

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Ekologie a ochrana prostředí

Ochrana životního prostředí



Diplomová práce

**Biodegradace polychlorovaných bifenyly v podzemní vodě pomocí
biologických přístupů**

Biodegradation of polychlorinated biphenyls in underground water using
biological approaches

Vypracovala: Kamila Šrédlová

Konzultant: RNDr. Zdena Křesinová, Ph.D.

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph.D. a konzultantky RNDr. Zdeny Křesinové, Ph.D. s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou řádně citovány. Dále prohlašuji, že předložená tištěná verze diplomové práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne

.....

Kamila Šrédlová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli, doc. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D., a konzultantce RNDr. Zdeně Křesinové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracovávání diplomové práce.

Luce Linhartové děkuji za pomoc při zpracování ergosterolu a Aleně Filipové za pomoc při zpracování PLFA. Janě Janochové, Jarce Medkové a ostatním členům Laboratoře environmentální biotechnologie děkuji za ochotu poradit, pomoc a všeobecnou podporu během zpracovávání diplomové práce.

V neposlední řadě děkuji rodině, bez jejíž podpory během studia by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla realizována za finanční podpory ze státních prostředků prostřednictvím Centra kompetence Technologické agentury ČR č. TE01020218.

Obsah

Obsah	3
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1 ÚVOD.....	8
2 SEZNAM ZKRATEK	9
3 TEORETICKÝ ÚVOD	11
3.1 Polychlorované bifenyly	11
3.1.1 Vlastnosti polychlorovaných bifenyly.....	11
3.1.1 Výroba a použití polychlorovaných bifenyly	13
3.1.2 Osud polychlorovaných bifenyly v životním prostředí	13
3.1.3 Účinky polychlorovaných bifenyly na zdraví.....	14
3.2 Charakterizace lokality.....	15
3.3 Přístupy k remediaci polychlorovaných bifenyly.....	15
3.3.1 Fyzikálně-chemické přístupy	15
3.3.2 Bioremediační přístupy.....	16
3.3.2.1 Bakteriální degradace PCB	16
3.3.2.2 Fytoremediace PCB	17
3.3.2.3 Mykoremediace PCB	17
3.4 Ligninolytické houby	18
3.4.1 Enzymatický aparát.....	18
3.4.1.1 Ligninolytické enzymy.....	19
3.4.1.2 Cytochrom P450.....	20
3.4.2 Využití ligninolytických hub v bioremediačních postupech	20
3.4.3 Degradace PCB ligninolytickými houbami	21
4 CÍL PRÁCE.....	24
5 MATERIÁL A METODY.....	25
5.1 Použitý materiál a chemikálie	25
5.2 Přístrojové vybavení.....	26
5.3 Fyzikálně-chemické metody	27

5.3.1	Vývin metodiky pro stanovení koncentrace PCB ve vodných matricích ..	27
5.3.1.1	Extrakce pevnou fází (Kolonky CHROMABOND C ₁₈).....	27
5.3.1.2	Extrakce pevnou fází C18 (Disky ENVI™-18).....	27
5.3.2	Extrakce pevných matric vysokotlakou extrakcí rozpouštědlem (ASE) ...	30
5.3.3	Detekce PCB plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS)...	31
5.3.4	Kvantifikace houbové biomasy prostřednictvím stanovení ergosterolu	31
5.3.4.1	Příprava vzorků	32
5.3.4.2	Stanovení ergosterolu pomocí kapalinové chromatografie.....	32
5.3.5	Stanovení fosfolipidových mastných kyselin	32
5.3.5.1	Extrakce lipidů	32
5.3.5.2	Frakcionace lipidů.....	33
5.3.5.3	Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace).....	33
5.3.5.4	GC/MS analýza	34
5.3.5.5	Vyhodnocení	34
5.4	Biologické metody	35
5.4.1	Příprava pevného substrátu a sterilizace	35
5.4.2	Kultivace mikroorganismů	35
5.4.3	Stanovení enzymatických aktivit	35
5.4.3.1	Stanovení aktivity lakázy	36
5.4.3.2	Stanovení aktivity MnP a VP.....	37
5.4.3.3	Stanovení koncentrace proteinů	37
5.4.4	Degradace PCB kmenem <i>P. ostreatus</i> KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu	38
5.4.5	Degradace PCB v průtokovém bioreaktoru	39
5.5	Statistické zpracování dat.....	39
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
6.1	Vývin metodiky pro stanovení koncentrace PCB ve vodných vzorcích.....	40
6.2	Stanovení koncentrace PCB ve vzorcích podzemní vody.....	47
6.3	Degradace PCB kmenem <i>P. ostreatus</i> KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu.....	48
6.3.1	Degradace PCB.....	48
6.3.2	Enzymatická aktivita.....	51

6.3.3 Stanovení ergosterolu	54
6.4 Degradace PCB v průtokovém bioreaktoru	55
6.4.1 Degradace PCB	55
6.4.2 Enzymatická aktivita.....	55
6.4.3 Stanovení ergosterolu a fosfolipidových mastných kyselin	57
7 ZÁVĚR.....	60
SEZNAM LITERATURY	61

Abstrakt

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou významné organické polutanty, které velmi pomalu podléhají degradaci a dlouhou dobu přetrvávají v životním prostředí. PCB mají mnohé negativní účinky na životní prostředí, organismy i lidské zdraví. Pro stanovení PCB ve vodných matricích byla optimalizována metoda extrakce pevnou fází (SPE) s následnou analýzou prostřednictvím GC/MS. Průměrná výtěžnost SPE demineralizované vody uměle kontaminované PCB se pro jednotlivé kongenery pohybovala kolem 85 %. V dlouhodobě kontaminované podzemní vodě pocházející z areálu bývalé obalovny živičných drtí byla zjištěna koncentrace PCB $3,3 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (suma vybraných kongenerů). Nejhojněji zastoupené kongenery byly trichlorované PCB, které dohromady představovaly asi 80 % celkového obsahu PCB. Vytvořená metodika byla dále spolu s vysokotlakou extrakcí pevných matric (ASE) použita pro zhodnocení degradačního potenciálu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), u které byla v literatuře popsána vysoká degradační účinnost vůči některým organopolutantům, včetně některých kongenerů PCB. *P. ostreatus* patří mezi ligninolytické houby (houby bílé hniloby), perspektivní skupinu mikroorganismů hojně studovanou z hlediska bioremediačních aplikací. *P. ostreatus* KRYOS byl při degradaci komerční směsi PCB Deloru 103 schopen z počátečního obsahu 50 μg po čtyřech týdnech odstranit 41 ± 8 % PCB. Růst houbové kultury nebyl v průběhu experimentu ovlivněn přítomností PCB. Pro degradaci PCB v uměle kontaminované vodě byl dále použit průtokový bioreaktor, se kterým bylo dosaženo odstranění 100 % PCB z vodné matrice a 72–80% odstranění celkového obsahu PCB (reziduální obsah PCB byl detekován v substrátu s houbovým myceliem).

Klíčová slova: biodegradace, polychlorované bifenyly, ligninolytické houby, *Pleurotus ostreatus*, extrakce pevnou fází, SPE

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a class of important organic pollutants which undergo very slow degradation and tend to persist for a long time in the environment. PCBs have various negative effects on living organisms, human health and the environment in general. A method for determining PCB levels in aqueous matrices was developed consisting of solid-phase extraction (SPE) and GC/MS determination. The average recoveries of PCB congeners from artificially spiked deionized water were around 85%. The PCB concentration of $3.3 \pm 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (a sum of selected congeners) was detected in contaminated groundwater originated from the area of a former asphalt concrete producing plant. The most abundant PCBs were trichlorinated congeners which together comprised about 80% of the total PCB content. The optimised SPE method was further applied together with accelerated solvent extraction (ASE) to assess the degradation potential of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) which shows high degradation efficiency of various organic pollutants including PCBs. *P. ostreatus* belongs to ligninolytic (white-rot) fungi, which is a very promising group of microorganisms frequently studied due to their bioremediation potential. *P. ostreatus*, strain KRYOS was able to remove $41 \pm 8\%$ of the initial amount (50 μg) of the commercial PCB mixture Delor 103 after four weeks of degradation. The growth of the fungal culture during the experiment wasn't influenced by the presence of PCBs. A continuous-flow bioreactor was also applied to study PCB degradation from artificially spiked water which resulted in 100% PCB removal from the water matrix and 72–80% removal of the total PCB content (residual amount of PCBs was detected in the growth substrate).

Keywords: biodegradation, polychlorinated biphenyls, ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus*, solid-phase extraction, SPE

1 ÚVOD

Polychlorované bifenyly (PCB) patří mezi persistentní organické polutanty. Jedná se o velmi stabilní látky lipofilní povahy, které mají tendenci akumulace v organické hmotě v půdě, sedimentech a kalech a bioakumulace v živých organismech. PCB mají mnohé negativní účinky na zdraví, ovlivňují imunitní, hormonální, nervový a reprodukční systém a jsou karcinogenní (Lauby-Secretan, 2013). PCB se používaly jako transformátorové a hydraulické kapaliny, topné oleje či přísady do barev. Přesto, že jejich výroba byla v Československu zakázána v roce 1984, i nadále představují riziko pro životní prostředí, ať už díky únikům z dřívější výroby, haváriím či špatnému nakládání s odpady.

Hlavní riziko spojené s polychlorovanými bifenyly spočívá v jejich schopnosti dlouhodobě přetrvávat v životním prostředí. Jednou z možností, jak je z prostředí odstranit, je použití fyzikálně-chemických metod, které jsou ale většinou velmi nákladné a technicky náročné. Proto je v určitých případech výhodnější použít bioremediační metody, tedy využít k odstranění polutantů živé organismy. V bioremediačních postupech je v současné době hojně diskutováno využití skupiny ligninolytických hub, které jsou díky produkci extracelulárních enzymů s nízkou substrátovou specifitou schopné degradovat široké spektrum organických polutantů, jako jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), endokrinní disruptory (ED) a PCB (Cajthaml *et al.*, 2008; Cajthaml *et al.*, 2009; Field a Sierra-Alvarez, 2008).

Pro degradační experimenty byla vybrána ligninolytická houba hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), u které byla zaznamenána výborná schopnost degradovat PCB s účinností pohybující se okolo 99 % v prostředí tekutého kultivačního média. Tento kmen patří mezi několik málo popsanych druhů, které jsou schopny degradovat i penta- a hexachlorované bifenyly a snížit akutní toxicitu média (Čvančarová *et al.*, 2012).

Cílem této diplomové práce je nalezení vhodné metody pro stanovení koncentrace polychlorovaných bifenyly ve vzorcích dlouhodobě kontaminované podzemní vody, studium degradace PCB pomocí houby *P. ostreatus* kultivované na slámovém substrátu včetně sledování produkce ligninolytických enzymů a navržení optimálních podmínek poloprovozního bioreaktoru (např. rychlost průtoku, množství biomasy a substrátu) pro degradaci PCB prostřednictvím houby *P. ostreatus*.

2 SEZNAM ZKRATEK

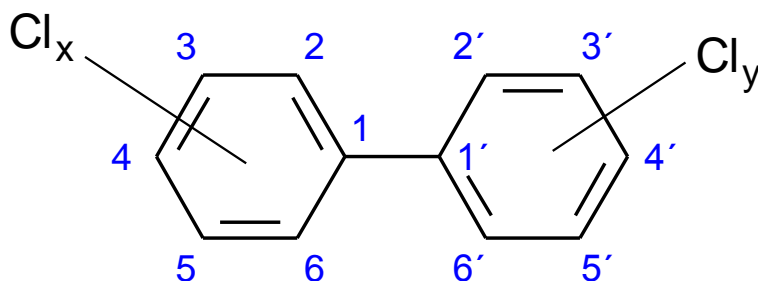
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (z angl. aryl hydrocarbon receptor)
ASE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (z angl. accelerated solvent extraction)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
CBA	chlorbenzoová kyselina
CYP	cytochrom P450
D103	Delor 103, komerční směs PCB
DCM	dichlormethan
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan
DMP	2,6-dimethoxyfenol
ED	endokrinní disruptory
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EI	elektronová ionizace
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
EtOAc	ethylester kyseliny octové
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (z angl. gas chromatography–mass spectrometry)
HCB	hexachlorbenzen
HKC	„heat-killed“ kontrola
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high-performance liquid chromatography)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
K _{ow}	rozdělovací koeficient n-oktanol/voda
LiP	lignin peroxidáza

MEG	malt-extrakt glukózový
MnP	Mn-dependentní peroxidáza
NEL	nepolární extrahovatelné látky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PCDD	polychlorované dibenzo- <i>p</i> -dioxiny
PCDF	polychlorované dibenzofurany
<i>pI</i>	isoelektrický bod
PLFA	analýza fosfolipidových mastných kyselin (z angl. phospholipid fatty acids)
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SPE	extrakce pevnou fází (z angl. solid-phase extraction)
TEF	faktor ekvivalentní toxicity (z angl. toxic equivalency factor)
TNT	2,4,6-trinitrotoluen
UNEP	Program OSN pro životní prostředí (United Nations Environmental Programme)
VP	versatilní peroxidáza

3 TEORETICKÝ ÚVOD

3.1 Polychlorované bifenyly

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou syntetické aromatické látky vyráběné chlorací molekuly bifenyly. Chemický vzorec PCB je $C_{12}H_{10-(x+y)}Cl_{x+y}$, kde $x+y$ je 1–10 (Obr. 1). Celkem může teoreticky existovat 209 tzv. kongenerů, tedy jednotlivých PCB, které se od sebe liší počtem a uspořádáním atomů chloru. Pro jednotlivé kongenery se používá číselné značení IUPAC (Tab. 1.) navržené Ballschmitemerem a Zellem (1980).



Obr. 1 Obecná chemická struktura PCB.

3.1.1 Vlastnosti polychlorovaných bifenyly

Všechny PCB kongenery mají lipofilní povahu, hodnoty rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda (K_{ow}) se pohybují od $10^{4,46}$ pro 2-monochlorobifenyl po $10^{8,18}$ pro dekachlorobifenyl (Hawker a Connell, 1988). Rozpustnost PCB ve vodě je velmi malá a obecně klesá se zvyšujícím se počtem atomů chloru v molekule, závisí ale i na jejich poloze (Dickhut *et al.*, 1986; Opperhulzen *et al.*, 1988). PCB mají mnoho výhodných technologických vlastností, díky kterým byly v minulosti hojně vyráběny a používány: jsou vysoce chemicky stálé a tepelně odolné, mají nízkou tenzi par, vysokou hustotu, dobře vedou teplo, ale díky vysokému elektrickému odporu nevedou elektrický proud (Pal *et al.*, 1980).

Tab. 1. Struktura jednotlivých PCB kongenerů (US EPA, 2003).

Číslo kongeneru	Pozice atomů Cl	Číslo kongeneru	Pozice atomů Cl	Číslo kongeneru	Pozice atomů Cl	Číslo kongeneru	Pozice atomů Cl
1	2	54	2,2',6,6'	107	2,3,3',4',5	160	2,3,3',4,5,6
2	3	55	2,3,3',4	108	2,3,3',4,5'	161	2,3,3',4,5',6
3	4	56	2,3,3',4'	109	2,3,3',4,6	162	2,3,3',4',5,5'
4	2,2'	57	2,3,3',5	110	2,3,3',4',6	163	2,3,3',4',5,6
5	2,3	58	2,3,3',5'	111	2,3,3',5,5'	164	2,3,3',4',5',6
6	2,3'	59	2,3,3',6	112	2,3,3',5,6	165	2,3,3',5,5',6
7	2,4	60	2,3,4,4'	113	2,3,3',5',6	166	2,3,4,4',5,6
8	2,4'	61	2,3,4,5	114	2,3,4,4',5	167	2,3',4,4',5,5'
9	2,5	62	2,3,4,6	115	2,3,4,4',6	168	2,3',4,4',5',6
10	2,6	63	2,3,4',5	116	2,3,4,5,6	169	3,3',4,4',5,5'
11	3,3'	64	2,3,4',6	117	2,3,4',5,6	170	2,2',3,3',4,4',5
12	3,4	65	2,3,5,6	118	2,3',4,4',5	171	2,2',3,3',4,4',6
13	3,4'	66	2,3',4,4'	119	2,3',4,4',6	172	2,2',3,3',4,5,5'
14	3,5	67	2,3',4,5	120	2,3',4,5,5'	173	2,2',3,3',4,5,6
15	4,4'	68	2,3',4,5'	121	2,3',4,5',6	174	2,2',3,3',4,5,6'
16	2,2',3	69	2,3',4,6	122	2,3,3',4',5'	175	2,2',3,3',4,5',6
17	2,2',4	70	2,3',4',5	123	2,3',4,4',5'	176	2,2',3,3',4,6,6'
18	2,2',5	71	2,3',4',6	124	2,3',4',5,5'	177	2,2',3,3',4,5',6'
19	2,2',6	72	2,3',5,5'	125	2,3',4',5',6	178	2,2',3,3',5,5',6
20	2,3,3'	73	2,3',5',6	126	3,3',4,4',5	179	2,2',3,3',5,6,6'
21	2,3,4	74	2,4,4',5	127	3,3',4,5,5'	180	2,2',3,4,4',5,5'
22	2,3,4'	75	2,4,4',6	128	2,2',3,3',4,4'	181	2,2',3,4,4',5,6
23	2,3,5	76	2,3',4',5'	129	2,2',3,3',4,5	182	2,2',3,4,4',5,6'
24	2,3,6	77	3,3',4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	183	2,2',3,4,4',5',6
25	2,3',4	78	3,3',4,5	131	2,2',3,3',4,6	184	2,2',3,4,4',6,6'
26	2,3',5	79	3,3',4,5'	132	2,2',3,3',4,6'	185	2,2',3,4,5,5',6
27	2,3',6	80	3,3',5,5'	133	2,2',3,3',5,5'	186	2,2',3,4,5,6,6'
28	2,4,4'	81	3,4,4',5	134	2,2',3,3',5,6	187	2,2',3,4',5,5',6
29	2,4,5	82	2,2',3,3',4	135	2,2',3,3',5,6'	188	2,2',3,4',5,6,6'
30	2,4,6	83	2,2',3,3',5	136	2,2',3,3',6,6'	189	2,2',3,3',4,4',5,5'
31	2,4',5	84	2,2',3,3',6	137	2,2',3,4,4',5	190	2,3,3',4,4',5,6
32	2,4',6	85	2,2',3,4,4'	138	2,2',3,4,4',5'	191	2,3,3',4,4',5',6
33	2,3',4'	86	2,2',3,4,5	139	2,2',3,4,4',6	192	2,3,3',4,5,5',6
34	2,3',5'	87	2,2',3,4,5'	140	2,2',3,4,4',6'	193	2,3,3',4',5,5',6
35	3,3',4	88	2,2',3,4,6	141	2,2',3,4,5,5'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
36	3,3',5	89	2,2',3,4,6'	142	2,2',3,4,5,6	195	2,2',3,3',4,4',5,6
37	3,4,4'	90	2,2',3,4',5	143	2,2',3,4,5,6'	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
38	3,4,5	91	2,2',3,4',6	144	2,2',3,4,5',6	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
39	3,4',5	92	2,2',3,5,5'	145	2,2',3,4,6,6'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
40	2,2',3,3'	93	2,2',3,5,6	146	2,2',3,4',5,5'	199	2,2',3,3',4,5,5',6'
41	2,2',3,4	94	2,2',3,5,6'	147	2,2',3,4',5,6	200	2,2',3,3',4,5,6,6'
42	2,2',3,4'	95	2,2',3,5',6	148	2,2',3,4',5,6'	201	2,2',3,3',4,5',6,6'
43	2,2',3,5	96	2,2',3,6,6'	149	2,2',3,4',5',6	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
44	2,2',3,5'	97	2,2',3,4',5'	150	2,2',3,4',6,6'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
45	2,2',3,6	98	2,2',3,4',6'	151	2,2',3,5,5',6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
46	2,2',3,6'	99	2,2',4,4',5	152	2,2',3,5,6,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
47	2,2',4,4'	100	2,2',4,4',6	153	2,2',4,4',5,5'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
48	2,2',4,5	101	2,2',4,5,5'	154	2,2',4,4',5,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
49	2,2',4,5'	102	2,2',4,5,6'	155	2,2',4,4',6,6'	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
50	2,2',4,6	103	2,2',4,5',6	156	2,3,3',4,4',5	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
51	2,2',4,6'	104	2,2',4,6,6'	157	2,3,3',4,4',5'		
52	2,2',5,5'	105	2,3,3',4,4'	158	2,3,3',4,4',6		
53	2,2',5,6'	106	2,3,3',4,5	159	2,3,3',4,5,5'		

3.1.1 Výroba a použití polychlorovaných bifenyků

PCB byly poprvé syntetizovány a popsány v r. 1881 a průmyslově produkovány byly od 30. let 20. století (Westin, 1979). PCB byly vyráběny jako směsi kongenerů pod různými komerčními názvy, např. Aroclor (Monsanto, USA), Clophen (Bayer, Západní Německo), Kaneclor (Kanegafuchi, Japonsko) nebo Delor (Chemko Strážske, Československo) (Totevová *et al.*, 1997). Stupeň chlorace směsi bylo možné ovlivnit množstvím přidaného chloru. Díky výhodným technologickým vlastnostem byly PCB používány jako dielektrické kapaliny v elektrických zařízeních (transformátorech, kondenzátorech), hydraulické kapaliny, teplonosná média, přísady do barev a inkoustů, zpomalovače hoření, změkčovadla plastů nebo jako impregnační materiály (UNEP, 1999; Holoubek *et al.*, 2006).

V bývalém Československu byly PCB vyráběny v Chemku Strážske v oblasti východního Slovenska v letech 1959–1984. Odhaduje se, že v Československu bylo celkem vyrobeno kolem 25000 tun PCB, z čehož velké množství uniklo do životního prostředí. Přesto, že výroba PCB zde byla zakázána v r. 1984, díky persistenci daných látek přetrvává vzniklá kontaminace dodnes (Kocan *et al.*, 2001; Kaštánek a Kaštánek, 2005).

3.1.2 Osud polychlorovaných bifenyků v životním prostředí

Mezi zdroje znečištění životního prostředí PCB patří havárie, úniky z dřívější výroby a používání PCB, úniky z produktů obsahujících PCB a nakládání s odpadem obsahujícím PCB (Nisbet a Sarofim, 1972). V životním prostředí byly PCB poprvé nalezeny v r. 1966. Vyskytují se v půdě, sedimentech, vodě, ovzduší, zvířecí i lidské tkáni a potravinách (Faroon *et al.*, 2003). Transport a distribuce PCB v životním prostředí jsou dány především jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. rozpustnost ve vodě, K_{ow} , tenze par), které se liší u jednotlivých kongenerů. PCB byly identifikovány i v odlehlých částech světa, kde nikdy nebyly používány, jako jsou např. polární oblasti (Muir *et al.*, 1988; Vecchiato *et al.*, 2015; Ubl *et al.*, 2012), což dokazuje jejich dálkový přenos na velké vzdálenosti.

PCB se sorbují na organickou hmotu v půdě (Zheng *et al.*, 2014) a sedimenty (Smith *et al.*, 2009). Díky lipofilnímu charakteru PCB snadno podléhají bioakumulaci v organismech a biomagnifikaci v potravních řetězcích. Organismy na vyšší trofické úrovni mívají

zpravidla vyšší obsah vysokochlorovaných kongenerů než organismy na nižší trofické úrovni (Mulr *et al.*, 1988).

V r. 2001 byly PCB zařazeny mezi persistentní organické polutanty v rámci Stockholmské úmluvy o persistentních organických polutantech. Rozklad PCB v přirozených ekosystémech probíhá velmi pomalu a v jeho průběhu dochází ke změně kongenerového složení (Sokol *et al.*, 1994; Kaštánek *et al.*, 1999). Poločas rozpadu PCB roste s počtem atomů chloru v molekule a je odhadován řádově na dny (trichlorované PCB) až několik let (heptachlorované PCB) v ovzduší; měsíce (trichlorované PCB) až desítky let (heptachlorované PCB) ve vodním prostředí a roky (trichlorované PCB) až desítky let (heptachlorované PCB) v půdě a sedimentech (Sinkkonen a Paasivirta, 2000).

3.1.3 Účinky polychlorovaných bifenylnů na zdraví

Za hlavní zdroj expozice člověka PCB je považována potrava. PCB se z trávicí soustavy rychle absorbují a díky lipofilnímu charakteru se akumulují v tukové tkáni a játrech. PCB přecházejí z matky na potomka prostřednictvím placenty a mateřského mléka (Faroon *et al.*, 2003). PCB negativně ovlivňují imunitní, hormonální, nervový a reprodukční systém (Passatore *et al.*, 2014). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovala PCB v r. 2013 jako prokazatelně karcinogenní pro člověka (Lauby-Secretan, 2013).

Působení PCB na organismus je dáno chemickou strukturou, a liší se proto u jednotlivých kongenerů. Dvanáct kongenerů (PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 a 189), které vykazují silnou afinitu vůči AhR (receptor pro aromatické uhlovodíky), je díky podobnosti s toxicitou PCDD označováno jako tzv. dioxin-like. Jedná se o kongenery, které mají čtyři a více atomů chloru, mají substituované obě pozice *para* (4 a 4'), maximálně jednu *ortho* (2, 2', 6, 6') a minimálně dvě *meta* (3, 3', 5, 5') (US EPA, 2003). Nejtoxičtější z PCB je kongener 126, jehož faktor ekvivalentní toxicity (TEF) dosahuje hodnoty 0,1 (Van den Berg, 1998).

V těle jsou PCB hydroxylovány systémem monooxygenáz cytochromu P450 (CYP). Vznikající hydroxylované metabolity jsou více rozpustné ve vodě a mohou být dále konjugovány s glutathionem a glukuronovou kyselinou a vyloučeny z těla (Faroon *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2013).

3.2 Charakterizace lokality

Tato diplomová práce je zacílená na provedení pilotních pokusů biodegradace polychlorovaných bifenyly prostřednictvím hub bílé hniloby v souvislosti se sanací podzemní vody z areálu bývalé obalovny živičných drtí. Od počátku 80. let do roku 1986 byl na této lokalitě používán Delor 103 (D103) (AQUATEST, 2013b). D103 je komerční směs PCB obsahující asi 64 % trichlorobifenyly, 24,1 % tetrachlorobifenyly, 10,5 % dichlorobifenyly a zbylé množství tvoří monochlorobifenyly, pentachlorobifenyly a hexachlorobifenyly (Kubátová *et al.*, 1996; Kaštánek *et al.*, 1999). PCB byly na této lokalitě využívány jako teplotně odolná média při ohřevu asfaltu, jako přísady do asfaltu bránící jeho rychlému tuhnutí a dále na ošetření povrchů zabraňující přilnutí asfaltu (Gruntorád, 2012).

V roce 1986 došlo v areálu bývalé obalovny k havarijnímu úniku D103 a následné kontaminaci povrchové a podzemní vody, půdy a sedimentů PCB a NEL (nepolární extrahovatelné látky) (AQUATEST, 2013a).

3.3 Přístupy k remediaci polychlorovaných bifenyly

PCB lze odstranit fyzikálně-chemickými metodami, které většinou charakterizuje vysoká účinnost, ale také vysoké finanční náklady. Proto je v dnešní době velká pozornost věnována bioremediačním metodám, které bývají technicky méně náročné, méně nákladné a nevedou k trvalé degradaci kontaminované matrice po remediaci.

3.3.1 Fyzikálně-chemické přístupy

Mezi metody použité při dekontaminaci půdy a sedimentů obsahujících PCB patří incinerace, chemická oxidace, extrakce rozpouštědlem, reduktivní dechlorace, vitrifikace či termální desorpce (Gomes *et al.*, 2013). Pro incineraci kontaminované půdy je nutné ji odtěžít a většinou dále převézt do místa dekontaminace, spalováním navíc dochází k nevratné degradaci půdy. Při spalování PCB je nutné dodržet konstantní vysokou teplotu nad 1300 °C tak, aby bylo zabráněno vzniku vysoce toxických polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů (PCDD) a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF) (Erickson *et al.*, 1989; Totevová *et al.*, 1997). Vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě a tendenci PCB se

sorbovat na organickou hmotu a sedimenty je sanace vodných matric méně obvyklá. K dekontaminaci je možné použít různé sorbenty, např. aktivované uhlí (Beless *et al.*, 2014), bentonit či různé polymery (Kaštánek *et al.*, 1995), které je poté nutno dále skládkovat nebo spalovat. Možná je i aplikace nanoželeza, při které dochází k reduktivní dechloraci PCB (AQUATEST, 2013b).

3.3.2 Bioremediační přístupy

3.3.2.1 Bakteriální degradace PCB

Kongenery s vyšším počtem atomů chloru mohou být degradovány prostřednictvím anaerobní reduktivní dehalogenace, při které halogenované látky slouží jako alternativní akceptor elektronů v anaerobní respiraci (Mohn a Tiedje, 1992). Tento proces provádějí např. bakterie rodu *Dehalococcoides* (Field a Sierra-Alvarez, 2008). U PCB jsou přednostně dechlorovány pozice *meta* a *para*, což má spolu se snížením obsahu chloru v molekule PCB za následek snížení toxicity kongenerové směsi (Magar *et al.*, 2005). Reduktivní dehalogenace probíhá například v anaerobním prostředí vodních sedimentů, kde v průběhu času dochází k poklesu obsahu vysokochlorovaných kongenerů a naopak vzniku nízkochlorovaných kongenerů (Sokol *et al.*, 1994).

Kongenery s nižším počtem atomů chloru mohou být některými bakteriemi degradovány aerobně tzv. horní bifenylovou dráhou (bph, biphenyl upper pathway). Při tomto procesu jsou do molekuly PCB inkorporovány dva atomy kyslíku za katalýzy 2,3-dioxygenáz a vzniku *cis*-diolů (Gibson a Parales, 2000). Sérií chemických reakcí katalyzovaných různými enzymy je vzniklá hydroxylovaná sloučenina metabolizována dále. Dochází k rozrušení jednoho aromatického kruhu za vzniku (chlorovaného) 2-hydroxypenta-2,4-dienoátu a odštěpení (chlorované) benzoové kyseliny. Aerobní degradaci PCB provádí např. některé bakteriální kmeny rodů *Pseudomonas* (Nováková *et al.*, 2002), *Burkholderia* (Tillmann *et al.*, 2005), *Alcaligenes* (Murínová *et al.*, 2004) nebo *Rhodococcus* (Mukerjee-Dha *et al.*, 1998). Obecně jsou touto cestou lépe degradovatelné kongenery s nižším počtem atomů chloru a kongenery substituované pouze na jednom aromatickém kruhu. V případě, že je PCB chlorováno pouze na jednom aromatickém kruhu, může být 2-hydroxypenta-2,4-dienoát dále metabolizován až na acetylkoenzym A,

který je v citrátovém cyklu využit k zisku energie. Z druhého, chlorovaného kruhu potom vznikají různě chlorované chlorbenzoové kyseliny (CBA) (Pieper a Seeger, 2008). Tvorba CBA je při aerobní bakteriální degradaci nežádoucí, neboť často dochází k jejich kumulaci jako odpadního produktu a následné inhibici další degradace PCB (Vrana *et al.*, 1996; Adebuseye *et al.*, 2008; Nováková *et al.*, 2002). CBA navíc vykazují estrogenní aktivitu (Svobodová *et al.*, 2009) a jsou toxické vůči vodním organismům (Zhao *et al.*, 1998).

3.3.2.2 Fytoremediace PCB

Fytoremediační postupy využívají rostliny k extrakci, sekvestraci, transformaci a degradaci polutantů z kontaminované matrice. Na fytoremediačním procesu se často podílí nejen samotný rostlinný druh, ale i přítomná asociovaná mikroflóra (především mikroorganismy v rhizosféře). Schopnost transformovat PCB byla popsána například u lilku černého (*Solanum nigrum*) (Mackova *et al.*, 1997) nebo tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Rezek *et al.*, 2008). Transformace probíhá za iniciální účasti peroxidáz a CYP (Chroma *et al.*, 2002).

Fytoremediace PCB není v praxi příliš aplikována. Příjem PCB rostlinou je vzhledem k jejich lipofilnímu charakteru omezený a díky chemické stabilitě PCB probíhá proces fytoremediace pomalu, s nízkou účinností degradace, vysokým podílem rhizodegradace a možnou kumulací toxických degradačních produktů (Aken *et al.*, 2009).

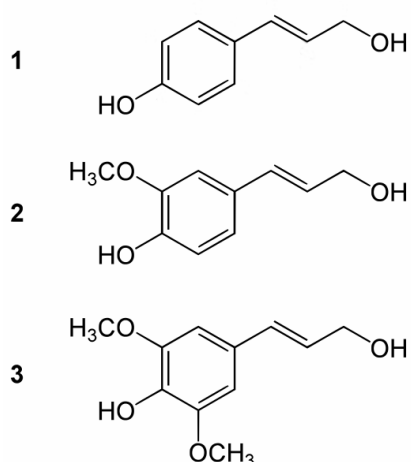
3.3.2.3 Mykoremediace PCB

Pro mykoremediace je velmi perspektivní především skupina tzv. ligninolytických hub, které jsou díky nízké substrátové specifitě extracelulárního enzymatického komplexu a radikálovému způsobu transformace schopny degradovat široké spektrum látek. Způsob degradace PCB ligninolytickými houbami je blíže popsán v kapitole 3.4.3.

Z dlouhodobě kontaminovaných půd byly izolovány autochtonní houbové organismy schopné degradace PCB. Jde především o zástupce oddělení Ascomycota a Zygomycota (Tigini *et al.*, 2009; Mouhamadou *et al.*, 2013; Sage *et al.*, 2014).

3.4 Ligninolytické houby

Ligninolytické houby (houby bílé hniloby) jsou skupinou dřevokazných hub patřící převážně do oddělení Basidiomycota (stopkovýtrusné houby). Charakteristickým znakem zástupců této skupiny je schopnost kompletně rozkládat lignin, polyfenolický komplexní organický polymer představující jednu z hlavních stavebních složek těl cévnatých rostlin. Molekula ligninu se skládá z náhodných kombinací tří monomerů: *p*-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu (Obr. 2) (Pointing, 2001).



Obr. 2 Strukturální monomery ligninu. 1: *p*-kumarylalkohol, 2: koniferylalkohol, 3: sinapylalkohol.

Lignin patří mezi v přírodě velmi obtížně rozložitelné sloučeniny a jeho rozklad je striktně aerobním procesem. Houby bílé hniloby jsou jedinou skupinou organismů, která je schopná plně rozkládat lignin a mineralizovat ho až na CO₂ a H₂O (Lundell *et al.*, 2010). Z rozkladu ligninu nezískávají houby bílé hniloby energii, tato schopnost jim ale přináší určitou ekologickou výhodu spočívající v usnadnění přístupu k snadněji rozložitelné celulóze a hemicelulóze (Pointing, 2001).

3.4.1 Enzymatický aparát

Díky nepravidelné polymerické struktuře a aromatickému charakteru ligninu musejí mít enzymy umožňující jeho degradaci nízkou substrátovou specifitu. Enzymatický aparát ligninolytických hub sestává z množství enzymů produkovaných extracelulárně (sem patří většina enzymů, které se podílejí na degradaci ligninu) i intracelulárně.

3.4.1.1 Ligninolytické enzymy

Ligninolytické houby produkují tři hlavní ligninolytické enzymy: lignin peroxidázu (LiP, E. C. 1.11.1.14), Mn-dependentní peroxidázu (MnP, E. C. 1.11.1.13) a fenol oxidázu lakázu (E. C. 1.10.3.2). Počet a množství produkovaných enzymů se u jednotlivých druhů hub liší. Regulace genové exprese lakáz a peroxidáz je ovlivněna koncentracemi uhlíku, dusíku a iontů kovů, přítomností xenobiotik, složením růstového média a růstovými podmínkami (Quarantino *et al.*, 2006; Janusz *et al.*, 2013).

LiP jsou glykosilované peroxidázy, obsahující ve své struktuře hem (Kirk a Farrell, 1987). Hmotnosti LiP je obvykle kolem 40–50 kDa a isoelektrický bod (pI) 3,2–4,0 (Wong, 2009). LiP v přítomnosti H₂O₂ katalyzuje oxidaci veratryl alkoholu, který poté dále oxiduje nefenolické aromatické látky, a ty se samovolně rozkládají. Vznikající radikály mohou podléhat řadě dalších reakcí, např. oxidaci, štěpení vazby uhlík-uhlík, hydroxylaci, dimerizaci, polymerizaci či demethylaci (Pointing, 2001). LiP dále katalyzují i oxidaci fenolických aromatických substrátů (Wong, 2009). LiP jsou ligninolytickými houbami produkovány výhradně extracelulárně (Baldrian, 2006).

MnP jsou glykosilované peroxidázy o hmotnosti obvykle 40–50 kDa, obsahující ve své struktuře hem. MnP oxiduje Mn²⁺ v přítomnosti H₂O₂ na vysoce reaktivní Mn³⁺, který je stabilizován chelatačními činidly, např. kyselinou š'avelovou. Chelatovaný Mn³⁺ slouží jako nízkomolekulární mediátor atakující fenolické látky za vzniku nestabilních radikálů, které se následně samovolně rozkládají (Hofrichter, 2002). Izolovaná MnP je schopna degradovat PAH (Bogan a Lamar, 1996), pentachlorofenol (Hofrichter *et al.*, 1998) či TNT (Van Aken *et al.*, 1999) *in vitro*. MnP jsou ligninolytickými houbami produkovány výhradně extracelulárně (Baldrian, 2006).

Lakázy jsou fenol oxidázy obsahující mēď. Katalyzují oxidace různých aromatických substrátů, při nichž je kyslík redukován na vodu a slouží tak jako terminální akceptor elektronů. Iniciální produkt je většinou nestabilní a může podléhat další katalytické oxidaci, hydrataci, disproportionaci či polymerizaci (Thurston, 1994). Většina houbových lakáz jsou extracelulární globulární proteiny o hmotnosti 60–70 kDa s pI okolo pH 4,0. Jejich typickým substrátem jsou fenoly, které jsou oxidovány na fenoxi-radikály (Giardina *et al.*, 2010). Lakáza může oxidovat i nefenolické substráty (např. veratryl alkohol) za přítomnosti vhodných mediátorů, např. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové

kyseliny) (ABTS) (Bourbonnais a Paice, 1990). Lakázy mohou být produkovány i intracelulárně, nicméně většina jich je ligninolytickými houbami produkována extracelulárně (Baldrian, 2006).

Ligninolytické houby produkují množství dalších enzymů, které se mohou podílet na rozkladu ligninu a degradačních procesech. Patří sem např. další peroxidázy, např. glyoxal oxidáza a superoxid dismutáza, které produkují H_2O_2 potřebný pro MnP a LiP (Leonowicz *et al.*, 1999). Někteří autoři uvádějí dále versatilní peroxidázu nezávislou na přítomnosti Mn^{2+} , která v izolované formě dokáže transformovat např. pentachlorofenol *in vitro* (Davila-Vazquez *et al.*, 2005).

3.4.1.2 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (CYP) patří do skupiny tzv. oxidáz se smíšenou funkcí, které představují hlavní mechanismus, jakým jsou u eukaryotických organismů metabolizovány xenobiotika. Tyto oxidázy obsahují hem a v eukaryotické buňce jsou lokalizovány v membráně hladkého endoplazmatického retikula (ER), jsou tedy intracelulární (Masaphy *et al.*, 1996). CYP katalyzuje hydroxylace (substrátem jsou především hydrofobní sloučeniny), ale i řadu dalších reakcí jako epoxidace či N-, S-, a O-demethylace (Schneider a Clark, 2013).

CYP není u hub bílé hniloby příliš prozkoumán z důvodu obtížné izolace, nestability a nízké hladiny exprese danými druhy (van den Brink *et al.*, 1998). Důkazy o zapojení CYP při degradaci polutantů jsou většinou nepřímé: CYP je inhibován např. oxidem uhelnatým (Bezalel *et al.*, 1997) či piperonyl butoxidem (Mori *et al.*, 2003; Matsuzaki a Wariishi, 2004) a reakce jím katalyzované jsou NADPH dependentní (Ning *et al.*, 2010).

3.4.2 Využití ligninolytických hub v bioremediačních postupech

U ligninolytických hub byla popsána schopnost transformace PAH (Cajthaml *et al.*, 2008), ED (Cajthaml *et al.*, 2009), PCDD (Kamei *et al.*, 2009), PCB (Dietrich *et al.*, 1995), organochlorovaných pesticidů vč. DDT (Xiao *et al.*, 2011; Purnomo *et al.*, 2013; Bumpus a Aust, 1987), 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) (Kim a Song, 2000), fluorochinolonů (Čvančarová *et al.*, 2015), syntetických barviv (Senthilkumar *et al.*, 2014; Mir-Tutusaus *et*

al., 2004), bromovaných zpomalovačů hoření (Donoso *et al.*, 2008) či některých farmak (Marco-Urrea *et al.*, 2009).

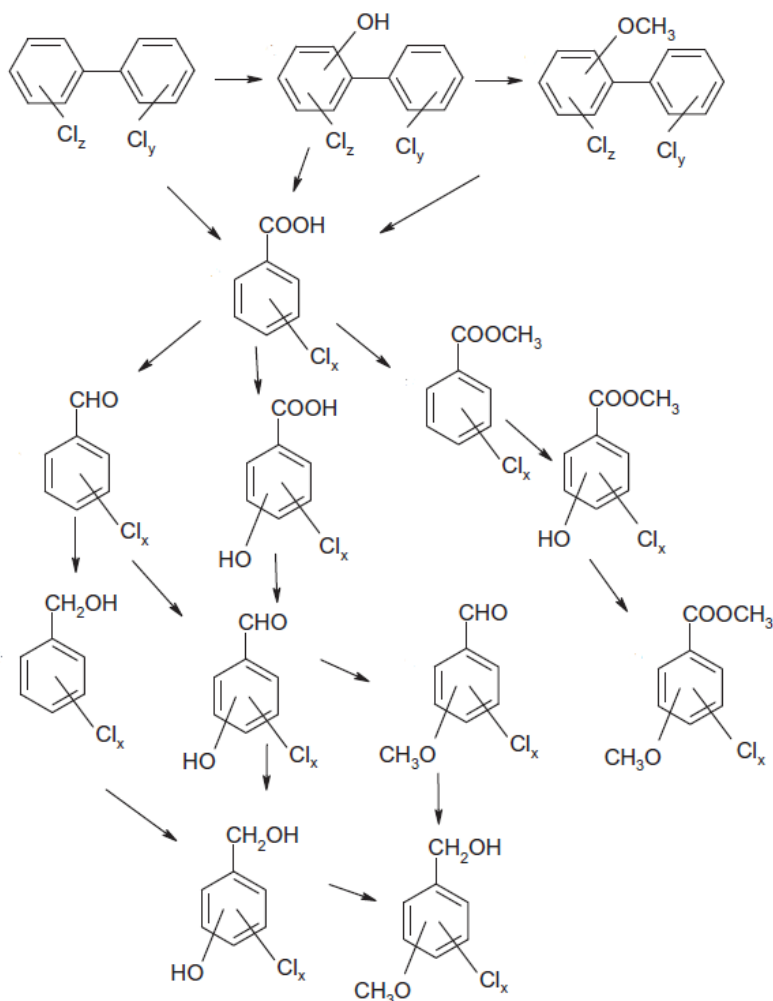
Všestrannost degradačního mechanismu ligninolytických hub umožňuje souběžnou degradaci vznikajících intermediátů. *P. ostreatus* je např. schopen degradovat heptachlor epoxid, což je rekalcitrantní metabolit vznikající při degradaci insekticidu heptachloru (Purnomo *et al.*, 2013). Při degradaci směsi PCB D103 kmenem *P. ostreatus* byla zaznamenána souběžná degradace CBA a dalších intermediátů (Čvančarová *et al.*, 2012).

Pro introdukci houby do kontaminované matrice je možné při reálných degradačních aplikacích použít vyplozený substrát z komerčních pěstíren. Typickým příkladem je v tomto ohledu hlíva ústřičná (*P. ostreatus*) pěstovaná pro potravinové účely ve velké míře po celém světě (Magan *et al.*, 2010). Eggen (1999) při degradaci hůře rozložitelných PAH (se čtyřmi a pěti aromatickými jádry) dokonce zaznamenala vyšší degradační účinnost vyplozeného substrátu ve srovnání se substrátem v růstové fázi před tvorbou plodnic.

3.4.3 Degradace PCB ligninolytickými houbami

Při degradaci PCB ligninolytickými houbami je pravděpodobně zapojen nejen systém ligninolytických enzymů, ale z nepřímých důkazů lze usuzovat, že první krok představuje oxidace PCB intracelulárním enzymatickým komplexem CYP (Čvančarová *et al.*, 2012; Stella, 2014). Zapojení CYP v iniciální fázi transformace bylo navrženo i u biodegradace CBA (Stella *et al.*, 2013), PAH (Bezalel *et al.*, 1996; Covino *et al.*, 2010), 17 α -ethinylestradiolu (Křesinová *et al.*, 2012) či některých farmak (Marco-Urrea *et al.*, 2009). Naopak degradace hydroxylovaných PCB, toxických produktů vznikajících při degradaci PCB, může probíhat i jen s izolovanou lakázou (Keum a Li, 2004; Schultz *et al.*, 2001; Kordon *et al.*, 2010). Jednotlivé ligninolytické houby se v konkrétním mechanismu a strategii degradace pravděpodobně liší (Vyas *et al.*, 1994; Kamei *et al.*, 2006).

Jako metabolity vznikající při degradaci PCB kmenem *P. ostreatus* byly detekovány CBA, hydroxylované a methoxylované PCB, chlorované benzaldehydy a chlorované alkoholy (Obr. 3). Všechny metabolity byly detekovány pouze ve stopových množstvích, což značí, že nedochází k jejich kumulaci (Čvančarová *et al.*, 2012).



Obr. 3 Schéma degradace PCB houbami bílé hniloby. Převzato z Čvančarová *et al.*, 2012.

Při degradaci PCB ligninolytickými houbami nedochází ke kumulaci CBA, jako je tomu u některých aerobních bakterií. Schopnost degradovat mono- di- a trichlorované CBA byla zjištěna u ligninolytických hub *P. ostreatus*, *Lentinus tigrinus*, *Irpex lacteus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Dichomitus squalens*, *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete magnoliae* a *Trametes versicolor*. Účinnost degradace závisí na struktuře dané CBA a konkrétním druhu. Některé druhy vč. *P. ostreatus* byly v tekutém médiu dále schopné snížit akutní toxicitu po degradaci (Muzikář *et al.*, 2011; Stella *et al.*, 2013).

Moeder *et al.* (2005) se při studiu degradace D103 kmenem *P. ostreatus* 3004 kultivovaným na slámovém substrátu zaměřili na faktory ovlivňující účinnost degradace PCB. Především jde o chemickou strukturu jednotlivých kongenerů, K_{OW} a rozpustnost ve vodě. Účinnost degradace je vyšší u kongenerů s nižším počtem atomů chloru, kongenerů

substituovaných pouze na jednom aromatickém kruhu a kongenerů substituovaných v poloze *ortho*. Naopak umístění Cl v polohách *meta* a *para* degradační účinnost snižuje. Autoři dále zjistili, že dochází k translokaci PCB dovnitř houbových plodnic, ačkoliv zanedbatelné (<1 %). Přednostně docházelo k translokaci hůře degradovatelných kongenerů.

4 CÍL PRÁCE

Cíle práce byly:

- optimalizace metodiky pro stanovení koncentrace PCB ve vodných matricích
- stanovení koncentrace PCB ve vzorcích kontaminované podzemní vody z oblasti bývalé obalovny živičných drtí
- pilotní biodegradace PCB houbovým kmenem *P. ostreatus* KRYOS, kultivovaným na slámovém substrátu, vč. sledování produkce vybraných ligninolytických enzymů a množství houbové biomasy
- navržení pracovních podmínek průtokového bioreaktoru pro optimální biodegradaci PCB ve vodných matricích kmenem *P. ostreatus* KRYOS vč. sledování produkce vybraných ligninolytických enzymů, množství houbové biomasy a charakterizace přítomných mikroorganismů

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Použitý materiál a chemikálie

2,6-dimethoxyfenol (DMP) 99%	Sigma-Aldrich, Německo
ABTS >98%	Sigma-Aldrich, Německo
Aceton pro HPLC	Chromservis, ČR
Agar	Penta, ČR
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, Německo
Cyklohexan pro organickou stopovou analýzu	Chromservis, ČR
Delor 103 (D103)	Chemko Strážske, SR
D-Glukosa monohydrát, p.a.	Lach-Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.	Lachema, ČR
Dichlormethan pro HPLC	Chromservis, ČR
Dusík 99,99%	Linde, ČR
Ergosterol $\geq 95,0\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Ethanol 96%	Fagron, ČR
Ethylester kyseliny octové pro HPLC	Chromservis, ČR
Hexachlorbenzen (HCB) 99%	Sigma-Aldrich, Německo
Hovězí sérový albumin (BSA)	Amresco, USA
Hydroxid draselný, p.a.	Penta, ČR
Hydroxid sodný, p.a.	Lach-Ner, ČR
Chloroform pro HPLC	Chromservis, ČR
Kolonky CHROMABOND C ₁₈ ec	Macherey-Nagel, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Kyselina chlorovodíková 35%, p.a.	Lach-Ner, ČR
Kyselina malonová 99%	Sigma-Aldrich, Německo
Kyselina octová 99%, p.a.	Lach-Ner, ČR
Kyselina ortho-fosforečná 84–85%, p.a.	Fluka, Německo
Kyselina sírová 96%, p.a.	Lach-Ner, ČR
Malt extrakt Broth	Oxoid, VB
Methanol pro HPLC	Chromservis, ČR
Methyl tridekanoát $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich, Německo
n-Hexan pro HPLC	Chromservis, ČR
n-Pentan pro HPLC	Chromservis, ČR
Octan sodný $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Peroxid vodíku $\geq 30\%$	Fluka, Německo
Písek mořský	Lach-Ner, ČR
Silikagel 60 pro kolonovou chromatografii	Merck, Německo
Síran manganatý, monohydrát $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Síran sodný bezvodý, p.a.	Lach-Ner, ČR
Slámové pelety	Atea Praha, ČR
SPE Disky ENVI™-18	Sigma-Aldrich, Německo
Toluen pro HPLC	Chromservis, ČR
Vyplazený slámový substrát (<i>P. ostreatus</i> KRYOS)	Volek, ČR

5.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy AE 240	Mettler, Švýcarsko
ASE 200 Accelerated Solvent Extraction System	Dionex, USA
Autokláv UNISTERI HP	BMT Medical Technology, ČR
Autosampler CombiPAL	Varian, USA
Autosampler CP 8400	Bruker, USA
Centrifuga EBA 20	Hettich, Německo
Centrifuga MIKRO 120	Hettich, Německo
Detektor Waters 2996 PDA	Waters, USA
Extrakční manifold	Waters, USA
Hmotnostní detektor 240-MS	Varian, USA
Kapalinový chromatograf Waters Alliance 2695	Waters, USA
Kolona DB-5ms	Agilent, USA
Kolona LiChroCART® 250-4 – Superspher® 100 RP – 18	Merck, Německo
Kolona LiChrolut® Si 60	Merck, Německo
Lyofilizátor	Labio, ČR
Magnetická míchačka MM6	Polamed, Polsko
Mixér 7011 Ergo	ETA, ČR
Orbitální třepačka Orbitron	INFORS HT, Švýcarsko
Peristaltická pumpa 120S	Watson Marlow, VB
pH elektroda HC 103	THETA '90, ČR
pH metr PH03	Labio, ČR
Plynový chromatograf 450-GC	Varian, USA
Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí SCION SQ	Bruker, USA
Purifikační systém Direct-Q ®	Merck Millipore, Německo
Spektrofotometr Infinite M200 PRO NanoQuant	Tecan, Švýcarsko
Ultrazvuková lázeň K-12	Kraintek, ČR
Váhy PM460	Mettler, Švýcarsko
Vakuová rotační odparka RVO 200A	Ingos, ČR
Vodní lázeň Julabo UC	Julabo, Německo
Vortex IKA MS3 digital	Works, USA
Vortex mixer ZX Classic VELP	Scientifica, Itálie

5.3 Fyzikálně-chemické metody

5.3.1 Vývin metodiky pro stanovení koncentrace PCB ve vodných matricích

5.3.1.1 Extrakce pevnou fází (Kolonky CHROMABOND C₁₈)

K extrakci byl připraven uměle kontaminovaný vzorek, který se skládal z milli-Q vody (ultra čistá voda; rezistivita 18,2 MΩ·cm při 25 °C), Deloru 103 a případně methanolu. Pokud byl ke vzorku přidáván methanol, byl nejprve smíchán s čistou milli-Q vodou a až potom následovala umělá kontaminace PCB.

Kolonky CHROMABOND C₁₈ byly postupně kondicionovány rozpouštědly (dichlormethan (DCM), aceton, methanol, milli-Q voda). Po kondicionaci byl extrahován vzorek (podtlak cca 20 hPa, rychlost průtoku 4–8 ml·min⁻¹) a následovalo sušení (podtlak do 200 hPa, 20–30 min). Sorbent byl eluován postupně různými rozpouštědly (DCM, ethylester kyseliny octové (EtOAc), aceton, methanol) a/nebo jejich kombinacemi. Složení vzorků a podmínky extrakcí jsou uvedeny v Tab. 2.

Po eluci byly vzorky zbaveny vody bezvodým síranem sodným. Pokud byla provedena extrakce DCM, byl vzorek převeden do EtOAc. Objem výsledného extraktu byl zjištěn buď zvážením vialek před a po přidání extraktu s následným přepočtem nebo přidáním známého množství vnitřního standardu hexachlorbenzenu (HCB). Vzorky byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS, kap. 5.3.3).

5.3.1.2 Extrakce pevnou fází C18 (Disky ENVI™-18)

K extrakci byl připraven uměle kontaminovaný vzorek, který se skládal z milli-Q vody, Deloru 103 a případně methanolu. Pokud byl ke vzorku přidáván methanol, byl nejprve smíchán s čistou milli-Q vodou a až potom následovala umělá kontaminace PCB.

SPE disk ENVI™-18 byl postupně kondicionován rozpouštědly (pentan, dichlormethan (DCM), methanol, milli-Q voda). Po kondicionaci byl extrahován vzorek (podtlak cca 150 hPa, rychlost průtoku cca 30 ml·min⁻¹) a následovalo sušení (podtlak cca 400 hPa, 30 min). Sorbent byl postupně eluován různými rozpouštědly (pentan, DCM, EtOAc, hexan). Složení vzorků a podmínky extrakcí jsou uvedeny v Tab. 3.

Po eluci byly vzorky zbaveny vody bezvodým síranem sodným. Pokud byla provedena extrakce DCM, byl vzorek převeden do EtOAc. Pokud byla provedena extrakce pentanem, byl vzorek převeden do hexanu. Objem výsledného extraktu byl zjištěn buď zvážením vialek před a po přidání extraktu s následným přepočtem nebo přidáním známého množství vnitřního standardu hexachlorbenzenu (HCB). Vzorky byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS, kap. 5.3.3).

Tab. 2 Složení vzorků a podmínky extrakce kolonkami CHROMABOND C18. DCM = dichlormethan, EtOAc = ethylester kyseliny octové.

Experiment	K1	K2	K3		K4				
Vzorek	–	–	A	B	A	B	C	D	E
Složení vzorku									
milli-Q voda [l]	500	500	500	500	500	500	500	500	500
methanol [ml]	–	–	5	10	0	0	10	30	60
D103 [μg]	500	50	1	1	0,5	1	1	1	1
Kondicionace									
DCM [ml]	6	6	5	5	5	5	5	5	5
aceton [ml]	6	6	–	–	–	–	–	–	–
methanol [ml]	6	6	5	5	5	5	5	5	5
milli-Q voda [ml]	6	6	5	5	5	5	5	5	5
Eluce									
methanol [ml] + aceton [ml] + DCM [ml]	2,5 + 2,5 + 2,5	–	–	–	–	–	–	–	–
aceton [ml] + DCM [ml]	–	3,5 + 3,5	–	–	–	–	–	–	–
methanol [ml]	–	–	–	–	–	–	–	–	–
aceton [ml]	–	–	–	–	–	–	–	–	–
DCM [ml]	–	10	10	10	10	10	10	10	10
DCM [ml]	–	10	–	–	–	–	–	–	–
EtOAc [ml]	–	–	10	10	10	10	10	10	10
Sušení po extrakci [min]	20	20	30	30	30	0	30	30	30

Tab. 3. Složení vzorků a podmínky extrakce Disky ENVI™-18. DCM = dichlormethan, EtOAc = ethylester kyseliny octové.

Experiment	DISK 1	DISK 2	DISK 3
Složení vzorku			
milli-Q voda [l]	0,75	1	1
methanol [ml]	–	60	80
D103 [µg]	20,1	2	2
Kondicionace			
pentan [ml]	20	–	–
DCM [ml]	–	20	20
methanol [ml]	20	20	20
milli-Q voda [ml]	20	20	20
Eluce			
pentan [ml]	30	–	–
pentan [ml]	30	–	–
EtOAc [ml]	20	–	–
DCM [ml]	20	30	30
hexan [ml]	–	30	–

5.3.2 Extrakce pevných matric vysokotlakou extrakcí rozpouštědlem (ASE)

Před vlastní extrakcí byly vzorky lyofilizovány a homogenizovány (Mixér 7011 Ergo, ETA). Extrakční metoda byla provedena dle Čvančarová (2009). Do patrony o objemu 30 ml byl vložen papírový filtr a 2 g mořského písku. Dále byl do patrony navážen vzorek (3–4 g), mrtvý objem patrony byl doplněn mořským pískem a navrch byl vložen papírový filtr. Podmínky vysokotlaké extrakce rozpouštědlem (ASE) byly: teplota 100 °C, tlak 13,8 MPa, počet cyklů: 3, statická fáze 5 min. Použitým rozpouštědlem byl hexan:aceton (1:1, v/v). Získané extrakty byly odpařeny do sucha (podtlak 700 hPa, teplota 40 °C) a rozpuštěny v přesně 10 ml hexanu.

Byla připravena směs 140 g silikagelu a 100 ml H₂SO₄, která byla odpařována přes noc na vakuové rotační odparce (tlak 175 hPa, teplota lázně 20 °C, 15 rpm). Takto připravená směs (cca 15 g) byla přidána ke vzorkům pro odstranění organických nečistot a vzorky byly vortexovány. Následně byly vloženy do ultrazvukové lázně (15 min, 50 °C) a poté ponechány několik hodin ustálit. Čirý supernatant byl odebrán skleněnou Pasteurovou pipetou do 8 ml skleněné vialy a centrifugován (6000 rpm, 15 min). Ze vzorku bylo

odebráno 900 μl do krimpovací vialy a přidáno 100 μl vnitřního standardu HCB o koncentraci 10 ppm. Následovala analýza GC/MS (kap. 5.3.3).

5.3.3 Detekce PCB plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS)

Analýza vzorků z kapitoly 6.1 (experimenty K1, K2, DISK 1 a K3) byla provedena na plynovém chromatografu Varian 450-GC s hmotnostním detektorem Varian 240-MS. Analyty byly separovány na koloně DB-5MS (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka stacionární fáze 0,25 μm). Nosným plynem bylo He s průtokovou rychlostí 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Nástřik byl 1 μl (autosampler CombiPAL), teplota injektoru byla 240 $^{\circ}\text{C}$. Teplotní program začal isotermálně při zavřeném děliči (60 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 min). Poté byl dělič otevřen (split ratio 1:50) a teplota stoupala lineárně do 120 $^{\circ}\text{C}$ (25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), poté do 240 $^{\circ}\text{C}$ (2,5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) a tato teplota byla udržována konstantní 28 min. Celkový čas metody byl 80 min. Byla použita elektronová ionizace (EI), měřen byl celkový iontový proud v rozsahu 140–410 m/z. Jednotlivé kongenery PCB byly identifikovány porovnáním hmotnostních spekter a retenčních časů se standardem D103 nebo standardy jednotlivých kongenerů.

Analýza vzorků z kapitol 6.1 (experimenty K4, DISK 2 a DISK 3), 6.2, 6.3.1 a 6.4.1 byla provedena na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem SCION SQ. Analyty byly separovány na koloně DB-5MS (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm). Nosným plynem bylo He s průtokovou rychlostí 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Nástřik byl 1 μl (autosampler CP-8400) a teplota injektoru 240 $^{\circ}\text{C}$. Teplotní program začal isotermálně při zavřeném děliči (60 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 min). Poté byl dělič otevřen (split ratio 1:50) a teplota stoupala lineárně do 120 $^{\circ}\text{C}$ (25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) a poté do 240 $^{\circ}\text{C}$ (2,5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Celkový čas metody byl 70 min. Byla použita elektronová ionizace (EI), měřen byl celkový iontový proud v rozsahu 140–410 m/z. Jednotlivé kongenery PCB byly identifikovány porovnáním hmotnostních spekter a retenčních časů se standardem D103 nebo standardy jednotlivých kongenerů.

5.3.4 Kvantifikace houbové biomasy prostřednictvím stanovení ergosterolu

Metoda extrakce byla upravena dle Bligh a Dyer (1959). Frakcionace lipidů, mírná alkalická methanolýza a analýza GC/MS byla upravena dle Šnajdr *et al.* (2008).

5.3.4.1 Příprava vzorků

Vzorky (po 0,2 g) byly naváženy do 8 ml vial a byl k nim přidán 1 ml cyklohexanu a 3 ml 10% KOH v methanolu (m/m). Vzorky byly 90 min inkubovány v ultrazvukové lázni při 70 °C. Poté byl ke vzorkům přidán 1 ml destilované vody a 2 ml cyklohexanu. Vzorky byly protřepány pomocí třepačky vortex (30 sec, 3500 rpm) a organická horní fáze byla odebrána skleněnou pipetou do připravené nové 8 ml vialy. Vzorky byly dodatečně vyextrahovány ve dvou dalších krocích vždy pomocí 2 ml cyklohexanu. Extrakty byly odpařeny proudem dusíku, rozpuštěny v 1 ml methanolu a převedeny do 2 ml centrifugačních zkumavek. Po následné centrifugaci (3 min, 6000 rpm) bylo odebráno 800 µl supernatantu do 2 ml vialek a následovala analýza kapalinovou chromatografií s UV detekcí (HPLC-UV).

5.3.4.2 Stanovení ergosterolu pomocí kapalinové chromatografie

Eluce ergosterolu probíhala na koloně LiChroCART® 250-4 – Superspher® 100 RP-18 (4 µm) v isokratickém režimu, kdy jako mobilní fáze byl použit 100% methanol (průtok 1 ml·min⁻¹). Dávkovací objem vzorků byl 10 µl a ergosterol byl detekován UV detektorem při 282 nm. Koncentrace ergosterolu byly stanovovány na základě plochy píku pomocí externích kalibračních křivek standardu ergosterolu, které byly sestrojeny z osmi bodů v koncentračním rozsahu 1–200 µg·ml⁻¹.

5.3.5 Stanovení fosfolipidových mastných kyselin

5.3.5.1 Extrakce lipidů

Bylo naváženo 0,5 g lyofilizovaného vzorku do vypálené zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru (50 mM KH₂PO₄, pH=7,4), 1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu, vzorek byl 15 s vortexován a ponechán ve tmě extrahovat při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace (3500 rpm, 5min). Supernatant byl odebrán Pasteurovou pipetou do nové vypálené zkumavky a uchován ve tmě. K sedimentu bylo přidáno 1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu, byl 15 s vortexován a extrahován ve tmě při laboratorní teplotě 1 h. Poté následovala centrifugace (3500 rpm, 5 min).

Supernatant byl odebrán Pasteurovou pipetou a spojen s předchozím. Extrakce směsí methanolu a chloroformu byla za stejných podmínek provedena ještě jednou.

K získanému celkovému supernatantu bylo přidáno 1,9 ml fosfátového pufru a 1,9 ml chloroformu, směs byla vortexována a ponechána přes noc při 4°C. Následovala centrifugace (3500 rpm, 5 min). Spodní chloroformová část obsahující fosfolipidy byla Pasteurovou pipetou přenesena část do nové vypálené vialky. Vodná fáze byla dále reextrahována 1,9 ml chloroformu a odebraná spodní chloroformová fáze byla spojena s předchozí.

5.3.5.2 Frakcionace lipidů

Vzorek v chloroformu byl odpařen do sucha proudem dusíku, rozpuštěn v 300 µl chloroformu a vortexován. Na kolonu Lichrolut Si 60 promytou 1,5 ml chloroformu byl aplikován vzorek. Neutrální lipidová frakce byla odstraněna promytím 2 ml chloroformu. Glykolipidová frakce byla odstraněna promytím 6 ml acetonu. Fosfolipidová frakce byla získána promytím 2 ml methanolu.

5.3.5.3 Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace)

V tomto kroku byly mastné kyseliny vázané ve fosfolipidech uvolněny a převedeny na methylestery. Nejprve byl vzorek rozpuštěn ve směsi 0,5 ml toluenu a 0,5 ml methanolu a vortexován 1 min. Ke vzorku byl přidán 1 ml 0,2 M KOH v bezvodém methanolu a směs byla inkubována 15 min při 37 °C ve vodní lázni. Poté bylo přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml kyseliny octové (1 M) a 2 ml destilované vody a směs byla vortexována 1 min a následně centrifugována (2500 rpm, 5 min). Horní fáze byla odebrána Pasteurovou pipetou do vypálené vialky. Vzorek byl promyt 1,6 ml hexanu a 0,4 ml chloroformu, vortexován 1 min a následně centrifugován (2500 rpm, 5 min). Horní fáze byla odebrána Pasteurovou pipetou a spojena s předchozí. Extrakce směsí hexanu a chloroformu byla provedena ještě jednou za stejných podmínek. Získaný vzorek byl odpařen dusíkem a převeden do 950 µl hexanu. Ke vzorku byl přidán interní standard (50 µl C13:0 methyl tridekanoát o koncentraci 200 ppm).

5.3.5.4 GC/MS analýza

Vzorky byly analyzovány na plynovém chromatografu Varian 450-GC s hmotnostním detektorem Varian 240-MS. Analyty byly separovány na koloně DB-5MS (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka stacionární fáze 0,25 μm). Pomocí autosampleru Combi Pal byl dávkován 1 μl vzorku, teplota injektoru byla 240 $^{\circ}\text{C}$. Nosným plynem bylo He s průtokem 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplotní program začal isotermálně při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$ a trval 1 min při zavřeném děliči. Potom byl dělič otevřen (split ratio 1:50), teplota stoupala lineárně do 120 $^{\circ}\text{C}$ (25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), poté do 240 $^{\circ}\text{C}$ (2,5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) a tato teplota byla udržována 10 min. K detekci byla používána EI (70 eV). Byl měřen celkový iontový proud v rozsahu 50–400 m/z. Methylované mastné kyseliny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů s příslušnými standardy. Kalibrační křivky byly sestrojeny z pěti bodů v koncentračním rozsahu 0,1–10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

5.3.5.5 Vyhodnocení

Přítomné skupiny mikroorganismů byly charakterizovány jako součet koncentrací mastných kyselin charakteristických pro jednotlivé skupiny (Šnajdr *et al.*, 2008; Němeček *et al.*, 2014):

- Gramnegativní bakterie (G–): 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, cy17:0, cy19:0, 18:1 ω 7
- Grampozitivní bakterie (G+): i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0
- Aktinobakterie: 10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0
- Bakterie celkem: i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0
- Celková mikrobiální biomasa: i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 16:0, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0, 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9

5.4 Biologické metody

5.4.1 Příprava pevného substrátu a sterilizace

Jako pevný substrát pro kultivaci byly použity slámové pelety. Do 250 ml Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 10,0 g pelet a přidáno 33 ml destilované vody. Sterilizace baněk byla provedena v autoklávu vlhkou parou pod tlakem (121 °C po dobu 20 min). Baňky byly ponechány 24 h při laboratorní teplotě a poté byla provedena druhá sterilizace.

5.4.2 Kultivace mikroorganismů

Pro degradační experimenty byl použit *P. ostreatus* KRYOS izolovaný z vyplozeného houbového substrátu získaného od firmy Volek (Louny, ČR). Kultura byla uchovávána na malt-extrakt glukózových (MEG) agarových miskách při 4 °C. Složení MEG agarového média je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4. Složení MEG agarového média.

glukóza	10 g
Malt extrakt Broth	5 g
agar	20 g
destilovaná voda	1000 ml

Při kultivaci *P. ostreatus* na slámových peletách byly z kultur na MEG agarových miskách vyříznuty disky (průměr 8 mm, v laminárním boxu, za sterilních podmínek). Do každé 250 ml Erlenmayerovy baňky se sterilním substrátem (kap. 5.4.1) byly vloženy 4 disky. Kultivace probíhala 10–14 dní ve tmě při 28 °C.

5.4.3 Stanovení enzymatických aktivit

Enzymatické aktivity (EA) byly stanoveny spektrofotometricky (spektrofotometr Infinite M200 PRO, Tecan) v mikrotitračních destičkách. Stanovena byla aktivita lakázy,

MnP a VP nezávislé na přítomnosti Mn^{2+} a celková koncentrace proteinů. Enzymová jednotka 1 U byla definována jako takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 μ mol substrátu za 1 minutu. Pro výpočet EA byl použit vzorec (1):

$$EA = \frac{\Delta A_{60} V_{rs}}{\epsilon V_{vz}} \quad [U \cdot ml^{-1}] \quad (1)$$

kde:

EA je aktivita enzymu [$U \cdot ml^{-1}$]

ΔA_{60} je změna absorbance reakční směsi za 1 min

V_{rs} je objem reakční směsi [μ l]

ϵ je molární extinkční koeficient enzymového substrátu při dané vlnové délce
[$mM^{-1} \cdot cm^{-1}$]

V_{vz} je objem vzorku [μ l]

5.4.3.1 Stanovení aktivity lakázy

Pro přípravu reakční směsi byl připraven 120 mM octanový pufr rozpuštěním 2,461 g octanu sodného v 250 ml destilované vody; pH bylo přidáním kyseliny octové (99%) upraveno na 5,0. Stanovení EA lakázy bylo provedeno dle Matsumura *et al.* (1986). Reakce byla zahájena přidáním ABTS, které je oxidováno v přítomnosti lakázy. Při detekované vlnové délce 420 nm je molární extinkční koeficient ABTS $36000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 5.

Tab. 5. Složení reakční směsi pro stanovení enzymatické aktivity lakázy.

	objem [μ l]
120 mM octanový pufr (pH=5,0)	160
vzorek	20
50 mM ABTS	20

5.4.3.2 Stanovení aktivity MnP a VP

Pro přípravu reakční směsi byl připraven 65,8 mM malonátový pufr rozpuštěním 1,349 g malonové kyseliny v 250 ml destilované vody; pH bylo přidáním hydroxidu sodného (10 M) upraveno na 4,5. Stanovení EA MnP a VP bylo provedeno dle de Jong *et al.* (1994). Reakce byla zahájena přidáním 2,6-dimethoxyfenolu (DMP), který je danými enzymy oxidován. Při detekované vlnové délce 469 nm je molární extinkční koeficient DMP $49600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Složení reakčních směsí I–III je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6. Složení reakčních směsí pro stanovení enzymatické aktivity MnP a VP.

	objem [μl]		
	I	II	III
65,8 mM malonátový pufr (pH=4,5)	170	150	150
vzorek	20	20	20
20 mM MnSO_4	–	10	–
10 mM H_2O_2	–	10	10
20 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	–	–	10
20 mM DMP	10	10	10

Aktivita MnP byla vypočtena dle vzorce (2) a aktivita VP dle vzorce (3):

$$\text{EA(MnP)} = \text{EA(II)} - \text{EA(III)} \quad (2)$$

$$\text{EA(VP)} = \text{EA(III)} - \text{EA(I)} \quad (3)$$

5.4.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno dle Bradford (1976) na základě změny absorbance vzorku po inkubaci (5 min při laboratorní teplotě) při 595 nm. Reakční směs sestávala z 20 μl vzorku a 180 μl činidla dle Bradfordové, jehož složení je uvedeno v Tab. 7. Jako slepý vzorek byla použita směs 20 μl vzorku a 180 μl činidla dle Bradfordové. Pro kvantifikaci byla sestrojena kalibrační křivka se standardem hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentračním rozsahu 1–10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Tab. 7. Složení činidla dle Bradfordové.

barvivo Coomassie Brilliant Blue G250	10 mg
ethanol	5 ml
kyselina fosforečná	10 ml
destilovaná voda	85 ml

5.4.4 Degradace PCB kmenem *P. ostreatus* KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu

Bylo připraveno a dvakrát sterilizováno 44 baňek s pevným substrátem (kap. 5.4.1). Baňky byly inokulovány *P. ostreatus* KRYOS (kap. 5.4.2) a 10 dní kultivovány v temnu při 28 °C. Byl připraven roztok pro umělou kontaminaci baňek přidáním 12,5 ml D103 do 1 l milli-Q vody (výsledná koncentrace 1,25 ppm D103). Mycelium a substrát v 9 baňkách pro stanovení degradace, 6 baňkách pro stanovení obsahu ergosterolu a 4 baňkách pro stanovení enzymatické aktivity byl rozrušen sterilní kovovou tyčinkou (povrchová sterilizace ethanolem a plamenem) a následně uměle kontaminován po 40 ml připraveného roztoku D103 (celkový obsah 50 µg D103 v baňce). Devět baňek, které sloužily jako tzv. „heat-killed“ kontrola (HKC), bylo sterilizováno v autoklávu a následně uměle kontaminováno 40 ml připraveného roztoku D103. Ke třem baňkám, které sloužily jako biotická kontrola bez PCB, 6 baňkám pro stanovení ergosterolu a 4 baňkám pro stanovení enzymatických aktivit bylo po sterilním rozrušení mycelia přidáno 40 ml čisté milli-Q vody. Všechny baňky byly v průběhu experimentu ponechány v temnu při 28 °C.

Enzymatická aktivita lakázy, MnP a MIP a celkové množství proteinů (kap 5.4.3) kultur s i bez přidaných PCB byla stanovována každé 2–3 dny ze sterilně odebrané malé části extracelulární tekutiny.

Odběry pro stanovení degradace PCB (vždy 3 baňky pro degradaci, 3 baňky HKC a 1 baňka jako biotická kontrola) byly provedeny po 7, 14 a 28 dnech. Substrát s myceliem byl lisem oddělen od extracelulární tekutiny a dále extrahován metodou ASE (kap. 5.3.2). Získaná extracelulární tekutina byla extrahována prostřednictvím SPE (kap. 5.3.1.1, experiment K4, D). Prázdné baňky byly vypláchnuty 15 ml EtOAc (orbitální třepačka, 24 h při 200 rpm) pro zjištění sorpce PCB na sklo. Vzorčky byly měřeny GC/MS (kap. 5.3.3).

Odběry pro stanovení ergosterolu (vždy 2 baňky s přidanými PCB a 2 baňky bez PCB) byly provedeny po 7, 14 a 28 dnech. Substrát s myceliem byl lisem oddělen od extracelulární tekutiny, lyofilizován a dále extrahován ASE metodou (kap. 5.3.2) a analyzován GC/MS (kap. 5.3.3).

5.4.5 Degradace PCB v průtokovém bioreaktoru

Průtokový reaktor (celkový objem 0,8 l) byl naplněn substrátem uvedeným v Tab. 8. a ponechán 24 h v temnu při 28 °C. Poté byl přemístěn do laboratoře a ponechán zde po celý průběh experimentu. Kohoutková voda byla dechlorována (stání 1 den v otevřené nádobě při laboratorní teplotě) a k 9 litrům dechlorované vody bylo přidáno 630 µl D103 o koncentraci 50 ppm (výsledná koncentrace 3,5 µg·l⁻¹). Takto získaná uměle kontaminovaná voda byla 7 dní rychlostí 0,9 ml·min⁻¹ čerpána přes reaktor. Druhý a sedmý den experimentu byl odebrán 1 l efluentu pro SPE extrakci (kap. 5.3.1.1, experiment K4, D) a následnou GC/MS analýzu (kap. 5.3.3). Každý den byla v efluentu stanovena enzymatická aktivita lakázy (kap. 5.4.3.1). Po skončení experimentu byl celý obsah reaktoru lyofilizován, zvážen, homogenizován a následně vzorkován pro extrakci PCB metodou ASE a stanovení GC/MS (kap. 5.3.2 a 5.3.3), stanovení ergosterolu (kap. 5.3.4, 3 paralely) a stanovení mastných kyselin (kap. 5.3.5, 3 paralely).

Tab. 8. Substrát použitý v průtokových reaktorech R1–R3.

R1	<i>P. ostreatus</i> KRYOS izolovaný z vyplozeného substrátu, kultivovaný 10 dní na slámových peletách (kap 5.4.1 a 5.4.2)
R2	Vyplozený slámový substrát s <i>P. ostreatus</i> KRYOS + sterilizované slámové pelety (kap 5.4.1) (1:1, v:v)
R3	Vyplozený slámový substrát s <i>P. ostreatus</i> KRYOS + sterilizované slámové pelety (kap 5.4.1) (1:1, v:v)

5.5 Statistické zpracování dat

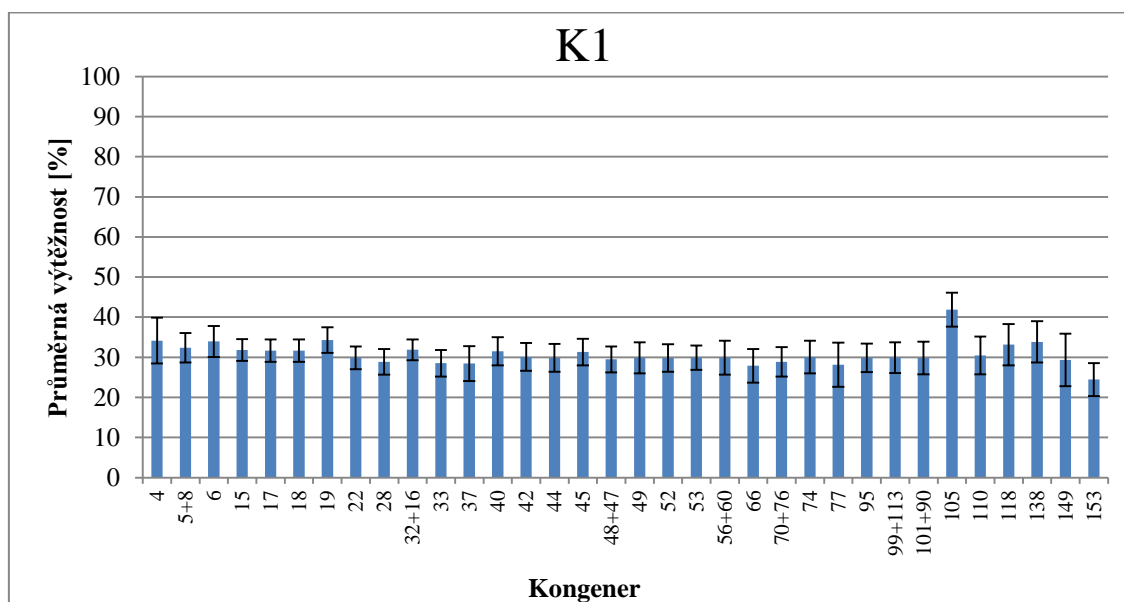
Pro statistické zpracování dat (kap. 6.3.3 a 6.4.3) byl použit statistický program R (verze i386 3.2.1).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Vývin metodiky pro stanovení koncentrace PCB ve vodných vzorcích

Pro stanovení PCB z vodné matrice s následnou analýzou plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS) je nutné analyty z vody zakonzentrovat a převést do vhodného organického rozpouštědla. Jako extrakční metoda byla zvolena extrakce pevnou fází (SPE). SPE je hojně využívanou metodou při extrakci různých organických polutantů z vodných matric. Ve srovnání např. s extrakcí kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction, LLE) je u SPE menší spotřeba rozpouštědel a zpracování vzorku je rychlejší a manuálně méně náročné (Wolska *et al.*, 1999; Fortuny *et al.*, 2003; Senseman *et al.*, 2003; Erger *et al.*, 2012).

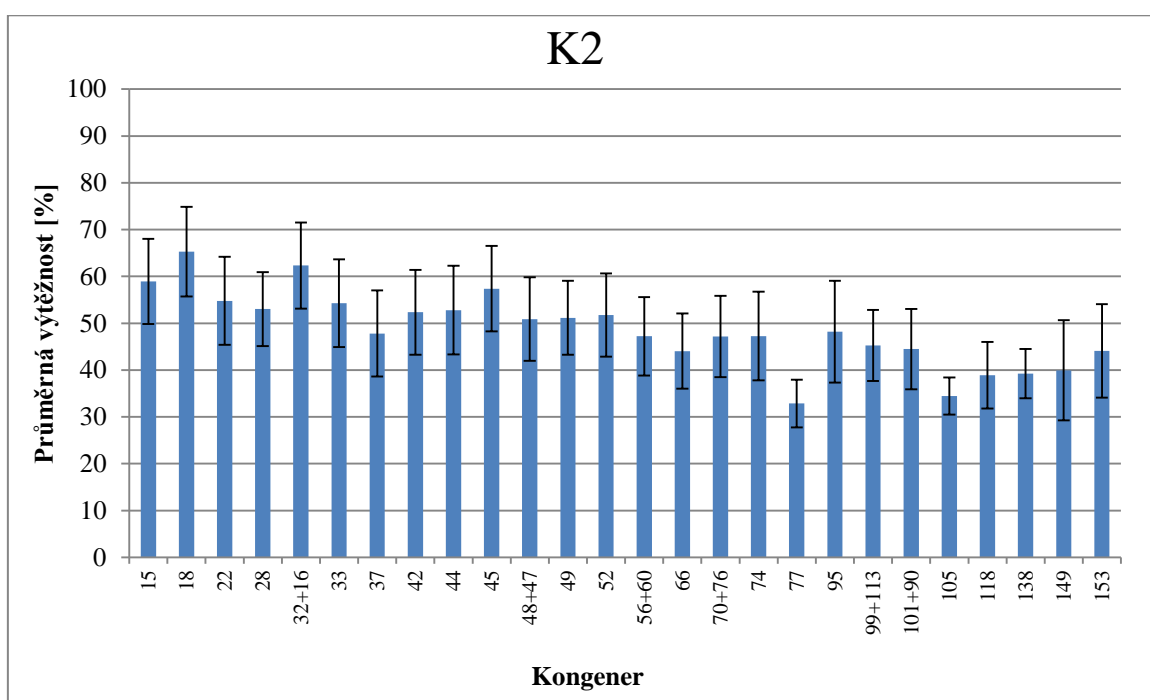
Metodika dle Zhang *et al.* (2007) byla upravena pro extrakci SPE kolonkami CHROMABOND C₁₈ obsahujícími silikagel s navázanými oktadecylovými skupinami. Výťažnost extrakce (kap. 5.3.1.1, experiment K1) uměle kontaminované vody (koncentrace 1000 µg·l⁻¹) se pohybovala kolem 30 % pro jednotlivé PCB kongenery (Obr. 4).



Obr. 4 Výťažnost extrakce jednotlivých PCB kongenerů z uměle kontaminované vody (koncentrace 1000 µg·l⁻¹ D103) kolonkami CHROMABOND C₁₈, experiment K1. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (2 paralely).

Pro ověření sorpční kapacity sorbentu byl proveden další pokus s kolonkami CHROMABOND C₁₈ (kap. 5.3.1.1, experiment K2), kde byla desetkrát snížena koncentrace PCB v uměle kontaminované vodě (výsledná koncentrace 100 µg·l⁻¹). Došlo k určitému zvýšení výtěžnosti extrakce, ale pouze na cca 50 % (Obr. 5). Dále byla testována eluční schopnost rozpouštědel přidáním dvou extrakčních kroků, v těchto extraktech ale nebyly detekovány PCB.

Získané výsledky se příliš neshodovaly s literaturou, Zhang *et al.* (2004) zaznamenali výtěžnost 60–120 % pro jednotlivé PCB kongenery, Wolska *et al.* (1999) dosáhli s kolonkami C₁₈ výtěžnosti 48–70 % a Wolska *et al.* (2005) výtěžnosti 40–80 %.

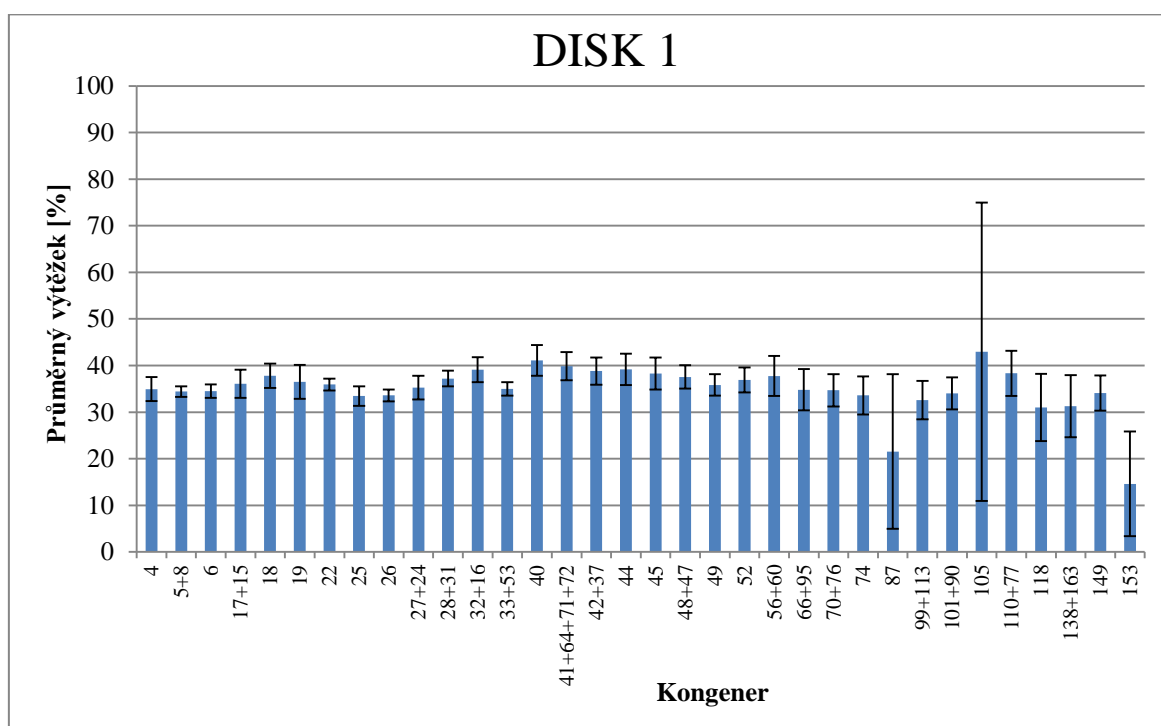


Obr. 5 Výtěžnost extrakce jednotlivých PCB kongenerů z uměle kontaminované vody (koncentrace 100 µg·l⁻¹ D103) kolonkami CHROMABOND C₁₈, experiment K2. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

Dalším typem SPE, který byl testován pro extrakci PCB, byly SPE disky ENVI™-18. Tyto disky obsahují stejný sorbent jako kolonky CHROMABOND C₁₈, mají ale oproti nim několik výhod. SPE disky mají vyšší sorpční kapacitu, méně často dochází k ucpání sorbentu či tvorbě preferenčních kanálků, kterými přednostně proniká rozpouštědlo, může být použit vyšší průtok a aplikován větší objem vzorku (Quintana *et al.*, 2003; Mikošková *et al.*, 2004; Eger *et al.*, 2012). Pro extrakci byla upravena metodika použitá autory Westbom *et al.* (2004).

Znovu byla snížena koncentrace PCB (asi čtyřikrát, na 26,8 µg·l⁻¹). Průměrná výtěžnost extrakce uměle kontaminované vody (kap. 5.3.1.2, experiment DISK 1) byla přesto opět velmi nízká, pohybovala se kolem 30–40 % pro jednotlivé kongenery (Obr. 6).

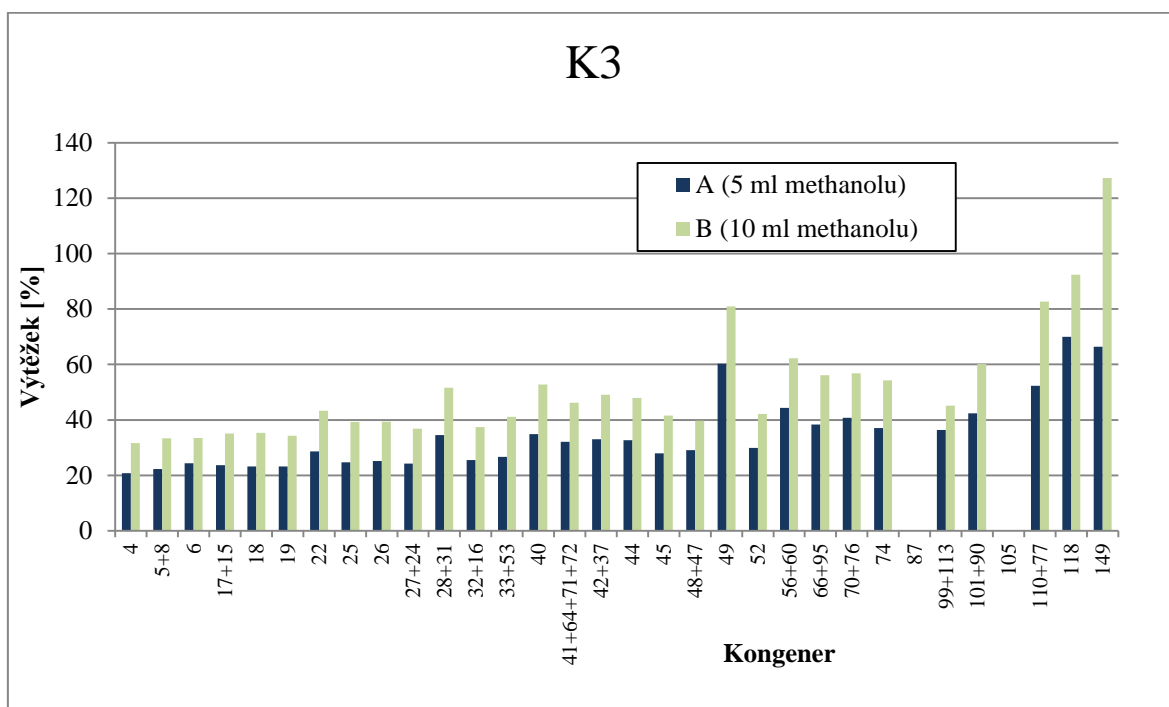
Westbom *et al.* (2004) zaznamenali s disky ENVI™-18 výtěžnost 68–80 % při iniciální koncentraci 1 µg·l⁻¹ a 77–85 % při iniciální koncentraci 0,02 µg·l⁻¹. Erger *et al.* (2012) dosáhli výtěžnosti 76–89 % s disky se sorbentem C₁₈. Dále zjistili, že výtěžnost se neliší mezi jednotlivými C₁₈ disky od různých výrobců a také, že není ovlivněna pH vzorku.



Obr. 6 Průměrná výtěžnost extrakce jednotlivých PCB kongenerů z uměle kontaminované vody (koncentrace 26,8 µg·l⁻¹ D103) disky ENVI™-18, experiment DISK 1. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

V některých pracích se můžeme setkat s přidáním methanolu ke vzorku vody pro zlepšení výtěžnosti extrakce (Geissler a Schöler, 1991; Quintana *et al.*, 2003; Wolska *et al.*, 2005). Možným důvodem by mohlo být zvýšení rozpustnosti PCB ve vodě obsahující methanol (Li a Andren, 1994). Proto byl sestaven pokus extrakce uměle kontaminované vody s přidáním methanolu kolonkami CHROMABOND C₁₈ (kap. 5.3.1.1, experiment K3). K 0,5 l milli-Q vody bylo přidáno 5 ml (paralela A) nebo 10 ml (paralela B) methanolu. Koncentrace PCB byla dále opět snížena na asi 2 µg·l⁻¹.

Výsledky tohoto experimentu naznačovaly, že výtěžnost extrakce je pozitivně ovlivněna přidáním methanolu do milli-Q vody před její umělou kontaminací a že se tato výtěžnost pravděpodobně zvyšuje se zvyšujícím se množstvím přidaného methanolu (Obr. 7).

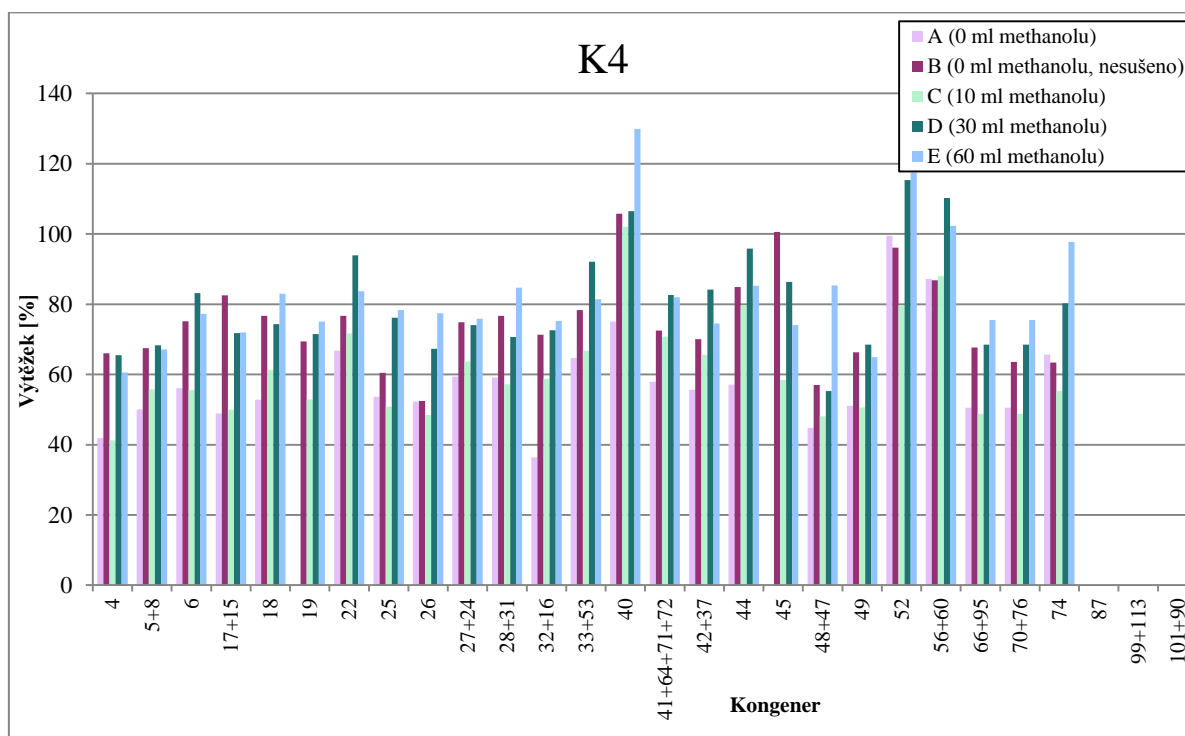


Obr. 7 Výtěžnost extrakce jednotlivých PCB kongenerů z uměle kontaminované vody (koncentrace cca 2 µg·l⁻¹ D103) kolonkami CHROMABOND C₁₈ s přidavkem methanolu ke vzorku, experiment K3.

V následujícím pokusu byl optimalizován přídavek methanolu ke vzorku (kap. 5.3.1.1, experiment K4). Pro extrakci byly opět vybrány kolonky CHROMABOND C₁₈. Byl testován přídavek 0–60 ml methanolu k 0,5 l milli-Q vody před umělou kontaminací PCB (Obr. 8).

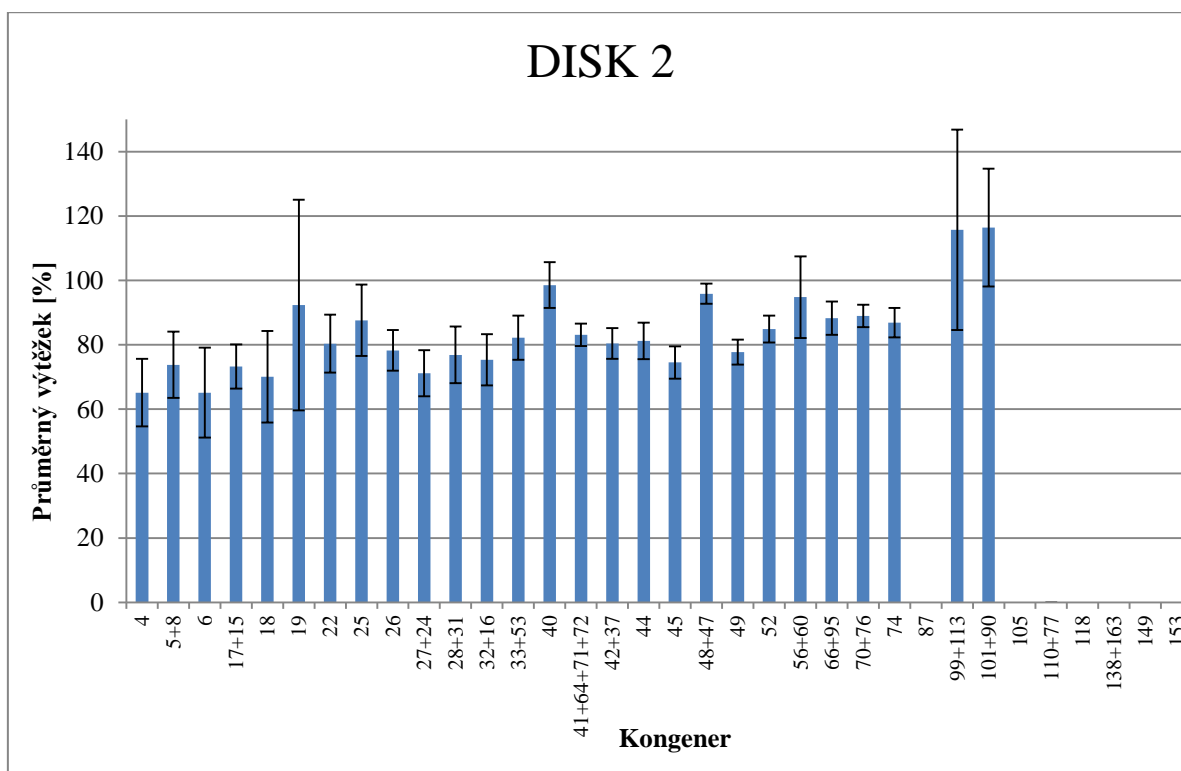
Pro většinu kongenerů výtěžnost stoupala se zvyšující se koncentrací methanolu. Tento trend je patrný především pro přídavek 0–30 ml methanolu k 0,5 l vody. Další přídavek (60 ml) se zvýšenou výtěžností extrakce projevil pouze u některých kongenerů (např. 18, 26, 28+31). Naopak u kongenerů 22, 33+53 či 44 výtěžnost oproti přidání 30 ml methanolu poklesla. S výjimkou kongenerů 48+47 a 74 nezpůsobilo přidání dvojnásobného množství methanolu (z 30 na 60 ml) odpovídající vzrůst extrakční výtěžnosti. Různé výtěžnosti pro různé kongenery jsou pravděpodobně způsobeny jejich odlišnými chemickými vlastnostmi (rozpuštěností ve vodě či polohou Cl atomů). Vzhledem k tomu, že pro jednotlivé vzorky nebyly provedeny paralely, ale nelze s jistotou určit obecný trend.

U vzorku B si lze dále všimnout pozitivního efektu nesusení sorbentu po extrakci.



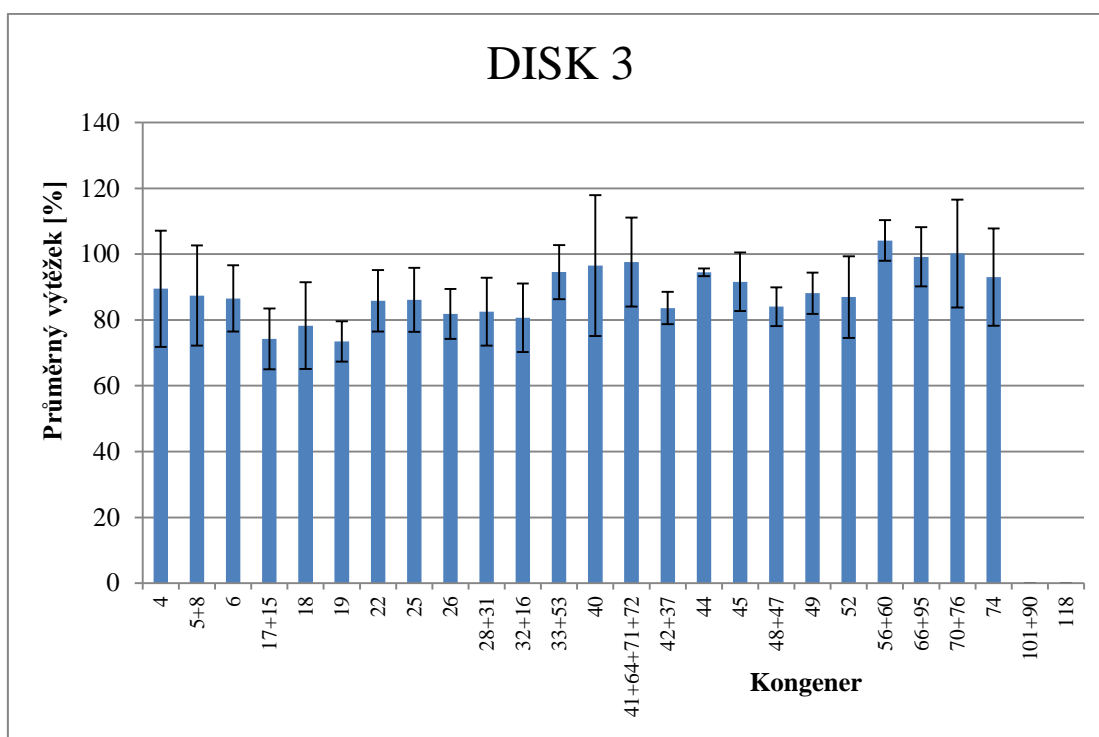
Obr. 8 Výtěžnost jednotlivých PCB kongenerů při optimalizaci SPE extrakce z uměle kontaminované vody (koncentrace 1–1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ D103 podle vzorku) kolonkami CHROMABOND C₁₈ s přídavkem methanolu ke vzorku, experiment K4.

Postup s přidáním methanolu byl dále aplikován i na SPE disky (kap. 5.3.1.2, experiment DISK 2). Iniciální koncentrace byla asi $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. S disky bylo dosaženo vyšší výtěžnosti než v odpovídajícím pokusu s kolonkami (experiment K3, paralela D). Výtěžnost se pro jednotlivé PCB kongenery pohybovala kolem 80 %.



Obr. 9 Průměrná výtěžnost jednotlivých PCB kongenerů při extrakci z uměle kontaminované vody (koncentrace asi $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ D103) SPE disky ENVI™-18 s přidáním 60 ml methanolu k 1 l vzorku, experiment DISK 2. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

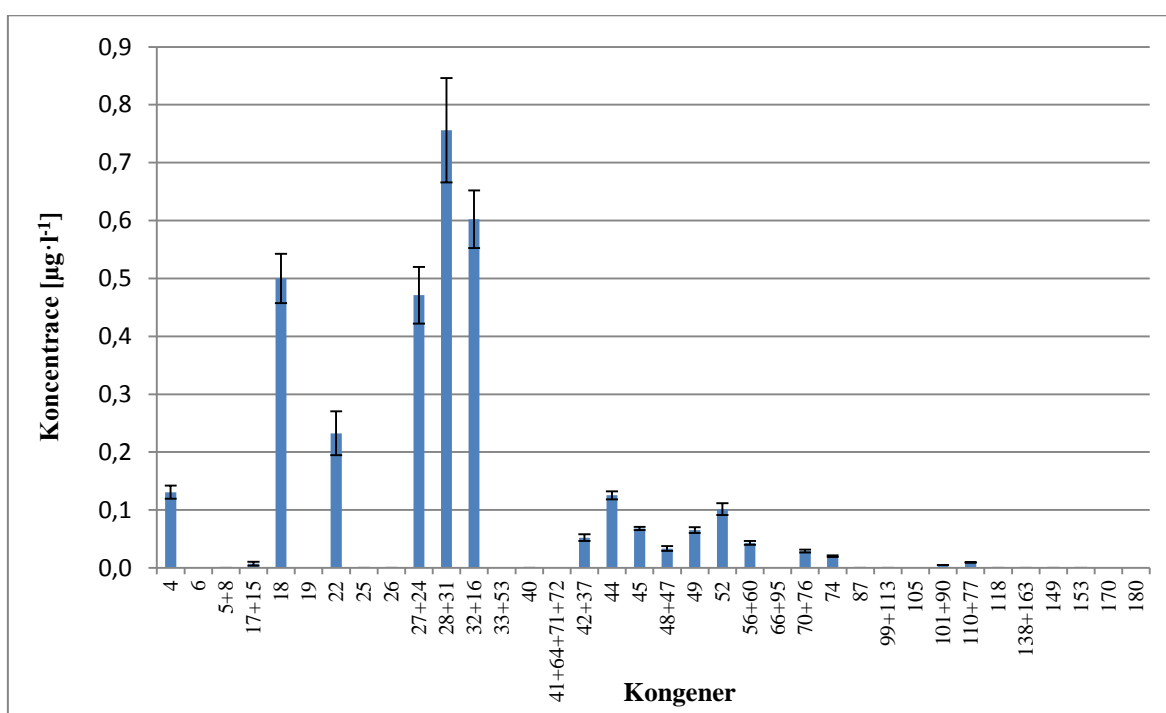
V následujícím pokusu byl ještě zvýšen podíl methanolu na přídavek 80 ml do 1 l milli-Q vody (kap. 5.3.1.2, experiment DISK 3). Protože z předchozího experimentu (DISK 2) vyplynulo, že eluce disku 30 ml DCM je dostačující, byla také vynechána druhá eluce hexanem s cílem redukovat množství spotřebovaných rozpouštědel. Toto schéma extrakce přineslo nejvyšší výtěžnost, v průměru kolem 85–90 % (Obr. 10). Z tohoto důvodu byla tato výsledná metodika vybrána pro analýzu reálné kontaminované vody (kap. 6.2).



Obr. 10 Průměrná výtěžnost jednotlivých PCB kongenerů z uměle kontaminované vody (koncentrace asi $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ D103) při extrakci SPE disky ENVITM-18 s přidáním 80 ml methanolu k 1 l vzorku, experiment DISK 3. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

6.2 Stanovení koncentrace PCB ve vzorcích podzemní vody

Pro analýzu vzorku reálné kontaminované podzemní vody z bývalé obalovny živičných drtí byla použita metodika DISK 3 (kap. 5.3.1.2). Podzemní voda obsahovala $3,3 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ PCB (suma vybraných kongenerů). Nejhojněji zastoupené byly trichlorované kongenery, které dohromady představovaly asi 80 % celkového obsahu PCB, což odpovídá charakteru znečištění Delorem 103. Nejvíce abundantní byl směsný pík kongenerů 28+31 ($0,76 \pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), které rovněž představují největší pík Deloru 103 (asi 22 % celkové plochy píků v chromatogramu D103) (Kubátová *et al.*, 1996).



Obr. 11 Koncentrace jednotlivých PCB kongenerů identifikovaných v podzemní vodě z oblasti bývalé obalovny živičných drtí. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely stanovení).

6.3 Degradace PCB kmenem *P. ostreatus* KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu

6.3.1 Degradace PCB

P. ostreatus KRYOS byl kultivován na slámovém substrátu a uměle kontaminován PCB (50 µg D103 na 43 g vlhkého slámového substrátu, kap. 5.4.4). Degradace PCB byla stanovena v 7., 14. a 28. dni experimentu a zahrnovala analýzu vodné části vzorku (kap. 5.3.1.1, experiment K4, D) i analýzu pevného substrátu (kap. 5.3.2).

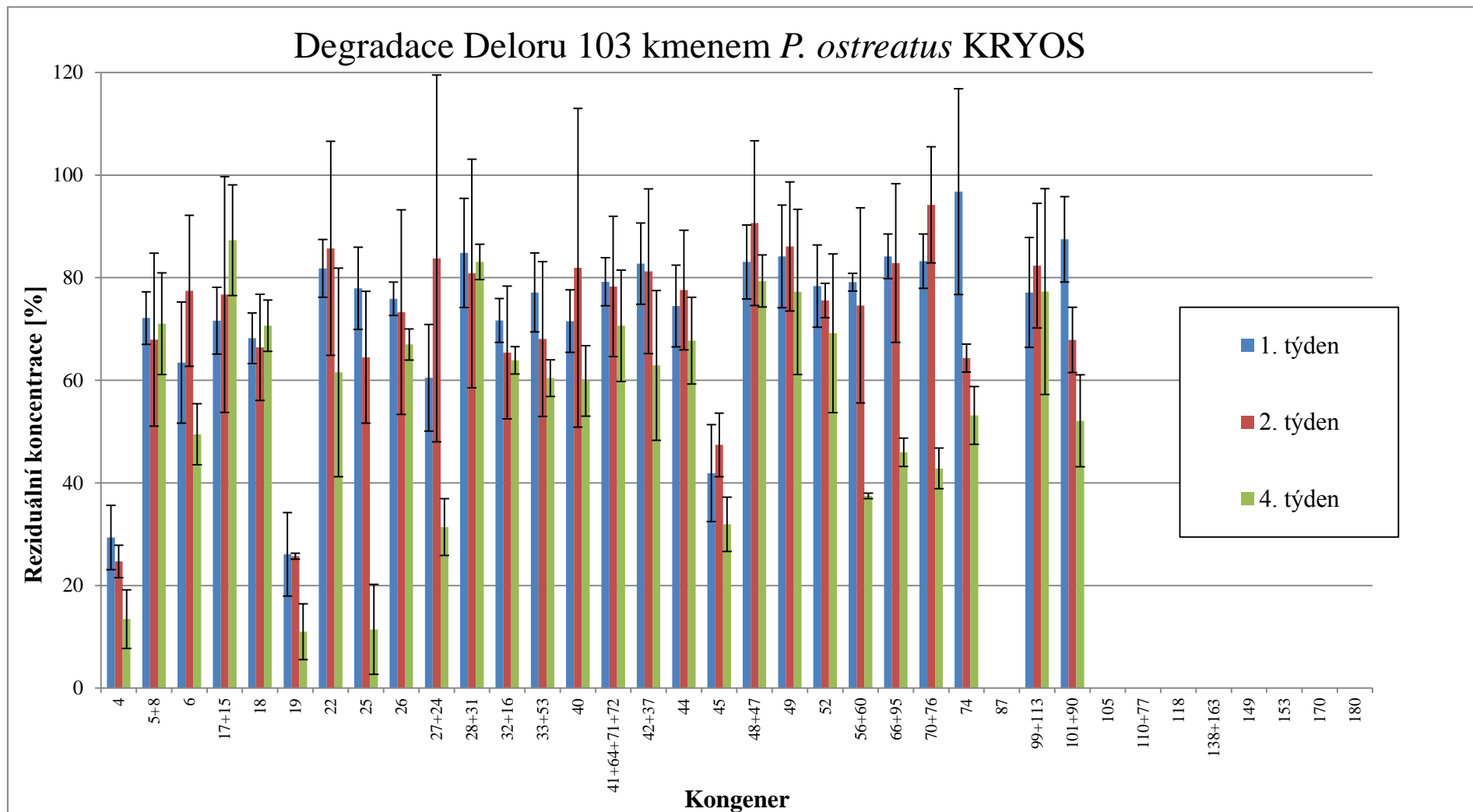
V analyzované vodné části nebyly u žádného vzorku detekovány PCB.

V průběhu experimentu byl zaznamenán pokles obsahu PCB kromě baněk obsahujících živou kulturu i v heat-killed kontrolách (HKC), kde by neměla probíhat degradace. Proto jsou reziduální koncentrace jednotlivých kongenerů vztaženy vůči reziduálním koncentracím příslušných kongenerů v HKC (Obr. 12 a Tab. 9).

I přesto byla detekována degradace PCB, která se lišila pro jednotlivé kongenery (Obr. 12). Nejlépe byly degradovány kongenery 4, 19 a 25, jejichž obsah po čtyřech týdnech kultivace poklesl pod 20 % přidaného množství a dále kongenery 6, 27+24, 45, 56+60, 66+95 a 70+76, jejichž reziduální obsah po čtyřech týdnech poklesl pod 50 %. Oproti tomu nejmenší degradace byla pozorována u kongenerů 17+15, 28+31, 48+47, 49 a 99+113, u kterých po čtyřech týdnech zůstalo >80 % původního obsahu.

Moeder *et al.* (2005) zaznamenali při degradaci Deloru 103 kmenem *P. ostreatus* 3004 kultivovaným na slámovém substrátu po 44 dnech nejúčinnější degradaci u kongenerů 4, 19, 27+24, 6, 46 a 7+9 (>90% degradace iniciálního množství). Tyto výsledky jsou porovnatelné s výsledky na Obr. 12. Naopak nejnižší degradační účinnost zjistili u kongenerů 49, 63, 74, 42+37 a 66+95 (<20% degradace iniciálního množství).

Kubátová *et al.* (2001) sledovali degradaci PCB různými kmeny ligninolytických hub v uměle kontaminované půdě. Zatímco druhy *P. chrysosporium* a *T. versicolor* nebyly schopné výrazně snížit obsah PCB oproti kontrolám, čtyři kmeny *P. ostreatus* (3004, F6, P15 a P19) vykazovaly podobnou degradační účinnost a byly schopné odstranit asi 40 % PCB za dva měsíce. Nejlépe byly degradovány kongenery substituované v poloze *ortho* (4, 19, 45 a 46) a naopak nejméně kongener 74, který má dva atomy Cl v pozici *para*.



Obr. 12 Reziduální koncentrace jednotlivých PCB kongenerů po degradaci Deloru 103 kmenem *P. ostreatus* KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu. Obsah PCB v baňce byl 50 µg D103 na 43 g vlhkého slámového substrátu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

Z procentuálního zastoupení jednotlivých kongenerů v D103 (Kubátová *et al.*, 1996; Taniyasu *et al.*, 2003) bylo vypočteno celkové množství odstraněných PCB (Tab. 9).

Tab. 9 Účinnost odstranění PCB po 4 týdnech degradace *P. ostreatus* KRYOS.

Počáteční obsah PCB v baňce [μg]	50
PCB odstraněno z vody [%]	100
Reziduální obsah PCB ve 4. týdnu [%]	59 ± 8
PCB odstraněno celkem [μg]	20 ± 4

Ve většině prací zabývajících se degradací PCB ligninolytickými houbami byla popsána schopnost *P. ostreatus* degradovat PCB s poměrně vysokou účinností jak v tekutých médiích, tak i na pevném substrátu (Kubátová *et al.*, 2001; Moeder *et al.*, 2005; Čvančarová *et al.*, 2012). Oproti tomu Novotný *et al.* (2004) nezaznamenali žádnou degradační schopnost u kmene *P. ostreatus* 3004 v dusíkem-limitovaném tekutém médiu.

Pokles obsahu PCB v HKC může být způsoben sorpcí PCB na slámový substrát, případně houbové mycelium, adsorpcí na skleněnou stěnu baňky nebo volatilizací. Kubátová *et al.* (2001) použili pro extrakci PCB Soxhletův extraktor a v kontrolní půdě dosáhli extrakční účinnosti pouze 0–50 %. Nejmenší výtěžnost byla pozorována u nízkochlorovaných kongenerů, což si autoři vysvětlovali jejich vyšší těkavostí. Extrahovali proto i slámový substrát inokulovaný houbovou kulturou, který byl umístěn nad kontaminovanou půdou, a našli zde dalších asi 10 % PCB. Beaudette *et al.* (1998) zaznamenali ztráty PCB až 40 % v abiotických kontrolách a až 60 % v kontrolách s kulturou usmrcenou kyselinou chloristou při kultivaci v tekutém médiu. Tento rozdíl byl připsán sorpci na houbové mycelium. Novotný *et al.* (1997) zaznamenali po třech týdnech ztráty asi 75 % v HKC.

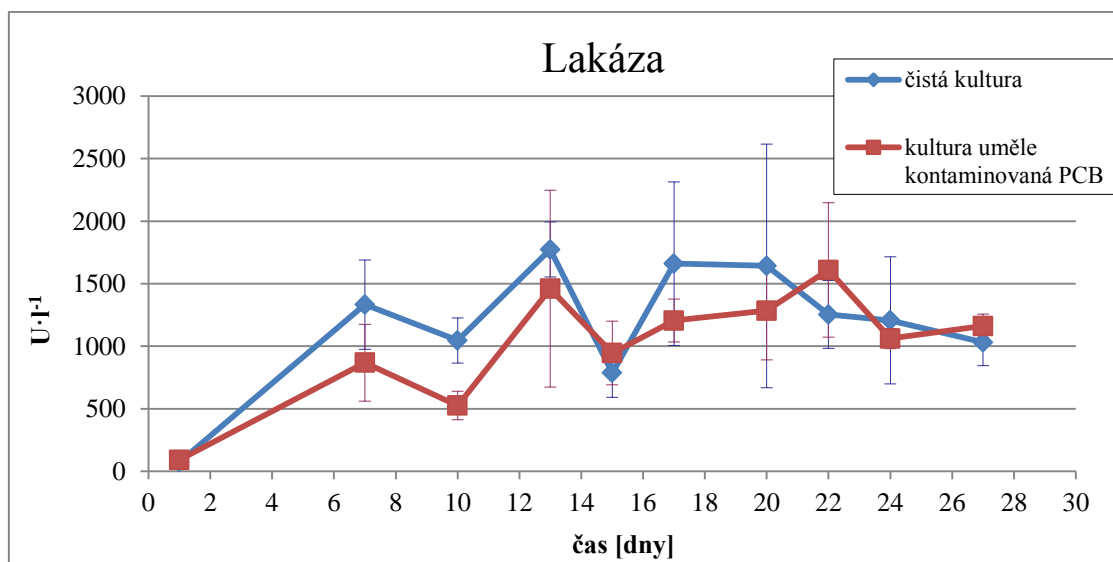
Zachář *et al.* (1996) zkoumali fyzikální faktory negativně ovlivňující vyhodnocování dlouhodobých experimentů biodegradace PCB. Zjistili, že výtěžnost PCB závisí na typu použitého média a výrazně klesá s časem. Autoři analyzovali i množství PCB zachycených na celulózových zátkách baněk indikující jejich volatilizaci; po 28 dnech zde bylo detekováno 63 % pentachlorovaných PCB a 14 % oktachlorovaných PCB. Jako další byla v této studii zjištěna adsorpce PCB na skleněný povrch baněk (asi 60 % z vody po 28 dnech; nezávisela na stupni chlorace (penta- až oktachlorované PCB)).

Adsorpce PCB na sklo byla zkoumána i autory Lung *et al.* (2000b), kteří zjistili ztráty 30 % (kongenery 28 a 101), 17 % (k. 52), 40 % (k. 138) a 55% (k. 180) po pěti dnech. Z těchto důvodů byl po zjištění nízké extrakční účinnosti v předkládané práci proveden výplach baněk EtOAc, kde ale PCB identifikovány nebyly. Adsorpci PCB na sklo lze snížit potažením vhodným materiálem, např. silikonovým olejem nebo polydimethylsiloxany (Lung *et al.*, 2000a). Kromě skla se PCB sorbují i na plastový materiál (Pascal *et al.*, 2005; Rochman *et al.*, 2013; Velzeboer *et al.*, 2014). Pepe a Byrne (1980) zaznamenali ztrátu 90 % PCB 153 (po 144 h) v polystyrenové zkumavce oproti ztrátě 30 % ve zkumavce z borosilikátového skla za stejných podmínek.

6.3.2 Enzymatická aktivita

Byla stanovena enzymatická aktivita lakázy, MnP a VP a celková koncentrace proteinů (kap. 5.4.3).

Lakáza je u druhu *Pleurotus* dominantní enzym (More *et al.*, 2011). Koncentrace lakázy v extracelulární tekutině se v průběhu experimentu pohybovala v rozmezí 500–2500 U·l⁻¹ (Obr. 13). Kromě nárůstu koncentrace lakázy v prvním týdnu degradace nebyl pozorován trend v čase. EA lakázy v čisté kultuře (bez PCB) a kultuře uměle kontaminované PCB se od sebe nelišila.



Obr. 13 Enzymatická aktivita lakázy v kultuře uměle kontaminované PCB a čisté kultuře bez PCB v průběhu degradace PCB kmenem *P. ostreatus* KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (2 paralely).

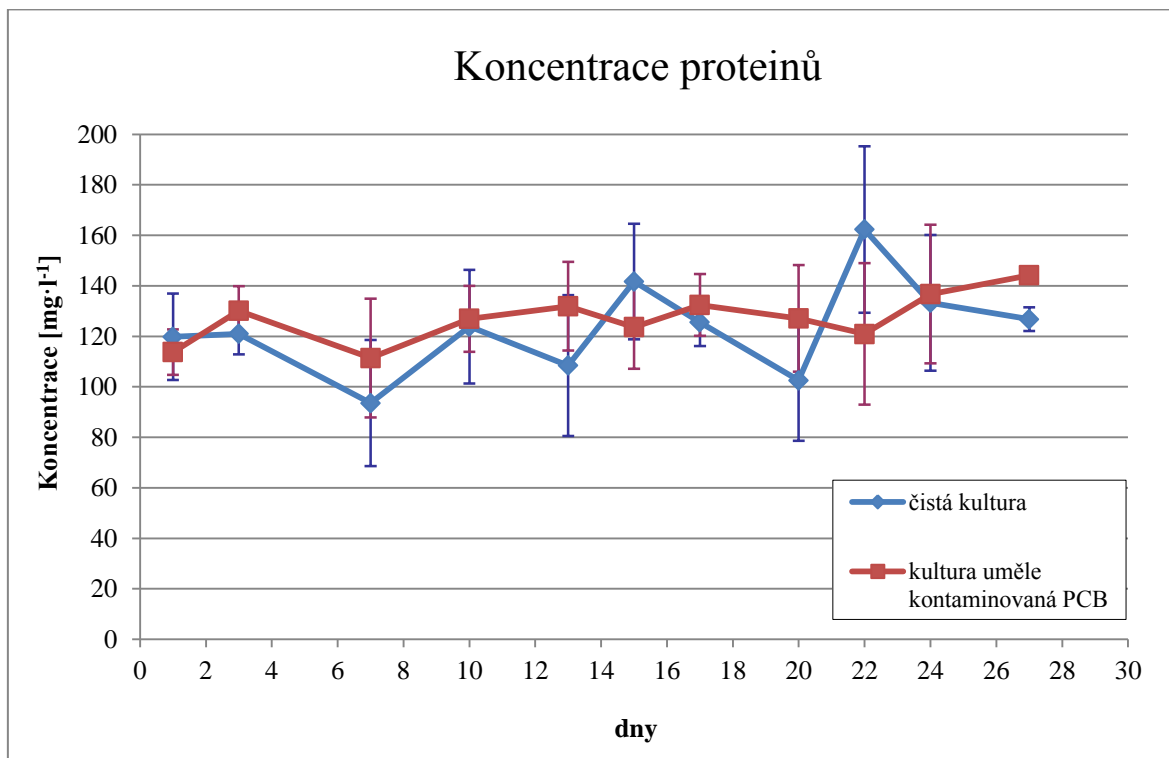
Množství produkovaných extracelulárních enzymů lze použít jako indikátor fyziologického stavu kultury (Novotný *et al.*, 1997). Houby bílé hniloby produkují různé ligninolytické enzymy v různém množství. Jejich produkce závisí na množství faktorů vč. kultivačních podmínek. *P. chrysosporium* např. v dusíkem-limitovaném médiu, které simuluje podmínky, za jakých ligninolytické houby rozkládají lignin, produkuje vyšší množství LiP (Faison a Kirk, 1985). U jiných hub tomu ale může být naopak (Kaal *et al.*, 1995). Produkce enzymů může být dokonce indukována přítomností polutantu (Yeo *et al.*, 2008; Takamiya *et al.*, 2008). Plačková *et al.* (2012) popsali u ligninolytické houby *T. versicolor* v přítomnosti PCB v dusíkem-limitovaném médiu nárůst enzymové aktivity lakázy až 42x oproti kontrole bez PCB.

Z výsledků enzymů v tomto pokusu vyplývá, že kultura nebyla nijak ovlivněna přítomností PCB. V literatuře byla u *P. ostreatus* kultivovaného v tekutém MEG médiu zjištěna inhibice enzymatické aktivity lakázy v přítomnosti PCB, zatímco v dusíkem-limitovaném médiu nebyla tato aktivita přítomností PCB nijak ovlivněna (Čvančarová *et al.*, 2012). Ve stejné práci dále nebyla zjištěna korelace mezi produkcí lakázy a účinností degradace PCB.

Enzymatická aktivita MnP nebyla v průběhu experimentu detekována.

Enzymatická aktivita VP byla detekována pouze 7., 10. a 22. den v čistých kulturách a 22. den v kulturách uměle kontaminovaných PCB a nepřesáhla 20 U·l⁻¹.

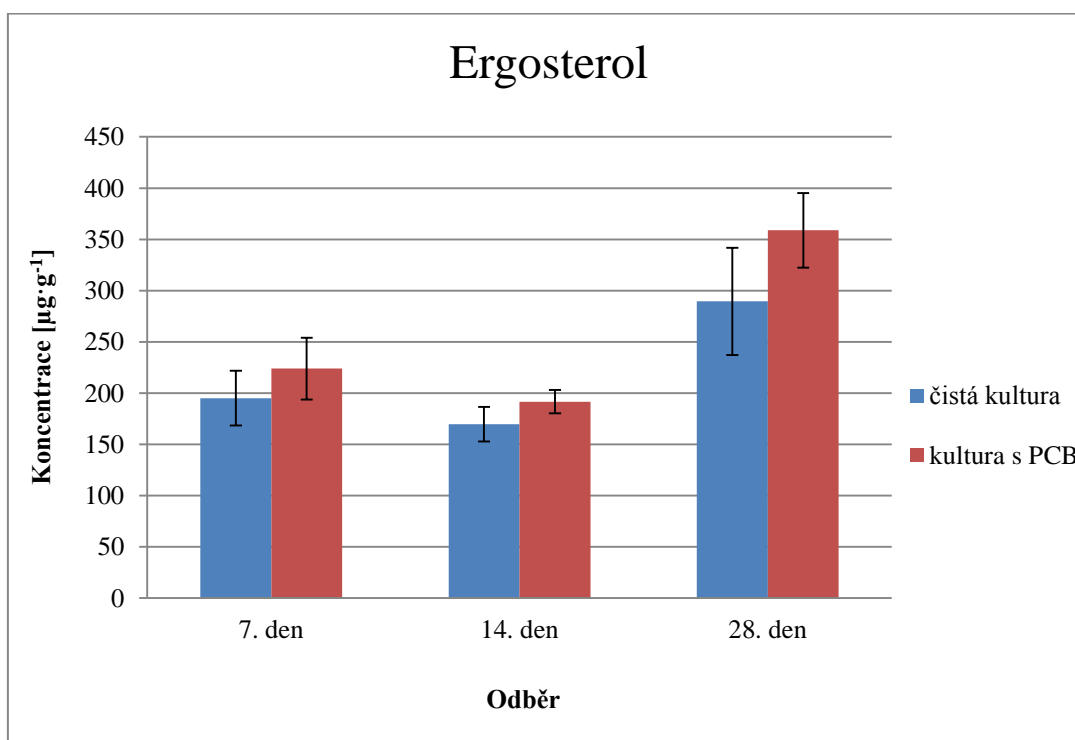
Koncentrace proteinů se pohybovaly mezi 80–200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 14). Během experimentu nebyl zaznamenán žádný trend v čase a koncentrace proteinů v baňkách s a bez přidaných PCB se od sebe nelišily.



Obr. 14 Celková koncentrace proteinů v kultuře s uměle kontaminované PCB a čisté kultuře bez PCB v průběhu degradace PCB kmenem *P. ostreatus* KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (2 paralely).

6.3.3 Stanovení ergosterolu

Z výsledků analýzy ergosterolu, který je součástí buněčných stěn hub, ale nevyskytuje se u rostlin a mnohobuněčných živočichů, lze sledovat vývoj houbové kultury v čase. Odběry pro stanovení obsahu ergosterolu (kap. 5.3.4) byly provedeny 7., 14. a 28. den experimentu. Mezi odběrem v 7. a 14. dni kultivace nelze pozorovat rozdíl, 28. den ale došlo k nárůstu koncentrace ergosterolu jak v čisté kultuře (na $290 \pm 52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), tak v kultuře uměle kontaminované PCB (na $359 \pm 36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Obr. 15). Obsah ergosterolu v čistých kulturách a kulturách uměle kontaminovaných PCB se v žádném odběru statisticky významně nelišil (dvouvýběrový Studentův t-test, $p > 0,05$) a nárůst houbové biomasy proto nebyl ovlivněn přítomností PCB.



Obr. 15 Obsah ergosterolu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ substrátu) v kulturách *P. ostreatus* KRYOS při degradaci PCB v 7., 14. a 28. dni kultivace čistých kultur a kultur kontaminovaných PCB. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (2 paralely).

6.4 Degradace PCB v průtokovém bioreaktoru

6.4.1 Degradace PCB

Koncentrace uměle kontaminované vody ($3,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) použité pro degradační experimenty byla zvolena tak, aby odpovídala koncentraci reálné kontaminované podzemní vody (kap. 6.2). Délka experimentu, množství substrátu, rychlost průtoku a celkové množství influentu bylo pro optimální degradaci PCB navrženo na základě výsledků degradace předchozího degradačního pokusu s *P. ostreatus* KRYOS (kap. 6.3.1).

Při analýze PCB v efluentu (kap. 5.3.1.1, experiment K4, D) nebyla zjištěna přítomnost PCB. Degradační účinnost jednotlivých reaktorů vypočtená z procentuálního zastoupení jednotlivých kongenerů v D103 (Kubátová *et al.*, 1996; Taniyasu *et al.*, 2003) je uvedena v Tab. 10. Zcela byly odstraněny kongenery 4, 6, 25, 27+24, 33+53, 42+37 a 45. Nebyl pozorován rozdíl v degradační účinnosti mezi jednotlivými aplikovanými substráty.

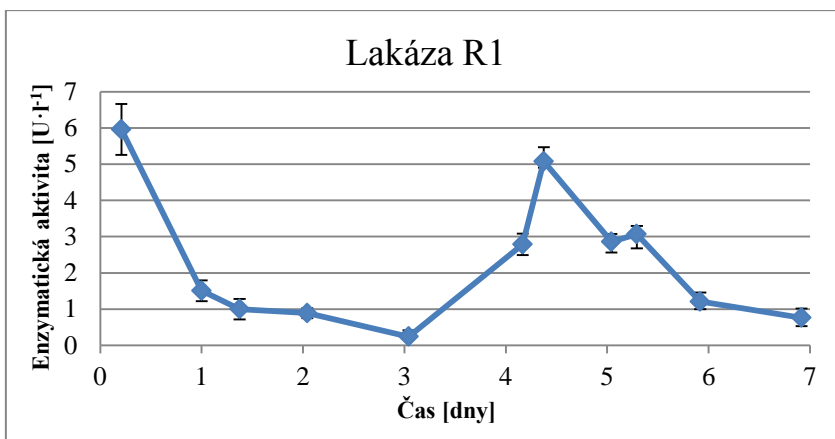
Degradace byla zastavena po 7 dnech po protečení celkového objemu uměle kontaminované vody (9 l). Reziduální obsah PCB by pravděpodobně bylo možné odstranit dodatečnou kultivací houbové kultury s případným přidáním vhodného živného substrátu.

Tab. 10 Degradace PCB v průtokových reaktorech R1–R3. Množství PCB v celkovém objemu aplikované uměle kontaminované vody (9 l) bylo $31,5 \mu\text{g}$ na přibližně 250 g vlhkého substrátu.

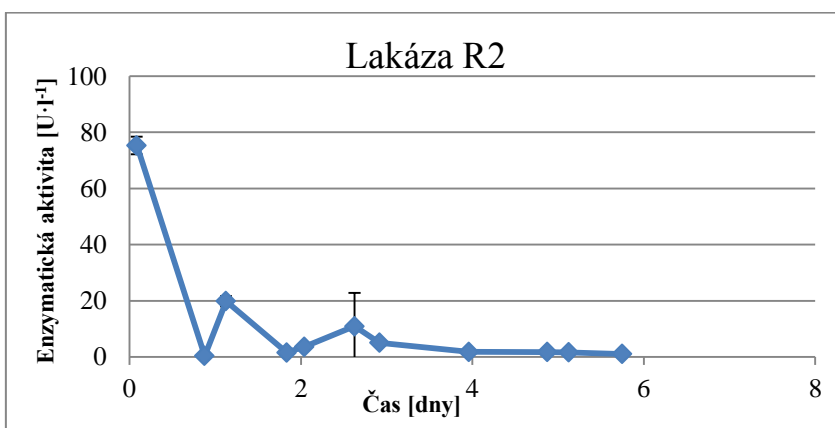
Reaktor	R1	R2	R3
Celkový obsah PCB ve vodě [μg]	31,5	31,5	31,5
PCB odstraněno z vody [%]	100,0	100,0	100,0
Reziduální obsah PCB v reaktoru po degradaci [%]	21,7	27,7	20,0
PCB odstraněno celkem [μg]	24,6	22,8	25,2

6.4.2 Enzymatická aktivita

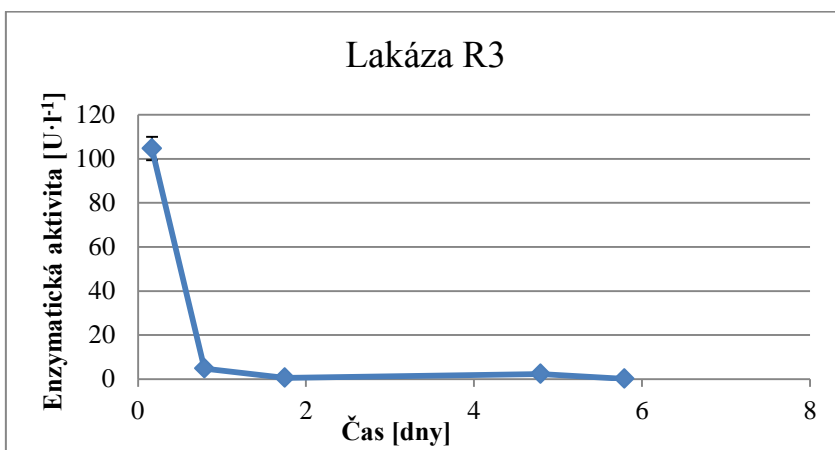
V průběhu experimentu byla v efluentu stanovena pouze enzymatická aktivita lakázy, protože v předchozím experimentu nebyla detekována MnP a VP byla zjištěna pouze v minimální koncentraci (kap. 6.3.2). EA lakázy pro jednotlivé reaktory je uvedena na Obr. 16–18. Obecně lze pozorovat velmi prudký pokles EA lakázy již během prvního dne z důvodu vymývání enzymů protékající vodou.



Obr. 16 Enzymatická aktivita lakázy v reaktoru R1. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).



Obr. 17 Enzymatická aktivita lakázy v reaktoru R2. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

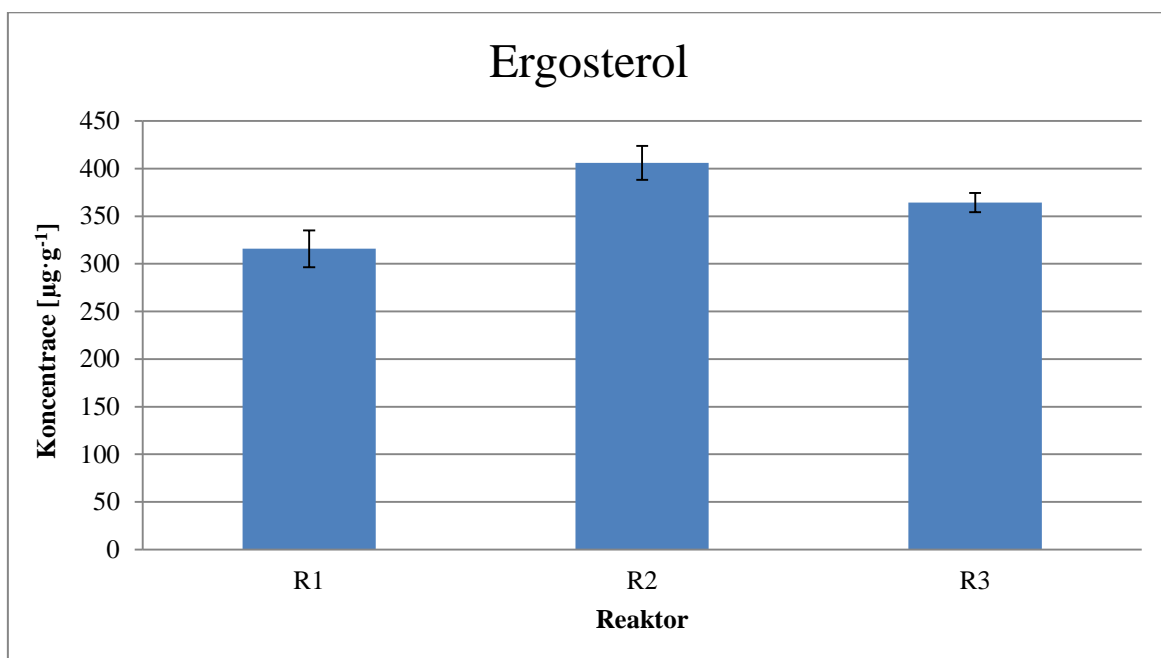


Obr. 18 Enzymatická aktivita lakázy v reaktoru R3. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

6.4.3 Stanovení ergosterolu a fosfolipidových mastných kyselin

Obsah ergosterolu byl stanoven po ukončení degračního experimentu z lyofilizované homogenizované náplně reaktoru (kap. 5.3.4).

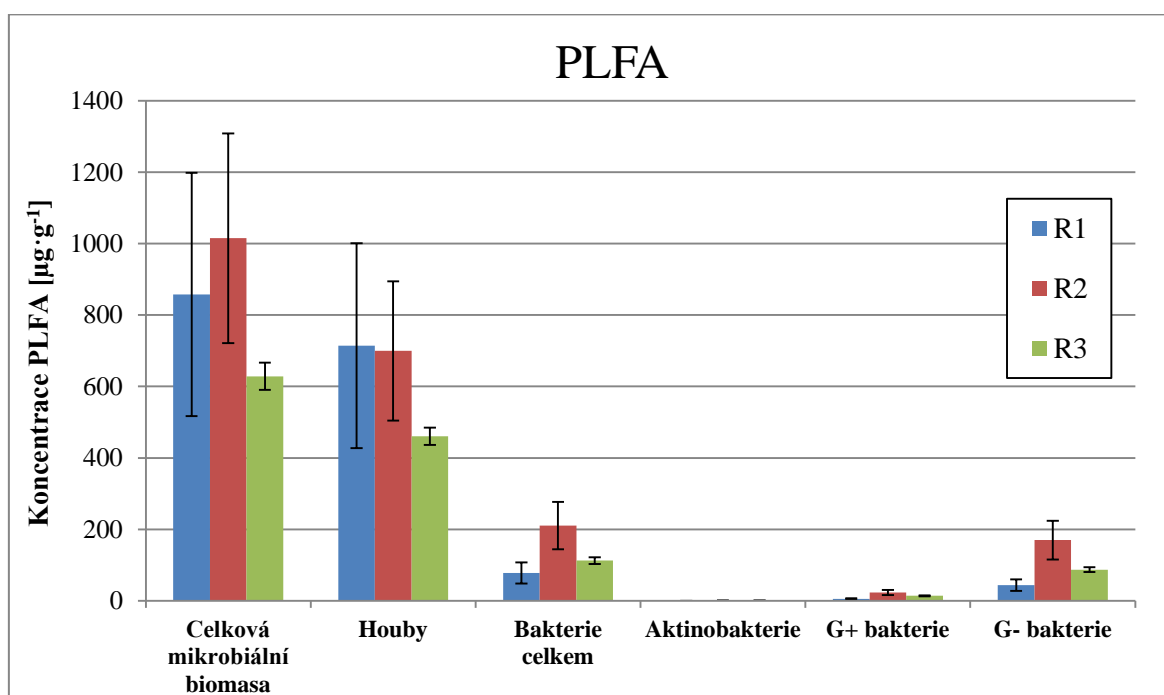
Nejvyšší obsah ergosterolu byl zjištěn u reaktorů R2 ($406 \pm 18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a R3 ($364 \pm 10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ve kterých byla jako substrát použita směs vyplozeného slámového substrátu se sterilizovanými slámovými peletami (Obr. 19). O něco nižší byl obsah ergosterolu v reaktoru R1 ($315 \pm 19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), kde byl *P. ostreatus* KRYOS kultivovaný na slámových peletách. Statisticky významně se lišil pouze reaktor R1 od reaktoru R2, které obsahovaly odlišný substrát (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$).



Obr. 19 Obsah ergosterolu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ substrátu) v reaktorech R1–R3 při degradaci PCB. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

Charakterizace mikroorganismů přítomných ve vzorcích reaktorů (R1–R3) byla provedena analýzou fosfolipidových mastných kyselin (PLFA, phospholipid fatty acids). Principem metody je izolace a stanovení fosfolipidových mastných kyselin vyskytujících se v buněčných membránách. Na základě obsahu charakteristických mastných kyselin lze určit jednotlivé skupiny mikroorganismů. Metoda extrakce byla upravena dle Bligh a Dyer (1959). Frakcionace lipidů, mírná alkalická methanolýza a analýza GC/MS byla upravena dle Šnajdr *et al.* (2008).

Nejvyšší koncentrace PLFA bakterií byla v reaktoru R2 ($210 \pm 66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Obr. 20). Z celkového počtu bakterií byly nejvíce zastoupené gramnegativní bakterie (G–) ve všech případech průtokových reaktorů. Koncentrace PLFA charakteristických pro aktinomycety byly ve všech reaktorech $<0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Reaktory R1–R3 se významně nelišily v obsahu PLFA celkové mikrobiální biomasy ani hub (ANOVA, $p>0,05$). V obsahu PLFA bakterií se významně lišil pouze reaktor R1 od reaktoru R2, které obsahovaly odlišný substrát (ANOVA, Tukey HSD, $p<0,05$).



Obr. 20 Koncentrace sumy fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) charakteristických pro jednotlivé skupiny mikroorganismů v průtokových reaktorech R1–R3. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (3 paralely).

Výsledky PLFA v případě houbové biomasy (jednotlivé reaktory se mezi sebou signifikantně nelišily, Obr. 20) neodpovídají výsledkům ergosterolu, kde se signifikantně lišil reaktor R1 od reaktoru R2 (Obr. 19). PLFA odrážejí přítomnost živé houbové biomasy, zatímco ergosterol poukazuje spíše na obsah celkové houbové biomasy. Mille-Lindblom *et al.* (2004) upozornili na skutečnost, že rozklad ergosterolu probíhá relativně pomalu, ačkoliv metody jeho kvantifikace jako markeru živé houbové biomasy jsou založené na předpokladu, že k jeho rozkladu dochází velmi rychle po odumření houbové hyfy. Autoři detekovali po dvou měsících pouze 34% úbytek ergosterolu bez přístupu UV záření, které jeho degradaci podstatně urychluje.

Z výsledků analýzy ergosterolu a PLFA je patrné, že degradace PCB houbou *P. ostreatus* probíhala i v přítomnosti bakterií, tedy za nesterilních podmínek, což je podstatné pro budoucí aplikace na reálné vodné matrice.

7 ZÁVĚR

Ligninolytické houby představují velmi perspektivní skupinu mikroorganismů z hlediska svého využití v biodegradačních postupech aplikovatelných pro dekontaminaci širokého spektra xenobiotik i přirozených látek z různých typů matric. Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na ověření schopnosti ligninolytické houby *P. ostreatus* (hlíva ústříčná) degradovat polychlorované bifenyly (PCB), persistentní organické polutanty vykazující mnoho nežádoucích toxických účinků na lidské zdraví i životní prostředí.

Byla optimalizována metodika pro stanovení koncentrace PCB ve vodných matricích, která zahrnovala extrakci pevnou fází (SPE) a následné stanovení prostřednictvím GC/MS. Průměrná výtěžnost SPE se v průměru pohybovala kolem 85 %. Výsledná metodika byla následně použita pro stanovení obsahu PCB ve vzorcích dlouhodobě kontaminované podzemní vody, kde byla zjištěna koncentrace PCB $3,3 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, a dále pro zhodnocení biodegradačních experimentů.

V další části práce byly provedeny *in vivo* degradační experimenty s *P. ostreatus* KRYOS kultivovaným na slámovém substrátu v pilotních statických kulturách a následně v průtokovém bioreaktoru. Jako jedna z možností náplně reaktoru byla testována houbovým myceliem prorostlá sláma, která vzniká jako odpadní produkt v komerčních pěstírnách hlívy ústříčné. Degradační experimenty byly zaměřené na dekontaminaci vodných matric a potvrdily vhodnost tohoto ligninolytického kmene pro biodegradační aplikace. Z uměle kontaminované vody bylo za všech testovaných podmínek odstraněno 100 % PCB. *P. ostreatus* KRYOS byl v pilotním experimentu při počátečním obsahu 50 μg PCB schopný po čtyřech týdnech odstranit 41 ± 8 % a růst houbové kultury nebyl v průběhu experimentu ovlivněn přítomností PCB. V průtokovém bioreaktoru byl *P. ostreatus* z celkového množství 31 μg PCB v kontaminované vodě schopen odstranit 72–80 %.

SEZNAM LITERATURY

- Adebusoye, S. A., Picardal, F. W., Ilori, M. O., Amund, O. O. (2008): Influence of chlorobenzoic acids on the growth and degradation potentials of PCB-degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1203–1208.
- Aken, B. V., Correa, P. A., Schnoor, J. L. (2009): Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises. *Environmental science & technology* 44, 2767–2776.
- AQUATEST (2013a): Rožmitál pod Třemšínem – sanační práce + monitoring. Závěrečná zpráva za rok 2012, AQUATEST a.s.
- AQUATEST (2013b): Vývoj a zavedení nástrojů aditivně modulujících proces bioremediace půdy a vody. AQUATEST a.s., Etapová zpráva 2013, III. tématický okruh. Projekt VaV MPO ČR ev. č. FR-TI1/456.
- Baldrian, P. (2006): Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews* 30, 215–242.
- Ballschmiter, K., Zell, M. (1980): Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* 302, 20–31.
- Beaudette, L. A., Davies, S., Fedorak, P. M., Ward, O. P., Pickard, M. A. (1998): Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Applied and environmental microbiology* 64, 2020–2025.
- Beless, B., Rifai, H. S., Rodrigues, D. F. (2014): Efficacy of carbonaceous materials for sorbing polychlorinated biphenyls from aqueous solution. *Environmental Science and Technology* 48, 10372–10379.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C. E. (1997): Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2495–2501.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E. (1996): Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology* 62, 2547–2553.

- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911–917.
- Bogan, B. W., Lamar, R. T. (1996): Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1597–1603.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G. (1990): Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters* 267, 99–102.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.
- Bumpus, J. A., Aust, S. D. (1987): Biodegradation of DDT [1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology* 53, 2001–2008.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, C., Šašek, V., Mougin, C. (2008): Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiologica* 53, 289–294.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M. (2009): Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745–750.
- Covino, S., Svobodová, K., Křesinová, Z., Petruccioli, M., Federici, F., D'Annibale, A., Čvančarová, M., Cajthaml, T. (2010): In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresource technology* 101, 3004–3012.
- Čvančarová, M. (2009): Studium ekotoxicity biodostupné frakce organopolutantů. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. 84 s.
- Čvančarová, M., Křesinová, Z., Filipová, A., Covino, S., Cajthaml, T. (2012): Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88, 1317–1323.
- Čvančarová, M., Moeder, M., Filipová, A., Cajthaml, T. (2015): Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi—Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere* 136, 311–320.

- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M. A., Vazquez-Duhalt, R. (2005): Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 223–231.
- de Jong, E., Cazemier, A. E., Field, J. A., de Bont, J. A. (1994): Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *Applied and environmental microbiology* 60, 271–277.
- Dickhut, R. M., Andren, A. W. Armstrong, D. E. (1986): Aqueous Solubilities of Six Polychlorinated Biphenyl Congeners at Four Temperatures. *Environmental Science & Technology* 20, 807–810.
- Dietrich, D., Hickey, W. J., Lamar, R. (1995): Degradation of 4, 4'-dichlorobiphenyl, 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl, and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental mikrobiology* 61, 3904–3909.
- Donoso, C., Becerra, J., Martínez, M., Garrido, N., Silva, M. (2008): Degradative ability of 2, 4, 6-tribromophenol by saprophytic fungi *Trametes versicolor* and *Agaricus augustus* isolated from chilean forestry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 961–968.
- Eggen, T. (1999): Application of fungal substrate from commercial mushroom production—*Pleurotus ostreatus*—for bioremediation of creosote contaminated soil. *International biodeterioration & biodegradation* 44, 117–126.
- Erger, C., Balsaa, P., Werres, F., Schmidt, T. C. (2012): Multi-component trace analysis of organic xenobiotics in surface water containing suspended particular matter by solid phase extraction/gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 181–189.
- Erger, C., Balsaa, P., Werres, F., Schmidt, T. C. (2012): Occurrence of residual water within disk-based solid-phase extraction and its effect on GC-MS measurement of organic extracts of environmental samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* 403, 2541–2552.
- Erickson, M. D., Swanson, S. E., Flora Jr, J. D., Hinshaw, G. D. (1989): Polychlorinated dibenzofurans and other thermal combustion products from dielectric fluids containing polychlorinated biphenyls. *Environmental science & technology* 23, 462–470.

- Faison, B. D., Kirk, T. K. (1985): Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 299–304.
- Faroon, O. M., Keith, L. S., Smith-Simon, C., De Rosa, C. T. (2003): Polychlorinated biphenyls: human health aspects. Concise international chemical assessment document. *World Health Organization*, Ženeva, 64 s.
- Field, J. A., Sierra-Alvarez, R., 2008. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution* 155, 1–12.
- Fortuny, G., Pineda, L., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R. (2013): Determination of 61 organic pollutants in drinking water by solid phase extraction followed by liquid and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry: an analytical strategy for a routine laboratory. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 93, 707–726.
- Geissler, A., Schöler, H. F. (1991): The analysis of chloropesticides and PCB in water a statistical evaluation of four enrichment methods. *Chemosphere* 23, 1029–1041.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010): Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 369–385.
- Gibson, D. T., Parales, R. T. (2000): Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 236–243.
- Gomes, H. I., Dias-Ferreira, C., Ribeiro, A. B. (2013): Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. *Science of the Total Environment* 445–446, 237–260.
- Gruntorád, J. (2012): Detail lokality - Obalovna Rožmitál p. Třemšínem - SSŽ a.s. Databáze SEKM (Systém evidence kontaminovaných míst), Dostupné online z: <http://www.sekm.cz/> [cit. 10. 6. 2015]
- Hawker, D. W. Connell, D. W. (1988): Octanol-Water Partition Coefficients of Polychlorinated Biphenyl Congeners. *Environmental Science & Technology* 22, 382–387.
- Hofrichter, M. (2002): Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology* 30, 454–466.

- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegaß, I., Fritsche, W. (1998): Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 399–404.
- Holoubek, I., Adamec, V., Bartoš, M., Budňáková, M., Černá, M., Čupr, P., Bláha, K., Demnerová, K., Drápal, J., Hajšlová, J., Hanzálková, M., Holoubková, I., Hrabětová, S., Jech, L., Klánová, J., Kohoutek, J., Kužilek, V., Machálek, P., Matějů, V., Matoušek, J., Matoušek, M., Mejstřík, V., Novák, J., Ocelka, T., Pekárek, V., Petira, K., Petrlík, J., Provazník, O., Punčochář, M., Rieder, M., Ruprich, J., Sánka, M., Tomaniová, M., Vácha, R., Volka, K., Zbiral, J. (2006): Národní implementační plán Stockholmské úmluvy o persistentních organických polutantech. Projekt TOCOEN, s.r.o., Brno v zastoupení Konsorcia RECETOX - TOCOEN & Associates, TOCOEN REPORT No. 293, Brno, leden 2006, 99 s. + 11 příloh.
- Chroma, L., Mackova, M., Kucerova, P., Burkhard, J., Macek, T. (2002): Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta biotechnologica* 22, 35–41.
- Kaal, E. E., Field, J. A., Joyce, T. W. (1995): Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technology* 53, 133–139.
- Kamei, I., Kogura, R., Kondo, R. (2006): Metabolism of 4, 4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete sp.* MZ142. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 566–575.
- Kamei, I., Watanabe, M., Harada, K., Miyahara, T., Suzuki, S., Matsufuji, Y., Kondo, R. (2009): Influence of soil properties on the biodegradation of 1, 3, 6, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and fungal treatment of contaminated paddy soil by white rot fungus *Phlebia brevispora*. *Chemosphere* 75, 1294–1300.
- Kaštánek, F., Demnerová, K., Pazlarová, J., Burkhard, J., Maléterová, Y. (1999): Biodegradation of polychlorinated biphenyls and volatile chlorinated hydrocarbons in contaminated soils and ground water in field condition. *International biodeterioration & biodegradation* 44, 39–47.
- Kaštánek, F., Kaštánek, P. (2005): Combined decontamination processes for wastes containing PCBs. *Journal of hazardous materials* 117, 185–205.
- Kaštánek, F., Kuncová, G., Demnerová, K., Pazlarová, J., Burkhard, J., Maléterová, Y. (1995): Laboratory and pilot-scale sorption and biodegradation of polychlorinated biphenyls from ground water. *International biodeterioration & biodegradation* 35, 287–300.

- Keum, Y. S., Li, Q. X. (2004): Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56, 23–30.
- Kim, H. Y., Song, H. G. (2000): Comparison of 2, 4, 6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. *Current microbiology* 41, 317–320.
- Kirk, T. K., Farrell, R. L. (1987): Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology* 41, 465–501.
- Kocan, A., Petrik, J., Jursa, S., Chovancova, J., Drobna, B. (2001): Environmental contamination with polychlorinated biphenyls in the area of their former manufacture in Slovakia. *Chemosphere* 43, 595–600.
- Kordon, K., Mikolasch, A., Schauer, F. (2010): Oxidative dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by laccases of white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 203–209.
- Křesinová, Z., Moeder, M., Ezechiáš, M., Svobodová, K., Cajthaml, T. (2012): Mechanistic study of 17 α -ethinylestradiol biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: tracking of extracellular and intracellular degradation mechanisms. *Environmental science & technology* 46, 13377–13385.
- Kubátová, A., Erbanová, P., Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F., Šašek, V. (2001): PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* 43, 207–215.
- Kubátová, A., Matucha, M., Ševčík, J. K. (1996): Application of correlation analysis for identification of polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A* 752, 197–207.
- Lauby-Secretan, B., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, V., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K. (2013): Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. *Lancet Oncology* 4, 287–288.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N. S., Hofrichter, M., Rogalski, J. (1999): Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology* 27, 175–185.
- Li, A., Andren, A. W. (1994): Solubility of polychlorinated biphenyls in water/alcohol mixtures. 1. Experimental data. *Environmental science & technology* 28, 47–52.

- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., Hildén, K. (2010): Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes—ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of basic microbiology* 50, 5–20.
- Lung, S. C., Altshul, L. M., Ford, T. E., Spengler, J. D. (2000a): Coating effects on the glass adsorption of polychlorinated biphenyl (PCB) congeners. *Chemosphere* 41, 1865–1871.
- Lung, S. C., Yanagisawa, Y., Ford, T. E., Spengler, J. D. (2000b): Characteristics of sorption losses of polychlorinated biphenyl congeners onto glass surfaces. *Chemosphere* 41, 1857–1864.
- Mackova, M., Macek, T., Ocenaskova, J., Burkhard, J., Demnerova, K., Pazlarova, J. (1997): Biodegradation of polychlorinated biphenyls by plant cells. *International biodeterioration & biodegradation* 39, 317–325.
- Magan, N., Fragoeiro, S., Bastos, C. (2010): Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi. *Mycobiology* 38, 238–248.
- Magar, V. S., Brenner, R. C., Johnson, G. W., Quensen, J. F. (2005): Long-term recovery of PCB-contaminated sediments at the Lake Hartwell Superfund site: PCB dechlorination. 2. Rates and extent. *Environmental science & technology* 39, 3548–3554.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009): Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765–772.
- Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S. L. (1996): Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo (a) pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS microbiology letters* 135, 51–55.
- Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, T., Murao, S. (1986). Structures of the Laccase-catalyzed Oxidation Products of Hydroxy-benzoic Acids in the Presence of ABTS [2, 2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)]. *Agricultural and biological chemistry* 50, 1355–1357.
- Matsuzaki, F., Wariishi, H. (2004): Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and biophysical research communications* 324, 387–393.
- Mikošková, J., Čáp, L., Lemr, K. (2004): Postupy izolace polyaromatických uhlovodíků a polychlorovaných bifenylů při jejich stanovení. *Chemické listy* 98, 80–85.

- Mille-Lindblom, C., von Wachenfeldt, E., Tranvik, L. J. (2004): Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59, 253–262.
- Mir-Tutusaus, J. A., Masís-Mora, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Sarrà, M., Caminale, G., Vicent, T., Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2014): Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Science of the Total Environment* 500, 235–242.
- Moeder, M., Cajthaml, T., Koeller, G., Erbanová, P., Šašek, V. (2005): Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 61, 1370–1378.
- Mohn, W. W., Tiedje, J. M. (1992): Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews* 56, 482–507.
- More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S., Veena, S. M (2011): Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* *Enzyme research* 2011.
- Mori, T., Kitano, S., Kondo, R. (2003): Biodegradation of chloronaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Applied microbiology and biotechnology* 61, 380–383.
- Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F., Geremia, R. A. (2013): Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fungal biology* 117, 268–274.
- Muir, D. C., Norstrom, R. J., Simon, M. (1988): Organochlorine contaminants in Arctic marine food chains: accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordanes-related compounds. *Environmental science & technology* 22, 1071–1079.
- Mukerjee-Dhar, G., Shimura, M., Kimbara, K. (1998): Degradation of polychlorinated biphenyl by cells of *Rhodococcus opacus* strain TSP203 immobilized in alginate and in solution. *Enzyme and microbial technology* 23, 34–41.
- Murínová, S., Dercová, K., Dudášová, H. (2014): Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by four bacterial isolates obtained from the PCB-contaminated soil and PCB-contaminated sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 91, 52–59.

- Muzikář, M., Křesinová, Z., Svobodová, K., Filipová, A., Čvančarová, M., Cajthamlová, K., Cajthaml, T. (2011): Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *Journal of Hazardous Materials* 196, 386–394.
- Němeček, J., Lhotský, O., Cajthaml, T. (2014): Nanoscale zero-valent iron application for in situ reduction of hexavalent chromium and its effects on indigenous microorganism populations. *Science of the Total Environment* 485, 739–747.
- Ning, D., Wang, H., Zhuang, Y. (2010): Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation* 21, 297–308.
- Nisbet, I. C. T. a Sarofim, A. F. (1972): Rates and Routes of Transport of PCBs in the Environment. *Environmental Health Perspectives* 1, 21–38.
- Nováková, H., Vošahlíková, M., Pazlarová, J., Macková, M., Burkhard, J., Demnerová, K. (2002): PCB metabolism by *Pseudomonas* sp. P2. *International biodeterioration & biodegradation*, 50, 47–54.
- 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, 1545–1551.
- Novotný, Č., Vyas, B. R. M., Erbanova, P., Kubatova, A., Šašek, V. (1997): Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. *Folia microbiologica* 42, 136–140.
- Opperhulzen, A. Gobas, F. A. P. C., Van der Steen, J. M. D. (1988): Aqueous Solubility of Polychlorinated Biphenyls Related to Molecular Structure. *Environmental Science & Technology* 22, 638–646.
- Pal, D., Weber, J. B., Overcash, M. R. (1980): Fate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil-plant systems. *Residue Reviews* 74, 45–98.
- Pascall, M. A., Zabik, M. E., Zabik, M. J., Hernandez, R. J. (2005): Uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs) from an aqueous medium by polyethylene, polyvinyl chloride, and polystyrene films. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 164–169.
- Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A. A., Massacci, A. (2014): Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives. *Journal of hazardous materials* 278, 189–202.

- Pepe, M. G., Byrne, J. J. (1980): Adhesion-binding of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl to glass and plastic: a possible source of error for PCB analysis. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 25, 936–940.
- Pieper, D. H., Seeger, M. (2008): Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 15, 121–138.
- Plačková, M., Svobodová, K., Cajthaml, T. (2012): Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 71, 22–28.
- Pointing, S. (2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 57, 20–33.
- Purnomo, A. S., Mori, T., Putra, S. R., Kondo, R. (2013): Biotransformation of heptachlor and heptachlor epoxide by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 40–44.
- Quarantino, D., Fenice, M., Federici, F., D'Annibale, A. (2006): Mn-peroxidase production by *Panus tigrinus* CBS 577.79: response surface optimisation and bioreactor comparison. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 832–840.
- Quintana, J. B., Martínez, E., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Cela, R. (2003): Screening of Polychlorinated Biphenyls in Water Samples by Strategic Sample Composition-Solid Phase Extraction and Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Comparison of Different Strategies for Sample Composition. *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry* 83, 269–284.
- Quintana, J. B., Martínez, E., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Cela, R. (2003): Screening of Polychlorinated Biphenyls in Water Samples by Strategic Sample Composition-Solid Phase Extraction and Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Comparison of Different Strategies for Sample Composition. *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry* 83, 269–284.
- Rezek, J., Macek, T., Mackova, M., Triska, J., Ruzickova, K. (2008): Hydroxy-PCBs, methoxy-PCBs and hydroxy-methoxy-PCBs: metabolites of polychlorinated biphenyls formed in vitro by tobacco cells. *Environmental science & technology* 42, 5746–5751.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T., Kaye, S. (2013): Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. *Environmental science & technology* 47, 1646–1654.

- Sage, L., Pérignon, S., Faure, M., Gaignaire, C., Abdelghafour, M., Mehu, J., Geremia, R. A., Mouhamadou, B. (2014): Autochthonous ascomycetes in depollution of polychlorinated biphenyls contaminated soil and sediment. *Chemosphere* 110, 62–69.
- Senseman, S. A., Mueller, T. C., Riley, M. B., Wauchope, R. D., Clegg, C., Young, R. W., Southwick, L. M., Moye, H. A., Dumas, J. A., Mersie, W., J. D. Mattice, Leidy, R. B. (2003): Interlaboratory comparison of extraction efficiency of pesticides from surface and laboratory water using solid-phase extraction disks. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 3748–3752.
- Senthilkumar, S., Perumalsamy, M., Prabhu, H. J. (2014): Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. *Journal of Saudi Chemical Society* 18, 845–853.
- Schneider, E., Clark, D. S. (2013): Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 39, 1–13.
- Schultz, A., Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F. (2001): Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4377–4381.
- Sinkkonen, S., Paasivirta, J. (2000): Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* 40, 943–949.
- Smith, J. N., Lee, K., Gobeil, C., Macdonald, R. W. (2009): Natural rates of sediment containment of PAH, PCB and metal inventories in Sydney Harbour, Nova Scotia. *Science of the Total Environment* 407, 4858–4869.
- Sokol, R. C., Kwon, O. S., Bethoney, C. M., Rhee, G. Y. (1994): Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in St. Lawrence River sediments and variations in dechlorination characteristics. *Environmental science & technology* 28, 2054–2064.
- Song, E. Q., MA, X. Y., Tian, X. G., Liu, J., Liu, L. C., Hui, D., Song, Y. (2013): The effect of the structure of polychlorinated biphenyls on their hydroxylation, oxidation, and glutathionyl conjugation reactions. *Biomedical and Environmental Sciences* 26, 138–147.
- Stella, T. (2014): Bioremediation of persistent aromatic pollutants. Doktorská disertační práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze.
- Stella, T., Covino, S., Křesinová, Z., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Čvančarová, M., Cajthaml, T. (2013): Chlorobenzoic acid degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus*:

In vivo and in vitro mechanistic study-evidence for P-450 involvement in the transformation. *Journal of hazardous materials* 260, 975–983.

Svobodová, K., Plačková, M., Novotná, V., Cajthaml, T. (2009): Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in vitro yeast assays. *Science of the Total Environment* 407, 5921–5925.

Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Cajthaml, T., Baldrian, P. (2008): Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology* 43, 186–192.

Takamiya, M., Magan, N., Warner, P. J. (2008): Impact assessment of bisphenol A on lignin-modifying enzymes by basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of hazardous materials* 154, 33–37.

Taniyasu, S., Kannan, K., Holoubek, I., Ansorgova, A., Horii, Y., Hanari, N., Yamashita, N., Aldous, K. M. (2003): Isomer-specific analysis of chlorinated biphenyls, naphthalenes and dibenzofurans in Delor: polychlorinated biphenyl preparations from the former Czechoslovakia. *Environmental Pollution* 126, 169–178.

Thurston, C. F. (1994): The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19–26.

Tigini, V., Prigione, V., Di Toro, S., Fava, F., Varese, G. C. (2009): Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. *Microbial Cell Factories* 8:5.

Tillmann, S., Strömpl, C., Timmis, K. N., Abraham, W. R. (2005): Stable isotope probing reveals the dominant role of *Burkholderia* species in aerobic degradation of PCBs. *FEMS microbiology ecology* 52, 207–217.

Totevová, S., Prouza, M., Brenner, V., Demmerová, K. (1997): Bakteriální degradace PCB. *Chemické Listy* 91, 858–866.

Ubl, S., Scheringer, M., Stohl, A., Burkhardt, J. F., Hungerbühler, K. (2012): Primary source regions of polychlorinated biphenyls (PCBs) measured in the Arctic. *Atmospheric Environment* 62, 391–399.

UNEP Chemicals (1999): Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs. United Nations Environment Programme, Ženeva, Švýcarsko, vydání 1.

- US EPA (2003): Table of PCB Species by Congener Number. *U. S. Environmental Protection Agency*. Dostupné online z: <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/congenertable.pdf> [cit. 6. 7. 2015]
- Van Aken, B., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A. I., Naveau, H., Agathos, S. N. (1999): Transformation and mineralization of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation* 10, 83–91.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X., Liem, A. K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998): Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106, 775–792.
- van den Brink, H. J. M., van Gorcom, R. F. M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Punt, P. J. (1998): Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 23, 1–17.
- Vecchiato, M., Argiriadis, E., Zambon, S., Barbante, C., Toscano, G., Gambaro, A., Piazza, R. (2015): Persistent Organic Pollutants (POPs) in Antarctica: Occurrence in continental and coastal surface snow. *Microchemical Journal* 119, 75–82.
- Velzeboer, I., Kwadijk, C. J. A. F., Koelmans, A. A. (2014): Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes. *Environmental science & technology* 48, 4869–4876.
- Vrana, B., Dercova, K., Baláž, Š., Ševčíková, A. (1996): Effect of chlorobenzoates on the degradation of polychlorinated biphenyls (PCB) by *Pseudomonas stutzeri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 323–326.
- Vyas, B. R. M., Šašek, V., Matucha, M., Bubner, M. (1994): Degradation of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl by selected white rot fungi. *Chemosphere* 28, 1127–1134.
- Westbom, R., Thörneby, L., Zorita, S., Mathiasson, L., Björklund, E. (2004): Development of a solid-phase extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. *Journal of Chromatography A* 1033, 1–8.
- Westin, R. A. (1979): Polychlorinated biphenyls 1929-1979: Final report. *U.S. Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances*, EPA 560/6-79-004, 90 s.

- Wolska, L., Galer, K., Górecki, T., Namieśnik, J. (1999): Surface water preparation procedure for chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Talanta* 50, 985–991.
- Wolska, L., Rawa-Adkonis, M., Namieśnik, J. (2005): Determining PAHs and PCBs in aqueous samples: finding and evaluating sources of error. *Analytical and bioanalytical chemistry* 382, 1389–1397.
- Wong, D. W. (2009): Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology* 157, 174–209.
- Xiao, P., Mori, T., Kamei, I., Kiyota, H., Takagi, K., Kondo, R. (2011): Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*. *Chemosphere* 85, 218–224.
- Yeo, S., Kim, M. K., Choi, H. T. (2008): Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellosa*. *FEMS microbiology letters* 278, 72–77.
- Zachář, P., Novotný, Č., Vozňáková, Z., Matucha, M., Tesařová, E., Sýkora, D., Kubátová, A., Popl, M., Šášek, V. (1996): Physical factors negatively affecting evaluation of long-term biodegradation experiments of polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 33, 2411–2421.
- Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O., Wang, G. (2007): Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere* 66, 1057–1069.
- Zhao, Y. H., Ji, G. D., Cronin, M. T. D., Dearden, J. C. (1998): QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp. *Science of the total environment* 216, 205–215.
- Zheng, Q., Nizzetto, L., Mulder, M. D., Sáňka, O., Lammel, G., Lia, J., Bing, H., Liu, X., Jiang, Y., Luo, C., Zhang, G. (2014): Does an analysis of polychlorinated biphenyl (PCB) distribution in mountain soils across China reveal a latitudinal fractionation paradox? *Environmental Pollution* 195, 115–122.