezření z ohrožení růstu rostlin a produkční funkce půdy (mg/kg sušiny)

Rizikový prvek	pH/CaCl <sub>2</sub>	Indikační hodnota	
		extrakce lučavkou královskou	extrakce NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
Zn	-	400	-
	-	-	20
Ni	≤ 6,5	150	-
	> 6,5	200	-
	-	-	1,0
Cu	< 5,0	150	-
	5,0-6,5	200	-
	> 6,5	300	-
	-	-	1,0

**Tabulka č.7** – Indikační hodnoty obsahů rizikových prvků v půdě, při jejichž překročení může být ohroženo zdraví lidí a zvířat (mg/kg sušiny)

Rizikový prvek	Indikační hodnota (extrakce lučavkou královskou)
As	40
Cd	20
Pb	400
Hg	20

## 5 Remediacce půd kontaminovaných rizikovými prvky

Remediacce je obecně chápána jako proces nápravy. Remediacce životního prostředí se soustředí nejen na odstraňování polutantů zejména z půd, sedimentů, povrchových a podzemních vod, ale i například odpadních organických materiálů. Obecně se uplatňují dva způsoby realizace, a to *ex-situ*, kdy je kontaminovaný materiál odebrán a *in-situ*, kdy se remediační technologie aplikují přímo v místě kontaminace. Pro remediaci se využívají fyzikálně-chemické a biologické metody. V posledních letech se stále více používají metody biologické (bioremediace), jelikož jsou považovány za šetrnější k životnímu prostředí (Kizek 2007).

Mezi fyzikálně-chemické remediační technologie patří:

- Promývání půdy silnými kyselinami nebo chelatačními činidly – hlavním principem je selekce vysoce kontaminovaných jemných částic od pevné a kapalné fáze půdní suspenze. Ostatní jemné částice jsou dále čištěny pomocí flotace, vyluhováním nebo magnetickou separací.

- Zapouzdření – princip zapouzdření kontaminovaných ploch spočívá v podzemní výstavbě nepromokavých vertikálních bariér. Běžně se tato technologie používá pro prevenci kontaminace (Brandl 2005).
- Elektrokinetické techniky – používá se především pro jemnozrnné půdy. Do půdy se umístí elektrody, kterými prochází stejnosměrný proud. V důsledku stejnosměrného proudění je vyvolán pohyb iontů směrem k elektrodě.
- Vitifikace – tato technologie spočívá v imobilizaci anorganických polutantů za použití elektrod pro roztavení zeminy při teplotě 1600–2000 °C.
- Propustné reaktivní bariéry – principem je vybudování propustné podpovrchové bariéry tvořené reaktivním materiálem a umístěné do ohniska kontaminace ve směru proudění podzemní vody. Podzemní voda touto bariérou protéká bez omezení a zároveň probíhá transformace kontaminujících látek na neškodné nebo méně škodlivé formy (Jiríček a kol. 2007).
- Vysrážení – spočívá v reakci rozpuštěných iontových kovů s přidanými srážecími činidly (digestáty, hydroxid vápenatý, soli hliníku) za vzniku nerozpustných sloučenin.
- Iontová výměna – principem je pryskyřice, která nese rozpustné ionty. Tyto ionty mohou být následně vyměněny za ionty těžkých kovů.
- Flokulace – tato technologie se využívá pro přeměnu koloidních částic do forem, které mohou být mechanicky oddělené z roztoku supernatantu s pomocí vločkovacích činidel, tj. flokulantů.
- Solidifikace/stabilizace – tato technologie využívá solidifikačních/stabilizačních činidel pro snížení mobility kontaminujících látek. Tato činidla jsou injektována přímo do půdy (Bradl 2005) a jiné.

U biologické remediační technologie se v případě využití živých organismů jedná o bioremediaci. Pro tyto metody se využívají mikroorganismy (plísňe, bakterie, kvasinky, bezobratlí atd.) nebo i vyšší organismy, kterými jsou zejména rostliny. V případě rostlin se pak jedná o fytoremediaci.

Bioremediační technologie jsou uplatňovány především při odstraňování organických sloučenin z odpadních vod. Některé technologie jsou vhodné i k sanaci půdy.

Mezi *ex-situ* bioremediační metody patří metoda land farming, kompostování a bioreaktory. V případě *in-situ* se jedná o bioventing, biofiltry, a biologické odstraňování kovů kam spadá biosorpce, bioakumulace, redukce a oxidace kovů či precipitace (Horáková 2006).

Výhodou fyzikálních a chemických remediačních metod je především rychlost a efektivita v odstranění kontaminantů z prostředí. Tyto metody mají ovšem také své nevýhody. Co se fyzikálních technologií týče často je zapotřebí půdní prostředí mechanicky méně či více narušit. Vzniká tak riziko rozšíření kontaminantů ať už způsobené zbytkovým množstvím kontaminované půdy po jejím odtěžení či samotnou manipulací s ní. V případě chemických technologií mohou být do půdy vneseny nežádoucí chemické látky. Obecně jsou tyto remediační technologie oproti bioremediačním nákladnější. Bioremediační metody jsou svými technologickými postupy k životnímu prostředí šetrné. Za nevýhodu lze také považovat časová náročnost probíhajících přirozených procesů (Sharma a kol. 2020).

## 5.1 Bioremediace

Bioremediace je relativně nová technika, která využívá přirozené biologické procesy k úplnému odstranění rizikových prvků z prostředí. Bioremediace pomocí hub, řas nebo bakterií jsou považované za nejúčinnější z metod odstraňování rizikových prvků, zejména pro využití přirozených procesů.

Schopnost mikroorganismů využívat nežádoucí organické látky jako zdroj uhlíku a energie se mezi jednotlivými druhy liší. Ne každý mikroorganismus lze k biodegradaci využít. Na rozkladných procesech se tedy podílejí spíše mikrobiální společenstva. Rychlost biodegradace či biotransformace závisí na množství přítomných mikroorganismů a je ovlivňována především teplotou, přítomností kyslíku, světlem, pH a množstvím dostupných živin. Důležitým faktorem je také charakter kontaminující látky, její struktura či biodegradabilita. Biodegradaci lze využít např. v procesech čištění a dočišťování odpadních a podzemních vod, kde dochází biochemickému rozkladu organických látek. Zatímco biotransformaci lze využít k dekontaminaci půdního prostředí.

Bioremediaci lze definovat jako jakýkoliv proces, v němž jsou toxické a rizikové látky přeměňovány na látky neškodné pro životní prostředí působením živých organismů či enzymů. Proces bioremediace spočívá v urychlení přirozených procesů dekontaminace či v řízené biotransformaci. V půdním či vodním prostředí se bioremediace uskutečňuje dvěma základními metodami (Kensa 2011).

První z nich je biostimulace živinami. Tato metoda urychluje probíhající degradační procesy uskutečňované přirozeně se vyskytující mikroflórou dodáváním živin jako je dusík či fosfor, čímž je podporován její růst. Lze také do prostředí dodat vhodné enzymy či růstové faktory.

Druhou metodou je metoda seeding. Tato metoda spočívá v obohacení kontaminovaného prostředí vhodným mikroorganismem (bioaugmentace), u něhož známe jeho degradační potenciál. S mikroorganismy není nutné zároveň aplikovat také potřebné živiny či růstové faktory. Mikroorganismy uplatňující se v této metodě jsou mnohem častěji izolovány z přirozeného prostředí než z kultur uměle vypěstovaných. Metoda seeding je vhodná v situacích, kdy kontaminované prostředí neobsahuje vhodnou mikroflóru nebo je díky jeho vysoké toxicitě sterilní. V takovém případě je zapotřebí do prostředí tyto mikroorganismy dodat. Před aplikací je však nutné upravit prostředí tak, aby byla životaschopnost vnášené populace co nejvíce zachována (Horáková 2006).

Odstraňování rizikových látek může být prováděno přímo v místě kontaminace. Jedná se pak o technologii „*in situ*“. Tato technologie nevyžaduje odtěžení půdy či odčerpání spodních vod na povrch s čímž jsou spojeny také relativně nízké náklady. Vzhledem k riziku šíření kontaminace dále do prostředí je průběh biotransformace těžko kontrolovatelný. Další uplatňovaná technologie je tzv. „*ex situ*“. Bioremediační technologie je aplikována na odtěžený kontaminovaný materiál v místě vzdáleném od původní lokality. Manipulace s odtěženým materiálem zvyšuje potřebné náklady, proces biotransformace je však pod kontrolou a snižuje se riziko další kontaminace prostředí (Matějů 2006).

### 5.1.1 Fytoremediace

Fytoremediace je proces při kterém jsou rostliny využívány k odstranění nežádoucích či toxických látek z životního prostředí. V jakém množství či formě rostlina rizikové prvky přijímá záleží především na jejím druhu. Mnohé studie prokázaly variabilitu příjmu také mezi genotypy jednotlivých druhů. Na druzích rostlin a jejich genotypech závisí také to, v jakých částech rostliny budou rizikové prvky akumulovány. Rostliny je ukládají buď v podzemních částech, tedy kořenech, či v nadzemních, konkrétně v listech. Některé druhy rostlin rizikové prvky přijmou a pouze je uloží ve svých tkáních, jiné jsou schopny tyto prvky přetransformovat v méně toxickou formu (Schwartz a kol. 2001).

Způsob, jakým rostliny reagují na stres podmíněný nedostatkem nebo přebytkem stopových prvků tedy nelze jednoznačně popsat. Rostliny si v průběhu evoluce vyvinuly takové biochemické mechanismy, které vedly k adaptaci na chemicky nevyvážené prostředí či k jeho toleranci. K popsání reakce rostliny na různé koncentrace stopových prvků v půdě je tudíž zapotřebí zkoumat vždy konkrétní systém půda-rostlina.

Rostliny, které se v poslední době ukázaly jako vhodné pro účely fytoremediace jsou svízel přítula (*Galium aparine* L.), lopuch plstnatý (*Arctium tomentosum* Mill.) a rozrazil rolní (*Veronica arvensis* L.) pro své schopnosti významně akumulovat arsen a řebříček obecný (*Achillea millefolium* L.), pcháč rolní (*Cirsium arvense* L.) či smetánka lékařská (*Taraxacum officinale* L.) v případě kadmia. Schopnost akumulovat i vyšší množství některých kovů (Cu, Cd, Cr, Ni a Zn) vykazuje několik druhů zemědělských plodin jako např. hořčice bílá (*Synapis alba* L.), ředkev setá (*Raphanus sativus* L.), řepka olejka (*Brassica napus* L.) či rod *Amaranthus* (Králůva a kol. 2010).

Rostliny schopné akumulovat těžké kovy v nadlimitním množství bez známek toxicity se nazývají hyperakumulátory. Jedná se především o populace druhů vyskytujících se na půdách bohatých na těžké kovy ať už v důsledku geochemických parametrů nebo znečištění. Hyperakumulátory tvoří zpravidla menší biomasu, jelikož využijí více energie v mechanismech nezbytných pro přizpůsobení se vysokým koncentracím těžkých kovů ve svých tkáních. Schopnost nadměrné akumulace těžkých kovů poskytuje rostlinám možnost obrany před býložravci či odolnost vůči patogenům.

Mezi zjištěné druhy hyperakumulujících rostlin patří řeřišničík Hallerův (*Arabidopsis halleri* L.), penízek modravý (*Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl), tařínka (*Alyssum lesbiacum* P. Candargy Rech. f.) či tabák (*Nicotiana tabacum* L.) (Verbruggen 2009).

Aby byla rostlina považována za hyperakumulátory měly by být koncentrace (v mg/kg) jednotlivých prvků v listech následující:

>100 – Cd

>1000 – Co, Cu, Pb, Ni

>10 000 – Zn, Mn

Podobných koncentrací mohou rostliny dosahovat i v případě, že se nejedná o hyperakumulátory. Může tomu tak být ve znečištěných oblastech.

Jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících biologickou dostupnost rizikových prvků je jejich vazba na půdní složky. Obecně jsou pro rostliny snadněji absorbovatelné stopové prvky rozpuštěné v půdním roztoce v iontové či chelátové formě. Absorpce stopových prvků rostlinami je zajištěna především metabolickými procesy v kořenech. Lze rozlišit



absorpci pasivní a aktivní (metabolickou). Pasivní příjem probíhá difúzí iontů z vnějšího roztoku do kořenové epidermis. Aktivní příjem vyžaduje metabolickou energii a probíhá proti chemickému gradientu. Mechanismus příjmu závisí na daném prvku. Pasivně přijímány jsou především Pb a Ni, zatímco aktivně jsou přijímány zejména Cu, Mo či Zn. Mezi mechanismy příjmu stopových prvků v kořenech patří např. kationtová výměna, transport uvnitř buněk kořenu pomocí chelatačních činidel či jiných nosičů. Významnou roli v procesu rozpouštění či komplexaci stopových prvků do mobilních a dostupnějších forem hrají nízkomolekulární organické kyseliny (např. šťavelová, octová, vinná, fumarová) vylučované kořenovými exsudáty či houbami. Kořenové exsudáty se skládají převážně z aminokyselin (např. asparagová, glutamová či prolinová). Předpokládá se, že hlavními ligandy vytvářející komplexy s kovy v rostlinách jsou právě proteiny (Kabata-Pendias 2010).

Nezanedbatelnou součástí absorpce stopových prvků rostlinami, je příjem těchto prvků skrze listy. Tento mechanismus příjmu má praktický význam při aplikaci hnojiv na listy, a to zejména Fe, Mn, Zn či Cu. Příjem listy se obecně skládá ze dvou fází. Prvním procesem je nemetabolická kutikulární penetrace považovaná za hlavní cestu příjmu a metabolické procesy odpovědné za akumulaci stopových prvků proti koncentračnímu gradientu. Ve druhé fázi dochází k transportu iontů přes plazmatickou membránu až do buněčného protoplastu. Stopové prvky přijímané skrze listy mohou být translokovány i do jiných rostlinných tkání, včetně kořenů, kde dochází k uložení přebytečných kovů.

Některé rizikové prvky mohou být do určité koncentrace a v určité formě pro rostlinu základními mikroelementy. Je tomu tak např. u mědi, železa, manganu či zinku. Rostlina je vyžaduje pouze v malém množství, avšak jejich nedostatek může vést ke zpomalení růstu, deformaci listů či až k zahynutí rostliny. Podle dostupnosti jednotlivých prvků z půdy lze vymezit tři skupiny. Snadno dostupnými prvky jsou Cd, Ni, Zn, Ar, Se, Cu. Středně dostupné jsou Mn a Fe. Těžko dostupné jsou Pb a Cr. Pro odstranění např. olova, je zapotřebí nejprve zvýšit jeho dostupnost pro rostlinu. Lze toho docílit přidáním chelatačního činidla do půdy (Schutzenhubel 2002).

Při procesu chelatace se organické sloučeniny pomocí dvou a více vazeb váží na kovové kationty (Fe, Cu). Tyto organické sloučeniny se nazývají chelatační činidla.

Některé kovy jsou v chelátové formě pro rostliny snadno dostupné. Vysoká koncentrace chelátů však může vést až k remobilizaci kovů ze sedimentů či vodonosné vrstvy, čímž je vystavena riziku kontaminace podzemní a pitná voda. Problémem také je, že většina chelatačních činidel (např. EDTA - ethylendiaminotetraoctová kyselina či fosfonáty) není nebo je, ale nespolehlivě, biologicky odbouratelná. Spíše jsou to látky v prostředí perzistentní (Nowack 2005).

Využití chelatačních činidel může být efektivní, ale v rámci fytořemediace existují vhodnější sanační alternativy, kterými jsou rhizofiltrace, fytoakumulace, fytoexkrece, fytostabilizace či fytovolatilizace. V případě mírně kontaminovaných půd jsou rostliny schopné fytoakumulace, což je proces, při kterém rostlina ukládá těžké kovy ve svých tkáních. V případě kovů, které již byly absorbovány kořeny, mohou být rostlinou následně vylučovány, a to buď fytoexkrecí či fytovolatilizací, pokud se pouze akumulují jedná se o fytoextrakci. Fytovolatilizace je proces, při kterém rostliny poutají těžké formy těžkých kovů z půdy a následně je skrze listy uvolňují do ovzduší. Rostliny jsou

schopné takto poutat těkavé formy např. arsenu, rtuti nebo selenu. Při využití této metody je nutno zajistit opatření zamezující nežádoucímu rozptylu těchto látek do ovzduší. V případě fytoexkrece jsou skrze listy či sekrečními žlázami vylučovány netěkavé formy rizikových prvků.

Na lokalitách více kontaminovaných půd s vyššími koncentracemi rizikových prvků rostliny přestávají transportovat tyto toxické látky do nadzemních částí. Místo toho jsou rizikové prvky vázány v kořenech či rhizosféře. Tato strategie je označována pojmem fytostabilizace.

Fytostabilizace je proces, při kterém rostlina imobilizuje kovové ionty prostřednictvím absorpce a akumulace kořeny či srážením uvnitř kořenové zóny. Fytostabilizace se tedy dá považovat za mechanickou stabilizaci znečištěné půdy, aby se zabránilo vyplavování rizikových prvků do půdy či jejich úniku do ovzduší. Základní mechanismus závisí na mnoha faktorech, jako je přítomnost mikroorganismů v rhizosféře, chelatace kovů, kořenové exsudáty, vazba kovových iontů na buněčnou stěnu či jejich sekvence do vakuol. Imobilizace kovů je možná také za pomoci redoxních přeměn (např. redukce  $\text{Cr}^{+VI}$  na  $\text{Cr}^{+III}$ ) či transformace prvků v nerozpustnou formu (Shackira 2019).

Poslední často využívanou metodou je fytodegradace, resp. fytotransformace. Při procesu fytodegradace jsou rostliny schopné pomocí metabolických reakcí toxické organické látky rozložit na látky netoxické. Touto metodou lze rozložit např. PAU (polycyklické aromatické uhlovodíky), ropné látky, chlorované látky (např. PCB), nitrolátky či detergenty. Anorganické látky tímto způsobem rozložit nelze (EPA 2000).

### 5.1.2 Bioremediace pomocí bakterií

V případě bakteriální remediace je vzhledem k variabilitě kontaminovaného prostředí zapotřebí pečlivě zvážit výběr vhodného bakteriálního společenstva. Nedávné studie ukazují, že v tomto směru mají velký potenciál bakterie kmene *Actinobacteria*. Tyto mikroorganismy prosperují jak v terestrickém prostředí, tak v prostředí vodním. Zároveň jsou schopné vytvářet populace i v extrémních podmínkách. Jsou přirozenými degradátory a významně přispívají k detoxikaci těžkých kovů a degradaci uhlovodíků či pesticidů v ekosystémech. Aktinobakterie jsou vhodné pro účely bioremediace také díky sekreci široké škály sekundárních metabolitů, včetně katalytických enzymů. Dále byly v přítomnosti kontaminujících látek prokázány buněčné reakce jako je produkce sideroforů či syntéza extracelulárních polymerních látek (EPS). Siderofory jsou látky umožňující chelataci těžkých kovů. EPS (exopolysacharidy) jsou molekuly, které se skládají z polysacharidů, jež jsou mikroorganismy akumulovány na jejich horním povrchu, jako slizovitá polysacharidová matrice, za účelem jejich obrany před stresujícími aspekty jako jsou teplota, vlhkost, chemické či toxické látky. Jsou tvořeny funkčními skupinami, postranními řetězci acetátu, sukcinátu, fosfátu a pyruvátu, které se považují za nesacharidové složky. EPS mohou těžké kovy vázat. U funkčních skupin biopolymerů převažuje záporný náboj a schopnost vazby kov-exopolymer závisí na pH (Behera a kol. 2023).

Další ze studií poukazuje na účinné odstranění kontaminujících látek ze zemědělské půdy pomocí rostlin podporujících růst bakterií kmene *Rhizobium* v kombinaci se zelenými posklizňovými zbytky (zelené odpady). Zelený odpad je bohatým zdrojem přirozeně se vyskytujících polyfenolů. Polyfenoly v přítomnosti znečišťujících látek mohou provádět chelataci kovů, jejich redukci či adsorpci. Zástupci rodu *Rhizobium*, díky své schopnosti provádět eliminaci těžkých kovů různými mechanismy, jsou dobrými bioremediačními činidly. Mezi základní mechanismy, které *Rhizobia* využívají při eliminaci kontaminujících látek, patří včetně biologické fixace dusíku také produkce sideroforů schopných chelatace kovů. Stejně jako *Actinobacteria* jsou i zástupci rodu *Rhizobium* schopné vylučovat EPS. Tyto mechanismy následně usnadňují rostlinám kontaminující látky z půdy odebírat skrze kořenový systém (Kumar a kol. 2023).

Jedním z mechanismů, které si některé druhy mikroorganismů osvojily, je také syntéza 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deaminázy (ACC-deamináza). Různé studie prokazují, že ACC-deaminázová aktivita mikroorganismů může přispívat k ochraně rostlin před toxickými látkami. Jeden ze zástupců mikroorganismů produkujících tento enzym je *Kluyvera ascorbata*, rhizobakterie, která údajně chrání rostliny řepky a rajčete před toxicitou NiCl<sub>2</sub>, a to tím, že zastaví stimulaci ethylenu, čímž zároveň podporuje jejich růst. Tato mikrobiální aktivita byla zaznamenána také u bakterií rodu *Burkholderia*.

Další z bakterií mající potenciál k využití v bioremediačních metodách je rod *Pseudomonas*. Zástupce *Pseudomonas putida* v rostlině tabáku vykazovala účinnou absorpci niklu z půd kontaminovaných niklem, jež vedla k potenciálnímu růstu a vývoji rostlin (Onofre-Lemus a kol. 2009).

V neposlední řadě je významná část mikroorganismů schopna kromě syntézy ACC-deaminázy, EPS či sideroforů produkovat povrchově aktivní látky tzv. biosurfaktanty. Surfaktanty obecně jsou látky tvořené polární a nepolární částí. Díky tomuto charakteru dokáží snížit povrchové napětí na fázových rozhraních. Využívají se v jakémkoliv procesu čištění (mýdla, prací prostředky) nebo je lze využít v enviromentálních aplikacích na bázi sanačního promývání. Existuje mnoho synteticky vyráběných surfaktantů, které jsou však mnohdy perzistentní a toxické pro životní prostředí. Biosurfaktanty produkované mikroorganismy pro životní prostředí nepředstavují hrozbu a jejich technické vlastnosti jsou srovnatelné s většinou surfaktantů synteticky vyráběných. Principem je snížení povrchového napětí a tím snadnější překonání této bariéry. Účelem je porušení nepolární fáze a její převedení do rozpustné podoby ve formě tzv. micely. Micela vzniká v momentě, kdy je určitý počet povrchově aktivních molekul seskupeno do konzistentního útvaru s nepolárním jádrem. Nepolární jádro může pojmout částici hydrofobní látky, tedy i polutantu. Mezi biosurfaktanty se řadí široké spektrum látek převážně lipidové povahy. Konkrétními zástupci a jejich producenty jsou rhamnolipidy (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*), trehalolipidy (*Mycobacterium sp.*, *Arthrobacter paraffineus*, *Corynebacterium sp.*), sophorolipidy (*Candida apicola*, *Candida bombicola*), polyollipidy (*Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula graminus*) či glykolipidy (*Alcanivorax borkumensis*, *Arthrobacter sp.*) (Mulligan 2005; Šír a kol. 2015).

### 5.1.3 Mykoremediace

Mykoremediace je odvětví bioremediace, kdy jsou k extrakci potenciálně toxických stopových prvků (PTE) z prostředí využívány makroplísňe (houby). Houby produkují řadu extracelulárních enzymů, které štěpí organické látky, zejména polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), polychlorované bifenylly (PCB), pesticidy, barviva, ropné uhlovodíky a další jednodušší sloučeniny.

Schopnost hub extrahovat rizikové prvky z prostředí závisí na zejména pH, typu substrátu, stáří mycelia či typu enzymu. Pro vyjádření schopnosti extrakce PTE se využívá bioakumulačního faktoru (BAF). Tento faktor lze vyjádřit jako poměr prvku v plodnici houby k jeho koncentraci v půdě. Vyšší hodnoty BAF Cd (4,34), Pb (2,75), Cu (9) a Hg (95) byly hlášeny např. u zástupců *Amanita muscaria*, *Hypholoma fasciculare*, *Russula foetens*, and *Boletus pinophilus*. Bioakumulační faktor je směrodatný v rozhodování, zda jsou konkrétní druhy hub k bioremediaci vhodné či nikoli. Aby mohl být určitý druh houby považován za hyperakumulující, měla by koncentrace těžkého kovu být zhruba 100krát vyšší než u neakumulujících druhů hub.

Těžké kovy jako je kadmium (Cd), olovo (Pb), rtuť (Hg), chrom (Cr), měď (Cu), zinek (Zn) a železo (Fe) byly účinně extrahovány také pomocí zástupců *Phellinus badius*, *Amanita spissa*, *Lactarius piperatus*, *Suillus grevillei*, *Agaricus bisporous*, *Tricholoma terreum* a *Fomes fomentarius* (Amjad a kol. 2017).

Proces mykoremediace závisí především na myceliu. Mycelium vylučuje extracelulární enzymy a kyseliny, které rozkládají lignin a celulózu. Mezi významné extracelulární enzymy patří skupina hydrolytických enzymů, které štěpí chemické vazby polymerních sloučenin pomocí molekul vody. Vznikají tak menší molekuly, které mohou být myceliem absorbovány. Látky, které nejsou houbou využity, mohou být zabudovány do plodnic. Tímto způsobem jsou zabudovávány biologicky dostupné formy rtuti, a to zejména u zástupců *Panellus stipticus*, *Psilocybe cubensis*, *Schizophyllum commune* či *Stropharia rugosoannulata*. Nejvyšší bioakumulační faktor vykazuje *Psilocybe cubensis*. Při koncentraci 1,25 mg/l Hg v půdě dosahuje hodnota BAF 3. Pro srovnání se hodnota BAF u *Stropharia rugosoannulata* pohybuje kolem 1,96 (Gabriel a kol, 2016).

Zástupci *Hebeloma crustuliniforme* nebo *Beuveria caledonica* jsou schopné exkrece citrátu a oxalátu. Citrát a oxalát představují velmi silné komplexotvorné ligandy. V přítomnosti oxalátu dochází k mobilizaci pouze takových kovů, se kterými je schopný vytvářet rozpustné sloučeniny. V přítomnosti pyromorfitů ( $Pb_5(PO_4)_3$ ) byla *B. caledonica* schopna vyprodukovat až 0,8 mmol/dm<sup>3</sup> oxalátu, čímž se výrazně zvýšila mobilita olova.

Kromě oxalátu či citrátu jsou hyfy řady dalších hub schopné produkovat i jiné exudáty. Např. siderofory, aminokyseliny či fenolické látky.

Byly popsány biologické aktivity hub vedoucích k imobilizaci iontů těžkých kovů prostřednictvím jejich akumulace ve svých pletivech či biosorpce kovových iontů na biopolymery buněčných stěn hyf.

Je známo, že pH půdy reguluje ionizaci na pH závislých iontových výměnných míst na organické hmotě a jílových minerálech s oxidy kovů. Tím pH ovlivňuje dostupnost kovů. S klesajícím pH roste ionizace. Přítomnost anorganických sloučenin jako jsou jíly, oxidy železa a manganu, síran vápenatý či uhličitán vápenatý v růstových substrátech pečárky

dvouvýtrusé (*Agaricus bisporus*) může vyvolat adsorpci a precipitaci kovů. Zároveň byl v houbovém substrátu zaznamenán vysoký obsah karboxylových kyselin, které mohou zvýšit kapacitu iontové výměny a podpořit tvorbu kovových komplexů. Tento mechanismus se osvědčil zejména při snaze o zvýšení biologické dostupnosti olova.

Mezi vhodné zástupce patří také hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*). Poukazuje na to také fakt, že její bioakumulační faktor je vyšší než 1. Hlíva ústříčná prokazuje významnou schopnost zvýšit biologickou dostupnost Pb již v raném stádiu její aplikace. Avšak při vysokých koncentracích jsou těžké kovy pro ligninolytické houby toxické, čímž je negativně ovlivněn jejich růst a produkce extracelulárních enzymů. Nicméně záleží na konkrétním kovu, druhu houby a podmínkách prostředí (Mandal & Das 2018).

Vzhledem ke strukturální podobnosti mezi ligninem a některými organickými kontaminanty se běžně ligninolytické houby, a také *A. bisporus*, používají i při odstraňování perzistentních organických polutantů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, fenolové sloučeniny či organochlorové pesticidy. Také kvůli vylučování velkého množství extracelulárních enzymů vykazují *P. ostreatus* a *A. bisporus* velký potenciál při remediaci kontaminovaných půd (Hildago a kol. 2023).

U multicelulárních hub se vyskytují intracelulární ligandy schopné inaktivovat toxické ionty kovů. Jedná především o metalothioneiny a glutathion (GSH). Volný kov nebo vázaný na GSH může být následně transportován do buněčných vakuol, kde je sekvestrován. GSH zároveň přispívá k eliminaci volných kyslíkových radikálů vznikající působením těžkých kovů.

U řady hub je imobilizace těžkých kovů založena na tvorbě nerozpustných oxalátů za vzniku sekundárních minerálů. Mnohé druhy hub jsou schopné imobilizovat těžké kovy díky redoxním reakcím. Jsou schopny např. redukovat  $\text{Hg}^{\text{II}+}$  na méně toxickou těkavou  $\text{Hg}^0$  nebo  $\text{Cr}^{\text{VI}+}$  na méně rozpustný  $\text{Cr}^{\text{III}+}$  (Osobová a kol. 2010).

**Tabulka č. 8** – Obsah potenciálně toxických stopových prvků (PTE) v různých druzích hub, které mohou pomoci při mobilizaci/komplexaci a sanaci PTE v půdním systému (Amjad a kol. 2017)

PTE	Druhy hub	Obsah PTE v různých druzích hub (mg/kg)							
		< 0,5	0,5-1	1-2	2-5	5-10	10-20	20-50	> 50
Cd	<i>Agaricus arvensis</i>				+	+	+	+	
	<i>Agaricus bisporous</i>		+		+			+	
	<i>Agaricus campestris</i>				+	+	+	+	
	<i>Agaricus silvicola</i>				+	+	+	+	+
	<i>Amanita muscaria</i>				+	+	+	+	
	<i>Phellinus sanguineus</i>								+ (80)
Pb	<i>Agaricus bisporous</i>		+		+			+	
	<i>Amanita muscaria</i>				+	+	+	+	+ (168)
	<i>Amanita spissa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+ (370)
	<i>Boletus edulis</i>			+	+	+	+	+	+ (300)
	<i>Lepista nuda</i>			+		+	+	+	+ (144)
	<i>Leccinus scabrum</i>			+	+	+	+	+	+ (181)
	<i>Lycoperdon perlatum</i>					+	+	+	+ (223)
Hg	<i>Suillus gravillei</i>	+							+ (52)
	<i>Phellinus badius</i>								+ (61)
	<i>Macrolepiota procera</i>			+	+	+		+	
	<i>Panellus stipticus</i>							+	
	<i>Psilocybe cubensis</i>							+	
	<i>Lactarius piperatus</i>								+ (109)
	<i>Schizophyllum comune</i>						+		
As	<i>Sarcosphaera crassa</i>					+			
Cr	<i>Russula delica</i>	+				+			
	<i>Boletis badius</i>				+				
	<i>Suillus gravillei</i>				+				+ (104)
Cu	<i>Agaricus arvensis</i>							+	
	<i>Boletus edulis</i>					+		+	
	<i>Cantharellus cibarius</i>								+ (53)
	<i>Entoloma sinuatum</i>								+ (64,8)
	<i>Fomes fomentarius</i>								+ (54)
	<i>Paxillus rubicondulus</i>								+ (51)
	<i>Phellinus badius</i>								+ (60)
	<i>Russula delica</i>						+		+ (52,2)
Zn	<i>Agaricus arvensis</i>								+ (85,2)
	<i>Amanita muscaria</i>								+ (86,6)
	<i>Boletus edulis</i>								+ (158)
	<i>Boletus pulverulentus</i>								+ (79)
	<i>Leucoagaricus nymphaeum</i>								+ (96,4)
	<i>Macrolepiota procera</i>								+ (81)
	<i>Nectria cinabarina</i>							+	+ (105)
	<i>Panellus stipticus</i>								+ (156)
	<i>Suillus luteus</i>								+ (150)
	<i>Tricholoma terreum</i>							+	+ (179)

## 5.4 Kombinace fytořemediace a mykoreřmediace

Ve snaze najít co nejefektivnější a šetrné technologie odstraňování rizikových prvků z životního prostředí, se čím dál tím více dostává do povědomí využití právě rostlin a hub. Nejedna studie prokázala, že kombinace vhodných druhů rostlin a hub vedla k výraznému snížení koncentrace těžkých kovů v půdním prostředí než při aplikaci těchto složek zvlášť. Druhy rostlin a hub jsou voleny kromě klimatických podmínek také na základě půdních vlastností jako je pH či kationtová výměnná kapacita (Hildago 2023).

Pro podporu fytořemediace se využívají také arbuskulární mykorhizní houby (AMF). Tyto houby zprostředkovávají interakce mezi rostlinami a kovy. Konkrétně mohou zvýšit fytoextrakci a fytostabilizaci kovů. AMF inhibují zejména olovo, arsen a chrom (Stevenson & Ying 2022).

Na arbuskulární mykorhize se podílejí mikroskopické houby – např. *Glomeromycota*. Tento typ mykorhizy je nejčastější a lze se s ním setkat u většiny druhů cévnatých rostlin. Mycelia těchto hub měří v průměru 3 až 4 pm a rostou nejen okolo kořenů rostlin, ale také prorůstají buňkami svrchní vrstvy až do buněk primární kůry kořene. Houba následně roste pod buněčnou stěnou, kde tvoří tzv. arbuskule. Arbuskule jsou obaleny cytoplasmatickou membránou hostitelské rostliny, což zajišťuje intenzivní výměnu látek. Látky, které jsou v půdě pro rostliny těžko dostupné mohou být zpřístupněny právě pomocí tenkých mycelií hub, které jsou schopné tyto látky transportovat i z nejmenších půdních pórů. Jako příklad lze uvést fosfor, který je přijímán rostlinami ve formě fosfátových iontů. Fosfátové ionty jsou silně vázány na povrchu půdních částic, čímž se stávají pro rostliny nedostupné. Mycelia hub jsou schopna významné množství těchto iontů uvolnit do úzkého prostoru mezi arbuskulí a plazmatickou membránou rostlinné buňky, a tím rostlině umožnit jejich příjem. Dá se předpokládat, že tento mechanismus je využitelný i v případě zvýšení dostupnosti těžkých kovů. Arbuskulární mykorhizu tvoří i většina zemědělských plodin, např. pšenice, kukuřice, slunečnice nebo rýže (Matušková 2021).

Většina hub vylučuje extracelulární enzymy, které podporují solubilizaci. Solubilizací dochází k mobilizaci těžkých kovů, které se tak stávají dostupné pro rostliny. Ve srovnání s rostlinami jsou houby schopné ve svých plodnicích akumulovat vyšší koncentrace Cd, Pb, Hg, Cu, Cr, Mn, Zn, Se, Fe a Ni. Kombinace fytořemediace a mykoreřmediace může být tedy velmi efektivní technologií při dekontaminaci půd (Amjad a kol. 2017).



## 6. Metodika

### 6.1 Popis experimentu

Vegetační nádobový experiment ke zkoumání Fytomykoremediace půdy kontaminované rizikovými prvky po aplikaci kalů z čistíren odpadních od založen v roce 2023 společně s pokusem na degradaci perzistentních organických a emergentních kontaminantů pomocí ligninolytických hub v rámci projektu NUTRISK (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16 019/0000845) z Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání EU.

#### 6.1.1 Charakteristika experimentální půdy

Půda byla odebrána ze zemědělsky využívaného pole nacházejícího se nedaleko města Žamberk v České republice (50° 8' 38.102 N, 16° 30' 51.351 E). Odebraná půda pro následné vegetační pokusy byla připravena smícháním různých dílčích vzorků odebraných z různých částí pole v hloubce 0-20 cm. Tato půda byla vybrána z toho důvodu, že na ní byly v minulosti úspěšně testovány fyto-remediační pokusy zejména organických polutantů. Nesterilizovaná půda byla následně důkladně homogenizována a ponechána vysušeni na vzduchu. Následně byla převedena přes 5 mm nerezové síto k odstranění kamenů a jiných nežádoucích složek.

Textura experimentální půdy byla hlinitopísčítá (pH (CaCl<sub>2</sub>) 5,2). Půda byla následně charakterizována základními fyzikálně-chemickými parametry použitím metod, které jsou uvedeny v publikaci Mercl a kol. (2021). Půda byla následně analyzována ke zjištění požadované hodnoty jednotlivých rizikových prvků.



**Obr. č. 4** – Experimentální půda pro nádobové vegetační pokusy po usušení a homogenizaci



**Tabulka č. 9** – Základní charakteristika experimentální půdy a obsah vybraných rizikových prvků

Sušina %	pH -	EC μS/cm	Cox %	KVK mmol/kg	Půdní typ	Půdní druh
99,1 (±0,3)	5,2 (±0,0)	96 (±0,5)	1,8 (±0,01)	75 (±0,0)	kambizem	písčitohlinitá

Ca mg/kg	K mg/kg	Mg mg/kg	Na mg/kg	P mg/kg	S mg/kg
3252,9 (±265)	5240,1 (±365)	3500,7 (±198)	311,5 (±16)	906,7 (±64)	248,1 (±15)

As mg/kg	Cd mg/kg	Cr mg/kg	Cu mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg	Zn mg/kg
24,1 (±1,4)	0,30 (±0,04)	40,7 (±1,5)	11,0 (±2,3)	13,1 (±1,6)	31,9 (±1,7)	66,0 (±4,8)

\*Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ze dvou měření, uvedená je zde i směrodatná odchylka

### 6.1.2 Charakteristika experimentálního čistírenského kalu

Jako experimentální anaerobně stabilizovaný čistírenský kal byl použit, který byl odebrán z ČOV na území ČR v rámci řešeného projektu Bezpečné využití kalů z ČOV na zemědělské půdě pomocí technologie torefakce (QK1710379) poskytovaného Ministerstvem zemědělství ČR. Tento projekt byl mimo jiné zaměřen na monitorování složení čistírenských kalů. Popis odběru čistírenských kalů byl popsán v publikaci Košnar a kol. (2023).

Kal byl odebrán těsně před založením vegetačního pokusu. Stručně lze uvést, že anaerobně stabilizovaný kal (cca 10 kg čerstvé hmotnosti) byl získán po anaerobní digesti ČOV důkladným promícháním náhodně odebraných dílčích vzorků po jeho zahuštění a odvodnění (n=10) a následným transportem do laboratoře (při teplotě 4 °C). Kal byl v laboratoři důkladně promíchán a z homogenizovaného kalu byly provedeny čtyři replikace pro další charakterizaci kalu a ke zjištění obsahu rizikových prvků (viz. kapitola výsledky).

Pro zachování požadované anonymity provozovatelů ČOV nelze zmínit konkrétní lokalitu ČOV, ze které byl kal odebrán. Nicméně ČOV lze charakterizovat následovně: kapacita čistírny byla více než 100 000 ekvivalentních obyvatel, zatížení 55 %, stabilizace anaerobní, mezofilní teploty stabilizace (35–40 °C), doba zdržení kalu ve vyhřívacím segmentu byla téměř 32 dní, biologická spotřeba kyslíku 99 % a chemická spotřeba kyslíku 93 %.



**Obr. č. 5** – Experimentální čerstvý čistírenský kal

**Tabulka č. 10** – Základní charakteristika experimentálního kalu a obsah rizikových prvků

Sušina %	pH -	EC mS/cm	N %	C %	H %	S %	O %	TOM %	Popeloviny %
37 (±0,0)	6,4 (±0,0)	3049,3 (±28,3)	2,4 (±0,1)	29,2 (±0,3)	4,6 (±0,4)	1,49 (±0,02)	15,6 (±0,06)	53,3 (±0,08)	46,7 (±0,08)

As mg/kg	Cd mg/kg	Cr mg/kg	Cu mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg	Zn mg/kg
9,86 (±0,03)	5,47 (±0,02)	198,4 (±1,7)	547,5 (±4,3)	143,5 (±2,6)	101,1 (±2,5)	2763,4 (±1,8)

\*Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ze dvou měření, uvedena je zde i směrodatná odchylka

### 6.1.3 Charakteristika experimentální rostliny a lignocelulózního substrátu

Experimentální rostlinou byla v této studii kukuřice setá (*Zea mays* L. var. Colisee), zakoupená od firmy KWS OSIVA s.r.o., jelikož na základě předchozích pokusů bylo s kukuřicí dosaženo dobrých výsledků na fytomykoremediace polycyklických aromatických uhlovodíků (Chane a kol. 2024) a syntetických parfémových látek (Chane a kol. 2023). Navíc při pěstování kukuřice je půda běžně hnojena organickými materiály, kterými jsou čistírenské kal.

Jako nosič ligninolytické houby, v tomto případě hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus* Jacq. P. Kumm), byla použita obilná sláma. Houba byla získána a napěstována na katedře Zahradnictví ČZU v Praze.

Charakteristika připraveného houbového substrátu a popis pěstování byl podrobně uveden v předešlých publikovaných pracích (Chane a kol. 2023; Chane a kol. 2024).

Velmi stručně, *P. ostreatus* byla předkultivována při teplotě 24 °C na čtyřech agarových miskách

se sladovým extraktem a glukózou. Předkultivování probíhalo po dobu 2 týdnů, aby bylo získáno čerstvé inokulum obsahující mycelium *P. ostreatus*.

Jako „očkovací směs“ bylo použito pšeničné zrno. Zrno bylo aplikováno v jednolitrových nádobách a sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 2 hodin. Po sterilizaci bylo zrno naočkováno kousky agarového mycelia obsahující *P. ostreatus* a kultivováno při teplotě 24 °C po dobu 2 týdnů.

Následně byl ligninocelulózní substrát (nasekaná obilná sláma) umístěna do 5L nádoby pokryté hliníkovou fólií a sterilizováno v autoklávu (teplota 121 °C; 2 hodiny)

Po inokulaci slámy zrnem obsahujícím *P. ostreatus* byla kultura pěstována po dobu 4 týdnů při teplotě 24 °C, dokud nebyl celý substrát zcela kolonizován (prorostlý) myceliem.



**Obr. č. 6** – Substrát prorostlý myceliem *P. ostreatus* k aplikaci do půdy

#### **6.1.4 Založení experimentu**

Bioremediační experiment na odstranění rizikových prvků z půdy pomocí rostlin kukuřice a ligninolytických substrátů po aplikaci čistírenského kalu byl proveden v následujících variantách, každé ve čtyřech opakováních:

- A) Půda obohacená o čistírenský kal (kontrolní varianta)
- B) Půda obohacená o čistírenský kal s přidavky substrátu obsahující *P. ostreatus* představující mykoremediace rizikových prvků z půdy obohacené čistírenským kalem
- C) Půda obohacená o čistírenský kal s přidavky substrátu obsahující *P. ostreatus* spojená s pěstováním kukuřice představující kombinaci fytořediace a mykoremediace rizikových prvků z půdy obohacené o čistírenský kal

Pro každé ošetření půdy (variantu pokusu) byly 4 kg volně vysušené a homogenizované půdy smíchány s 1 kg čerstvého kalu (při sušině 25 %). Mykoremediační ošetření mělo ještě navíc přídavek 0,2 kg čerstvého substrátu (při sušině 35 %) obsahující příslušnou houbou bílé hniloby. Popsané směsi byly umístěny v 6L plastových nádobách se třemi otvory na dně. Plastová nádoba bez otvorů umístěná pod perforovanou nádobou se substrátem sloužila k zachycení případného výluhu, který byl v případě potřeby navrácen zpět na povrch půdy. Nádoby s připravenými variantami půdních směsí byly osety 8 semeny kukuřice a 2 týdny po vyklíčení byly vybrány čtyři sazenice podobné velikosti, které byly ponechány po zbytek experimentu.

Nasycení půdy vodou bylo 60 % a kontrolované pravidelně gravimetricky po celou dobu experimentu. Varianty pokusu byly v případě potřeby odplevelovány a zalévány demineralizovanou vodou, ve které byly rizikové prvky pod mezí detekce.

Všechny nádoby byly náhodně umístěny ve venkovní zastřešené hale chránící proti dešti.

Vzorky půdy z variant pokusu vznikly důkladnou homogenizací 3 dílčích vzorků z celého půdního profilu v rámci dané nádoby, a to na začátku experimentu (čas = 0 dnů) a na konci experimentu (čas = 120 dní). Vzorky půdy pro analýzu rizikových prvků byly před samotnou analýzou usušeny, homogenizovány, namlety tloučkem a uloženy v mrazáku ve skleněných nádobách s uzávěrem před následnými analýzami.

Rostliny byly sklizeny po 120 dnech experimentu a rozděleny celkovou nadzemní biomasu a kořeny. Kořeny a nadzemní biomasa umyté demineralizovanou vodou byly nakrájeny na menší kousky, usušeny, namlety pomocí laboratorního mlýnku a skladovány v mrazáku ve skleněných nádobách s uzávěrem před následnými analýzami.



**Obr. č. 7** – Vegetační nádobový experiment s kukuřicí pěstované na půdě s přídavky čistírenského kalu a substrátu obsahující *P. ostreatus* v době sklizně



## 6.2 Extrakce – rozklad a stanovení rizikových prvků

Celkové obsahy sledovaných rizikových prvků (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb a Zn) byly stanoveny pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem po mikrovlnné digesci lučavkou královskou zavedenou (rutinní) metodou KAVR ČZU v Praze. Stanovení rtuti nebylo předmětem této práce. Nicméně, v budoucnu se plánují proměřit všechny varianty pokusu v případě, že obsah rtuti bude relevantní (nad mezí detekce).

Vzorky byly přesně naváženy v rozmezí 2-3 mg. Do teflonových kádinek se vzorky bylo přidáno 10 ml lučavky královské. Lučavka královská byla připravena smícháním 25 ml kyseliny dusičné ( $\text{HNO}_3$ ) a 75 ml kyseliny chlorovodíkové ( $\text{HCl}$ ), tj. v poměru 1:3. Z teflonových kádinek byly vzorky převedeny do teflonových vysokotlakých nádob mikrovlnného digesčního systému. Kádinky byly důkladně vypláchnuty demineralizovanou vodou. Vysokotlaké nádoby byly uzavřeny a utaženy pomocí momentového klíče a byl spuštěn přednastavený program rozkladu.

Následně byly nádoby z mikrovlnné digesce vyňaty a ochlazeny na laboratorní teplotu. Po ochlazení byly vzorky převedeny pomocí demineralizované vody do teflonových kádinek a přemístěny do vypařovacího zařízení, aby se lučavka královská částečně vypařila a bylo možné její zředění kvůli riziku poškození následně použitého měřicího zařízení. Po vypaření byly vzorky převedeny do 25ml zkumavek a doplněny demineralizovanou vodou po rysku. Zkumavky s převedenými vzorky byly uzavřeny transparentní fólií.

Převedené vzorky byly umístěny do optického emisního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem v laboratořích KAVR ČZU v Praze, kde byly zjišťovány koncentrace jednotlivých rizikových prvků.

Podobným způsobem byly zjišťovány i koncentrace rizikových prvků v biomase rostlin kukuřice seté. Rozdílný byl způsob rozkladu organické hmoty, při kterém byly oproti půdě použity nízkotlaké nádoby. Mikrovlnný rozklad vzorků biomasy byl proveden v kyvetách, do kterých bylo naváženo 0,5 g rostlinného vzorku. Poté byly vzorky zality 8 ml  $\text{HNO}_3$  (65% v/v) a 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v).



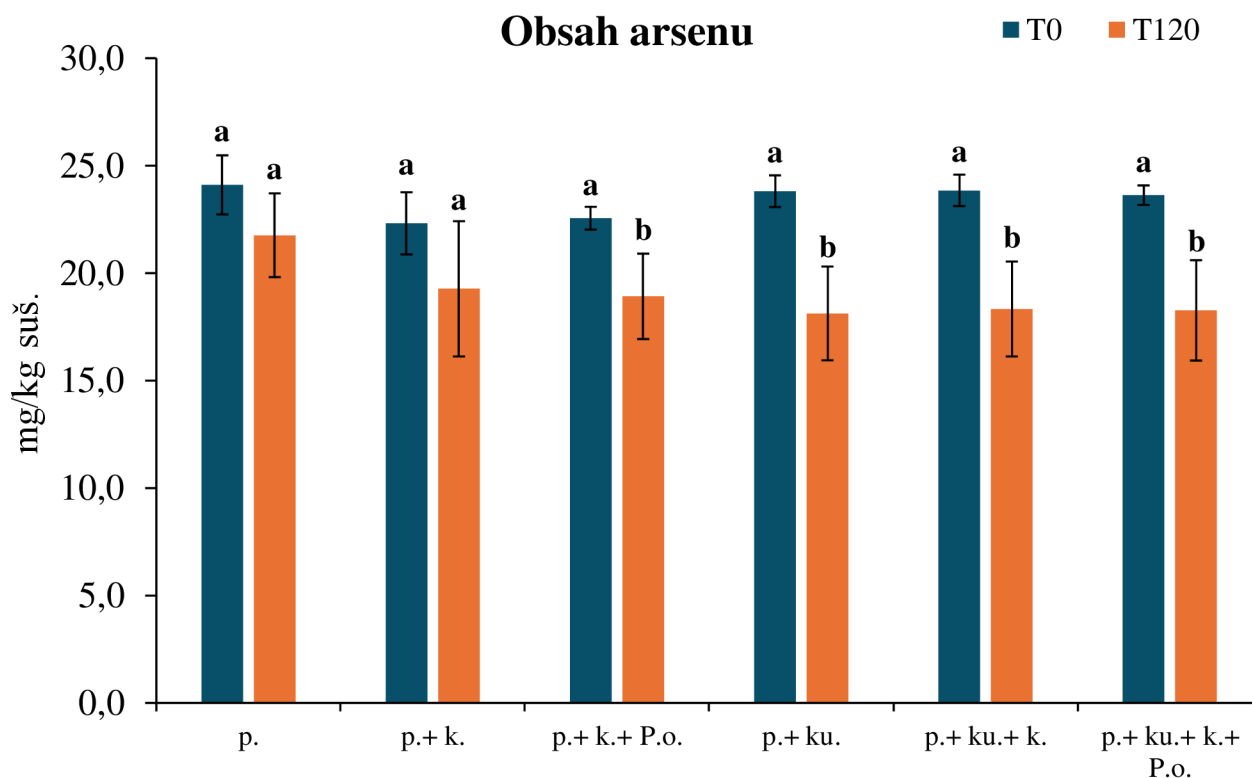
**Obr. č. 8** – Optický emisní spektrometr s indukčně vázanou plazmou (ICP-OES)

### 6.3 Statistické vyhodnocení dat

Uvedené výsledky představují průměry ze čtyř nezávislých měření. Průměry jsou uvedeny se směrodatnými odchylkami. Pro statistické vyhodnocení dat byla data analyzována za účelem ověření normálního rozdělení dat (Shapiro-Wilk test), homogenita byla ověřena také (Levene test). Při nerovnoměrné distribuci dat byla data transformována logaritmováním. Po ověření podmínek pro jednofaktorovou analýzu rozptylu byly jednotlivé varianty porovnávány na  $P < 0.05$ . Rozdíly mezi více než dvěma variantami byly zjištěny Tukeyého testem. Rozdíly mezi dvěma variantami byly ověřeny párovým t-Testem na  $P < 0.05$ .

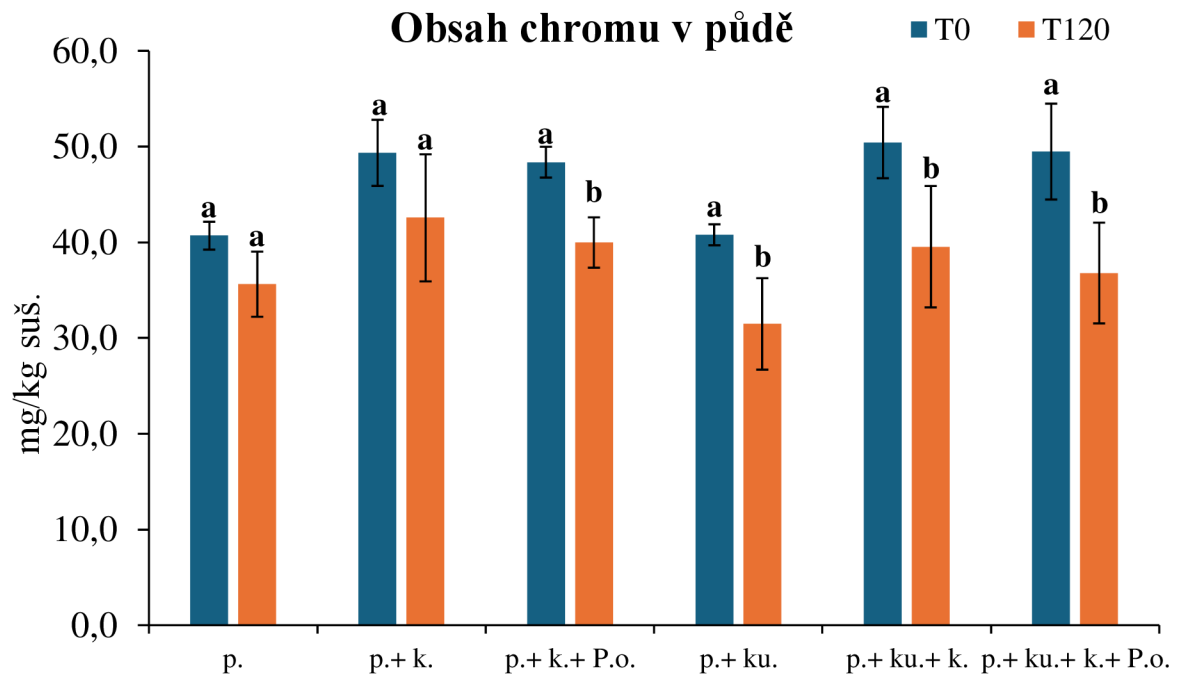
## Výsledky

V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty jako průměr ze čtyř nezávislých měření, uvedená je zde i směrodatná odchylka.



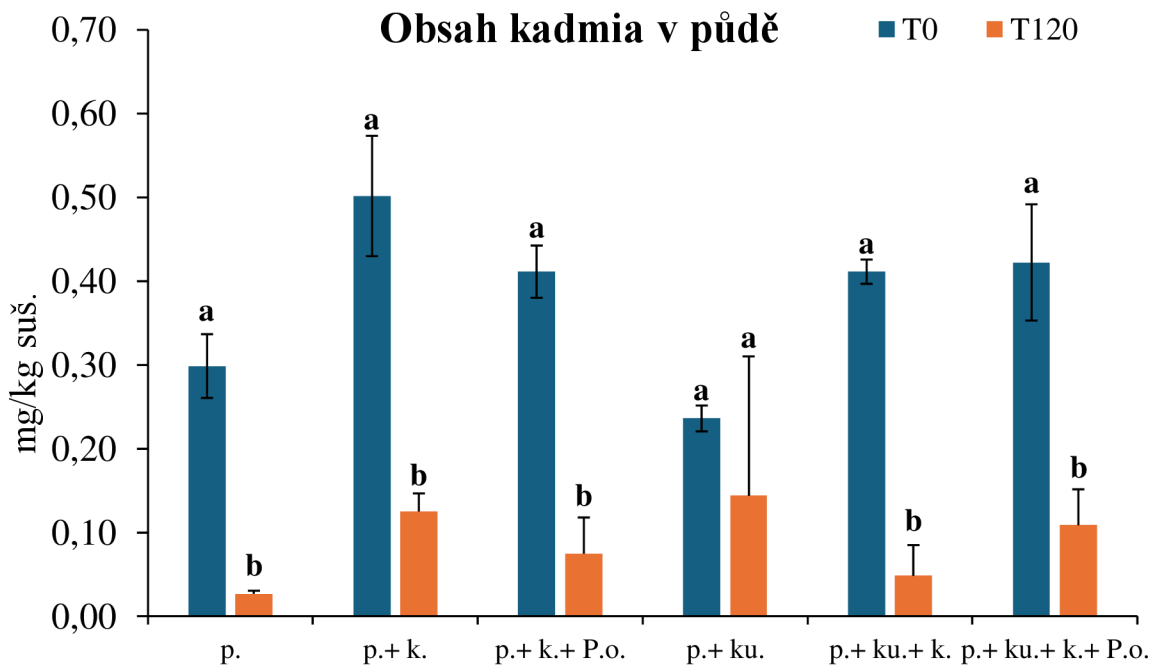
**Graf č.1** – Obsah arsenu v půdě jednotlivých variant pokusu

Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).



**Graf č.2** – Obsah chromu v půdě jednotlivých variant pokusu

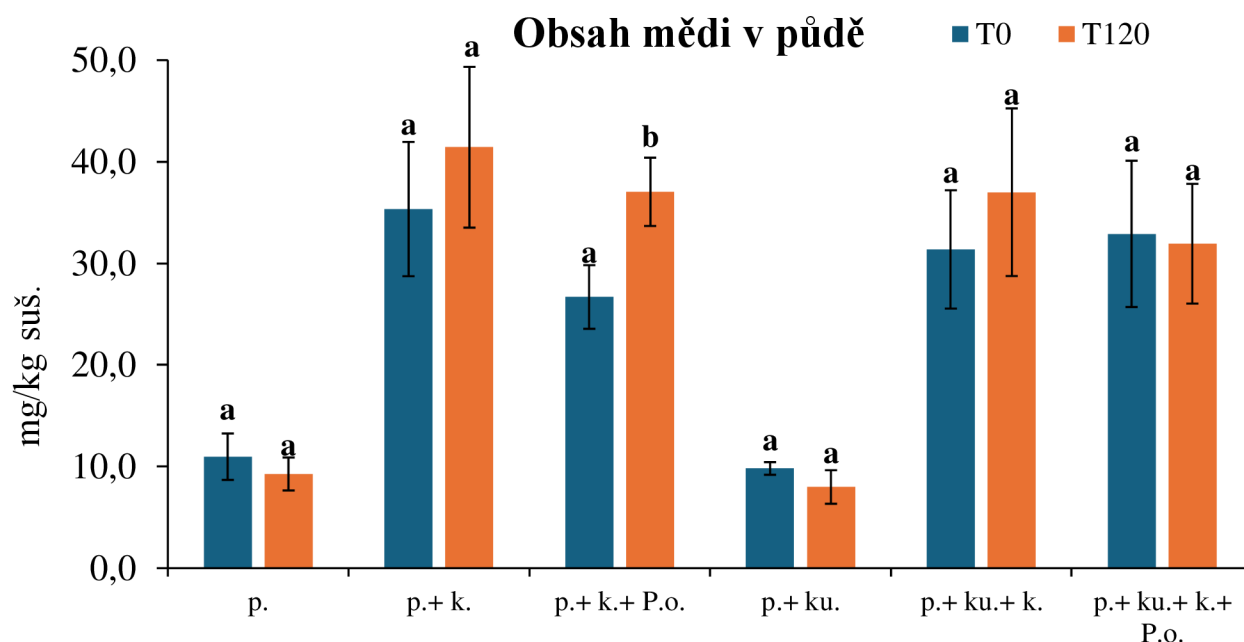
Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).



**Graf č.3** – Obsah kadmia v půdě jednotlivých variant pokusu

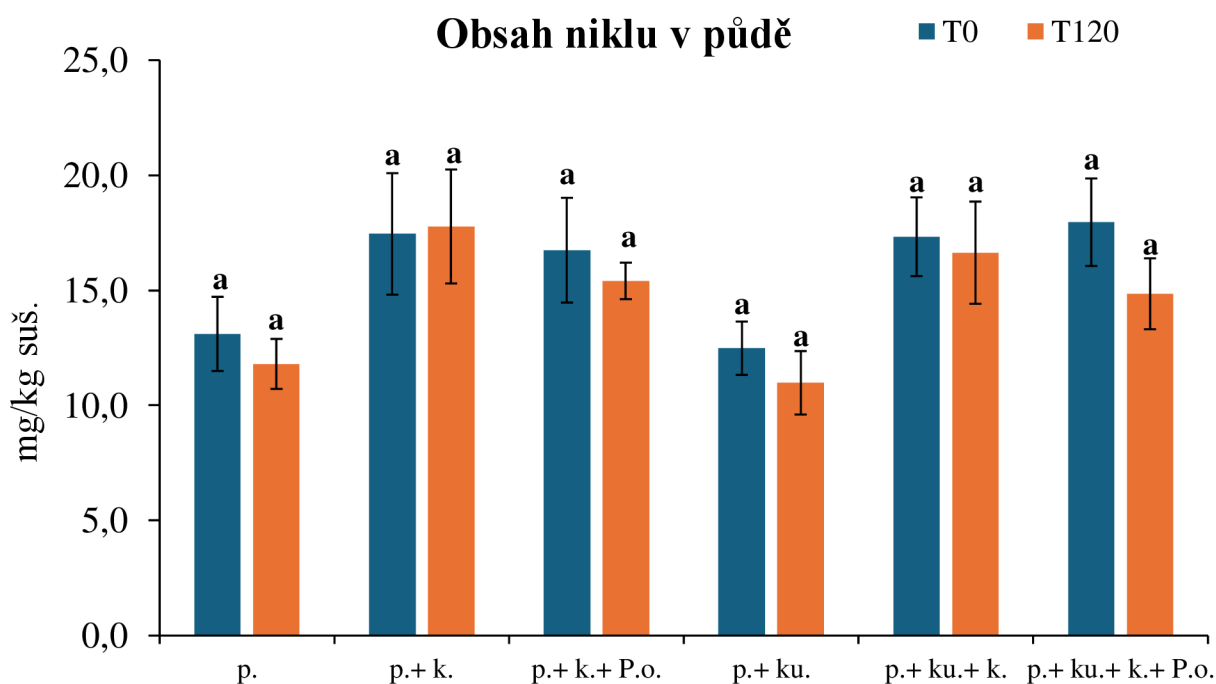
Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).





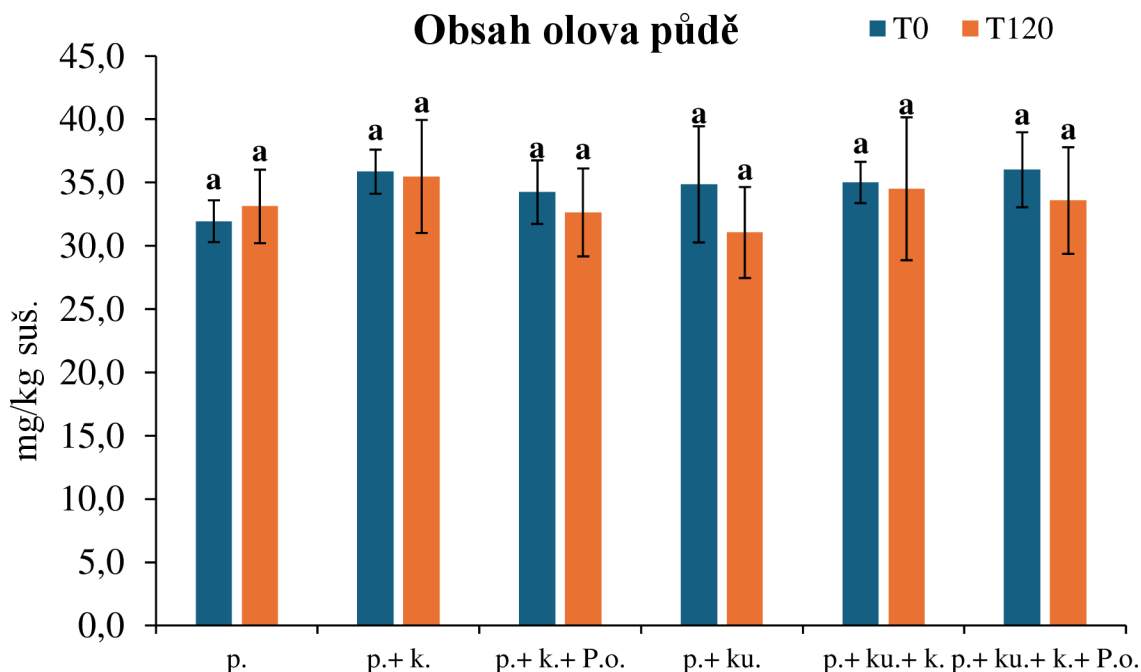
**Graf č.4** – Obsah mědi v půdě jednotlivých variant pokusu

Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).



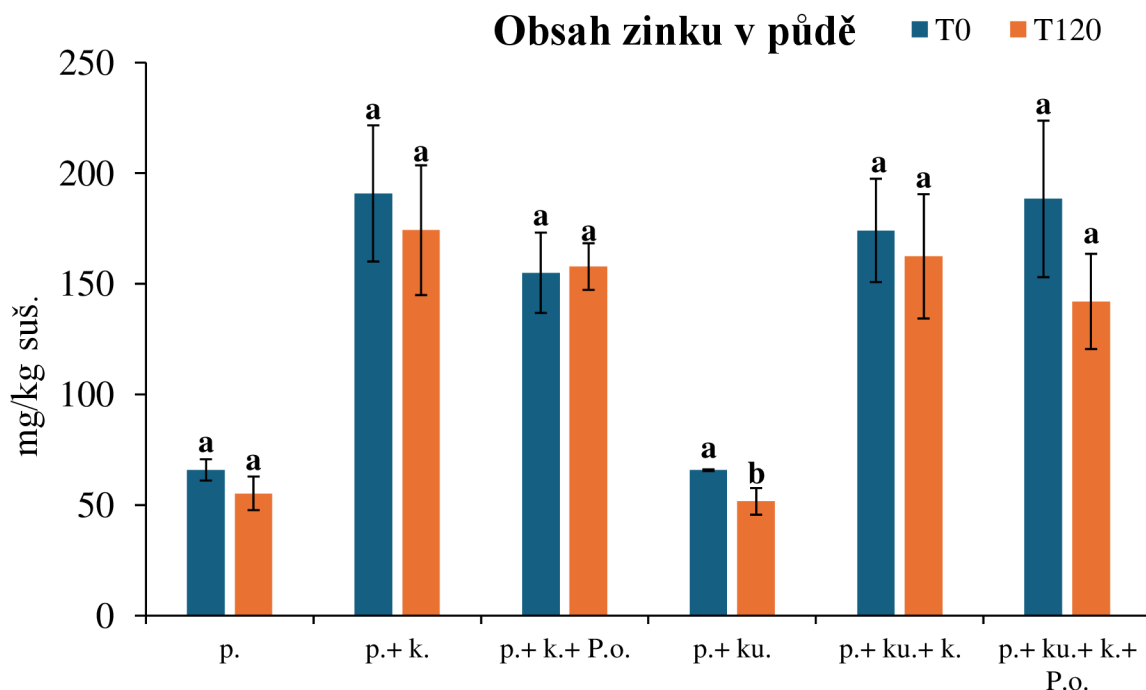
**Graf č.5** – Obsah niklu v půdě jednotlivých variant pokusu

Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).



**Graf č.6** – Obsah olova v půdě jednotlivých variant pokusu

Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).



**Graf č.7** – Obsah zinku v půdě jednotlivých variant pokusu

Vysvětlivky: p. (půda), p.+k. (půda+kal), p.+k.+P.o. (půda+kal+*P.ostreatus*), p.+ku. (půda+kukuřice), p.+ku.+k., (půda+kukuřice+kal), p.+ku.+k.+P.o. (půda+kukuřice+kal+*P.ostreatus*). Rozdílná malá písmena značí statisticky významný rozdíl mezi T0 a T120 určený párovým t-Testem ( $P < 0.05$ ).

**Tab. č.11** – Výnosy biomasy ve vybraných variantách pokusu

	<b>Nadzemní biomasa (g suš./nádoaba)</b>	<b>Kořeny (g suš./nádoaba)</b>	<b>Biomasa celkem (g suš.)</b>
p.+ ku.	34,0 (±1,84)c	7,1 (±1,44)b	41,1 (±3,05)c
p.+ ku.+ k.	48,5 (±2,02)a	12,1 (±1,76)a	60,6 (±1,95)a
p.+ ku.+ k.+ P.o.	42,9 (±0,92)b	11,3 (±1,27)a	54,2 (±1,52)b

Vysvětlivky: p.+ ku. (půda+kukuřice), p.+ ku.+ k. (půda+kukuřice+kal), p.+ ku.+ k.+ P.o. (půda+kukuřice+kal+P.ostreatus). Rozdílná malá písmena ve sloupci značí statisticky významné rozdíly mezi variantami pokusu určené dle statistického testu ANOVA při  $P < 0.05$  s následným Tukey-HSD testem.

**Tab. č.12** – Odběr rizikových prvků kořeny rostlin kukuřice

<b>Kořeny</b>	<b>As μg/nádoaba</b>	<b>Cd μg/nádoaba</b>	<b>Cr μg/nádoaba</b>	<b>Cu μg/nádoaba</b>	<b>Ni μg/nádoaba</b>	<b>Pb μg/nádoaba</b>	<b>Zn μg/nádoaba</b>
p.+ ku.	25,0 (±0,0)a	2,1 (±1,0)a	141,7 (±26,0)a	58,8 (±5,0)a	75,7 (±33,0)a	27,2 (±5,0)a	144,6 (±35,0)a
p.+ ku.+ k.	0,0 (±0,0)b	3,4 (±1,0)a	89,1 (±34,0)a	352,0 (±69,0)b	43,1 (±9,0)a	16,9 (±1,0)b	703,6 (±158,0)b
p.+ ku.+ k.+ P.o.	0,0 (±0,0)b	3,7 (±1,0)a	70,3 (±25,0)b	296,3 (±55,0)b	38,6 (±10,0)a	14,0 (±19,0)ab	630,1 (±219,0)b

Vysvětlivky: p.+ ku. (půda+kukuřice), p.+ ku.+ k. (půda+kukuřice+kal), p.+ ku.+ k.+ P.o. (půda+kukuřice+kal+P.ostreatus). Rozdílná malá písmena ve sloupci značí statisticky významné rozdíly mezi variantami pokusu určené dle statistického testu ANOVA při  $P < 0.05$  s následným Tukey-HSD testem.

**Tab. č.13** – Odběr rizikových prvků nadzemní biomasou rostlin kukuřice

Nadzemní biomasa	As μg/nádoba	Cd μg/nádoba	Cr μg/nádoba	Cu μg/nádoba	Ni μg/nádoba	Pb μg/nádoba	Zn μg/nádoba
p.+ ku.	0,0 (±0,0)a	0,0 (±0,0)a	20,0 (±4,0)a	80,5 (±7,0)a	30,7 (±10,0)a	0,0 (±0,0)a	630,7 (±93,1)a
p.+ ku.+ k.	0,0 (±0,0)a	3,0 (±1,0)b	11,0 (±14,0)a	118,7 (±17,0)b	61,7 (±8,0)b	0,0 (±0,0)a	2255,0 (±353,0)b
p.+ ku.+ k.+ P.o.	0,0 (±0,0)a	5,0 (±1,0)c	8,0 (±9,0)a	84,0 (±9,0)a	34,3 (±14,0)a	0,0 (±0,0)a	1637,0 (±310,0)b

Vysvětlivky: p.+ ku. (půda+kukuřice), p.+ ku.+ k. (půda+kukuřice+kal), p.+ ku.+ k.+ P.o. (půda+kukuřice+kal+P.ostreatus). Rozdílná malá písmena ve sloupci značí statisticky významné rozdíly mezi variantami pokusu určené dle statistického testu ANOVA při  $P < 0.05$  s následným Tukey-HSD testem.

**Tab. č.14** – Odběr rizikových prvků celkovou biomasou rostlin kukuřice

Biomasa celkem	As μg/nádoba	Cd μg/nádoba	Cr μg/nádoba	Cu μg/nádoba	Ni μg/nádoba	Pb μg/nádoba	Zn μg/nádoba
p.+ ku.	142,4 (±16,0)a	12,1 (±2,0)a	853,5 (±203,0)a	440,9 (±30,0)a	491,7 (±225,0)a	159,6 (±35,0)a	1599,4 (±218,0)a
p.+ ku.+ k.	0,0 (±0,0)b	20,4 (±3,0)b	440,4 (±134,0)b	1842,6 (±225,0)b	286,0 (±33,0)a	82,4 (±3,0)b	6300,8 (±1248,0)b
p.+ ku.+ k.+ P.o.	0,0 (±0,0)b	24,0 (±3,0)b	344,1 (±90,0)b	1523,9 (±203,0)b	227,0 (±34,0)a	61,7 (±82,0)ab	5044,9 (±915,0)b

Vysvětlivky: p.+ ku. (půda+kukuřice), p.+ ku.+ k. (půda+kukuřice+kal), p.+ ku.+ k.+ P.o. (půda+kukuřice+kal+P.ostreatus). Rozdílná malá písmena ve sloupci značí statisticky významné rozdíly mezi variantami pokusu určené dle statistického testu ANOVA při  $P < 0.05$  s následným Tukey-HSD testem.

## Diskuse

Upravený čistírenský kal obsahoval v určitých případech vysoké koncentrace rizikových prvků překračující mezní hodnoty stanovené vyhláškou č. 437/2016 Sb. MŽP. Bylo tomu tak u mědi, překračující limitní hodnotu o 47,5 mg (9,5 %); niklu, přibližně 43,5 mg (43,5 %) nad limitem a zinku, překračující mezní hodnotu o 263,4 mg (10,5 %). Pro kadmium je mezní hodnota v upravených čistírenských kalech 5 mg/kg sušiny, naměřená hodnota tedy limit překračuje také, avšak pouze o 0,47 mg. Arsen (mezní hodnota 30 mg/kg sušiny) a olovo (200 mg/kg sušiny) naměřené v experimentálním kalu jsou významně pod limitem. Chrom (mezní hodnota 200 mg/kg sušiny) byl se svými hodnotami těsně pod limitem (viz. tab. č.10).

Co se týče experimentální půdy, obsahy rizikových prvků splňovaly limitní hodnoty stanovené vyhláškou č.153/2016 Sb. MŽP. Jedinou výjimkou byl arsen. Limitní hodnota arsenu v běžných půdách je 20 mg/kg sušiny. Tato hodnota byla překročena o 4,1 mg (20,5 %) (viz. tab. č.9).

Výsledky měření obsahu rizikových prvků v půdě ukázaly rozdílné tendence jednotlivých variant pokusu.

V případě arsenu se kombinace rostliny kukuřice seté a hlívy ústřičné neukázala jako nejefektivnější varianta pro detoxikaci půdy. Pokles u kombinace rostliny kukuřice seté a hlívy ústřičné byl srovnatelný s variantami použití rostlinné a fungální složky samostatně (viz. graf č.1). Avšak bylo patrné, že využití rostlin nebo hub vede k prokazatelnému snížení obsahu As v půdě oproti variantám bez bioremediačního opatření. Zásadní roli při dostupnosti arsenu v půdě hraje pH. Vzhledem k faktu, že se zvyšujícím se pH roste také mobilita arsenu, dá se předpokládat, že vzroste také jeho příjem rostlinami. Transport arsenu z kořenů do nadzemní biomasy u *Zea mays L.* v tomto případě nebyl zaznamenán (viz. tab. č.14), avšak studie, kterou publikoval Ning Li a kol. (2023), ukázala pravý potenciál této zemědělské plodiny. V této studii dosahovaly hodnoty arsenu v nadzemní biomase *Zea mays L.* 59,25 ( $\pm 2,37$ ), při režimu kapkové závlahy. Pro zjištění, co vedlo k poklesu arsenu v našem pokusu by bylo zapotřebí dalšího ověření například analýzou půdního roztoku, zda nedošlo u těchto variant k jeho vyplavení, když nebyl přijat rostlinou. Dále by bylo vhodné znovu provést rozklad příslušných vzorků biomasy a ujistit se, zda opravdu obsahovaly arsen pod mezí detekce, jako tomu bylo i v našem měření. Další možnou hypotézou je, že arsen mohl být rostlinami přijat, ale tím, že rostliny těchto variant dosahovaly vyšších výnosů, mohl být obsah arsenu naředěn.

Stejně jako u arsenu se varianta použití rostliny kukuřice seté zároveň s hlívou ústřičnou, v případě chromu, neukázalo jako výrazně lepší než použití těchto dvou složek samostatně (viz. graf č.2). Bylo dosaženo podobných trendů jako v případě obsahu arsenu. I přes to, že se chrom řadí mezi imobilní prvky, byl jeho pokles v půdě oproti arsenu výraznější, dá se tedy předpokládat jeho lepší dostupnost pro rostlinu i houbu. O tom svědčí také fakt, že kromě varianty samostatné půdy a půdy s aplikovaným kalem byly v ostatních variantách zaznamenány výrazné statistické rozdíly. Jeho odběr rostlinami se zvýšil jen u variant s aplikovaným kalem, ale nebyly zaznamenány významné rozdíly ve fytoremediaci a v kombinaci s houbou.

Výrazné rozdíly mezi prvním a posledním dnem experimentu také svědčí o vysoké mobilitě kadmia v půdě, jeho snadným příjmem a transportem rostlinou kukuřice seté i hlívou ústříčnou (viz. graf č.3). Dá se předpokládat, že podobných výsledků lze dosáhnout i u dalších rostlin a hub vhodných pro bioremediaci. V tomto případě dosahovaly varianty samostatně použité rostliny kukuřice seté (p.+ ku.+ k.) a hlívy ústříčné (p.+ k.+ P.o.) podobných výsledků jako při kombinaci těchto dvou složek. Potenciál *P. ostreatus* zaznamenává také studie publikovaná Ruqiang Dou a kol. (2024), kde hodnoty kadmia akumulované právě *P. ostreatus* dosahovaly až 5 mg/kg sušiny, a to jak v neutrálním, tak kyselém prostředí. Z výsledků bylo patrné, že u variant bez rostliny by docházelo k pravděpodobnému vyplavení kadmia. To by mohlo způsobit kontaminaci podzemní vody. Fytoremediace tedy může tato rizika potlačit, jak tomu naznačuje odběr kadmia rostlinami (vit. tab. č. 12–14).

V případě mědi byl statisticky prokazatelný pouze nárůst koncentrace mědi v půdě, a to u varianty p.+ k.+ P.o. (viz. graf č.4). Tento nárůst může být způsoben zakoncentrováním mědi při kompresy organické složky v půdní směsi a zároveň její pevnou vazbou na organické látky nacházející se v půdě. K ověření této hypotézy by bylo potřeba opakovat měření, popřípadě ověřit možný pokles organické hmoty na konci experimentu například ztrátou žiháním. Potenciál při odstranění mědi z půdy ukázala *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) (pečárka dvouvýtrusá) ve studii, kterou publikoval Amjad Ali a kol. (2017). V této studii hodnoty mědi naakumulované v *A. bisporus* dosahovaly hodnot až 107 mg/kg, což je téměř 10krát více než u zde použité *P. ostreatus*.

V případě obsahu niklu v půdě nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl na začátku a na konci experimentu. Nicméně, v případě varianty p.+ k.+ ku.+ P.o. byla zaznamenána výrazná tendence k poklesu obsahu niklu patrně vlivem přídavku fungální složky. Pokles nebyl tak výrazný, aby došlo ke statisticky významnému poklesu (viz. graf č.5).

Olovo nepatří mezi mobilní prvky, což se ukázalo i v experimentu, kdy jeho hodnoty v půdě klesly maximálně o necelé 3 mg/kg sušiny (viz. graf č.6). Největší rozdíl mezi hodnotami olova na počátku a konci experimentu byl zjištěn u varianty kombinující rostlinu kukuřice a hlívu ústříčnou. Nelze ale hovořit o poklesu obsahu v našem experimentu, jelikož obsahy v čase nebyly statisticky významně rozdílné. Použití rostlinné a fungální složky samostatně se však od jejich kombinace, vzhledem k nízké mobilitě prvku, lišilo téměř zanedbatelně. Dobrých výsledků bylo dosaženo s *Brassica oleracea* var. *Italica* (brokolice) ve studii, kterou provedl Sevinç Yeşilyurt (2023). V této studii byla rostlina schopna ve svých kořenech akumulovat olovo v hodnotách 3,6 ( $\pm 0,2$ ) mg/kg, zatímco v nadzemní biomase byly naměřeny hodnoty několikanásobně vyšší, a to 48,3 ( $\pm 6,9$ ) mg/kg sušiny. Nižší odběr olova kořeny rostlin z půd s kalem než bez kalu (viz. tab. č. 12) patrně indikují jeho zvýšenou sorpci v půdních směsích.

Co se týče zinku, prokázala se kombinace půda+kukuřice (p.+ ku.) jako jediná statisticky prokazatelná (viz. graf č.7). Avšak u varianty půda+kal+kukuřice+houba, bylo dosaženo nejlepšího výsledku a výrazného poklesu zinku.

Výnos biomasy kukuřice v našem experimentu úzce souvisí s aplikací čistírenského kalu na půdu. Při aplikaci kalu na půdu statisticky významně vzrostly také výnosy biomasy, a to bez ohledu na výši kontaminace použitého kalu (viz. tab. č.11). Lze tedy

čistírenské kaly považovat za účinné organické hnojivo. V případě varianty, kdy byla použita hlíva ústříčná, byl nárůst biomasy mírnější. Příčinou mohla být sorpce živin na organickém substrátu využívaném pro růst hub, a tedy menší dostupnost živin pro rostlinu.

V této práci byly obsahy prvků v jednotlivých morfologických částech rostliny ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  suš.) přepočítány na odběry rizikových prvků rostlinou ( $\mu\text{g}/\text{nádoba}$ ) pro lepší přehlednost vlivu jednotlivých složek (kal nebo houba) na jejich příjem rostlinou reálně vypěstovanou v nádobě. Varianta zahrnující kombinaci rostliny kukuřice a hlívy ústříčné (fyto/mykoremediace) se ukázala jako účinná pouze v případě odběru kadmia, kdy jeho množství přijaté nadzemní biomasou vzrostlo o  $2 \mu\text{g}$  (60 %) po aplikaci houby (viz. tab. č.13). V případě ostatních prvků se osvědčila jako efektivní varianta s použitím pouze rostliny kukuřice (viz. tab. č.14), tedy samostatná fyto-remediace. Většina rizikových prvků byla sice přijata kořeny v poměrně vysokém množství (viz. tab. č.12), avšak dále do nadzemní biomasy v takovém rozsahu transportovány nebyly. Výjimkou byl zinek, jehož množství bylo v nadzemní biomase několikanásobně vyšší než v kořenech (viz. porovnání tab. č.13). U arsenu a olova byly hodnoty v nadzemní biomase pod mezí detekce.

Výsledky našeho vegetačního experimentu naznačily, že aplikace ligninolytických hub do půd kontaminovaných rizikovými prvky může mít tendenci pozitivně ovlivnit jejich pokles v půdě a následný možný odběr rostlinami, jako v případě kadmia. V dalším směru výzkumu by bylo dobré otestovat i další druhy ligninolytických hub. K lepším výsledkům by patrně vedlo zvýšení dávky mykoremediačních substrátů do půdy, avšak to by mělo za následek výrazný pokles výnosu biomasy pěstovaných rostlin. Do budoucna by bylo vhodné testovat pouze aplikace samostatných izolovaných exoenzymů či derivátů (výluhů) vznikajících při pěstování ligninolytických hub.

## Závěr

- 1) Cílem této práce v experimentální části bylo zhodnotit potenciál rostlin a ligninolytických hub při jejich využití v bioremediaci půd kontaminovaných rizikovými prvky po aplikaci čistírenského kalu. U několika vybraných prvků (např. Zn, Cr, As) bylo dosaženo poměrně vysokých odběrů z půdy, a to zejména při využití rostliny, tedy samotnou fytořemediací.
- 2) Náš experiment ukázal, že přidáním kalu do půdy se zvyšuje obsah vybraných rizikových prvků v půdě. To naznačuje, že při relevantní a pravidelné aplikaci kalů do půdy může z dlouhodobého hlediska docházet ke kontaminaci.
- 3) Kombinace rostlinné a fungální složky může mít v otázce bioremediace vysoký potenciál. Jak se ukázalo i v experimentu této práce, odběr rizikových prvků rostlinou byl významně podpořen přidáním houbového substrátu pouze v případě kadmia. Pro ostatní rizikové prvky podpora fytořemediaci mykořemediací nebyla statisticky průkazná, avšak oproti kontrole významná.
- 4) Co se týče čistírenských kalů, jakožto alternativy organických hnojiv, ukázalo se, že půda je po aplikaci kalu významně obohacena nejen o základní živiny (N, P, K, Ca, Mg), ale bohužel také o rizikové prvky, které však mohou do určitých obsahů v půdě rostlině posloužit jako mikroprvky potřebné k jejich správnému vývoji (Cu, Zn). To se v našem experimentu projevilo tím, že v půdách obohacených o kaly došlo k prokazatelně vyššímu výnosu biomasy oproti kontrole. V případě kombinace fyto/mykořemediaci došlo k mírnému poklesu výnosu, avšak ve srovnání s kontrolní variantou byl tento výnos stále statisticky průkazně vyšší.
- 5) Schopnost rostlin a hub akumulovat rizikové prvky z půdy lze považovat za výhledově účinný způsob, jak dosáhnout dekontaminace prostředí ekologicky šetrnou cestou. Stejně jako kukuřice setá a hlíva ústříčná, které byly použity pro experiment v této práci, existuje dle dostupné literatury celá řada druhů rostlin a hub, jejichž potenciál k bioremediaci je mnohdy dokonce vyšší. Pro objasnění, v jakém rozsahu je toto bioremediační opatření efektivní, by byl zapotřebí výzkum více druhů rostlin a ligninolytických hub a uvedení výsledků do praxe. Pro možné využití v praxi by bylo vhodné do budoucna také ověřit schopnost ligninolytických hub přežít v půdě po dlouhou dobu v interakci s přirozeně se vyskytujícími mikroorganismy v okolní půdě.
- 6) Náš vegetační experiment ukázal, že fyto/mykořemediacní opatření by mohlo být slibné a perspektivní zejména pro rizikovými prvky kontaminované zemědělsky využívané půdy s nižším pH.



## Literatura

- AMJAD, A. L. I., et al. 2017. Mycoremediation of potentially toxic trace elements—a biological tool for soil cleanup: a review. *Pedosphere*, **27**: 205-222.
- BEHERA, Shivananda; DAS, Surajit. 2023. Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: Cellular mechanisms and genetic regulations. *Microbiological Research*, 127399.
- BRADL, Heike (ed.). 2005. Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation. Elsevier, London.
- CIBULKA, Jiří. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. 1991. Praha: Academia. ISBN 80-200- 0401-7.
- ČELECHOVSKÁ, O., et al. 2005. Arsenic content in tissues of fish from the River Elbe. *Acta Veterinaria Brno*, **74**: 419-425.
- Český statistický úřad. 2022. Vodovody, kanalizace a vodní toky. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/vodovody-kanalizace-a-vodni-toky-2022>
- DOHÁNYOS, Michal. 2006. Efektivní využití a likvidace čistírenských kalů. *Biom.cz* [online]. 2006-05-09 [cit. 2024-04-15]. Dostupné z WWW: <<https://biom.cz/cz/odborne-clanky/efektivni-vyuziti-a-likvidace-cistirenskych-kalu>>. ISSN: 1801-2655.
- DOU, Ruqiang, et al. 2024. In situ mycoremediation of acid rain and heavy metals co-contaminated soil through microbial inoculation with *Pleurotus ostreatus*. *Science of The Total Environment*, **912**: 169020.
- FILIPPI, Michal; GOLIÁŠ, Viktor; PERTOLD, Zdeněk. 2004. Arsenic in contaminated soils and anthropogenic deposits at the Mokrsko, Roudný, and Kašperské Hory gold deposits, Bohemian Massif (CZ). *Environmental Geology*, **45**: 716-730.
- GABRIEL, Jiří, et al. 2016. Translocation of mercury from substrate to fruit bodies of *Panellus stipticus*, *Psilocybe cubensis*, *Schizophyllum commune* and *Stropharia rugosoannulata* on oat flakes. *Ecotoxicology and environmental safety*, **125**: 184-189.
- GREGER, Maria. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 1-27.
- GROPPER, S. S. – SMITH, J. L. – GROFF, J. L. 2005. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 4th edition. Belmont: Wadsworth. 600 p. ISBN 0-534-55986-7
- HIDALGO, June, et al. 2023. Mycoremediation with *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* growth substrates versus phytoremediation with *Festuca rubra* and *Brassica* sp. for the recovery of a Pb and  $\gamma$ -HCH contaminated soil. *Chemosphere*, **327**: 138538.

- HORÁKOVÁ, D. 2006. Bioremediace. Brno: Masarykova Univerzita. Dostupné z: [http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace\\_FRVS\\_2006-2.pdf](http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace_FRVS_2006-2.pdf). ISSN 1802-128X.
- CHANE, Abraham Demelash, et al. 2023. Bioremediation of the synthetic musk compounds Galaxolide and Tonalide by white rot fungal strain-assisted phytoremediation in biosolid-amended soil. *Chemosphere*, **328**: 138605.
- CHANE, Abraham Demelash, et al. 2024. Persistent polycyclic aromatic hydrocarbons removal from sewage sludge-amended soil through phytoremediation combined with solid-state ligninolytic fungal cultures. *Fungal Biology*, **128**: 1675-1683.
- CHIOU, Yu-Hu, et al. 2014. Nickel accumulation in lung tissues is associated with increased risk of p53 mutation in lung cancer patients. *Environmental and molecular mutagenesis*, **55**: 624-632.
- CHUDOBA, Jan; DOHÁNYOS, Michal; WANNER, Jiří. 1991. Biologické čištění odpadních vod. SNTL, Praha.
- JIRÍČEK, Marek; ŠRÁČEK, Ondřej; JANDA, Václav. 2007. Odstraňování chlorderivátů ethenu z podzemní vody využitím podpovrchových reakčních bariér tvořených granulovaným železem (Fe<sup>0</sup>). *Chemické listy*, **101**: 176-180
- KABATA-PENDIAS, A. 2010. Trace Elements in Soils and Plants (4th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10158>.
- KAFKA, Z.; PUNCOCHAROVA, J. 2002. Toxicity of heavy metals in nature. *Chemické listy*, **96**: 611-617.
- KECSKÉSOVÁ, S., et al. 2020. Opätovné získavanie fosforu úpravou čistiarenského kalu. *Chemické listy*, **114**: 341-348.
- KENSA, V. Mary. 2011. Bioremediation-an overview. *Journal of Industrial Pollution Control*, **27**: 161-168.
- KHAN, Muhammad Amjad, et al. 2017. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the total environment*, **601**: 1591-1605.
- KIZEK R. 2007. Rostliny, které léčí životní prostředí. Český rozhlas, Praha. Dostupné z: <https://temata.rozhlas.cz/rostliny-ktere-leci-zivotni-prostredi-7856529> (accessed February 2007)
- KOS, Miroslav. 2016. Čistírenský kal—obnovitelný zdroj pro výrobu paliva a hnojiva. *SOVAK. Časopis oboru vodovodů a kanalizací*, **1**: 16-20.

- KOŠNÁŘ, Zdeněk, et al. 2023. Concentration of the main persistent organic pollutants in sewage sludge in relation to wastewater treatment plant parameters and sludge stabilisation. *Environmental Pollution*, 122060.
- KOTOVICOVÁ, Jana; VAVERKOVÁ, Magdalena. 2012. Výzkum možností využití kalů z čistíren odpadních vod na plantážích rychle rostoucích dřevin. *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae (Bratislava)*, **20**: 29-37.
- KRALOVA, Lucie, et al. 2010. The variability of arsenic and other risk element uptake by individual plant species growing on contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination*, **19**: 617-634.
- KREJSEK, Jan, et al. 2020. Vitaminy D, C a zinek jsou esenciální pro funkci imunitního systému a posílení obranyschopnosti. *Pediatric pro praxi*, **21**: 270-274.
- KUBÍK, Ladislav; NĚMEC, Pavel. 2016. REGISTR KONTAMINOVANÝCH PLOCH celkové obsahy rizikových prvků v zemědělských půdách průběžná zpráva, Brno.
- KUMAR, Ashok, et al. 2023. Bioremediation potential of green wastes and plant growth promoting rhizobacteria and its enhancement by their combination: A review. *Environmental Advances*, **12**: 100379.
- LI, Ning, et al. 2023. Enhancing phytoremediation of arsenic-contaminated soil by agronomic practices (drip irrigation and intercropping): Influence of soil organic matter. *Science of The Total Environment*, **891**: 164463.
- MAKOVNIKOVA, Jarmila, et al. 2006. Inorganic contaminants in soil ecosystems. *Chemicke listy*, **100**: 424-432.
- MAN, Matěj. 2011. Methylrtuť, jak vzniká a proč je nebezpečnější než kovová rtuť. *Arnika.org* [online].[cit. 25. 4. 2013]. Dostupné z: (<http://arnika.org/methylrtut-jak-vznika-a-proc-je-nebezpecnejsi-nez-kovova-rtut>).
- MANDAL, S. K.; DAS, N. 2018. Phyto-mycoremediation of benzo [a] pyrene in soil by combining the role of yeast consortium and sunflower plant. *Journal of Environmental Biology*, **39**: 261-268.
- MARKUS, Julie; MCBRATNEY, Alex B. 2001. A review of the contamination of soil with lead: II. Spatial distribution and risk assessment of soil lead. *Environment international*, **27**: 399-411.
- MATĚJŮ, Vít, et al. 2006. Kompendium sanačních technologií. *Vodní zdroje Ekomonitor s.r.o.*, Chrudim.
- MATUŠKOVÁ L. 2021. Spletité vztahy. *Věda a výzkum* **3**: 28-29.

MERCL, Filip, et al. 2021. Pyrolysis of biosolids as an effective tool to reduce the uptake of pharmaceuticals by plants. *Journal of Hazardous Materials*, **405**: 124278.

Ministerstvo životního prostředí. 2004. Vyhláška č. 252 ze dne 22. dubna 2004., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Page 5406-5407 in *Sbírka zákonů České republiky, 2004, částka 82*. Česká republika.

Ministerstvo životního prostředí. 2016. Vyhláška č. 153 ze dne 9. května 2016, kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Pages 2692-2699 in *Sbírka zákonů České republiky, 2016, částka 59*. Česká republika.

Ministerstvo životního prostředí. 2016. Vyhláška č. 437 ze dne 19. prosince 2016. Pages 6994-7024 in *Sbírka zákonů České republiky, 2016, částka 178*. Česká republika.

MOŠKO, Jaroslav, et al. 2017. Pyrolýza stabilizovaného čistírenského kalu: vlastnosti produktů. *Energie z biomasy XVIII*, 12. Lednice.

Mulligan C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, **133**: 183-98

NATIONAL RISK MANAGEMENT RESEARCH LABORATORY (US). 2000. Introduction to phytoremediation. National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.

NAVRÁTIL, Tomáš, et al. 2019. Mapování distribuce a zásob rtuti v povrchové organické vrstvě lesních půd na území CHKO Brdy. *Bohemian centralis, Praha*, **35**: 7-25.

NORTON, R. 2014. International Plant Nutrition Institute. Canada. Available from <http://anz.ipni.net/article/ANZ-3214>. Accessed August. 2014.

NOWACK, Bernd; VANBRIESEN, Jeanne M. 2005. Chelating agents in the environment. *ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC*, **910**: 1-18.

ONOFRE-LEMUS, Janette, et al. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 6581-6590.

OSOBOVÁ, Michaela; SÁCKÝ, Jan; KOTRBA, Pavel. 2010. The role of fungi in biochemical cycles of the metals and the implication to phytoremediation. *Listy Cukrovarnické a Řepářské*, **126**: 404.

PATOČKA, Jiří, et al. 2013. Environmentální zdraví: naléhavé problémy. *Kontakt*, **15**: 190-202.

PAZDERA, Oldřich. 1996. Dokumentace EIA - ČOV Jihlava, intenzifikace. Brno.

PECHOVÁ, A. – PAVLATA, L. 2007. Chromium as an essential nutrient: a review. In *Veterinární medicína*, Brno, **52**: 1-18.

PITTER, Pavel. 2009. *Hydrochemie*. 4. aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-701-9.

PROCHÁZKOVÁ, Alice; MIKLOVÁ, Barbora. 2013. Mapování siloxanů v procesu tvorby kalového plynu. In: *WASTE*. **3**: 159.

RAČEK, J., DOSKOČIL, B., ŠEVČÍK, J., CHORAZY, T., HLAVÍNEK, P. 2018. Sušení čistírenského kalu pro podmínky České republiky. *Vodovod.info - vodárenský informační portál*[online]. Dostupný z WWW: <http://vodovod.info>. ISSN 1804-7157.

RELIENE, R. – SCHIESTL, R. H. 2006. Environmental Toxins, Nutrition, and Cancer. In HEBER, D. – BLACKBURN, G. L. – GO, V. L. W. – MILNER, J. *Nutritional Oncology*. 2nd edition. Burlington, Academic Press, 822 p. ISBN 13: 978-0-12-088393-6. P. 273-282.

ROSENDORFOVÁ, Lenka, and ING LUCIE HOUDKOVÁ. 2008. *Metody termického zneškodnění čistírenských kalů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 70 p.

SHACKIRA, A. M.; PUTHUR, Jos T. 2019. Phytostabilization of Heavy Metals: Understanding of Principles and Practices. In: Srivastava, S., Srivastava, A., Suprasanna, P. (eds) *Plant-Metal Interactions*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20732-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20732-8_13)

SHARMA, Indu. 2020. Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects. In: *Trace metals in the environment-new approaches and recent advances*. IntechOpen. 271 p.

SCHUTZENDUBEL, Andres; POLLE, Andrea. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, **53**: 1351-1365.

SCHWARTZ, Christophe, et al. 2001. Measurement of in situ phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former smelter site. *Science of the total environment*, **279**: 215-221.

STEVENSON, Danielle Nicole; YING, Samantha C. 2022. Unravelling Controls on Plant-Fungal-Metal Interactions in Phyto-Mycoremediation Contexts. In: *ASA, CSSA, SSSA International Annual Meeting*. ASA-CSSA-SSSA.

SVOBODOVÁ, Z.; LLOYD, R.; MÁCHOVÁ, J. ; VYKUSOVÁ, B. 1993: *Water quality and fish health*. EIFAC Technical Paper. FAO. Rome. No. 4. 59 p.

ŠÍR M., et al. 2015. Produkce a charakterizace kvasinkového biosurfaktantu a testování jeho působení na půdní mikroorganismy. *Chemické listy*, **109**: 155-158.

ŠVEHLA P., TLUSTOŠ P., BALÍK J. 2007. *Odpadní vody*. Česká zemědělská univerzita v Praze Katedra agrochemie a výživy rostlin, Praha.

VERBRUGGEN, Nathalie; HERMANS, Christian; SCHAT, Henk. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New phytologist*, **181**: 759-776.

WEINER Eugene R. 2010. *Applications of environmental chemistry: a practical guide for environmental professionals*. CRC press. 288 p.

WU, Jinhua, et al. 2014. Effect of low-level prenatal mercury exposure on neonate neurobehavioral development in China. *Pediatric neurology*, **51**: 93-99.

YEŞİLYURT, Sevinç. 2023. Phytoremediation method and Brassica family: Removal of chromium, cadmium and lead accumulation with broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Results in Chemistry*, **6**: 101005.

YUDOVICH, Ya E.; KETRIS, M. P. 2005. Mercury in coal: A review: Part 1. *Geochemistry*. *International Journal of Coal Geology*, **62**: 107-134.