

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Fytobioremediace polycyklických aromatických
uhlovodíků přítomných v půdě a v odpadních materiálech**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petr Frühbauer

Obor: Ochrana a využívání přírodních zdrojů

Vedoucí práce: prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc., dr. h. c.

Konzultant: Ing. Zdeněk Košnář, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Fytobioremediace polycyklických aromatických uhlovodíků přítomných v půdě a v odpadních materiálech" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu prof. Ing. Pavlu Tlustošovi, CSc., dr. h. c. za vedení práce a konzultování jejího průběhu. Dále bych rád poděkoval panu Ing. Zdeňku Košnářovi, Ph.D. za řízení celého pokusu, metodické vedení v laboratoři a konzultování průběhu práce.

Fytobioremediace polycyklických aromatických uhlovodíků přítomných v půdě a v odpadních materiálech

Souhrn

Tato práce se zabývá využitím fyto-remediačních a myko-remediačních metod k odstranění polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) z půd. Nové metody využívají synergického vztahu více druhů organismů za účelem zvýšení účinnosti jejich schopnosti degradace. Hlavními cíli bylo ověření účinnosti degradace PAU pomocí těchto metod a určení nejefektivnější metody odstranění PAU z půd.

K vytvoření jednotlivých bioremediačních metod bylo využito rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.) a mycelia hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., kmen HK35), které simulovaly fyto-remediaci, myko-remediaci a fytobioremediaci (kombinovanou metodu využívající rostlin i mikroorganismů v půdě). Kontrolní variantou byly vzorky půd bez přidaného houbového substrátu a rostlin, které sloužily jako ukazatel přirozené atenuace v nesterilizovaných půdách. Do půd byly PAU dodány ve formě popela ze spalování biomasy, přičemž do každé varianty s příměsí popela bylo přidáno 52,7 g (1 % hm). Houbové mycelium bylo předpěstováno v dubových pilinách a následně přidáno 400 g (8 % hm.) do vybraných variant půd na začátku pokusu. Půdy byly důkladně homogenizovány a polovina variant byla oseta semeny kukuřice seté. Délka pokusu byla přizpůsobena vegetačnímu období kukuřic v daném roce a trvala 100 dnů. Pomocí GC/MS bylo sledováno 16 prioritních PAU dle US EPA. Obsah 16 PAU se v jednotlivých variantách lišil, a proto bylo potřeba v rámci pokusu stanovit obsah těchto látek na začátku pokusu v čase T_0 a na konci v čase T_{100} . Součástí výzkumu byla také analýza 2 skupin enzymů, podílejících se na degradaci PAU (ligninolytické enzymy a hydrolytické enzymy).

Grafickým a statistickým vyhodnocením výsledků se potvrdil předpoklad nejvyššího účinku degradace PAU metodou fytobioremediace. Celkem bylo touto metodou odstraněno 25 % sledovaných PAU, což je přibližně o 10 % více než u fyto-remediace. Účinnost přirozené atenuace (7,4 %) a myko-remediace (8,7 %) byla výrazně nižší. Nejvíce byly degradovány jednodušší PAU. Zároveň se osvědčilo využití kukuřice seté jako fyto-remediační rostliny. Degradční schopnost houbového mycelia nevykazovala takového účinku, lze se však domnívat, že byla určitým způsobem inhibována, jelikož v kombinaci s rostlinami významně přispěla ke zvýšení celkové degradace. Využití metody v praxi by bylo možné, záleží však na mnoha faktorech, zvláště pak na podmínkách prostředí a celkové kontaminaci dané lokality.

Klíčová slova: Polycyklické aromatické uhlovodíky; Kontaminace; Bioremediace; Fyto-remediace; Myko-remediace; Biodegradace

Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Soil and in Waste Materials

Summary

The subject of this work is the use of phytoremediation and mycoremediation methods to remove polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils. The new methods use the synergistic relationship of multiple species of organisms to increase the effectiveness of their ability to degrade. The main objectives were to verify the effectiveness of PAH degradation by these methods and to determine the most effective method that removes PAHs from soils.

Maize plants (*Zea mays* L.) and a mycelium of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., strain HK35) were used to create individual bioremediation methods that simulated phytoremediation, mycoremediation and phytobioremediation (combined method using plants and microorganisms in the soil). The control variant was soil samples without added fungal substrate and plants. These samples served as an indicator of natural attenuation in unsterilized soils. PAHs were added to the soils in the form of ash from biomass combustion. An amount of 52.7 g (1 % W/W) was added to each variant with an ash admixture. The fungal mycelium was cultivated in oak sawdust and then 400 g (8 % W/W) was added to selected soil variants at the beginning of the experiment. The soils were thoroughly homogenized and half of the variants were sown by corn seeds. The duration of the experiment was adapted to the growing season of maize in the year and lasted for 100 days. 16 priority PAHs according to the US EPA were monitored by GC/MS. The content of 16 PAHs was differed in individual variants. It was necessary to determine the content of these substances at the beginning of the experiment at time T_0 and at the end at time T_{100} . The research also included the analysis of 2 groups of enzymes involved in the degradation of PAHs (ligninolytic enzymes and hydrolytic enzymes).

Graphical and statistical evaluation of the results confirmed the assumption of the highest effect of PAHs degradation by phytobioremediation. In total, 25 % of monitored PAHs were removed by this method which is approximately 10 % more than in phytoremediation. The effectiveness of natural attenuation (7.4 %) and mycoremediation (8.7 %) was significantly lower. Simpler PAHs were degraded the most. The use of maize as a phytoremediation plant has also proved successful. The degradability of the fungal substrate was not so effective. However, it is possible that it was inhibited in some way because it significantly contributed to the increase of overall degradation in combination with plants. The use of this method in practice would be possible, but it depends on many factors, especially on the environmental conditions and the overall contamination of the site.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Contamination; Bioremediation; Phytoremediation; Mycoremediation; Biodegradation

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecké hypotézy a cíle práce	9
3	Charakteristika, vlastnosti a rozdělení polycyklických aromatických uhlovodíků	10
3.1	Popis vybraných sloučenin	10
3.2	Zdroje, způsoby vzniku a formy výskytu v životním prostředí	12
3.3	Akumulace v půdách, sedimentech a jiných odpadních materiálech... ..	15
3.4	Přirozené způsoby odstraňování polycyklických aromatických uhlovodíků v životním prostředí	17
3.5	Nežádoucí vlivy na organismy a zdraví člověka	17
4	Remediace	18
4.1	Bioremediace	20
4.1.1	Vliv podmínek na bioremediaci	21
4.1.2	Fytoremediace	22
4.1.3	Degradace pomocí bakterií	29
4.1.4	Mykoremediace	29
4.1.5	Mykoremediace podporovaná rostlinami	32
5	Metodika	34
5.1	Charakteristika experimentální půdy	34
5.2	Charakteristika popelu ze spalování biomasy	34
5.3	Charakteristika houbového substrátu a semen kukuřice seté	34
5.4	Struktura experimentálního výzkumu	35
5.4.1	Základní analýzy vzorků zemin	36
5.4.2	Stanovení ergosterolu	37
5.4.3	Analýza enzymů	37
5.4.4	Analýza polycyklických aromatických uhlovodíků	38
5.5	Zpracování dat a statistické vyhodnocení	39
6	Výsledky	40
7	Diskuze	48
8	Závěr	53
9	Literatura	54
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Kontaminace půd znečišťujícími látkami je dlouhodobý proces, jejíž rapidní nárůst přišel až s rozvojem průmyslu v důsledku lidské činnosti. Příkladem je korelace mezi využíváním uhlí a intenzitou znečištění. Ze studie sedimentů byl zjištěn zvýšený obsah znečišťujících látek (včetně PAU) v evropských zemích během průmyslové revoluce, zatímco v letech 1950 až 1960 došlo v důsledku omezení využívání uhlí v průmyslu k poklesu obsahu uvedených polutantů v sedimentech. Vzhledem k rozvoji analytických metod a přístrojů je tato problematika řešena teprve poměrně krátké období (Vácha 2019).

Hlavním problémem PAU je převážně jejich negativní dopad na zdraví lidí a živočichů. Nedokonalým spalováním dochází k uvolňování těchto látek do životního prostředí a vlivem lidské činnosti celkový obsah těchto látek v prostředí stále stoupá. Vstupem do potravního řetězce se stávají nebezpečnými pro všechny organismy a u člověka vyvolávají různá onemocnění, jako jsou mutagenita nebo karcinogenita. Z toho důvodu US EPA vytvořila seznam 16 prioritních PAU, které by měly být více sledovány a z životního prostředí odstraňovány (Samanta et al. 2002).

Státní zdravotní ústav Praha analyzoval obsah těchto 16 PAU v půdách dětských hřišť po celé ČR, která poukazují na situaci jednotlivých lokalit. Nejvyšší kontaminace půd byly zjištěny v Ostravě, zvýšený obsah byl ale zaznamenán i na jiných místech po celé ČR (Zimová et al. 2006). To značí, že výskyt PAU je všudypřítomný a vzdálenost od zdroje pouze určuje míru kontaminace jednotlivých lokalit.

Výběr vhodné metody k odstranění kontaminantů z životního prostředí závisí na mnoha faktorech a pro každý typ znečištění nebo lokalitu mohou být odlišné. Bioremediace jsou poměrně efektivní, šetrné k životnímu prostředí a levnější v porovnání s jinými remediálními metodami, a proto se stávají preferovanou volbou pro čištění kontaminované půdy (Wu et al. 2008). Mnoho studií s cílem zjištění schopnosti a účinnosti degradace PAU různými druhy rostlin a mikroorganismů v půdách bylo již provedeno. Mezi velmi účinné organismy spadají právě houby bílé hniloby a jejich lignin degradující systém, který je schopný degradovat širokou škálu PAU (Boyle et al. 1998). Nové metody naznačují lepší efektivitu odstraňování PAU z půd využitím více druhů organismů. Klíčová je stimulace aktivity mikroorganismů nebo rostlin a zvýšená produkce enzymů, podílejících se na degradaci (Macek et al. 2000). Využití rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.) společně s myceliem hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., kmen HK35) by proto mohlo vést k velmi intenzivní degradaci velké škály PAU. Schopnost těchto 2 organismů degradovat PAU byla již ověřena v předchozích výzkumech (Košnář et al. 2019). Aplikovatelnost v reálných podmínkách přirozeného prostředí však nikoli. Tento experiment byl proto nastaven tak, aby co nejlépe odpovídal přirozenému prostředí včetně popelu jako kontaminující složky půd a kukuřice jako základní plodiny intenzivně pěstované v současném zemědělství.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Hypotézy experimentální práce:

- 1) Předpokládáme, že při aplikaci popele obsahujícího PAU do půdy oseté kukuřicí setou (*Zea mays* L.) se kontaminace těmito látkami v průběhu času bude snižovat.
- 2) Předpokládáme, že při aplikaci popele obsahujícího PAU do půdy a přidáním mykoremediačních substrátů obsahujících hlívu ústříčnou (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., kmen HK35) se kontaminace těmito látkami v průběhu času bude snižovat.
- 3) Očekáváme, že nejvyšší účinnost degradace PAU v půdách kontaminovaných popelem bude u variant s přítomností jak rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.), tak mykoremediačních substrátů obsahujících hlívu ústříčnou (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., kmen HK35).
- 4) Očekáváme přítomnost PAU v kořenech rostlin a nadzemní biomase kukuřice seté (*Zea mays* L.) v důsledku extrakce těchto látek z půd.

Cíle experimentální práce:

- 1) Zjistit změny obsahu PAU v půdě po aplikaci popela v přítomnosti rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.).
- 2) Zjistit změny obsahu PAU v půdě po aplikaci popela a mykoremediačních substrátů obsahujících hlívu ústříčnou (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., kmen HK35).
- 3) Zjistit změny obsahu PAU v půdě po aplikaci popela a mykoremediačních substrátů obsahujících hlívu ústříčnou (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., kmen HK35) v přítomnosti rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L.).
- 4) Stanovit obsah PAU v rostlinách kukuřice seté (*Zea mays* L.) po jejich extrakci z půdy.

3 Charakteristika, vlastnosti a rozdělení polycyklických aromatických uhlovodíků

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou organické látky, obsahující 2 a více cyklických sloučenin benzenu s aromatickými jádry, které jsou vzájemně propojené atomy uhlíku (Shen 2016). Mezi obecnou charakteristiku všech PAU je možné zařadit jejich nízkou rozpustnost ve vodě, nízkou tenzi par a lipofilní charakter (Connell 1997). Se zvyšující se molekulovou hmotností se snižuje tenze par, těkavost, Henryho konstanta a rozpustnost ve vodě, avšak i pro PAU se dvěma cykly ve sloučenině je rozpustnost ve vodě velmi nízká (viz tabulka 1) (Connell 1997; Shen 2016). Henryho konstanta vyjadřuje poměr parciálního tlaku sloučeniny ve vzduchu ku koncentraci sloučeniny ve vodě při dané teplotě. Tato konstanta je nazývána také jako rozdělovací koeficient vzduch-voda (Katyal & Morrison 2007). Používá se jako indikátor potenciálu volatilizace jednotlivých látek (ATSDR 1995). Se zvyšující se molekulovou hmotností dochází také ke zvýšení jejich bodu tání a varu, přičemž pro naftalen jako nejjednodušší PAU s nejmenší molekulovou hmotností jsou tyto hodnoty nejnižší, zatímco pro koronen jsou naopak nejvyšší (Connell 1997). Problematická je jejich perzistence v životním prostředí, která se s rostoucí molekulovou hmotností zvyšuje (Connell 1997; Shen 2016). Z těchto vlastností vyplývá, že PAU s vyšší molekulovou hmotností jsou náchylnější k bioakumulaci, a tudíž pro organismy nebezpečnější. Rozdělovací koeficient oktanol-voda ($\log K_{ow}$) se pro PAU pohybuje v rozmezí mezi 3,36 až cca 6,90 (Connell 1997). Základní rozdělení všech PAU je podle počtu cyklických sloučenin v molekule na látky s nízkou molekulovou hmotností (2 až 3 cyklické sloučeniny), střední molekulovou hmotností (4 cyklické sloučeniny) a látky s vysokou molekulovou hmotností (5 až 6 cyklických sloučenin v molekule) (Riaz et al. 2019).

Problematické se stávají PAU také z důvodu jejich schopnosti přenosu na dlouhé vzdálenosti, kdy dochází ke kontaminaci oblastí vzdálených od samotného zdroje znečištění. Transport PAU je ovlivněn mnoha faktory a jejich šíření je omezováno fotochemickou degradací nejčastěji s volnými radikály NO_2^{\bullet} nebo OH^{\bullet} v ovzduší, suchou a mokrou depozicí nebo s produkty rozpadu plynných částic. Běžná je také výměna látek mezi povrchem a ovzduším, která je důležitá jak z hlediska transportu, tak i z hlediska osudu PAU v jednotlivých složkách životního prostředí, včetně půdy a vody (Shen 2016).

3.1 Popis vybraných sloučenin

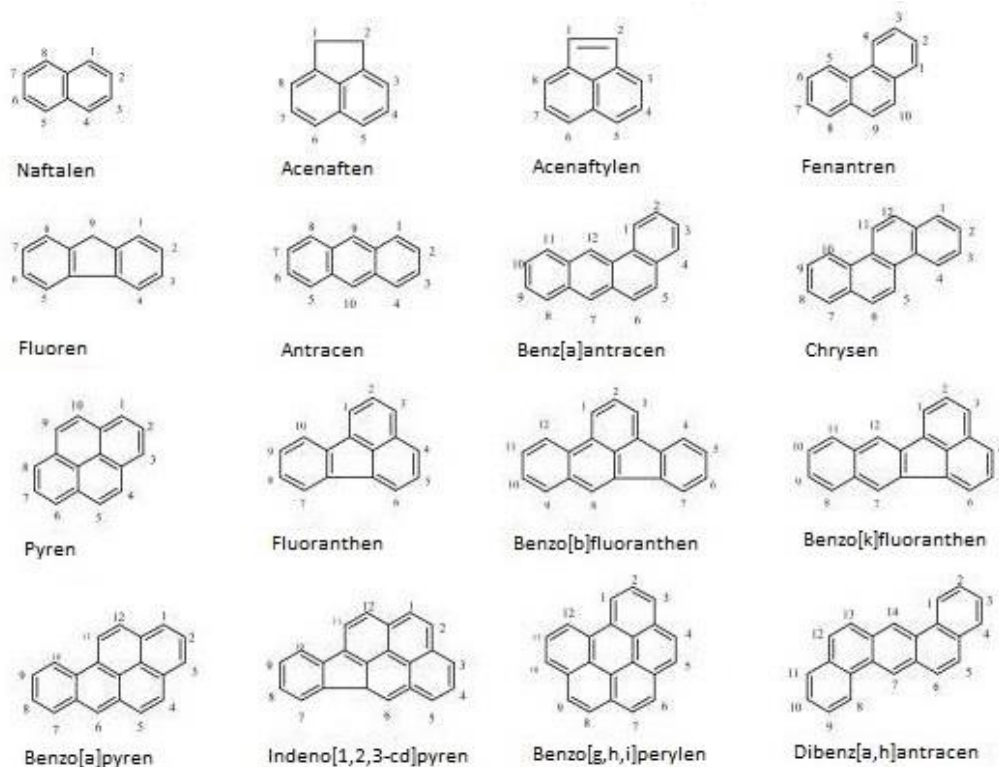
Mezi nejvýznamnější PAU, patřících do skupiny tzv. „prioritních znečišťujících látek“ podle US EPA (United States Environmental Protection Agency), patří těchto 16 látek: acenaftalen, acenaften, antracen, benz[a]antracen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[g,h,i]perylen, benzo[a]pyren, chrysen, dibenz[a,h]antracen, fluoren, fluoranthen, indeno[1,2,3-cd]pyren, naftalen, fenantren, pyren. Pro tyto látky jsou vytvořené přesné analytické testovací metody a jejich obsah v prostředí je regulován legislativou (US EPA 2014). Vzhledem k odlišné struktuře molekul nejsou vlastnosti a chování

v prostředí jednotlivých PAU stejné, pro sloučeniny s podobnou strukturou a molekulovou hmotností jsou ale velmi podobné (Shen 2016). Základní vlastnosti všech 16 PAU dle US EPA jsou uvedené v tabulce 1 a jejich molekulární struktura je znázorněna na obrázku 1.

Tabulka 1. Základní chemicko-fyzikální vlastnosti PAU ze skupiny prioritních znečišťujících látek dle US EPA (ATSDR 1995; Shen 2016)

PAU	ZK	BJ	MH	S	BV	BT	R	T	H	log K _{ow}
Naftalen	NA	2	128,18	N	209	80	31,5	$1,1 \cdot 10^1$	43,0	3,37
Acenaftylen	ACE	2	152,20	N	290	124	3,93	$8,9 \cdot 10^{-1}$	11,55	4,00
Acenaften	AC	2	154,20	N	252	108	3,93	$2,9 \cdot 10^{-1}$	24,0	3,92
Fluoren	FL	2	166,23	N	276	119	1,98	$8,0 \cdot 10^{-2}$	8,50	4,18
Fenantren	FE	3	178,24	N	326	136	1,15	$2,5 \cdot 10^{-2}$	4,0	4,57
Antracen	AN	3	178,24	N	326	136	0,075	$1,1 \cdot 10^{-3}$	6,0	4,54
Fluoranthén	FLU	3	202,26	S	369	166	0,206	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,659	5,22
Pyren	PY	4	202,26	S	369	166	0,132	$5,5 \cdot 10^{-4}$	1,10	5,18
Benz[a]antracen	BaA	4	228,30	V	400	177	0,009	$1,5 \cdot 10^{-5}$	0,102	5,91
Chrysen	CH	4	228,30	V	400	177	0,002	$6,1 \cdot 10^{-7}$	0,106	5,86
Benzo[b]fluoranthén	BbF	4	252,32	V	461	209	0,002	$2,1 \cdot 10^{-5}$	0,054	5,80
Benzo[k]fluoranthén	BkF	4	252,32	V	430	194	0,0008	$1,3 \cdot 10^{-7}$	0,111	6,00
Benzo[a]pyren	BaP	5	252,32	V	461	209	0,004	$7,5 \cdot 10^{-7}$	0,009	6,04
Indeno[1,2,3-cd]pyren	IP	5	276,34	V	498	233	0,0005	$1,0 \cdot 10^{-10}$	-	6,50
Dibenz[a,h]antracen	DA	5	278,36	V	487	218	0,0006	$4,3 \cdot 10^{-10}$	0,007	6,75
Benzo[g,h,i]perylene	BP	6	276,34	V	467	218	0,0003	$1,4 \cdot 10^{-10}$	0,001	6,50

ZK – zkratka/ **BJ** - počet benzenových jader/ **MH** – relativní molekulová hmotnost/ **S** - skupina dle MH a počtu cyklů ve sloučenině (**N** = nízko, **S** = středně a **V** = vysokomolekulární)/ **BV** - bod varu (°C)/ **BT** - bod tání (°C)/ **R** - rozpustnost ve vodě při 25°C (mg/l)/ **T** - tenze par při 25°C (Pa)/ **H** - Henryho konstanta (Pa·m³/mol)



Obrázek 1. Molekulární struktura PAU ze skupiny prioritních znečišťujících látek dle US EPA (Yan et al. 2004).

3.2 Zdroje, způsoby vzniku a formy výskytu v životním prostředí

Výskyt PAU v životním prostředí je v současné době všudypřítomný (Yan et al. 2004). Do prostředí se uvolňují v důsledku nedokonalého spalování organických materiálů. Zdroje PAU je možné rozdělit na pyrogenní, petrogenní nebo biologické. Dále jsou rozdělovány na zdroje přirozeného nebo antropogenního původu. Mezi hlavní přirozené zdroje patří lesní požáry a sopečná aktivita, do prostředí se ale mohou dostávat také v důsledku přirozeného prosakování ropných látek, erozí sedimentárních hornin obsahujících ropné uhlovodíky, mohou být také syntetizovány určitými rostlinami a bakteriemi nebo jsou uvolňovány během degradace rostlinné hmoty. Z antropogenních zdrojů sem spadá kouření, spalování fosilních paliv v dopravě, lokální topeniště, průmysl, úniky ropných produktů ze zásobníků nebo splaškové kalů a další odpadní materiály (Abdel-Shafy & Mansour 2016). Průmyslové činnosti, podílející se na vzniku PAU jsou: výroba elektrické a tepelné energie, zpracování kovů, krakování, výroba koksu, asfaltu, pigmentů, barviv, plastů, pesticidů, léčiv, pryskyřic a ochranných prostředků na dřevo (Connell 1997; Abdel-Shafy & Mansour 2016; Shen 2016). Do prostředí se také dostávají spalováním biologických odpadů, zemědělskou činností nebo v důsledku odlesňování spalováním organických zbytků po těžbě dřeva (Shen 2016). Kouření cigaret není až takovým producentem těchto látek oproti ostatním činnostem, jeho význam je důležitý převážně z hlediska expozice lidskému organismu (Connell 1997). Spalováním organických materiálů (např. spalování dřeva) za nízkých teplot (přibližně do 500 °C) dochází

obvykle ke vzniku PAU s nízkou molekulovou hmotností, zatímco procesy probíhající za vysokých teplot, jako je spalování paliv v motorech, uvolňují do ovzduší PAU s vyšší molekulovou hmotností (Tobiszewski & Namieśnik 2012). Odhady celosvětové celkové emise 16 základních PAU do ovzduší jsou 60,5 % ze spalování biomasy v lokálních topeništích a průmyslu, 13,6 % ze spalování zemědělského odpadu, odlesňování a požárů a 12,8 % z provozu motorových vozidel (Holme et al. 2019). Vývoj v posledních 30 letech ukazuje zvyšování koncentrace PAU v půdách a vzhledem ke stále zvyšujícím se emisím z antropogenních činností je předpokladem pro další roky nárůst obsahu těchto látek v životním prostředí (Kuppusamy et al. 2017).

Nedokonalé spalování organických materiálů (převážně fosilních paliv) vede k tvorbě PAU více způsoby. Během samotného spalování dochází ke vzniku různých typů PAU, přičemž mohou být uvolňovány buď v nezměněné formě nebo transformovány pomocí dalších látek, vyskytujících se v prostředí. Během transformace dochází vlivem vysokých teplot k přetrhání vazeb s uhlíkem a vzniklé volné radikály dále reagují v prostředí s dalšími látkami. V prostředí s dostatečným množstvím kyslíku by z těchto radikálů vznikaly CO_2 a H_2 , avšak vzhledem ke skutečnosti, že v přirozeném prostředí kyslík není rovnoměrně rozprostřen, nehledě na jeho množství, dochází za těchto podmínek k tvorbě jiných sloučenin s fragmenty, volně se zde vyskytujícími. Ochlazováním takto vzniklých směsí se jednotlivé látky stávají více komplexními, což mnohdy vede právě ke vzniku PAU (Connell 1997). Základním principem transformace a vzniku složitějších sloučenin je přenos atomů vodíku a navázání acetylenů na stávající sloučeninu. V prvotní fázi transformace dochází k odtržení atomu vodíku z uhlovodíkového řetězce jednoduššího PAU. Na volnou vazbu se váže acetylen, který přijímá volný atom vodíku. Vazba acetylenu probíhá i na dalších atomech uhlíku v řetězci PAU. Následně probíhá rotace acetylenu a vzniká tak nový cyklický řetězec. Tímto způsobem dochází ke vzniku složitějšího PAU a volného atomu vodíku, který je ze sloučeniny eliminován (Liu et al. 2019). Přirozenou reakcí všech látek vstupujících do prostředí je tvorba jejich stabilnějších forem. PAU mají tudíž tendenci se v prostředí vyskytovat ve formě konjugovaných benzenových jader. Množství vznikajících PAU závisí na mnoha faktorech, jako je teplota spalování nebo chemické složení spalovaného organického materiálu. Na druhou stranu jejich vysoká schopnost absorpce UV a viditelného záření může těmto sloučeninám dodávat dostatek energie umožňující transformaci a chemickou modifikaci, což by vedlo ke snížení jejich stability v prostředí (Connell 1997). Vzhledem k nízké tenzi par PAU jsou tyto látky v ovzduší přítomné jak v plynné, tak i v pevné krystalické formě nebo adsorbované na pevné částice (Shen 2016). Tyto organické látky jsou obvyklou součástí partikulárních částic spadajících do skupiny označované jako $\text{PM}_{2,5}$. Jejich množství závisí převážně na zdroji, který v tomto případě zastupují převážně výfukové plyny ze spalování nafty. Částice ze spalování nafty jsou z 20 až 40 % z celkové hmotnosti tvořeny organickými složkami, jako jsou např. n-alkany. Z organických látek vázaných na partikulární částice jsou nejznámější právě PAU. Tendence vázat se na pevné částice mají spíše středně a vysokomolekulární PAU se 4 a více cykly ve sloučenině, zatímco nízkomolekulární PAU se v ovzduší vyskytují převážně v plynné fázi. Zastoupení PAU v ovzduší je ale dáno více faktory, jako jsou typ paliva, zatížení motoru, technologie spalování nebo

teplota prostředí. V zimním období tudíž dochází k výrazně vyšší vazbě PAU na pevné částice než v období letním (Holme et al. 2019). Zda se budou PAU vázat na pevné částice nebo budou v atmosféře přítomné v plynné fázi záleží také na celkové koncentraci PM_{2,5} v prostředí (Tobiszewski & Namieśnik 2012).

K posuzování a hodnocení závažnosti kontaminací na lokalitách ČR jsou stanoveny indikátory znečištění zemin (tabulka 2), podzemní vody a půdního vzduchu. Hodnoty jsou odvozené od monitorování PAU v půdním prostředí dle US EPA, které určují koncentrace různých chemických látek v jednotlivých složkách životního prostředí, jejichž překročení by si mělo vyžádat další průzkum či odstranění kontaminace. Hodnoty odpovídají míře přijatelného nekarcinogenního rizika kvocientu nebezpečnosti HQ (z angličtiny „Hazard Quotient“) = 1 a zvýšenému celoživotnímu riziku vzniku rakoviny ELCR (z angličtiny „Excess Lifetime Cancer“ Risk) = $1 \cdot 10^{-6}$ (MŽP 2014). HQ udává poměr potenciální expozice dané látky a úrovně, při které se neočekávají žádné nepříznivé účinky. Pokud je HQ < 1, neočekávají se v důsledku expozice žádné nepříznivé účinky na zdraví, HQ = 1 a více značí možnost výskytu nepříznivých účinků na zdraví (US EPA 2011). ELCR představuje riziko úmrtí na rakovinu nad „přirozené“ základní riziko, které je výsledkem celoživotního vystavení karcinogenům (Freni 1987). Indikátory znečištění se využívají pro indikaci znečištění chemickými látkami, pro indikaci míst bez závažného znečištění, k výběru prioritních škodlivin během analýzy rizik, k posuzování intenzity znečištění nebo jako dočasný sanační limit při havarijních situacích, kdy hrozí nebezpečí z prodlení. Indikátory znečištění ale nejsou sanační limity. Ty se stanovují posouzením rizik, specifických pro danou lokalitu (MŽP 2014).

Tabulka 2. Přehled hodnot indikátorů znečištění zemin (MŽP 2014).

PAU	PVÚ (mg.kg ⁻¹ sušiny)	OP (mg.kg ⁻¹ sušiny)
Acenaften	33 000	3 400
Antracen	170 000	17 000
Benzo[a]antracen	2,1	0,15
Benzo[a]pyren	0,21	0,015
Benzo[b]fluoranthen	2,1	0,15
Benzo[k]fluoranthen	21	1,5
Dibenzo[a,h]antracen	0,21	0,015
Fluoren	22 000	2 300
Fluoranthen	22 000	2 300
Chrysen	210	15
Indeno[1,2,3-cd]pyren	2,1	0,15
Naftalen	18	3,6
Pyren	17 000	1 700

PVÚ – průmyslově využívaná území/ OP – ostatní plochy

3.3 Akumulace v půdách, sedimentech a jiných odpadních materiálech

Vstup PAU do půdního prostředí probíhá buď přímo ze zdroje nebo pomocí atmosférické depozice (Riaz et al. 2019). Atmosférická depozice je hlavní způsob vstupu PAU do půd (Tobiszewski & Namieśnik 2012). V atmosféře dochází k jejich vazbě na různé částice a pomocí suché, a především mokré depozice se dostávají do půdy nebo vody. Celkový obsah PAU, vstupujících do půd v důsledku atmosférické depozice, je výrazně ovlivněn atmosférickými procesy. Díky nim se kontaminanty mohou přenášet do odlehlých částí krajiny a v závislosti na meteorologických podmínkách se zde ukládat. Vlivem emise, eroze půd a dalších činností se pak PAU dostávají do vodních nádrží, kde dochází k jejich ukládání v sedimentech (Riaz et al. 2019). Akumulace PAU v sedimentech je závislá na složení sedimentu, velikosti zrn nebo obsahu organické hmoty. Příkladem přímého vstupu PAU do vodního prostředí jsou odpadní vody z petrochemického průmyslu, zatímco PAU pyrogenního původu jsou emitovány do ovzduší a teprve odtud ukládány do dalších složek životního prostředí (Tobiszewski & Namieśnik 2012). Pro PAU s nízkou molekulovou hmotností je typické jejich možný výskyt v plynné formě, tudíž se mohou naopak z půdy uvolňovat do ovzduší. Na rozdíl od atmosféry ale dochází v půdách a sedimentech k jejich akumulaci a stávají se tak konečnou složkou životního prostředí pro ukládání těchto látek (Riaz et al. 2019).

Celkový obsah PAU v zemědělských půdách ČR je regulován limitními hodnotami danými legislativou viz tabulka 3. Vyhláška č. 153/2016 Sb. o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu uvádí preventivní a indikační hodnoty celkové sumy vybraných PAU a samostatně celkový obsah pro benzo[a]pyren. Při překročení indikačních hodnot rizikových látek může být ohroženo zdraví lidí a zvířat.

Tabulka 3. Limitní obsahy PAU v zemědělských půdách dle vyhlášky č. 153/2016 Sb.

Látka	Preventivní hodnota	Indikační hodnota
ΣPAU	1,0 mg.kg ⁻¹ sušiny	30,0 mg.kg ⁻¹ sušiny
Benzo[a]pyren	-	0,5 mg.kg ⁻¹ sušiny

ΣPAU - antracen, benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[a]pyren, benzo[g,h,i]perylene, fenantren, fluoranthen, chrysen, indeno[1,2,3-cd]pyren, naftalen, pyren

V závislosti na obsahu PAU v půdách jsou půdy označovány jako neznečištěné (koncentrace < 0,6 mg.kg⁻¹), mírně znečištěné (0,6 až 1 mg.kg⁻¹), znečištěné (1 až 5 mg.kg⁻¹), silně znečištěné (5 až 10 mg.kg⁻¹) a velmi silně znečištěné (koncentrace > 10 mg.kg⁻¹) (Kuppusamy et al. 2017).

Popel ze spalování biomasy

Ačkoli nepatří spalování biomasy v celosvětovém měřítku mezi primárními zdroje energie, její využití neustále roste. Z environmentálního hlediska se jedná o bioenergii získanou z obnovitelných zdrojů, je ale důležité sledovat také vznikající odpadní produkty, včetně popela (Masto et al. 2015). Popeloviny tvoří přibližně 5 % z celkové hmotnosti rostlinné

biomasy (Hynšt et al. 2016). Právě popel ze spalování biomasy může představovat hrozbu pro životní prostředí, a to z důvodu přítomnosti potenciálně toxických prvků a PAU (Masto et al. 2015).

Nejdůležitějšími faktory, ovlivňujícími vznik znečišťujících látek v zařízeních, určených ke spalování biomasy, jsou provozní podmínky kotle a typ spalovaného materiálu (Masto et al. 2015). Popel je možné rozdělit na roštový a úletový, jejich vlastnosti jsou odlišné a závisí nejen na typu biomasy a podmínkách spalování, ale také na růstových podmínkách, stáří rostliny a obsahu vody v biomase, použitých hnojivech a pesticidů během pěstování, doby a techniky sklizně, znečištění, skladování atd. Vznik PAU probíhá sekundárními reakcemi během pyrolýzy a za neúplného spalování při teplotách nad 400 °C, kdy dochází k aromatizaci uhlíkatých sloučenin (Ochecová et al. 2014). Mezi hlavní PAU emitované tímto způsobem patří antracen, fluoranthen, pyren, benzo[a]anthracene a chrysen. Zatímco jednodušší látky jsou emitovány v plynné fázi, složitější látky s vyšší molekulovou hmotností se stávají součástí popelu. Celkový obsah PAU je významně ovlivněn také množstvím nespáleného uhlíku v popelu v důsledku nedokonalého spalování. Redukce celkového obsahu uhlíku, a tudíž i snížení obsahu PAU v popelu, je možné docílit opětovným spalováním při teplotách vyšších než 550 °C nebo nastavením počátečních provozních podmínek spalování na tyto teploty (Masto et al. 2015). Obecně je vyšší výskyt PAU v popelu s obsahem spalitelné sušiny > 6 %. Příčinou může být sorpce těchto látek v pórovité struktuře nespálené organické hmoty (Hynšt et al. 2016).

Vzhledem k vysokému obsahu živin, zásaditému charakteru, schopnosti snížení mobility a biologické dostupnosti rizikových prvků v půdách, podpoře aktivity mikroorganismů, zlepšení celkové textury, aerace a vodní kapacity půd je možné popel s nízkým obsahem PAU využívat v zemědělství jako hnojivo (Ochecová et al. 2014; Masto et al. 2015). Popel přidávaný do hnojiv v ČR pochází pouze ze spalování dřeva a slámy. Hlavními složkami tohoto popelu jsou oxidy a karbonáty draslíku a vápníku, v menší míře pak fosfor a hořčík, které se zde mohou vyskytovat jak v rozpustné, tak nerozpustné formě (Hynšt et al. 2016). Ve vodě rozpustné frakce tvoří významný podíl a mohou dosahovat až 61 % z celkového obsahu popelu (Ochecová et al. 2014). Vzhledem k emisím NO_x během spalování je popel poměrně chudý na dusík. Vysoká koncentrace kationtů vytváří zásadité pH v rozmezí 10-12 (Hynšt et al. 2016). Hodnota pH klesá s rostoucí teplotou spalování a v průběhu času od vzniku popelu (Masto et al. 2015). Spalitelná organická hmota tvoří 2 až 10 % z celkové hmotnosti popelu v závislosti na procesu spalování (Hynšt et al. 2016). Obsah popelovin je pro jednotlivá paliva odlišný. Poměrně malé množství obsahuje dřevo (0,3 až 1 %), více popelovin obsahuje kůra, sláma nebo trávy a některé materiály, jako např. rýžové slupky, obsahují až 40 % (Ochecová et al. 2014). Z anorganických látek je kromě minerálních živin významnou součástí mnoho stopových prvků, které mohou být nezbytné nebo působit toxicky pro organismy (Hynšt et al. 2016).

Obsah PAU v hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech je regulován limitními hodnotami. Mezi tyto látky spadá také popel

ze samostatného spalování biomasy. Limitní hodnota pro ΣPAU v popelu, uvedená v příloze č. 1 k vyhlášce Ministerstva zemědělství č. 131/2014 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, ve znění pozdějších předpisů, a vyhláška č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv, činní 20 mg.kg⁻¹ sušiny. Maximální aplikační dávka popele ze samostatného spalování biomasy je 2 tuny sušiny.ha⁻¹ za 3 roky. Kromě popelu patří mezi významné zdroje PAU a rizikových prvků také kaly z čistíren odpadních vod, a proto je jejich současná aplikace společně s popelem v témže roce zakázána.

3.4 Přírozené způsoby odstraňování polycyklických aromatických uhlovodíků v životním prostředí

Hlavní degradační způsoby lze rozdělit podle převažujících procesů na chemické, fotolytické a metabolické. V mnoha případech mohou tyto procesy nastat současně, jsou však silně ovlivněny podmínkami prostředí, převážně teplotou, dostupností kyslíku a přítomností mikroorganismů. V důsledku emise při spalování se látky šíří do všech složek životního prostředí a následně dochází k jejich hromadění v sedimentech a ukládání do těla živých organismů. Živé organismy a jejich metabolismus lze tudíž brát také jako jeden z přírozených způsobů degradace PAU (Connell 1997).

V atmosféře dochází k degradaci PAU pomocí fotolýzy nebo oxidací s dalšími látkami, přítomnými v ovzduší (OH radikály, ozon, oxidy dusíku a další silné oxidanty). Fotolytická degradace probíhá také ve vodním prostředí. Poločas rozpadu v důsledku fotolytické aktivity je u částic v atmosféře výrazně nižší než u částic, vyskytujících se ve vodě nebo jiných organických rozpouštědlech (Tobiszewski & Namieśnik 2012). Z půd se tyto látky mohou buď ztrácet nebo degradovat v důsledku fyzikálních (těkáním, abiotickou ztrátou způsobenou výkyvy teplot), chemických (fotooxidace, vyluhování do podzemních vod) a biologických (absorpce rostlinami, degradace mikroorganismy) procesů (Kuppusamy et al. 2017).

3.5 Nežádoucí vlivy na organismy a zdraví člověka

Hlavními možnostmi příjmu PAU pro člověka je příjem trávicím ústrojím společně s potravou nebo vdechováním, a to jak rozptýlené kontaminace v ovzduší, tak přímým vdechováním PAU v důsledku kouření cigaret nebo pasivního vdechování cigaretového kouře (Holme et al. 2019). Nikoli nikotin, ale právě PAU jsou látky, které mají během kouření rakvinotvorné účinky. V cigaretovém kouři byl zjištěn výskyt flouanthenu, pyrenu, benzo[a]anthracenu, benzo[b,j,k]flouanthenu, benzo[a]pyrenu a perylenu, z nichž některé jsou označeny jako prokázané karcinogeny pro člověka (Connell 1997). Byla prokázána souvislost mezi vstupem PAU do organismu vdechováním a zvýšeným výskytem rakoviny plic (Shen 2016). K metabolické přeměně a eliminaci většiny PAU přijímaných ve formě potravy trávicím ústrojím dochází v játrech (Holme et al. 2019). Působení PAU na člověka může probíhat i pomocí kontaktu s pokožkou. Metabolická aktivace je vyvolávána dopadajícím slunečním zářením na pokožku a způsobuje fotomutagenní a fototoxické účinky. Tento stav

byl prokázán u 11 z 16 PAU uvedených jako prioritní polutanty životního prostředí dle US EPA. Dokonce byl u některých PAU sledován fotomutagenní efekt, ačkoli jejich mutagenita metabolickou aktivací v buňkách nebyla prokázána (Yan et al. 2004).

Právě karcinogenita pro živočichy včetně člověka je jejich největším problémem (Shen 2016). Sice zatím nebyla prokázána pro veškeré PAU, dá se však očekávat, že skoro pro všechny je možné stanovit určitý stupeň jejich karcinogenity, ačkoli tento stupeň může být velmi malý (Connell 1997). Benzo[a]pyren byl mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) označen jako nejvýznamnější prokázaný karcinogen pro člověka (Shen 2016). Činnost enzymů cytochromu P450 a následná přeměna PAU na dihydrodiol epoxidy, které jsou schopné se zabudovávat do DNA či hemoglobinu, mají za následek vznik nádorů (Connell 1997). Vzniklé reaktivní metabolity jsou kromě mutace a případného vzniku tumorů schopné reagovat s dalšími buněčnými strukturami, zasahovat do transkripce, replikace DNA a syntézy proteinů (Shen 2016). Z toho lze vyvodit, že opakovaná expozice nižším koncentracím vede u člověka a dalších živočichů k chronické otravě organismu. Celkový dopad PAU se pro jednotlivé organismy liší. Zatímco savci včetně člověka jsou schopni produkovat enzymy přeměňující tyto látky na polární, ve vodě rozpustné látky, pro vodní živočichy jsou PAU výrazně toxičtější a mohou u nich vyvolávat i akutní toxicitu (Connell 1997). PAU přijímané spolu s pevnými částicemi z ovzduší se mohou v těle uvolňovat a dostávat do krevního toku, kde působí negativně a vyvolávají další zdravotní obtíže organismu. Účinky se projevují převážně ve formě kardiovaskulárních onemocnění: hypertenze, trombóza, zvýšený výskyt zánětů, endoteliální disfunkce, ateroskleróza a infarkt myokardu (Holme et al. 2019).

4 Remediacce

Remediace jsou procesy zahrnující různé druhy metod, které vedou ke snížení nebo odstranění kontaminantů a jejich vlivů na jednotlivé složky životního prostředí za účelem snížení nepříznivých účinků na zdraví organismů a znovuvyužití kontaminované oblasti (Vidali 2001). Metody remediace je možné rozdělit podle složek životního prostředí, ve kterých daný dekontaminační proces probíhá (půda, povrchová voda nebo podzemní voda). Dále pak podle místa dekontaminace na *in situ* nebo *ex situ* technologie (Khan et al. 2004). *Ex situ* technologie jsou takové, které zahrnují fyzické odstranění kontaminovaného materiálu a jejich následnou úpravu mimo místo kontaminace. Oproti tomu *in situ* technologie umožňují zpracování tohoto materiálu přímo v místě kontaminace (Boopathy 2000). Podle způsobu degradace kontaminantů jsou metody rozděleny na fyzikálně-chemické, biologické, chemické a termické (Gan et al. 2009).

Fyzikálně-chemické metody jsou založené na extrakci rozpouštědlem nebo směsí více rozpouštědel. Průběh extrakce je možné rozdělit na desorpci z vazebného místa a následnou eluci do extrakční tekutiny. Jako extrakční činidla jsou využívána superkritická a subkritická tekutiny, ale i biologicky rozložitelné látky jako cyklodextriny nebo rostlinné oleje. Chemické metody degradují PAU pomocí oxidantů, kterými jsou např. Fentonovo činidlo, ozon, peroxokyselina, manganistan draselný, peroxid vodíku nebo aktivovaný persíran sodný

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Součástí chemických metod je také fotokatalytická degradace, využívající fotokatalyzátory k podpoře oxidačních reakcí v přítomnosti světelného záření. Další možnostmi jsou metody elektrokinetické, založené na elektromigraci iontů. Pro využití těchto metod k odstraňování PAU jsou potřeba solubilizační činidla. Tepelnou úpravou půd za vysokých teplot až 1 200 °C dochází k účinnému odstraňování PAU z půd. Nevýhodou při termickém zpracování půd je vlhkost, která musí být odstraněna a nutnost zařízení k regulaci znečišťování ovzduší odpadními plyny, vznikajícími během spalování. Vzhledem k nedostatkům jednotlivých metod byly vyvinuty integrované sanační technologie kombinující více procesů za účelem širší aplikovatelnosti a lepší účinnosti odstraňování (Gan et al. 2009).

Mezi nejpoužívanější *in situ* remediační technologie půd patří: vymývání, extrakce půdních par, proplachování půd, enkapsulace, aerace, solidifikace a stabilizace (využitím směsi asfaltu nebo pyrolýzy = vitrifikace), biologické metody (bioremediace, fyto-remediace a bioventing) (Khan et al. 2004). *In situ* technologie založené na tepelných procesech jsou: *in situ* spalování, odpařování a volatilizace, elektrické odporové vytápění (z angličtiny Electrical Resistance Heating), tepelné vodivé vytápění (z angličtiny Thermal Conduction Heating), extrakce parou, nízkoteplotní *in situ* tepelná remediace. Dalšími fyzikálně chemickými metodami jsou technologie přidavku aktivních látek (metody míchání hlubokých nebo mělkých půd s různými typy sorbentů, pojiv nebo chemicky aktivních látek-oxidantů) (Suthersan et al. 2016). Metody založené na elektrokinetických procesech umožňují odstranění převážně těžkých kovů z kontaminovaných půd. Mezi tyto metody patří odstranění těžkých kovů pomocí kationtových selektivních membrán nebo pomocí povrchově aktivních keramických obalů, využití elektrod potažených speciálně navrženým polymerním materiálem, elektrochemická geooxidace nebo elektrochemická výměna iontů. Tvorba propustných zón obsahujících sorbenty, katalytická činidla, pufrovací roztoky nebo oxidační činidla v kontaminovaných půdách a následný přenos kontaminantů do těchto zón aplikací elektrického proudu. Pro zlepšení účinnosti remediace se v některých případech aplikují do kontaminovaných půd tekutiny (většinou kyseliny) usnadňující transport kontaminantu, který je způsobený dodáváním stejnosměrného proudu elektrodami umístěnými v půdách. Elektrokinetické metody je možné kombinovat i s biologickými metodami, např.: elektrokinetické bioremediace (Virikutyte et al. 2002). *In situ* technologie jsou obvykle levnější než technologie *ex situ*, které navíc zahrnují těžbu a transport kontaminovaného materiálu (Cunningham et al. 1995).

Ex situ remediační technologie jsou přímé a absolutní metody úpravy půd. Způsoby nakládání s půdou mohou být: nadzemní zpracování vytěženého materiálu, uložení na skládku nebo zpracování ve spalovně (Suthersan et al. 2016). Nejpoužívanější *ex situ* technologie jsou: landfarming, tepelná desorpce a spalování (Khan et al. 2004). Je ale možné využívat i stejné postupy jako v případě *in situ* metod, včetně tepelných, biologických, chemických a fyzikálních procesů (Suthersan et al. 2016). *Ex situ* remediační metody jsou využívány z důvodu rychlejšího a komplexnějšího odstraňování kontaminantů z půd. Na druhou stranu jsou mnohdy dražší, vyžadují další vybavení oproti *in situ* technologiím a při jejich aplikaci dochází

k výraznému narušení lokality a tím i ke zvýšené expozici kontaminantů pro člověka a další organismy, vyskytujících se v blízkosti místa kontaminace. Z výše zmíněných důvodů je snaha k využívání biologických metod pro odstranění kontaminantů z životního prostředí (Suthersan et al. 2016).

4.1 Bioremediace

Bioremediace je metoda využívající přirozených vlastností živých organismů schopných degradace a odstraňování anorganických a organických kontaminantů z životního prostředí. Může probíhat jak v aerobním, tak v anaerobním prostředí. Výhodou anaerobní bioremediace jsou nižší ekonomické náklady, jelikož není potřeba velké aerační plochy. Zároveň je možné takto odstranit kontaminace z hlubších vrstev půdního profilu s omezeným množstvím kyslíku (Gan et al. 2009). Proces anaerobní degradace je pomalý a byl prokázán pro PAU s nízkou molekulovou hmotností. Degradace těchto látek probíhá za podmínek, redukujících dusičnany a sírany. Zvýšení účinnosti je možné docílit přidáním acetátu, laktátu, pyruvátu, chloridu sodného, celulózy nebo Fe. Průběh degradace PAU anaerobní cestou je možné rozdělit do několika kroků, přičemž proces začíná redukcí dusičnanů a síranů za vzniku organických kyselin s nízkou molekulovou hmotností. Reakcí s nerozpustnými oxidy Fe dochází ke vzniku ligandů, díky čemuž se Fe stává dostupné pro bakterie schopné jeho redukce a dochází tak k intenzivnější degradaci PAU (Haritash & Kaushik 2009). Bioremediace je podporovaná tzv. „přirozenou atenuací“, která je definována jako soubor všech dějů, přirozeně se vyskytujících v životním prostředí, které bez zásahu člověka vedou k omezení množství, toxicity, mobility, objemu nebo koncentrace kontaminantů (Soudek et al. 2008). Bioremediační metody lze stejně jako v případě jiných metod rozdělit na *in situ* a *ex situ*. Mezi *ex situ* bioremediační metody patří kompostování, využití bioreaktorů či biofiltrů. *In situ* metody jsou např. bioventing a biostimulace. Land farming a bioaugmentace je možné provádět obojím způsobem (Boopathy 2000). Výhodou bioreaktorů jako *ex situ* bioremediační metody je možnost kontroly teploty a tlaku pro docílení lepších podmínek a zlepšení procesu degradace. Stejně tak i během kompostování nebo využití kombinované bioremediační technologie na vysokých hromadách tzv. „biopiling“ (z angličtiny biopiles), které se stalo oblíbenou bioremediační metodou, je možné udržovat vhodné podmínky pro nejvyšší stupeň degradace. Land farming je metoda využívající tradičních zemědělských postupů jako je orba, provzdušňování, homogenizace, zavlažování nebo hnojení, které zlepšují vlastnosti půdy a přispívají tak k činnosti půdních mikroorganismů. Hlavní nedostatek metody je omezená zóna sanace na cca 10 až 35 cm silnou povrchovou vrstvou půdy. Biostimulace je vhodná pro velmi chudé půdy na živiny, kam jsou tyto látky uměle dodávány a dochází tak k podpoře přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, zatímco bioaugmentace dodává do půd s nízkým obsahem degradujících organismů uměle vypěstované kultury bakterií nebo hub (Kuppusamy et al. 2017). Ke zvýšení účinnosti bioremediačních metod je vhodné využít fyzikální či chemické předúpravy kontaminované půdy. Přidání slámy, kompostu, hnoje a dalších organických materiálů

napomáhá degradaci zlepšováním textury půdy, přenosem kyslíku a dodáním zdroje energie pro mikroorganismy v půdě (Haritash & Kaushik 2009).

Hlavními výhodami bioremediačních metod je možnost, provádět je přímo v místě kontaminace, jsou mnohdy levnější než klasické fyzikální nebo chemické metody, eliminují produkci odpadu a jejich aplikací nedochází k výraznému narušení stanoviště. V případě nutnosti je možná jejich kombinace s jinými, fyzikálními či chemickými metodami. Obecně jsou lépe přijímány veřejností (Boopathy 2000).

Nevýhodou je omezení jejich využití pouze na určité látky, které lze tímto způsobem odbourat. Obnáší riziko vzniku toxičtějších metabolitů v důsledku mikrobiální aktivity. Mnohdy se jedná o časově náročnější metody a je třeba počítat i s prostorovým omezením dané lokality. Z těchto důvodů, ale také z důvodu odlišnosti jednotlivých lokalit je nutné před samotným zahájením procesu provést studie pro danou oblast a vybrat vhodný postup remediací. Mezi nevýhody je možné zařadit také regulační předpisy přesně určující vhodné metody a limitní koncentrace kontaminantů, na které musí být jejich obsah snížen. Sporná je možnost využití geneticky modifikovaných organismů v bioremediacích, pro které je na rozdíl od přirozeně se vyskytujících organismů potřeba dodržovat specifické předpisy (Boopathy 2000).

4.1.1 Vliv podmínek na bioremediaci

Pro rostliny a půdní mikroorganismy je jedním z nejdůležitějších faktorů biologická dostupnost kontaminantů, která přímo ovlivňuje rychlost jejich degradace. Je řízena řadou fyzikálně chemických procesů jako jsou sorpce a desorpce, difúze či rozpouštění (Boopathy 2000). Biologická dostupnost závisí na lipofilitě sloučenin, půdním typu, pH, obsahu jílu, vlhkosti, typu půdní vody, výměnné iontové kapacitě, obsahu přijatelných živin a stáří kontaminantu (Kučerová et al. 1999; Vaněk et al. 2017). Stáří kontaminantu (tzv. „sekvestrace“) je možné definovat jako celkovou dobu, po kterou se kontaminant vyskytoval v životním prostředí (Kučerová et al. 1999). Dlouhodobý kontakt organických znečišťujících látek s půdními částicemi vede ke zvýšené vazbě těchto kontaminantů na půdní částice a v důsledku toho dochází ke snížení biologické dostupnosti pro organismy, tedy ke snížení schopnosti biodegradace. Na sekvestraci se podílí převážně organické složky půdy (humínové frakce), ovlivněna je ale více faktory, jako např. kationtovou výměnnou kapacitou, objemem mikropórů, strukturou půdy nebo plochou povrchu (Haritash & Kaushik 2009). V důsledku sekvestrace dochází k hlubšímu průniku kontaminantu v půdním profilu. Z hlediska biologické dostupnosti a desorpce lze PAU rozdělit do skupin: a) snadno desorbující a biologicky dostupné frakce, b) těžce se desorbující frakce s nízkou dostupností a c) zcela nedostupné frakce (Kadri et al. 2017). Biologická degradace je jedním z nejdůležitějších procesů v půdách. Některé látky podléhají nevratné sorpci do půdní organické hmoty. Rychlost a celkový rozsah odstraňování PAU se v průběhu času snižuje v důsledku poklesu biologicky dostupných frakcí. Pokles intenzity odstraňování je typický pro půdy s vysokým obsahem organických látek a jílu, kde je významná převážně sekvestrace a difúze do mikropórů (Kuppusamy et al. 2017).

Biologická dostupnost je spjata s mobilitou kontaminantu, která je ovlivněna silnou absorpcí kontaminantu na půdní matrici a jejich nízkou a pomalou rozpustností (Cerniglia 1993). Jednotlivé faktory mají za následek zpomalení transportu kontaminantů do vodné fáze, která umožňuje snazší příjem pro organismy (Boopathy 2000). Přístupnost látek pro organismy vyjadřuje koeficient oktanol-voda K_{OW} . Pro mírně hydrofobní látky, které jsou rostlinami nejlépe vstřebávány, se $\log K_{OW}$ pohybuje v rozmezí od 0,5 do 3. Pokud je hodnota K_{OW} nižší, látky jsou hydrofilní a nedochází tak k jejich dostatečné sorpci na kořeny rostlin ani k aktivnímu transportu v rostlinných tkáních. Naopak pokud je hodnota K_{OW} vyšší, látky jsou hydrofobní a dochází k jejich vazbě na lipidy, přítomné na povrchu kořenů rostlin, což činní jejich vstup do organismu obtížnější (Vaněk et al. 2017).

Efektivita odstraňování PAU z půd biologickou cestou je ovlivňována také teplotou prostředí, sezónními faktory, zastoupením organické hmoty, přítomností mikroorganismů schopných degradace PAU, vlastnostmi kontaminantů, celkovou koncentrací PAU a hloubkou v půdním profilu (Cerniglia 1993). Rychlost degradace závisí více na desorpci kontaminantů z půdních částic než na degradační schopnosti mikroorganismů. Rychlost desorpce je udávána difúzí kontaminantů, kterou je možné v půdách urychlit zvyšováním teploty nebo chemickým ošetřením. Zvyšováním teploty dochází ke snižování rozdělovacího koeficientu půda-voda a zvýšenému přenosu hmoty v půdě. Organickými rozpouštědly lze zase zvýšit rychlost přenosu hydrofobních sloučenin v půdě a následné redistribuci znečišťujících látek. Podpora biologické dostupnosti PAU je způsobena také bioaugmentací a s ní souvisejícím vznikem biosurfaktantů (Haritash & Kaushik 2009). Produkce surfaktantů mikroorganismy je možné zlepšit dodáním lehkých rostlinných olejů, které jsou významným zdrojem živin a uhlíku. Levným zdrojem těchto olejů jsou odpadní vody a vedlejší produkty z výroby a zpracování rostlinných olejů (např. olivový olej). Významný zdroj živin tvoří také další odpadní materiály z potravinářského průmyslu, jako např. odpady z lihovarnictví, mlékárenského průmyslu (výroba syrovátky) nebo odpadní vody vznikající během zpracování brambor či manioku (Amodu et al. 2013).

4.1.2 Fytoremediace

Jedná se o metody využívající schopnost zelených rostlin přijímat, akumulovat a degradovat kontaminanty, které jsou přítomné v půdním nebo vodním prostředí (Khan et al. 2004). Jednotlivé procesy probíhající během fytoremediace jsou znázorněny na obrázku 2. Kontaminanty jsou buď kompletně odstraněny nebo může docházet k jejich přesunu z půd nebo z vodního prostředí a následně k jejich akumulaci v rostlinách. Jednotlivé rostliny jsou schopné jak adsorpce, tak i absorpce organických i anorganických polutantů (Kučerová et al. 1999). Základními procesy jsou extrakce (těžkých kovů nebo radionuklidů), degradace a volatilizace (převážně organických sloučenin) a stimulace mikroorganismů v oblasti rhizosféry. Účinnost fytoremediace závisí mimo jiné také na agronomických opatřeních, jako je hnojení, zavlažování, zvyšování biodostupnosti kontaminantů pomocí syntetických chelatorů, výběr vhodných rostlin, hustota rostlin při výsadbě a střídání plodin (Soudek et al. 2008).

Fytoremediace je vhodná převážně k odstraňování hydrofobních polutantů v místech povrchového znečištění (Kučerová et al. 1999).

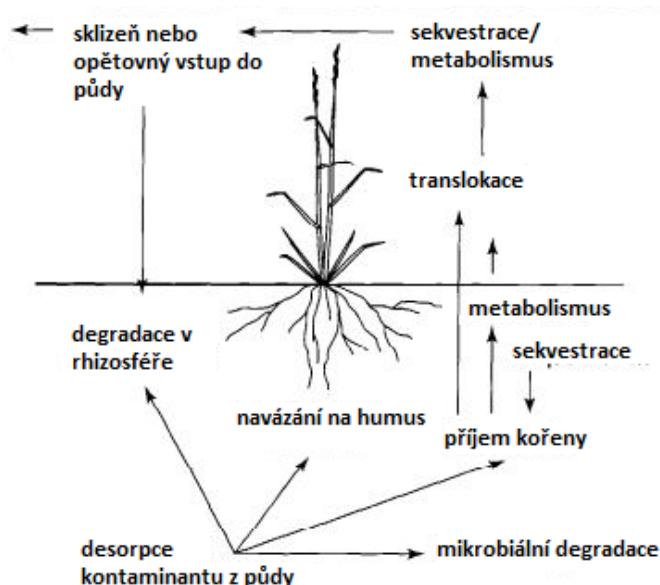
Tabulka 4. Seznam některých rostlin využívaných k degradaci PAU (Gan et al. 2009).

javor (<i>Acer L.</i>)	borovice vejmutovka (<i>Pinus strobus L.</i>)
vrba černá (<i>Salix nigra Marshall</i>)	trnovník akát (<i>Robinia pseudoacacia L.</i>)
topol (<i>Populus L.</i>)	morušovník červený (<i>Morus rubra L.</i>)
jílek vytrvalý (<i>Lolium perenne L.</i>)	choulostice indická (<i>Aeschynomene indica L.</i>)
oves setý (<i>Avena sativa L.</i>)	štírovník růžkatý (<i>Lotus corniculatus L.</i>)
jetel luční (<i>Trifolium pratense L.</i>)	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea Schreb.</i>)
ředkev setá (<i>Raphanus sativus L.</i>)	lupina mnoholistá (<i>Lupinus polyphyllus Lindl.</i>)
brukev řepka (<i>Brassica napus L.</i>)	proso prutnaté (<i>Panicum virgatum L.</i>)
paprika roční (<i>Capsicum annuum L.</i>)	komonice lékařská (<i>Melilotus officinalis (L.) Pall.</i>)
kopr vonný (<i>Anethum graveolens L.</i>)	srha laločnatá (<i>Dactylis glomerata L.</i>)

Hlavní výhodou fytoremediace je nižší množství odpadního materiálu, které je potřeba dále zpracovávat oproti běžným technologiím. Jedná se o *in situ* metodu s minimálním narušením životního prostředí a z hlediska energie potřebné pro fungování procesu jsou dostatečné přirozené zdroje (solární energie). Pro rozsáhlé oblasti s nízkou koncentrací kontaminantů se jedná o ekonomicky výhodnou metodu. Mineralizace organických polutantů může vést až ke vzniku základních sloučenin, jako jsou CO₂ a H₂O. V důsledku odčerpávání kontaminované podzemní vody kořeny rostlin dochází ke snižování dalšího šíření kontaminantů v životním prostředí (Khan et al. 2004). Tyto metody jsou vysoce akceptované veřejností, zlepšují estetické vlastnosti krajiny a přečištěnou kontaminovanou půdu je možné využít k zemědělským účelům (např. k pěstování energetických či technických plodin) (Khan et al. 2004; Soudek et al. 2008). Oproti jiným technologiím nedochází k výraznému vzniku emisí a prašnosti. Fytoremediační metody jsou rychlejší než přirozená atenuace a lze je kombinovat s jinými sanačními technologiemi, kde mohou sloužit jako konečné metody pro snížení obsahu kontaminantů na požadovanou úroveň (Soudek et al. 2008).

Nevýhodami a omezeními fytoremediace jsou nízká tolerance rostlin vůči kontaminantům, nízký transport kontaminantů z kořenů do nadzemní biomasy a nízký výnos biomasy (včetně hyperakumulátorů) (Cunningham et al. 1995; Soudek et al. 2008). Mnohdy se kontaminant nachází v biologicky nedostupné formě a chybí vhodné rostlinné druhy schopné degradace těchto látek (Soudek et al. 2008). Ideální by bylo využití rostlinných druhů přirozeně se vyskytujících na chudých a kontaminovaných půdách. Nevýhodou těchto rostlin je mimo jiné i jejich schopnost akumulace či přeměny pouze určitých látek, nedostupnost a nedostatek informací o jejich fyziologii, podmínkách pěstování či schopnostech odolávat

nepříznivým podmínkám prostředí (Kučerová et al. 1999). Během fytoremediace je potřeba další manipulace s rostlinným „odpadním“ materiálem, aby se zabránilo vstupu polutantů do potravního řetězce (Khan et al. 2004). Jedná se o dlouhodobý proces, který většinou zahrnuje více než 1 vegetační období. Oblast sanace je omezena pouze na oblast rhizosféry. Změna klimatických a hydrologických podmínek a faktorů prostředí může negativně ovlivnit průběh dekontaminace (Cunningham et al. 1995; Khan et al. 2004). Mezi problémy spadá také neobeznámenost s technologiemi u dozorčích orgánů, která vede k pochybnostem lidí vůči novým technologiím (Soudek et al. 2008). V praxi je problematické stanovit pravděpodobnou rychlost degradace, vývoj a celkovou dobu probíhající bioremediace (Gan et al. 2009). Zásadní je ale jejich výsledná účinnost, kdy oproti jiným metodám fytoremediace ne vždy dosahuje kompletního odstranění polutantů (Kučerová et al. 1999).



Obrázek 2. Fytoremediace organických polutantů z kontaminovaných půd (převzato z Cunningham et al. (1995), přeložil Petr Frühbauer).

a) Fytostabilizace

Fytostabilizace využívá vlastnosti kořenového systému rostlin k omezení vymývání kontaminantů z půd a zabraňuje tak jejich mobilitě. Mezi tyto vlastnosti patří adsorpce, absorpce, komplexace, precipitace, oxidace či redukce, zabudování do ligninu (organické látky) nebo do humusové složky půdy (Soudek et al. 2008; Vaněk et al. 2017). Velmi důležitá je provázanost jednotlivých systémů rostlin, mikroorganismů, kontaminantů a půdního prostředí, jelikož organismy svou aktivitou mění vlastnosti prostředí, a tudíž dochází i ke změně povahy kontaminantu. Je tedy možné pomocí činnosti organismů docílit např. změny rozpustnosti kontaminantu. Rostliny určené pro fytostabilizaci by neměly být schopné transportu kontaminantů do nadzemních částí z důvodu možné kontaminace potravního řetězce. Dále by měly být schopné snášet danou úroveň kontaminace s rozsahem kořenového systému až do kontaminované oblasti a měly by být schopné svou činností změnit biologické, fyzikální či chemické podmínky vedoucí k úspěšné stabilizaci polutantu v půdě (Vaněk et al.

2017). Rostliny není potřeba sklízet, přispívají k obnově ekosystému, snižují nebo zcela zabraňují prosakování kontaminantu, zabraňují vodní a větrné erozi půd a produkcí huminových látek vážou kontaminanty v půdě (Soudek et al. 2008; Vaněk et al. 2017). Jedná se ale o dlouhodobou metodu, při které nedochází k odstraňování kontaminantu, a proto se musí zabránit případnému uvolňování kontaminantu zpět do životního prostředí. Mnohdy je také potřeba úprava půdních vlastností hnojením a aplikací dalších látek (Vaněk et al. 2017). Účinnost fytoakumulace závisí na chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech půdy. Mnohdy se jedná o finální úpravu půd po jiné sanační technologii nebo pro obnovu vegetace na půdách s vysokou koncentrací kontaminantu, kde není možná obnova pomocí původní vegetace (Soudek et al. 2008). Je možné jí využít i pro zajištění kontaminované oblasti před dekontaminací nebo regulaci průtoku kontaminované podzemní vody jejím odčerpáváním kořeny rychle rostoucích rostlin (Kučerová et al. 1999).

b) Fytoakumulace

Tato metoda je někdy označována také jako fytoextrakce nebo fytoabsorpce (Soudek et al. 2008). Principem je absorpce kontaminantů kořeny rostlin a následně jejich ukládání v nadzemních částech rostlin, která je brána jako odpadní materiál, a proto s ní musí být náležitě zacházeno (Kučerová et al. 1999). Odpadní biomasa je pak následně umístěna na bezpečná uložení nebo dále chemicky, termicky nebo mikrobiálně zpracována (Kučerová et al. 1999; Vaněk et al. 2017). Během fytoakumulace se mohou využívat tzv. „hyperakumulátory“, kterými jsou např. rostliny z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) (Cunningham et al. 1995). Tyto druhy rostlin mají výraznou schopnost akumulace daného kontaminantu, jsou schopny snášet vysoké koncentrace znečištění, mají rozsáhlý kořenový systém, jsou rychle rostoucí a produkují velké množství biomasy (Cunningham et al. 1995; Vaněk et al. 2017). U většiny rostlin tomu tak není, a proto je potřeba využívat tradiční plodiny s tendencemi akumulovat kontaminanty nebo vytvářet křížence hyperakumulátorů s rostlinami s rychlejším růstem a vyšším výnosem biomasy. Výskyt těchto rostlin je obvykle vzácný a mnohdy chybí znalosti o jejich vlastnostech a podmínkách růstu (Cunningham et al. 1995). Metoda je vhodná pro sanaci těžkých kovů, metaloidů, nekovů či radionuklidů. Není vhodná pro odstraňování organických polutantů z důvodu vzniku toxičtějších metabolitů a jejich následnému úniku během respirace rostlin (Soudek et al. 2008). Vzhledem ke schopnosti extrakce může tato metoda po úpravě sklizené biomasy sloužit jako ekonomicky velmi výhodný způsob opětovného získávání těžkých kovů (Vaněk et al. 2017).

c) Rhizofiltrace

Kontaminanty ve vodním prostředí jsou pomocí precipitace nebo absorpce zachytávány kořenovým systémem, kde se akumulují. Rhizofiltrace je vhodná pro sanaci malých koncentrací polutantů ve větších objemech povrchových či splaškových vod (Soudek et al. 2008). Využívá se nejčastěji pro odstraňování kovů a radionuklidů z vodního prostředí. Způsoby nakládání s odpadní biomasou jsou stejné jako v případě fytoakumulace. Vhodnými rostlinami pro rhizofiltraci mohou být jak vodní, tak suchozemské druhy. Výhoda suchozemských rostlin je jejich vyšší vzrůst a rozvinutější kořenový systém, při jejich aplikaci

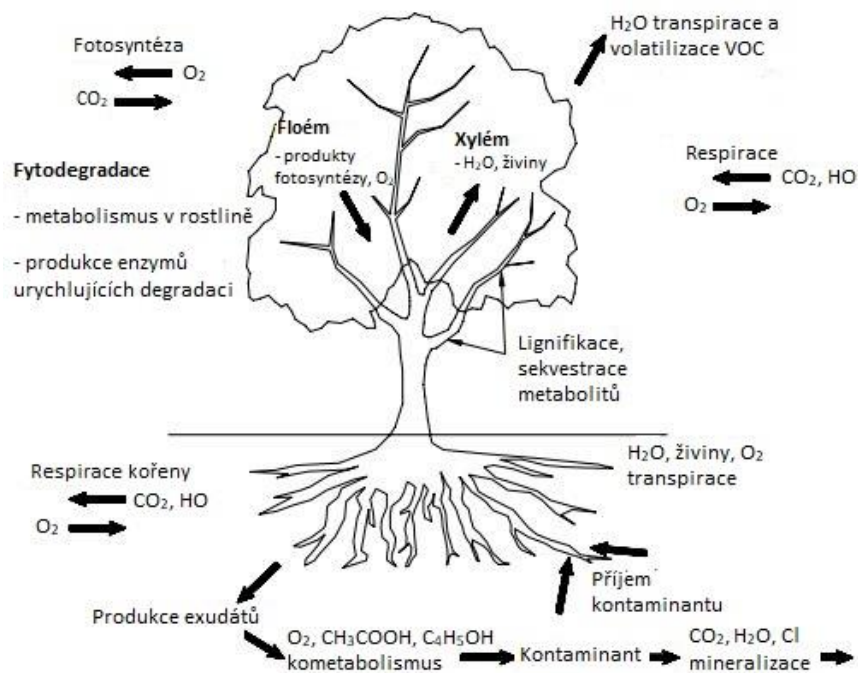
je však potřeba plovoucích konstrukcí. Mezi typické druhy využívané v této metodě patří např. orobinec (*Typha* L.), rákos (*Phragmites* Adans.), sítina (*Juncus* L.), ostřice (*Carex* L.) nebo ze suchozemských rostlin např. slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) (Vaněk et al. 2017).

d) Fytovolatilizace

Principem fytovolatilizace je přenos kontaminantu z půd do ovzduší, tudíž nedochází k jejich úplnému odstranění, akumulaci ani imobilizaci. Kontaminanty jsou přijímány kořenovým systémem a transportovány do nadzemních částí, přičemž mohou i nemusí být transformovány a následně jsou pomocí transpirace a těkání vylučovány z organismu (Soudek et al. 2008). Podmínkou fytovolatilizace je uvolnění kontaminantu do těkavé formy. Metodu lze použít hlavně pro organické polutanty (např. trichlorethylen), je ale možné jí využít i v případě anorganických kontaminantů (např. Hg) (Vaněk et al. 2017).

e) Fytodegradace

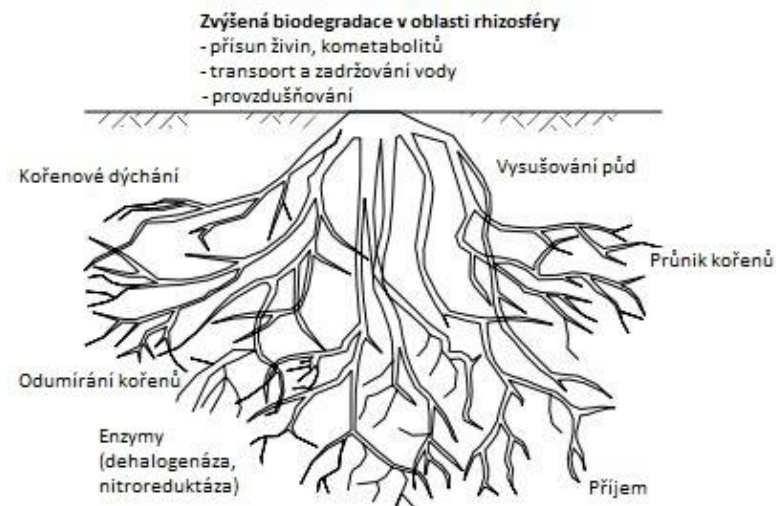
Fytodegradace využívá rostliny a mikroorganismy s nimi asociovanými (Vaněk et al. 2017). Během procesu dochází k přeměně a odbourávání kontaminantu, a to jak uvnitř organismu (fyto-degradace *in planta*), tak i v půdním prostředí v důsledku uvolňování rostlinných exudátů-enzymatických metabolitů kořeny rostlin (fyto-degradace *ex planta*), jak je zobrazeno na obrázku 3. Tento proces je vhodný převážně pro odstraňování organických polutantů (PAU, polychlorované bifenyly, residua výbušnin, detergenty nebo organochlorované pesticidy), důležité je však zabránění vzniku toxičtějších metabolitů, a to nejen pro danou rostlinu, ale i pro ostatní organismy (Soudek et al. 2008; Vaněk et al. 2017). Metodu lze využít k dekontaminaci půd, sedimentů, kalů z čistíren odpadních vod a znečištěných podzemních i povrchových vod (Vaněk et al. 2017). Pro fytodegradaci je nejdůležitější dosažitelnost organických molekul pro příjem, transport a metabolickou transformaci. Pokud je kontaminant příliš pevně vázán na půdní částice a nedochází k jeho absorpci organismy nebo transportu v půdním prostředí, je lepší využít fytostabilizaci než fytodegradaci (Cunningham et al. 1995).



Obrázek 3. Fytodegradační a fytovolatilizační mechanismy spojené s některými dalšími mechanismy, nezbytnými pro život rostlin (převzato z Suthersan et al. (2016), přeložil Petr Frühbauer).

f) Rhizodegradace

Základním principem rhizodegradace je podpora růstu a aktivity jednotlivých populací v oblasti rhizosféry prostřednictvím kořenových exudátů, obsahujících živiny pro mikroorganismy. Výsledkem je zvýšení počtu mikroorganismů a stimulace jejich aktivity, která vede ke zvýšení degradace kontaminantů (Soudek et al. 2008). Oblast rhizosféry včetně procesů zde probíhajících jsou znázorněny na obrázku 4. Metoda se využívá převážně pro odstraňování kontaminací v půdním prostředí a je možné takto odstraňovat ropné uhlovodíky (C10 - C40), PAU, polychlorované bifenyly, pesticidy a chlorovaná rozpouštědla. Na rozdíl od rhizofiltrace není u rhizodegradace potřeba rostliny sklízet, nevýhodou je ale nízké pole působnosti. Oblast rhizosféry se nachází přibližně 1 až 3 mm v okolí kořene a je tudíž ovlivňována rychlostí růstu kořene a hloubkou kořenové zóny (Vaněk et al. 2017).



Obrázek 4. Rhizodegradace a související procesy v rhizosféře (převzato z Suthersan et al. (2016), přeložil Petr Frühbauer).

Průběh degradace organických polutantů

Detoxikační procesy xenobiotik jsou přirozenou schopností rostlin, umožňující ochranu před toxickými účinky těchto látek. Jednotlivé procesy se liší v závislosti na struktuře polutantu, která ovlivňuje chování xenobiotik vůči buňce a biologickým membránám (Vaněk et al. 2017). Základní podmínkou pro průběh degradace je biologická dostupnost polutantů pro rostliny nebo mikroorganismy. Příjem závisí jak na vlastnostech polutantů, tak i na vlastnostech samotných organismů. V případě hydrofobních organických látek se polutant může podle vlastností buďto sorbovat na povrchu kořenů, akumulovat v rostlinných tkáních, transformovat nebo vytékat do ovzduší (Kučerová et al. 1999).

Příjem kontaminantů rostlinou probíhá převážně pomocí kořenového systému. U mokřadních druhů rostlin je možné kromě příjmu kořenem také vstup přímo do rostlinných tkání z vodního sloupce, ve kterém se rostlina nachází (Singh & Jain 2003). Mechanismy vstupu kontaminantů do rostliny mohou být buď difuze nebo přenos kontaminantů s transportním médiem. Příjem kořenem je dán právě difuzí v půdních pórech obsahujících vzduch či vodu a hmotnostním tokem. Kontaminanty společně s transportním médiem jsou v těle rostliny distribuovány transpiračním proudem (Trapp et al. 1994). Distribuce v rostlině závisí na xylémovém nebo floémovém transportu (Singh & Jain 2003). Pro rostliny je běžným procesem volatilizace, kdy dochází k výměně látek mezi listy rostlin a atmosférou. Tento proces je reverzibilní a v případě pomalejší volatilizace oproti transpiraci dochází k hromadění kontaminantů v listech a jejich následné redistribuci pomocí asimilačního proudu. Kontaminanty se mohou poté uvolňovat z listů do stonků a následně až do plodů, kde se akumulují (Trapp et al. 1994).

V rostlinách dochází ke 3 hlavním fázím během metabolické přeměny xenobiotik, a to k transformaci, konjugaci a kompartmentaci. Hlavními rostlinnými enzymy, podílejícími se na rozkladu organických kontaminantů, jsou cytochrom P450 a peroxidázy (Macek et al. 2000). Další enzymy, které se pravděpodobně podílejí na přeměně organických látek jsou glutathion

S-transferázy, dehalogenázy, nitroreduktázy, lakáza (fenoloxidáza) a nitrilázy (Macek et al. 2000; Vaněk et al. 2017). Rozpustné látky jsou ukládány ve vakuolách a nerozpustné látky v buněčné stěně nebo jsou vázány v nerozpustných buněčných strukturách, jako je lignin (Kučerová et al. 1999; Vaněk et al. 2017).

Z hlediska vstupu xenobiotik do buněk rostlin jsou látky polární a hydrofilní povahy pro rostliny méně nebezpečné, jelikož je rostlina schopna regulovat jejich příjem pomocí buněčných membrán. Vzhledem k fytoremediaci je však tento stav problematický a obecně jsou buňkami lépe přijímány látky nepolárního a lipofilního charakteru (Vaněk et al. 2017).

4.1.3 Degradace pomocí bakterií

Vysoká bakteriální aktivita byla zaznamenána převážně u degradace nízkomolekulárních PAU, jako je naftalen nebo fenantren. Vzhledem ke svým vlastnostem a schopnostem jsou v současné době využívány i pro degradaci složitějších sloučenin (Ghosal et al. 2016). Schopnost kompletní degradace složitějších sloučenin jako fluoranthenu, pyrenu, fluorenu nebo benz[a]antracenu byla prokázána např. u *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Beijerinckia sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.* a *Arthrobacter sp.* (Cerniglia 1993). V závislosti na přítomnosti kyslíku jsou degradační cesty děleny na aerobní a anaerobní. Aerobní degradace byla v minulosti více studována a bakteriemi je upřednostňována. Degradace je zprostředkovávána monooxygenázami a dioxygenázami, které se podílejí na hydroxylaci aromatických řetězců. Kromě toho mohou bakterie stejně jako rostliny nebo houbové organismy degradovat PAU pomocí cytochromu P450. Anaerobní degradace je primárně založena na redukčních reakcích (Ghosal et al. 2016). Postup bakteriální degradace včetně vznikajících meziproductů je znázorněn na obrázku 5.

4.1.4 Mykoremediace

Mykoremediace je bioremediační metoda využívající enzymatickou aktivitu hub nebo jejich interakce s dalšími mikroorganismy za účelem odstranění nebo přeměny PAU na méně škodlivé až neškodné formy (Kadri et al. 2017). V půdním prostředí jsou nejdůležitějšími organismy z hlediska biodegradace houby a bakterie, které jsou svými metabolickými a fyziologickými vlastnostmi schopny odbourávat kontaminanty. Se vzrůstající hloubkou půdního profilu dochází k úbytku hub, a naopak přibývá počet bakterií, které se zde stávají dominantními (Boopathy 2000). Rozložení mikroorganismů v půdním profilu je dáno vlhkostí, teplotou a množstvím rozpuštěného kyslíku, který jsou bakterie narozdíl od hub schopné získávat pomocí alternativních akceptorů elektronů (dusičnany, sírany, železo, mangan nebo CO₂) (Boopathy 2000; Gan et al. 2009). Povrchové půdy jsou také bohatší na humusové látky, které slouží jako zdroj energie, uhlíku a dalších živin pro mikroorganismy, a proto se zde vyskytují ve větším počtu s vyšší druhovou rozmanitostí (Boopathy 2000). Oblast rhizosféry zahrnuje přibližně 5x10⁶ bakterií, 9x10⁵ aktinomycet a 2x10³ hub na gram půdy (Kučerová et al. 1999). Hlavní skupinou hub, zodpovědných za degradaci PAU, jsou tzv. „houby bílé hniloby“ (Haritash & Kaushik 2009). Výhodou hub je schopnost degradovat velké množství xenobiotik

a jejich přirozený výskyt v půdách. Za dobrých podmínek dochází k růstu jejich mycelia v půdách, tedy ke zvětšení jejich pole působnosti. Kombinací aktivit hub hydrolyzujících širokou škálu xenobiotik a bakterií mineralizujících vzniklé meziprodukty v důsledku činnosti hub lze docílit dobrých výsledků v procesu mikrobiální remediace (Kadri et al. 2017). Stejně jako rostliny jsou i mikroorganismy za vhodných podmínek schopné rozkladu organických polutantů na základní sloučeniny, jako jsou CO₂ a H₂O nebo v případě anaerobního rozkladu NH₄ (Kučerová et al. 1999; Gan et al. 2009).

Tabulka 5. Seznam některých ligninolytických a neligninolytických hub oxidujících PAU (Cerniglia 1993; Eggen & Majcherczyk 1998; Pointing 2001; Novotný et al. 2004; Acevedo et al. 2011; Ting et al. 2011).

Ligninolytické houby

Phanerochaete chrysosporium Burds.

Trametes versicolor (L.) Lloyd

Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) P. Kumm.

Irpex lacteus (Fr.) Fr.

Coriolopsis polyzona (Pers.) Ryv.

Bjerkandera adusta (Willd.) P. Karst.

Anthracophyllum discolor (Mont.) Singer

Pycnoporus cinnabarinus (Jacq.) P. Karst.

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst.

Naematoloma frowardii (Speg.) E. Horak

Neligninolytické houby

Aspergillus niger Tiegh.

Candida tropicalis (Castell.) Berkhout

Chrysosporium pannorum (Link) S. Hughes

Cunninghamella elegans Lendn.

Gliocladium Corda

Mortierella verrucosa Linnem.

Neurospora crassa Shear & B.O. Dodge

Penicillium Link

Trichoderma viride Pers.

Rhizoctonia solani J.G. Kühn

Nové technologie využívají katalytické působení mikrobiálních enzymů. Tato metoda je velmi účinná a oproti chemickým katalyzátorům není tak náročná na reakční podmínky (reakce probíhá i za relativně nízkých teplot a širokého rozmezí pH). Rychlost reakcí i stereospecifita jsou větší. Jako enzym je využívána převážně lakáza, schopná oxidovat vysoké množství PAU. Hlavní nevýhodou metody jsou finanční náklady, které je možné snížit imobilizací a zvýšenou extrakcí kontaminantu nebo optimalizací fyzikálně-chemických faktorů (Kuppusamy et al. 2017).

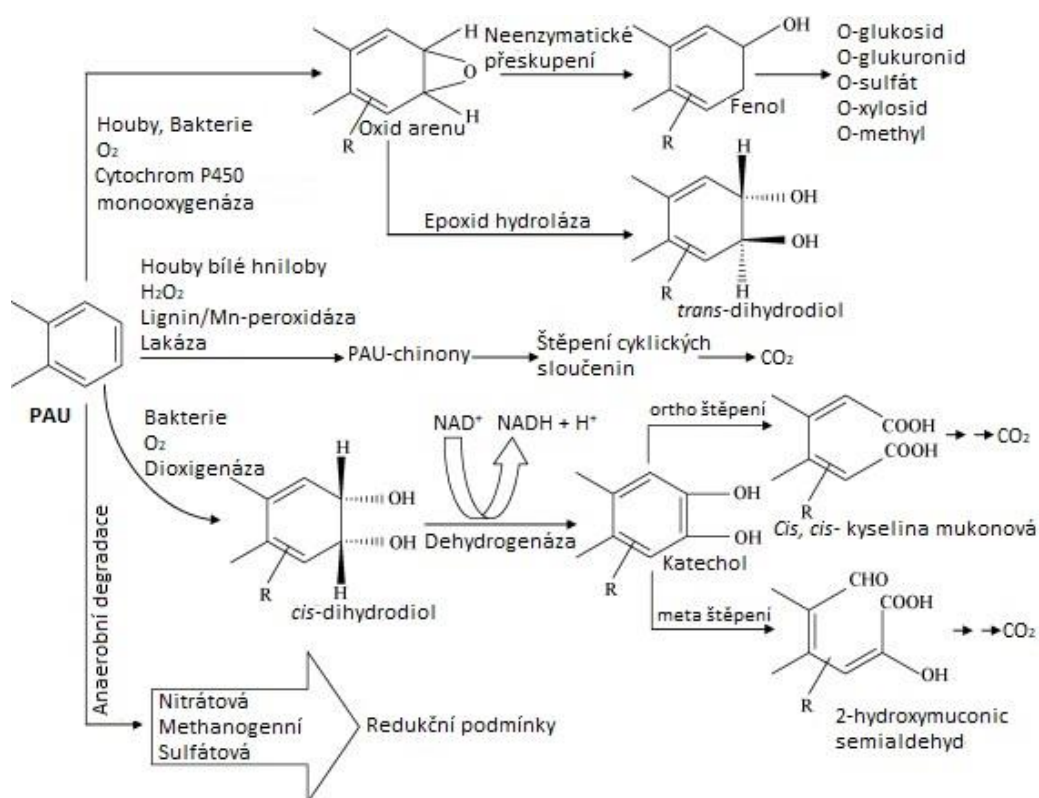
Mikrobiální procesy v půdách během degradace PAU

Mikrobiální aktivita je závislá na mnoha faktorech prostředí, převážně pak na množství a typu mikroorganismů, zdroji energie, obsahu živin, pH, teplotě, obsahu kyslíku, redoxním potenciálu a přítomnosti různých inhibitorů (Boopathy 2000; Kadri et al. 2017). Inhibitory mohou tvořit i jednotlivé PAU, jejichž vysoká koncentrace ovlivňuje výskyt a aktivitu

mikroorganismů v půdě, a proto může být počáteční degradace v silně kontaminovaných půdách velmi pomalá (Kadri et al. 2017). Oproti bakteriím, které jsou schopné využívat PAU jako svůj jediný zdroj energie a živin, transformují houby tyto látky kometabolicky a dochází tak ke vzniku detoxikovaných produktů (Cerniglia 1993). Kometabolismus lze definovat jako metabolismus sloučeniny, které neslouží jako primární zdroj uhlíku, energie nebo jako esenciální živina a je možné ho dosáhnout pouze v přítomnosti substrátu, indukujícího potřebné enzymy pro jejich degradaci. Jednotlivé faktory jsou dány prostředím (substrátem), které slouží právě jako zdroj energie, uhlíku a dalších látek, a tudíž má přímý vliv na mikrobiální růst a produkci enzymů (Boopathy 2000). Vlastnosti půdy také ovlivňují sílu interakce PAU s jednotlivými půdními sloučeninami (Kadri et al. 2017). Z hlediska teploty jsou pro aktivitu většiny enzymů ideální mezofilní teploty, některé enzymy jsou však neaktivnější za vyšších teplot až 75 °C (Mn-peroxidázy). Za nízkých teplot aktivita většiny enzymů výrazně klesá a při 5 °C je zaznamenána pouze pro lakázy. Optimální pH půd pro mikroorganismy je 7, tudíž neutralizace půd vede ke zlepšování procesu degradace (Haritash & Kaushik 2009). Funkce enzymů je silně ovlivněna přítomností kyslíku, kdy v případě jeho nedostatku aktivita některých enzymů (ligninolytických) klesá. Aplikace biosurfaktantů a povrchově aktivních látek může ovlivňovat produkci enzymů a tím i průběh degradace, čímž je možné docílit celkového zlepšení procesu. V případě inokulace nesterilních půd různými kulturami hub je jejich aktivita ovlivněna přirozeně se vyskytujícími mikroorganismy, které se stávají jejich konkurenty (Kadri et al. 2017).

Proveditelnost bioremediace a typ probíhající mikrobiální transformace jsou silně ovlivněny molekulární strukturou a celkovou koncentrací kontaminantu (Boopathy 2000). Způsoby degradace PAU mohou být buď přímé, nebo nepřímé, kdy dochází k degradaci PAU pomocí enzymů vznikajících během peroxidace ligninu (Kadri et al. 2017). Enzymy, podílející se na degradaci, můžeme rozdělit na ligninolytické a neligninolytické (Haritash & Kaushik 2009). Na počáteční oxidaci PAU v půdách se výrazně podílejí ligninolytické houby produkující extracelulární enzymy (Kadri et al. 2017). Hlavní skupiny tvoří peroxidázy (lignin peroxidázy a Mn-peroxidázy), fenoloxidázy (lakáza, tyrozináza) a další enzymy produkující H₂O₂ (Haritash & Kaushik 2009). Tyto enzymy využívají peroxid vodíku nebo O₂ a způsobují tak rozpad ligninu. Vysokou oxidační schopnost PAU má v přítomnosti vhodných mediátorů lakáza (Kadri et al. 2017).

Primárními enzymy aerobních organismů pro transformaci a mineralizaci xenobiotik jsou monooxygenázy a dioxygenázy (Boopathy 2000). Skupinu neligninolytických enzymů, podílejících se na degradaci PAU, tvoří např. cytochrom P450 monooxygenáza, hydrolázy, lipázy, proteázy a dioxygenázy. Neligninolytické houby mohou produkovat také extracelulární enzymy, v jejich případě však nejsou tak účinné jako intracelulární. V závislosti na typu enzymu je pak možné rozdělit oxidaci PAU do 2 degradačních drah viz obrázek 5 (Kadri et al. 2017).



Obrázek 5. Mikrobiální degradace PAU v závislosti na typu organismu a enzymu, podílejícího se na reakci (převzato z Haritash & Kaushik (2009), přeložil Petr Frühbauer).

Příkladem může být např. degradace antracenu. Za působení ligninolytických enzymů se antracen oxiduje na antrachinon -> kyselinu ftalovou -> CO₂. V případě neligninolytických enzymů je antracen degradován na antracen *trans*-1,2-dihydrodiol 1-anthrol -> 9,10-antrachinon -> ftalát -> glukuronid -> sulfát -> xylosidové konjugáty hydroxylových meziproductů (Kadri et al. 2017).

Obecně platí, že poločas rozpadu pro PAU se 2 až 3 benzenovými jádry v řádech dnů je výrazně kratší než u vysokomolekulárních PAU, kde se tento poločas rozpadu pohybuje v měsících, a dokonce až letech. V půdním prostředí je pak možné sledovat vyšší obsahy PAU s 5 a 6 cykly. Důvodem mohou být jak vlastnosti těchto látek, tak i nedostatek mikroorganismů, schopných degradovat vysokomolekulární PAU (Cerniglia 1993).

4.1.5 Mykoremediace podporovaná rostlinami

Základem kombinace těchto metod je biostimulace, kdy v důsledku dodávání uhlíku do kontaminovaných půd dochází k podpoře růstu mikroorganismů a s tím spojené rychlosti degradace (Haritash & Kaushik 2009). Rostliny jsou v oblasti rhizosféry schopné podpořit degradaci pomocí kořenových exudátů obsahujících enzymy, alkoholy, bílkoviny, steroly, růstové faktory, nukleotidy, karboxylové kyseliny, aminokyseliny, cukry a alifatické nebo aromatické látky, které slouží jako živiny pro mikroorganismy a podporují jejich růst i aktivitu (Kučerová et al. 1999; Vaněk et al. 2017). Množství a typ exudátů závisí na druhu a stádiu vývoje rostliny a na vlastnostech daného prostředí (typu půdy, množství živin, pH, obsahu vody

a kyslíku, teplotě, intenzitě světla a koncentraci CO₂) (Vaněk et al. 2017). Kromě enzymů a živin mohou rostliny podporovat mikroorganismy také transportem kyslíku do svých kořenů (Macek et al. 2000). Kořeny slouží také jako vhodné prostředí pro růst symbiotických hub například z čeledi *Mycorrhizae* (Kučerová et al. 1999). Počet mikroorganismů v oblasti rhizosféry může být až několikanásobně větší než v půdách bez výskytu kořenů (Vaněk et al. 2017). Bylo prokázáno, že v rhizosféře některých rostlin (pšenice, kukuřice nebo hrachu) se mikrobiální aktivita zvýší až o 2 řády (Kučerová et al. 1999).

V některých případech se interakce mezi rostlinami a mikroorganismy vyvinuly k vzájemnému prospěchu. V těchto případech je odbourávání kontaminantů z půd urychleno, a to nejen v důsledku zvýšené aktivity mikroorganismů, ale i samotného působení rostlin na přítomné polutanty (Macek et al. 2000). Podpora aktivity mikroorganismů je ale během kombinace obou metod prioritní a účinek rostlin může být oproti mikroorganismům minimální (Kuppusamy et al. 2017). K dosažení kompletní degradace organických látek je podpora mikrobiální aktivity důležitá, jelikož rostliny často přeměňují tyto látky pouze na netoxické metabolity, které sice nemusí působit fyto toxicky, ale mohou mít stále negativní účinek na jiné organismy (Macek et al. 2000). Vyšší účinnost degradace byla prokázána také využitím více druhů rostlin na jednom místě než v případě monokultur nebo půd bez rostlin, kde na kontaminanty působí přirozená atenuace (Kuppusamy et al. 2017).

Opačným případem je činnost rhizobakterií podporující růst rostlin, které snižují jejich environmentální stress a umožňují jejich růst v podmínkách, které pro rostliny nejsou ideální. Tyto organismy jsou schopné stimulace růstu kořenového systému rostlin, mohou fixovat dusík, syntetizovat siderofóry, produkovat fytohormony nebo solubilizovat minerály. Tyto činnosti vedou jak ke zvýšení úrodnosti půd, tak ke zlepšení vývoje rostlin (Kuppusamy et al. 2017).

Vývoj nových metod za účelem snížení nákladů a dopadu na životní prostředí, zvýšené degradaci PAU a zkrácení doby procesu vede k propojení více typů bioremediačních metod, jako v případě mykoremediace podporované rostlinami. Víceprocesní fyto mediační systém navíc kombinuje mikrobiální a fyto mediační procesy s dalšími fyzikálními a fotochemickými systémy. Příkladem je spojení landfarmingu společně s bioaugmentací, která přispívá k růstu rostlin. Kombinací těchto metod je možné docílit až o 50 % větší degradace PAU než v případě využití každé z těchto metod zvlášť. Mezi nové metody spadá také tzv. „vermiremediace“, tedy využití žížal převážně ke zvýšení biologické dostupnosti PAU vázaných v mikropórech pro mikroorganismy a rostliny, které jinak nejsou schopné v těchto místech působit. Kromě toho jsou žížaly schopné biotransformace PAU, které přijímají dermálně pasivní difúzí nebo trávicím ústrojím. Integrované technologie se stávají v současné době prioritními metodami a umožňují omezení nedostatků jednotlivých metod (Kuppusamy et al. 2017).

5 Metodika

5.1 Charakteristika experimentální půdy

Půda použitá pro tento výzkum pochází z dlouhodobého polního pokusu v okolí Humpolce (49°33'16"N, 15°21'2"E, 525 m n. m., průměrná roční teplota = 7 °C, průměrné roční srážky = 665 mm). Odběr půdy (písčitohlinitá kambizem) probíhal na více místech dané lokality do hloubky 20 cm od povrchu. Odebraná půda byla následně ponechána k volnému vysušení na vzduchu, přeseťta přes 5 mm nerezové síto a důkladně homogenizována. Půda byla charakterizována základními fyzikálně-chemickými vlastnosti: pH (CaCl₂) = 4,80 ± 0,02; pH (H₂O) = 5,65 ± 0,13; měrná elektrická vodivost = 83,4 ± 8,6 μS/cm; sušina = 98,5 ± 0,2 %; obsah organické hmoty = 5,0 ± 0,2 %; C_{tot} = 1,85 ± 0,07 %; H_{tot} = 0,80 ± 0,03 %; N_{tot} = 0,18 ± 0,01 %; S_{tot} = 0,02 ± 0,00 %; O_{tot} = 2,19 ± 0,18 %. Obsah jednotlivých PAU v čisté půdě byl pro všech 16 látek pod mezí detekce GC/MS, které jsou uvedené v tabulce 8.

5.2 Charakteristika popelu ze spalování biomasy

Ke kontaminaci půd jednotlivými PAU bylo využito úletového popelu ze spalování pšeničné slámy v elektrárně určené ke spalování biomasy. Popel pocházel z kotle s výkonem 20 MW, teplotou spalování 600 až 700 °C a produkcí popelu kolem 2 000 t ročně. Popel byl odebírán náhodně z odpadního kontejneru určeného pro popel, následně vysušen na vzduchu za pokojových podmínek a homogenizován s cílem dosažení reprezentativního směšného vzorku. Základní charakteristika popelu: pH (H₂O) = 10,3; měrná elektrická vodivost = 2,67 mS/cm; sušina = 98,78 % a obsah nespálené organické hmoty = 52,6 %. V popelu byly stanoveny také koncentrace 16 PAU, jejichž průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6. Celkový obsah ΣPAU v popelu činil v průměru 160,58 ± 2,25 mg/kg.

Tabulka 6: Obsah 16 prioritních PAU v popelu ze spalování biomasy [mg/kg].

NA	ACE	AC	FL	FE	AN	FLU	PY
18,99 ± 0,66	12,45 ± 1,03	3,98 ± 0,12	0,17 ± 0,03	18,15 ± 0,37	21,62 ± 0,56	16,25 ± 0,16	6,47 ± 0,32
BaA	CH	BbF	BkF	BaP	DA	IP	BP
7,30 ± 0,36	6,62 ± 0,35	13,87 ± 0,45	7,50 ± 0,29	15,46 ± 0,19	1,18 ± 0,11	3,88 ± 0,42	6,73 ± 0,48

Průměrné hodnoty (n = 4) ± směrodatná odchylka.

5.3 Charakteristika houbového substrátu a semen kukuřice seté

Jako substrát k předpěstování houbového mycelia byly pro tento výzkum využity dubové piliny. Z ligninolytických hub byla vybrána hlíva ústříčná - *P. ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm., kmen HK35 (*P. ostreatus*), kterou poskytla Katedra zahradnictví, FAPPZ, ČZU v Praze. Příprava inokula probíhala v souladu s postupem, uvedeným v García-Delgado et al. (2015). Čistá kultura byla před inokulací udržována ve stálé teplotě 4 °C. Předkultivace probíhala při

teplotě 24 °C na miskách obsahujících agar obohacený o extrakt ze sladu a glukózy po dobu 2 týdnů. Inokulum obsahující *P. ostreatus* bylo naočkováno do předem upraveného pšeničného zrna (předvařené a zbavené přebytečné vody s přidáním sádry, která tvořila 5 %). Takto upravený substrát byl následně po dobu 2 hodin sterilizován v autoklávu (teplota = 121 °C). Po sterilizaci bylo do substrátu přidáno předpěstované mycelium a celá směs byla udržována po dobu 14 dnů v teplotě 24 °C. Následně se tato směs využila pro naočkování dubových pilin, které musely být upravené destilovanou vodou na požadovanou vlhkost (60 %) a sterilizovány ve skleněných nádobách uzavřených pomocí hliníkové fólie po dobu 2 hodin (teplota = 121 °C). Pěstování v dubových pilinách probíhalo při teplotě 24 °C po dobu 4 týdnů, dokud nebyl celý substrát prorostlý myceliem. Základní charakteristika takto připraveného houbového substrátu: pH (H₂O) = 3,81; měrná elektrická vodivost = 12,01 mS/cm; sušina = 97,97 %; obsah organické hmoty = 26,69 %.

Jako fytoimediační rostlina byla pro tento výzkum využita kukuřice setá (*Zea mays* L. var. Colisee) zakoupená od společnosti KWS (Německo).

5.4 Struktura experimentálního výzkumu

Struktura pokusu byla založena v souladu s certifikovanou metodou řešeného projektu TAČR č. TA04020329 „Mykoremediace vybraných perzistentních organických polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů“ pana prof. Ing. Pavla Tlustoše, CSc., dr. h. c. a kolektivu. Venkovní pokus probíhal v zastřešené vegetační hale Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ, ČZU v Praze. Použito bylo celkem 32 plastových nádob o objemu 6 l s otvory na dně, umožňující odtok přebytečné vody do prázdných zásobníků, umístěných pod nimi. V případě průtoku půdním profilem byla voda vrácena zpět do nádob tak, aby nedocházelo k vyplavování látek z půd. Nádoby byly rozdělené na 8 variant ve 4 opakováních (viz tabulka 7). Každá z nádob obsahovala 5,4 kg přeseť a homogenizované zeminy, přihnojené vodnými roztoky NH₄NO₃ (N = 500 mg/kg půdy) a K₂HPO₄ (P = 32 mg/kg půdy a K = 80 mg/kg půdy). Po 4 týdnech se nádoby znovu přihnojovaly stejným množstvím NH₄NO₃. Do variant obsahujících houbový substrát bylo přidáno 400 g (8 % hm) tohoto substrátu a do variant s popelem bylo dodáno 52,7 g (1 % hm) popelu. Jednotlivé varianty byly následně homogenizovány. V době založení pokusu byly odebírány vzorky zemin z celého půdního profilu nádob, pomocí půdní nerezové sondy, označované jako T₀. S cílem dosažení 70% nasycení půdních kapilár vodou, které je ideální zejména pro růst mycelia hlívy a přítomných mikroorganismů, bylo do každé z nádob přidáno 1,5 l demineralizované vody. Do zeminy se u variant F, FM, F+P a FM+P zaseto do každé z nádob 20 semen kukuřice seté. Po vyklíčení se počet rostlin zredukoval pouze na 3 v každé nádobě. Vzorky byly po celý průběh pokusu uměle zavlažovány demineralizovanou vodou. Vegetační období rostlin probíhalo v létě roku 2018 po dobu 100 dnů.

Po 14 dnech od vysetí kukuřice byla zaznamenána klíčivost v jednotlivých variantách. V průběhu celého vegetačního období pak byla několikrát přeměřována výška kukuřic. Během sklizně byla kromě výšky stanovena také hmotnost celkové nadzemní biomasy a hmotnost

očištěných kořenů rostlin. Po vysušení v laboratorní sušárně značky VENTICELL, BMT při teplotě 60 °C a následném převážení suché biomasy v laboratoři bylo možné stanovit její vlhkost. Další úprava rostlinných vzorků obnášela namletí pomocí střížného mlýnu SM 100, Retsch přes 1 mm síto. Založení a průběh venkovního pokusu je znázorněn na obrázcích 6 až 9 v příloze této práce.

Současně se sklizní byly odebrány také vzorky půd označované jako T₁₀₀. Úprava vzorků zemin probíhala pomocí lyofilizace při teplotě -40 °C v přístroji FreeZone Legacy Freeze Dryers značky Labconco. Mezi analýzami byly vzorky uskladněné v teplotě 4 °C. Část původních vzorků byla zamražena jako rezerva v teplotě -20 °C. Veškerá úprava vzorků, uskladnění a následná analýza probíhala v laboratořích FAPPZ, ČZU v Praze.

Tabulka 7: Schéma nádobového pokusu

Varianta	Popis
A	Bez rostlin – zemina + NPK
M	Bez rostlin – zemina + NPK + houbový substrát
A+P	Bez rostlin – zemina + NPK + popel
M+P	Bez rostlin – zemina + NPK + popel + houbový substrát
F	S rostlinami – zemina + NPK
FM	S rostlinami – zemina + NPK + houbový substrát
F+P	S rostlinami – zemina + NPK + popel
FM+P	S rostlinami – zemina + NPK + popel + houbový substrát

NPK – hnojivo přidávané ke každé variantě

5.4.1 Základní analýzy vzorků zemin

V rámci jednotlivých analýz byly opakovaně využívány následující přístroje: analytické váhy Sartorius TE 4101 a orbitální třepačka zakoupená od společnosti VWR.

Měrná elektrická vodivost: Měřena ve vodném výluhu v poměru 1:10 (hmotnostně vzorek-demineralizovaná voda), umístěného na 60 minut a 120 ot./min. do třepačky. Vodivost byla měřena konduktometrem InoLab Cond 730, WTW za pomoci 4 - elektrodové vodivostní měřící cely TetraCon 325.

pH (H₂O): Měřeno ve stejném vodném výluhu jako měrná elektrická vodivost pH metrem 340i, WTW pomocí SenTix 41 pH elektrody.

pH (CaCl₂): Měřeno ve vodném roztoku 0,01 M CaCl₂ v poměru 1:5 (objemově vzorek-roztok CaCl₂), umístěného na 60 minut do třepačky, 120 ot./min. pomocí pH metru SI 400 značky Sentron.

Sušina a obsah organické hmoty: Stanovení probíhalo metodou ztráty žíháním v laboratorní komorové peci Linn High Therm 800 P. Do hliníkových fólií bylo naváženo 5 g vzorku půd (v případě houbového substrátu a popelu pouze 0,5 g) a sušeno při 105 °C, následované žíháním při 550 °C. Z rozdílů hmotností byla stanovena sušina vzorku a celková spalitelná organická složka.

Stanovení C, H, N, S: Celkový (totální) podíl základních prvků byl stanoven přístrojem Vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Německo). Stanovení probíhalo dle aplikačního listu výrobce a jako referenční materiál byl použit standard acetamidu.

5.4.2 Stanovení ergosterolu

Stanovení volného ergosterolu v živých buňkách hub sloužilo k určení obsahu biomasy hub ve vzorcích půdy. Do umělohmotných, uzavíratelných, kónických zkumavek bylo naváženo na analytických vahách 1,00 g zeminy a přidáno 25 ml metanolu. Po dobu 30 minut byly vzorky promíchávány v inkubační třepačce ISS-4075R, Jeio Tech ve tmě při teplotě 25 °C a 250 ot./min. K usazení nečistot bylo využito stolní centrifugy značky Rotina 420 R, Hettich po dobu 10 minut (20 °C, 6 000 ot./min.). Výsledný extrakt byl přenesen do skleněných baněk s kulatým dnem. Metanol byl následně odpařen pomocí rotační vakuové odparky R-300 (Büchi, Švýcarsko) na vodní lázni při teplotě 40 °C za sníženého tlaku 122 mbar. Ergosterol v baňce byl resuspendován přidáním 2 ml metanolu a umístěním na několik sekund do ultrazvukové lázně typu Sonorex Digitec DT 510/H (Bandelin, Německo). Injekční stříkačkou přes nylonový filtr (velikost pórů 0,45 µm) byl extrakt přenesen do vzorkovacích lahvíček a následně analyzován pomocí 1260 Infinity HPLC systému (Agilent Technologies, USA) vybavený DAD detektorem (detektorem s diodovým polem) a kolonou Phenomenex C18 (250 mm x 4,60 mm; velikost částic 5 µm; velikost pórů 100 Å). Jako mobilní fáze byla použita směs 97% methanol/voda (V/V) o průtoku 1 ml/min. Detekce probíhala při 282 nm. Ergosterol byl kvantifikován pomocí kalibrační křivky sestavené z proměřených roztoků (10 - 1 000 µg/l) standardu 95,0% ergosterolu zakoupeného od firmy Sigma Aldrich. Výsledky měření byly vyjádřeny jako µg ergosterolu/g vysušené půdy.

5.4.3 Analýza enzymů

Analýza obsahu enzymů umožňuje určení celkové mikrobiální aktivity ve vzorcích zemin jednotlivých variant. Testy celkových oxidáz a peroxidáz, vybraných ligninolytických (lakáza, Mn-peroxidáza) a hydrolytických (β-D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, lipáza, chitináza, cellobiohydroláza) enzymů v půdních extraktech byly provedeny podle certifikované metodiky Hanč et al. (2018). Do 50 ml Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,2 g půdy a extrahováno 20 ml pufru octanu sodného (50 mmol/l, pH = 5) při pokojové teplotě. Reakční směs byla homogenizována pomocí přístroje Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Německo) po dobu 30 sekund při 8 000 ot./min. Vzorky určené k analýze hydrolytických enzymů byly měřeny metodou fluorescenčního stanovení enzymatické aktivity. Extrakty určené pro stanovení ligninolytické aktivity byly filtrovány za použití kolon PD-10 (Pharmacia, Švédsko) k odstranění

inhibičních sloučenin. Analýza ligninolytických enzymů probíhala metodou spektrofotometrického stanovení enzymatické aktivity. Jednotlivé enzymatické aktivity byly měřeny ve čtyřech opakováních na 96-jamkových mikrodestičkách přístrojem Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko). Jedna jednotka enzymatické aktivity na 1 g suché půdy (U/g) byla definována jako množství enzymu, katalyzujícího tvorbu 1 μ mol reakčního produktu za minutu.

5.4.4 Analýza polycyklických aromatických uhlovodíků

Veškeré skleněné nádobí bylo před použitím umyté destilovanou vodou, poté acetonem, hexanem a následně sušeno při 150 °C po dobu 2 hodin. Extrakce PAU z půdních vzorků byla provedena ultrazvukem. Do skleněných baněk s plochým dnem o objemu 100 ml bylo naváženo 5 g (\pm 0,001 g) od každého vzorku. K vzorku byl přidán pomocí injekční stříkačky 1 ml surogátu 2-FBP (2-Fluorobiphenyl, koncentrace 500 mg/l) a 30 ml směsného roztoku hexan-aceton v poměru 1:1. Baňky byly umístěny na 30 minut při stálé teplotě 35 °C do ultrazvukové lázně Sonorex Digitec DT 510/H (Bandelin, Německo). Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se reakční směs filtrovala přes filtrační papír do čistých skleněných baněk s kulatým dnem o stejném objemu. Tento postup extrakce PAU v jednotlivých vzorcích probíhal celkem 3x po sobě. Společný extrakt ze všech 3 opakováních v baňkách s kulatým dnem byl umístěn do rotační vakuové odparky R-300 (Büchi, Švýcarsko), s nastavenou teplotou = 40 °C a tlakem = 156 mbar. Po odpaření rozpouštědla téměř do sucha byl extrakt vzorku znovu rozpuštěn přidáním 2 ml hexanu. Odstranění nečistot z extraktů bylo provedeno metodou extrakce na tuhou fázi (SPE) za využití vakua. Před použitím bylo potřeba SPE kolonky typu Strata SI-1 Silica SPE (Phenomenex, USA) nejdříve promýt 10 ml směsí dichlormethan-hexan v poměru 1:3. Poté byl přes sorbent promyt extrakt vzorku obsahující PAU. Z důvodu uvolnění veškerého analytu byly prázdné baňky znovu promyty 2 ml hexanu a umístěny na několik sekund do ultrazvukové lázně. Výsledný eluát byl stejně jako v předchozím kroku opět převeden na sorbent a promyt. Na závěr byl sorbent promyt 8 ml čistého hexanu a 10 ml směsí dichlormethan-hexan v poměru 1:3. Baňka s čistým extraktem byla opět umístěna na vakuovou rotační odparku (teplota = 40 °C, tlak = 156 mbar), kde došlo k odpaření veškerého rozpouštědla. Odpařený extrakt byl znovu rozpuštěn 2 ml hexanu. Do výsledného extraktu byl na závěr přidán roztok interního standardu *p*-TER-*d*₁₄ (*p*-Terphenyl-*d*₁₄, koncentrace 500 μ g/l). Extrakce PAU ve vzorcích kořenů (1 g) a nadzemní biomasy (1 g) kukuřice seté probíhal stejným postupem jako v případě půd.

Stanovení PAU probíhalo na plynovém chromatografu Agilent HP 6890 N (Agilent Technologies, USA) spojeného s hmotnostním detektorem Agilent HP 5975 (Agilent Technologies, USA) a vybaveného automatickým vzorkovačem Agilent 7683B a DB-EUPAH (vnitřní průměr 20 m x 0,18 mm, 0,14 μ m tloušťka filmu) kapilární kolonou (Agilent J&W Scientific, USA). Nosným plynem bylo čisté helium (HiQ, 6,0, Linde, Česká republika) při konstantní průtokové rychlosti 1,0 ml/min. Vzorky byly dávkovány v pulzním režimu bez rozdělení extraktu (1 μ l, průtok proplachování 70 ml/min při 0,75 min), pulzní tlak 25,0 PSI

(„libra na čtvereční palec“). Teplotní režim byl: 300 °C na hmotnostním detektoru a kvadrupol byl vyhříván při 180 °C. Teplotní program kapilární kolony DB-EUPAH byl zpočátku udržován při 50 °C po dobu 1 minuty a poté zvýšen na 300 °C/min rychlostí 10 °C/min a udržováno po dobu 10 minut při konečné teplotě 300 °C. Hmotnostní spektrometr byl provozován za použití ionizace elektronů (70 eV) a sběr dat byl prováděn v režimu selektivního sledování iontů (SIM) s charakteristickými molekulárními ionty každého PAU. PAU v půdních extraktech byly identifikovány na základě retenčních časů standardů 16 individuálních PAU ve směsném roztoku SV Calibration Mix 5 (2 000 mg/l) a kvantifikovány pomocí faktorů odezvy souvisejících s příslušnými vnitřními standardy na základě externí pětibodové kalibrační křivky (10-1000 µg/l) pro každou jednotlivou sloučeninu PAU. Kalibrační křivky vykazovaly přijatelnou linearitu ($R > 0,99$) pro každý PAU.

Tabulka 8: Meze detekce 16 PAU pomocí GC/MS [µg/kg].

NA	ACE	AC	FL	FE	AN	FLU	PY
1,8	2,1	2,3	2,8	2,5	2,4	3,1	2,9
BaA	CH	BbF	BkF	BaP	DA	IP	BP
3,0	3,8	2,9	3,2	3,3	5,8	5,5	5,9

5.5 Zpracování dat a statistické vyhodnocení

Úroveň degradace PAU v jednotlivých variantách byla stanovena rozdílem mezi obsahem 16 PAU v půdách na začátku pokusu v čase T_0 a obsahem těchto látek na konci pokusu v čase T_{100} . Intenzita degradace každého PAU je znázorněna v grafu 1 a v grafu 2.

Tyto výsledky byly dále statisticky vyhodnoceny v programu STATISTICA 12 Cz (StatSoft), za účelem posouzení rozdílů v účinnosti degradace mezi jednotlivými variantami. K tomu bylo využito testů jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) u souborů dat, které splňovaly předpoklady pro využití této metody (FE, AN, FLU, BaA, CH, BkF, DA). Normalita všech dat byla ověřena pomocí Shapiro-Wilkova testu a shodnost rozptylů pomocí Levenova testu. Statisticky významné rozdíly mezi variantami byly stanoveny Tukeyho metodou mnohonásobného porovnání. Oba testy byly stanoveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Vzhledem k situaci, že ne všechna naměřená data jednotlivých PAU splňovala podmínky pro stanovení metodou analýzy rozptylu, byla využita ještě neparametrická metoda Kruskal-Wallisova ANOVA (NA, ACE, AC, PY, BbF, BaP, IP, BP). Statisticky významné rozdíly mezi variantami byly stanoveny metodou vícenásobného porovnání průměrného pořadí pro všechny skupiny. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

6 Výsledky

Pro přehlednost jednotlivých analýz byly výsledky zprůměrovány pro každou variantu a doplněny o směrodatné odchylky v programu Microsoft Excel 365 ProPlus. Výsledky pak byly seřazeny do tabulek zvlášť pro vzorky půd v čase T_0 a zvlášť pro vzorky půd v čase T_{100} . V následujících tabulkách je možné vidět výsledky, charakterizující základní vlastnosti půd v jednotlivých variantách, mezi které patří pH, EC (měrná elektrická vodivost), sušina, obsah organické hmoty, procentické zastoupení základních prvků tvořící organickou složku půd včetně poměrů mezi těmito prvky. Tabulky 9, 10 a 11 popisují vlastnosti půd T_0 a tabulky 12; 13 a 14 popisují vlastnosti půd T_{100} .

Tabulka 9: Základní charakteristika půd T_0 .

Varianta	pH H ₂ O	pH CaCl ₂	EC [μS/cm]	Sušina [%]
A	5,65 ± 0,13	4,80 ± 0,02	83,4 ± 8,6	98,5 ± 0,2
M	5,48 ± 0,08	4,69 ± 0,05	113,9 ± 3,9	98,6 ± 0,1
A+P	6,96 ± 0,11	6,17 ± 0,21	627,2 ± 74,3	98,8 ± 0,1
M+P	6,40 ± 0,22	5,82 ± 0,15	498,6 ± 23,0	98,7 ± 0,0
F	5,32 ± 0,23	5,00 ± 0,13	86,8 ± 5,6	98,6 ± 0,0
FM	4,88 ± 0,25	4,69 ± 0,04	116,3 ± 7,5	98,4 ± 0,1
F+P	6,40 ± 0,18	6,27 ± 0,13	556,2 ± 32,9	97,0 ± 2,1
FM+P	5,91 ± 0,09	5,89 ± 0,02	505,1 ± 47,2	98,5 ± 0,2

Tabulka 10: Elementární analýza půd T_0 .

Varianta	Obsah org. hmoty [%]	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]
A	5,0 ± 0,2	0,18 ± 0,01	1,85 ± 0,07	0,80 ± 0,03	0,02 ± 0,00	2,19 ± 0,18
M	6,1 ± 0,4	0,18 ± 0,02	2,05 ± 0,25	0,80 ± 0,06	0,02 ± 0,00	3,08 ± 0,54
A+P	5,2 ± 0,4	0,17 ± 0,01	1,98 ± 0,07	0,74 ± 0,03	0,05 ± 0,03	2,27 ± 0,30
M+P	6,2 ± 0,3	0,18 ± 0,01	2,24 ± 0,07	0,79 ± 0,02	0,04 ± 0,01	2,93 ± 0,36
F	5,0 ± 0,2	0,17 ± 0,00	2,00 ± 0,05	0,83 ± 0,01	0,02 ± 0,00	2,02 ± 0,14
FM	6,0 ± 0,3	0,18 ± 0,01	2,12 ± 0,08	0,83 ± 0,02	0,02 ± 0,00	2,88 ± 0,35
F+P	5,0 ± 0,2	0,17 ± 0,01	2,15 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,03 ± 0,00	1,86 ± 0,22
FM+P	6,0 ± 0,5	0,18 ± 0,01	2,31 ± 0,17	0,80 ± 0,03	0,03 ± 0,01	2,63 ± 0,52

O – vyjadřuje zastoupení kyslíku, pocházejícího z organických sloučenin

Tabulka 11: Poměr mezi jednotlivými prvky (půdy T_0).

Varianta	Poměr C/H	Poměr C/O	Poměr C/N
A	2,32 ± 0,02	1,13 ± 0,11	10,54 ± 0,50
M	2,55 ± 0,15	0,93 ± 0,26	11,70 ± 0,80
A+P	2,67 ± 0,03	1,18 ± 0,16	11,48 ± 0,21
M+P	2,83 ± 0,07	1,04 ± 0,15	12,45 ± 0,23
F	2,41 ± 0,04	1,32 ± 0,08	11,60 ± 0,03
FM	2,56 ± 0,07	0,99 ± 0,14	12,04 ± 0,10
F+P	2,76 ± 0,07	1,57 ± 0,22	12,74 ± 0,25
FM+P	2,86 ± 0,12	1,22 ± 0,27	12,74 ± 0,21

Tabulka 12: Základní charakteristika půd T₁₀₀.

Varianta	pH H ₂ O	pH CaCl ₂	EC [μ S/cm]	Sušina [%]
A	5,56 \pm 0,20	4,47 \pm 0,15	58,4 \pm 13,9	98,0 \pm 1,2
M	5,69 \pm 0,11	4,73 \pm 0,02	70,5 \pm 16,8	98,6 \pm 0,2
A+P	6,10 \pm 0,18	5,26 \pm 0,08	271,4 \pm 71,0	99,0 \pm 0,0
M+P	6,26 \pm 0,11	5,42 \pm 0,05	297,9 \pm 60,1	98,2 \pm 1,0
F	5,46 \pm 0,10	4,46 \pm 0,04	43,0 \pm 5,8	98,9 \pm 0,1
FM	5,56 \pm 0,10	4,61 \pm 0,01	60,8 \pm 6,3	98,4 \pm 0,5
F+P	6,08 \pm 0,11	5,24 \pm 0,04	185,6 \pm 17,8	98,8 \pm 0,2
FM+P	6,23 \pm 0,07	5,34 \pm 0,03	177,8 \pm 22,1	98,5 \pm 0,3

Tabulka 13: Elementární analýza půd T₁₀₀.

Varianta	Obsah org. hmoty [%]	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]
A	4,8 \pm 0,2	0,18 \pm 0,01	1,92 \pm 0,13	0,79 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	1,87 \pm 0,18
M	5,4 \pm 0,1	0,18 \pm 0,00	2,15 \pm 0,14	0,83 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	2,26 \pm 0,15
A+P	5,0 \pm 0,1	0,16 \pm 0,00	1,93 \pm 0,06	0,70 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	2,60 \pm 0,59
M+P	5,4 \pm 0,1	0,18 \pm 0,02	2,28 \pm 0,28	0,75 \pm 0,06	0,02 \pm 0,00	2,20 \pm 0,38
F	5,1 \pm 0,3	0,16 \pm 0,00	1,87 \pm 0,11	0,79 \pm 0,03	0,01 \pm 0,00	2,35 \pm 0,26
FM	5,7 \pm 0,2	0,18 \pm 0,01	2,29 \pm 0,25	0,84 \pm 0,06	0,01 \pm 0,00	2,34 \pm 0,22
F+P	5,4 \pm 0,1	0,17 \pm 0,01	2,17 \pm 0,13	0,76 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	2,32 \pm 0,34
FM+P	5,9 \pm 0,1	0,20 \pm 0,02	2,81 \pm 0,36	0,87 \pm 0,05	0,02 \pm 0,00	1,98 \pm 0,55

O – vyjadřuje zastoupení kyslíku, pocházejícího z organických sloučenin

Tabulka 14: Poměr mezi jednotlivými prvky (půdy T₁₀₀).

Varianta	Poměr C/H	Poměr C/O	Poměr C/N
A	2,42 \pm 0,19	1,38 \pm 0,17	10,97 \pm 1,08
M	2,58 \pm 0,11	1,27 \pm 0,15	11,75 \pm 0,47
A+P	2,75 \pm 0,12	1,03 \pm 0,18	11,86 \pm 0,58
M+P	3,02 \pm 0,15	1,46 \pm 0,47	12,98 \pm 0,62
F	2,36 \pm 0,09	1,07 \pm 0,13	11,76 \pm 0,43
FM	2,72 \pm 0,12	1,33 \pm 0,27	12,48 \pm 0,54
F+P	2,85 \pm 0,07	1,28 \pm 0,27	13,03 \pm 0,07
FM+P	3,22 \pm 0,23	2,16 \pm 0,97	13,86 \pm 0,72

V rámci ověření vlivů přítomnosti substrátu obsahujícího hlívu a zvýšené koncentrace PAU na rostliny kukuřice seté byla stanovena klíčivost semen, výška jednotlivých rostlin, hmotnost nadzemní biomasy a kořenů v době sklizně a následně po vysušení. Z jednotlivých hmotností byla stanovena sušina nadzemní biomasy 36,6 \pm 0,7 % a sušina kořenů rostlin 33,2 \pm 3,8 %. Další výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulce 15. Jednofaktorová ANOVA a Tukeyho mnohonásobné porovnání prokázaly statisticky významné rozdíly ve výšce kukuřic. Neparametrickými metodami byl stanoven také rozdíl ve hmotnosti nadzemní biomasy. Pro klíčivost nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi variantami.

Tabulka 15: Charakteristika rostlin kukuřice seté v jednotlivých variantách půd.

Varianta	Klíčivost [%]	Výška [cm]	Sušina NB [g]	Sušina K [g]
F	82,50 ± 2,5	154,5 ± 9,7 ^a	130,6 ± 5,6 ^{ab}	18,8 ± 2,3
FM	78,75 ± 5,4	119,3 ± 10,8 ^b	79,3 ± 1,8 ^a	11,7 ± 0,8
F+P	78,75 ± 2,2	158,4 ± 13,5 ^a	157,7 ± 36,8 ^b	22,4 ± 3,1
FM+P	81,25 ± 4,1	123,0 ± 8,8 ^b	81,9 ± 2,8 ^{ab}	11,9 ± 1,0

NB – nadzemní biomasa/ K – kořeny/ Rozdílná malá písmena ve sloupcích u jednotlivých hodnot znamenají statisticky významné rozdíly mezi variantami ($\alpha = 0,05$)

Analýzou ergosterolu ve vzorcích půd bylo možné určit obsah celkové biomasy hub (tabulka 16). Výsledky jsou uvedeny jako množství ergosterolu na kilogram vysušené půdy. Mezi jednotlivými výsledky ergosterolu nebyly statistickými metodami zjištěny žádné významné rozdíly ($\alpha = 0,05$). Mikrobiální aktivitu znázorňují výsledky ligninolytických (tabulka 17) a hydrolytických (tabulka 18) enzymů v jednotlivých variantách. Výsledky jsou vyjádřeny v enzymových jednotkách (U) na gram vysušené půdy. Statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi variantami byly zjištěny pouze u lakázy, chitinázy a cellobiohydrolázy. Pro zbylé enzymy nebyly rozdíly statisticky prokázány ($\alpha = 0,05$).

Tabulka 16: Obsah ergosterolu ve vzorcích půdy T₀ a T₁₀₀ [mg/kg].

Varianta	Půdy T ₀	Půdy T ₁₀₀
A	7,71 ± 0,29	10,98 ± 0,67
M	16,55 ± 1,05	30,16 ± 0,80
A+P	10,50 ± 0,50	19,98 ± 0,00
M+P	14,93 ± 0,43	17,37 ± 0,34
F	6,21 ± 0,29	14,65 ± 0,10
FM	18,28 ± 0,53	35,23 ± 0,97
F+P	10,81 ± 0,56	14,55 ± 0,41
FM+P	15,61 ± 0,14	22,24 ± 0,33

Tabulka 17: Obsah ligninolytických enzymů ve vzorcích půd T₀ a T₁₀₀ [mU/g].

Varianta	Čas	Lakáza	Mn-peroxidáza	Oxidáza	Peroxidáza
A	T ₀	0,47 ± 0,12 ^{AB}	0,43 ± 0,29	0,88 ± 0,32	0,35 ± 0,16
	T ₁₀₀	0,26 ± 0,15 ^B	0,58 ± 0,24	0,84 ± 0,52	2,08 ± 0,49
M	T ₀	0,65 ± 0,25 ^{AB}	0,47 ± 0,16	0,95 ± 0,21	0,80 ± 0,23
	T ₁₀₀	0,37 ± 0,12 ^{AB}	0,87 ± 0,59	0,81 ± 0,32	0,38 ± 0,27
A+P	T ₀	0,69 ± 0,42 ^{AB}	0,99 ± 0,65	1,16 ± 0,76	0,82 ± 0,35
	T ₁₀₀	0,45 ± 0,24 ^{AB}	0,89 ± 0,00	0,71 ± 0,38	0,15 ± 0,07
M+P	T ₀	1,04 ± 0,12 ^{AB}	0,52 ± 0,00	0,75 ± 0,15	0,35 ± 0,19
	T ₁₀₀	0,48 ± 0,27 ^{AB}	1,02 ± 0,27	0,60 ± 0,44	0,33 ± 0,00
F	T ₀	0,65 ± 0,34 ^{AB}	1,44 ± 0,87	0,62 ± 0,31	0,46 ± 0,02
	T ₁₀₀	0,38 ± 0,30 ^{AB}	0,51 ± 0,11	0,81 ± 0,21	0,11 ± 0,03
FM	T ₀	0,93 ± 0,35 ^{AB}	0,41 ± 0,29	1,12 ± 0,42	0,60 ± 0,22
	T ₁₀₀	0,62 ± 0,40 ^{AB}	0,37 ± 0,16	0,72 ± 0,38	0,89 ± 0,26
F+P	T ₀	0,65 ± 0,25 ^{AB}	0,64 ± 0,36	0,78 ± 0,28	0,40 ± 0,20
	T ₁₀₀	0,23 ± 0,20 ^{AB}	11,27 ± 1,18	1,05 ± 0,12	2,84 ± 2,0

FM+P	T ₀	1,17 ± 0,36 ^A	0,30 ± 0,11	0,62 ± 0,07	0,07 ± 0,03
	T ₁₀₀	0,46 ± 0,21 ^{AB}	0,68 ± 0,60	0,73 ± 0,39	0,66 ± 0,35

Rozdílná velká písmena ve sloupci znamenají statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi jednotlivými variantami v průběhu času

Tabulka 18: Obsah hydrolytických enzymů ve vzorcích půd T₀ a T₁₀₀ [U/g].

Varianta	Čas	β -D glukosidáza	Kyselá fosfatáza	Chitináza	Celobio- hydroláza	Lipáza
A	T ₀	2,83 ± 0,34	1,58 ± 0,34	0,75 ± 0,14 abAB	0,53 ± 0,22	23,55 ± 13,98
	T ₁₀₀	2,87 ± 1,21	1,25 ± 0,41	0,23 ± 0,08 abB	0,28 ± 0,22	11,80 ± 3,77 a
M	T ₀	3,97 ± 1,00	1,45 ± 0,30	2,19 ± 1,20 aA	0,41 ± 0,19	13,73 ± 3,23
	T ₁₀₀	2,51 ± 1,38	1,05 ± 0,40	0,31 ± 0,10 abAB	0,21 ± 0,13	14,19 ± 3,20 ab
A+P	T ₀	3,42 ± 2,00	1,86 ± 0,69	0,73 ± 0,27 abAB	0,68 ± 0,22	15,56 ± 1,33
	T ₁₀₀	1,65 ± 0,54	0,59 ± 0,28	0,19 ± 0,08 aB	0,32 ± 0,20	13,77 ± 1,28 ab
M+P	T ₀	3,00 ± 0,49	1,94 ± 1,72	0,92 ± 0,38 abAB	0,25 ± 0,07	16,97 ± 2,56
	T ₁₀₀	3,09 ± 0,90	1,28 ± 0,41	0,37 ± 0,16 abAB	0,54 ± 0,40	19,45 ± 5,34 ab
F	T ₀	3,28 ± 0,7	1,04 ± 0,14	0,86 ± 0,31 abAB	0,35 ± 0,13	13,86 ± 1,67
	T ₁₀₀	2,02 ± 0,61	0,73 ± 0,53	0,30 ± 0,14 abAB	0,22 ± 0,08	19,20 ± 2,44 ab
FM	T ₀	2,33 ± 0,52	0,72 ± 0,18	0,81 ± 0,33 abAB	0,66 ± 0,56	19,15 ± 4,74
	T ₁₀₀	2,82 ± 0,72	1,04 ± 0,44	0,59 ± 0,17 bAB	0,46 ± 0,26	22,55 ± 6,84 ab
F+P	T ₀	2,83 ± 0,18	1,25 ± 0,51	0,48 ± 0,08 bAB	0,54 ± 0,24	19,82 ± 5,16
	T ₁₀₀	2,44 ± 0,59	0,97 ± 0,30	0,35 ± 0,13 abAB	0,27 ± 0,15	25,38 ± 6,76 b
FM+P	T ₀	3,46 ± 0,95	1,25 ± 0,49	0,65 ± 0,23 abAB	0,35 ± 0,20	19,63 ± 5,83
	T ₁₀₀	1,14 ± 0,29	0,19 ± 0,04	0,48 ± 0,16 abAB	0,26 ± 0,07	20,72 ± 4,23 ab

Rozdílná malá písmena ve sloupcích znamenají statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi variantami ve stejném čase a velká písmena znamenají statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi jednotlivými variantami v průběhu času

Vzhledem k nízkým hodnotám (pod mezí detekce GC/MS viz tabulka 8) obsahu všech 16 sledovaných PAU v nadzemní části rostlinné biomasy nebylo v této práci možné určit translokační faktor. V kořenech rostlin byl ve variantách F+P a FM+P naměřen obsah NA, FE, AN, FLU, PY a BaA (viz tabulka 19). Pro tyto varianty byl určen bioakumulační faktor, vypočítaný

jako: $BF = (C_k - C_{T0}) \cdot 100$, kdy C_k znamená celková koncentrace PAU v kořenech rostlin a C_{T0} celková koncentrace PAU v půdách T_0 . Bioakumulační faktory obou variant jsou poměrně nízké: 3,15 % pro variantu F+P a 3,9 % pro variantu FM+P.

Tabulka 19: Obsah jednotlivých PAU v kořenech rostlin kukuřice seté [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

Varianta	NA	FE	AN	FLU	PY	BaA
F+P	12,3 ±	6,20 ±	6,43 ±	11,33 ±	5,78 ±	5,15 ±
	2,76	1,66	1,85	2,62	1,51	0,81
FM+P	25,90 ±	5,70 ±	7,78 ±	5,68 ±	5,98 ±	5,10 ±
	4,04	0,62	1,83	1,07	1,13	1,02

V půdách byl ve všech variantách obsahujících popel (3; 4; 7 a 8) naměřen obsah 15 PAU jak ve vzorcích T_0 (tabulka 20), tak ve vzorcích T_{100} (tabulka 21). Obsah FL byl ve všech variantách pod mezí detekce. Stejně tak obsah všech PAU ve variantách bez přidavku popelu (1; 2; 5 a 6) byl pod mezí detekce stanovení. Účinnost degradace jednotlivých PAU v různých variantách je zobrazena v grafu 1 a v grafu 2. Statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi variantami byly stanoveny u všech sledovaných PAU kromě DA, IP a BP, jejichž degradovaný obsah byl ve všech variantách velmi nízký. Graf 3 vyjadřuje intenzitu degradace všech sledovaných PAU procentuálně a graf 4 zobrazuje celkovou degradaci v jednotlivých skupinách, rozdělených podle relativní molekulové hmotnosti (viz tabulka 1) a celkové množství degradace všech PAU v jednotlivých variantách.

Tabulka 20: Obsah jednotlivých PAU ve vzorcích půdy T_0 [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

Varianta	NA	ACE	AC	FL	FE	AN	FLU	PY
A+P	311,57	54,24 ±	33,27 ±	PMD	145,36	130,83	144,06	158,88
	± 15,78	5,42	4,73		± 4,96	± 6,77	± 14,06	± 13,13
M+P	302,03	52,58 ±	32,25 ±	PMD	140,91	126,83	139,65	154,02
	± 15,29	5,26	4,59		± 4,80	± 6,56	± 13,63	± 12,72
F+P	310,04	53,98 ±	33,11 ±	PMD	144,65	130,19	143,35	158,1 ±
	± 15,70	5,40	4,71		± 4,93	± 6,73	± 13,99	13,06
FM+P	301,98	52,56 ±	32,15 ±	PMD	140,96	126,59	139,87	154,29
	± 16,06	6,67	5,09		± 8,89	± 5,06	± 17,11	± 17,26
	BaA	CH	BbF	BkF	BaP	DA	IP	BP
A+P	60,42 ±	86,83 ±	120,07	76,27 ±	179,66	33,52 ±	45,74 ±	61,79 ±
	2,97	4,10	± 7,97	3,99	± 7,54	4,69	1,21	5,14
M+P	58,57 ±	84,17 ±	116,4 ±	73,93 ±	174,16	32,49 ±	44,34 ±	59,9 ±
	2,88	3,98	7,73	3,87	± 7,31	4,55	1,17	4,98
F+P	60,12 ±	86,4 ±	119,49	75,89 ±	178,78	33,35 ±	45,52 ±	61,49 ±
	2,96	4,08	± 7,93	3,97	± 7,50	4,67	1,20	5,11
FM+P	58,45 ±	84,12 ±	116,49	73,88 ±	174,33	32,33 ±	44,17 ±	59,57 ±
	4,11	6,15	± 10,74	5,75	± 12,62	4,88	2,00	3,42

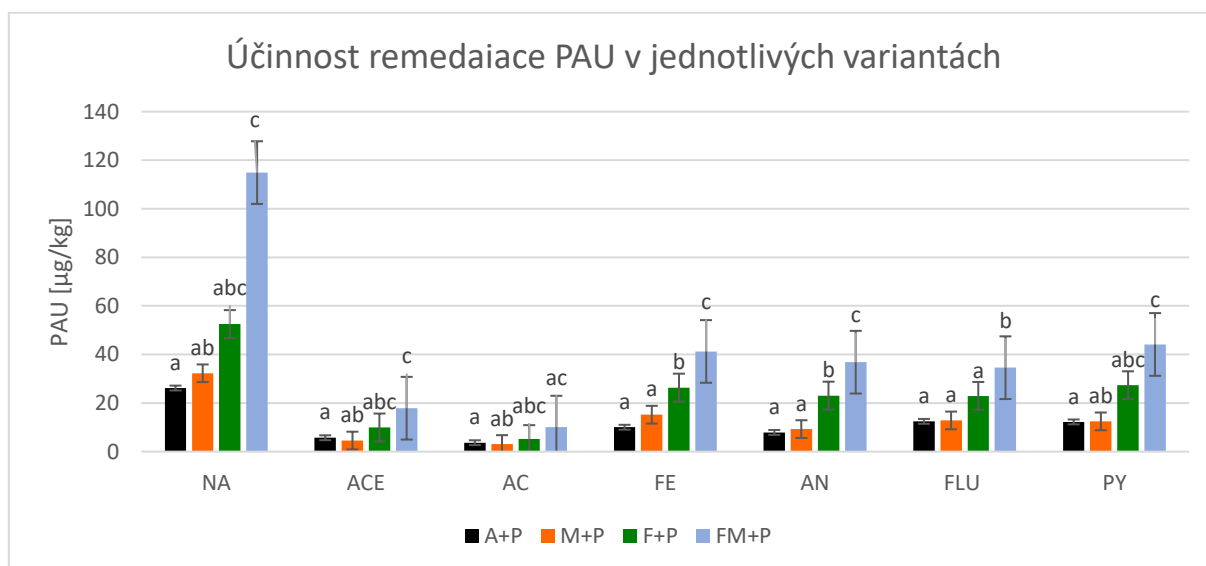
PMD – pod mezí detekce GC/MS

Tabulka 21: Obsah jednotlivých PAU ve vzorcích půdy T₁₀₀ [μg/kg].

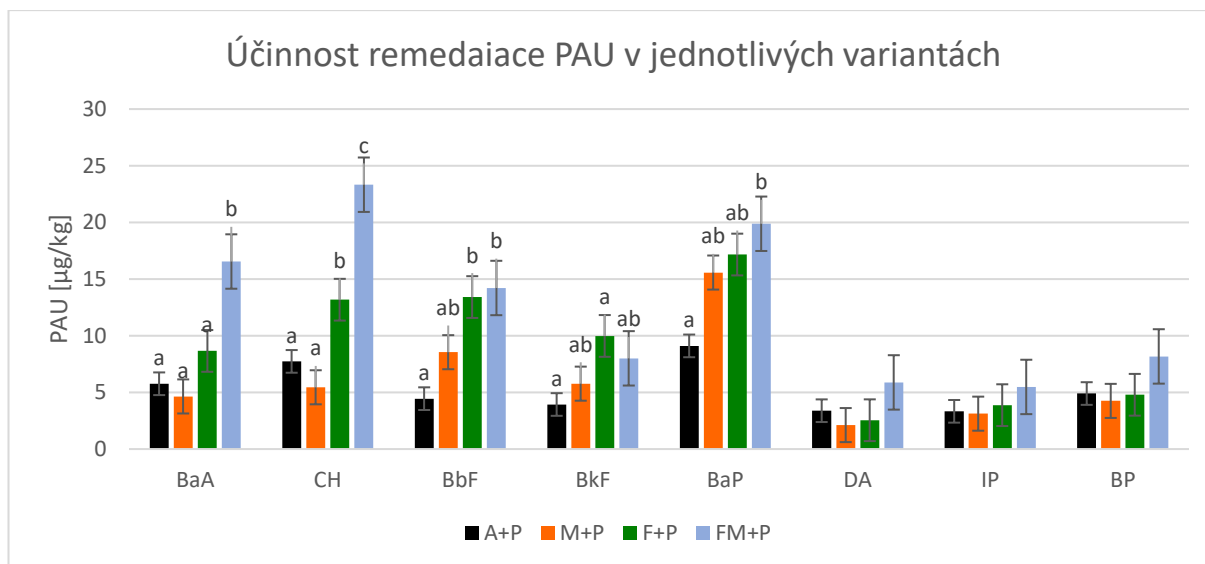
Varianta	NA	ACE	AC	FL	FE	AN	FLU	PY
A+P	285,39 ± 15,40	48,53 ± 6,01	29,6 ± 3,92	PMD	135,32 ± 8,57	122,93 ± 7,50	131,6 ± 15,68	146,65 ± 14,23
M+P	269,77 ± 19,27	48,02 ± 5,28	29,11 ± 4,23	PMD	125,7 ± 3,29	117,54 ± 4,81	126,8 ± 13,59	141,56 ± 14,88
F+P	257,52 ± 18,41	44,04 ± 4,95	27,95 ± 3,42	PMD	118,29 ± 6,63	107,13 ± 6,62	120,41 ± 11,98	130,77 ± 10,26
FM+P	187,08 ± 22,68	34,69 ± 6,30	22,06 ± 2,93	PMD	99,71 ± 6,56	89,77 ± 9,16	105,31 ± 14,09	110,16 ± 11,20
	BaA	CH	BbF	BkF	BaP	DA	IP	BP
A+P	54,66 ± 3,09	79,09 ± 6,37	115,63 ± 8,42	72,34 ± 2,68	170,56 ± 9,22	30,13 ± 2,86	42,41 ± 2,20	56,89 ± 6,01
M+P	53,93 ± 3,66	78,72 ± 4,54	107,85 ± 5,63	68,16 ± 2,92	158,58 ± 9,37	30,38 ± 4,23	41,22 ± 0,78	55,65 ± 4,01
F+P	51,46 ± 3,82	73,22 ± 3,73	106,075 ± 7,55	65,91 ± 1,52	161,61 ± 2,77	30,81 ± 4,64	41,64 ± 1,09	56,70 ± 4,52
FM+P	41,90 ± 4,64	60,80 ± 8,00	102,27 ± 10,58	65,87 ± 6,73	154,45 ± 14,31	26,45 ± 6,42	38,69 ± 2,84	51,40 ± 1,98

PMD – pod mezí detekce GC/MS

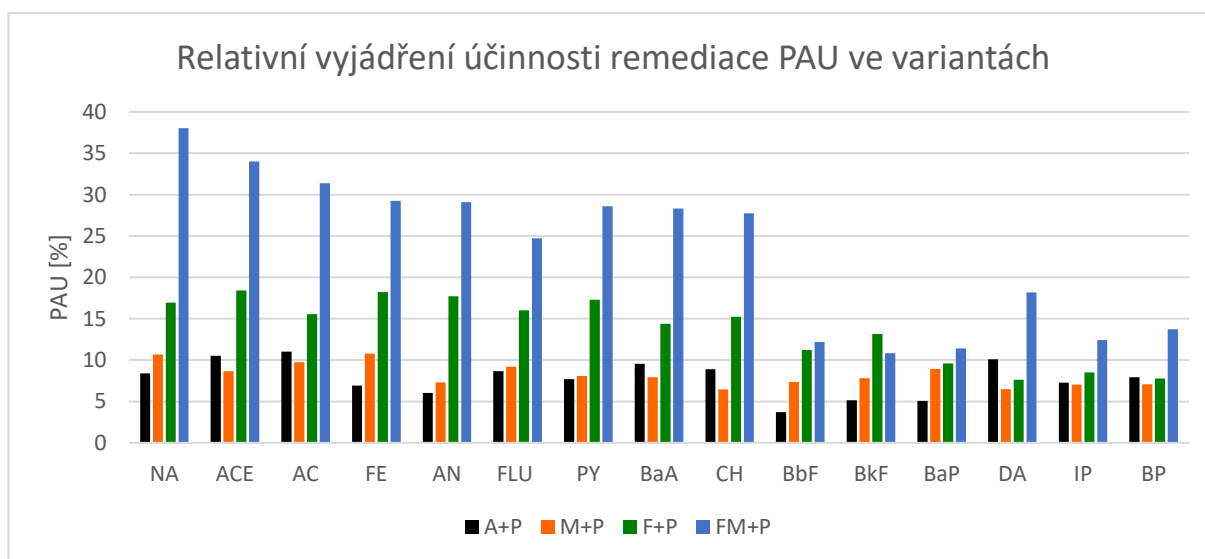
Analýza rozptylu neprokázala statisticky významné rozdíly mezi úrovní degradace DA v jednotlivých variantách. Kruskal-Wallisovou ANOVOU a vícenásobným porovnáním nebyl stanoven rozdíl mezi variantami pro IP a BP. U ostatních PAU byl těmito metodami stanoven alespoň 1 rozdíl.



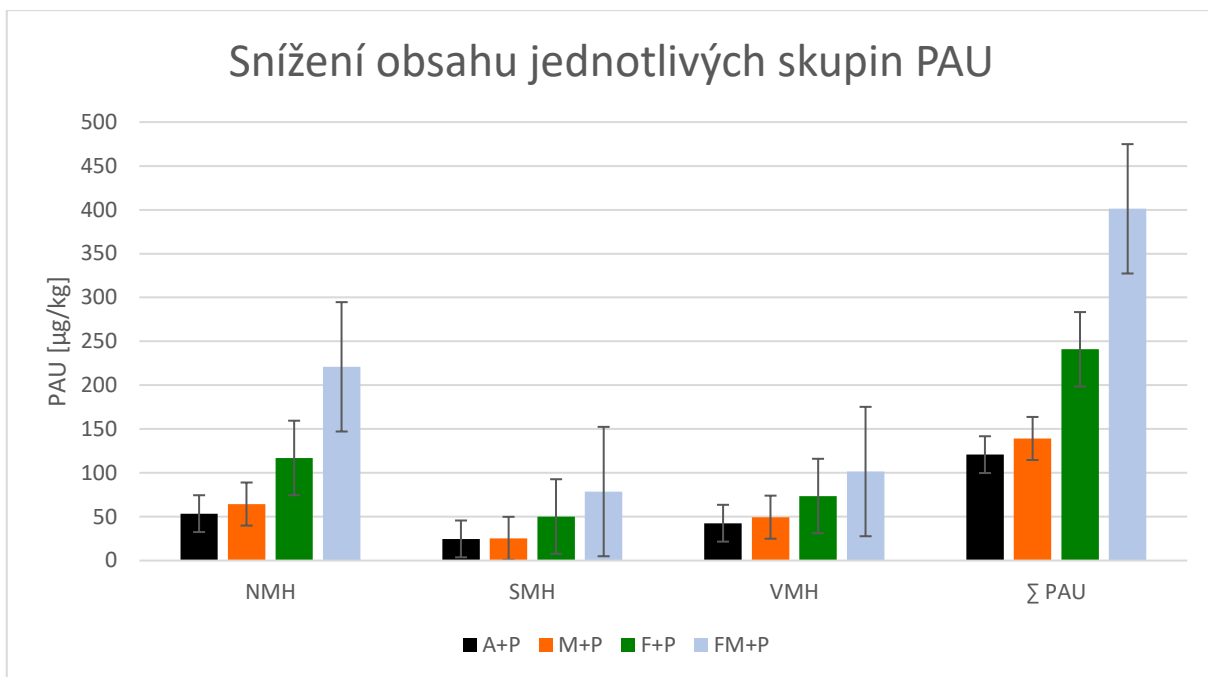
Graf 1: Množství degradovaných PAU v půdě jednotlivých variant nádobového pokusu včetně chybových úseček, udávajících standardní chybu. Malými písmeny jsou nad sloupci vyznačeny rozdíly mezi variantami, které byly stanoveny metodami mnohonásobného porovnání ($\alpha = 0,05$).



Graf 2: Množství degradovaných PAU v půdě jednotlivých variant nádobového pokusu včetně chybových úsečků, udávajících standardní chybu. Malými písmeny jsou nad sloupci vyznačeny rozdíly mezi variantami, které byly stanoveny metodami mnohonásobného porovnání ($\alpha = 0,05$).



Graf 3: Procentuální vyjádření degradace sledovaných PAU v půdách jednotlivých variant.



Graf 4: Hodnoty degradace PAU s nízkou (NMH), střední (SMH) a vysokou (VMH) relativní molekulovou hmotností ve srovnání s celkovou degradací všech PAU včetně chybových úseček, udávajících standardní chybu.

7 Diskuze

Vzhledem ke struktuře pokusu bylo v rámci práce možné vyhodnotit vliv přítomnosti vyššího obsahu PAU v půdách na výnos rostlin kukuřice seté. Z průměrných hodnot výšky a hmotnosti nadzemní biomasy vyplývá, že byl růst rostlin v některých variantách inhibován. Ve výsledcích je možné vidět výrazně vyšší hodnoty jak výšky (až o 25 %), tak váhy (až o 50 %) nadzemní biomasy u variant F a F+P. Rozdíl mezi variantami byl prokázán také statistickým vyhodnocením ($\alpha = 0,05$). Tato situace ale nenaznačuje negativnímu vlivu přítomnosti vyššího obsahu PAU v půdách. Místo toho byl růst rostlin ovlivněn přítomností houbového substrátu, obsahujícího hlívu ústřičnou. Vztah těchto mikroorganismů lze tudíž označit jako konkurenci vůči rostlinám. Toto tvrzení podporují i výsledky průměrné hmotnosti vypraných kořenů, které jednoznačně poukazují na rozvinutější kořenový systém rostlin u variant F a F+P. Vliv přítomnosti popelu nebo houbového substrátu na klíčivost semen kukuřice seté nebyl významný. Pozitivní účinek přítomnosti PAU na rostliny ve smyslu zvýšeného množství rostlinné biomasy v půdách obsahujících 2 mg/kg BaP uvádí také Sun & Zhou (2016), kteří zaznamenali rozdíl ve výnosu 2 druhů rostlin (aksamitník rozkladitý (*Tagetes patula*) a nocenka zahradní (*Mirabilis jalapa*)) oproti kontrolní půdě. Dále uvádí, že příliš vysoké koncentrace BaP (> 5 mg/kg) už působí negativně na růst rostlin, tudíž se dá říct, že do určité míry mohou PAU jako zdroj živin stimulovat růst rostlin a mikroorganismů v půdách.

Z dat základní charakteristiky půd byly zřetelně rozpoznatelné vzorky s přidavkem popelu, jejichž pH se pohybovalo kolem 6, zatímco ostatní varianty bez popelu měly pH poměrně nižší. Rozdíl byl pozorovatelný i ve výsledcích měrné elektrické vodivosti, kde bylo u variant obsahujících popel možné vidět až 7x vyšší hodnoty důsledkem vyššího obsahu iontů v těchto půdách. Rozdíly v průběhu času mezi půdami T_0 a T_{100} byly pozorovány pouze u EC, kde došlo k poklesu ve všech variantách půd. Výrazné rozdíly převážně u vzorků s popelem mohly být způsobeny činností mikroorganismů a rostlin, které využívají jednotlivé látky v půdě jako zdroj živin, a tudíž způsobují pokles výskytu volných iontů v půdách. Obsah organické hmoty v půdách tvořil 5-6 % z celkového složení. Vyšší hodnoty až o 1 % byly podle očekávání naměřeny u variant s houbovým substrátem. Výraznější rozdíly v obsahu organické hmoty mezi jednotlivými variantami byly stanoveny v půdách T_0 , přesto i v půdách T_{100} bylo možné vidět rozdíly mezi vzorky s obsahem houbového substrátu a bez něj. V průběhu času lze pozorovat u většiny variant úbytek organické složky půd, což může být způsobeno čerpáním živin mikroorganismy a rostlinami. Tento pokles obsahu organické složky může poukazovat také na degradaci PAU a snížení jejich celkového obsahu.

Možnost poklesu obsahu mikroorganismů v půdách, jako jednu z příčin snížení organické hmoty půd v průběhu času, bylo možné vyloučit na základě naměřených hodnot ergosterolu ve vzorcích. Z výsledků je patrné zvýšení obsahu ergosterolu (mikroorganismů) ve všech variantách půd, včetně těch bez přidaného houbového substrátu. Největší nárůst (o 58 %) byl zaznamenán u varianty F, která na začátku pokusu obsahovala nejmenší množství ergosterolu. To značí, že i v půdách bez přidaného houbového substrátu došlo k nárůstu přirozeně se vyskytujících mikroorganismů. Zvýšení autochtoní houbové biomasy způsobené

stimulací kořenovými exudáty rostlin a s tím související nárůst enzymatické aktivity uvádí ve své práci Košnář et al. (2019). V polních podmínkách ke stejnému zjištění dospěli také Sun et al. (2011). Největší obsah ergosterolu v půdách T_0 i T_{100} byl naměřen ve variantách M a FM. Zároveň došlo u těchto variant k jeho nárůstu v průběhu času o 45-48 %. U variant M+P a FM+P, které obsahovaly kromě houbového substrátu i popel, byly naměřeny také vyšší hodnoty ergosterolu, nárůst v čase ale nebyl tak výrazný. Je tedy možné, že příměs popelu v půdách mohla inhibovat růst mikrobiální populace a působit tudíž negativně na tyto organismy. Vliv přítomnosti rostlin na mikroorganismy v půdě není na výsledcích ergosterolu patrný, na rozdíl od opačné situace, kdy byl pozorován negativní vliv přítomnosti mikroorganismů na růst rostlin.

Nejnižší obsah degradovaného množství Σ PAU byl zaznamenán u varianty A+P, která simuluje přirozenou atenuaci v půdách. Stejně zjištění uvádí ve svých výsledcích Košnář et al. (2019), kde úroveň degradace Σ PAU tímto způsobem činí 4,8 %. V porovnání s touto prací (degradace Σ PAU = 7,4 %) se jedná o podstatně nižší účinnost. Kromě ACE a AC, u kterých celková degradace dosahovala nejnižších hodnot ve variantě M+P, byly zbylé NMH a SMH PAU přirozenou atenuací nejhůře odstraňovány. Ačkoli byla touto metodou zaznamenána nejnižší úroveň odstranění ze všech (degradace BbF pouze 3,7 %), účinnost remediace některých složitějších látek jako DA nebo BP byla v porovnání s mykoremediací či dokonce fytoremediací vyšší. Rozdíly v degradaci složitějších PAU mezi jednotlivými variantami ale nebyly příliš vysoké a statisticky neprůkazné ($\alpha = 0,05$).

Účinnost mykoremediace se příliš nelišila od přirozené atenuace a v některých případech převážně u složitějších látek s vyšší relativní molekulovou hmotností byla dokonce nižší. Pro tuto skupinu se přirozená atenuace ukazuje jako účinnější až u 5 z 8 VMH PAU. Rozdíly v účinnosti odstranění mezi mykoremediací a přirozenou atenuací byly ale velmi nízké (<3,6 %) a ani u jednoho z 16 PAU nebyly statisticky prokázány ($\alpha = 0,05$). Leonardi et al. (2007) uvádí účinnost *P. ostreatus* na degradaci PAH se 3 a 4 aromatickými kruhy až 73 %. Takto vysoké účinnosti v této práci dosaženo nebylo. Dále pak popisuje možnosti využití povrchově aktivních látek ke zlepšení biologické dostupnosti převážně VMH PAU, kde jako účinné označuje sójový olej a Tween 80.

Poměrně nízkou účinnost mykoremediace bylo možné vysvětlit na výsledcích naměřeného obsahu ligninolytických enzymů v půdách, které jsou ukazatelem aktivity houbové biomasy. Jednotlivé hodnoty těchto enzymů byly velmi nízké, a kromě jedné výjimky nepřesahovaly 3 mU/g. Většina výsledků byla dokonce nižší než 1 mU/g. Košnář et al. (2019) ve své práci uvádí hodnoty lakázy a Mn – peroxidázy u různých variant s houbovým substrátem obsahující hlívu ústřičnou i bez něj o několik řádů vyšší (0,1 - 1,5 U/g). Rozdíl v produkci ligninolytických enzymů byl dán nejspíše odlišnými podmínkami prostředí, kde mohla být v případě této práce aktivita houbových organismů inhibována například dalšími látkami, vyskytující se v popelu ze spalování biomasy. Na druhou stranu mohlo v průběhu času dojít k poklesu aktivity lakázy a dalších enzymů, jak uvádí Wu et al. (2008), kteří popisují úplný pokles aktivity extrahovatelné lakázy v průběhu prvních 14 dnů od začátku inkubace. I přes

velmi nízké hodnoty bylo ale možné vidět rozdíly v produkci ligninolytických enzymů mezi variantami. Obsah lakázy ve vzorcích simulující mykoremediaci byl vyšší než u přirozené atenuace. Stejně tak tomu bylo i ve všech ostatních případech s příměsí houbového substrátu oproti jejich alternativám bez tohoto substrátu. Obsah oxidázy, peroxidázy a Mn – peroxidázy byl ale vyšší u varianty A+P v porovnání s variantou M+P. Z toho vyplývá, že i autochtonní mikroorganismy v půdách se podílely na tvorbě ligninolytických enzymů, a tudíž na procesu degradace PAU. V průběhu času došlo u všech variant k poklesu obsahu lakázy, který byl statisticky prokázán ($\alpha = 0,05$) mezi variantou FM+P na počátku pokusu a variantou A na konci. Snížení obsahu lakázy v průběhu času společně s vyšší produkcí ostatních ligninolytických enzymů autochtonními organismy ve variantě A+P mohlo tudíž souviset s intenzitou degradace PAU. Degradací pomocí lakázy se ve své práci zabývá Wu et al. (2008), který popisuje její vysoký účinek u 13 PAU podle US EPA, převážně pak u AN (86 % při obsahu lakázy 10 U/g) a BaP (60 % při obsahu lakázy 10 U/g) během pouhých 24 hodin. Dále pak uvádí zvýšení účinnosti degradace přidáním redoxních mediátorů (ABTS), které výrazně přispěly k degradaci AN, BaP a BaA. Intenzitu degradace v průběhu času pomocí ligninolytických enzymů s využitím hlívy ústříčné popisují Eggen & Majcherczyk (1998), kteří uvádějí na příkladu BaP účinnost odstranění v prvním měsíci inkubace až 40 %, zatímco v druhém měsíci byla účinnost navýšena o pouhých 9 %. Zajímavostí je, že na konci jejich experimentu nebyl nalezen žádný obsah jednodušších meziproduktů (např. chinony) v půdách. To vysvětlují buď kompletním metabolizací BaP nebo tvorbou jiných meziproduktů.

Na rozdíl od ligninolytických enzymů byl obsah hydrolytických enzymů ve všech půdách výrazně vyšší (0,2 - 25,4 U/g). Rozdíl mezi obsahem těchto dvou skupin enzymů je až o 3 řády. Lze tudíž předpokládat, že na degradaci PAU se z větší části podílely právě hydrolytické enzymy. Nejvíce bylo ve vzorcích zjištěno lipázy, jejíž obsah neklesl ani u jedné z variant pod 10 U/g. Jedná se také o jediný z této skupiny enzymů, u kterého byl v průběhu času naměřen ve většině případů nárůst, značící zvýšení enzymatické aktivity. Nízký pokles v průběhu času byl zaznamenán u varianty M+P (o 12,8 %), která ale jako jediná vykazuje nárůst obsahu cellobiohydrolázy více jak o polovinu původního obsahu. Druhý pokles v čase byl zaznamenán u varianty A, kde celkový obsah lipázy klesl na polovinu. Zároveň byl v čase T_{100} zjištěn statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$) v obsahu lipázy právě mezi variantou A a variantou F+P. Obsah ostatních hydrolytických enzymů nebyl tak vysoký jako v případě lipázy, přesto stále výrazně vyšší než obsah ligninolytických enzymů. Druhým, nejvíce zastoupeným enzymem v půdách, byla β -D glukosidáza, jejíž hodnoty dosahovaly v čase T_0 průměrně 3,1 U/g a v čase T_{100} pak v průměru 2,3 U/g. Množství kyselé fosfatázy bylo více jak 2x nižší než množství β -D glukosidázy a celkové množství chitinázy a cellobiohydrolázy v jednotlivých variantách nepřesahovalo 1 U/g. Výjimkou je varianta M, kde byl naměřen v čase T_0 zvýšený obsah chitinázy (2,19 U/g), ostatní enzymy však nenaznačují zvýšené enzymatické aktivity v této variantě.

Fytoremediace s využitím rostlin kukuřice seté na rozdíl od mykoremediace a přirozené atenuace odstraňovala většinu látek podstatně lépe. Kromě DA a BP byla u ostatních PAU

výrazně účinnější a je tudíž možné ji v rámci této práce označit jako jednu z lepších metod pro odstranění tohoto typu látek z půd. U více jak poloviny sledovaných PAU byla účinnost odstranění až 2x vyšší v porovnání s mykoremediací a přirozenou atenuací. V případě BkF dosahovala fytofarmacie nejlepšího výsledku (13,2 %) ze všech variant. Hodnota celkového degradovaného množství BbF tvořila dokonce trojnásobek oproti přirozené atenuaci. Košnář et al. (2019) uvádí nejvyšší účinnost odstranění u jednodušších PAU (NA, ACE, AC a FL), zatímco složitější PAU touto metodou příliš odstraněny nebyly, což je v rozporu s touto prací, kde bylo dosaženo podobné účinnosti (14,4 - 18,4 %) jak u jednodušších, tak i u složitějších PAU, jako jsou FLU, PY, BaA nebo CH. Jako jednu z možností zvýšení účinnosti degradace uvádí Meng et al. (2011) nahrazení rostlinné monokultury více druhy rostlin (např. *Lolium perenne*, *Trifolium repens* nebo *Apium graveolens*), kdy kombinace 2 druhů rostlin výrazně zvýšila degradaci jednodušších PAU, zatímco kombinace 3 druhů rostlin byla v porovnání s monokulturami lepší v odstraňování složitějších PAU. Sun et al. (2011) popisují nejvyšší účinnost degradace (30,4 %) v polních podmínkách s využitím metody pěstování více druhů rostlin vedle sebe (z angličtiny „intercropping“) oproti monokulturám a neosázené půdě.

Nelze ale říct, že došlo v důsledku fytofarmacie pouze k degradaci PAU na jednodušší meziproducty. Ačkoli v nadzemní biomase nebyl zjištěn žádný obsah těchto látek, v kořenech rostlin byl zaznamenán obsah některých jednodušších PAU (celkem 6) včetně FLU, PY a BaA. Výskyt nízkého obsahu (<44,9 µg/kg) jednodušších PAU v kořenech kukuřice popisují také Košnář et al. (2018). Bioakumulační faktor ΣPAU ale nepřesahoval ani u jedné z variant 4 %. Sun & Zhou (2016) uvádí na příkladu BaP nejvyšší koncentrace v kořenech rostlin aksamitníku rozkladitěho a nocenky zahradní oproti nadzemním částem, stejně jako je uvedeno v této práci v případě kukuřice. Velmi nízkou bioakumulační schopnost rostlin (<1 %) popisují také Sun et al. (2011). Podíl jednotlivých PAU v kořenech rostlin není vysoký a pohybuje se okolo 4-9 % v poměru k obsahu těchto látek v půdách T₀. Při porovnání s degradovaným obsahem v půdách ale můžeme pozorovat, že se na snížení obsahu některých PAU podílela poměrně významně také fytoakumulace. Nejvýznamnější byla akumulace v kořenech rostlin u varianty F+P, kde obsah BaA činil 60 % z celkového degradovaného množství v půdách. Dále pak akumulace FLU, kde tento obsah dosahoval téměř 50 %. U ostatních PAU nebyl jejich podíl v kořenech při porovnání s degradovaným množstvím tak výrazný a pohyboval se mezi 13,5 - 30,8 %. Přítomnost houbového mycelia v půdách naopak značí lepší degradaci PAU, jelikož byl v kořenech rostlin rostoucích v těchto půdách naměřen nižší obsah akumulovaného množství PAU než v kořenech rostlin rostoucích v půdách bez houbového substrátu.

Jako nejúčinnější metoda degradace PAU z půd kontaminovaných popelem se ukázala kombinace fytofarmacie s mykoremediací (fytofarmacie). Ke stejnému zjištění dospěli i García-Sánchez et al. (2018) s kukuřicí a *Crucibulum laeve* jako mykoremediační houbou. Kromě již zmiňovaného BkF a FL (jehož obsah byl ve všech variantách pod mezí detekce GC/MS) byla úroveň degradace zbylých 14 PAU nejvyšší. U všech NMH PAU dosahovala okolo 30 % z celkové počáteční kontaminace. V případě NA (38 %) a ACE (34 %) došlo tímto způsobem k odstranění více jak 1/3 celkové kontaminace. Vysoký stupeň degradace NA (87,7

%) uvádí také Košnář et al. (2018), který využíval ve své práci jako fytořediační rostlinu také kukuřici setou. V porovnání s touto prací se jedná o výrazně vyšší účinek degradace, který je možné vysvětlit odlišným způsobem aplikace a celkovou dávkou kontaminace 16 PAU do půd.

Degradace AN byla metodou fytořibioremediace skoro 5x vyšší než v případě přirozené atenuace a pro zbylé NMH a SMH PAU tvořila téměř trojnásobek oproti přirozené atenuaci a mykoremediaci. Fytořibioremediace dosahovala vysoké účinnosti i u některých složitějších PAU (BaA, CH), kde se tato účinnost pohybovala v podobných hodnotách jako v případě jednodušších PAU. Degradace ostatních VMH PAU se pohybovala mezi 10 - 18,2 % (DA). García-Sánchez et al. (2018) uvádí vysoké hodnoty degradace také u složitějších PAU (BbF, BkF, BaP a BP), které jsou podstatně větší než v této práci a tvoří 48-62 % z původního obsahu po 180 dnech od založení pokusu. Je tedy možné, že v případě delšího vegetačního období nebo víceletého pěstování kukuřice by i degradace PAU s využitím hlívy ústřičné stále vzrůstala a mohla dosáhnout podobných hodnot. Rozdíly v degradaci PAU mezi jednotlivými variantami byly patrné i ze statistického vyhodnocení ($\alpha = 0,05$), převážně pak rozdíly mezi fytořibioremediací a mykoremediací nebo přirozenou atenuací, což je v rozporu s Košnářem et al. (2019), který uvádí podobnou účinnost degradace u mykoremediace bez i s asistencí rostlin, ačkoli poukazuje na nejvyšší mikrobiální aktivitu právě u rostlinami podporované mykoremediace. Prokazatelné rozdíly byly ale také zaznamenány mezi fytořibioremediací a fytořediací. Oproti rostlinami podporované mykoremediaci si fytořediace vedly podstatně hůř a u některých PAU (NA, AC, BaA a DA) byla celková účinnost odstranění až 2x nižší. Rozdíl v účinnosti degradace NMH a SMH PAU mezi těmito dvěma variantami se pohybuje v rozmezí 8,7-21 %.

8 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo ověření účinnosti degradace PAU v půdách pomocí fytoředičních a mykoředičních metod, včetně jejich vzájemné kombinace. Pokus byl nastaven tak, aby simuloval přirozené prostředí a ověřil možnost aplikace těchto metod v životním prostředí.

Účinnost degradace celkového obsahu PAU v půdách se u přirozené atenuace (7,4 %) a mykoředičce (8,7 %) v této práci příliš nelišila. Oproti tomu fytoředičce byla výrazně účinnější (14,7 %). Analýza rostlinného materiálu prokázala výskyt nízkého obsahu jednodušších PAU v kořenech rostlin (4-9 % v poměru k obsahu těchto látek v půdách T_0), značící kromě fytoředičce také fytoakumulaci. V nadzemní biomase nebyl zjištěn obsah žádného z 16 PAU, což je z hlediska dalšího zpracování a využití rostlin pozitivní zjištění. Nejúčinnější metodou byla fytoředičce, kterou došlo k degradaci až 1/4 celkového obsahu PAU v půdách. Účinnost fytoředičce byla o 10 % vyšší než v případě fytoředičce a o 17 % vyšší než v případě mykoředičce. I přes poměrně nízkou účinnost mykoředičce byly hypotézy 1, 2 a 3 této práce potvrzeny. Hypotéza 4 o přítomnosti PAU v rostlinné biomase byla potvrzena pouze pro jednodušší sloučeniny a pouze v kořenech rostlin.

Obecně byly všemi metodami nejvíce degradovány NMH PAU. Fytoředičcí byl snížen obsah NA, ACE a AC až o 1/3 z celkové původní kontaminace. Ačkoli jsou BaA a CH vzhledem k jejich molekulové hmotnosti brány jako VMH PAU, intenzita jejich degradace v půdách se rovnala intenzitě degradace jednodušších PAU. Ostatní VMH PAU ale vykazovaly výrazně nižší intenzitu degradace oproti jednodušším PAU, jak bylo očekáváno vzhledem k jejich vlastnostem a složitější struktuře.

Analýza enzymatické aktivity nenaznačovala příliš vysokému obsahu ligninolytických enzymů (< 3 mU/g). Naopak bylo v půdách zjištěno poměrně vysoké zastoupení hydrolytických enzymů, zvláště lipázy (> 10 U/g), které se mohly podílet na degradaci PAU ve značném měřítku. Vysokou účinnost fytoředičce lze tudíž vysvětlit stimulací rostlin působením mikroorganismů v oblasti rhizosféry a následnou degradací extracelulárními hydrolytickými enzymy v půdě.

Tato práce popisuje možnost využití kukuřice jako fytořediční rostliny a společně s mikroorganismy tak dosáhnout poměrně efektivního odstranění PAU z životního prostředí. Osetí kontaminovaných půd v dalších letech umožní sledovat změnu obsahu PAU v průběhu delší doby, což může vést až ke kompletnímu odstranění všech PAU z půd. Možnost aplikace této metody v kontaminovaných lokalitách závisí na dané situaci, kdy by mohlo být za přijatelných podmínek kromě ředičských schopností rostlin využito také jejich produkčních vlastností. Výsledky této práce potvrzují jako nejúčinnější způsob ředičce kombinaci více druhů organismů z důvodu jejich synergického působení a jsou vhodným podkladem pro další výzkum. Kromě toho mohou sloužit ke zlepšení stávajících ředičských metod a tvorbě nových postupů s lepšími výsledky.

9 Literatura

Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* **25(1)**: 107-123.

Acevedo F, Pizzul L, del Pilar Castillo M, Cuevas R, Diez MC. 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials* **185(1)**: 212-219.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Available from <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf> (accessed June 2020).

Amodu OS, Ojumu TV, Ntwampe SKO. 2013. Bioavailability of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Renewable Resources. Pages 171-194 in Petre M, editor. *Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications*. InTech, Rijeka, Croatia.

Boopathy R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74(1)**: 63-67.

Boyle D, Wiesner C, Richardson A. 1998. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **30(7)**: 873-882.

Cerniglia CE. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **4(3)**: 331-338.

Connell DW. 1997. *Basic concepts of environmental chemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton.

Cunningham SD, Berti WR, Huang JW. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* **13(9)**: 393-397.

Eggen T, Majcherczyk A. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41(2)**: 111-117.

Freni SC. 1987. Application of Estimated Excess Lifetime Cancer Risk in Field Situations. Pages 339-347 in Covello VT, Lave LB, Moghissi A, Uppuluri VRR, editors. *Uncertainty in Risk Assessment, Risk Management, and Decision Making*. Springer, Boston, Massachusetts.

Gan S, Lau EV, Ng HK. 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* **172(2-3)**: 532-549.

García-Delgado C, Alfaro-Barta I, Eymar E. 2015. Combination of biochar amendment and mycoremediation for polycyclic aromatic hydrocarbons immobilization and biodegradation in creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* **285**: 259-266.

García-Sánchez M, Košnář Z, Mercl F, Aranda E, Tlustoš P. 2018. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted

phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **147**: 165-174.

Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. 2016. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1369.

Hanč A, Částková T, Bazalová M. 2018. Změny enzymatické aktivity a metody jejího stanovení během procesu vermikompostování v systému průběžného krmení. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Haritash AK, Kaushik CP. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169(1-3)**: 1-15.

Holme JA, Brinchmann BC, Refsnes M, Låg M, Øvrevik J. 2019. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environmental Health* **18(1)**: 1-18.

Hynšt J, Vodáková M, Němec P, Prášková L. 2016. Porovnání různých dávek hnojiva Rošťák: Závěrečná zpráva o výsledcích vegetační nádobové zkoušky za roky 2011-2015. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.

Kadri T, Rouissi T, Brar SK, Cledon M, Sarma S, Verma M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences* **51**: 52-74.

Katyal A, Morrison RD. 2007. Forensic applications of contaminant transport models in the subsurface. Pages 513-575 in Murphy BL, Morrison RD, editors. *Introduction to Environmental Forensics*. Academic Press. Kidlington, Oxford.

Khan FI, Husain T, Hejazi R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* **71(2)**: 95-122.

Košnář Z, Částková T, Wiesnerová L, Praus L, Jablonský I, Koudela M, Tlustoš P. 2019. Comparing the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil after different bioremediation approaches in relation to the extracellular enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences* **76**: 249-258.

Košnář Z, Mercl F, Tlustoš P. 2018. Ability of natural attenuation and phytoremediation using maize (*Zea mays* L.) to decrease soil contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from biomass fly ash in comparison with PAHs-spiked soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **153**: 16-22.

Kučerová P, Macková M, Macek T. 1999. Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chemické Listy* **93**: 19-26.

Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, Lee YB, Naidu R, Megharaj M. 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere* **168**: 944-968.

- Leonardi V, Šašek V, Petruccioli M, D'Annibale A, Erbanová P, Cajthaml T. 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* **60(3)**: 165-170.
- Liu P, Li Z, Bennett A, Lin H, Sarathy SM, Roberts WL. 2019. The site effect on PAHs formation in HACA-based mass growth process. *Combustion and Flame* **199**: 54-68.
- Macek T, Mackova M, Káš J. 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* **18(1)**: 23-34.
- Masto RE, Sarkar E, George J, Jyoti K, Dutta P, Ram LC. 2015. PAHs and potentially toxic elements in the fly ash and bed ash of biomass fired power plants. *Fuel Processing Technology* **132**: 139-152.
- Meng L, Qiao M, Arp HPH. 2011. Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *Journal of Soils and Sediments* **11(3)**: 482-490.
- Ministerstvo zemědělství. 2014. Vyhláška č. 131 ze dne 3. července 2014, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, ve znění pozdějších předpisů, a vyhláška č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojivo stanovení požadavků na hnojiva. Pages 1314-1345 in *Sbírka zákonů České republiky*, částka 56. Česká republika.
- Ministerstvo životního prostředí. 2014. *Věstník MŽP ročník XIV - leden 2014 - částka 1*. Česká republika.
- Ministerstvo životního prostředí. 2016. Vyhláška č. 153 ze dne 9. května 2016, o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Pages 2692-2699 in *Sbírka zákonů České republiky*, částka 59. Česká republika.
- Novotný Č, Svobodová K, Erbanová P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Šašek V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry* **36(10)**: 1545-1551.
- Ochecová P, Tlustoš P, Száková J, Košnář Z, Mercl F. 2014. Popel z biomasy - významný zdroj živin. Pages 43-50 in Vaněk V, editor. *Racionální použití hnojiv*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57(1-2)**: 20-33.
- Riaz R, Ali U, Li J, Zhang G, Alam K, Sweetman AJ, Jones KC, Malik RN. 2019. Assessing the level and sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soil and sediments along Jhelum riverine system of lesser Himalayan region of Pakistan. *Chemosphere* **216**: 640-652.
- Samanta SK, Singh OV, Jain RK. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **20(6)**: 243-248.

- Shen H. 2016. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Their Global Atmospheric Emissions, Transport, and Lung Cancer Risk. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Singh OV, Jain RK. 2003. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63(2)**: 128-135.
- Soudek P, Petrová Š, Benešová D, Kotyza J, Vaněk T. 2008. Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické Listy* **102**: 346-352.
- Sun M, Fu D, Teng Y, Shen Y, Luo Y, Li Z, Christie P. 2011. In situ phytoremediation of PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.) with tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity. *Journal of Soils and Sediments* **11(6)**: 980-989.
- Sun Y, Zhou Q. 2016. Uptake and translocation of benzo[a]pyrene (B[a]P) in two ornamental plants and dissipation in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **124**: 74-81.
- Suthersan SS, Horst J, Schnobrich M, Welty N, McDonough J. 2016. Remediation Engineering. CRC Press, Boca Raton.
- Ting WTE, Yuan SY, Wu SD, Chang BV. 2011. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **65(1)**: 238-242.
- Tlustoš P, Jablonský I, Jelínek F, Kaplan L, Košnář Z, Koudelka M. 2017. Mykoremediace vybraných perzistentních organických polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Tobiszewski M, Namieśnik J. 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution* **162**: 110-119.
- Trapp S, McFarlane C, Matthies M. 1994. Model for uptake of xenobiotics into plants: Validation with bromacil experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13(3)**: 413-422.
- US EPA. 2011. An Overview of Methods for EPA's National-Scale Air Toxics Assessment. Durham, North Carolina. Available from <https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/2005-nata-tmd.pdf> (accessed June 2020).
- US EPA. 2014. Priority Pollutant List. United States. Available from <https://www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act> (accessed June 2020).
- Vácha R. 2019. Kontaminace půd. Česká technologická platforma pro zemědělství. Available from <https://www.ctpz.cz/vyzkum/kontaminace-pudy-857> (accessed June 2020).
- Vaněk T, Soudek P, Podlípna R, Petrová Š, Landa P. 2017. Fytoremediace a možnosti její aplikace. Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., Praha.

- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* **73(7)**: 1163-1172.
- Virkutyte J, Sillanpää M, Latostenmaa P. 2002. Electrokinetic soil remediation - critical overview. *Science of The Total Environment* **289(1-3)**: 97-121.
- Wu Y, Teng Y, Li Z, Liao X, Luo Y. 2008. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* **40(3)**: 789-796.
- Yan J, Wang L, Fu PP, Yu H. 2004. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Research* **557(1)**: 99-108.
- Zimová M, Melicherčík J, Bíbrová Z, Podolská Z, Kulhánek A, Ježová M. 2006. Zdravotní rizika kontaminace půdy městských aglomerací: Odborná zpráva za rok 2005. Státní zdravotní ústav Praha, Praha.

10 Samostatné přílohy



Obrázek 6: Kukuřice setá v nádobách s různými variantami půd v zastřešené hale areálu ČZU (autor obrázku: Petr Frühbauer).



Obrázek 7: Kontaminace půd popelem ze spalování biomasy a homogenizace s houbovým substrátem, předpěstovaným v umělohmotných nádobách znázorněných na prostřední fotografii (autor obrázků: Petr Frühbauer).



Obrázek 8: Odebrané a očištěné kořeny rostlin kukuřic připravené k sušení a následné úpravě (autor obrázku: Petr Frühbauer).



Obrázek 9: Sklizeň rostlin, vážení a příprava na sušení a další úpravu (autor obrázku: Petr Frühbauer).