

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

**Robin Kycil<sup>1</sup>, Vít Matějů<sup>1</sup>, Simona Vosáhlová<sup>1</sup>, Sandra Pšeničková<sup>1</sup>, Michal Strejček<sup>2</sup>, Jáchym Šuman<sup>2</sup>, Andrea Zubrová<sup>2</sup>, Ondřej Uhlík<sup>2</sup>, Josef Kozák<sup>3</sup>, Helena Bartáková<sup>3</sup>**

1) ABITEC, s.r.o., *Radiová 1285/7, 102 31 Praha 10*

2) VŠCHT Praha, FPBT, *Technická 5, 166 28 Praha 6*

3) GEO Group a.s., *Jana Masaryka 26, 120 00 Praha 2*

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## OBSAH

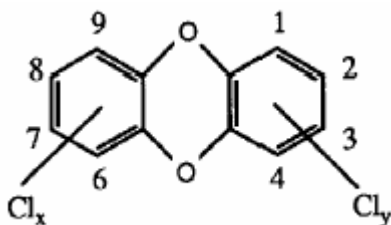
- Úvod
- Možnosti biologických technologií pro biotransformaci či degradaci PCDD/F
- Výsledky pilotních a čtvrtprovozních pokusů
- Využití sekundárních metabolitů rostlin (SMR) pro podporu aerobní kometabolické transformace a degradace PCDD/F
- Čtvrtprovozní pokusy s využitím SMR a reálných vzorků zemin kontaminovaných PCDD/F
- Uplatnění výsledků pro dekontaminace znečištěných lokalit či úpravu odpadů

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## PCDD/F – základní vlastnosti

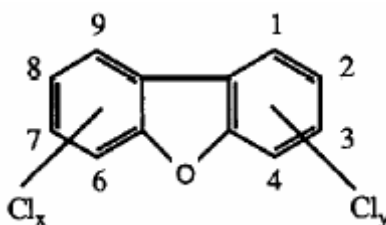
- všechny kongenery dioxinů jsou hydrofobní, s malou rozpustností ve vodě
- chemická a biochemická odolnost, odolnost vůči vysokým teplotám
- silné sorpční vlastnosti jak na organické tak anorganické podíly půdy
- limitovaná dostupnost v prostředí pro biologickou transformaci či degradaci
- vysoká toxicita

PCDD



75 kongenerů

PCDF



135 kongenerů

[uiozp.ft.utb.cz/studmat/200932591642/PCDD-PCDF.doc](http://uiozp.ft.utb.cz/studmat/200932591642/PCDD-PCDF.doc)

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Toxické vlastnosti PCDD/F

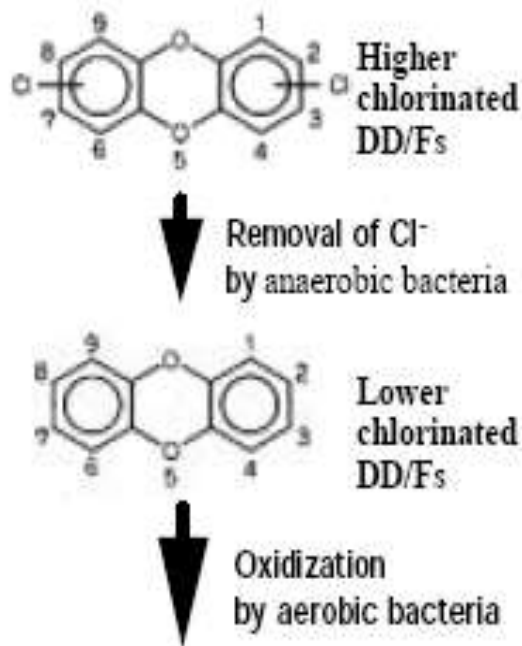
- způsobují chlorakné, poškození celistvosti kůže
- karcinogenní, mutagenní, teratogenní, embryotoxické,
- endokrinní disruptory (hormonálně aktivní látky)
- neurotoxické

## Původ PCDD/F

- antropogenní – výroba aromatických chlorderivátů (například výroba herbicidů), chlorové bělení papíru, tavení rud, produkty neřízeného spalování odpadů a jiné
- přírodní – lesní požáry, sopečné erupce

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Možnosti biologické transformace či degradace PCDD/F



**Reduktivní dehalogenace** za anaerobních podmínek je považována za pravděpodobně jediný biologický proces pro transformaci vysoce chlorovaných kongenerů PCDD/F. Di- po octachlorované PCDD/Fs mohou být předmětem postupného reductivního odstranění atomů halogenů anaerobními bakteriemi.

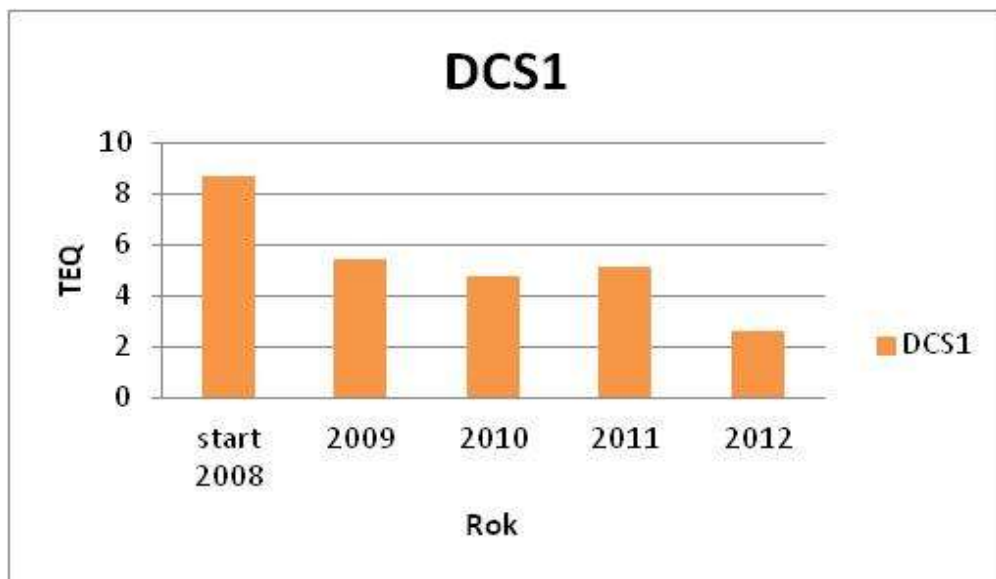
Vzniklé níže chlorované kongenery mohou být dále transformovány za aerobních podmínek a dále biologicky degradovány.

BUNGE, M., ADRIAN, L., KRAUS, A., OPEL, M., LORENZ, W.G., ANDREESEN, J.R., GÖRISCH, H., LECHNER, U. (2003): Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium, *Nature* **421**:357- 360

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Praktické zkušenosti z biologické transformace či degradace PCDD/F

Pilotní test za provozních podmínek (množství cca 130 t zeminy)



Toxický ekvivalent (TEQ) zeminy se snížil po každém technologickém zákroku provedeném v roce 2009 a 2012 (celkově se TEQ snížil o cca 70%).

Žádné změny hodnoty TEQ nenastaly, pokud nebyla zemina nijak ošetřována (od 2010 do 2011).

Obr. 1 – Toxický ekvivalent se snížil z hodnoty 8,7 ng/g suš. to 2,6 ng/g suš. (70%).

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Praktické zkušenosti z biologické transformace či degradace PCDD/F

### Čtvrtprovozní test v laboratorních podmínkách



Snížení hodnoty TEQ o více jak 70% na cca 1,3 až 1,6 ng TEQ/g suš.

Obr. 2 – Vývoj hodnoty TEQ v průběhu čtvrtprovozního pokusu s reálným vzorkem zeminy v laboratoři

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Praktické zkušenosti z biologické transformace či degradace PCDD/F

Čtvrtprovozní test v laborních podmínkách, aerobní transformace s využitím cíleného mikrobiálního kometabolismu přidavkem sekundárního metabolitu rostlin:

**Pokles TEQ o 76% na konečnou koncentraci 0,52 ng TEQ / g suš. za 8 měsíců (od 10/2019 do 06/2020).**



Obr. 3 - Bioreaktory pro čtvrtprovozní pokus



Obr. 4 - Měření odplynů analyzátozem plynů (CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub>)

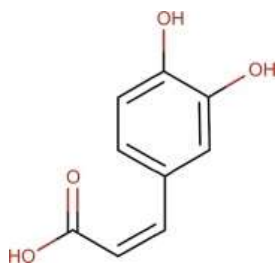


# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

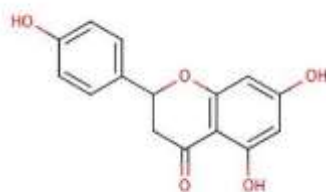
## Využití sekundárních metabolitů rostlin pro podporu aerobní kometabolické transformace a degradace PCDD/F

### Sekundární metabolity rostlin (SMR)

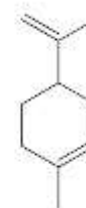
- Podporují biologický rozklad či transformaci jako růstový kometabolický substrát.
- Indukují některé mikrobiální katabolické procesy a tvorbu enzymů degradujících polutant.
- Podpora transformace či biodegradace organických polychlorovaných kontaminantů aplikací SMR vede ke snížení toxicity znečištěného prostředí.
- Tvoří několik skupin podle chemické povahy: např. fenolové látky, terpeny, alkaloidy a další. Jejich známý počet dosahuje několika set tisíc sloučenin.
- Jako příklady SMR majících vliv na biodegradaci a biotransformaci polychlorovaných polutantů lze uvést některé flavonoidy (naringenin, kvercetin, naringinin), fenolové látky (kyselina kávová) a terpeny (limonen, karvon)



Obr. – kyselina kávová



Obr. – naringenin



Obr. – limonen

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Využití sekundárních metabolitů rostlin pro podporu aerobní kometabolické transformace a degradace PCDD/F

- Použití SMR v čisté formě je v průmyslovém měřítku neekonomické, vyrábějí se v čisté formě pro potravinové doplňky, nebo léčivé přípravky).
- Lze využít zdroje ve formě odpadů (výlisky a kůra pomerančů, grapefruitů nebo citronů, odpady ze zpracování cibule), nebo např. listů břízy bílé, eukalyptu, břechťanu, jehličí borovice.
- V rámci výzkumného projektu jsme našli technické řešení přípravy organického substrátu, jehož složení podporuje kometabolickou transformaci níže chlorovaných kongenerů PCDD/F v kontaminované zemině, kalech i sedimentech.
- V substrátu byly využity odpadních materiály, které slouží jako zdroj sekundárních metabolitů rostlin limonenu, kyseliny kávové a naringenu v poměru požadovaných koncentrací vybraných SMR.
- Substrát lze využít při remediacích kontaminovaných území prováděných metodami *ex-situ*.



Obr. – nastrouhaná pomerančová kůra



Obr. – nastrouhaná citronová kůra

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Využití sekundárních metabolitů rostlin pro podporu aerobní kometabolické transformace a degradace PCDD/F

- Nevýhody přístupu založeného na využití zdrojů SMR v odpadních surovinách:
- Eliminace PCDD/F se zvyšovala až po opakovaném dávkování SMR, to vyžadovalo opakování přídavek organických substrátů se SMR.
- Opakovaný přídavek substrátu bohatého na SMR zvyšuje při sanaci náklad\ na logistiku, mechanické manipulace, vše spojené se zajištěním dostupnosti kyslíku v prostředí i zvyšování objemu dekontaminovaného materiálu.
- Pokračovali jsme proto v systematickém testování a hledání řešení dalšího cíle projektu a to nalezení vhodného heterotrofního substrátu pro podporu aerobní kometabolické biologické transformace PCDD/F.
- Vybrané modelové látky ze skupiny sekundárních metabolitů rostlin byly testovány jako vhodné substráty pro růst heterotrofních půdních bakterií a pro indukci enzymatického aparátu pro odbourávání dibenzodioxinů a dibenzofuranů.
- Bakterie pro testování byly v počátku vybrány ze sbírky izolátů Laboratoře aplikované mikrobiální ekologie Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha na základě zvolených kritérií.
- Později jsme získávali pro testování další izoláty bakterií z reálných vzorků zemin získaných z lokalit dlouhodobě kontaminovaných PCDD/F v České republice a ve Švédsku.
- Postupně jsme získali desítky izolátů.

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

Získávání izolátů bakterií z reálných vzorků zemin z kontaminovaných lokalit



Obr. – vzorkování v lokalitě na severu Švédska



Obr. – cesta na lokalitu



Obr. – odebraný vzorek

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

Získávání izolátů bakterií z reálných vzorků zemin z kontaminovaných lokalit



Obr. - vzorkování v blízkosti areálu Spolany v Neratovicích



# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Využití sekundárních metabolitů rostlin pro podporu aerobní kometabolické transformace a degradace PCDD/F

- Sekundární metabolity, které byly zahrnuty do testování jako potenciální induktory exprese dioxygenas hydroxylujících aromatický kruh, čítaly následující látky: flavon, flavanon, fisetin, naringenin, apigenin, katechin, kvercetin, myricetin, morin, kumarin, chrysin, (S)-(-)-limonen, (R)-(+)-limonen,  $\alpha$ -pinen, p-cymen, (S)-(+)-karvon, vanilovou kyselinu, salicylovou kyselinu, ferulovou kyselinu, kávovou kyselinu, trans-skořicovou kyselinu, p-hydroxybenzoovou kyselinu, umbelliferon a floroglucinol.
- Mezi nejefektivnější induktory hydroxylující dioxygenasy patřily obecně terpenoidy, především limonen či p-cymen, a flavanon.
- Zkoušky provedené s limonenem při řešení projektu prokázaly, že stimuluje rozvoj potřebné enzymatické aktivity pro degradaci PCDD/F u bakteriálních společenství přítomných v kontaminovaných zemích izolovaných z nejrůznějších zdrojů.
- Limonen samotný není k praktickému využití příliš vhodný (těkává látka, velmi omezená rozpustnost ve vodě, vyšší koncentrace v prostředí působí baktericidně).

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Využití sekundárních metabolitů rostlin pro podporu aerobní kometabolické transformace a degradace PCDD/F

- Museli jsme najít způsob, jak limonen v provozu v potřebné koncentraci do zemin zapravit, obvykle se ošetřují stovky až tisíce tun zemin. .
- Výsledkem je přípravek s názvem ABI-Dioxin, který obsahuje směs neionogenních a anionaktivních povrchově aktivních látek a limonen.
- Přípravek samotný je při správném dávkování induktorem hydroxylující dioxygenasy.
- Biologická rozložitelnost přípravku ABI-Dioxin byla ověřena standardizovaným postupem dle předpisu OECD 301F. Biologická rozložitelnost zaručuje, že se přípravek nebude akumulovat při jeho používání v dekontaminovaných zeminách, kalech, či sedimentech a nebude tak způsobovat sekundární znečištění akumulací vnášených látek do prostředí. V posledních etapách výzkumných prací našeho projektu s ním bylo pracováno při testech podpory kometabolické transformace PCDD/F za aerobních podmínek, prováděných s reálnými vzorky zemin.

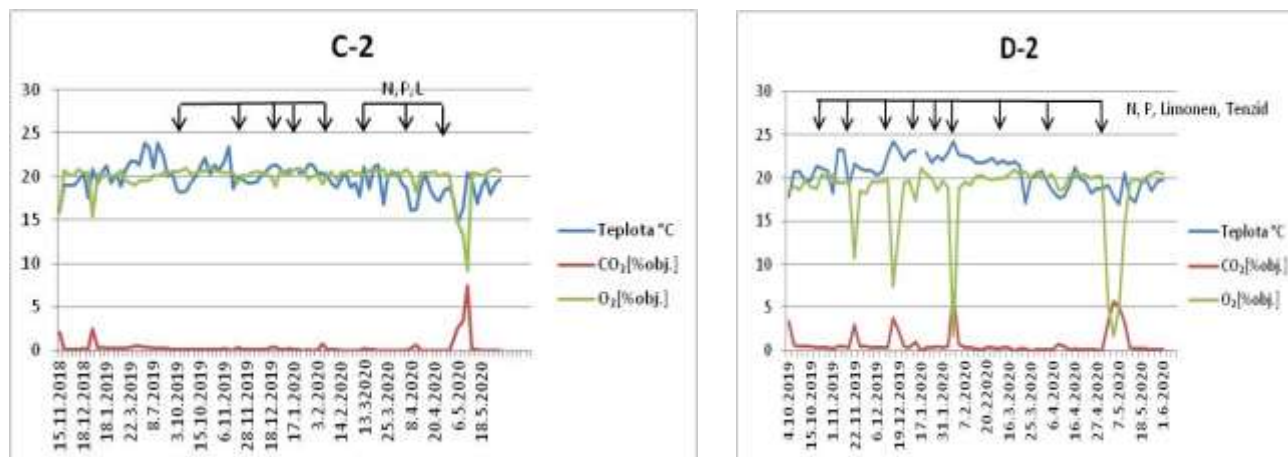


Obr. – přípravek ABI-DIOXIN

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Čtvrtprovozní pokusy s reálnými vzorky zemin kontaminovaných PCDD/F

Při závěrečné etapě testy probíhaly ve čtvrtprovozním měřítku (objem 30L) v aerovaných reaktorech. Intenzita vzdušnění byla řízena na základě měření obsahu kyslíku a oxidu uhličitého v půdním vzduchu. Současně byla měřena a zaznamenávána teplota v bioreaktorech. V průběhu biologické transformace byly ze zeminy v bioreaktorech odebírány vzorky ke zkouškám na stanovení fyzikálně-chemických, chemických a mikrobiologických ukazatelů, ke stanovení aktuální ekotoxicity a zbytkové koncentrace dioxinů. Vzorky byly odebírány také k sekvenční analýze, jejichž cílem bylo určit změny ve struktuře mikrobiálních společenstev během kometabolické transformace. Byla sledována i respirační aktivita.



Obr. - Měření složení půdního vzduchu a teploty bioreaktorů C-2 a D-2 (N= dusík, P=fosfor, L=limonen)



# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Čtvrťprovozní pokusy s reálnými vzorky zemin kontaminovaných PCDD/F

### Změny ve struktuře bakteriálních společenstev v průběhu čtvrtprovozních pokusů

- Vzorky zemin z experimentů podpory kometabolické transformace PCDD/F za aerobních podmínek byly podrobeny izolaci DNA a následné amplifikaci genů pro 16S rRNA. Změny ve struktuře mikrobiálních, konkrétně bakteriálních společenstev během kometabolické transformace byly provedeny na základě vysokokapacitní amplikonové sekvenace na platformě Illumina MiSeq.
- K hodnocení byly vybrány ty varianty, kde byly očekávány slibné výsledky a kde byl zaznamenán i významný pokles koncentrací PCDD/F.
- S dlouhodobým přidavkem limonenu stoupalo relativní zastoupení rodů *Pseudomonas* a *Rhodococcus*, což jsou typické heterotrofní taxony, které obecně disponují schopnostmi degradovat široké spektrum organických látek včetně toxikantů, mimo jiné i chlorovaných dioxinů a dibenzofuranů, a sekundárních metabolitů rostlin včetně limonenu.
- Zvýšení relativní četnosti zástupců právě těchto dvou bakteriálních rodů může vést k indukci exprese genů podílejících se na aerobním odbourávání dioxinů a dibenzofuranů, jak bylo v rámci našeho výzkumného projektu experimentálně demonstrováno na modelových zástupcích těchto dvou rodů.

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Čtvrťprovozní pokusy s reálnými vzorky zemin kontaminovaných PCDD/F

### Vývoj poklesu koncentrace PCDD/F v průběhu testů

- Pokles koncentrací PCDD/F v průběhu testů s reálnými vzorky zemin byl nejpříznivější ve variantách, kde byl používán jako heterotrofní substrát limonen, nebo v projektu připravený přípravek ABI-Dioxin (obsahuje směs neionogenních a anionaktivních povrchově aktivních látek a limonen). Stanovení koncentrací PCDD/F v zeminách z testů byl prováděn akreditovanou laboratoří. Nejvyšší pokles PCDD/F na 25,5 % původní koncentrace byl zaznamenán po 8 měsících biotransformace. Zbytkové koncentrace PCDD/F, vyjádřené jako toxický ekvivalent (TEQ) byly 520 ng TEQ/kg sušiny až 930 ng TEQ/kg sušiny.
- Kontrolní zemina pouze s přidavkem minerálních živin a vzdušněním nevykázala žádný pokles koncentrací PCDD/F.

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Uplatnění výsledků pro dekontaminace znečištěných lokalit či úpravu odpadů

- Plánujeme provedení ověřené účinnosti procesu v provozních podmínkách při dekontaminaci vytěžené zeminy, pravděpodobně z lokalit historicky znečištěných při impregnaci dřeva.
- Technologický postup lze po modifikaci využít i pro další polychlorované organické polutanty

# Biologická transformace a degradace polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)

## Závěr

- Biologická transformace a degradace PCDD/F je proveditelná.
- Proces lze v aerobní fázi intenzifikovat využitím mikrobiálního kometabolismu přidavkem SMR.
- Díky výsledkům získaným při řešení projektu dokážeme SMR do kontaminované zeminy v průběhu bioremediace vnést v jeho prakticky čisté formě formou přípravku ABI-Dioxin, odpadá tak nutnost vnášení balastní organiky do procesu při využití přírodních zdrojů SMR.

## Poděkování

Publikované výsledky byly dosaženy s podporou projektu TRIO č. FV10471.