

TOXICITA, BIODEGRADÁCIA A REMEDIÁCIA SEDIMENTOV KONTAMINOVANÝCH PCB

STU
FCHPT



Katarína Dercová

Laboratórium environmentálnej biotechnológie

Oddelenie biochemickej technológie

Ústav biotechnológie

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie

Slovenská technická univerzita Bratislava

STU
FCHPT

Jana Čičmanová

Jana Šeligová



Katarína Demnerová, VŠCHT, Praha

Martina Macková

Petra Lovecká



Pavel Hucko, VÚVH Bratislava

Patrik Kušnír

Polychlórované bifenyly (PCB) substitučné deriváty bifenyly

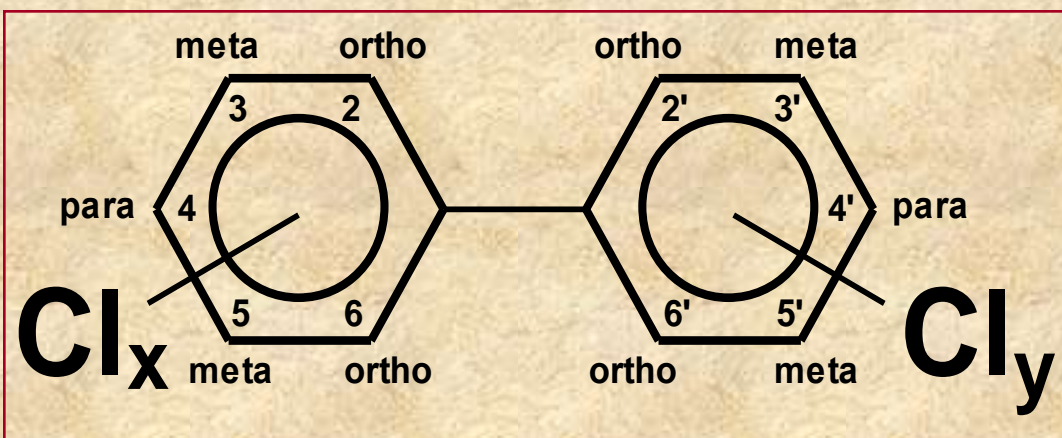
jadro s väčším počtom Cl má
nečiarkové značenie



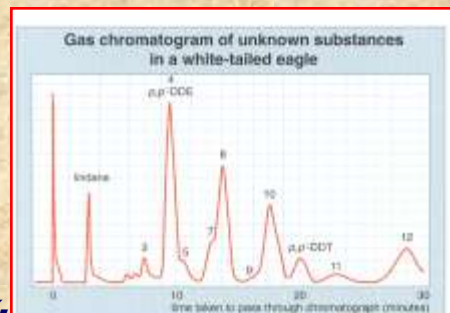
$x = 1 - 5$

$y = 0 - 5$

**Celkom 209
kongenéro**



3,3',4,4',5-pentachlórbifenyl (najtoxickejší kongenér)

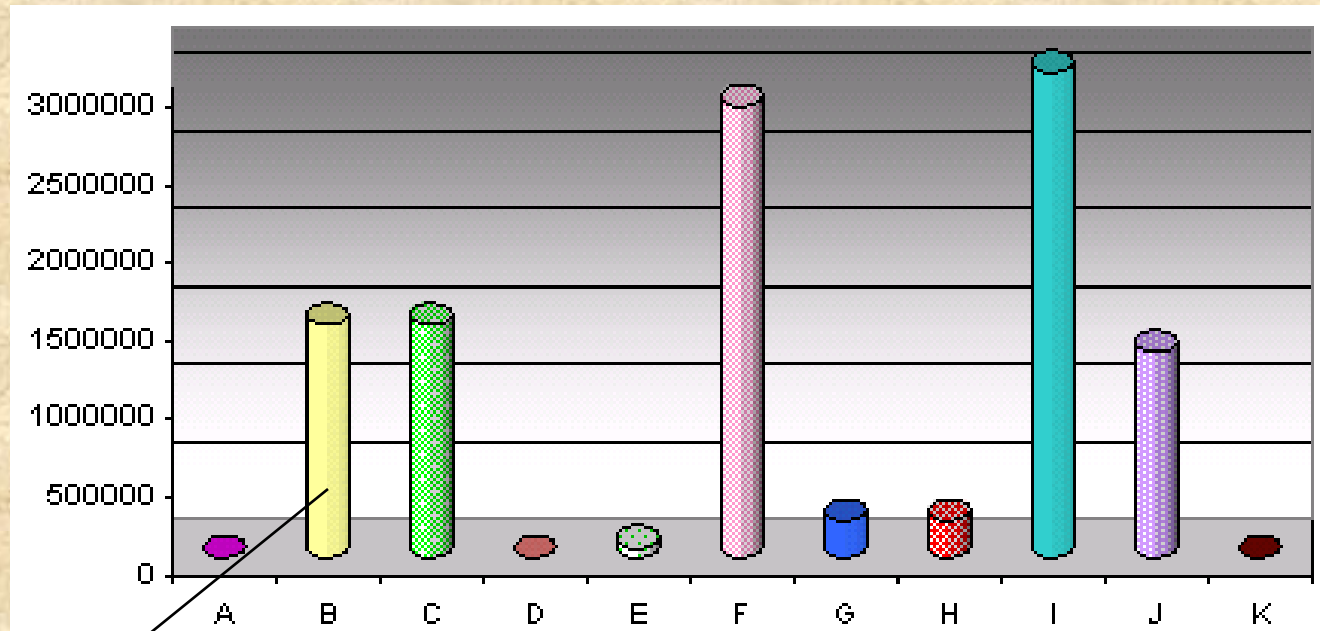


When Sören Jensen used gas chromatography to analyse environmental samples in the mid-1960s, fourteen unknown peaks kept turning up. The chromatogram shows some of these peaks (numbered), along with others corresponding to known pollutants such as DDT. — From Jensen 1972.



Sören Jensen (1966) – prvý
analyzoval PCB

Globálna produkcia tzv. „špinavej dvanástky“ (dirty dozen)



A	Dioxíny	10,5 t
B	PCB	1-2 mil. t
C	HCB	1-2 mil. t
D	Mirex	(-)
E	Chlordan	70 000 t
F	DDT	2,8-3 mil. t

G	Aldrin	240 000 t
H	Dieldrin	240 000 t
I	Endrin	3,12 mil. t
J	Toxafén	1,33 mil. t
K	Heptachlór	900 t

Štokholmská konvencia

- A** minimalizácia neúmyselne produkovaných POPs
- B – C** eliminácia použitia priemyselne produkovaných POPs
- C - K** kontrola priamej produkcie „POPov pesticídov“

CHEMKO Strážske

1959-1984

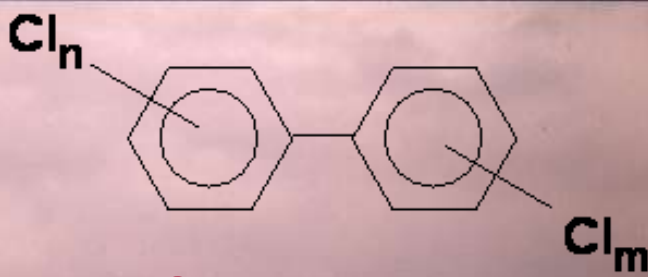
Aroclor – Monsanto USA 1929-1977

Phenoclor - Francúzsko

Kanechlor - Japonsko

Chlorophen - Poľsko

Delor, Hydeler, Delotherm – ČSSR



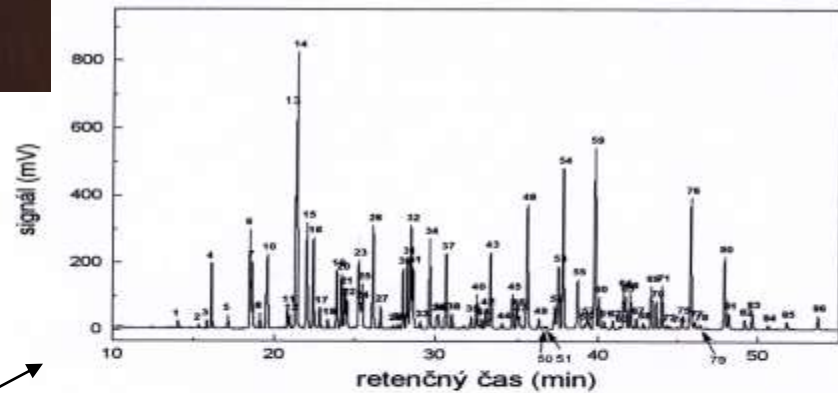
PCB



(Dercová a kol.)

DELOR 103 - 40 % Cl

DELOR 106 - 60 % Cl



Obr. 1. GC-ECD chromatogram štandardnej zmesi PCB Delor 103 a Delor 106, 2:1 w/w.

Tab. 1 Číslo píku, retenčný čas, číslovanie IUPAC, pozícia atómu chlóru a hmotnostné zastúpenie kongenérův PCB v zmesi Delor 103 a Delor 106, 2:1 w/w.

Číslo píku	Retenčný čas (min)	IUPAC	Pozícia atómov chlóru	hmotnost. zlomok(%)
1	14.03	4, 10	2, 2'; 2, 6	3.87
2	15.29	7, 9	2, 4'; 2, 5	2.31
3	15.77	6	2, 3'	0.38
4	16.06	5, 8	2, 3; 2, 4'	2.97
5	17.07	19	2, 2', 6	0.65
6	18.46	18	2, 2', 5	4.78
7	18.60	15, 17	4, 4'; 2, 2', 4	2.09
8	19.10	24, 27	2, 3, 6; 2, 3', 6	0.24
10	19.57	16, 32	2, 2', 3; 2, 4', 6	6.92

PCB vyrábajúce na Slovensku

Delor 103 ~ Aroclor 1242

náplne transformátorov a kondenzátorov

Delor 106 ~ Aroclor 1260

prísady do tlačiarenských farieb

Delotherm

kvapaliny do teplovýmenných systémov

Hydelor

kvapaliny do hydraulických a mazacích systémov

**Množstvo PCB vyrobené
v Chemko Strážske: 21 500 t**

Predané odberateľom v ČSSR

11 610 t (5 500 t ČR; 5 500 t SR)

Exportované (hlavne do NDR)

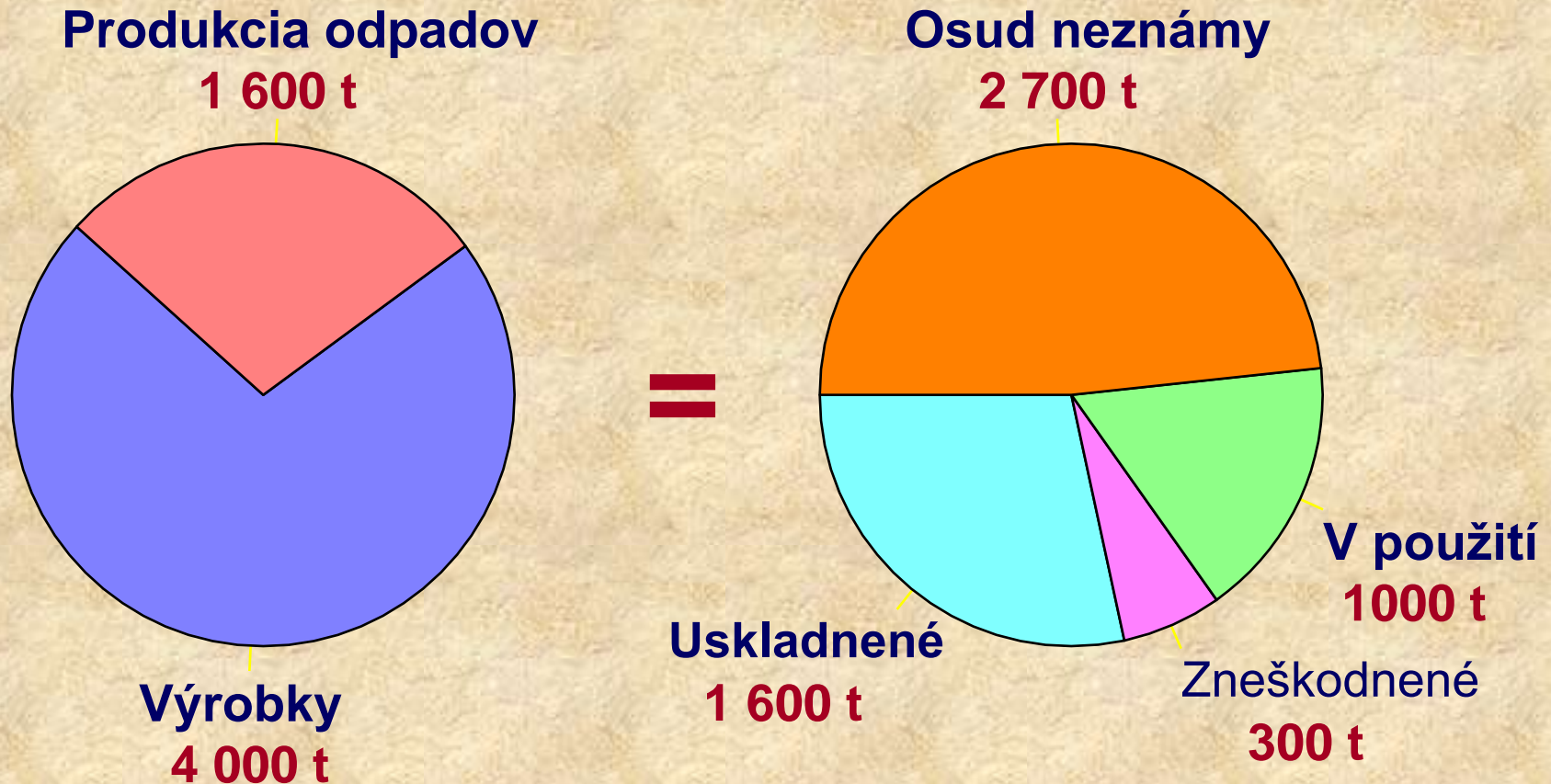
9 870 t

Produkcia odpadov

asi 1 600 t

Inventarizácia PCB na Slovensku

- Situácia v novembri 1997 -



Inventarizácia PCB (2001-2003)

Σ 4500 t

1000 t – odpady (bifenyly, terfenyly)

1000 t – 400 transformátorov, 30000 akumulátorov, 400 ks iné zariadenia

1500 t – oleje, farby

900 t - skládka Pláne



Sklad nepoužitých produktov PCB



Bifenyly a terfenyly



Tuhé destilačné zvyšky



Vlastnosti PCB



Definícia POPs

Vlastnosti determinujúce správanie sa POPs

1. Všadeprítomné ⇒ **semiprchavosť**, globálny transport
2. Pretrvávajú v environmente ⇒ **sorpcia**, perzistencia
3. Zakoncentrovávajú sa v tukových tkanivách ⇒ **hydrofóbnosť**, **bioakumulácia**
4. Sú nebezpečné pre ľudí a divo žijúcu zver ⇒ **toxické**, **potenciálne mutagény**, **karcinogény**, **teratogénne**, **endokrinné disruptory**

ovzdušie pôda voda

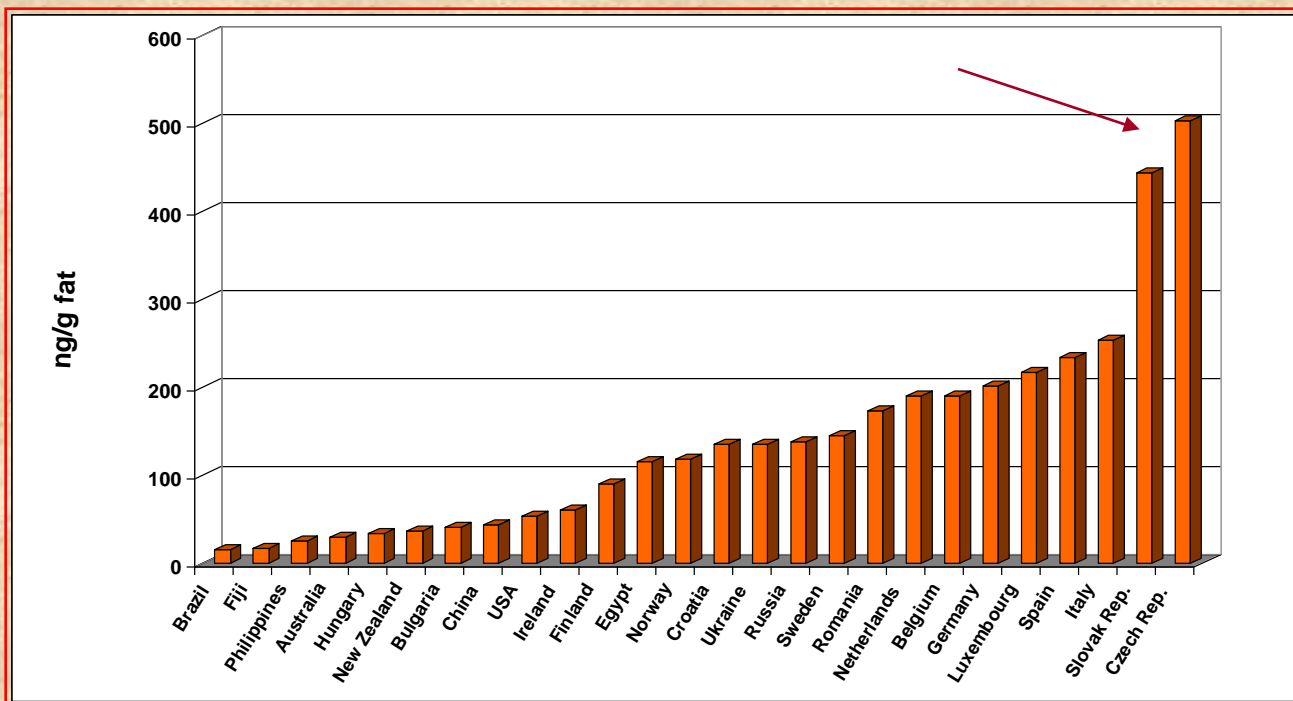


TOXICITA

- Akútna
- Chronická



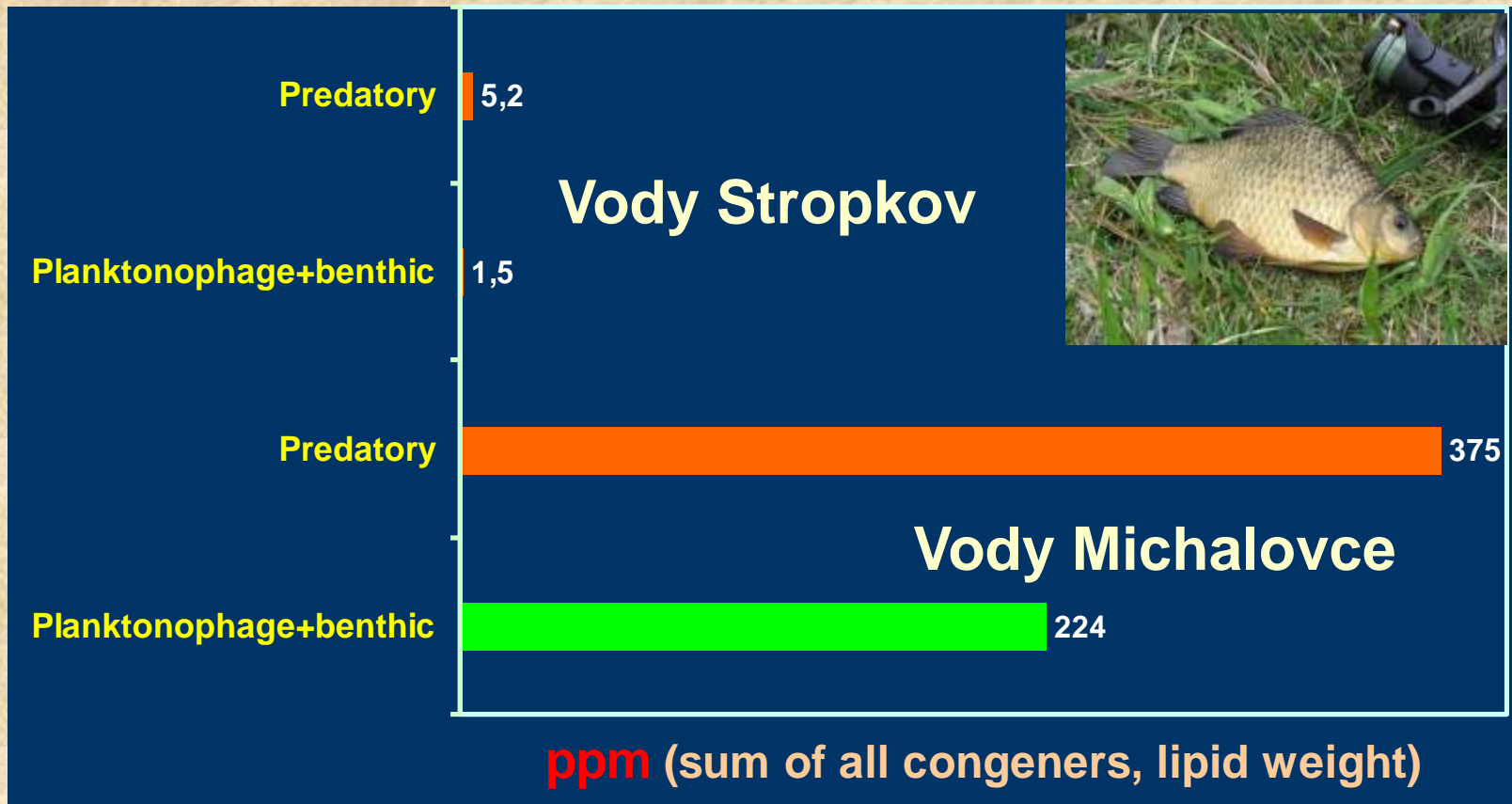
chlorakné, poškodenie pečene, reprodukčné anomálie, karcinogenéza, neurotoxicita, Potterovej syndróm
estrogénne účinky - imitátory a blokátory hormónov, vplyv na hormonálne syntézy a receptory, štítnu žľazu



**Množstvo
indikátorových PCB
v materskom mlieku
(Holoubek 2006,
[www.recetox.chemi.
muni.cz](http://www.recetox.chemi.muni.cz))**

Hladina PCB v rybách

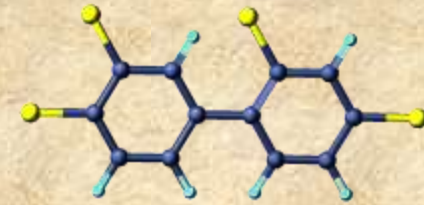
Michalovce (znečistená oblasť) vs Stropkov (požad'ová oblasť)



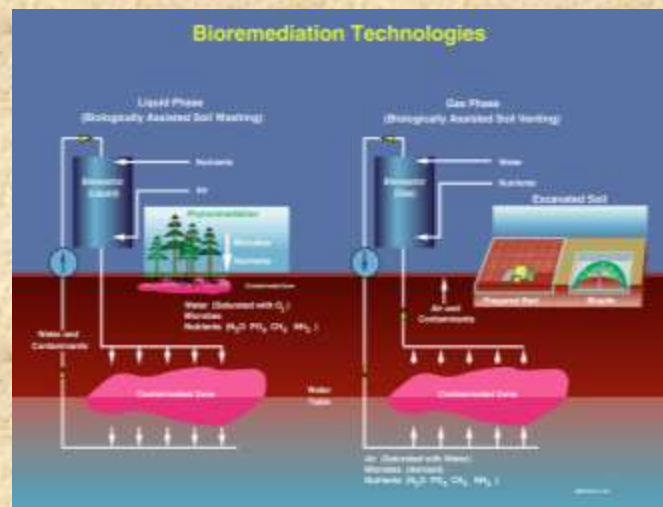
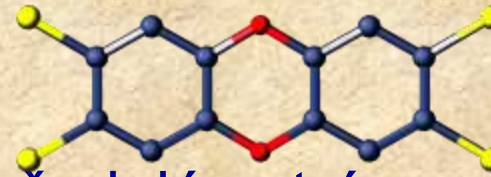
(Kočan a kol., 1998)

karas stiebristý – nálezy - 15-220 násobok hodnoty PCB na ostatnom území SR

Dekontaminácia PCB

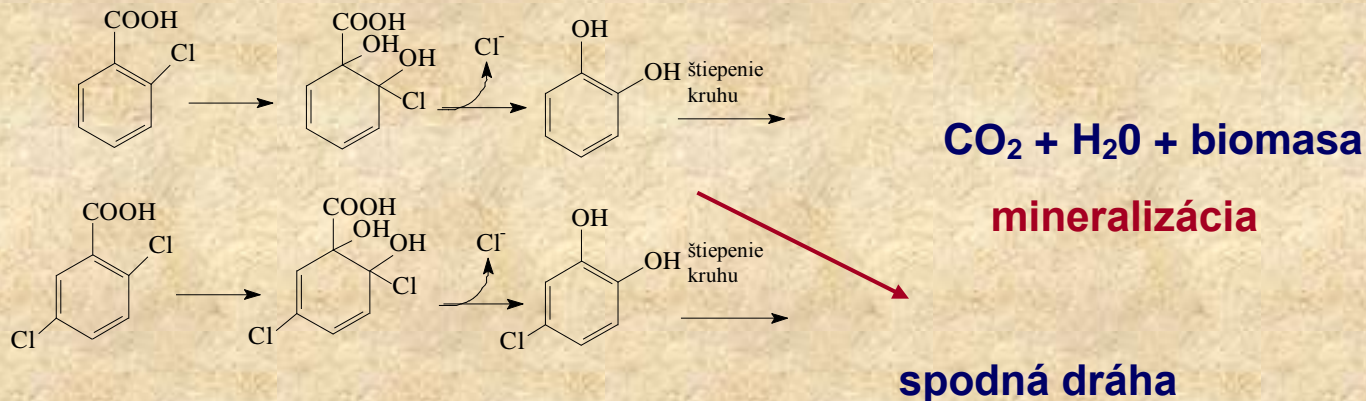
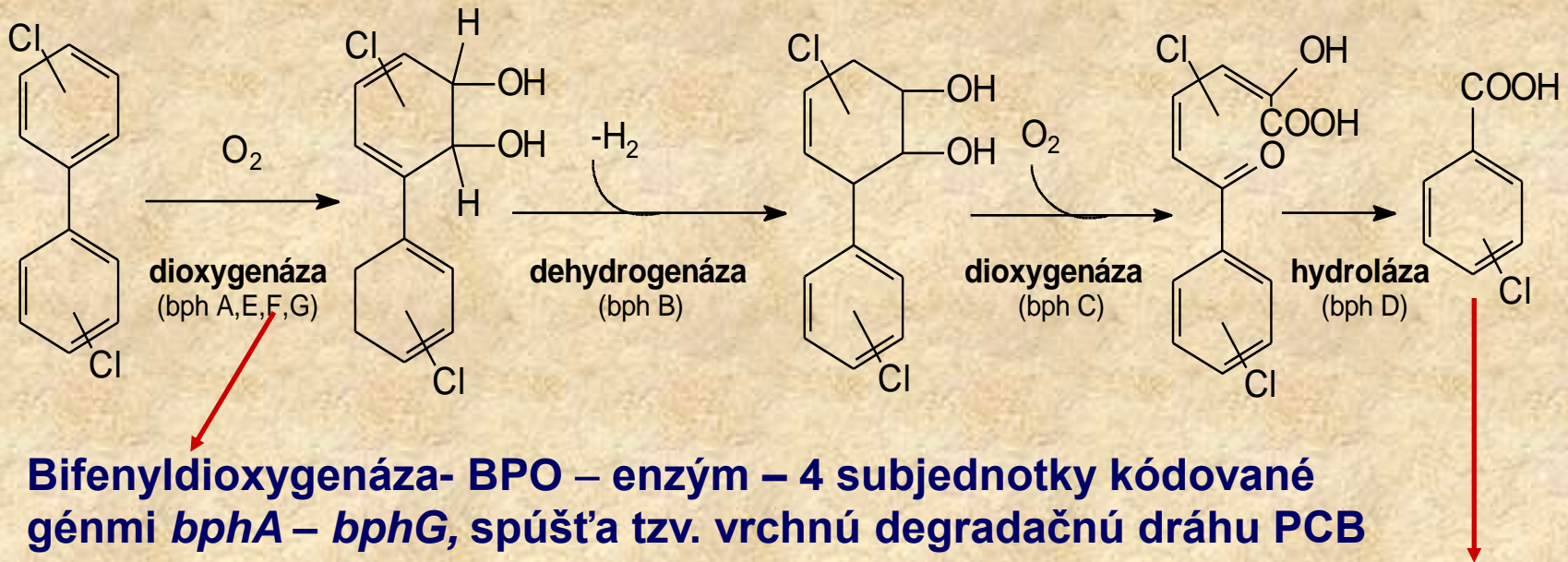


- Spaľovacie technológie (dioxínové filtre, CBC proces...)
- Plazmové technológie (Plascon, ONSV, EO)
- Nespáľovacie technológie:
- Fyzikálno-chemické metódy -(vyžadujú extrémne podmienky - pH, teplota, tlak...)
- **Biologické metódy – bioremediácia** – využívajú degradačnú činnosť mikroorganizmov - ekonomická a ekologická alternatíva



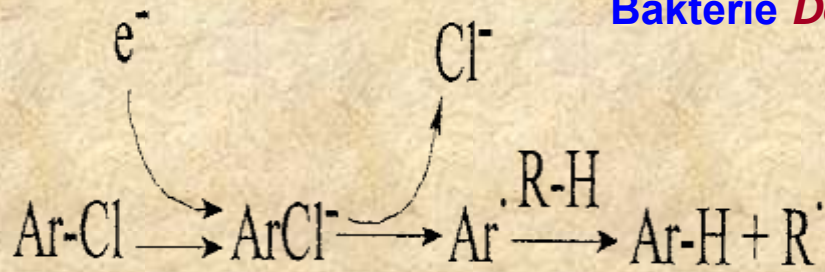
Aeróbná degradácia PCB

2,3-dioxygenázovou metabolickou dráhou

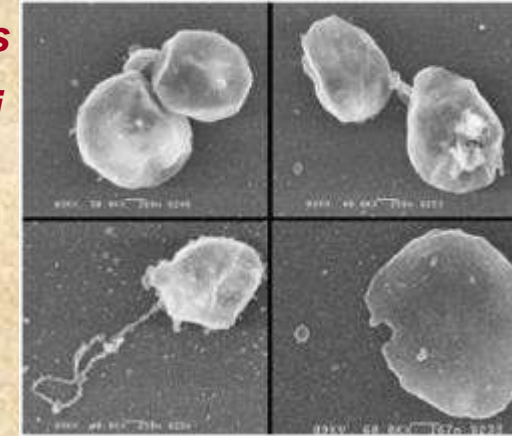


Baktérie *Dehalococcoides*

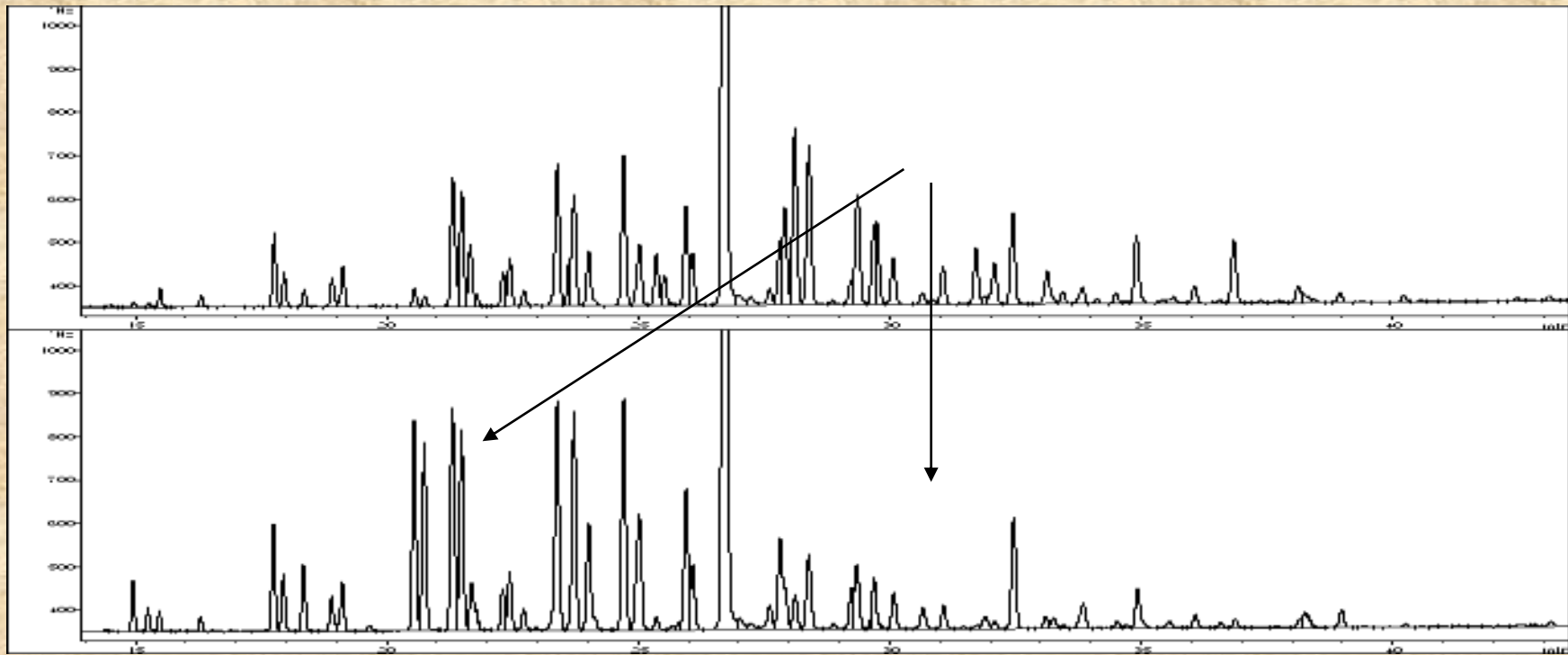
Baktérie *Desulfomonile tiedjei*



Redukčná dehalogenácia

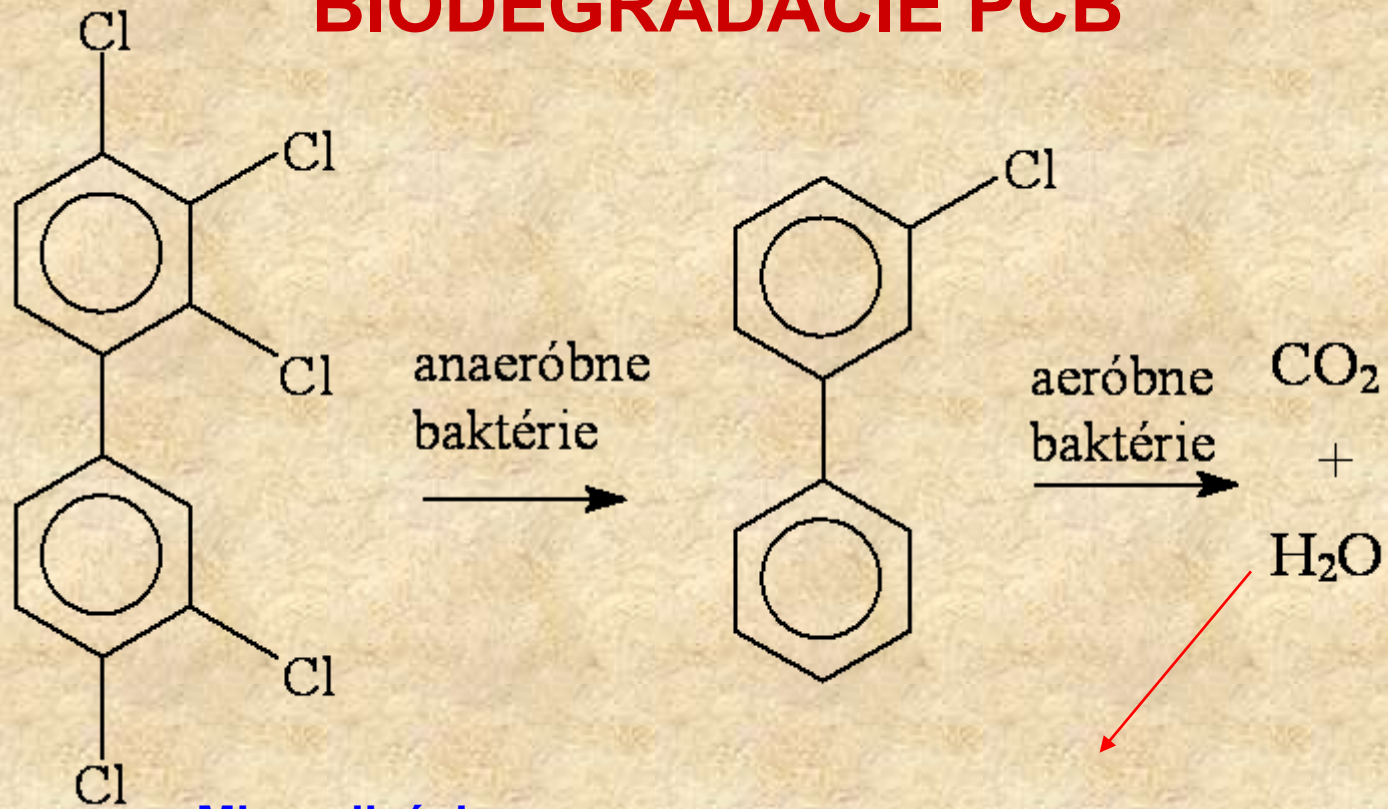


Bedard, 2006



Úbytok a premena vyššie chlórovaných kongenéroov PCB (Aroclor 1248) na nižšie chlórované kongenéry

DVOJKROKOVÝ KOMBINOVANÝ ANAERÓBNO-AERÓBNY PROCES BIODEGRADÁCIE PCB



Mineralizácia:

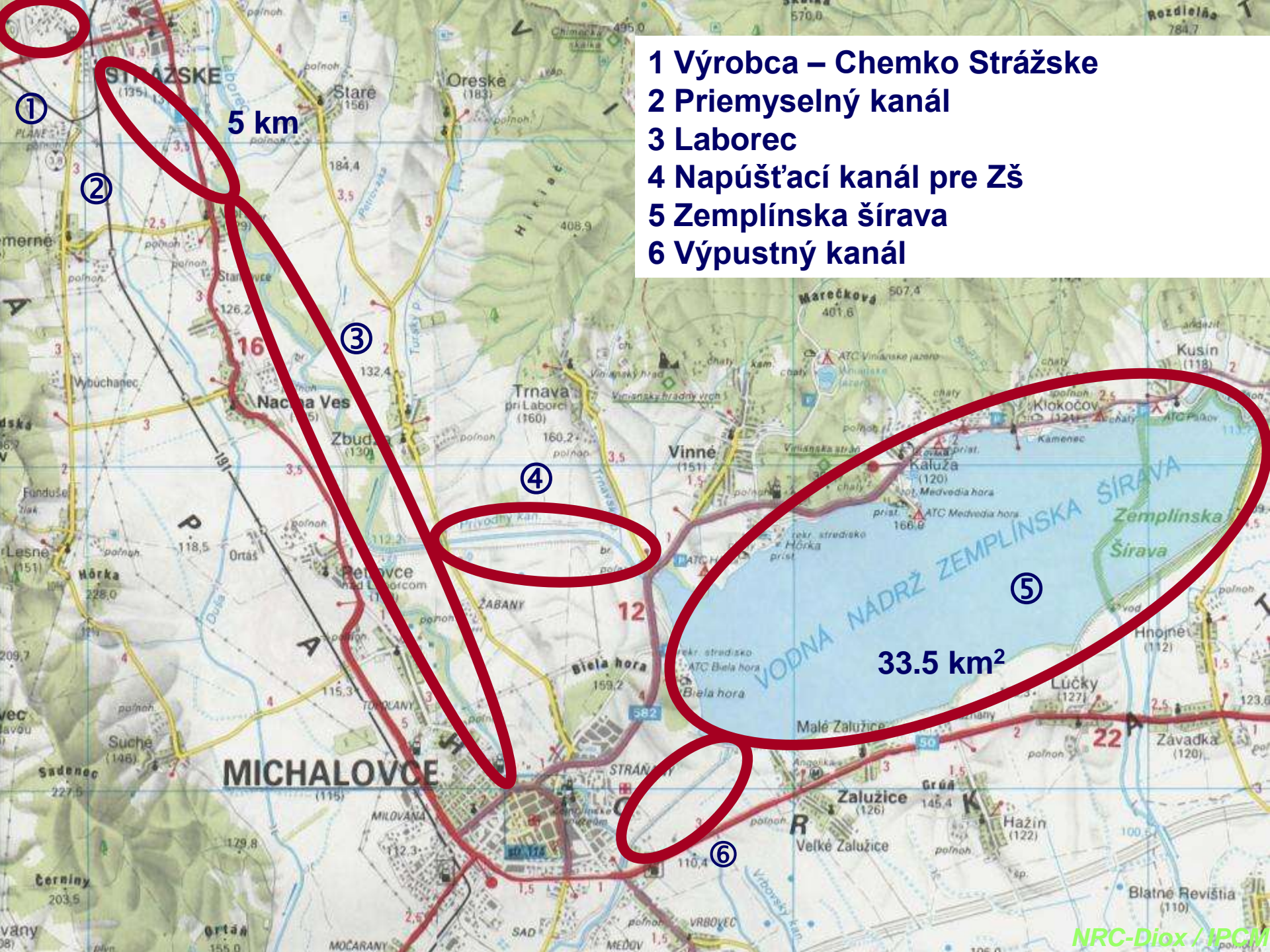
Účinný spôsob rozkladu PCB mikroorganizmami:
prvý krok dehalogenácia, druhý štiepenie jadra
nižšie chlórovaného kongenéru (Abramovicz, 1990)

Kontaminované oblasti

"staré environmentálne zát'aže "

Chemko Strážske

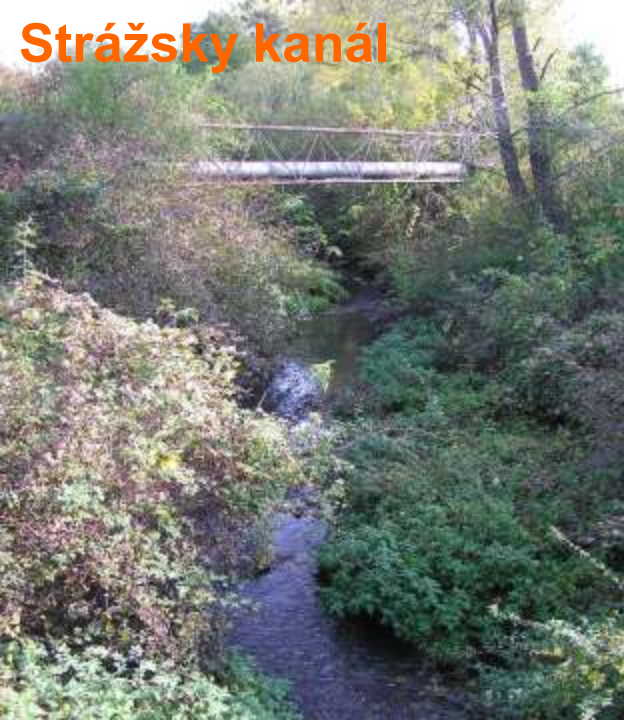




- 1 Výrobca – Chemko Strážske
- 2 Priemyselný kanál
- 3 Laborec
- 4 Napúšťací kanál pre Zš
- 5 Zemplínska šírava
- 6 Výpustný kanál

5 km

33.5 km²



Laborec



Zemplínska šírava

**PCB – koncentračný rozsah
v sedimentoch:**

Kanál: 1 – 10 g/kg

Laborec: 0.1 - 1 g/kg

Zemplínska šírava: 0.001 - 0.1 g/kg

**Predbežný odhad: 40 000 ton
kontaminovaných sedimentov**

Technologické postupy *ex situ* (mimo kontaminovanej plochy)

Chemické metódy:

Solidifikácia a stabilizácia

Chemická extrakcia

Chemická oxidácia/redukcia - halogénované polutanty

Dehalogenácia

Fyzikálne metódy:

Termická desorpcia

Spaľovanie

Pyrolýza

Vitrifikácia

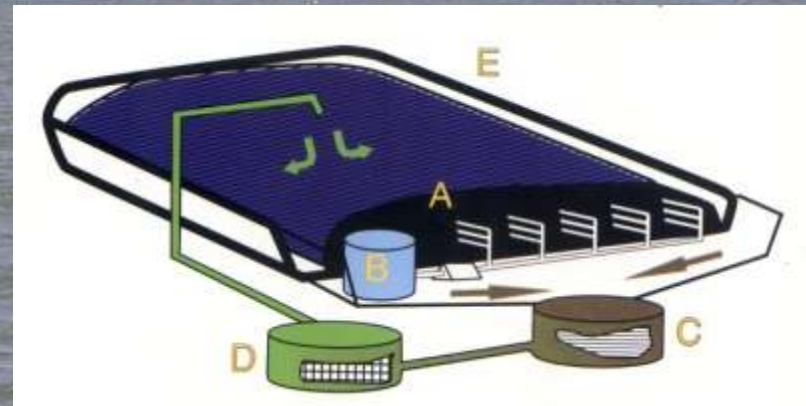
Biologické metódy:

Kompostovanie

Biostabilizácia a bioimobilizácia (keď je kontaminant biologicky obtiažne odbúrateľný, napr. kovy)

Landfarming

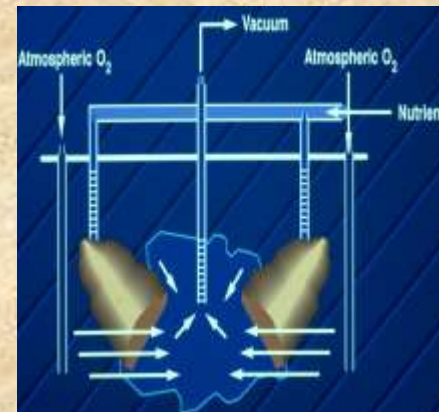
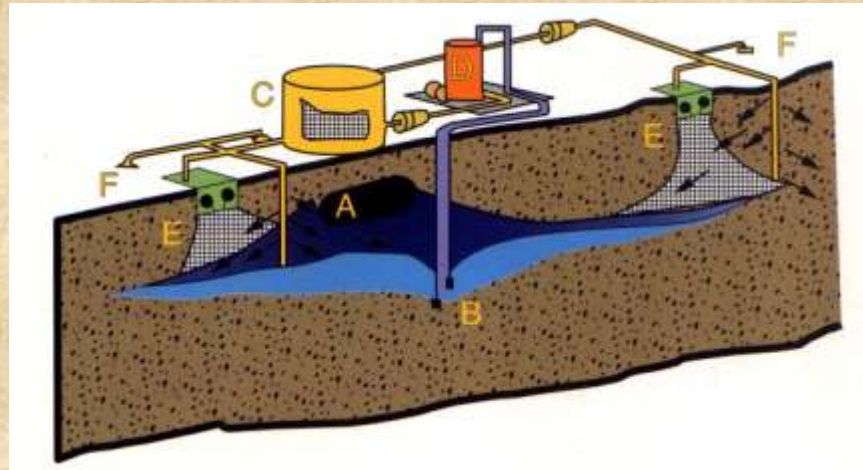
Biologické suspenzné systémy (angl. *slurry phase system*)



Remediačné postupy *in situ*

(priamo na kontaminovanej ploche)

- Bioremediácia
- Bioventing
- Biostripping
- Biosparging
- Bioslurping
- Fytoremediácia



"Non-combustion Technologies Project "



SR – participácia na globálnom programe:

„ Odstránenie bariér, ktoré sťažujú osvojenie a efektívnu implementáciu dostupných nespáľovacích technológií na deštrukciu POPs a demonštráciu životnosti týchto metód “



UNDP - implementačná agentúra

UNIDO - výkonná agentúra

Cieľ projektu - dodanie nespáľovacej technológie vysokej technickej úrovne a efektivity pre deštrukciu chlórovaných polutantov (najmä PCB) a pesticídov

Celkové náklady

20 155 040.- USD

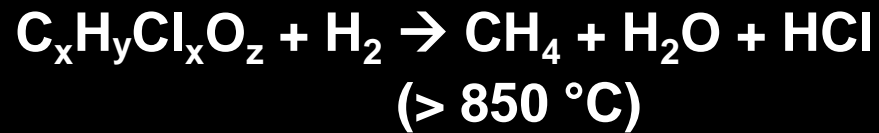
Základné kritériá:

- **100%-ná efektivita deštrukcie predmetných látok**
- **Úplné zabránenie rozširovania reziduí procesu likvidácie v prostredí**
- **Žiadne nekontrolovateľné úniky**

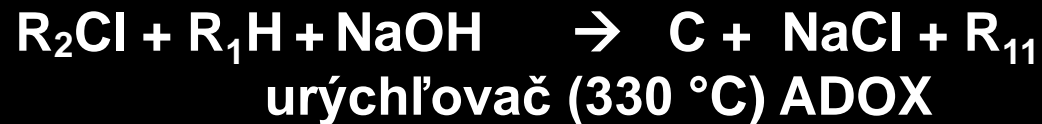
Bezpečná deštrukcia PCB do roku 2010 je vyžadovaná od všetkých členských krajín EU!

Potenciálne technológie

GPCR (Gas Phase Chemical Reduction)
(P, R, V, K) (TRBP) TORBED/GPCR

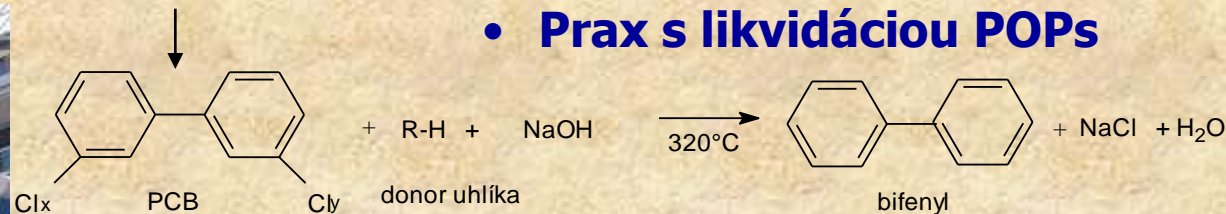


BCD (Base Catalyzed Decomposition)



Výhody

- Účinnosť 99.9999 %
- Nízke množstvo tuhých zvyškov
- Všetky druhy odpadov, mobilita, variabilita
- Prax s likvidáciou POPs



Limitácie, nevýhody

- Bezpečnosť vzhľadom k vodíku
- Komplexnosť
- Drahé pre málo pevné odpady a malé množstvá

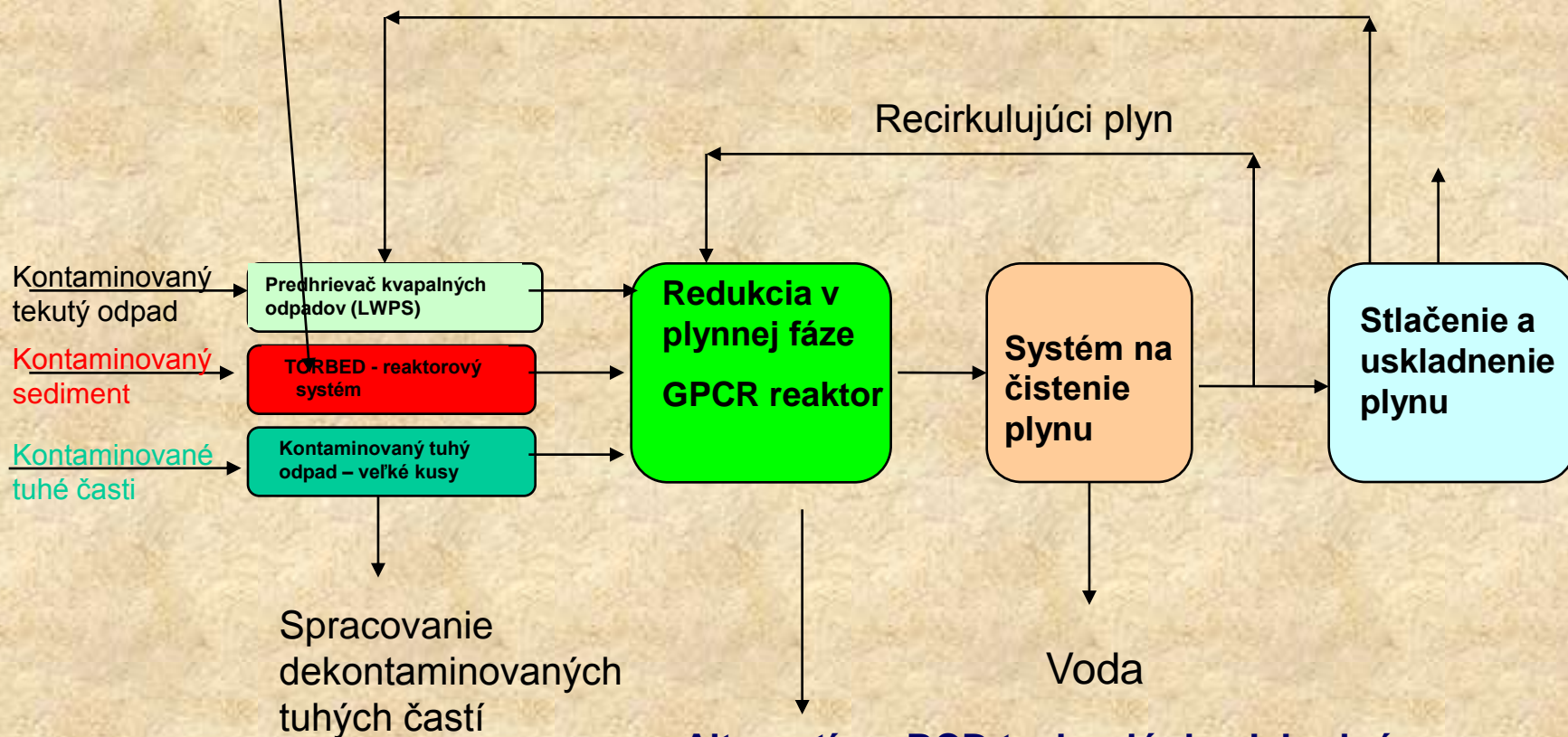
I. technologická jednotka pre deštrukciu PCB (tuhé zvyšky a oleje)

II. extrakčná jednotka (sedimenty a pôda)

Projektovaná kapacita deštrukčnej jednotky - 750 ton ročne

TORBED systém - termická desorpcia

1. Ťažba sedimentov
2. Odvodnenie a triedenie sedimentov
3. Čistenie sedimentov od PCB látok: extrakcia → reaktor



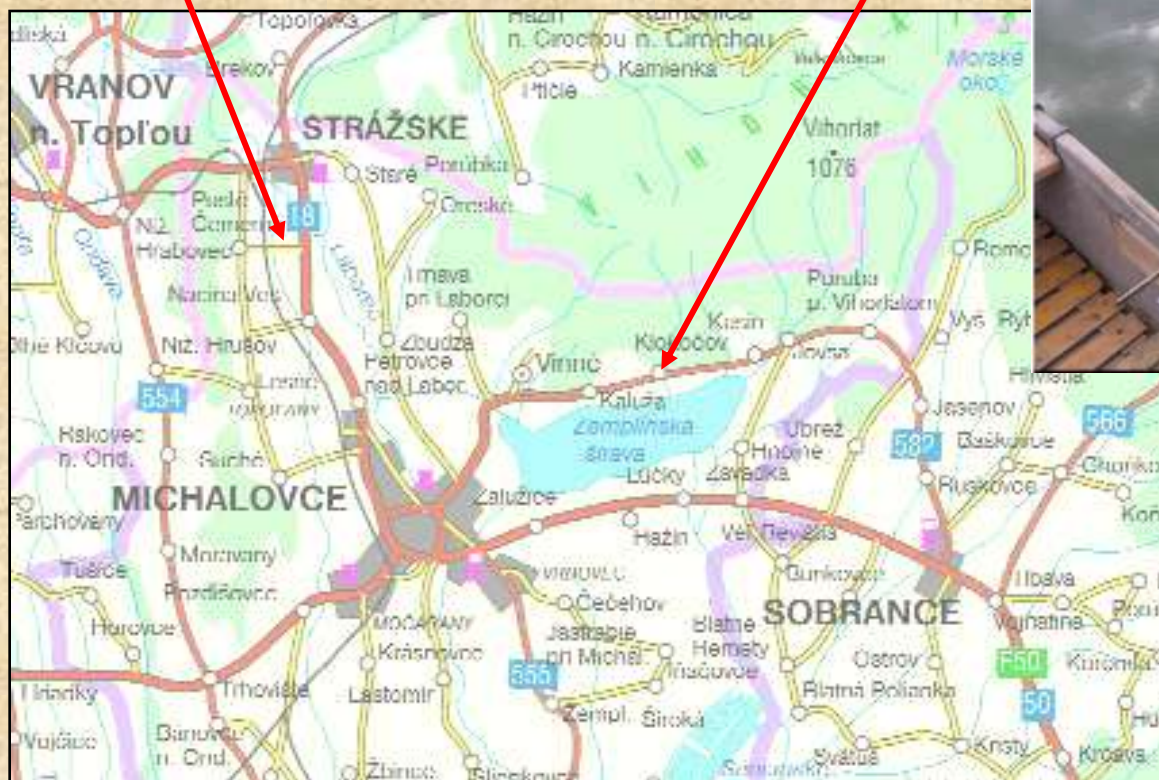


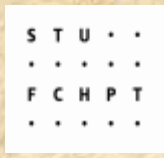
TOXICITA A BIODEGRADÁCIA PCB V KONTAMINOVANÝCH SEDIMENTOCH

IZOLÁCIA MIKROORGANIZMOV S POTENCIÁLNOU DEGRADAČNOU SCHOPNOSŤOU

Sediment zo Strážskeho
kanála (Sk)

Sediment zo Zemplínskej
šíravy (Zš)





Cieľ práce

Toxicita

1. Test inhibície rastu koreňov *Lactuca sativa*
+ test inhibície rastu *Lemna minor*
2. Test inhibície bioluminiscencie na *Vibrio fischeri*

Genotoxicita

3. Amesov test na zistenie mutagénnych účinkov na kmene:
Salmonella typhimurium His⁻ TA 97, TA 98, TA 100

Izolácia MO

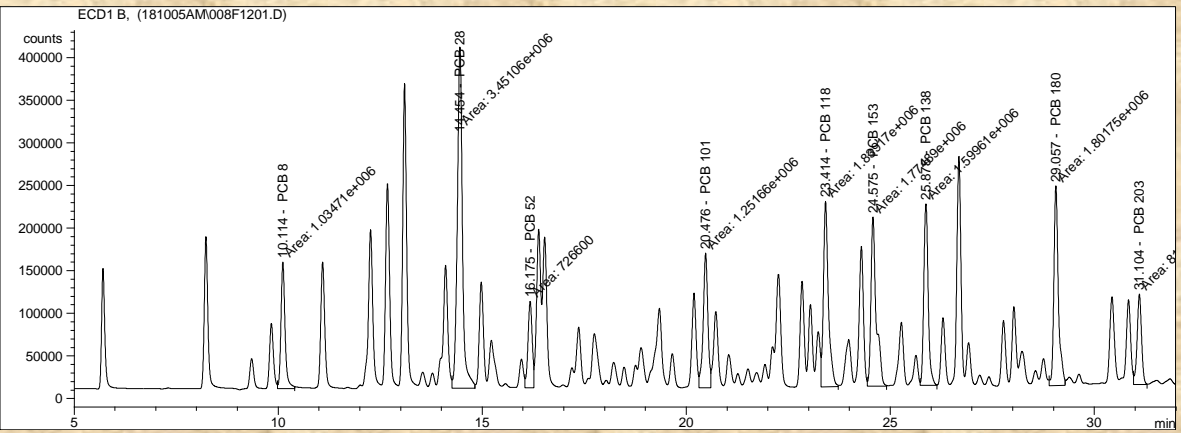
4. Izolácia mikroorganizmov s degradačnou schopnosťou

Biodegradácia

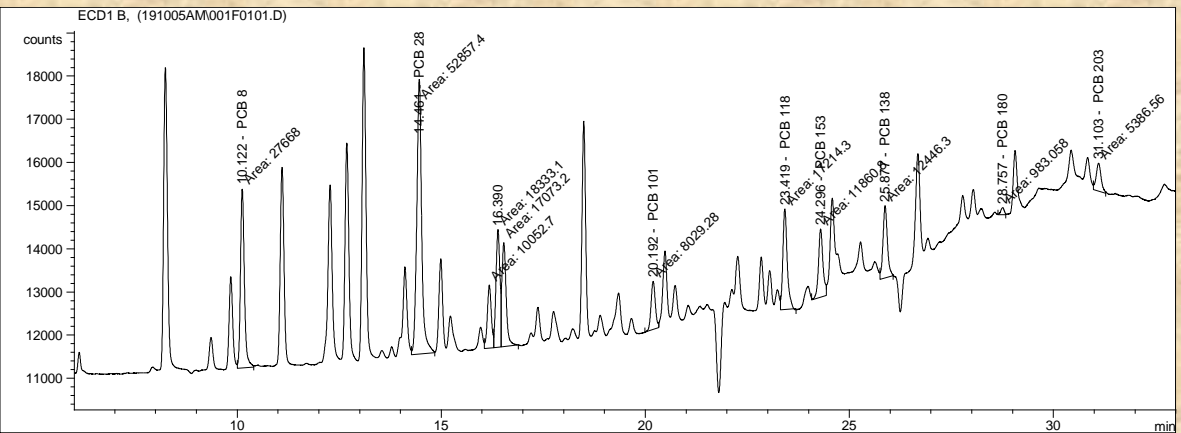
5. Biodegradácia PCB v sedimentoch:
s biostimuláciou
s bioaugmentáciou



PCB kongenér	Sk	Zš
8	81,1	208,3
28	124,5	187,8
52	40	26,3
101	55,3	29,1
118	58,1	44,3
138	40,6	19,2
153	50,2	22,5
180	209	< 2,5
203	15,1	6,9



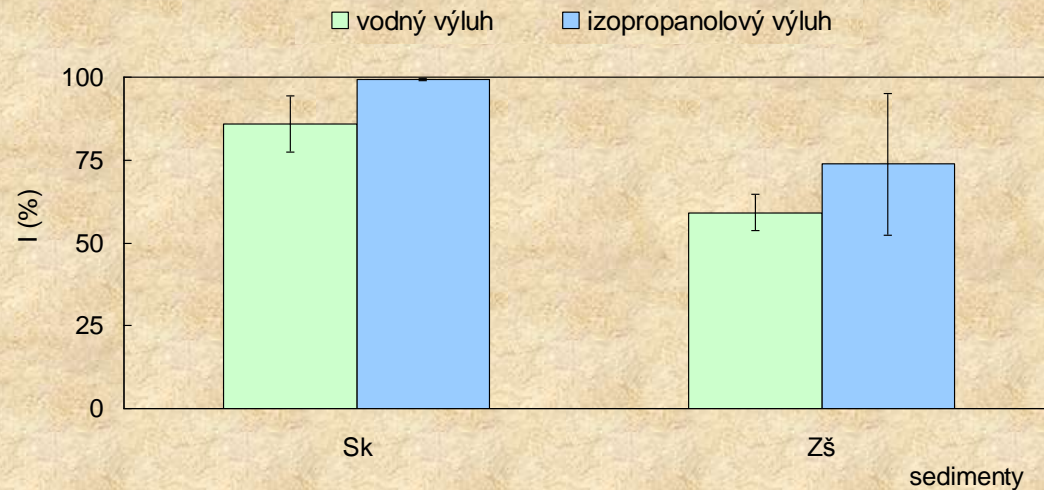
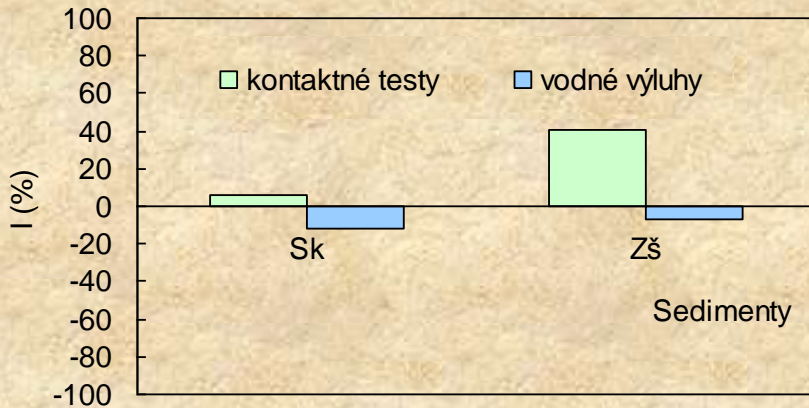
Strážsky kanál



Zemplínska šírava

Ekotoxicita sedimentov Sk a Zš

1. Test inhibície rastu koreňov *Lactuca sativa*
2. Test inhibície bioluminiscencie na *Vibrio fischeri*



- Vodné výluhy sú menej toxické – nízka rozpustnosť nepolárnych látok
- Kontaktné testy potvrdili toxický účinok na rast koreňov
- Izopropanolové výluhy (2 %) sedimentov Sk a Zš sú toxickejšie, než vodné

Genotoxicita sedimentov Sk a Zš

3. Amesov test na zistenie mutagénnych účinkov na kmene: *Salmonella typhimurium* His⁻ TA 97, TA 98, TA 100

	TA 100	TA 97	TA100	TA97
výluh	počet revertantov		$\Phi = Rt/Rc$	
Sk _{voda}	146	87	0,94	1,22
Sk _{izop}	124	86	0,79	1,20
Zš _{voda}	172	74	1,11	1,04
Zš _{izop}	138	44	0,88	0,61
SK _{voda} 1:1	126	43	0,81	0,61
Zš _{voda} 1:1	102	67	0,66	0,94
SK _{voda} 1:2	143	73	0,92	1,02
Zš _{voda} 1:2	153	0	0,98	0,00
SK _{izop} 1:1	134	51	0,86	0,72
Zš _{izop} 1:1	136	41	0,87	0,58
SK _{izop} 1:2	146	77	0,94	1,08
Zš _{izop} 1:2	143	61	0,92	0,86
kontrola	155.5	71		
9-aminoaciridín	-	852		
azid sodný	923	-		

Mutagenita:

indukovaní revert. / spontánni revert. > 2

➤ **Výluhy sedimentov Sk a Zš nie sú mutagénne pre testované štandardné kmene TA 97 a TA 100**

Delor 103 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	TA 98			TA 100		
	Počet revertantov (Rt)	S.o.	Φ^*	Počet revertantov (Rt)	S.o.	Φ^*
$5,0\cdot 10^{-06}$	27	6,51	1,15	79	7,94	1,06
$5,0\cdot 10^{-05}$	32	4,04	0,97	80	7,77	0,95
$5,0\cdot 10^{-04}$	28	2,52	1,11	87	2,65	1,03
$5,0\cdot 10^{-03}$	23	4,73	1,35	73	8,19	0,87
$5,0\cdot 10^{-02}$	30	1,53	1,03	69	9,29	0,82
PK(NAFA)	456	27,68		1693	51,55	
NK (DMSO)	29	8,96		73	5,86	
SR	31 (Rc)	3,06		84 (Rc)	6,51	

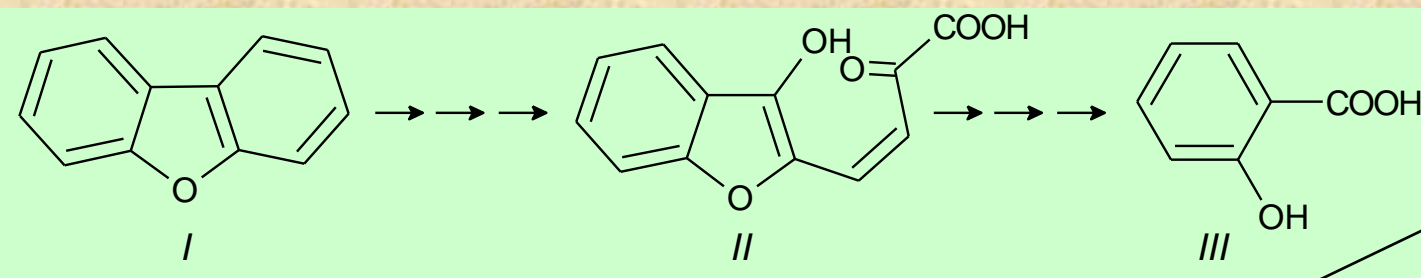
$\Phi = Rt/Rc$

Izolácia mikrobiálneho konzorcia zo sedimentov Sk a Zš

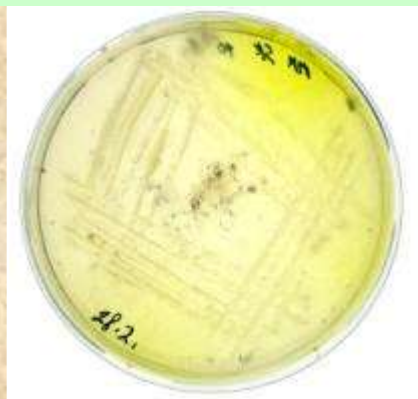
➤ Princíp izolácie MO s biodegradačným potenciálom pre PCB:

Kultivácia pod selekčným tlakom jediného zdroja uhlíka – bifenylu – štruktúrny analóg PCB a induktor degradácie PCB

Princíp dibenzofuránového skríningu prítomnosti 2,3-dioxygenázy:



Tvorba žltého produktu



Sk



Zš

Izolácia čistých kmeňov - potenciálni degradéri PCB

Izolácia DNA a identifikácia *bphA1* génu z kmeňov izolovaných zo sedimentov Sk a Zš

- **Izolácia bakteriálnej DNA termolýzou**
- **PCR** – amplifikácia génu *bphA1* s primermi: *F350*, *R674*
- **Gélová elektroforéza** – vizualizácia *bphA1* génu



<u>Popis gélu</u>	<u><i>bphA1</i> gén</u>
1. dráha marker	100bp
2. dráha Zš 5a	
3. dráha Sk 2b	
4. dráha Sk 6	
5. dráha Zš 4	
6. dráha Zš 12a	
7. dráha Zš 10	
8. dráha LB 400	
9. dráha negatívna kontrola	
10.dráha marker	100 bp

— 300 bp
— 100 bp

bphA1 gén



Dokumentácia gélovej elektroforézy (1,5 % gél) pre potvrdenie *bphA1* génu po PCR s mikrobiálnou DNA izolovanou z kmeňov *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligenes xylosoxidans* a *Burkholderia* sp. LB 400

Popis gélu:

bphA1 gén

A dráha marker 100 bp

B dráha *P. stutzeri*

áno

C dráha *P. stutzeri*

áno

D dráha *A. xylosoxidans*

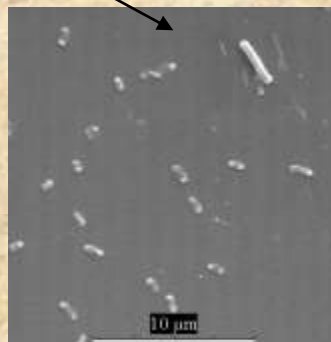
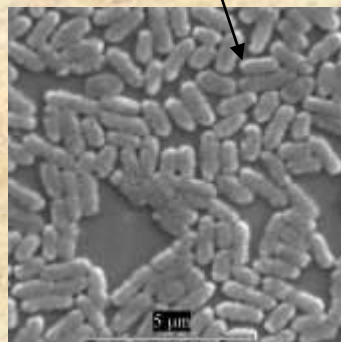
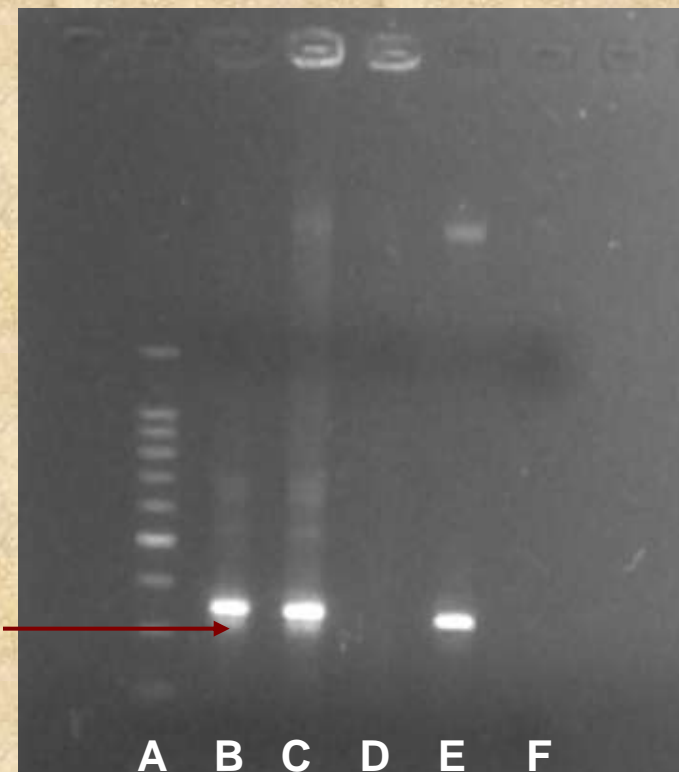
nie

E dráha *B. sp. LB 400*

áno

F dráha negatívna kontrola

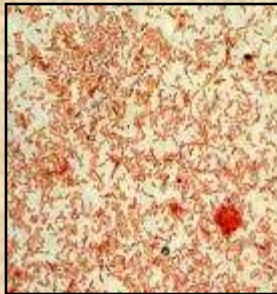
bphA1 gén



Mikroorganizmy izolované zo sedimentov Zš a Sk



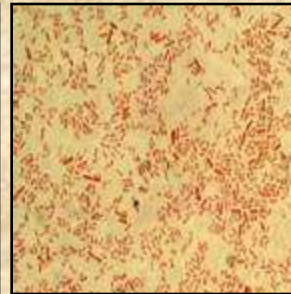
Zš5a G+



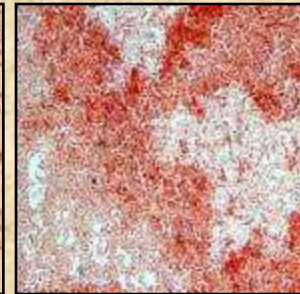
Zš 10 G-



Zš 4 G-



Zš12a G-

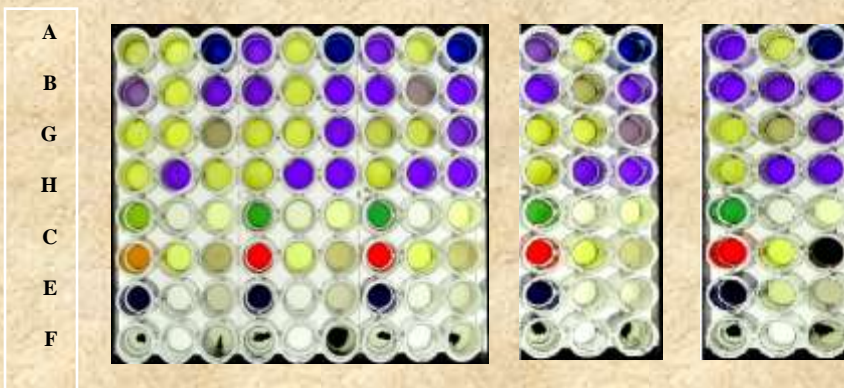


Sk6 G-

Fotografie z Grammovo farbenia mikroorganizmov izolovaných zo sedimentov s detegovaným *bphA1* génom



NEFERMTEST



Výsledok biochemických identifikačných reakcií Nefermtestu 24 pre izolované mikroorganizmy zo sedimentov Zemplínskej šíravy a Strážskeho kanála.

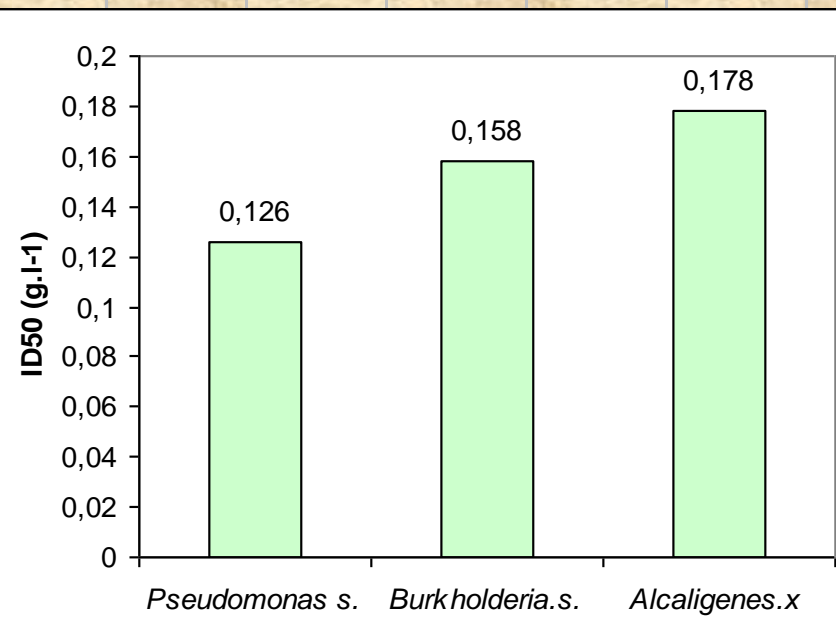
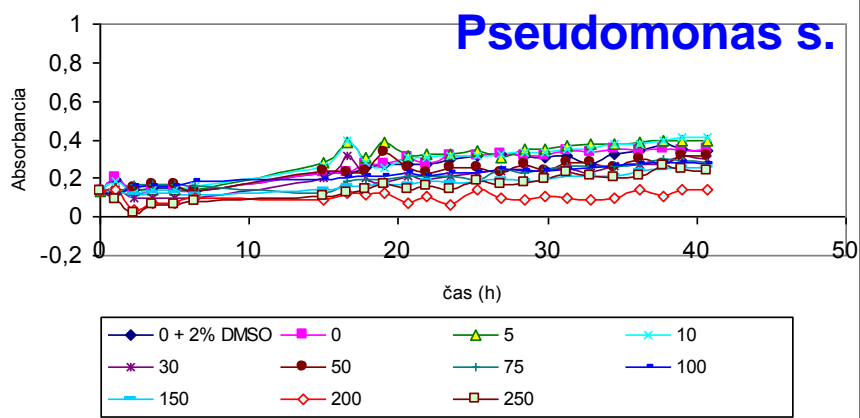
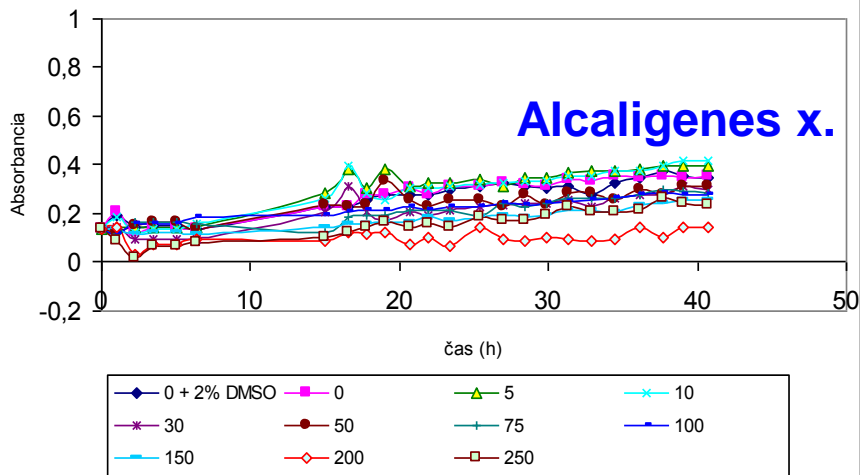
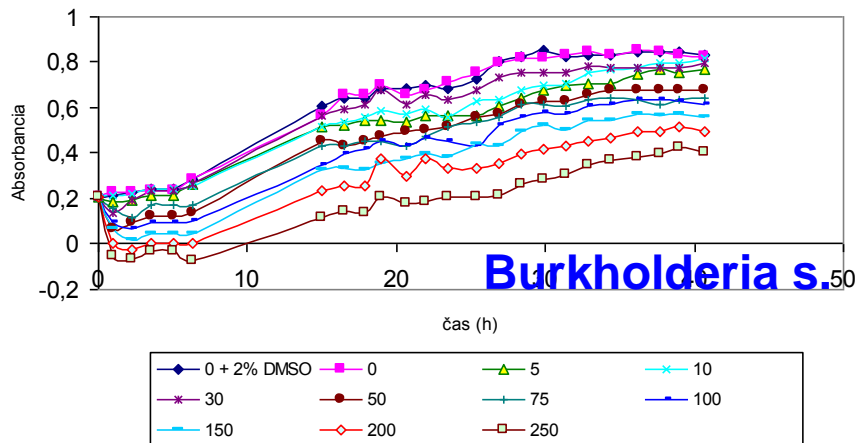
Izolované kmene zo Zemplínskej šíravy a Strážskeho kanála.

Izolovaný mikroorganizmus zo sedimentov	Výsledok Nefermtestu24
Zš10, Zš4, Zš12a	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Ochrobacterum anthropi</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sk 6	<i>Agrobacterium radiobacter</i>



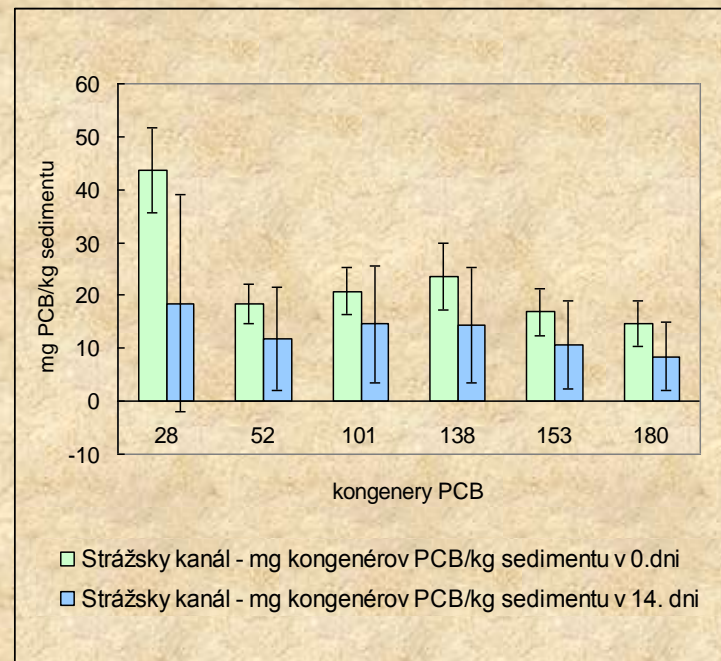
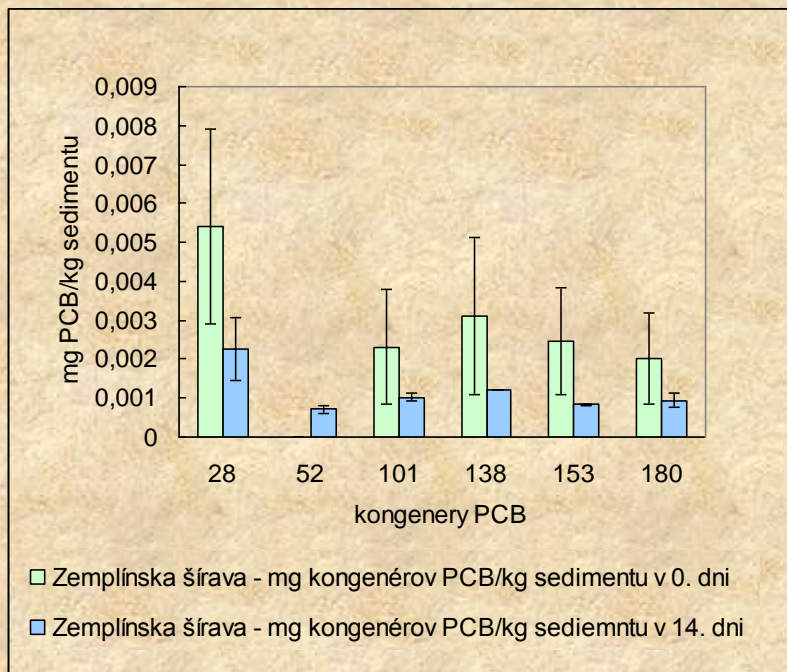
Toxicita

Rastové krivky baktérií s prídavkom rôznych koncentrácií Deloru 103. Kultivácia prebiehala na minerálnom médiu s glukózou (2 g.l⁻¹), na reciprokej trepačke (180 min⁻¹) pri 28 °C. Hodnoty v legende sú v mg.l





Biodegradácia PCB v sedimentoch Sk a Zš prirodzeným konzorciom s biostimuláciou



Porovnanie koncentrácie kongenéro PCB degradovaných v sedimentoch Zemplínskej šíravy v 0. a 14. dni degradácie.

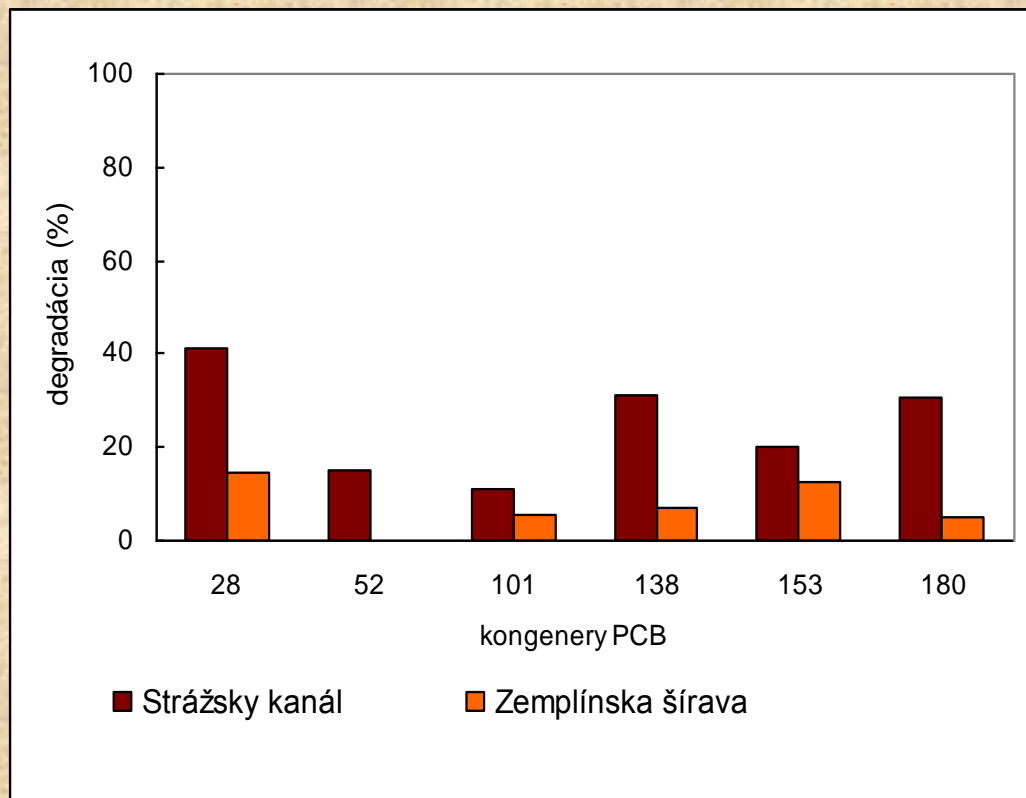
Porovnanie koncentrácie kongenéro PCB degradovaných v sedimentoch Strážskeho kanála v 0. a 14. dni degradácie.

Indikátorové kongenéry:

28-3Cl, 52-4Cl, 101-5 Cl, 138,153,180 > 5 Cl



Biodegradácia PCB v sedimentoch Sk a Zš prirodzeným konzorciom s biostimuláciou



Porovnanie koncentrácie kongenéro
PCB degradovaných v sedimentoch
Zemplínskej šíravy v 0. a 14. dni
degradácie.

Porovnanie koncentrácie kongenéro
PCB degradovaných v sedimentoch
Strážskeho kanála v 0. a 14. dni
degradácie.

Indikátorové kongenéry:

28-3Cl, 52-4Cl, 101-5 Cl, 138,153,180 > 5 Cl

Biodegradácia PCB v sedimentoch Sk a Zš s bioaugmentáciou

- Sedimenty obohatené izolovaným mikrobiálnym konzorciom

	Strážsky kanál		Zemplínska šírava		rozdiel 0. a 14. deň	
	0. deň	14. deň	0. deň	14. deň	Sk	Zš
Kongenér PCB	mg PCB.kg ⁻¹	mg PCB.kg ⁻¹	µg PCB.kg ⁻¹	µg PCB.kg ⁻¹	mg PCB.kg ⁻¹	µg PCB.kg ⁻¹
28	20,38	2,41	3,18	2,72	17,96	0,46
52	8,23	16,74	1,17	5,41	-	-
10	9,00	16,93	1,39	5,95	-	-
138	10,05	16,58	1,43	6,70	-	-
153	6,59	12,33	1,09	5,44	-	-
180	5,66	9,67	1,12	5,18	-	-

- Výraznejšia degradácia len pri kongenére PCB 28 – 2,4,4' trichlór-bifenyl

ZÁVERY

- Sedimenty Zemplínskej šíravy a Strážskeho kanála kontaminované s PCB sú toxické, nie však mutagénne pre testované štandardné kmene;
- Izolované mikrobiálne konzorcium z oboch sedimentov obsahuje bakteriálne kmene s prítomným génom *bphA1*, kódujúcim enzým 2,3-dioxygenázu štartujúcu degradáciu PCB;
- Biodegradácia PCB v sedimentoch s pôvodným mikrobiálnym konzorciom s biostimuláciou: Strážsky kanál - 28 (40 %), 138 (31 %), 180 (30 %); Zemplínska šírava - 28 (14 %) a 153 (13 %) bola účinnejšia ako s bioaugmentáciou; v sedimentoch bioaugmentovaných izolátmi zo sedimentov bola pozorovaná výraznejšia degradácia len v prípade kongenéru PCB28, kde rozdiel koncentrácie pre Strážsky kanál predstavuje 18 mg.kg^{-1} a pre Zemplínsku šíravu $0,5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ sedimentu;
- Pri prevzdušnení a priživení sedimentov (N, P) na brehu kontaminovaného priemyselného kanála je možné uvažovať aj s biodegradáciou PCB prítomným bakteriálnym konzorciom – potrebné overenie priamo v reále.

POĎAKOVANIE

Paedr. Alena Pilváňová

www.non-combustion.sk

Doc. Ing. Mária Mikulášová, PhD.



Ďakujem Vám za pozornosť

