

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

BIOTRANSFORMACE AROMATICKÝCH NITROLÁTEK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

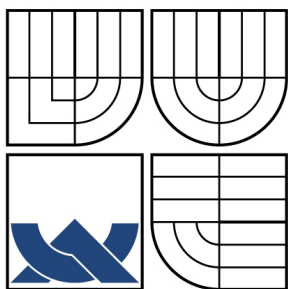
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

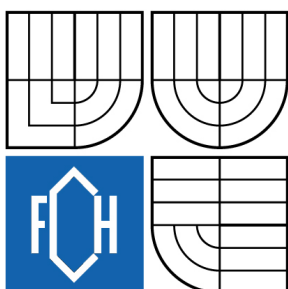
AUTHOR

MARTINA ZLÁMALOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

BIOTRANSFORMACE AROMATICKÝCH NITROLÁTEK

BIOTRANSFORMATION OF AROMATIC NITRO COMPOUNDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

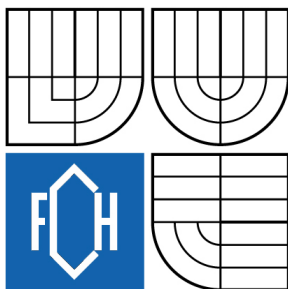
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MARTINA ZLÁMALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. ZDENĚK FRIEDL, CSc.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce

FCH-BAK0145/2006

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Student(ka)

Zlámalová Martina

Studijní program

Chemie a chemické technologie (B2801)

Studijní obor

Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)

Vedoucí bakalářské práce

prof. RNDr. Zdeněk Friedl, CSc.

Konzultanti bakalářské práce

Název bakalářské práce:

Biotransformace aromatických nitrolátek

Zadání bakalářské práce:

Rešeršní zpracování aerobní biotransformace aromatických polynitrolátek typu TNT. Metody detekce a analytického stanovení transformačních meziproduktů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2007

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martina Zlámalová
student(ka)

prof. RNDr. Zdeněk Friedl, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

SOUHRN

Tato práce se zabývá odstraněním, popřípadě snížením kontaminace půd, způsobenou výbušninami, pro pozdější využití.

Největším znečišťujícím elementem půd i povrchových vod je zbrojní průmysl, ale i továrny na výrobu barviv.

Pojednává se zde o využití bakterií, hub a rostlin při následné biodegradaci trinitrotoluenu a jemu příbuzných kontaminantů.

Jsou zde rozebírány biodegradace pomocí organismů v závislosti na přítomnosti a koncentraci kyslíku, tj. za aerobních či anaerobních podmínek.

Mimo jiné jsou zde popisovány další technologické postupy při odbourávání explosiv a to fyzikálně-chemické degradace např. sanace kontaminovaných půd kompostováním, dekontaminace půd využitím Land farming, sanace půd metodou Soil slurry reactors či dekontaminace perkolačními technikami.

SUMMARY

This work deals with elimination or reduction of possible soil's contaminants, namely explosives for utilization in the future.

The greatest contaminating elements of soils and surface water are not only armaments industry but also factories for production of dyes.

The thesis deals with the use of bacterias, fungus and plants by the following biodegradation of trinitrotoluene and its congeneric contaminants.

The work analyses biodegradation supported by organism in a dependence on a presence and a concentration of oxygen that are aerobic or anaerobic conditions.

This work describes also technological procedures by degradation of explosives that are physically-chemical degradation for example the sanitation of contaminated soils by composting the soil's decontamination with the consumption of Land farming method, or the decontamination of the percolation techniques.

KLÍČOVÁ SLOVA

TNT, biotransformace, biodegradace

KEYWORDS

TNT, biotransformation, biodegradation

ZLÁMALOVÁ, M. Biotransformace aromatických nitrolátek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, 2008. 33 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Zdeněk Friedl, CSc.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ:

Úvodem bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce panu prof. RNDr. Zdeňku Friedlovi, CSc za odborné vedení, rady a připomínky, které mi udělil během zpracování bakalářské práce. Děkuji také svým rodičům za podporu a všem, kteří mi poskytli pomoc při realizaci mé práce.

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Toxicita nitroaromátů	7
2. Biodegradační dráhy nitroaromátů	8
2.1 Biodegradační dráhy TNT (2,4,6-trinitrotoluenu)	8
2.2 Biodegradace popsaná u různých mikroorganismů	9
2.2.1 Degradace v závislosti koncentrace kyslíku	12
2.2.1.1 Anaerobní prostředí	12
2.2.1.1.1 Bakterie	12
2.2.1.2 Aerobní prostředí	14
2.2.1.2.1 Bakterie	14
2.2.1.2.2 Houby	15
2.2.1.2.3 Rostliny	18
3. Technologická zařízení a postupy	18
3.1 Sanace kontaminovaných půd kompostováním	19
3.2 Dekontaminace půd využitím Land farming	22
3.3 Sanace půd metodou Soil slurry reactors	22
3.4 Dekontaminace perkolačními technikami	24
3.5 Další metody	24
4. Shrnutí	25
5. Literatura	26

1. Úvod:

Výbušniny patří mezi látky, které ve dvacátém století významně ovlivnily životní prostředí. Nejen jejich přímý efekt – exploze – ale také toxicita a perzistence znehodnocující stav přirozených ekosystémů. Explosivní látky lze z chemického hlediska obecně rozdělit do skupin nitroaromátů, nitraminů a nitrát esterů [1]. Zástupci jednotlivých skupin se liší chemickou povahou, která určuje jejich reaktivní vlastnosti a také jejich toxicitu pro živé organismy a veškeré ekosystémy. Nejvíce je zde kladen důraz na biologické degradace nitroaromátů s využitím bakterií a hub (plísňí, mikromicet).

Důležitým zástupcem nitroaromatických sloučenin je bezesporu 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), pak méně často používaný 2,4-dinitrotoluen (DNT).

V minulosti při průmyslové výrobě docházelo ke vzniku dalších polohových isomerů trinitrotoluenů, jež mohou být toxičtější než samotný 2,4,6-trinitrotoluen. Těmito isomery, jakož i jejich potencionálními produkty bitransformace, se na rozdíl od trinitrotoluenů dříve nikdo nezabýval.

Pro vyhodnocení toxikologického a ekotoxikologického významu trinitrotoluenů, průmyslově vyráběných staršími metodami, je tedy vhodné znát i vlastnosti těchto látek stejně tak, jako vztahy mezi strukturou těchto látek a jejich akutní toxicitou [2].

TNT byl v minulosti nejpoužívanější výbušninou, a proto se stal modelovou sloučeninou pro výzkum biologických efektů (akutní a chronické toxicity, genotoxicity) a také biodegradací.

Největší podíl na znečištění půd a povrchových vod má zbrojní průmysl. Dalším velkým zdrojem kontaminace jsou továrny na výrobu barviv, které ve svých odpadních vodách vypouští nezanedbatelné množství TNT jako vedlejšího produktu [3]. Zvýšené koncentrace TNT v půdě nebo vodě jsou také nalézány na lokalitách, kde dochází k manipulaci či likvidaci výbušnin.

1.1 Toxicita nitroaromátů

Nitroaromatické výbušniny (2,4,6-trinitrotoluen, 2,4-dinitrotoluen a jejich izomery) a produkty jejich chemických a biologických reakcí jsou velmi nebezpečné pro životní prostředí.

Nebereme-li v úvahu riziko samovolného vznícení (u TNT dochází k samovznícení již při koncentraci 1,2 %) [4], nelze opomenout ani toxické efekty těchto látek na živé organismy. Nitroaromáty jsou obecně vysoce toxické látky s mutagenními vlastnostmi. TNT i v malých dávkách (18 µg/kg) vykazuje silně inhibiční účinek při pokusech na jednobuněčných sladkovodních řasách [3]. Při koncentraci 50 mg/kg dochází k silnému omezení růstu většiny hub, kvasinek, plísní a G⁻ bakterií [5].

Toxicita a mutagenita nitroaromátů je ovlivněna umístěním nitroskupin na aromatickém jádře [6]. V lidském organismu dochází v důsledku intoxikace TNT k poruše krevetvorby, ke křečím, bolestem hlavy a poruše dýchání. Po chronické expozici TNT bylo pozorováno poškození jater (TNT-hepatitida). Dále dochází k plastické anemii a časté jsou také neuropatologické symptomy [7]. TNT jako ve vodě málo rozpustná látka do organismu vstupuje zejména vstřebáním pokožkou nebo sliznicemi (často dochází k intoxikaci po vdechování aerosolu).

Mutagenita a toxicita TNT byla studována několika testy toxicity. Nejvíce výsledků bylo publikováno z bakteriálního bioluminiscenčního testu Microtox [8]. Byla rovněž stanovena toxicita v testech letality ryb a koryšů [9]. Údaje o genotoxicitě vychází z výsledků Amosova testu [10]. Testem letality ryb určená LC₅₀ (letální – smrtelná koncentrace pro 50 % zkoumaných ryb) pro TNT se pohybovala v rozmezí 2 až 3 mg/l [5].

Velkou pozornost je třeba věnovat také meziproduktům degradace TNT. Metabolity redukce nitroskupin jako jsou nitrosoderiváty, hydroxyaminoderiváty a aminoderiváty vykazují ve většině testů vyšší toxicitu než TNT [11]. Také u technických preparátů TNT, které jsou znečištěny těmito látkami, je pozorována vyšší toxicita. Rovněž po vstupu TNT do organismu může docházet k biotransformacím, které často vedou ke změnám toxicity původní látky [12].

2. Biodegradační dráhy nitroaromátů

Toxicita a mutagenita explosiv pro živé organismy a také jejich stálost v jednotlivých složkách ekosystémů vyvolala otázku jejich řízené degradace. V minulosti byly nejčastěji využívány chemické a fyzikální způsoby destrukce výbušnin. Často používaná metoda spalování nebo otevřené exploze je dosti finančně nákladná a nepříliš šetrná k životnímu prostředí. Také další způsoby odbourávání explosiv fyzikální nebo chemickou cestou jsou nákladné a málo efektivní.

V druhé polovině devadesátých let dvacátého století se rozvinula možnost degradace explosiv moderními biotechnologickými postupy. Biotechnologické procesy využívají k přeměně výbušnin mikroorganismů – nejčastěji bakterií a hub, které jsou izolovány přímo z kontaminovaných lokalit. Studována je také možnost genetické manipulace mikroorganismů s cílem vnést do jejich genetické výbavy geny pro degradační enzymy.

Biodegradační metody jsou v principu velmi jednoduché a mají relativně nízké provozní náklady. Nezanedbatelným faktorem je rovněž jejich ekologičnost.

Mezi nevýhody patří delší doba rekultivace kontaminované oblasti. Problémem je také využití biologických metod pro degradaci substrátů s velmi vysokými koncentracemi explosiv, kde jsou mikroorganismy těmito látkami inhibovány.

Konečným cílem bioremediačního procesu je dokonalá mineralizace škodliviny (tj. převedení původní látky na jednoduché molekuly – nejčastěji oxid uhlíčitý a vodu). V mnoha případech však dochází pouze k částečné přeměně kontaminantů a je tedy nutné během remediačního procesu sledovat nejen úbytek původní látky, ale i produkty reakcí a testovat jejich toxicitu.

Degradační procesy využívající bakterií a nižších hub lze z hlediska podmínek reakce rozdělit na procesy aerobní (probíhající za přístupu kyslíku nebo kyslík vyžadující) a procesy anaerobní. Podmínky procesu degradace fundamentálně ovlivňují průběh biochemických reakcí, kdy za anaerobních podmínek dochází nejčastěji k redukčním reakcím, úplné mineralizace degradovaného substrátu je dosaženo jen zřídka. Aerobní mikroorganismy naopak přeměňují substrát oxidačně s využitím kyslíku – v mnoha případech byla prokázána úplná mineralizace.

Důležitým faktorem je také přítomnost externího uhlíku. Při některých biodegradacích je využíván jako jediný zdroj uhlíku právě degradovaný polutant. V mnoha případech však mikroorganismy pro svůj růst vyžadují přirozený zdroj uhlíku (například sacharid) a k biochemickým přeměnám polutantu dochází pouze v podobě kometabolismu.

2.1 Biodegradační dráhy TNT (2,4,6-trinitrotoluenu)

Trinitrotoluen je od začátku dvacátého století v rozsáhlé míře využíván k výrobě výbušnin. Po roce 1920 byl zahájen výzkum chování TNT v živých organismech a osudu v životním prostředí. Tento výzkum se výrazně urychlil během 2. světové války, v jejímž průběhu došlo

k mohutné produkci TNT i jiných výbušnin. V této době se také objevil problém kontaminovaných lokalit se zvýšenou koncentrací TNT.

2,4,6-trinitrotoluen je nepolární sloučenina s relativně malou rozpustností ve vodě (150 mg/l při 25°C) [13]. Tři nitroskupiny v polohách 2-, 4-, 6- se chovají jako elektrofilní objemné substituenty a významně redukuje elektronovou hustotu v aromatickém kruhu a tím částečně brání elektrofilnímu ataku mikrobiálních enzymů – především oxygenáz. Jedny z prvních analýz osudu TNT v lidském organismu byly provedeny na pracovnících ze zbrojařských továren. V jejich moči byly jako metabolity TNT nalezeny především 2,4-diamino-6-nitrotoluen; 2,2',6,6'-tetranitro-4,4'-azoxytoluen a jejich konjugáty s glukuronovou kyselinou. Výskyt těchto chemických látek již naznačoval možné biochemické mechanismy odbourávání TNT mikroorganismy [14, 15, 16]. Jak prokázali pozdější studie, dochází během degradace TNT houbami a bakteriemi v prvním kroku k redukci nitroskupin na aromatickém jádře [17], další reakce vedou k odštěpení substituentů a otevření aromatického kruhu.

Do devadesátých let dvacátého století nebyly k dispozici poznatky o úplné destrukci aromatického jádra TNT během mikrobiálních degradací. Poprvé bylo popsáno rozštěpení aromatického jádra při studiích biodegradace 2,4-diamino-6-nitrotoluenu v aerobním prostředí pomocí *Pseudomonas fluorescens* [18]. V té době byla prokázána degradace aromatického kruhu v přítomnosti kyslíku s využitím kmene mikromycety *Phanerochaete chrysosporium* [19].

Od té doby byl výzkum biodegradací zaměřen nejen na základní poznatky biotransformací (biochemické dráhy, výzkum enzymů a produktů), ale dochází i k intenzivnímu vypracování biotechnologických zařízení pro účely biodegradací.

2.2 Biodegradace popsaná u různých mikroorganismů

Během dlouholetého výzkumu biodegradací TNT jako modelové látky se podařilo popsat množství různých degradačních metabolických cest v závislosti na:

1. použitém druhu mikroorganismu
2. chemických podmínkách, za kterých byly experimenty prováděny (přítomnost kyslíku, pH apod.)
3. na přítomnosti elektronových akceptorů
4. na přítomnosti substrátů a zdrojů živin (uhlíku a dusíku)

Degradace xenobiotik probíhá u mnohých mikroorganismů jako kometabolismus. V takovém případě nedokáže organismus růst za přítomnosti xenobiotika jako jediného zdroje uhlíku a je nutné dodat jiný hlavní zdroj uhlíku. U kmenů rodu *Pseudomonas* dochází například ke stimulaci metabolismu xenobiotik v přítomnosti glukosy nebo kvasničného extraktu [20]. Existují však také mikroorganismy, které nevyžadují jiný zdroj uhlíku než samotné xenobiotikum (tedy TNT) [21, 22] a dokáží úspěšně degradovanou látku využít pro vlastní růst. V některých případech bylo navíc prokázáno, že přítomnost jiného zdroje uhlíku inhibuje degradaci nebo úplnou mineralizaci TNT [23].

Velká pozornost byla také věnována podmínkám reakční směsi. Několik prací bylo zaměřeno na úspěšnost degradací TNT v závislosti na přítomnost kyslíku, nitrátu, sulfátu a oxidu uhličitého [24, 25, 26, 27]. V závislosti na různých podmínkách tak dochází k různému způsobu transformace TNT a vznikají odlišné metabolity.

Schéma 1 ukazuje předpokládané metabolity mikrobiální degradace TNT v závislosti na koncentraci kyslíku v degrační směsi.

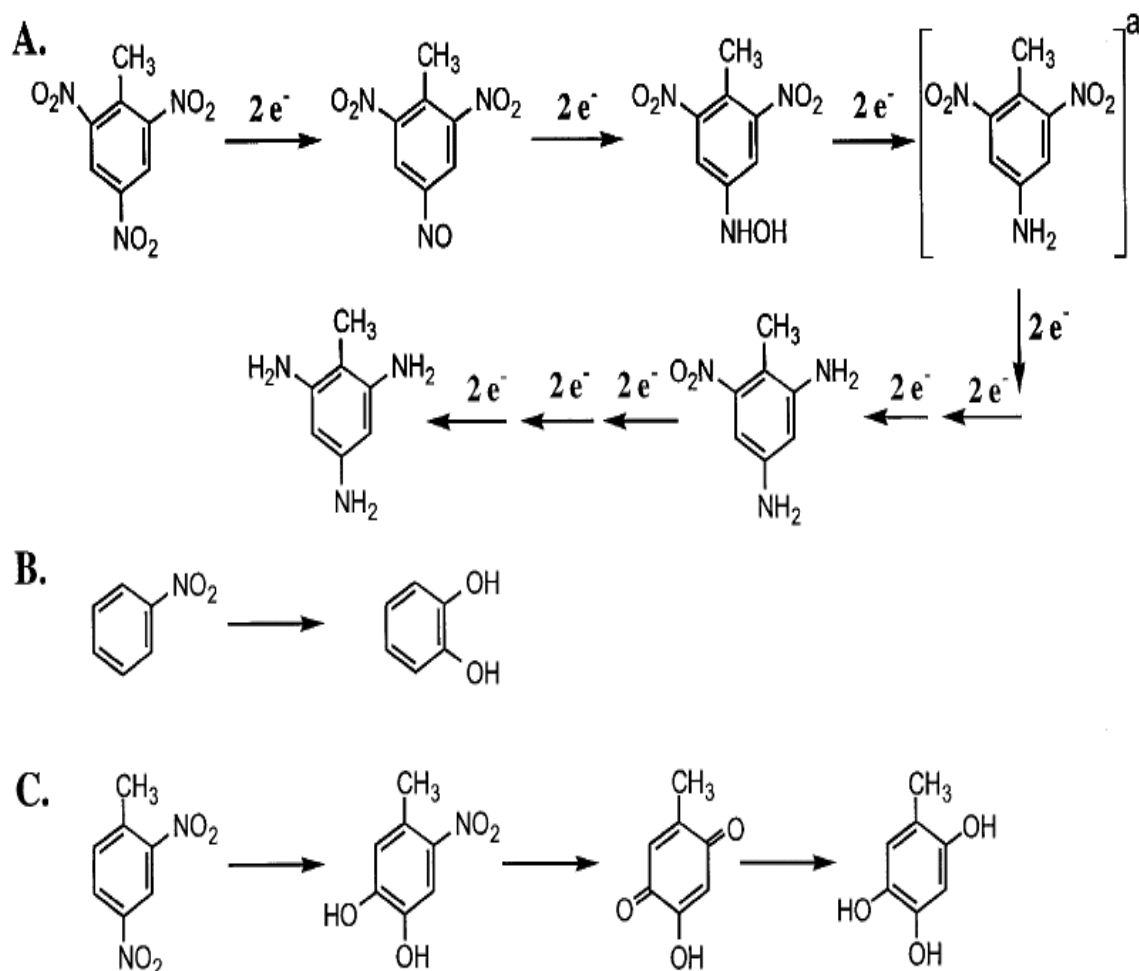


Schéma 1

(převzato z práce [28])

Na základě dlouholetého výzkumu bylo také vypracováno zjednodušené metabolické schéma mikrobiální degradace TNT (viz. **Schéma 2**)

Ne všechny mikroorganismy jsou však schopny degradovat molekulu TNT až na CO₂ a H₂O, tj. mineralizovat. Často dochází pouze k částečné přeměně funkčních skupin, přičemž vlastní aromatické jádro zůstává chemicky nezměněno.

Příkladem organismu, který mineralizuje TNT jsou kmeny rodu *Pseudomonas*, strain 1-2WT nebo II BX [22]. V případě uvedených bakterií bylo prokázáno odstranění nitroskupiny z aromatického kruhu za přítomnosti kyslíku s mineralizací v následných krocích.

Won a kolektiv [30] popisují výsledky degradačních studií s *Pseudomonas sp.*, strain Y, I, II. Autoři prokázali odstranění nitro skupiny z aromatického skeletu po její prvotní redukci na R-NH₂.

Další degradační cesta byla popsána u *Mycobacterium sp.* Strain HL-4-NT-1. Tento mikroorganismus odstraňuje redukcí nitro skupiny z aromatického kruhu ve formě nitritu přes nestabilní hydrid – Meisenheimerův komplex [31].

Kromě bakterií byla mineralizace TNT prokázána také u některých zástupců hub, zejména *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanismus mineralizace je pravděpodobně biochemicky odlišný od bakteriálního a je mnohem méně prostudován. Mezi zástupci micromycet schopnými degradovat TNT lze jmenovat zejména plísňě bílé hniloby [23, 32, 33, 34].

Většina zkoumaných mikroorganismů však dokáže TNT redukovat přinejmenším na aminoderiváty. Tyto sloučeniny však vykazují toxičtější efekty než vlastní TNT [1]. Navíc dochází k jejich masivní sorpci na některé kompartmenty mikrobiálních buněk, na půdní částice nebo tvoří molekuly polymerní povahy, což snižuje biodostupnost molekul pro další biodegradace.

2.2.1 Degradace v závislosti na koncentraci kyslíku

Z hlediska reakčního schématu a zejména potřeby přítomnosti kyslíku lze biodegradace TNT rozdělit na degradace v anaerobním a aerobním prostředí. V následující kapitole jsou podrobněji předloženy rozdíly v biodegradacích TNT probíhajících v anaerobním prostředí a v prostředí s přímým přístupem kyslíku. V rámci podkapitol jsou potom degradace rozděleny na degradace s využitím bakterií (anaerobní i aerobní prostředí) a hub – mikromycet (jedná se o striktně aerobní mikroorganismy).

2.2.1.1 Anaerobní prostředí

2.2.1.1.1 Bakterie

Výzkum možných degradací TNT byl v počátcích zaměřen na nalezení vhodných anaerobních bakterií. Mnoho striktně anaerobních bakterií se zúčastňuje hlavních dekompozičních reakcí v živé přírodě a jejich genetická výbava je velmi bohatá na přítomnost redukčních enzymů.

Bylo prokázáno, že sulfidogenní bakterie spolu se zástupci rodu *Clostridium* jsou schopné redukce nitroskupin TNT v přítomnosti oxidu uhličitého, vodíku nebo pyruvátu [27]. Limitujícím krokem série redukčních reakcí byla redukce 2,4-diamino-6-nitrotoluenu na triaminotoluen. Ten byl následně anaerobně transformován na neznámý produkt. Odstranění triaminotoluenu bylo v dalších pracích uskutečněno také aerobně v přítomnosti Mn^{2+} iontů [27].

V jiných pracích [35, 36] byl triaminotoluen nalezen jako produkt hydrolýzy a adukt triaminotoluenu s methylglyoxalem jako konečný metabolit transformace TNT kmenem *Clostridium bifermentans* LJP-1.

Anaerobní redukci TNT studovali podobně [37] s využitím bakterií *Veillonella alcalescens*. Autoři prokázali redukci TNT (původní koncentrace 0,1 g/l) na triaminotoluen. Reakce byla podmíněna přítomností silného redukčního činidla v médiu (H_2).

Jako konečný produkt anaerobní (ale i aerobní) transformace TNT pomocí fakultativně anaerobních bakterií druhu *Pseudomonas fluorescens* byl prokázán 4-N-acetyl-amino-6-nitrotoluen [38].

Další studie s *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52 [39, 40] prokázala redukci TNT v anaerobním prostředí pomocí enzymu nitrobenzenreduktázy na 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluen. V dalším kroku byl tento meziprodukt za přítomnosti NAD(P)H dále redukován na aminodinitrotoluen nebo na 2-hydroxylamino-4-amino-6-nitrotoluen. Konečný produkt degradace nebyl identifikován. Další práce využila při transformacích TNT kmene *Methanococcus* sp (strain B). Byla též prokázána úplná degradace TNT (100 mg/kg) z média za 40-60 dní. Výsledným produktem byl 2,4-diamino-6-nitrotoluen. Reakce probíhala v anaerobních podmínkách za syčení CO_2 a za přítomnosti redukčního činidla (H_2).

Při studiích biodegradací TNT se zástupci sirných bakterií *Desulfovibrio* spp. byla prokázána redukce původní molekuly na aminodinitro- a diaminonitrotolueny [41]. V médiu byly mezi produkty reakce detekovány také další metabolity – kyselina nitrobenzoová, cyklohexanon, 2-methylpentanová kyselina a také kyselina máselná a octová. Z původního množství TNT bylo 49,6 % přeměněno až na kyselinu octovou. V experimentech s *Desulfovibrio* spp. sloužil TNT jako jediný zdroj uhlíku.

Mnoho prací prokázalo, že TNT a jeho degradační produkty se většinou váží ireversibilně na lipidy buněčné membrány a stěny a také na ostatní mastné kyseliny a rovněž proteiny. Tento fakt může být jednou z příčin obtížné degradovatelnosti TNT v anaerobních podmínkách a rovněž může vysvětlovat negativní výsledky snah o analytickou detekci konečných metabolitů degradace TNT.

Za striktně anaerobních podmínek nebyla při *in situ* experimentech s kontaminovanou půdou prokázána významná mineralizace TNT na CO_2 . Redukce TNT je zpravidla ukončena tvorbou triaminotoluenu.

V případě, že během degradačních kroků dojde ke zvýšení redoxního potenciálu prostředí nad -250 mV nebo k navázání některého intermediátu na huminové kyseliny, je degradační

reakce ukončena předčasně a jako výsledné produkty biodegradace jsou nalézány nitraminy [42, 43, 44].

2.2.1.2 Aerobní prostředí

2.2.1.2.1 Bakterie

Mnohé práce zaměřené na degradaci TNT využívají druhů fakultativně i striktně aerobních bakterií. Nejčastěji jsou degradace prováděny se zástupci G^- bakterií s bohatou enzymatickou výbavou.

Při studiích aerobní degradace TNT pomocí kmenů rodu *Pseudomonas* (Y, I, II) byla prokázána kometabolická redukce na 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluen, 2-amino-4,6-dinitrotoluen a diaminonitrotoluen [45]. Mezi dalšími produkty byly identifikovány 2,2',6,6'-tetranitro-6-azoxytoluen. Jako hlavní zdroj uhlíku byla využita glukóza. Kultivační médium bylo obohaceno také o kvasničný extrakt. Další degradace 2-amino-4,6-dinitrotoluenů a diaminonitrotoluenů již nebyla prokázána. Po vyčerpání TNT jako substrátu se dále postupně degradují pouze v prvních krocích produkované azoxysloučeniny.

Při studiích s *Escherichia coli* a *Pseudomonas* FR2 dochází za aerobních podmínek k redukci dvou ze tří nitroskupin na benzenovém jádře nitroreduktázovým enzymatickým systémem, který pro správnou funkci vyžaduje jako koenzym NAD(P)H nebo flavoprotein. Při redukcích nebyla prokázána přítomnost hydrogenáz [37].

Vanderberg a kolektiv [46] popsali štěpení aromatického kruhu TNT s využitím kmene druhu *Mycobacterium vaccae*. Reakce probíhá přes hydrid – Meisenheimerův komplex a jako produkty byly identifikovány nové oxidační metabolity: 2,4-diamino-6-nitrobenzylmethylether a 4-amino-2,6-dinitrobenzoová kyselina.

Jiná studie s *Pseudomonas fluorescens* [18] popsala aerobní odstranění aminoskupiny z meziprojektu degradace TNT – 2,4-diamino-6-nitrotoluen – za vzniku hydroxyderivátu a amoniaku. V dalším kroku degradace bylo prokázáno otevření aromatického kruhu.

Studie s *Pseudomonas savastanoi* prokázaly denitraci TNT (0,07 g/l) na 2,4-dinitrotoluen a NO_2^- [47]. Denitrace byla kuriózně podpořena přidavkem NO_2^- do média a odstraněním NH_4^+ . Přídavek glukosy podporoval degradaci TNT ke tvorbě 2-amino-4,6-dinitrotoluenů a byla potlačena denitrace. Úplná mineralizace nebyla v uvedeném případě prokázána.

S využitím kmene druhu *Serratia marcescens* při aerobní degradaci TNT (0,05 g/l), který současně sloužil jako jediný zdroj energie i uhlíku, byla prokázána tvorba 4-amino-2,6-dinitrotoluenů a 2-amino-4,6-dinitrotoluenů. Přídavek detergentů (Tween 80) zvyšoval rychlost uvedeného kroku degradace [48].

Aerobní degradace TNT s využitím bakteriálních kmenů má řadu praktických výhod.

1. Většina degradačně aktivních bakterií byla vyizolována přímo z kontaminovaných půd a dokáže se tak rychle adaptovat na nové prostředí na jiných kontaminovaných lokalitách.
2. Bakterie jsou oproti houbám i jiným organismům obecně méně citlivé k toxicitě TNT.
3. Ve srovnání s anaerobními reakcemi byla v aerobních podmínkách prokázána v mnoha případech dokonalá mineralizace TNT. [23, 25, 32, 42, 49]

Praktickou nevýhodou aerobních degradací TNT je akumulace hydroxysloučenin, které jsou v aerobních podmínkách relativně stálé a následně tvoří azoxysloučeniny. Často se také v prostředí váží s huminovými kyselinami. Uvedený proces snižuje efektivitu biodegradace a zabráňuje úplnému odbourání TNT. Při technologickém využití degradace TNT je tedy nutné úpravou podmínek těmto procesům zabránit.

Vazba meziproduktů TNT na zbytky huminových kyselin je navíc často specificky katalyzována některými mikrobiálními enzymy, jako jsou například peroxidázy [50].

Biodostupnost jiných meziproduktů – aminoderivátů – je podobně snížena jejich vazbou na nabitě zbytky chinolů, fenolů, aromatických kyselin a dusíkatých heterocyklů, které jsou rovněž součástí huminových kyselin. Množství takto vázaných meziproduktů degradace TNT je velmi závislé na podmínkách prostředí. Důležitými faktory jsou zejména pH, iontová síla obecně a také selektivní přítomnost iontů některých kovů (zejména železa) [51].

2.2.1.2.2 Houby

Nejčastějšími produkty anaerobních degradací nebo aerobních degradací s využitím mnoha kmenů bakterií jsou aminoderiváty. Tyto látky však v testech vykazují vyšší toxicitu než samotný TNT. Úspěšným řešením problému degradace (a úplné mineralizace) TNT se v posledních letech zdají být zástupci hub (mikromycet, plísň), zejména pak plísň bílé hniloby (white rot fungi).

Tyto mikroorganismy jsou v přirozeném prostředí schopny degradovat komplexní molekuly dřevního ligninu. Při degradacích aromatických jader, které tvoří přirozenou složku ligninu, jsou využívány mnohé extracelulární nespecifické a nestereoselektivní enzymy [52]. Vlastní reakce se dále účastní řada radikálů a velmi reaktivních intermediátů [53, 54, 55]. Bohaté a neselektivní enzymatické vybavení těchto mikromycet vedlo k jejich využití pro degradaci a mineralizaci řady důležitých aromatických polutantů, včetně TNT [56].

Houby bílé hniloby jsou schopny v poměrně rychlém kroku redukovat TNT na aminodinitrotoluen. Ligninolytické enzymy se pak účastní v dalších krocích úplné mineralizace [32, 34, 57]. Syntéza ligninolytických enzymů je indukována snížením koncentrace důležitých prvků v médiu (dusíku, uhlíku a síry) [58, 59]. Důležitým faktorem je dostatečný parciální tlak kyslíku. Indukce byla také prokázána v přítomnosti veratryl alkoholu. Koncentrace TNT, která toxicky inhibuje klíčení hub ze spor, je asi 20 mg/kg. Rostoucí houby jsou schopny tolerovat asi dvakrát vyšší koncentraci (až 50 mg/kg) [49].

Modelovým organismem při výzkumu biodegradace TNT pomocí hub se stala *Phanerochaete chrysosporium* [19, 23, 60]. Enzymatický systém účastnící se mineralizace TNT je tvořen lignin peroxidázou (LiP), mangan dependentní peroxidázou (MnP) a mnoha

oxidázami a reduktázami. Důležitými kosubstráty jsou peroxid vodíku, veratryl alkohol, oxalát a chinony [59, 61, 62, 63, 64]. Primárním substrátem není TNT, ale nejpravděpodobněji až hydroxylaminodinitrotoluen (respektive charakteristický poměr jeho redukované a oxidované formy). Některé lignolytické enzymy (zejména LiP) jsou velmi citlivé k reaktivním radikálům. Výhodou samotného hydroxylaminodinitrotoluen je schopnost účinně chránit LiP před negativními účinky peroxidu vodíku [32, 34].

Jak prokázaly experimenty, mineralizace TNT pomocí lignindegradačních enzymů probíhá skutečně až po prvotní redukci jiným enzymatickým aparátem [57]. První krok redukce TNT na aminodinitrotoluen nebo hydroxylaminodinitrotoluen je katalyzována NAD(P)H dependentní nitrareduktázou. Tento membránově vázaný enzym je citlivý na přítomnost kyslíku. Rovněž exprese genů tohoto enzymu je indukována odlišnými faktory než u lignindegradujícího systému.

Substrátem pro lignin peroxidázu (LiP) je pravděpodobně 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluen. Charakteristický poměr oxidované formy této molekuly zabraňuje reakcím LiP s jinými substráty a dochází tak k velmi selektivní a silné kompetitivní inhibici reakce s radikály [65].

Studie degradace radioaktivně značeného ^{14}C -TNT (0,03 g/l) prokázala selektivní rozdělení radioaktivity mezi jednotlivé produkty reakce [34]. 13,9 % radioaktivity bylo detekováno v CO_2 , 31,7 % bylo nalezeno v myceliu, 20,3 % ve vodě rozpustných podílech a 20,8 % v organickém extraktu. Definice dusíku indukovala až 40% mineralizaci TNT a rovněž indukovala expresi LiP.

Fernando a kolektiv [23] studovali mineralizaci TNT přítomného ve vodném médiu a v půdě v reálných environmentálních koncentracích v půdní matrici a ve vodném roztoku.

V půdní matrici obohacené o obilné klasy pozorovali po 90 dnech 18,4% mineralizaci (výchozí koncentrace TNT 10 g/kg). V organickém podílu bylo po degradaci nelezeno 62,6 % metabolitů, 11,5 % bylo sorbováno na obilné klasy. Přibližně 15 % z původního množství TNT zůstalo po 90 dnech nezměněno.

V roztoku došlo již po 15 dnech k 18% mineralizaci TNT (původní koncentrace 100 mg/l). Po prodloužené 90 denní inkubaci již nedošlo k výrazné změně (bylo mineralizováno 19,6 % původního TNT). 12,3 % z původního množství TNT zůstalo nezměněno.

Vlastní metabolismus TNT enzymatickým aparátem hub však není doposud dostatečně prostudován.

Některé práce [33] naznačují, že za ligninolytických podmínek dochází k redukci TNT na 4-amino-2,6-dinitrotoluen a 2-amino-4,6-dinitrotoluen. Bylo prokázáno, že redukce TNT koreluje s transportem protonových iontů přes buněčnou membránu [33]. Jiné studie [66] naopak vliv redoxního membránového potenciálu na redukci TNT vylučují.

Další kroky degradace TNT nebyly doposud v literatuře popsány. Pravděpodobně se při následných reakcích uvolňuje NO_2^- a methanol po působení lignin degradujícího enzymatického komplexu [67].

Při srovnávacích experimentech s několika kmeny druhů hub bílé hniloby (*Phanerochaete sordii*, *Phlebia brevispora*, *Cyathus stercoreus*) bylo prokázáno, že odstraňování TNT z roztoku (původní koncentrace 0,09 g/l) probíhá 2 – 9x rychleji než pokles mutagenity roztoku [68]. Hlavními metabolity degradace TNT byly 4-amino-2,6-dinitrotoluen, 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 2,4-diamino-6-nitrotoluen a 2,6-diamino-4-nitrotoluen.

Rozsáhlý screening degradačních vlastností 91 druhů hub provedli Scheibner a kolektiv [69]. Autoři studovali mineralizaci TNT u zástupců dřevokazných hub a hub dřevní hniloby, dále u hub dekompozice odpadů a také u dalších saprofytických mikromycet. Mezi enzymaticky nejaktivnější patřily *Clitocybula dusenii* TMB 12 a *Stropharia rugosa-annulata* DSM 11 372. U uvedených kmenů bylo po 64 denní inkubaci mineralizováno 42 % (resp. 36 %) TNT z původní koncentrace 100 µmol/l.

Experimenty s *Phlebia radiata* [70] prokázaly redukci TNT a aminodinitrotoluen (0,03 g/l) na 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluen a aminodinitrotoluen. Reakce probíhala za ligninolytických podmínek. Důležitým faktorem prvního kroku redukce TNT byla přítomnost nitrátoreduktázy jako membránově vázaného enzymu. Další kroky degradace byly závislé na peroxidázách uvolňovaných z buňky do prostředí.

Experimenty prováděné za neligninolytických podmínek vedly k produkci neznámých metabolitů [32, 49]. 2-amino-4,6-dinitrotoluen nebyl mezi produkty degradace TNT prokázán [71].

Při hledání vhodných mikroorganismů pro degradaci TNT byly prováděny experimenty s druhem *Suillus variegatus*, který patří mezi houby ektomykorhizy (houby žijící v symbiotickém vztahu s kořeny vyšších rostlin) [36]. TNT v koncentraci 2-10 µg/ml způsobil 50% pokles v produkci biomasy. Tato hodnota charakterizuje toleranci daného druhu houby k toxicitě TNT. Ve srovnání s *Phanerochaete chrysosporium* dochází k indukci genů pro lignindegradující enzymy také v přítomnosti uhlíkového zdroje – deficit uhlíku tak není limitujícím faktorem pro nastartování syntézy degradačních enzymů. Dalším rozdílem je fakt, že degradace TNT je u *S. variegatus* urychlena v přítomnosti nadbytku dusíku. Rovněž první krok redukce TNT není u *S. variegatus* vázán na membránu. První redukci TNT katalyzují extracelulární enzymy.

Využití hub k biodegradaci TNT má několik výhod.

1. Degradační enzymy hub jsou značně nespecifické a jsou schopny katalyzovat nejen transformaci přirozených substrátů (lignin), ale i mnohých přírodních i antropogenních aromatických látek.

2. Indukce enzymatického komplexu degradace ligninu je nejčastěji startována poklesem koncentrace přirozeného, snadno zpracovatelného zdroje uhlíku. Indukce enzymů je tedy nezávislá na přítomnosti vyšších koncentrací TNT jako induktoru. Za těchto podmínek lze tedy odbourat i velmi nízké koncentrace TNT (např. v pitné vodě) nebo využít mikromycet v dočišťovací fázi degradace TNT po aplikaci jiné technologie.

3. Syntéza enzymů do extracelulárního prostoru umožňuje houbám degradovat i látky toxické pro samotnou buňku nebo metabolizovat mnohé nerozpustné sloučeniny. Příkladem je růst hub na ligninocelulózovém odpadu [33].

4. Experimenty s houbami neprokázaly produkci azoxysloučenin [6]. Během degradace tak nedochází ke snížení biodostupnosti meziproduktů, jak je často pozorováno u bakterií.

Objektivně je však třeba zmínit také nevýhody odbourávání polutantů s využitím hub.

1. Biodegradace je zpravidla velmi pomalá a vyžaduje externí přídavky nutrientů do média. Dochází tak ke zvyšování celkového objemu reakční směsi.

2. Nevýhodou je špatná adaptace hub na nové podmínky v půdách, protože kmeny mikromycet s vhodnými předpoklady k biodegradaci TNT nejsou zpravidla izolovány z půd. Např. u *Phanerochaete chrysosporium* byla prokázána inhibice růstu v přítomnosti běžných půdních bakterií rodu *Pseudomonas* nebo mnohých actinomycet. Tyto bakterie produkují často phenaziny, které působí na houby jako fungistatika nebo fungicida [72].

2.2.1.2.3 Rostliny

Mezi aerobními degradacemi je nutno zmínit také fytotransformace.

Modelovými organismy pro odstraňování TNT z kontaminovaných půd mohou být například bobovité rostliny [73] nebo zástupci rodu *Nitella* [74]. V obou studovaných případech byly v rostlině nebo v růstovém médiu nalezeny po předchozí inkubaci s TNT jako výsledné produkty aminonitrotolueny.

V jiné práci [75] autoři studovali transformace TNT u *Myriophyllum spicatum*, *Myriophyllum aquaticum* a *Catharanthus roseus*. Po předchozí inkubaci s TNT (0,08-0,1 g/l) byla v rostlinných pletivech identifikována malá množství 4-amino-2,6-dinitrotolueny a 2-amino-4,6-dinitrotolueny. Další neznámé metabolity byly pravděpodobně vázány na organické komponenty v rostlinném těle. Triaminotoluen nebo azoxysloučeniny nebyly jako produkty transformace TNT v rostlinách nalezeny.

Největší podíl metabolitů fytotransformace TNT byl deponován v rostlinném kořeni [76]. Úplná mineralizace TNT s využitím rostlin nebyla prozatím prokázána.

3. Technologická zařízení a postupy

Kromě biologických metod odbourání explosiv jsou technologicky zpracovány metody fyzikálně-chemické degradace. Nejefektivnější a nejvíce využívanou metodou pro odstranění TNT z půd je spalování. Vzhledem k nutnosti transportu vytěžené půdy do spaloven a s přihlédnutím k ceně energie potřebné ke spálení je tato metoda nejen „neekologická“, ale i finančně značně náročná.

Základní poznatky o mechanismech a podmínkách mikrobiální degradace TNT, se staly podkladem rozvoje množství technologických zařízení a postupů. Mezi nejčastěji citované technologické metody degradace explosiv patří využití tzv. soil spurty reactors [77, 78, 79], kompostování [11, 80, 81], land farming [82] a tzv. perkolační techniky.

3.1 Sanace kontaminovaných půd kompostováním

Z počátku výzkumu využití kompostování pro degradaci TNT se vycházelo z předpokladu, že nejvhodnější jsou metody, které využívají zvýšení podílu vodné fáze v půdách, tzv. biodegradace v půdním bahně. Tyto pokusy byly prováděny nejčastěji ze anaerobních podmínek, zatímco během pravého (moderního) kompostování dochází mnohdy k intenzivnímu provzdušňování [11, 83].

Další laboratorní pokusy však zahájily rozvoj nových technologií kompostování.

Základním předpokladem je vytvoření kompostu. Kompost pro účely degradací je tvořen nehomogenní směsí pomleté a vysušené kontaminované zeminy. Dále se do půdy přidává organický substrát společně s konsorciem mikroorganismů (například koňský hnůj, zbytky nasekané trávy nebo zahradní kompost).

Během samotného procesu tlení a biochemických transformací dochází v kompostu k nárůstu teploty, ke změnám parciálního tlaku kyslíku a také pH. Analýza vzniklých produktů kompostování je v současnosti komplikovaná odběrem reprezentativního vzorku. Degradční produkty a také samotný TNT se totiž váže na organické zbytky a jejich koncentrace se tak v různých místech kompostové směsi značně liší.

Bylo prokázáno, že biodegradace výbušnin se uskutečňuje nejrychleji při teplotě 55°C, postačující teplotou je ale i teplota 35°C [84]. Během celého procesu kompostování TNT je nutné sledovat aktuální teplotu a koncentraci kyslíku v kompostu. Mezi dalšími faktory ovlivňujícími např. koncentrace konečných metabolitů, toxicitu, riziko detonace půdy apod., lze jmenovat například délku kompostování, intervaly provzdušňování nebo zvlhčování [84, 85, 86, 87].

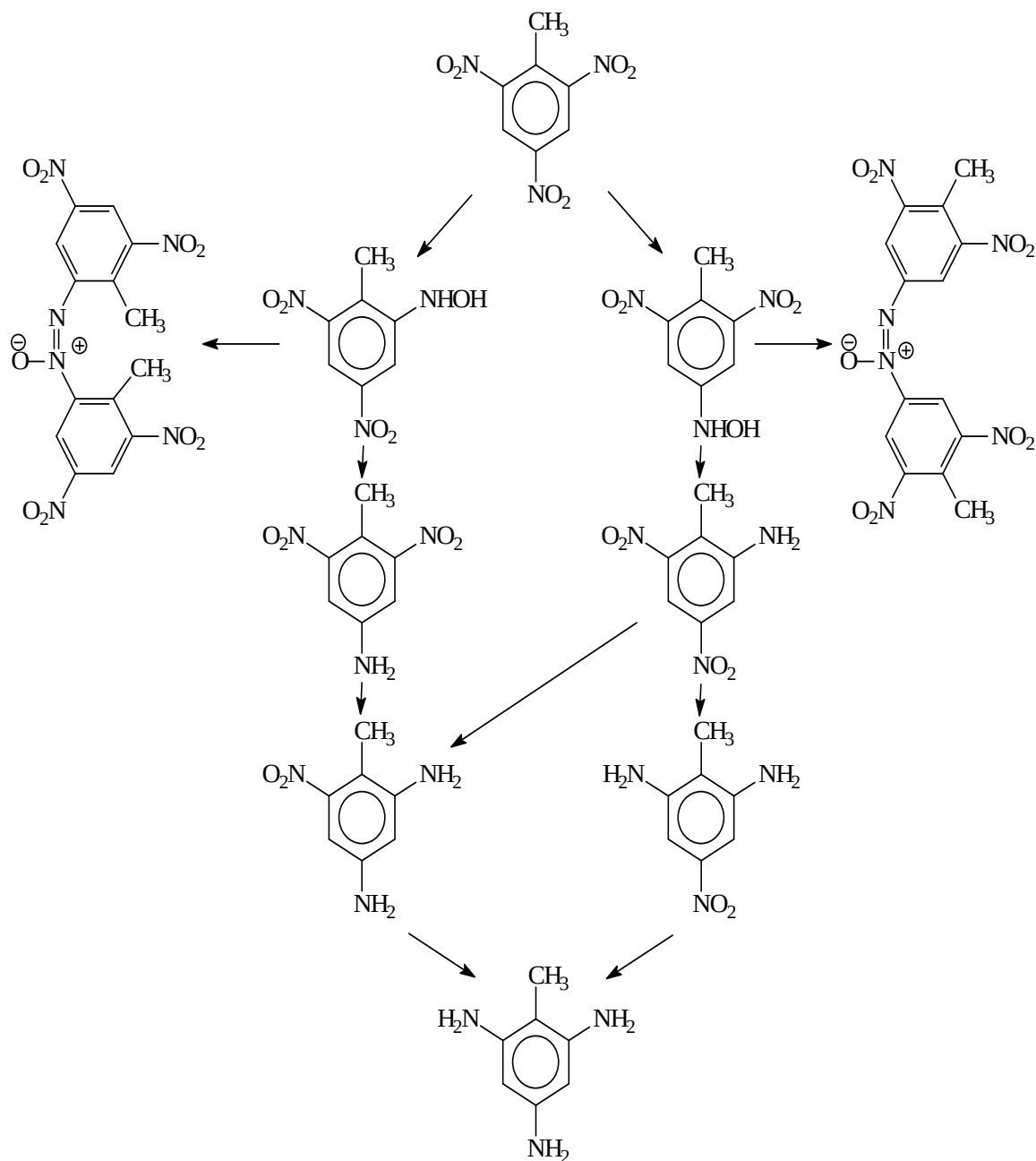


Schéma 3

(převzato z práce [88])

Metodu kompostování výbušných látek přepracovali Lowe a kolektiv pro své experimenty [4]. Byla navržena technologie degradace TNT v uzavřených statických nádobách s mechanickým třepáním a intenzivním vzdušněním.

Breitung a kolektiv [39] srovnávali v laboratorních podmínkách dva různé systémy kompostování TNT založené na jedné straně na intenzivním vzdušnění a na straně druhé na udržení anaerobních podmínek. Ve vzdušněném kompostu došlo k relativně velmi rychlému poklesu koncentrace TNT. Z původní koncentrace 20 g/kg bylo po 28 dnech detekováno méně než 8 %. Po navození kyselého prostředí však došlo zpětně k nárůstu až na 25 %.

Důležitým procesem úbytku TNT tedy není jen biotransformace, ale také sorbce a další fyzikálně-chemické děje.

Druhý kompost byl po 65 dní udržován v anaerobních podmínkách. Jako produkty degradace TNT byly prokázány aminoderiváty. V následné aerační fázi degradace (97 dní) byly tyto aminoderiváty dále degradovány. Po prodloužené době byla toxicita produktů v anaerobním kompostu ve srovnání s aerobním dokonce nižší.

Bylo prokázáno, že konečné produkty degradace byly ve značných množstvích vázány na huminové a fulminové kyseliny.

Další experimenty zaměřené na degradaci TNT s využitím různých poměrů anaerobní a aerobní fáze uskutečnili např. Bruns-Nagel a kolektiv [89, 90].

V jiném experimentu [89, 90] anoxicko/aerobního kompostování TNT došlo během období 20 týdnů k poklesu původních koncentrací TNT (1,2-1,7 g/kg) až na 0,012-0,025 g/kg. Většina vzniklých aminoderivátů byla zabudována do matrice. Testy s výluhem z kompostu prokázaly velmi nízkou toxicitu.

V dalších experimentech [11, 91] byl TNT v laboratorních podmínkách smíchán s kompostem (koncentrace 0,015 g/g půdy) a promícháván se vzduchem bez CO₂. Po této fázi byla prokázána redukce nitroskupin na aminoskupiny, byla prokázána také tvorba azoxysloučenin. Uvedené metabolity byly identifikovány jak v termofilním, tak v mezofilním uspořádání experimentu.

Kompostování lze se značným úspěchem využít i u vysoce kontaminovaných půd (koncentrace TNT může být i vyšší než 1 g/kg suché půdy) [92]. V přírodních podmínkách (*in situ*) však v půdě nedochází k odbourávání TNT rychle. Velký vliv na přirozenou degradaci má zejména vstupní koncentrace TNT, neboť může ve vyšších koncentracích působit toxicky, a tak znemožňovat nastartování vlastních degradačních reakcí. Důležitým faktorem v přírodním prostředí je také střídání období sucha a dešťů, a dále proměnlivý obsah kyslíku v různých půdních vrstvách. Velkou roli hraje také teplota [25].

Shrnutí některých výhod a nevýhod kompostování:

1. Cena biodegradace touto technologií se zvyšuje o náklady na těžbu zeminy, její transport, dodávání externích zdrojů uhlíku a dusíku a dalších organických substrátů (až 90 % celkového objemu) [89, 90]. Značnou položku tvoří také cena velkoobjemové inokulace zeminy konzorciem mikroorganismů [78].

2. Problémem metody kompostování je dlouhá inkubační doba.

3. Ve většině experimentů nebyla objasněna biodegradační cesta TNT. Předpokládá se, že TNT je redukován na aminoderiváty, které se kovalentně váží na organické látky původní matrice.

4. Během kompostování TNT nebyla prokázána mineralizace a nebylo prokázáno štěpení aromatického kruhu.

3.2 Dekontaminace půd využitím Land farming

Land farming je metoda velmi podobná kompostování. Rozdílem je menší ředění původní kontaminované zeminy aditivy – živiny, inokulum apod.

Půda, která je jen nepatrně obohacena o externí živiny (sacharidy, vitaminy, minerály), je intenzivně vlhčena, provzdušňována a mechanicky míchána.

Widrig a kolektiv [82] publikovali výsledky svých experimentů degradace TNT touto metodou. Během 12 měsíců poklesla koncentrace TNT z původních 4 g/kg na 0,1-0,001 g/kg v závislosti na technologických podmínkách. Byla prokázána 20% mineralizace TNT, 25 % metabolitů vzniklých z původního množství TNT bylo zabudováno do buněčných kompartment a 10 % bylo adsorbováno na půdní matici. Mezi hlavními produkty byly prokázány 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen a butan-2,3-diol.

3.3 Sanace půd metodou Soil slurry reactors

K dekontaminaci půd s velmi vysokým obsahem explosivních látek se využívá tzv. slurry reactors. Výhodou této metody je minimální ředění půdy kompostem, a také významná mineralizace TNT a také relativně vysoká rychlost odbourání. Nevýhodou je nemožnost využít tuto metodu *in situ*, obtížný způsob inokulace a vysoká cena sušení půdy [89, 90]. Šedesátidenní experimenty [24, 77] spojené s mechanickým promícháváním půdy s živinami a elektronovými akceptory a intenzivním provzdušňováním prokázaly 100% transformaci původních koncentrací TNT a 24% mineralizaci.

Funk a kolektiv [78, 79] popisují anaerobní modifikaci této metody. Byla prokázána transformace TNT na nearomatické sloučeniny. Mineralizace na CO₂ však prokázána nebyla.

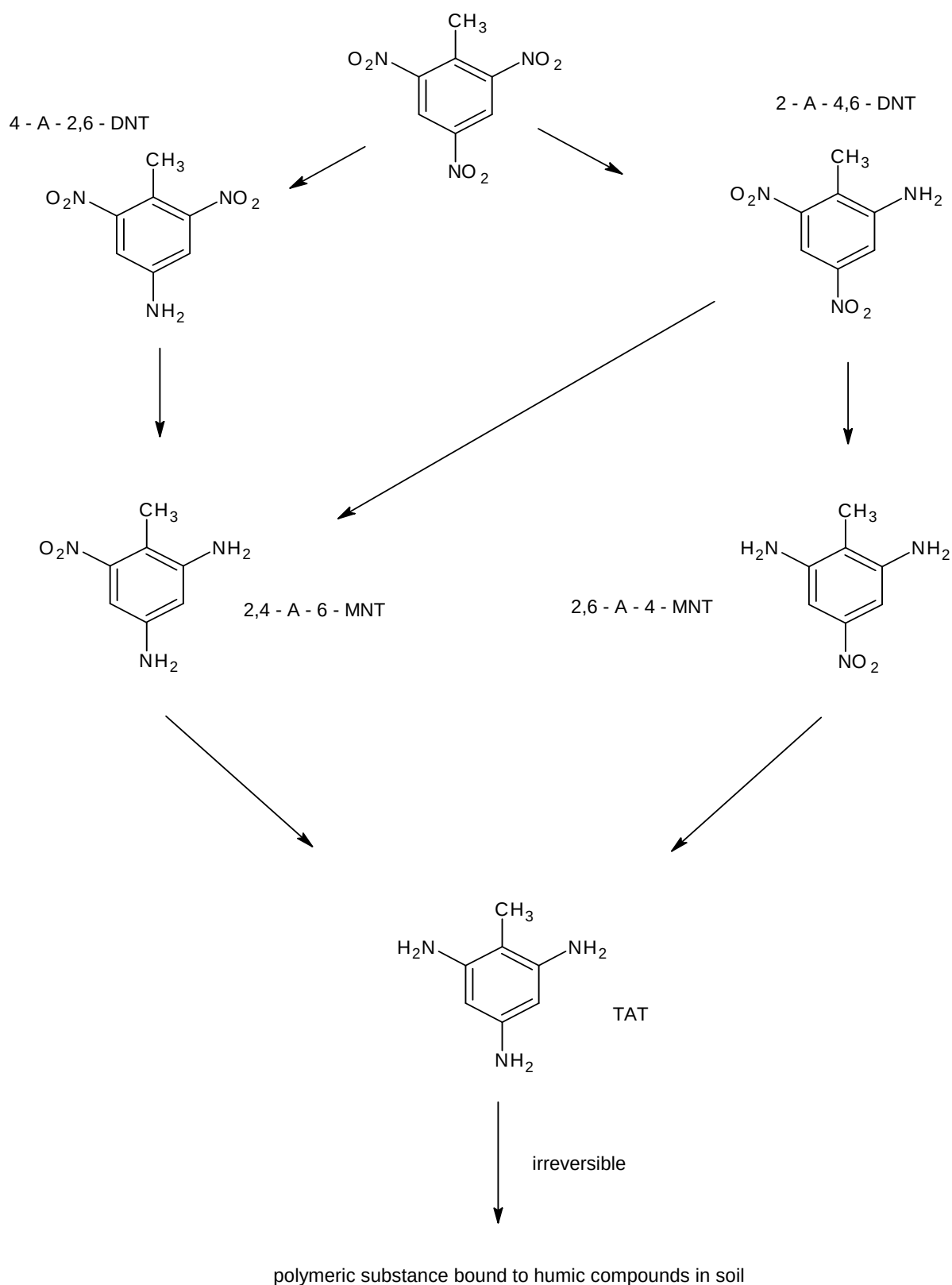


Schéma 4

(převzato z práce [65])

Laboratorní experimenty se „soil slurry reactors“ uskutečnili také Boopathy a kolektiv [21]. Množství kyslíku v půdní vrstvě bylo závislé na hloubce směsi v reaktoru. S rostoucí

hloubkou parciální tlak kyslíku exponenciálně klesá. Během experimentu byla kontaminovaná půda semikontinuálně nebo dávkově vyměňována a doplňována o externí zdroj uhlíku. Z původní koncentrace TNT 4-12 g/kg došlo po 15 dnech z 23 % k mineralizaci, 8 % původního množství zůstalo vázáno na půdu, 27 % bylo zabudováno do biomasy. Mezi produkty degradace byly identifikovány 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 4-amino-2,6-dinitrotoluen, 2,4-diamino-6-nitrotoluen a butan-2,3-diol. V důsledku kyselého pH nebyly azoxylátky mezi metabolity prokázány.

3.4 Dekontaminace perkolačními technikami

Metoda tzv. perkolace neboli vyluhování se používá nejčastěji k odstraňování nižších koncentrací TNT z půd (koncentrace menší než 0,3 g/kg půdy).

Bruns-Nagel a kolektiv [89, 90] promývali cyklicky za aerobních podmínek kolonu naplněnou 450 g půdy kontaminované TNT. K promývání byl využit pufr obohacený o uhlíkaté a dusíkaté látky. Po 19 dnech bylo prokázáno významné snížení koncentrací nitroaromátů a také pokles celkové toxicity ve výluhu z kolony.

Dále [89, 90] promývali kolonu naplněnou půdou s TNT v koncentraci 0,07-2,1 g/kg perkolačním roztokem tvořeným fosfátovým pufrem s různými aditivami (glukosa, sulfid amonný). Mutagenita a toxicita výluhu z kolony byla po 19 dnech významně redukována a TNT nebyl po této době ve výluhu v detekovatelné koncentraci. Hlavním vedlejším metabolitem v roztoku i v půdě byl během promývání 4-N-acetylamino-2-amino-6-nitrotoluen.

3.5 Další metody

Kromě zmíněných často citovaných metod jsou publikovány i jiné metody nebo modifikace a varianty odstraňování TNT z kontaminovaných půd.

Jako možná remediační metoda byla v literatuře diskutována humifikace. Metoda je založena na reakci degradačních metabolitů TNT s organickou půdní hmotou. Důležitým metabolitem je pravděpodobně 2,4-dihydroxyamino-6-nitrotoluen, který se váže na huminovou matici pomocí bakteriální peroxidázy v aerobním prostředí. Vytvořená kovalentní vazba odolává i drastickým změnám pH, lze ji však zrušit například saponizací [93].

Důležitým směrem základního výzkumu je také studium vhodných kombinací degradačních mikroorganismů – jejich konsorcií [48]. Příkladem takové studie je například [94] posuzování degradačních schopností aerobně rostoucího konsorcia s převahou zástupců rodu *Pseudomonas*. Další rozbor lze například najít v práci [41].

Některé studie se zabývaly spojením biodegradace s chemickou cestou redukce TNT. Heijman a kolektiv [95] studovali bakteriální redukci nitroaromátů v anaerobním prostředí.

V dalších krocích bylo jako redukčního činidla využito iontů Fe^{2+} vázaných v půdní matrici. Ionty železa tak sloužily jako nebiologické akceptory elektronů.

Citována je také často abiotická degradace TNT v půdě i ve vodě pomocí tzv. „Fenton oxidace“ (H_2O_2 , Fe^{2+}).

Vhodnou kombinací může být spojení promývání půdy v kolonce s následnou fytoremediací. [96, 97, 98]

Publikováno bylo i spojení abiotické oxidace s následnou bioremediací s využitím bakterií [99, 100].

Během optimalizace technologických procesů je nutné také studovat vhodnou inokulaci půd mikroorganismy a pozornost musí být věnována i uchovávání a skladování mikroorganismů. Například spory *Phanerochaete chrysosporium* zůstávají po zabudování do alginátové matrice a přidavkem nutrientů životaschopné při teplotě skladování 5°C až jeden rok [101].

Při remediacích TNT byly kromě mikroorganismů využity i izolované enzymy [74]. Enzymy je možné preparovat a použít přímo v roztoku nebo imobilizované na sorbentu. Práce s enzymy je ve srovnání s mikroorganismy finančně méně náročná. Degradace xenobiotik probíhá rychleji, protože není nutná adaptace celých buněk na nové prostředí (tzv. lag fáze). Při práci je však třeba sledovat vznik vedlejších produktů degradace. Mezi významné enzymy, které byly využity při degradacích nitroaromátů, patří například lignin peroxidáza a mangan peroxidáza [102].

4. Shrnutí

Za ekonomicky i provozně nejvhodnější metodu odstraňování explosiv z půd lze považovat dekontaminace *in situ*. V mnoha případech je TNT degradován kometabolicky a je tedy nutné dodávat externí zdroj uhlíku (např. *Phanerochaete chrysosporium* vyžaduje obilné klasy, bakterie rodu *Pseudomonas* metabolizují TNT v přítomnosti kvasničného extraktu a glukosy). Dodávaný uhlíkový zdroj sice podporuje primární transformaci TNT, na druhé straně však působí negativně na kompletní mineralizaci.

Velkým problémem *in situ* metod je střídání sucha a deště zejména v letním období. Velký vliv na degradaci má i provzdušňování půdy a tolerance mikroorganismů k toxickým účinkům TNT a jeho metabolitů.

Kompletní mineralizace TNT byla doposud prokázána pouze v aerobním uspořádání s houbami bílé hniloby a u některých bakterií izolovaných z kontaminovaných půd. Při koncentracích TNT vyšších než 100 $\mu\text{mol/l}$ je mineralizace většinou inhibována.

Striktně anaerobní mikroorganismy redukují nitroskupiny TNT rychleji a nedochází k tvorbě azoxysloučenin. Metabolity anaerobních degradací se často nacházejí kovalentně vázané na huminové složky půdy.

Obecně lze za nejvhodnější a nejperspektivnější považovat vhodnou kombinaci aerobního a anaerobního odstraňování TNT [25].

5. Literatura

- [1] Feller, A. K. (1993). Literature survey "Biodegradation of TNT and other important explosives". Federal office of defense technology and procurement Federal armed forces research center for NBC protection. L0529-3-A/038/P.
- [2] Bednařík, K. (2003). Toxicita trinitrotoluenů a produktů jejich biotransformací. Pojednání k disertační práci.
- [3] Higson, F. K. (1992). Microbial degradation of nitroaromatic compounds. *Adv. Appl. Microbiol.*, **37**, 1-19.
- [4] Lowe, W., Williams, R., Marks, P. (1989). Composting of explosive-contaminated soil technology. U.S.Army toxic and hazardous materials agency. CETHA-TE-CR-90027.
- [5] Nay, M. W., Randall, C. W., King, P. H. (1974). Biological treatability of trinitrotoluene manufacturing wastewater. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, **46**, 485-497.
- [6] Tan, E. L., Ho, C. H., Griest, W. H., Tyndall, R. L. (1992). Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *J. Toxicol. Environ. Health*, **36**, 165-175.
- [7] Hathaway, J. A. (1977). A review of reported dose-related effects providing documentation for a workplace standard. *J. Occupat. Med.*, **19**, 341-345.
- [8] Hankenson, K., Schaeffer, D. J. (1991). Microtox assay of trinitrotoluene, diaminonitrotoluene and dinitromethylaniline mixtures. *Bull. Environ. Contem. Toxicol.*, **46**, 550-553.
- [9] Pearson, J. G., Glennon, J. P., Barkley, J. J. (1997). An approach to the toxicological evaluation of a complex industrial wastewater. *Aquatic toxicology, Proc. 2nd Annu. Symp. Aquat. Toxicol.*, Cleveland, Ohio. ASTM Spec. Techn. Publ. 284-301.
- [10] Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, K. (1985). Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, **147**, 219-229.
- [11] Kaplan, D. L., Kaplan, A. M. (1982). Thermophilic biotransformations of 2,4,6-trinitrotoluene under simulated composting conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 757-760.
- [12] Ahlborg, J. G., Einistoe, P., Sorsa, M. (1988). Mutagenit aktivita a metaboliti v moči pracovníků vystavených trinitrotolenu (TNT). *Brit. J. Industr. Med.*, **45**, 353-358.
- [13] Rosenblatt, D. H., Burrows, E. P., Mitchell, W. R., Parmer, D. L. (1991). *Organic explosives and related compounds*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

- [14] Dale, H. H. (1921). The fate of TNT in the animal body. *Medical. Res. Council GB Spec. Rep. Ser.*, **58**, 53-61.
- [15] Channon, H. J., Mills, G. T., Williams, R. T. (1944). The metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (alpha-TNT). *Biochemistry*, **38**, 70-85.
- [16] Snyder, R. K. (1946). Metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) excreted in the urine of dogs. *J. Industr. Hyg. Toxicol.*, **28**, 59-75.
- [17] Rogovskaja, Z. J. (1951). Wlijanie trinitrotoluola na mikroorganizmi i biochemizeskie prozessi samootzischenija vodi. *Mikrobiologija*, **20**, 265-272.
- [18] Naumova, R. P., Amerkhanova, N. N., Shaikhutdinov, V. A. (1988). Possibility of deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology*, **57**, 169-173.
- [19] Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., Aust, S. D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. *Science*, **228**, 1434-1436.
- [20] Won, W. D., Heckly, R. J., Glover, D. J., Hoffsommer, J. C. (1974). *Appl. Environ. Microbiol.*, **27**, 513-516.
- [21] Boopathy, R., Manning, J., Kulpa, C. F. (1998). A laboratory study of the bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil using aerobic/anoxic soil slurry reactor. *Water Environ. Res.*, **70**, 80-86.
- [22] Traxler, R. W., Wood, E., Delaney, J. M. (1974). Bacterial degradation of alpha- TNT. *Dev. Ind. Microbiol.*, **16**, 71-76.
- [23] Fernando, T., Bumpus, J. A., Aust, D. S. (1990). Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1666-1671.
- [24] Boopathy, R., Wilson, M., Kulpa, C. F. (1994). Anaerobic removal of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) under different electron accepting conditions: Laboratory study. *Water Environ. Res.*, **65**, 271-275.
- [25] Bradley, P. M., Chapelle, F. H. (1995). Factors affecting microbial 2,4,6-trinitrotoluene mineralization in contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 802-806.
- [26] Gorontzy, T., Kuver, J., Blotevogel, K.-H. (1993). Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 1331-1336.
- [27] Preuss, A., Fimpel, J., Diekert, G. (1993). Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.*, **159**, 345-353.

- [28] Johnson, G. R., Smets, B. F., Spain, J. C. (2001). Oxidative Transformation of Aminodinitrotoluene Isomers by Multicomponent Dioxygenases. *Am. Soc. Microbiol.*, **12**, 5460-5466.
- [29] Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S., Ampleman, G. (2000). Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 605-618.
- [30] Won, W. D., di Salvo, L. H., Ng, L. (1976). Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 576-580.
- [31] Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Knackmuss, H.-J. (1994). Identification of hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by Mycobacterium strain. *J. Bacteriol.*, **176**, 932-934.
- [32] Michels, J., Gottschalk, G. (1994). Inhibition of the Lignin Peroxidase of Phanerochaete-Chrysosporium by Hydroxylamino-Dinitrotoluene, an Early Intermediate in the Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 187-194.
- [33] Stahl, J. D., Aust, S. D. (1995). Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Environ. Sci. Res.*, **49**, 117-133.
- [34] Stahl, J. D., Aust, S. D. (1993). Metabolism and detoxification of TNT by Phanerochaete chrysosporium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **192**, 477-482.
- [35] Ederer, M. M., Lewis, T. A., Crawford, R. L. (1997). 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: Comparison with non-adapted bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 82-88.
- [36] Lewis, T. A., Goszczynski, S., Crawford, R. L., Korus, R. A., Admessu, W. (1996). Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by Clostridium bifermentans. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4669-4674.
- [37] McCormick, N. G., Feeherry, F. E., Levinson, H. S. (1976). Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 946-958.
- [38] Gilcrease, P. C., Murphz, V. G. (1995). Bioreconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4209-4212.
- [39] Breitung, J., Brunsnagel, D., Steinbach, K., Kaminski, L., Gemsa, D., Vonlow, E. (1996). Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 795-800.

- [40] Rieger, P. G., Knackmuss, H. J. (1995). Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. *Environ. Sci. Res.*, **49**, 1-18.
- [41] Boopathy, R., Manning, J. F. (1996). Characterization of partial anaerobic metabolic pathway for 2,4,6-trinitrotoluene degradation by a sulfate-reducing bacterial consortium. *Can. J. Microbiol.*, **42**, 1203-1208.
- [42] Bradley, P. M., Chapelle, F. H., Landmeyer, J. E., Schumacher, J. G. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2170-2175.
- [43] Focht, D. D. (1992). *Soil. Sci.*, **154**, 300-307.
- [44] Lenke, H., Wagner, B., Daun, G., Knackmuss, H.-J. (1994). TNT-contaminated soil: A sequential anaerobi/aerobic process for bioremediation., *Proc. Abstr. 97th Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, Anet. Q-383, 456.
- [45] Won, W. D., Heckly, R. J., Glover, D. J., Hoffsommer, J. C. (1973). Metabolic disposition of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol.*, **27**, 513-516
- [46] Vanderberg, L. A., Perry, J. J., Unkefer, P. J. (1995). Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycrobacterium vaccae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 937-945.
- [47] Martin, J. L., Comfort, S. D., Shea, P. J., Kokjohn, T. A., Drijber, R. A. (1997). Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Can. J. Microbiol.*, **43**, 447-455.
- [48] Montpas, S., Samson, J., Langlois, E., Lei, J. Y., Piche, Y., Chenevert, R. (1997). Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 291-294.
- [49] Spiker, J. K., Crawford, D. L., Crawford, R. L. (1992). Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive-contaminated soils by the white rot *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3199-3202.
- [50] Klivanov, A. M., Alberti, B. N., Morfia, J., Felshin, L. M. (1980). Enzymatic removal of toxic phenols and anilins from waste waters. *J. Appl. Biochem.*, **2**, 414-421.
- [51] Shindo, H., Huang, P. M. (1984). Catalytic effects of manganese (IV), iron (III), aluminium and silicon oxide on the formation of phenolic polymers. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, **48**, 927-934.
- [52] Barr, D. P., Aust, S. D. (1994). *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 78A-87A.
- [53] Hattaka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungus: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 125-135.

- [54] Hofrichter, M., Fritsche, W. (1996). Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank coal depolymerizing activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 220-225.
- [55] Hofrichter, M., Fritsche, W. (1996). Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal humic acid depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b 19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 419-424.
- [56] Aust, S. D. (1990). Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microb. Ecol.*, **20**, 197-209.
- [57] Bumpus, J. A., Tatarko, M. (1994). Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibit lignin peroxidases. *Curr. Microbiol.*, **28**, 185-190.
- [58] Jeffries, T. W., Choi, S., Kirk, T. K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 290-296.
- [59] Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, **117**, 277-285.
- [60] Bumpus, J. A., Aust, S. D. (1986). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. *BioEssay*, **6**, 166-170.
- [61] Ander, P., Mistra, C., Farrell, R. L., Ericsson, K.-E. (1990). Redox reactions in lignin degradation: interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose: quinone oxidoreductase. *J. Biotechnol.*, **13**, 189-198.
- [62] Gold, M. H., Kuwahara, M., Chiu, A. A., Glenn, J. K. (1984). Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diaryl propane oxygenase from the white rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 353-362.
- [63] Kelley, R. L., Reddy, C. A. (1986). Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, **144**, 248-253.
- [64] Kersten, P. J. (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2936-2940.
- [65] Stolpmann, H., Lenke, H., Warrelmann, J., Heuermann, E., Fruechticht, A., Daun, G., Knackmuss, H.-J. cap. Bioremediation of TNT-Contaminated Soil by the TERRANOX[®] System from *Biological Unit Processes for Hazardous Waste Treatment* edited by Hincee, R. E., Skeen, R. S., Sayles, G. D. (1995).

- [66] Rieble, S., Joshi, D. K., Gold, M. H. (1994). Aromatic nitroreductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 298-304.
- [67] Vali, K., Brock, B. J., Joshi, D. K., Gold, M. H. (1992) Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 221-228.
- [68] Donnelly, K. C., Chen, J. C., Huebner, H. J., Brown, K. W., Autenrieth, R. L., Bonner, J. S. (1997). Utility of four strains of white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1105-1110.
- [69] Scheibner, K., Hofrichter, M., Herre, A., Michels, J., Fritsche, W. (1997). Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 431-431.
- [70] Van Aken, B., Skubisz, K., Naveau, H., Agathos, S. N. (1997). Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 813-817.
- [71] Barrows, S. E., Frajer, C. J., Truhlar, D. G., Elovitz, M. S., Weber, E. J. (1996). *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 3028-3038.
- [72] Radtke, C., Cook, W. S., Anderson, A. (1994). Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 274-280.
- [73] Palazzo, A. J., Leggett, D. C. (1986). *J. Environ. Qual.*, **15**, 49-52.
- [74] Wolfe, N. L., Ou, T.-Y., Gunnison, D. (1994). U. S. Army Corp of Engineers. Technical Report Irrp-94-3.
- [75] Hughes, J. B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J., Bhadra, R. (1997). Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 266-271.
- [76] Vanderford, M., Shanks, J. V., Hughes, J. B. (1997). Phytotransformation of trinitrotolunene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 277-280.
- [77] Boopathy, R., Manning, J., Montemagno, C., Kulpa, C. F. (1994). Evaluation of soil slurry reactor system for treating soil contaminated with munition compounds. *Proc. 94th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, p. 456. May 23-27, Las Vegas, NV, USA.
- [78] Funk, S. B., Crawford, D. L., Crawford, R. L. (1993). Initial-phase for bioremediation of munitions compound-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2171-2177.

- [79] Funk, S. B., Crawford, D. L., Crawford, R. L., Mead, G., Davis-Hoover, W. (1995). Full scale anaerobic bioremediation of trinitrotoluene (TNT) contaminated soil. A US EPA SITE program demonstration. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **51**, 625-633.
- [80] Pennington, J. C., Hayes, C. A., Myers, K. F., Ochman, M., Gunnison, D., Felt, D. R., McCormick, E. F. (1995). Fate of 2,4,6-trinitrotoluene in a simulated compost system. *Chemosphere*, **30**, 429-438.
- [81] Williams, R. T., Ziegenfuss, P. S., Fisk, W. E. (1992). Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic conditions. *J. Ind. Microbiol.*, **9**, 137-144.
- [82] Widrig, D. L., Boopathy, R., Manning, J. F. (1997). Bioremediation of TNT-contaminated soil: A laboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1141-1148.
- [83] Isbister, J. D., Anspach, G. L., Kitchens, J. F., Doyle, R. C. (1984). Composting for decontamination of soils containing explosives. *Microbiologica*, **7**, 47-73.
- [84] Williams, R. T., Ziegenfuss, P. S., Marks, P. J. (1988). Field demonstration-composting of explosives-contaminated sediments at Louisiana Army Ammunition Plants (LAAP). U. S. Army toxic and hazardous materials agency. AMXTHIR-TE-88242.
- [85] Doyle, R. C., Isbister, J. D., Anspach, G. L., Kitchens, J. F. (1986). Composting explosives/organics contaminated soils. U.S. Army toxic and hazardous materials agency. AMXTH-TE-CR-86077.
- [86] Greist, W. H., Stewart, A. J., Tyndall, R. L., Ho, C. H., Tan, E. (1990). Characterization of explosives waste decomposition due to composting. U.S. Army medical research and development command. DOEIAG 1016-8123-A1.
- [87] Klausmeier, R. E., Jamison, E. I. (1982). Composting of TNT: Airbone products and toxicity. U. S. Army Armament Research and Development Command. ARLCD-CR-81039.
- [88] Bednařík, K. (2004). Toxicita trinitrotoluenů a produktů jejich biotransformací. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Disertační práce.
- [89] Bruns-Nagel, D., Breitung, J., Gamsa, D., von Loew, E., Steinbach, K., Gorontzy, T. (1996). Strategie for bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil. *DECHEMA Monogr.*, **133** (Biodeterioration and biodegradation), 583-588.
- [90] Bruns-Nagel, D., Breitung, J., von Loew, E., Steinbach, K., Gorontzy, T., Kahl, M., Blotvogel, K.-H., Gamsa, D. (1996). Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2651-2656.

- [91] Kaplan, D. L., Kaplan, A. M. (1982). 2,4,6-trinitrotoluene-surfactant complexes, biodegradability, mutagenity and soil leaching studies. US ArmyNatic, Research and Development Center, DTIC-Defense Technical Information Center. TR-82/006 (1981), AD-A113727 (1982).
- [92] Bruns-Nagel, D., Breitung, J., Steinbach, K., Gemsa, D., von Loew, E., Gorontzy, T., Blotevogel, K. H. (1997). Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil by Anaerobic/Aerobic and Aerobic Methods. *Proc. 4th Int. Symp. In Situ and On Site Bioremediation*, New Orleans, Louisiana. Battelle, Alleman/Leeson. May 9-15.
- [93] Held, T., Drade, G., Schmidt, F. R. J., Brokamp, A., Reis, K. H. (1997). Enhanced humification as an in-situ bioremediation technique for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soils. *Environ. Technol.*, **18**, 479-487.
- [94] Kulpa, C. F., Charlebois, P. M., Montemagno, C. D. (1991). Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by microbial consortium. *Proc. Air and Waste Manag. Ass., 84th Ann. Meet.*, pp. 1-11. Vancouver, British Columbia.
- [95] Heijman, C. G., Grieder, E., Holliger, C., Schwarzenbach, R. P. (1995). Reduction of nitroaromatic: Compounds coupled to microbial iron reduction in laboratory aquifer columns. *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 775-783.
- [96] Li, Z. M., Comfort, S. D., Shea, P. J. (1997). Destruction of 2,4,6-trinitrotoluene by fenton oxidation. *J. Environ. Qual.*, **26**, 480-487.
- [97] Li, Z. M., Peterson, M. M., Comfort, S. D., Horst, G. L., Shea, P. J., Oh, B. T. (1997). Remediating TNT-contaminated soil by soil washing and fenton oxidation. *Sci. Tot. Environ.*, **204**, 107-115.
- [98] Li, Z. M., Shea, P. J., Comfort, S. D. (1997). Fenton oxidation of 2,4,6-trinitrotoluene in contaminated soil slurries. *Environ. Eng. Sci.*, **14**, 55-66.
- [99] Anderson, T. A., Guthrie, E. A., Maltos, B. T. (1993). Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2630-2636.
- [100] Fletcher, J. S., McFarlane, J. C., Pfleeger, T., Wickliff, C. (1990). Influence of root expoxure concentration on the fate of nitrobenzene in soyabean. *Chemosphere*, **20**, 513-523.
- [101] Loomis, A. K., Childress, A. M., Daigle, D., Bennett, J. W. (1997). Alginate Encapsulation of the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Microbiol.*, **34**, 127-130.
- [102] Karam, J., Nicell, J. A. (1997). Potential applications of enzymes waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **69**, 141-153.