

## Mykoremediace vybraných perzistentních organických polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů

certifikovaná metodika

Pavel Tlustoš a kol.



© Česká zemědělská univerzita v Praze  
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ  
165 21 Praha-Suchbátol  
<http://www.af.czu.cz>

Vydavatelství Česká zemědělská univerzita v Praze

ISBN 978-80-213-2764-1

Praha 2017

Certifikovaná metodika byla zpracována  
v rámci řešení výzkumného projektu TAČR č. TA04020329

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů



**Mykoremediace vybraných perzistentních organických  
polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub  
pěstovaných v substrátech založených  
na bázi lignocelulózních materiálů**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Pavel Tlustoš a kol.**

---

Certifikovaná metodika byla zpracována  
v rámci řešení výzkumného projektu TAČR č. TA04020329

# Mykoremediace vybraných perzistentních organických polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Dedikace: Ke zpracování certifikované metodiky bylo použito výsledků výzkumných aktivit realizovaných v rámci řešení výzkumného projektu TAČR č. TA04020329 „Výzkum a vývoj technologie výroby substrátů pro pěstování druhů jedlých a léčivých hub s využitím odpadních surovin a odpadního tepla z bioplynových stanic”.

## Kolektiv autorů:

Ing. Ivan Jablonský, CSc.<sup>2</sup>  
Ing. František Jelínek<sup>1</sup>  
Ing. Lukáš Kaplan, Ph.D.<sup>1</sup>  
Ing. Zdeněk Košnář<sup>1</sup>  
doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D.<sup>2</sup>  
prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.<sup>1</sup>

Česká zemědělská univerzita v Praze

<sup>1</sup> Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin

<sup>2</sup> Katedra zahradnictví

---

Mykoremediace vybraných perzistentních organických polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů

Pavel Tlustoš a kol.

Vydání první, 2017

Vydavatelství: Česká zemědělská univerzita v Praze

Tisk Powerprint s.r.o., Brandejsovo nám. 1219/1, 165 00 Praha Suchdol, [www.powerprint.cz](http://www.powerprint.cz)

165 21 Praha – Suchdol

Obálka: Mykoremediace půdy kontaminované PAU metodou ex situ pomocí substrátů prorostlých hlívou ústříčnou (*Pleurotus ostreatus*) s pěstováním kukuřice seté (*Zea mays*)

© Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, FAPPZ ČZU v Praze

Katedra zahradnictví, FAPPZ ČZU v Praze

Kamýčká 129, 160 00 Praha 6 - Suchdol

tel.: +420 224 382 736

<http://www.af.czu.cz>

ISBN 978-80-213-2764-1

## I. Cíl metodiky

---

Persistentní organické polutanty (dále jen POPs) patří k velmi rizikové skupině kontaminujících sloučenin, běžně se nacházejících v životním prostředí a hromadících se v půdě. Zde mohou negativně působit na všechny živé organizmy, z půdy mohou být transportovány do potravního řetězce a ohrožovat zdraví zvířat a lidí.

Hlavním cílem předkládané metodiky je zhodnotit účinnost substrátů vyrobených z upravených lignocelulózních materiálů s prorostlým myceliem hub hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm) a pohárovky obecné (*Crucibulum laeve* Huds.) na degradaci perzistentních organických polutantů přítomných v kontaminované půdě. Tato bioremediační metoda je označována jako mykoremediace. Jako zástupce POPs v půdě bylo vybráno 16 základních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), které jsou dle US EPA (United States Environmental Protection Agency) označovány za prioritní organické polutanty životního prostředí. Vyplozené substráty z hub jsou v rámci mykoremediace kontaminované půdy testovány společně s rostlinami kukuřice seté (*Zea mays* L.). Dalším cílem je poskytnout výrobcům a pěstitelům hub návod k přípravě substrátů pro pěstování vybraných druhů hub vhodných pro mykoremediace půdy a uvést ověřený postup na využití substrátů pro mykoremediace půdy kontaminované PAU. Metodika je aplikovatelná i jako bioremediační metoda *in situ* přímo na kontaminované zemědělské půdy. Metodika je vhodná pro společnosti zabývající se dekontaminací PAU v půdě a pro podniky, které kladou velký důraz na biologické, environmentálně šetrné a ekonomicky přijatelné způsoby odstranění těchto zdravotně rizikových a potenciálně karcinogenních látek ze zemědělské půdy.

## II. Vlastní popis metodiky

---

### 1. Úvod – mykoremediace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU)

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou všudypřítomné organické polutanty životního prostředí, především ovzduší, do kterého se dostávají zejména během nedokonalého spalování organické hmoty společně s emisemi dalších látek z řady zdrojů, jak uvádí Abdel-Shafy a Mansour (2015):

- a) antropogenní zdroje (elektrárny, teplárny, lokální topeniště, hutnictví a jiné).
- b) přírodní zdroje (vulkanická činnost, lesní a prérijní požáry, místa těžby fosilních paliv).
- c) ostatní zdroje (automobilová doprava, nedokonalá úprava potravin, tabákový kouř a jiné).

Emitované PAU jsou v prostředí vysoce perzistentní sloučeniny, které se vlivem suché a mokré atmosférické depozice dostávají do půdy a vody s jejich následnou

akumulací v říčních a rybníčních sedimentech nebo biotě včetně člověka (Wei et al., 2015).

U mnohých organismů mohou PAU vyvolávat karcinogenní, mutagenní, teratogenní nebo embryotoxické účinky. Naftalen je z PAU nejvíce toxický a benzo[a]pyren je prokázáný karcinogen. Další možné karcinogeny jsou benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, indeno[1,2,3-cd]pyren a dibenz[a,h]antracen (Chen a Liao, 2006).

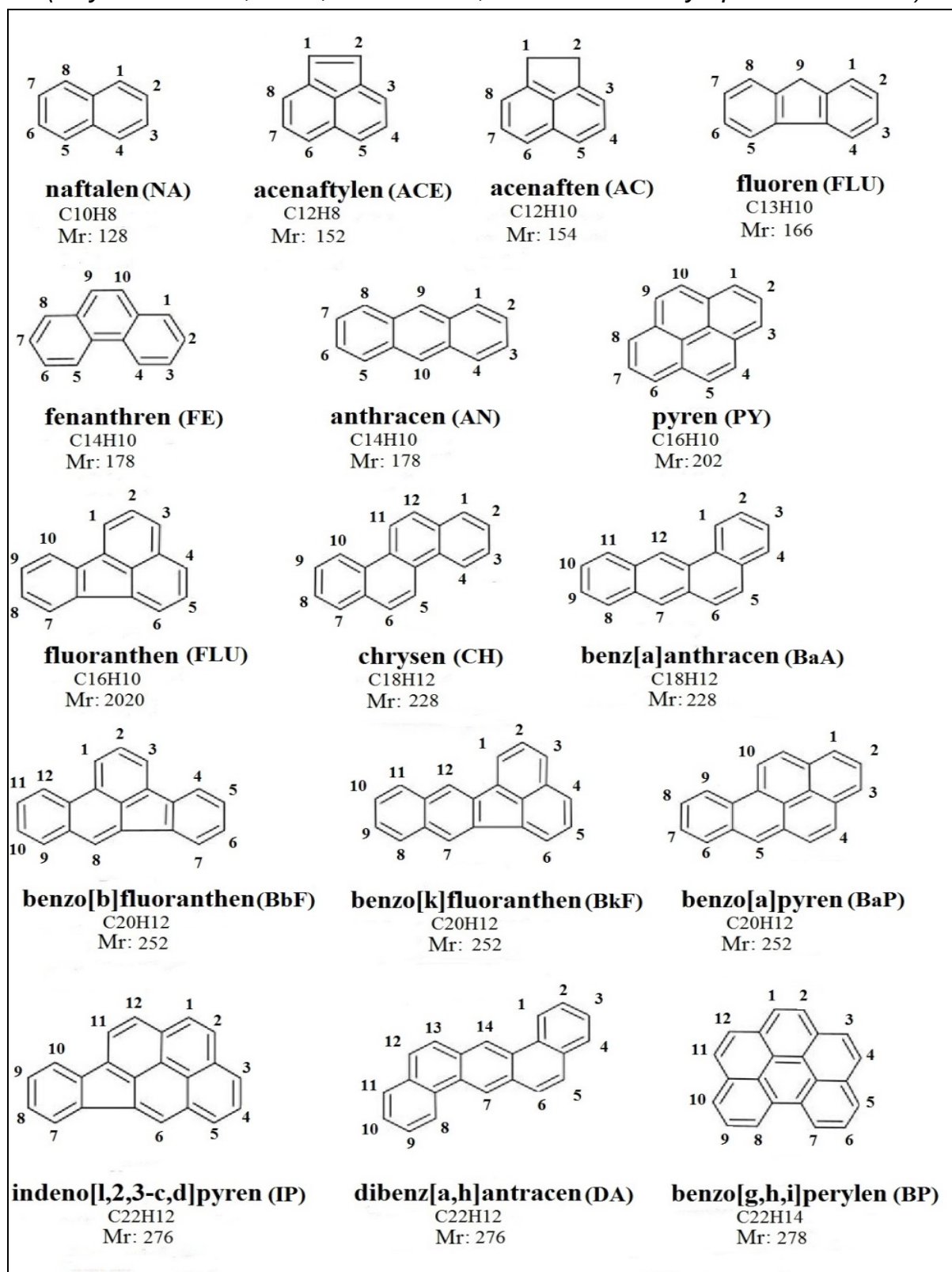
Existují stovky sloučenin a derivátů PAU, proto US EPA zavedla seznam 16 základních PAU označovaných jako prioritní polutanty životního prostředí, které se skládají ze dvou až šesti aromatických kondenzovaných benzenových jader (cyklů). Chemické struktury, jejich systematické názvy a zkratky, sumární vzorce a relativní molekulové hmotnosti všech 16 PAU jsou uvedeny na *Obr. 1*. Na základě molekulové hmotnosti, od které se odvíjí většina fyzikálně – chemických vlastností PAU, můžeme je dle Eisler (2000) rozdělit do skupin na nízkomolekulární PAU (NM PAU, zahrnující NA, ACE, AC, FL, FE a AN), středně-molekulární PAU (SM PAU, zahrnující FLU, PY, BaA a CH) a vysokomolekulární PAU (VM PAU, zahrnující BbF, BkF, BaP, IP, DA a BP). Z důvodu velmi nízké rozpustnosti ve vodě jsou PAU považovány za látky lipofilní, které mají vysokou afinitu k organické hmotě a významně se tak adsorbují na organickou hmotu v půdě a sedimentech (Bakker et al., 2000).

Ke kontaminaci zemědělské půdy PAU dochází atmosférickou depozicí nebo aplikacemi materiálů obsahující PAU, především čistírenských kalů a rybníčních sedimentů na zemědělskou půdu (Vácha et al., 2011). Limitní preventivní obsah PAU v zemědělských půdách ČR byl stanoven na 1000 µg/kg suché hmotnosti půdy (dále jen s.h.) dle Vyhlášky č. 153/2016 Sb., o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu (dále jen Vyhláška č. 153/2016 Sb.). Na základě monitorování obsahu PAU zemědělských půd ČR, bylo zjištěno, že nejvíce kontaminované půdy jsou v Ústeckém a Severomoravském kraji (Vácha et al., 2015).

Z důvodů zachování trvale udržitelného rozvoje a nenarušeného životního prostředí, které představuje jednu z nejvyšších hodnot lidské společnosti, je třeba hledat způsoby, jak tyto polutanty odstranit z životního prostředí s ohledem na udržení zdraví lidí včetně bioty (Vidali, 2001).

Bioremediace představují účinné, environmentálně šetrné a ekonomicky výhodné postupy vedoucí k degradaci nebo dekontaminaci polutantů z jednotlivých složek životního prostředí, především půd, pomocí cíleného působení vybraných druhů mikroorganismů – bakterií, hub, plísní, řas, rostlin nebo živočichů. Bioremediace probíhá za podpory autochtonních společenstev mikroorganismů (bakterií, hub nebo jiných) přirozeně se vyskytujících v půdě (Adams et al., 2015).

Obr. 1: Chemické struktury, systematické názvy, sumární vzorce a relativní molekulové hmotnosti 16 US EPA PAU  
(Anyakora a kol., 2005; Atkins et al., 2010. Do češtiny upravil Z. Košnář)



Mezi významné metody bioremediace (biodegradace) PAU v životním prostředí patří:

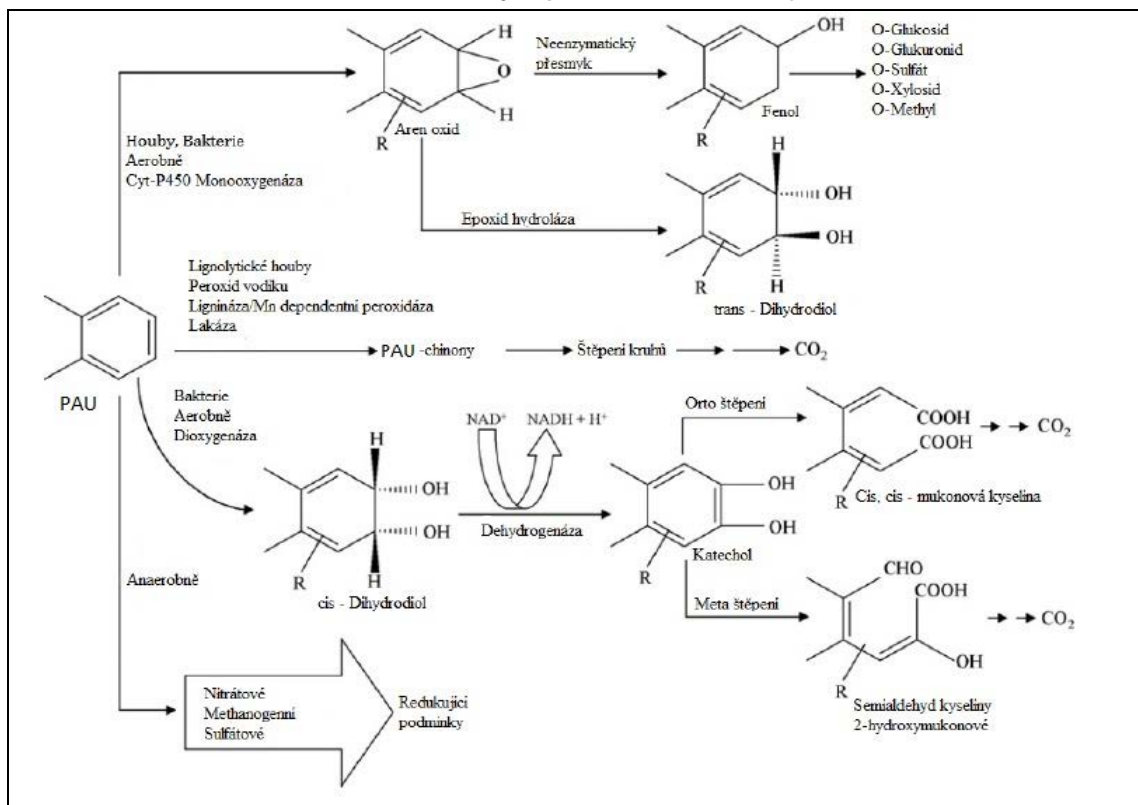
- fytoremediace, která dle Pueke a Rennenberg (2005) spočívá v cílené aplikaci vybraných druhů rostlin schopných biodegradace PAU v půdě.
- bioaugmentace, která dle Winquist et al. (2014) spočívá v cílené aplikaci specifických kmenů bakterií schopných biodegradace PAU v půdě.
- mykoremediace, která dle Agnello et al. (2016) představuje cílené aplikace specifických kmenů hub nebo plísní schopných biodegradace PAU v půdě.

Mykoremediace jsou velice perspektivní a účinné metody využívající cílené aplikace hub „bílé hniloby“ (z angličtiny „white rot fungi“), které produkují ligninolytické enzymy schopné biodegradovat PAU (Agnello et al., 2016).

Houby představují rozsáhlou skupinu eukaryotních heterotrofních organismů, které přijímají živiny ve formě organických látek. Bylo prokázáno, že některé druhy hub jsou schopné oxidovat PAU (Cerniglia, 1993).

Obr. 2 uvádí obecné schéma biodegradace PAU pomocí bakterií, neligninolytických a ligninolytických hub. Transformace PAU pomocí hub se rozděluje na dva základní metabolismy: neligninolytický a ligninolytický, ve kterých dochází k detoxifikaci PAU pomocí neligninolytických a ligninolytických enzymů (Haritash a Kaushik, 2009).

**Obr. 2: Schéma aerobní a anaerobní biodegradace PAU pomocí bakterií, ligninolytických a neligninolytických hub (Haritash a Kaushik, 2009).  
Do češtiny upravil Z. Košnář**



Většina neligninolytických hub (např. *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans*, *Chrysosporium pannorum*), které nerostou na dřevě, produkují neligninolytický enzym cytochrom P-450 monooxygenázu schopný oxidace benzenových jader bez jejich rozštěpení.

Na druhé straně, ligninolytické houby (např. *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*), které rostou na dřevě, jsou schopny produkce ligninolytických enzymů peroxidázy a lakázy schopných oxidace benzenových jader s jejich následným rozštěpením (Bamforth a Singleton, 2005). Rozsáhlý přehled hub využívaných v mykoremediacích uvádí Fernández-Luqueño et al. (2011).

Metabolismus PAU u neligninolytických druhů hub začíná oxidací aromatického jádra enzymem cytochrom P-450 monooxygenázou, kdy vznikají arenoxidy PAU, z kterých neenzymatickým přesmykem vznikají fenoly PAU. Tyto sloučeniny slouží jako substráty pro následné reakce za vzniku konjugátů PAU (např. ortho-glukoronidy, glykosidy nebo sulfáty) s menší toxicitou a vyšší rozpustností. V případě působení epoxid hydroláz na vzniklé arenoxidy PAU vznikají trans-dihydrodioly PAU jako konečné produkty degradace (Haritash a Kaushik, 2009). U ligninolytických hub se rozlišují dva druhy základních enzymů: peroxidázy a lakázy. Tuor et al. (2005) dále uvádějí, že mezi nejzkoumanější extracelulární ligninolytické enzymy schopné detoxifikovat PAU patří peroxidázy, které v závislosti na typu rozkladu substrátu můžeme rozdělit na lignin peroxidázu a mangan-dependentní peroxidázu. Bylo prokázáno, že fenol-oxidázové enzymy, obecně lakázy, jsou také schopné oxidovat PAU. Vlivem činnosti ligninolytických enzymů dochází k postupné oxidaci PAU za vzniku chinonů PAU s následným štěpením benzenových jader za vzniku karboxylových kyselin. Působením ligninolytických enzymů může docházet až k úplnému rozkladu PAU na konečné produkty CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O.

Mnoho autorů uvádí, že využití hub bílé hniloby, zejména houby *Pleurotus ostreatus* nebo jiných zástupců basidiomycet (rody *Irpex*, *Trametes*, *Phanerochaete*, *Ganoderma*) jsou velice perspektivní pro jejich možné využití v mykoremediační praxi (Canet et al., 2001; Li et al., 2012; García-Delgado et al., 2015).

## **2. Mykoremediace půdy kontaminované PAU pomocí substrátu na bázi dřevní štěpky kolonizovaného houbou *Pleurotus ostreatus***

### **2.1 Metodický přístup**

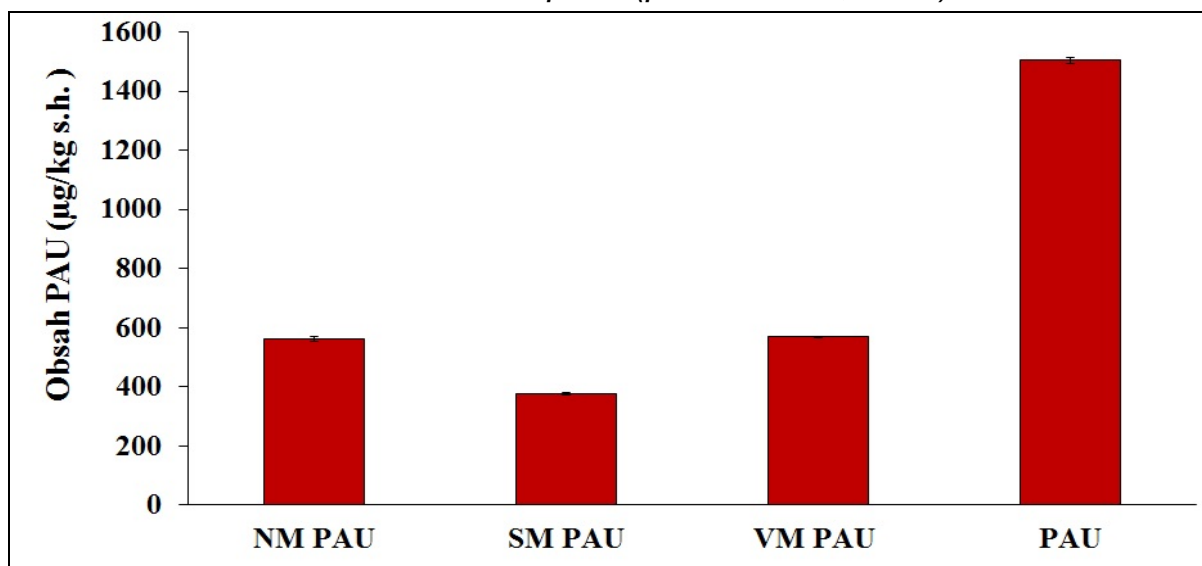
Předmětem studia bylo ověření různých druhů substrátů vyrobených z dřevní jabloňové štěpky po pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm.) na mykoremediace půdy kontaminované polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAU). Houbové substráty byly testovány v půdě kontaminované PAU jak



samostatně, tak i v kombinaci s rostlinami kukuřice seté (*Zea mays* L. var. colisee) s cílem ověřit jejich vliv na změnu obsahu PAU v půdě v nádobových experimentech.

Půdní vzorky byly odebrány z orniční vrstvy (hloubka 0 – 20 cm) zemědělsky využívaného pole (49°33'16" N, 15°21'2" E) nedaleko města Humpolec (kraj Vysočina, ČR). Půda pro nádobové experimenty byla před použitím vysušena na vzduchu, homogenizována a přeseta přes 5 mm síto. Základní fyzikálně – chemické vlastnosti odebrané půdy (kambizem modální) shrnuje *Tab. 1*. Pro experimenty byla využita orná půda s obsahem PAU pod mezí detekce. Pro následné experimenty byla půda kontaminována standardy 16 základních US EPA PAU o koncentraci 2000 µg/ml v methylchloridu pro každý jednotlivý PAU (Restek, USA). Dávka 160,1 µl roztoku standardu PAU o koncentraci 2000 µg/ml byla aplikována rozpuštěná v hexanu (100 ml) tak, aby obsah PAU dle Váchy (2015) reflektoval obsah PAU v kontaminovaných zemědělských půdách ČR. Stanovená výchozí průměrná suma všech PAU byla  $1506,5 \pm 34,0$  µg/kg suché zeminy (*Graf 1*).

*Graf 1: Vstupní obsah jednotlivých frakcí PAU a celkový obsah PAU v kontaminované půdě (průměr ± SD; n = 8)*



*NM, SM a VM PAU = nízkomolekulární, středněmolekulární a vysokomolekulární polycyklické aromatické uhlovodíky*

Na mykoremediační ošetření půd kontaminovaných PAU byly využity cíleně vyrobené substráty z jabloňové štěpky o různé velikostní frakci, které byly prorostlé myceliem hlívy. Frakce štěpky o délce 10 – 30 mm byla nadrcena z jednoletých větví štěpkovačem (Vermeer BC160XL, Transtechnik CS, ČR). Frakci štěpky o délce 30 – 50 mm, tvořily odpadní kusy dřeva vzniklého při drcení celých jabloní včetně kořenů. Před osázením sadbou hlívy byly oba typy štěpky zality horkou vodou (cca 90 °C) a ponechány v místnosti s teplotou 30 °C k následné inkubaci po dobu 2 dnů. Po skončení teplotního procesu byla drť štěpky zaočkována sadbou hlívy důkladným promícháním s 2 % (w/w) sadby hlívy. Substrát prorůstal myceliem hlívy po dobu 6 týdnů.

Všechny frakce dřevní štěpky uspokojivě prorostly podhoubím hlívy, čímž se prokázalo, že jsou všechny typy nadrceného materiálu vhodné k dalšímu použití.

Tab. 1: Základní fyzikálně – chemické půdní charakteristiky zeminy z Humpolce

Charakteristika	Hodnota
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,31
EC (mS/cm)	0,14
KVK (mmol <sub>(+)</sub> /kg)	158
C <sub>tot</sub> (g/kg)	18,3
N <sub>tot</sub> (g/kg)	1,35
C/N	13,7
P <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	0,08
K <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	0,19
Ca <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	1,58
Mg <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	0,15
P <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	0,90
K <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	9,63
Ca <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	1,83
Mg <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	8,47

V následném experimentu byly využity celkem tři druhy hlívočných substrátů odvozených dle využití velikostní frakce štěpky:

- a) S1: substrát z frakce 10 – 30 mm,
- b) S2: substrát z frakce 30 – 50 mm
- c) S3: směs substrátů S1 a S2 v poměru 1:1 (w/w).

Obr. 3: Substrát ze štěpky frakce 10 – 30 mm s viditelně prorostlým myceliem hlívy



Obr. 4: Substrát ze štěpky frakce 30 – 50 mm s viditelně prorostlým myceliem hlívy



Nádobový experiment byl založen ve venkovní vegetační hale Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin (KAVR), FAPPZ, ČZU v Praze. Při založení pokusu bylo do 6,0 l plastových nádob (h: 20,5 cm a Ø: 24,0 cm) naváženo 5,0 kg zeminy kontaminované PAU smíchané s hnojivým roztokem (0,5 g N ve formě  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,16 g P a 0,4 g K ve formě  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) a následně smíchané s 5 % (w/w) prorostlého substrátu ( $C_{\text{tot}} = 44,9 \%$ ;  $N_{\text{tot}} = 1,02 \%$ ) dle variant experimentu uvedených v Tab. 2.

Tab. 2: Schéma a popis variant nádobového experimentu na mykoremediaci zeminy kontaminované standardy PAU pomocí substrátů prorostlých hlívou

Varianta	Popis složení
KZ	zemina + PAU bez přidavku substrátu
KZ+S1	zemina + PAU s přidavkem substrátu S1 (frakce 10 – 30 mm)
KZ+S2	zemina + PAU s přidavkem substrátu S2 (frakce 30 – 50 mm)
KZ+S3	zemina + PAU s přidavkem substrátu S3 (směs S1 a S2 – 1:1 (w/w))
KZ+R	zemina + PAU bez přidavku substrátu + rostliny
KZ+S1+R	zemina + PAU s přidavkem substrátu S1 (frakce 10 – 30 mm) + rostliny
KZ+S2+R	zemina + PAU s přidavkem substrátu S2 (frakce 30 – 50 mm) + rostliny
KZ+S3+R	zemina + PAU s přidavkem substrátu S3 (směs S1 a S2 – 1:1 (w/w)) + rostliny

V případě variant s rostlinami bylo do každé nádoby zaseto pět semen kukuřice (osivo dodané od KWS, SRN) a po 15 dnech růstu rostlin byl jejich počet zredukován na tři. Nádoby byly během průběhu experimentu pravidelně zalévány deionizovanou vodou tak, aby byla zachována cca 60% nasycenost půdních pórů vodou. Varianty pokusu s rostlinami jsou zachyceny na Obr. 5. Povrch půdy byl pravidelně kypřen a odplevelován pro zajištění optimálního růstu rostlin.

Obr. 5: Průběh nádobového experimentu s kukuřicí pěstovanou na půdě kontaminované PAU s přidavky hlívkových substrátů ze štěpky různé velikosti (60 dnů od zasetí)



Experiment byl ukončen po 120 dnech. Sklizená kukuřice byla rozdělena na kořen a nadzemní biomasu (stonek s listy). Po sklizni rostlin byly také z celého půdního profilu odebrány vzorky zemin pro následné stanovení celkového obsahu PAU v půdě včetně obsahu frakcí nízkomolekulárních, středně a vysokomolekulárních PAU (NM, SM a VM PAU).

Obsah PAU ve vzorcích zemin a rostlin byl stanoven na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC/MS, Agilent, USA). Pro vyhodnocení výsledků byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s následným *post-hoc* Tukeyeho testem na hladině významnosti  $P < 0,05$  (Statistica 12, StatSoft, USA). Mezi variantami označenými rozdílnými malými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly.

## 2.2 Vliv substrátů a rostlin na obsah PAU v půdě

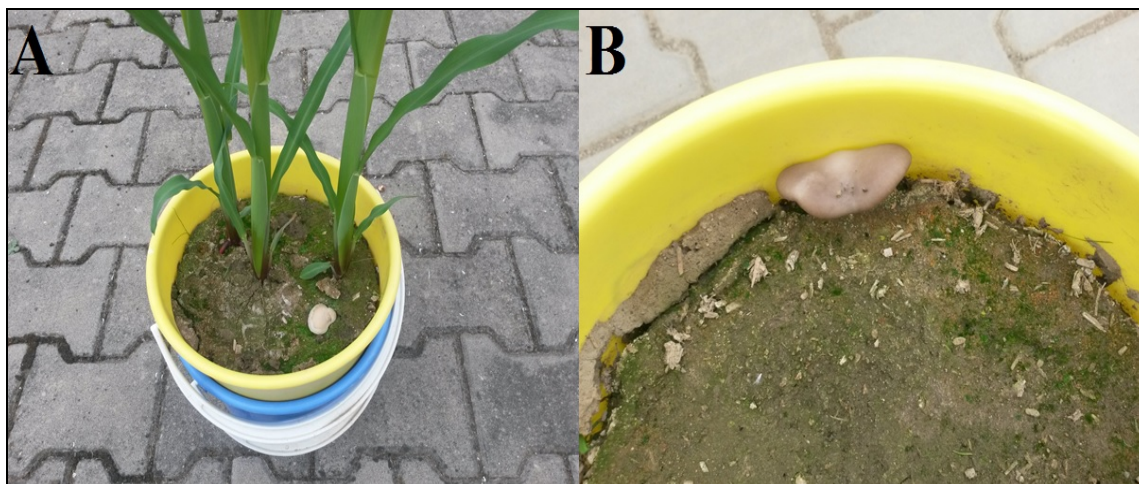
Po ukončení experimentu byly sledovány změny obsahu PAU v půdě jednotlivých variant. *Tab. 2* přehledně uvádí procentuální pokles zkoumaných frakcí PAU v půdě po 120 dnech trvání experimentu. Ze získaných výsledků bylo zřejmé, že v případě aplikace hlívkou prorostlého substrátu S1 (frakce 10 – 30 mm) do půdy kontaminované PAU bez rostlin (varianta KZ+S1 viz *Obr. 6: A*) došlo k průkaznému snížení obsahu jednotlivých frakcí PAU (NM, SM a VM) a v případě celkového obsahu sumy 16 PAU se jednalo o  $36,0 \pm 1,3$  % snížení v půdě. Rozdíl mezi vlivem substrátu S2 (frakce 30 – 50 mm) a S3 (směs S1 a S2) na pokles obsahu PAU v půdě nebyl průkazný, avšak v obou případech došlo k průkaznému snížení obsahu PAU ve srovnání s kontrolní variantou (KZ). Podobný trend byl pozorován i v případě variant s rostlinami. Vliv rostlin kukuřice na zvýšení účinnosti degradace PAU v půdě

(varianta KZ+S1+R viz *Obr. 6: B*) ve srovnání s variantou bez rostlin (KZ+S1) nebyl zřejmý, avšak v obou případech došlo ke snížení obsahu PAU pod limitní preventivní hodnotu 1000 µg/kg s.h. zeminy danou Vyhláškou č. 153/2016 Sb.

*Tab. 2: Snížení obsahu frakcí NM, SM, VM PAU a celkových PAU (%; průměr ± SD; n = 4) z celkového obsahu PAU v půdě*

	Půda bez rostlin (%)			
	KZ	KZ+S1	KZ+S2	KZ+S3
NM PAU	2,5 ± 0,6c	14,7 ± 1,3a	8,4 ± 0,7b	9,3 ± 0,4b
SM PAU	1,5 ± 0,4c	10,8 ± 2,2a	5,3 ± 1,3b	5,3 ± 0,2b
VM PAU	1,4 ± 0,5c	10,5 ± 0,5a	5,9 ± 1,4b	5,4 ± 0,7b
Celkem PAU	5,4 ± 0,3c	36,0 ± 1,3a	19,6 ± 2,3b	20,0 ± 0,8b
	Půda s rostlinami (%)			
	KZ+R	KZ+S1+R	KZ+S2+R	KZ+S3+R
NM PAU	2,7 ± 0,7c	14,6 ± 1,8a	9,3 ± 0,5b	9,8 ± 0,5b
SM PAU	1,3 ± 0,4c	10,4 ± 1,2a	6,9 ± 1,5b	6,4 ± 1,6b
VM PAU	1,6 ± 0,5c	11,2 ± 0,4a	5,1 ± 1,4b	5,1 ± 0,5b
Celkem PAU	5,6 ± 1,4c	36,2 ± 2,5a	21,3 ± 1,8b	21,3 ± 1,6b

*Obr. 6: A) Mykoremediace PAU v půdě s rostlinami a s přidavkem hlíivového substrátu (frakce 10 – 30 mm), B) Mykoremediace PAU v půdě s přidavkem hlíivového substrátu (frakce 10 – 30 mm) bez rostlin*



### *2.3 Sledování vlivu PAU v půdě po aplikaci substrátů na růst a výnos rostlin*

V průběhu nádobového experimentu byla po dobu 120 dnů pravidelně každých 15 dní zaznamenávána výška rostlin kukuřice v rámci jednotlivých variant. Ze získaných hodnot uvedených v *Tab. 3.* bylo zjištěno, že testované přídatky hlíivových substrátu neměly vliv na růst rostlin během vegetace. Po sklizni rostlin byly také sledovány výnosy sušiny nadzemní biomasy a kořenů kukuřice, které jsou uvedeny v *Tab. 4.* Testované přídatky PAU negativně neovlivnily výnosy sušiny zkoumaných částí rostlin kukuřice.

Tab. 3. Výška (cm; průměr ± SD; n = 4) rostlin kukuřice během 120 denního vegetačního experimentu

Dny	KZ+R	KZ+S1+R	KZ+S2+R	KZ+S3+R
15	33,5 ± 5,2a	27,5 ± 7,0a	29,0 ± 6,1a	31,3 ± 2,2a
30	73,8 ± 9,2a	69,0 ± 11,6a	70,3 ± 9,0a	69,8 ± 4,0a
45	97,0 ± 6,7a	103,8 ± 3,8a	105,0 ± 6,4a	92,5 ± 11,2a
60	136,5 ± 11,2a	126,8 ± 13,0a	124,5 ± 11,6a	119,5 ± 11,4a
75	155,5 ± 9,7a	144,3 ± 5,6a	146,0 ± 3,7a	139,8 ± 10,8a
90	193,3 ± 5,9a	194,0 ± 7,3a	196,5 ± 9,3a	189,0 ± 11,3a
105	195,5 ± 4,9a	194,8 ± 6,6a	197,5 ± 7,2a	191,3 ± 7,6a
120	196,0 ± 5,4a	194,8 ± 4,5a	197,8 ± 5,6a	194,0 ± 6,9a

Tab. 4: Výnos sušiny (g/nádoba; průměr ± SD; n = 4) nadzemní biomasy a kořenů kukuřice po sklizni 120 denního vegetačního experimentu

Část rostliny	KZ+R	KZ+S1+R	KZ+S2+R	KZ+S3+R
Nadzemní biomasa	111,8 ± 11,6a	103,4 ± 2,9a	105,9 ± 6,1a	101,7 ± 7,6a
Kořeny	16,8 ± 3,1a	17,4 ± 2,5a	15,7 ± 2,0a	14,6 ± 1,9a

#### 2.4 Vliv substrátů a pěstovaných rostlin na příjem PAU z půdy

V rámci vegetačního experimentu byl sledován vliv houbových substrátů na příjem PAU z půdy kontaminované PAU. Výsledky zastoupení jednotlivých frakcí PAU (%) v kořenové části kukuřice shrnuje Tab. 5. V případě aplikace substrátu S1 (frakce 10 – 30 mm) byla zaznamenána nejvyšší schopnost extrakce PAU z půdy do kořenů ( $119,9 \pm 6,7 \mu\text{g/kg s.h.}$ ). Schopnost extrakce PAU z půdy rostlinou neměla vliv na celkový pokles obsahu PAU v půdě ve srovnání s variantami, které byly bez rostlin. V nadzemní biomase byly sledované obsahy PAU pod mezí detekce. Z toho vyplývá, že v kořenech dochází k akumulaci PAU bez následné degradace nebo dalšího pohybu rostlinou.

Tab. 5: Obsah NM, SM, VM PAU a sumy 16 PAU ( $\mu\text{g/kg s.h.}$ ; průměr ± SD; n = 4) v kořenech kukuřice sklizené po 120 dnech trvání experimentu na mykoremediace

Dny	KZ+R	KZ+S1+R	KZ+S2+R	KZ+S3+R
NM PAU	n.s. <sup>1</sup>	60,7 ± 8,1a	35,4 ± 5,7b	35,9 ± 8,5b
SM PAU	n.s.	40,4 ± 5,6a	20,4 ± 3,0b	17,2 ± 2,7b
VM PAU	n.s.	18,8 ± 2,4	n.s.	n.s.
PAU	n.s.	119,9 ± 6,7a	65,2 ± 4,4b	69,1 ± 10,7b

<sup>1</sup>n.s.: nebylo stanoveno

### 3. Mykoremediace půdy kontaminované PAU pomocí substrátu na bázi obilného zrna kolonizovaného houbou *Crucibulum laeve*

#### 3.1 Metodický přístup

Předmětem dalšího studia bylo ověření využití substrátů na bázi obilných zrn pro rostlých myceliem pohárovky obecné (*Crucibulum laeve* Huds.) při mykoremediaci půdy kontaminované PAU. Tyto houbové substráty byly aplikovány v kontaminované půdě jak samostatně, tak i v kombinaci s rostlinami kukuřice seté (*Zea mays* L. var. *colisee*) za účelem ověření zvýšení mykoremediační účinnosti houbových substrátů během nádobových experimentů.

Půdní vzorky byly odebrány z orniční vrstvy (hloubka 0 – 20 cm) zemědělsky využívaného pole (49°50'08" N; 18°17'33" E) nedaleko řeky Olše na okraji města Ostravy (Moravskoslezský kraj, ČR). Tato oblast je dle Váchy (2015) nechvalně známá z důvodu výskytu zemědělských půd kontaminovaných PAU, jejichž obsah se v půdách v posledních letech neustále zvyšuje, především díky jejich vysoké akumulaci a perzistenci v půdě. Odebraná půda pro nádobové experimenty byla před použitím vysušena na vzduchu, homogenizována a přeseta přes 5 mm síto. Základní fyzikálně – chemické vlastnosti odebrané půdy (fluvizem modální) shrnuje *Tab. 6*.

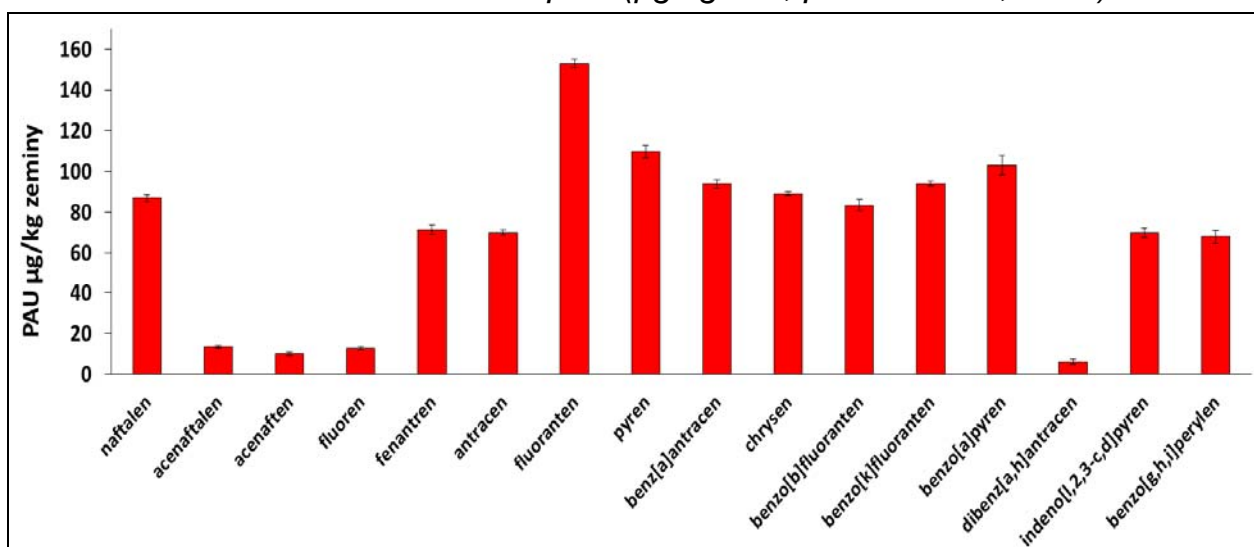
*Tab. 6: Základní fyzikálně – chemické půdní charakteristiky zeminy z Ostravy*

Charakteristika	Hodnota
pH (CaCl <sub>2</sub> )	7,5
EC (mS/cm)	0,13
KVK (mmol <sub>(+)</sub> /kg)	76
C <sub>tot</sub> (g/kg)	36,7
N <sub>tot</sub> (g/kg)	2,9
C/N	12,7
P <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	0,08
K <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	0,11
Ca <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	1,54
Mg <sub>Mehlich III</sub> (g/kg)	0,12
P <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	1,37
K <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	7,34
Ca <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	1,75
Mg <sub>pseudotot</sub> (g/kg)	5,42

V odebrané půdě pro následné experimenty byl stanoven vstupní celkový obsah PAU a obsah individuálních 16 US EPA PAU, které jsou uvedeny v *Grafu 2*. Výchozí průměrná suma všech PAU byla stanovena v hodnotě 1132,2 ± 20,8 µg/kg s.h. (n = 4). Dle vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 153/2016 Sb., kterou se mě-

ní některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu, je stanoven limit celkové sumy PAU v hodnotě 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h. zeminy. Z celkového obsahu sumy 16 PAU převažovala suma VM PAU ve výši  $423,0 \pm 13,2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h. zeminy a suma SM PAU byla  $445,7 \pm 7,5$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h. zeminy. Dále suma NM PAU dosahovala  $264,3 \pm 4,4$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h. zeminy.

Graf 2: Vstupní obsah 16 individuálních US EPA PAU v kontaminované půdě odebrané z ostravského pole ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h.; průměr  $\pm$  SD;  $n = 8$ )

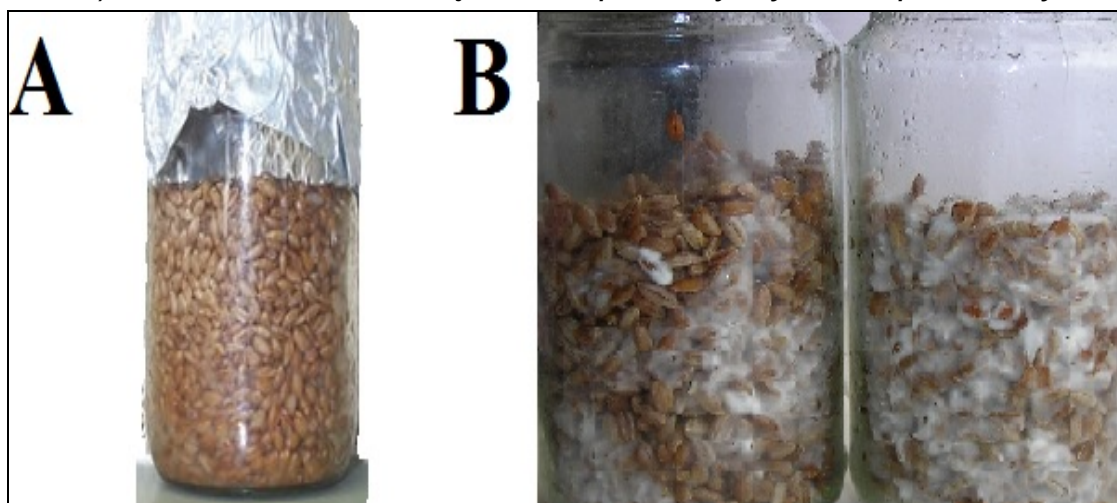


Na mykoremediace půdy kontaminované PAU byly využity substráty prorostlé myceliem pohárovky obecné (*Crucibulum leave*). Pohárovka obecná byla zakoupena od německé společnosti Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ 8451). Zakoupené kmeny hub byly před použitím uskladněny v klimaboxu při 4 °C a před-kultivovány při 24 °C na agaru obsahujícím 2 % sladový extrakt po dobu dvou týdnů k dosažení čerstvého inokula.

Jako vhodný substrát pro přípravu inokula pohárovky bylo vybráno zrno ječmene. Před vlastní inokulací substrátu bylo 250 g zrna ječmene přelito 150 mL destilované vody v 1 L skleněných nádobách a zakryto hliníkovou fólií (*Obr. 7: A*). Následně bylo zrno sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 45 minut. Substrát na bázi zrna ječmene byl následně inokulován 10 mL suspenze vytvořené ze čtyř bločků agaru prorostlého myceliem houby homogenizované v 80 mL sterilní vody (55 % v/w). Mycelium houby prorůstalo substrátem po dobu 4 týdnů. Na *Obr. 7: B* jsou uvedeny substráty prorostlé myceliem pohárovky, které byly následně využity na mykoremediace kontaminované půdy.



Obr. 7: A) Substrát na bázi zrna ječmene před inokulací,  
 B) Substrát na bázi zrna ječmene prorostlý mycelií pohárkovky



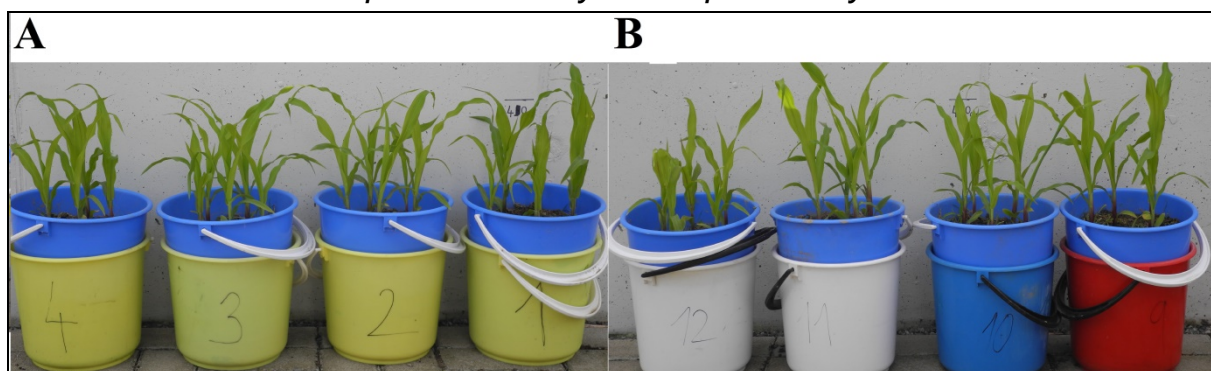
Nádobový experiment byl založen ve venkovní vegetační hale Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin (KAVR), FAPPZ, ČZU v Praze vybavené automatizovanou zatahovací střešou chránící rostliny proti vodním srážkám a nadměrnému slunečnímu svitu. Při založení experimentu bylo do 6,0 l plastových nádob (h: 20,5 cm a Ø: 24,0 cm) naváženo 5,0 kg zeminy kontaminované PAU smíchané s hnojivým roztokem (0,5 g N ve formě  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,16 g P a 0,4 g K ve formě  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) a následně smíchané s 3,5 % (w/w) prorostlého substrátu dle variant experimentu uvedených v *Tab. 7*.

Tab. 7: Schéma a popis variant nádobového experimentu na mykoremediaci zeminy kontaminované standardy PAU pomocí substrátů prorostlých pohárkovkou

Varianta	Popis složení
KZ	kontaminovaná zemina bez přídavku substrátu
KZ+S	kontaminovaná zemina s přídavkem substrátu
KZ+R	kontaminovaná zemina bez přídavku substrátu s rostlinami
KZ+S+R	kontaminovaná zemina s přídavkem substrátu a s rostlinami

V případě variant s rostlinami bylo do každé nádoby zaseto pět semen kukuřice (osivo dodané od KWS, SRN) a po 15 dnech růstu rostlin byl jejich počet zredukován na tři. Nádoby byly během průběhu experimentu pravidelně zalévány deionizovanou vodou tak, aby byla zachována cca 60% nasycenost půdních pór vodou. Průběh vegetace rostlin po prvních 15 dnech růstu je zachycen na *Obr. 8*. V případě nutnosti byl povrch půdy pravidelně manuálně kypřen a odplevelován pro zajištění optimálního růstu rostlin.

Obr. 8: A) Kukuřice pěstovaná na kontaminované půdě bez přídavku substrátu, B) Kukuřice pěstovaná na kontaminované půdě s přídavkem substrátu prorostlého myceliem pohárkovky



Experiment byl ukončen po 180 dnech. Sklizená kukuřice byla po 120 dnech rozdělena na kořen a nadzemní biomasu (stonek s listy). Po sklizni rostlin byly také z celého půdního profilu odebrány vzorky zemin pro následné stanovení celkového obsahu PAU v půdě včetně obsahu frakce nízkomolekulárních, středně a vysokomolekulárních PAU (dále jen NM, SM a VM PAU).

Obsah PAU ve vzorcích zemin a rostlin byl stanoven na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC/MS, Agilent, USA). Pro vyhodnocení výsledků byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s následným *post-hoc* Tukeyeho testem na hladině významnosti  $P < 0,05$  (Statistica 12, StatSoft, USA). Mezi variantami označenými rozdílnými malými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly.

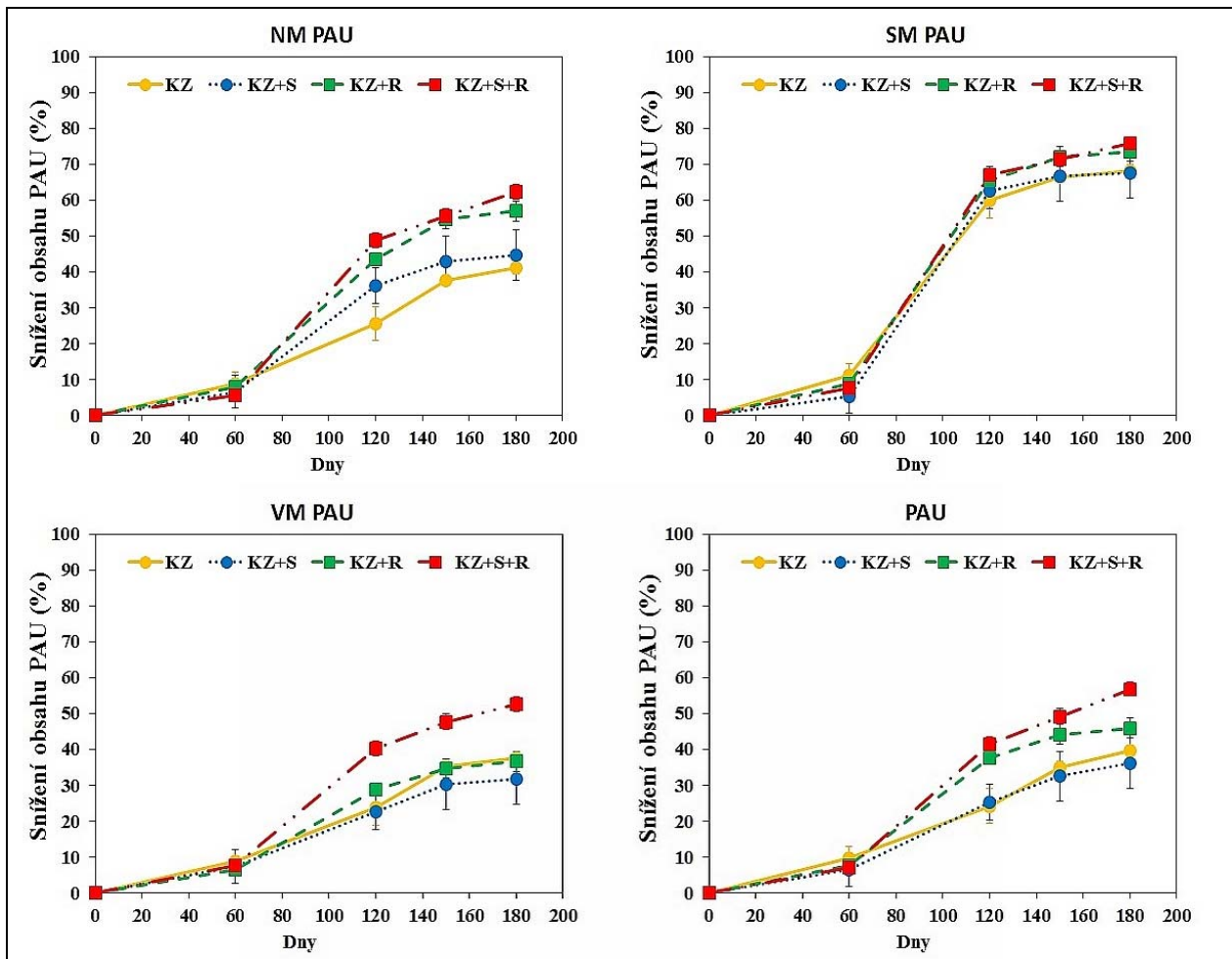
### 3.2 Vliv substrátů a rostlin na obsah PAU v půdě

V Grafu 3 jsou uvedeny procentuální poklesy obsahu frakcí nízkomolekulárních PAU (NM PAU), středněmolekulárních PAU (PAU), vysokomolekulárních PAU (VM PAU) a také celkových PAU v půdě jednotlivých variant odebíraných v průběhu mykoremediačního experimentu po 60, 120, 150 a 180 dnech.

Ze získaných výsledků analýzy PAU po ukončení experimentu bylo zřejmé, že v případě aplikace substrátu prorostlého pohárkovkou (*C. leucae*) do kontaminované půdy osázené rostlinami kukuřice (varianta KZ+S+R), došlo ke statisticky průkaznému snížení obsahu NM PAU o 62,3 % (171,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h.) ve srovnání s ostatními variantami pokusu. Ve stejné variantě KZ+S+R byl v případě poklesu obsahu SM PAU zaznamenán podobný vývoj, kdy došlo k průkaznému snížení jeho obsahu o 75,7 % (326,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h.) oproti kontrolní variantě (KZ), avšak tato změna nebyla průkazná ve srovnání s variantami KZ+S a KZ+R. Dále, v uvedené variantě KZ+S+R se obsah VM PAU prokazatelně snížil až o 52,2 % (215,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h.) ve srovnání s ostatními variantami pokusu.

V případě sledování poklesu celkové obsahu PAU v půdě bylo zjištěno, že ve variantě s přidáním houbovými substráty a s rostlinami (KZ+S+R) se suma PAU statisticky průkazně snížila o 56,8 % (635,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h.). Celkový obsah PAU v půdě se za dobu 180 dní snížil pod limitní hodnotu 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  zeminy danou Vyhláškou č. 153/2016 Sb. na 475,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h. z výchozího obsahu 1110,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h. zeminy.

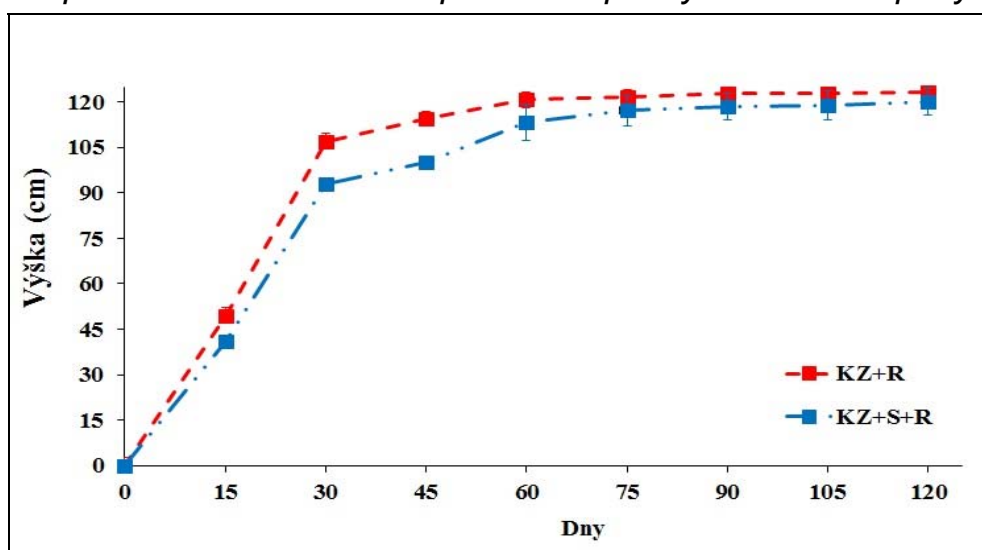
**Graf 3: Snížení obsahu jednotlivých frakcí NM, SM a VM PAU a celkového obsahu PAU (%) v průběhu mykoremediace kontaminované půdy ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.h.; průměr  $\pm$  SD;  $n = 4$ )**



### 3.3 Sledování vlivu PAU v půdě po aplikaci substrátů na růst a výnos rostlin

V průběhu nádobového experimentu byla po dobu 120 dní pravidelně každých 15 dní zaznamenávána výška rostlin kukuřice v rámci jednotlivých variant. Ze získaných hodnot uvedených v *Grafu 4* bylo zjištěno, že testované přídavky substrátu pro rostlého pohárkou měly vliv na růst rostlin během vegetace, kdy kukuřice po dobu prvních 45 dnů dosahovala nižší výšky než kukuřice rostoucí na půdě bez substrátu. Od 60 dnů experimentu byl růst rostlin vyrovnán. Po sklizni rostlin byly také sledovány výnosy sušiny nadzemní biomasy a kořenů kukuřice, které jsou uvedeny v *Tab. 8*.

Graf 4: Výška (cm; průměr ± SD, n=4) rostlin kukuřice v průběhu 120 denního experimentu při mykoremediaci půdy



Tab. 8: Výnos sušiny (g/nádoba; průměr ± SD, n = 4) nadzemní biomasy a kořenů kukuřice sklizené za 120 dní trvání experimentu při mykoremediaci půdy

Část rostliny	KZ+R	KZ+S+R
Nadzemní biomasa	111,2 ± 10,4a	94,4 ± 2,9a
Kořeny	10,1 ± 0,4a	10,0 ± 4,1a

### 3.4 Vliv substrátů a pěstovaných rostlin na příjem PAU z půdy

Tab. 9 uvádí obsahy jednotlivých frakcí NM, SM, VM a celkových PAU v kořenech a také v nadzemní biomase kukuřice. V případě varianty, kdy byl aplikován substrát do půdy, (varianta KZ+S+R) došlo k prokazatelně vyšší akumulaci PAU v kořenech ( $114,1 \pm 1,3 \mu\text{g/kg s.h.}$ ). Ve stejné variantě byl také zaznamenán průkazně vyšší příjem PAU ( $66,3 \pm 0,6 \mu\text{g/kg s.h.}$ ) z kořenů do nadzemní biomasy. V obou variantách byl stanoven obsah PAU vyšší než je limitní obsah PAU v potravinách ( $10 \mu\text{g/kg s.h.}$ ), který je stanoven Vyhláškou č. 53/2002 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků, ve znění vyhlášky č. 233/2002 Sb.

Tab. 9: Obsah NM, SM, VM PAU a sumy 16 PAU ( $\mu\text{g/kg s.h.}$ ) v nadzemní biomase a v kořenech kukuřice sklizené po 120 dnech trvání experimentu na mykoremediaci

	Kořeny		Nadzemní biomasa	
	KZ+R	KZ+S+R	KZ+R	KZ+S+R
NM PAU	33,0 ± 2,7b	62,0 ± 6,0a	19,7 ± 2,6b	31,6 ± 4,4a
SM PAU	26,9 ± 1,6b	47,3 ± 1,3a	21,1 ± 1,0b	32,4 ± 1,2a
VM PAU	43,8 ± 1,5b	49,5 ± 0,7a	29,2 ± 0,5b	32,6 ± 0,4a
PAU	78,4 ± 1,8b	114,1 ± 1,3a	50,5 ± 1,1b	66,3 ± 0,6a

### III. Srovnání novosti postupů

Navržená mykoremediační technika vedoucí ke snížení obsahu perzistentních organických polutantů typu PAU představuje unikátní, environmentálně šetrnou a nízkonákladovou bioremediační metodu zachovávající přirozené funkce půdy.

Předložená metodika podává ucelený souhrn poznatků získaných studiem literatury a především vyhodnocením a zpracováním vlastních vegetačních pokusů, které probíhaly na ČZU v Praze v letech 2015 – 2016, ve kterých byly hodnoceny vlivy přísadků substrátů z hub na chování obsahu jednotlivých 16 PAU (dle US EPA) v kontaminované půdě. Zcela nově byla v mykoremediacích PAU testována pohárovka obecná (*Crucibulum laeve*). Metodika také nově hodnotí i společné působení substrátů s rostlinami. V metodice je zohledněna jak degradace standardních sloučenin PAU v půdě, tak i působení hub na PAU v kontaminované orné půdě odebrané z oblasti se silnou antropogenní zátěží na území České republiky.

Poznatky z vegetačních experimentů, ve kterých se testovaly různé druhy substrátů z hub na mykoremediaci PAU v půdě bez rostlin, ale i na zvýšení fyto-remediační účinnosti vybraných druhů rostlin, lze shrnout do následujících bodů:

1. Pro výrobu substrátu dřevních ligninolytických hub byla použita štěpka ze dřeva listnatých stromů nebo zrno obilnin. Výhoda štěpky spočívá v tom, že se jedná o odpadní produkty z ovocnářství, sadovnictví nebo z posklizňových zbytků a je možná její homogenní aplikace v provozních podmínkách. Naše doporučená metoda přípravy substrátu pro dřevní houby spočívá v teplotním ošetření substrátu při 121 °C v autoklávu po dobu 4 – 6 hodin.

2. Metodika předkládá nové a dosud velmi málo známé údaje o chování obsahu nízkomolekulárních, středněmolekulárních a vysokomolekulárních PAU v půdě, ale i v systému půda – rostlina s přísadky lignocelulózních substrátů obsahující lignolytické houby hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*) nebo pohárovky obecné (*Crucibulum laeve*).

3. a) Vliv substrátů z hub na biodegradaci PAU v půdě: Aplikací 5 % přísadku substrátu ze štěpky (frakce 10 – 30 mm) prorostlého myceliem hlívy do půdy bez rostlin, se obsah PAU průkazně snížil o 36,0 % z původního průměrného celkového obsahu PAU 1506,5 µg/kg s.h. během 120 dnů vegetačního experimentu. Podobný trend byl zaznamenán i v případě aplikace 3,5 % přísadku substrátu z ječmene prorostlého myceliem pohárovky, kdy došlo ke snížení obsahu PAU o 36,2 %.

b) Vliv rostlin na zvýšení biodegradace PAU v půdě se substráty z hub: Vliv rostlin na zvýšení účinnosti biodegradace PAU v půdě nebyl průkazný v případě, že byl aplikován substrát ze štěpky prorostlý myceliem hlívy. Avšak, po aplikaci substrátu z ječmene prorostlého myceliem pohárovky do půdy s následným pěstováním rostlin,

se obsah PAU v půdě snížil o 56,8 % z původního celkového obsahu PAU 1110,4 µg/kg s.h. během 180 dnů vegetačního experimentu.

4. Zvýšený obsah PAU ( $114,1 \pm 1,3$  µg/kg s.h.) byl stanoven pouze v kořenech rostlin pěstovaných na půdě po aplikaci substrátu z ječmene prorostlého myceliem pohárovky, zatímco obsah PAU v nadzemní biomase byl nízký ( $63,3 \pm 0,6$  µg/kg s.h.). V kořenech rostlin pěstovaných na půdě se substrátem ze štěpky prorostlého myceliem hlívy byl obsah PAU podobný ( $119,9 \pm 6,7$  µg/kg s.h.), avšak v nadzemní byl pod mezí detekce.

5. Námí navrhovaná metodika může být snadno proveditelná i jako mykoremediační metoda *in situ*. V případě vyšší zátěže PAU v půdě se navrhuje metodu aplikovat po více let.

#### **IV. Popis uplatnění certifikované metodiky**

1. Předkládaná metodika poskytuje státní správě návod na alternativní šetrný způsob odstranění organických polutantů z životního prostředí, než je tomu v případě použití konvenčních fyzikálně – chemických remediačních metod, které jsou často ekonomicky náročné a rizikové pro životní prostředí, protože kontaminovaná půda ošetřená například termickou desorpčí zcela ztrácí přirozené vlastnosti a biologickou aktivitu nezbytnou k jejím základním funkcím.

2. Metodika poslouží pěstitelům hub, výrobcům a producentům houbových substrátů jako návod jak využít specifické druhy hub a připravit materiály vhodné pro mykoremediace půd kontaminovaných polycyklickými aromatickými uhlovodíky.

3. Dále bude metodika sloužit společně s zabývajících se dekontaminací půd znečištěných PAU, které se snaží ve své praxi klást důraz na implementaci nových, environmentálně šetrných a nízkonákladových bioremediačních metod.

4. Metodika bude také sloužit zemědělcům, kterým ukazuje možnosti šetrné dekontaminace půd poškozených antropogenní činností a kontaminovaných PAU při současném bezpečném pěstování rostlin.

#### **V. Ekonomické aspekty**

V následující *Tab. 10* se pro potenciální výrobce a koncové uživatele substrátů uvádí materiálové a pracovní zhodnocení nákladů na vyčištění 1 ha půdy kontaminované PAU pomocí aplikace substrátů metodou *in situ* bez rostlin a s rostlinami kukuřice. Účinnost mykoremediace PAU v půdě byla ověřována v rámci experimentů s přídatky substrátů v půdě bez rostlin a s rostlinami s obsahem PAU v rozmezí 1,1 až 1,5 mg/kg zeminy. V případě využití navrhovaných substrátů z hub na mykoremediace PAU v půdě *in situ*, by odpadly náklady spojené s nutností na vytěžení da-

né kontaminované půdy, jako je tomu v případě mnohých fyzikálně – chemických remediačních metod.

Námi vyčíslené náklady na vyčištění 1 ha půdy kontaminované PAU jsou 1,50 mil. Kč v případě použití substrátu ze štěpky prorostlého hlívou a 1,64 mil. Kč při použití obilného substrátu prorostlého pohárkou. Při přepočtu nákladů na vyčištění 1 t zeminy se náklady pohybují na úrovni 500,- Kč. Pokud by se půda s přidávkou substrátů osela kukuřicí tak by se náklady zvýšily o 5970 Kč/ha při výsevu 80 000 zrn kukuřice, ale současně klesly o tržby za vyprodukovanou biomasu. Použitím námi navrhované metodiky na mykoremediace půd zatížených PAU pomocí substrátů z hub se výrazně sníží náklady, protože náklady potřebné na přečištění půdy kontaminované PAU například pomocí termické desorpce se pohybují v rozmezí 75 mil. Kč až 112,5 mil. Kč/ha kontaminované půdy.

*Tab. 10: Materiálové a pracovní náklady na přečištění 1 ha půdy kontaminované PAU pomocí houbových substrátů metodou in situ bez rostlin*

Položka	Bez rostlin			
	Štěpkový substrát s hlívou		Obilný substrát s pohárkou	
dávka substrátu	187,50	t/ha	131,25	t/ha
cena houbového substrátu	8 000	Kč/t	12 500	Kč/t
cena dávky	1 500 000	Kč/ha	1 640 625	Kč/ha
aplikace dávky	1 750	Kč/ha	1 750	Kč/ha
cena celkem	1 501 750	Kč/ha	1 642 375	Kč/ha

*(Ceny jsou stanovené bez dopravy, PHM a DPH)*

*Tab. 11: Materiálové a pracovní náklady na přečištění 1 ha půdy kontaminované PAU pomocí houbových substrátů metodou in situ s rostlinami kukuřice*

Položka	S rostlinami kukuřice			
	cena dávky a aplikace	1 501 750	Kč/ha	1 642 375
cena osiva	4 200	Kč/ha	4 200	Kč/ha
příprava a zasetí	1 770	Kč/ha	1 770	Kč/ha
cena celkem	1 507 720	Kč/ha	1 648 345	Kč/ha

*(Ceny jsou stanovené bez dopravy, PHM a DPH)*

## **VI. Závěr**

Metodika podává souhrn detailních postupů mykoremediace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), jako zástupce persistentních organických polutantů, v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů. Účinnost námi cíleně vyrobených mykoremediačních substrátů byla ověřována na orné půdě zatížené PAU (1,1 až 1,5 mg/kg s.h. zeminy),

ve kterých byly testovány substráty z jabloňové dřevní štěpky prorostlé myceliem hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm) a také substráty ze zrna ječmene prorostlé myceliem pohárkovky obecné (*Crucibulum laeve* Huds.) po aplikaci do půdy bez rostlin, ale i do půdy s následným pěstováním rostlin kukuřice seté (*Zea mays* L. var. *colisee*).

Metodika poskytuje podrobné informace o cílené výrobě substrátů prorostlých myceliem hub a jejich aplikaci do kontaminované půdy, která je snadno proveditelná i v případě mykoremediace orné půdy kontaminované PAU metodou *in situ*. Podstatná část metodiky je věnována vlivu jednotlivých substrátů z hub na celkový obsah PAU včetně jejich frakcí nízkomolekulárních, středněmolekulárních a vysokomolekulárních PAU v půdě bez rostlin. V případě pěstování rostlin kukuřice na půdě kontaminované PAU po aplikaci substrátů z hub byl sledován vliv rostlin na zvýšení účinnosti biodegradace PAU v půdě a také přestup PAU z půdy do kořenů a nadzemní biomasy rostlin.

Stěžejní poznatky z realizovaných experimentů jsou shrnuty v následujících bodech:

- 5 % přídavek dřevního substrátu (frakce 10 – 30 mm) prorostlého hlívou snížil obsah PAU v orné půdě bez rostlin o 36,0 % za 120 dní.
- 3,5 % přídavek obilného substrátu prorostlého pohárkovkou snížil obsah PAU v orné půdě o 36,2 % za 180 dní.
- Průkazný vliv rostlin na zvýšení biodegradace PAU v orné půdě byl zaznamenán v případě aplikace obilného substrátu prorostlého pohárkovkou, kdy se obsah PAU v půdě snížil o 56,8 % za 180 dní.
- Vyšší obsah PAU byl stanoven pouze v kořenech kukuřice, v nadzemní biomase byl zanedbatelný.

Metodika obsahuje jednoduchou a přehlednou finanční rozvahu nákladů na výrobu a aplikaci mykoremediačních substrátů do orné půdy zatížené PAU použitím metody *in situ*. Dále umožňuje uživatelům si zvolit vlastní strategii ekonomicky dostupné a environmentálně šetrné metody odstraňování polutantů PAU z životního prostředí s ohledem na zachování přirozených vlastností a biologické aktivity půdy.



## VII. Seznam použité související literatury

- Abdel-Shafy, H. I., Mansour, M. S. M. 2015. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 25. 107–123.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 3 (1). 28–39.
- Agnello, A. C., Bagard, M., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., Huguenot, D. 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*. 563–564. 693–703.
- Anyakora, C., Ogbeche, A., Palmer, P., Coker, H. (2005): Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A*. 1073 (1–2). 323–330.
- Atkins, A., Bignal, K. L., Zhou, J. L., Cazier, F. (2010): Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from the combustion of biomass pellets. *Chemosphere*. 78. 1385–1392.
- Bakker, M. I., Casado, B., Koerselman, J. W., Tolls, J., Kollöffel, C. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *The Science of the Total Environment*. 263. 91–100.
- Bamforth, S. M., Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80 (7). 723–736.
- Canet, R., Birnstingl, J. G., Malcolm, D. G., Lopez-Real, J. M., Beck, A. J. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology*. 76. 113–117.
- Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. 4. 331–338.
- Eisler, R. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals*. Organics vol. 2. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 1343–1411.
- Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., Dendooven, L. 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 18. 12–30.
- García-Delgado, C., Alfaro-Barta, I., Eymar, E. 2015. Combination of biochar amendment and mycoremediation for polycyclic aromatic hydrocarbons immobilization and biodegradation in creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 285. 259–266.
- Haritash, A. K., Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*. 169. 1–15.
- Chen, S.-C., Liao, C.-M. 2006. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Science of the Total Environment*. 366. 112–123.
- Li, X., Wu, Y., Lin, X., Zhang, J., Zeng, J. 2012. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil microcosms amended with mushroom cultivation substrate. *Soil Biology & Biochemistry*. 47. 191–19.
- Pueke, A. D., Rennenberg, H. 2005. Phytoremediation. *EMBO reports*. 6 (6). 497–501.

- Vácha, R., Čechmánková, J., Skála, J., Váchová, T. 2011. Use of dredged sediments on agricultural soils from viewpoint of potentially toxic substances. *Plant, Soil and Environment*. 57 (8). 388–395.
- Vácha, R., Skála, J., Čechmánková, J., Horváthová, V., Hladík, J. 2015. Toxic elements and persistent organic pollutants derived from industrial emissions in agricultural soils of the Northern Czech Republic. 15. 1813–1824.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*. 73 (7). 1163–1172.
- Vyhláška č. 53 ze dne 15. února 2002 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků, ve znění vyhlášky č. 233/2002 Sb.
- Vyhláška č. 153 ze dne 9. května 2016 o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2016. částka 59. s 2692–2699.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*. 41. 1–17.
- Wei, Y.-L., Bao, L.-J., Wu, C.-C., He, Z.-C., Zeng, E. Y. 2015. Association of soil polycyclic aromatic hydrocarbon levels and anthropogenic impacts in a rapidly urbanizing region: spatial distribution, soil-air exchange and ecological risk. *Science of the Total Environment*. 473–474. 676–684.
- Winqvist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K. T., Jørgensen, K. S., Tuomela, M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi– from laboratory to field scale. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 86. 238–247.

## VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Balíková, E. (2014): Diplomová práce. Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) vybranými bakteriemi. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 103 s.
- Otradovcová, Š. (2016): Diplomová práce: Vliv ošetření substrátu a teplotních podmínek na vývoj kultury *Pleurotus eryngii* a *Pleurotus nebrodensis*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 72 s.
- Jablonský, I., Jelínek, F., Kaplan, L., Koudela, M., Tlustoš, P., Bazalová, M. Zhodnocení fyzikálně-chemických a biologických vlastností substrátů založených na bázi separátů upravených fermentací. Certifikovaná metodika. Česká zemědělská univerzita v Praze. 37 s.
- Wiesnerová, L. (2016): Diplomová práce. Vliv podmínek prostředí na vztah kultury hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), *Trichoderma pleuroti* a *mikrobiota* v substrátu. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 58 s.
- Zadobilová, L. (2015): Diplomová práce. Vztah mikroorganismů v substrátu k myceliu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) a konkurenční houbě *Trichoderma pleurotum*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 97 s.

## **IX. Dedikace**

Ke zpracování certifikované metodiky bylo použito výsledků výzkumných aktivit realizovaných v rámci řešení výzkumného projektu TAČR č. TA04020329 „Výzkum a vývoj technologie výroby substrátů pro pěstování druhů jedlých a léčivých hub s využitím odpadních surovin a odpadního tepla z bioplynových stanic”.

## **X. Ostatní náležitosti certifikované metodiky**

V souladu se závazným *Postupem pro uznání výsledku typu „Nmet – Certifikovaná metodika“*, který vydalo Ministerstvo zemědělství – Odbor výzkumu, vzdělávání a poradenství dne 9. května 2016, jsou v následujících podkapitolách uvedeny další požadované údaje nebo doplňující informace.

### **Jména oponentů a názvy jejich organizací**

Posudek odborníka v daném oboru vypracoval:

Doc. RNDr. Čeněk Novotný, CSc.  
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč

Posudek pracovníka příslušného odborného orgánu státní správy vypracovala:

Ing. Michaela Budňáková  
Ministerstvo zemědělství ČR (odbor rostlinných komodit)  
Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

### **Podíly na vzniku předkládané metodiky**

Na zpracování a finalizaci předkládaného výstupu projektu (certifikované metodiky) se členové řešitelského týmu s rolí spoluautorů metodiky zúčastnili níže uvedeným podílem: Ivan Jablonský (10 %), – Zdeněk Košnář (50 %), – Lukáš Kaplan (10 %), – Martin Koudela (10 %), – František Jelínek (10 %), – Pavel Tlustoš (10 %).

### **Osvědčení odborného orgánu státní správy**

Osvědčení o uznání certifikované metodiky vydalo Ministerstvo zemědělství ČR dne 13.7. 2017 (osvědčení č.: 43590/2017-MZE-17221)

# OBSAH

I. Cíl metodiky.....	1
II. Vlastní popis metodiky .....	1
1. Úvod – mykoremediace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) .....	1
2. Mykoremediace půdy kontaminované PAU pomocí substrátu na bázi dřevní štěpky kolonizovaného houbou <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	5
3. Mykoremediace půdy kontaminované PAU pomocí substrátu na bázi obilného zrna kolonizovaného houbou <i>Crucibulum laeve</i> .....	12
III. Srovnání novosti postupů.....	18
IV. Popis uplatnění certifikované metodiky.....	19
V. Ekonomické aspekty .....	19
VI. Závěr .....	20
VII. Seznam použité související literatury.....	22
VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice .....	23
IX. Dedikace.....	24
X. Ostatní náležitosti certifikované metodiky.....	24