

# CHEMIE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ I

## Environmentální procesy

(13)

## Environmentální biotické transformace chemických látek

Ivan Holoubek, Vít Matějů (Envisan)

**RECETOX, Masaryk University, Brno, CR**

**[holoubek@recetox.muni.cz](mailto:holoubek@recetox.muni.cz); <http://recetox.muni.cz>**

# (13) Environmentální biotické transformace chemických látek

Biotické transformace chemických látek.

Biodegradace, typy biodegradačních reakcí, aerobní biodegradace a metabolické mechanismy, anaerobní biodegradace, kinetika biodegradace.

Bioremediace.

Testy biodegradability.

Biotransformace, vlivy biotransformací na xenobiotika, fáze biotransformačních procesů.

# Biodegradace

**Mikrobiální degradace** hrají klíčovou roli při odstraňování syntetických chemických látek z vodního a terestrického prostředí

Pokud je biodegradace pomalá, dochází k biakumulaci a primární a sekundární toxikaci potravních řetězců nebo může dojít ke snížení kvality pitné vody nebo ovlivnění různých funkcí povrchových vod.

**Persistence chemických látek** z pohledu mikrobiální degradace vede k řadě problémů:

- ↳ Estetickým – plasty, pěnicí detergenty..,
- ↳ Ekologickým rizikům (tenzidy, PCBs, DDT, aldrin...),
- ↳ Humánním rizikům (PCDDs/Fs, pesticidy..).

# Some Definitions....

## Biodegradation

The process in which material **is broken down** into innocuous products by living organisms.

Websters New Collegiate Dictionary

## Mineralization

The **complete conversion** of an organic chemical to stable inorganic forms of C, H, N, P, etc. which may entail several successive biological transformations

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Biodegradace

V porovnání s nebiologickými eliminačními procesy jako jsou hydrolýza nebo fotochemická degradace, vede biodegradace v aerobním prostředí k anorganickým koncovým produktům jako jsou CO<sub>2</sub> a voda.

Tento proces se nazývá **ultimativní biodegradace** nebo **mineralizace** – hlavní propad látek v biotickém prostředí.

# More Definitions....

## Primary Biodegradation

- ↗ 1st Step in the Biodegradation Process
- ↗ Partial Breakdown
- ↗ Loss of Chemical Identity and in some cases function
- ↗ If Biodegradation Does Not Continue
  - Persistent Metabolites Remain (e.g. Nonylphenol ethoxylates)
  - Only Part of the Mass Returned to Natural Mineral Cycles

## Ultimate Biodegradation

- ↗ Complete Breakdown
- ↗ Loss of Chemical Identity and Function
- ↗ Extensive Mineralization with No Persistent Metabolites
- ↗ Mass Completely Returned to Natural Mineral Cycles

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# And More Definitions....

## Ready Biodegradable

- ↪ Exclusively a Legal Term
- ↪ Passes an OECD Ready Biodegradability Test
- ↪ By Inference, Is Inherently & Practically Biodegradable
- Inherently Biodegradable
- ↪ Can be ultimately biodegraded under some circumstances
- ↪ Legal Term - Passes an OECD Inherent Biodegradability Test

## Practically Biodegradable

- ↪ Is ultimately biodegraded in habitats to which it is discarded
- ↪ Rate of degradation exceeds or is similar to the rate of loading (No accumulation)

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich



# Mikrobiální transformace

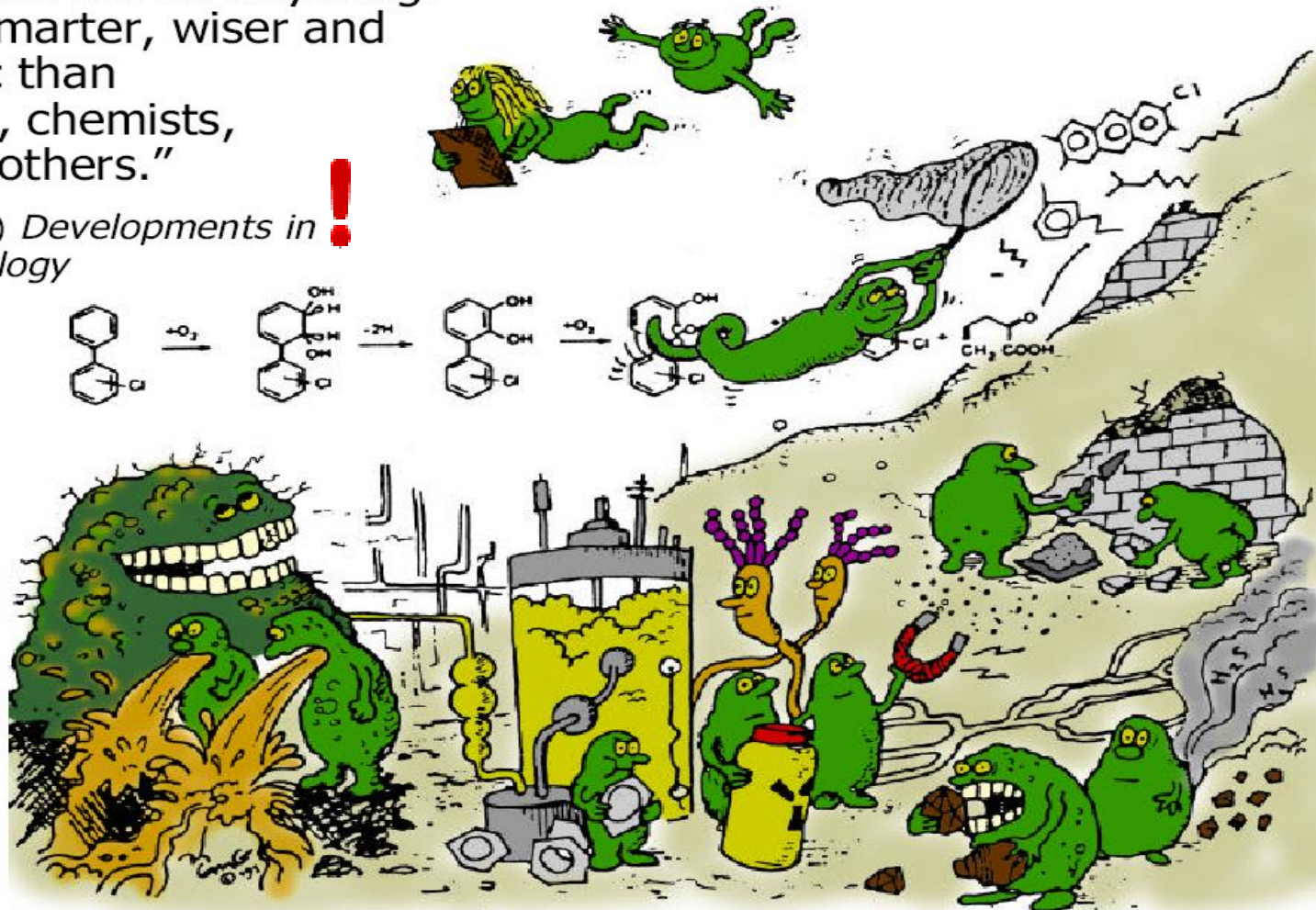
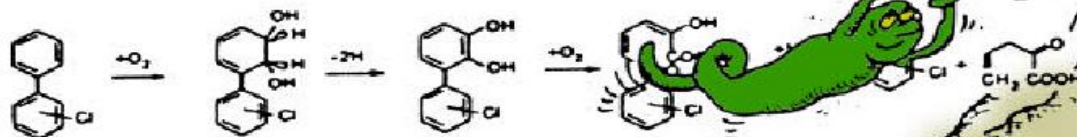
Microbes can and will do anything:  
microbes are smarter, wiser and  
more energetic than  
microbiologists, chemists,  
engineers and others."

Perlman, D. (1980) *Developments in Industrial Microbiology* !



Správně je

D. PERLMAN



Vít Matěju



# Mikrobiologie

**MIKROORGANISMY** schopné rozkládat polutanty:

- ↪ Bakterie
- ↪ Kvasinky
- ↪ Plísně
- ↪ Nižší houby



**Nejčastěji se využívají bakterie.**

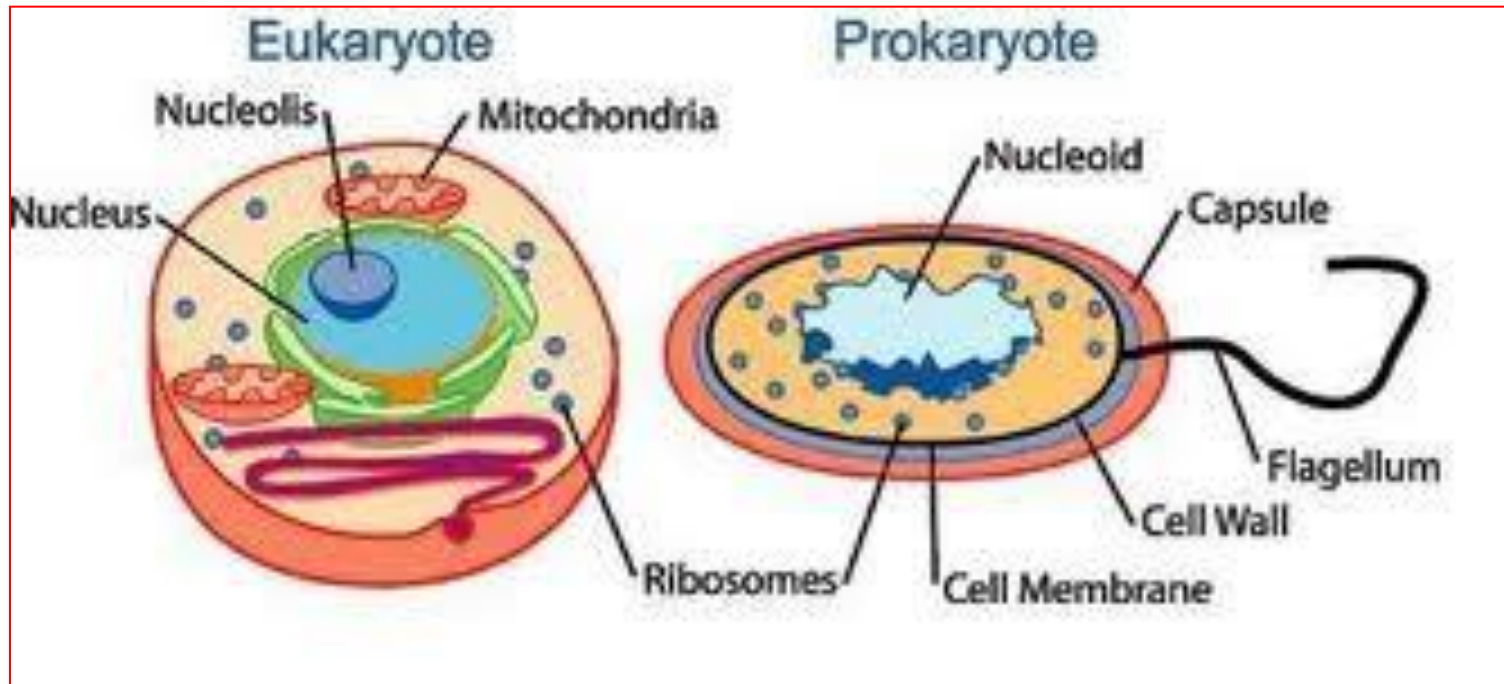
Využití kvasinek pro čištění kontaminovaných lokalit prakticky neexistuje.

Nižší houby: snaha o jejich využití nevedla k úspěšným výsledkům, takže se v současné době nevyužívají.

Vít Matějů

# Mikrobiologie

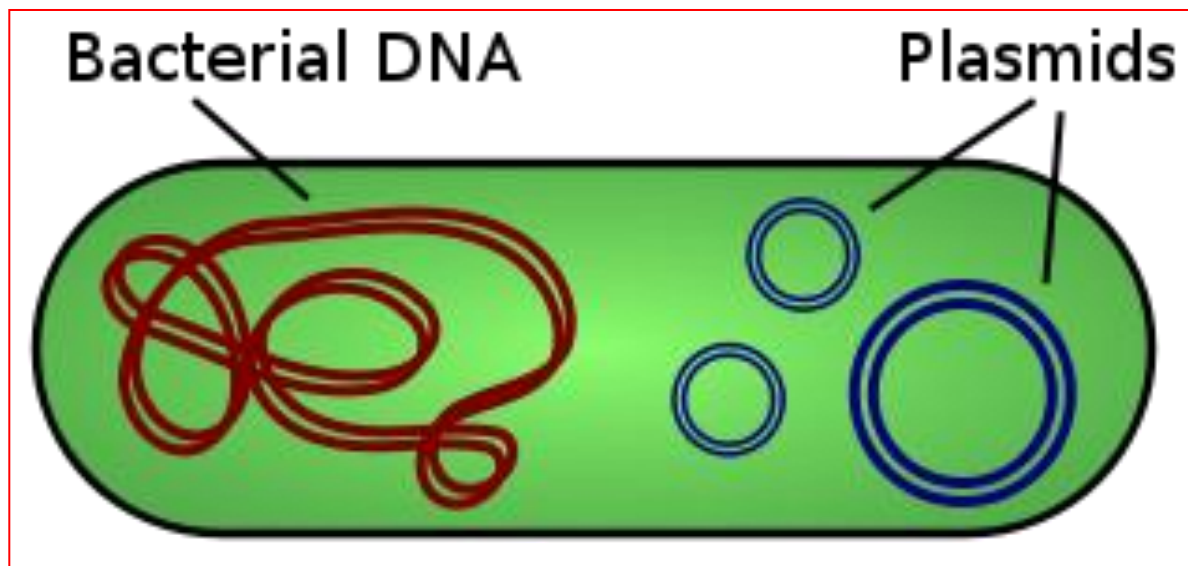
- ↪ **Eukaryontní organismy – kvasinky, nižší houby**
- ↪ **Prokaryontní organismy - bakterie**



Vít Matějů

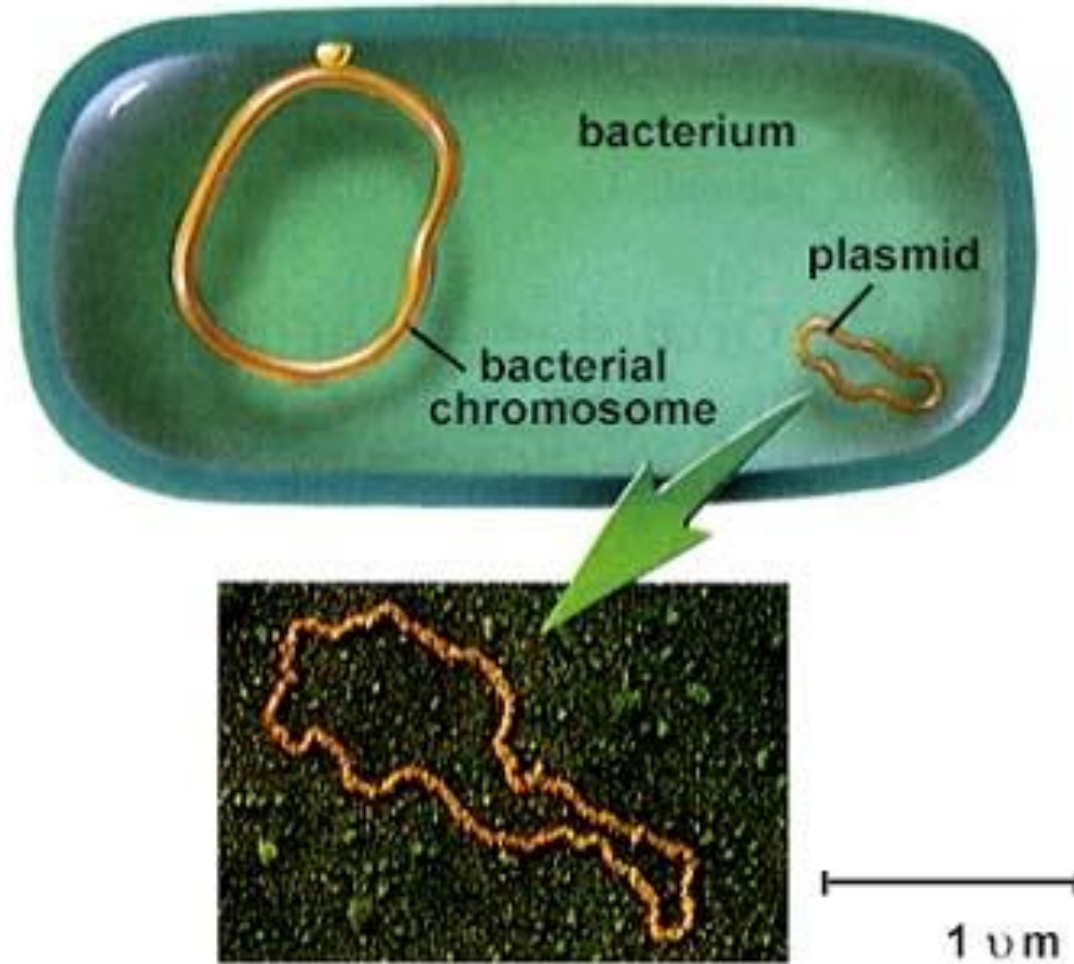
# Mikrobiologie

- ↪ **PLASMIDY** – většinou nesou genetickou informaci pro syntézu enzymů nutných pro degradaci polutantů
- ↪ Pokud pomnožovací kultivace neprobíhá za selekčního tlaku, hrozí vyředění plasmidů a ztráta biodegradační aktivity.



Vít Matějů

# Mikrobiologie



Vít Matějů

# Mikrobiální degradace

- ↪ Využívají se kmeny přirozeně se vyskytující v zájmové lokalitě – autochtonní populace
- ↪ Nebo kmeny uměle připravené (izolace, selekční tlaky, pomnožení) s požadovanými vlastnostmi – allochtonní populace.
- ↪ Při využití allochtonních kmenů se postup nazývá **bioaugmentace** – obohacení vyselektovanými kmeny z jiných míst. Zastupitelný termín pro bioaugmentaci je **inokulace**.
- ↪ Otázkou je, jak dlouho inokulované kmeny přežívají a jak dlouho jsou aktivní.

Vít Matějů

# Mikrobiální procesy

Co mikroorganismy umí ?

## BIOTRANSFORMACE

Obměna molekuly polutantu biologickou cestou, výsledek může být pozitivní i negativní

## BIODEGRADACE

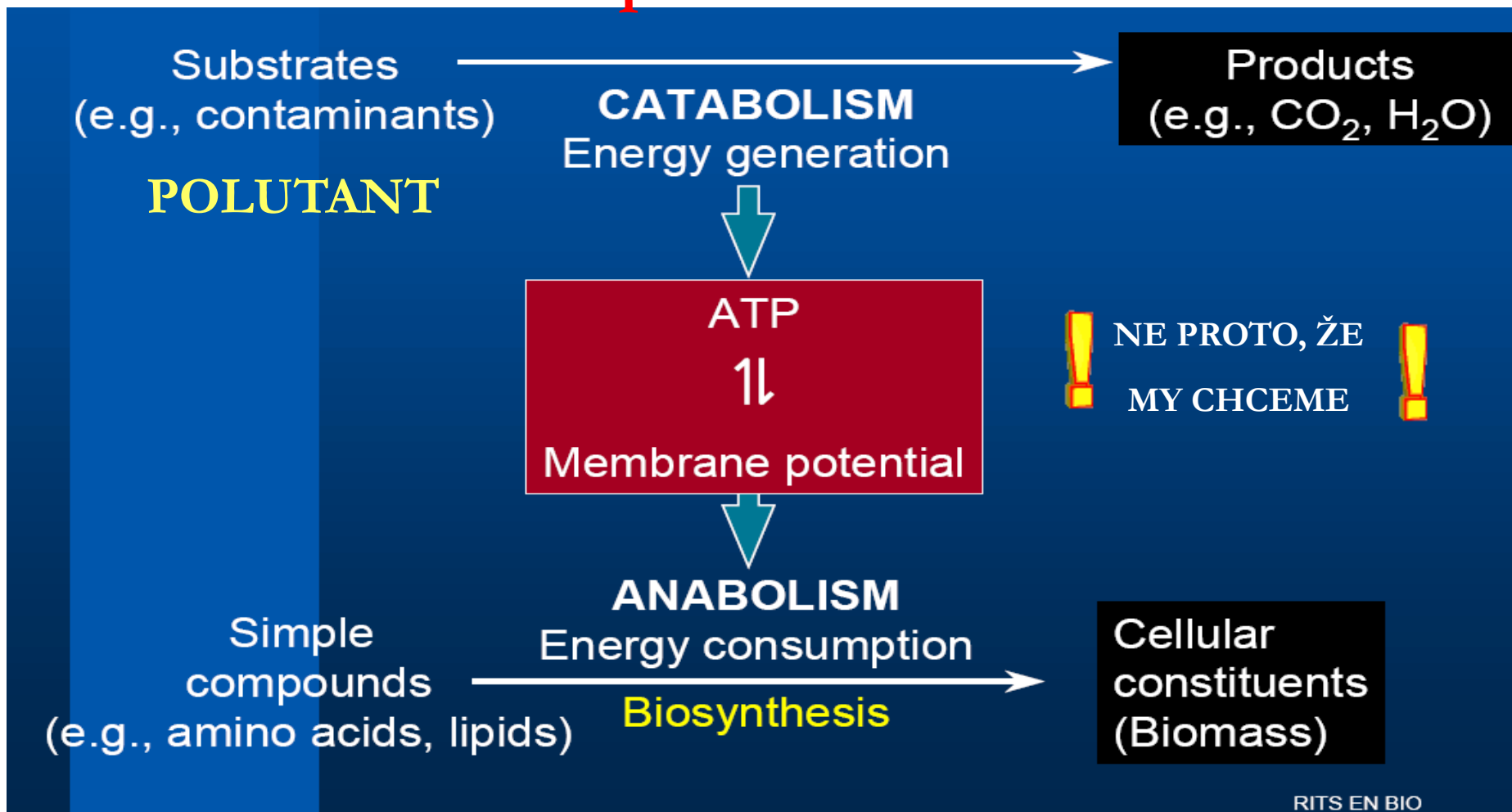
Rozklad organických látek na menší organické či anorganické molekuly (aminokyseliny, monosacharidy, tuky)

## MINERALIZACE

Oxidace organické látky na oxid uhličitý a vodu (za uvolnění energie a tvorby mikrobiální biomasy)

Vít Matějů

# Základní mikrobiologické mechanismy využití polutantů



Vít Matěju



# Mikrobiologie – biologický rozklad polutantů

**Aerobní** - v přítomnosti kyslíku (alifatické uhlovodíky, některé chlorované ethyleny, aromatické uhlovodíky, fenoly), kyslík je finální akceptor elektronů

**Anaerobní** – bez přítomnosti kyslíku (pentachlorfenol, tetrachlorethylen, aromatické uhlovodíky, organické kyseliny, nitroaromatické sloučeniny – TNT, RDX, HRX – finální akceptor elektronů jiný než kyslík

Vít Matěju

# Biologická rozložitelnost polutantů

Biologická rozložitelnost polutantu závisí na:

- ↪ Struktura a náboji molekuly
- ↪ Polaritě
- ↪ Rozpustnosti ve vodě
- ↪ Stupni zvětrání
- ↪ Biologické dostupnosti
- ↪ Enzymatickém vybavení mikroorganismu
- ↪ Transportu do buňky (přenosu hmoty)



Vít Matějů

# Factors Affecting Biodegradation

## Inherent Properties of a Chemical

- ↪ Structure
- ↪ Physical/Chemical Properties

## Environmental Conditions

- ↪ Local Biology
- ↪ Physical chemical conditions

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Faktory řídicí biodegradace

- ↪ **Půdní matrice**
- ↪ **Katabolická schopnost mikrobů**
- ↪ **Chemické vlastnosti**
- ↪ **Biodostupnost**
- ↪ **Přítomnost dalších chemických látek (NAPLs)**

# Inherent Properties of a Chemical

## Molecular Weight

- >500 Daltons - Negative

## Types of Bonds (Stability or Availability of Enzymes in Nature)

- Esters < Amides < Ethers < Sulfonates < Phosphonates

## Stereochemistry

## Types and Numbers of Substitutions

- Cl, NO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub> - Negative
- OH, =O, NH<sub>2</sub>, SO<sub>4</sub> - Neutral or Positive

## Branching of Alkyl Chains

## Steric Limitations around Bonds

The more crowded the more difficult for enzymes to reach \*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Polarita molekuly

## Hydrofóbní molekuly:

- ↪ **silná sorpce** na pevné částice horninového prostředí a v organickém podílu
- ↪ **rozpouštějí se v nepolárních látkách** přítomných v prostředí (ropné uhlovodíky)
- ↪ **transport do buňky** je možný pouze pokud jsou **rozpuštěné ve vodě**

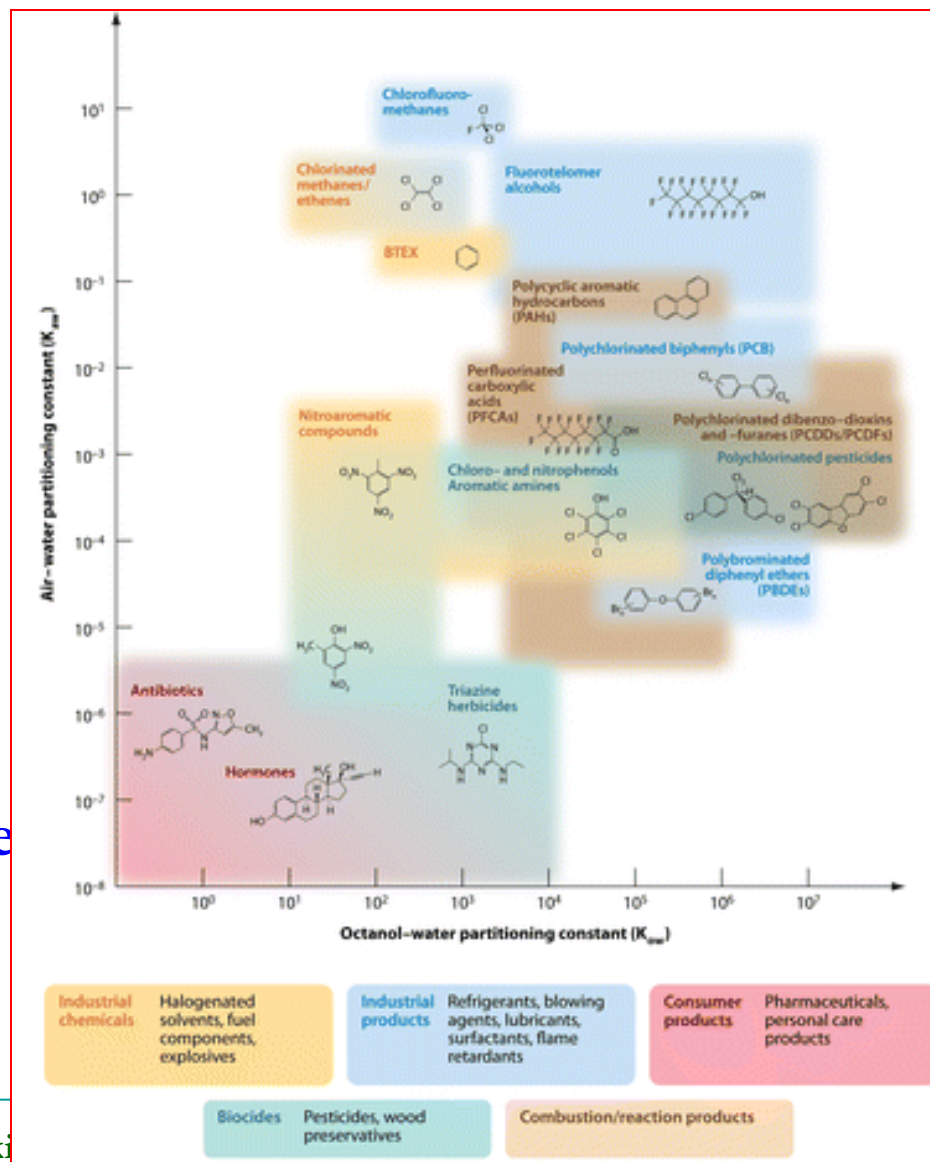
**Je nezbytná podpora přenosu hmoty.**

# Makroskopické parametry molekuly

Mezi nejčastěji používané makroskopické parametry k popisu molekul patří:

- ↪ stupeň hydrofobicity
- ↪ rozdělovací koeficient polutantu oktanol-voda
- ↪ doba zdržení při HPLC

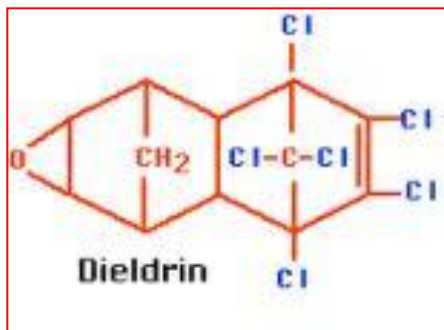
Zvyšování rozdělovacího koeficientu oktanol-voda v některých případech vede ke snížení rychlosti biodegradace.





# Struktura molekuly

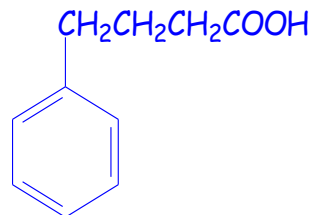
- ↪ Adice halogenového iontu, nitroso skupiny, CN, sulfátu, halogenu či methyly k jednoduchému aromatickému uhlovodíku, mastné kyselině či jiné molekule **podstatně zhoršuje biologickou rozložitelnost**
- ↪ adice hydroxylové, karboxylové či amidické skupiny **stimuluje biodegradovatelnost**



Rozložitelnost klesá se stoupající alkyací a halogenací **původní látky**  
**Chybí enzymy pro rozklad**

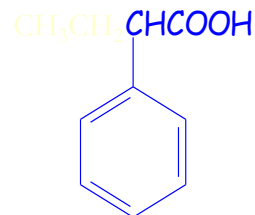
# Chemická struktura a degradace

## 1. Influence of point of linkage



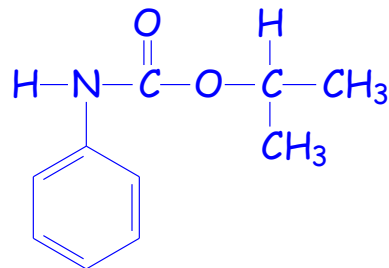
4-phenylbutyric  
acid

Rapidly  
degraded

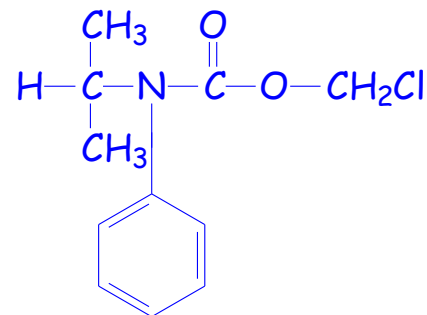


2-phenylbutyric  
acid

Slowly  
degraded



Propam



Propachlor

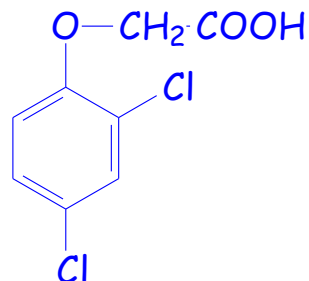
Centre for Toxic Compounds in the Environment

<http://recetox.muni.cz>

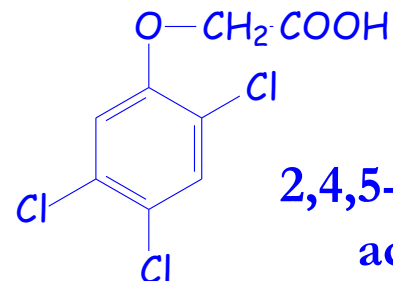
# Chemická struktura a degradace

## 2. Influence of substitution

2,4-dichloroacetic  
acid (2,4-D)

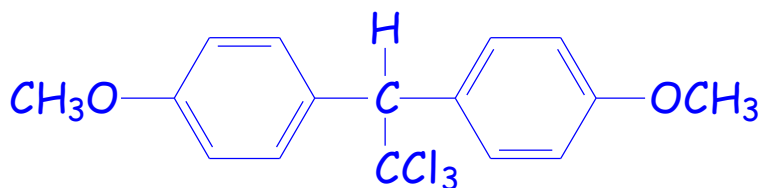


**Rapidly  
degraded**

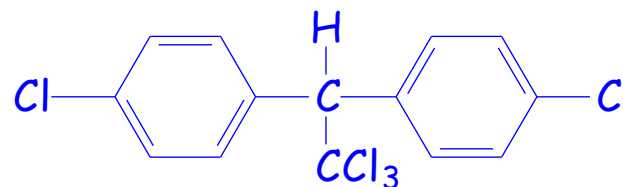


2,4,5-trichloroacetic  
acid (2,4,5-T)

**Slowly  
degraded**



Methoxychlor

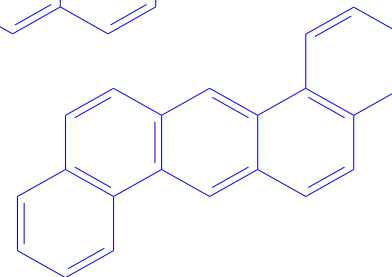
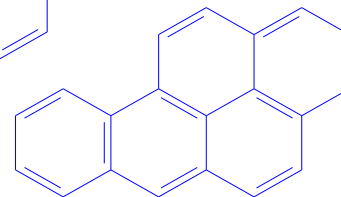
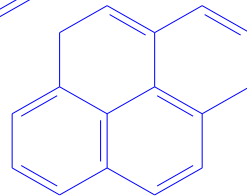
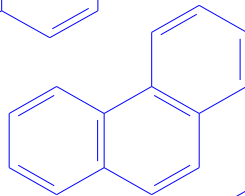
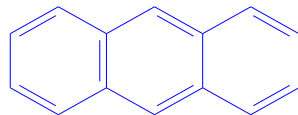
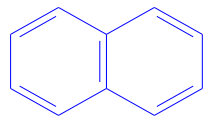


DDT

# Chemická struktura a degradace

Rapidly degraded

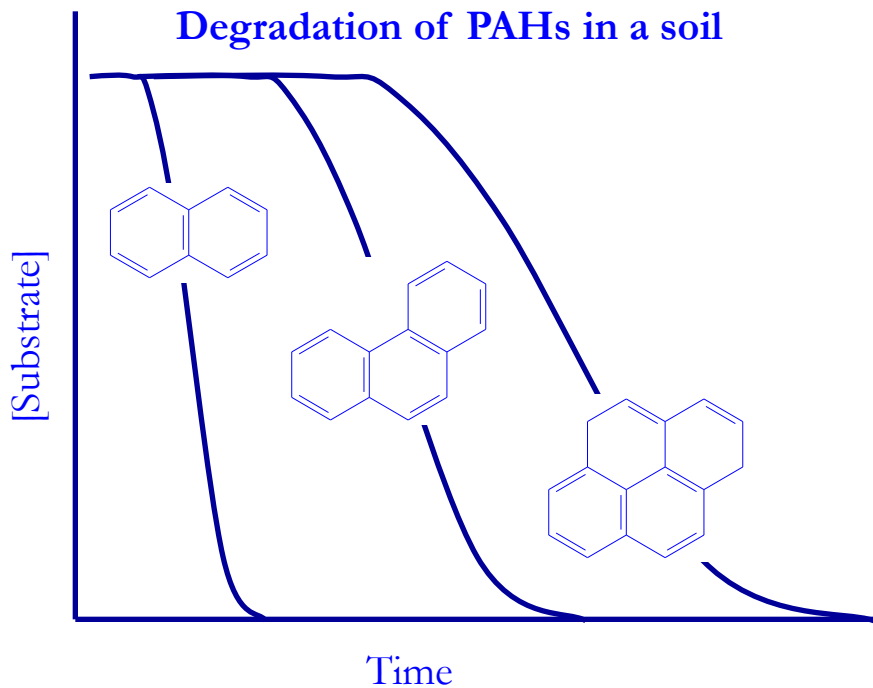
3. Influence of size



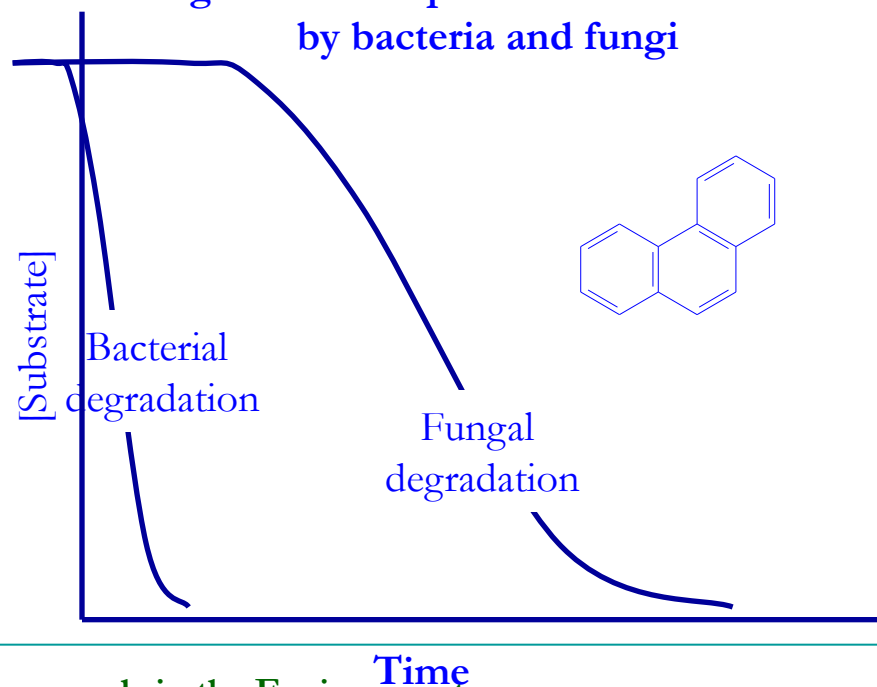
Slowly degraded

# Chemická struktura a degradace

Degradation of PAHs in a soil



Degradation of phenanthrene in a soil by bacteria and fungi



# Environmental Factors Affecting Biodegradation

## Presence of Potential Degraders

## Favorable Conditions for Degradation Population Activity and Growth

- ↪ Temperature & pH
- ↪ Sufficient Nutrients (N, P, trace elements)
- ↪ Moisture
- ↪ Availability of Electron Acceptors ( $O_2$ ,  $NO_3$ ,  $SO_4$ )
- ↪ Time (SRT > Generation Time)
- ↪ Absence of Inhibitors

## Bioavailability of the Chemical

- ↪ Solubility
- ↪ Sorption

## Concentration Sufficient Opportunity for Acclimation

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Podmínky pro odbourávání chemických látek

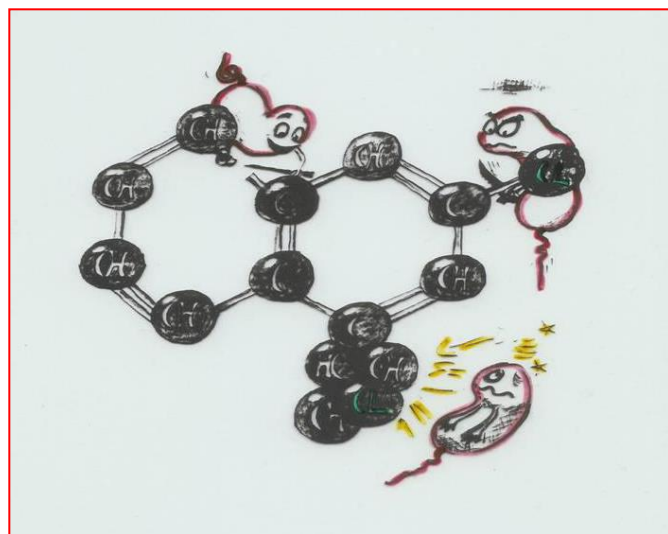
- ↪ Pro biologický rozklad polutantů je nezbytné, aby mikroorganismy obsahovaly enzymy, které jsou schopné katalyzovat degradační či biotransformační reakce polutantu.
- ↪ Fyziologické pochody nesmí být inhibovány přítomnými polutanty
- ↪ Kontaminované prostředí nesmí působit na mikroorganismy toxicky.

Vít Matějů



# Podmínky pro odbourávání chemických látek

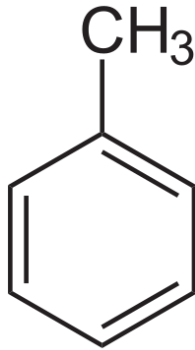
- ↪ V prostředí je třeba zajistit **dostatek makrobiotických prvků** (dusík jako  $\text{NH}_4$  a fosfor jako orthofosfát) a
- ↪ **Vhodné pH, teplotu, dostatek vlhkosti (v půdě) a přítomnost finálních akceptorů elektronů**



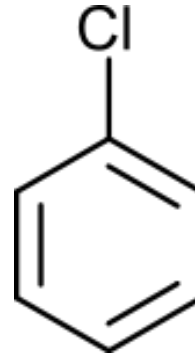
Vít Matějů

# Odbourávání chemických látek

Některé polutanty nelze odbourávat vedle sebe, například:



Toluen

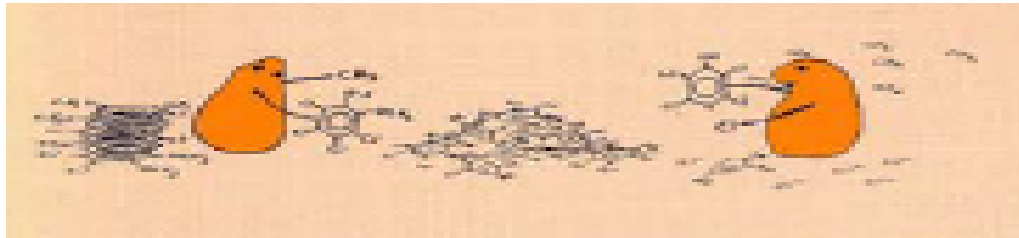


Chlorbenzen

Vít Matějů

# Optimální podmínky pro činnost půdních bakterií

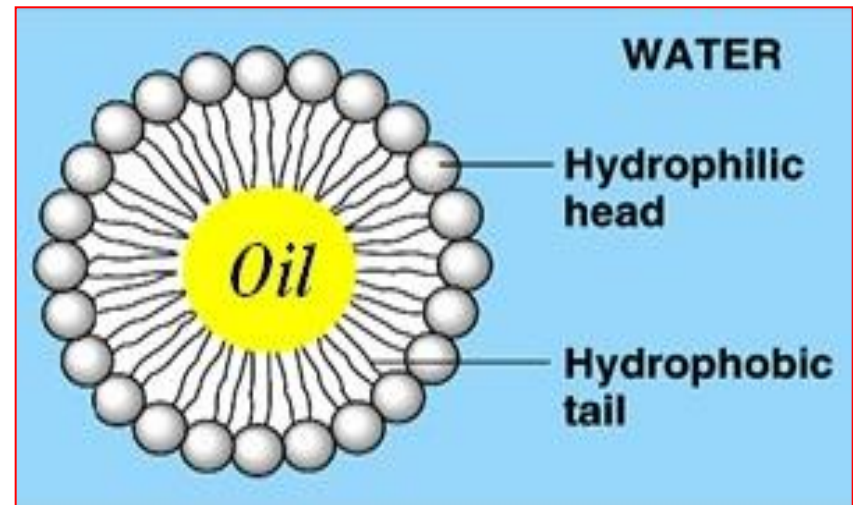
- ↪ pH 4,5 až 8,2
- ↪ **Obsah vlhkosti** nejméně 30 % půdní vodní kapacity
- ↪ **Enzymy** – oxydasy, monooxygenasy, dioxygenasy, hydrolasy, peroxidasy



Vít Matějů

# Transport do buňky – přenos hmoty

- ↪ **Bakterie nevytvářejí exoenzymy pro rozklad polutantů**
- ↪ **Rozklad probíhá v buňce**
- ↪ **Molekuly se do buňky dostávají přes buněčnou membránu**
- ↪ **Transport do buňky je:**
  - aktivní (přenašeče)
  - pasivní (např. difúze)

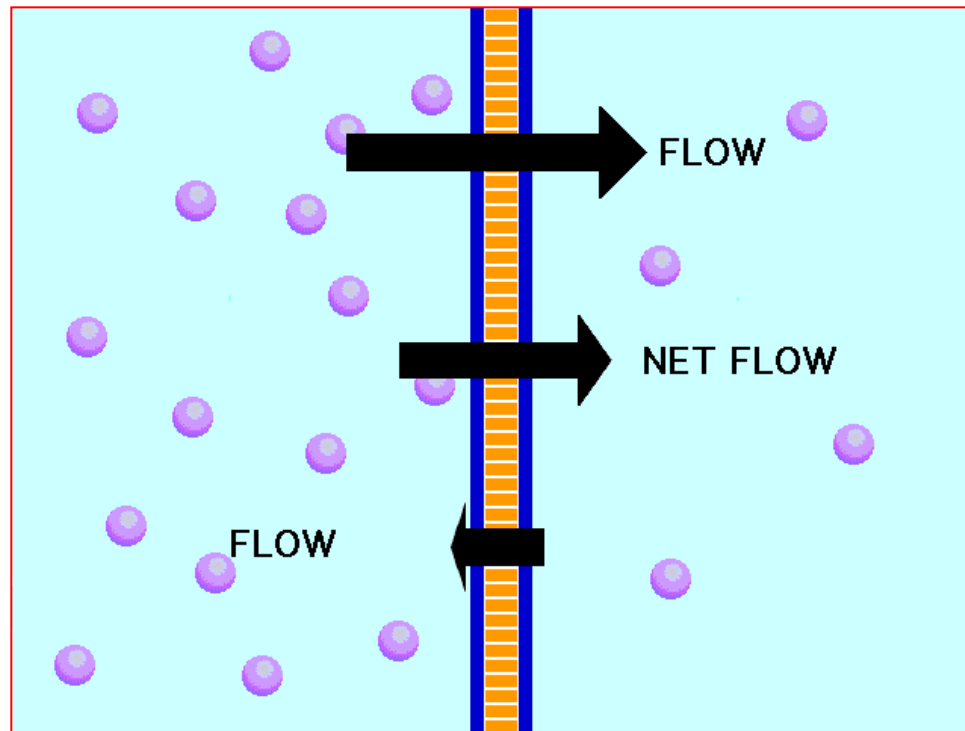


Vít Matějů

# Transport do buňky – přenos hmoty

**Pasivní transport – difuze:**

Není třeba energie, je to pohyb molekul z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací látky

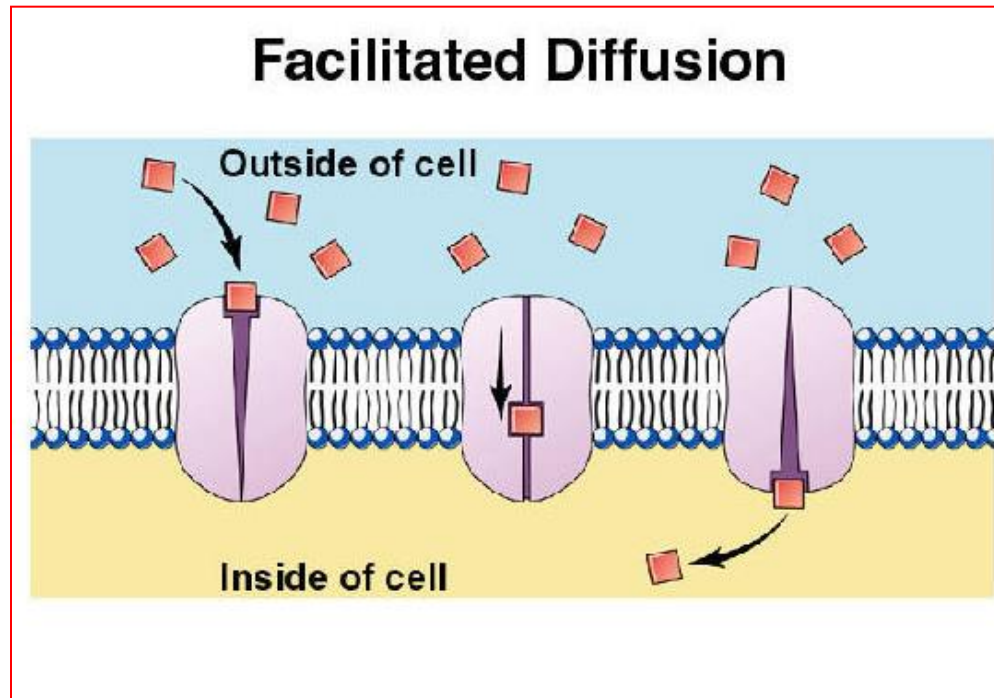


Vít Matěju

# Transport do buňky – přenos hmoty

## Pasivní transport – podporovaná difuze

Není třeba ATP, ale musí být přítomna přenosová bílkovina, která zprostředkovává přenos z prostředí s vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací

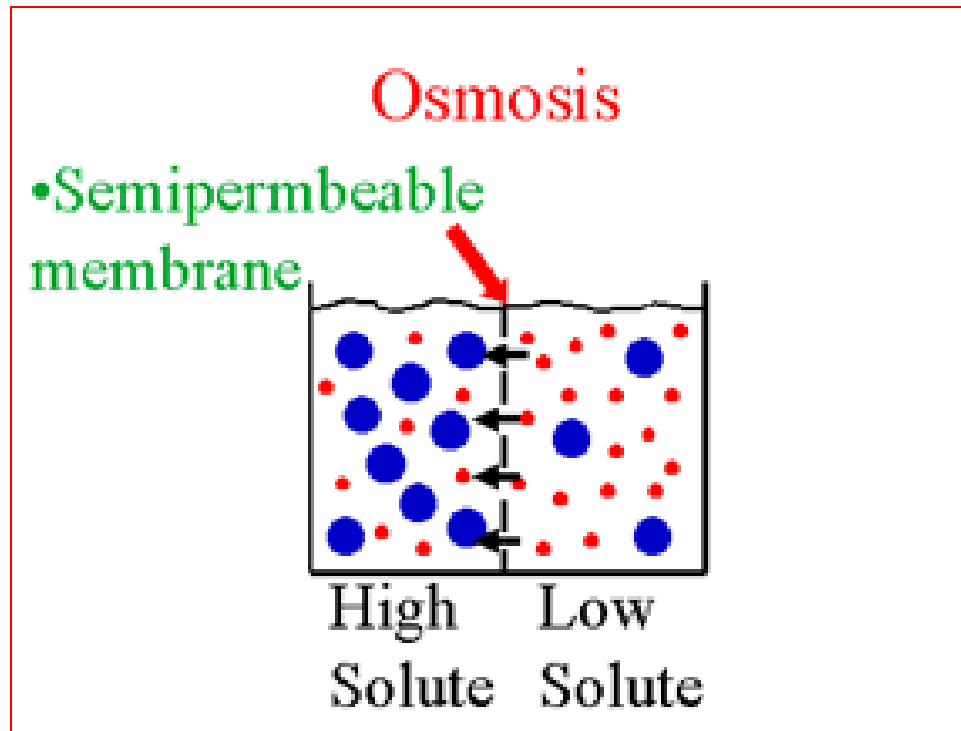


Vít Matějů

# Transport do buňky – přenos hmoty

## Pasivní transport – osmóza

Pohyb vody (červené tečky) polopropustnou membránou do místa s vyšší koncentrací rozpuštěných látek (modré tečky)

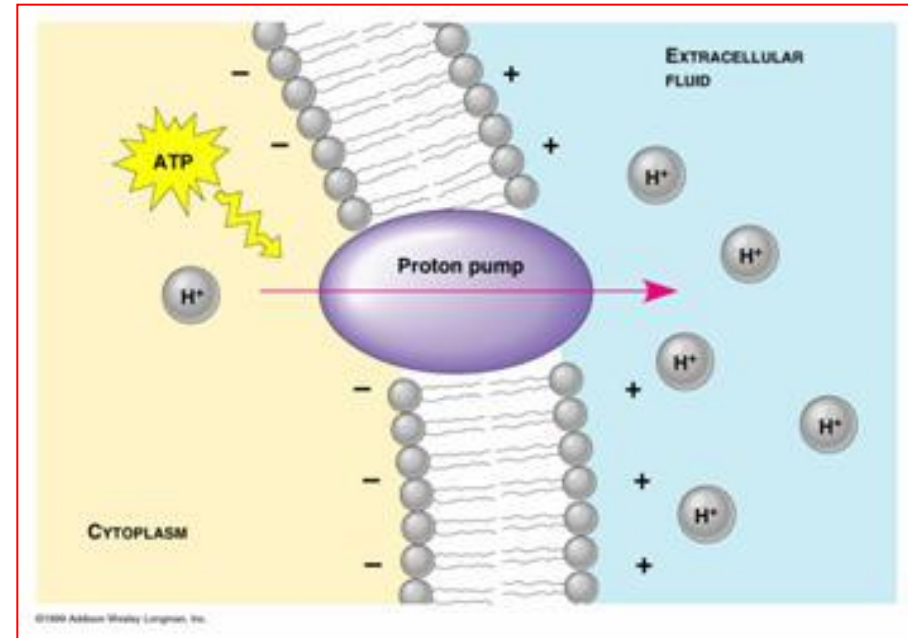
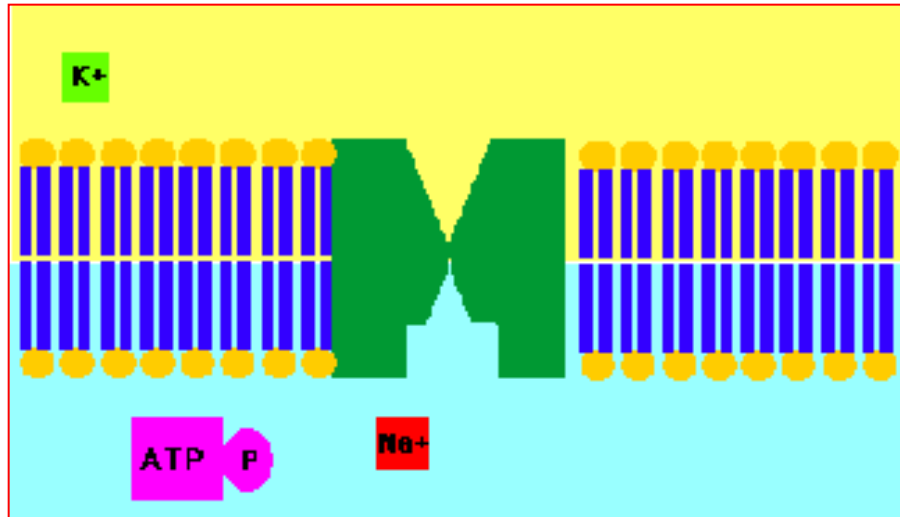


Vít Matějů

# Transport do buňky – přenos hmoty

## Aktivní transport

Pro aktivní transport je třeba energie (např. ve formě ATP)



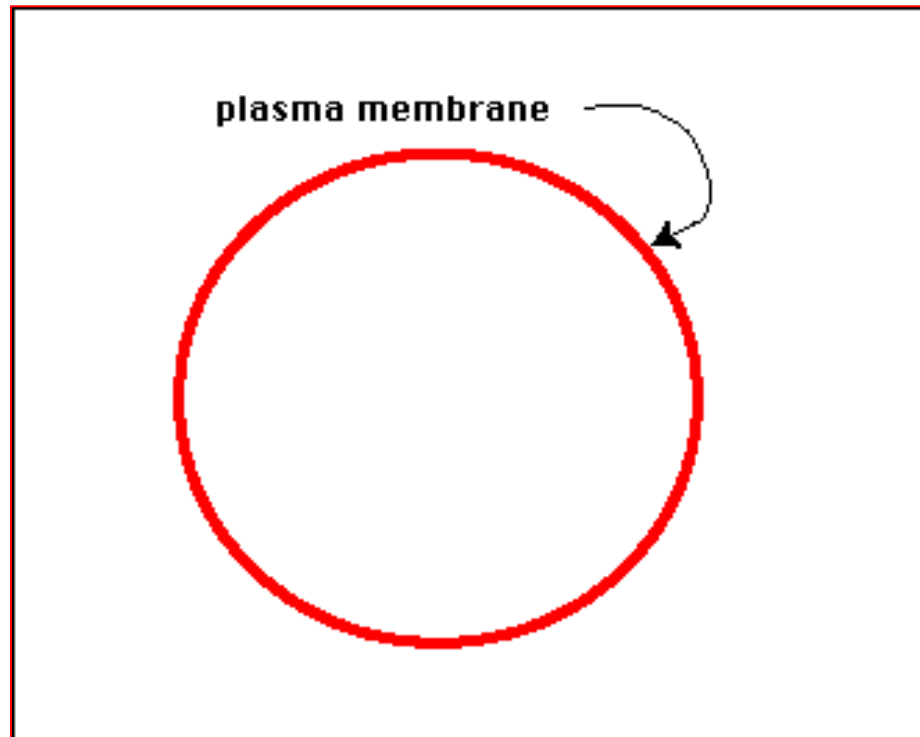
Vít Matějů



# Transport do buňky – přenos hmoty

## Aktivní transport - endocytosa

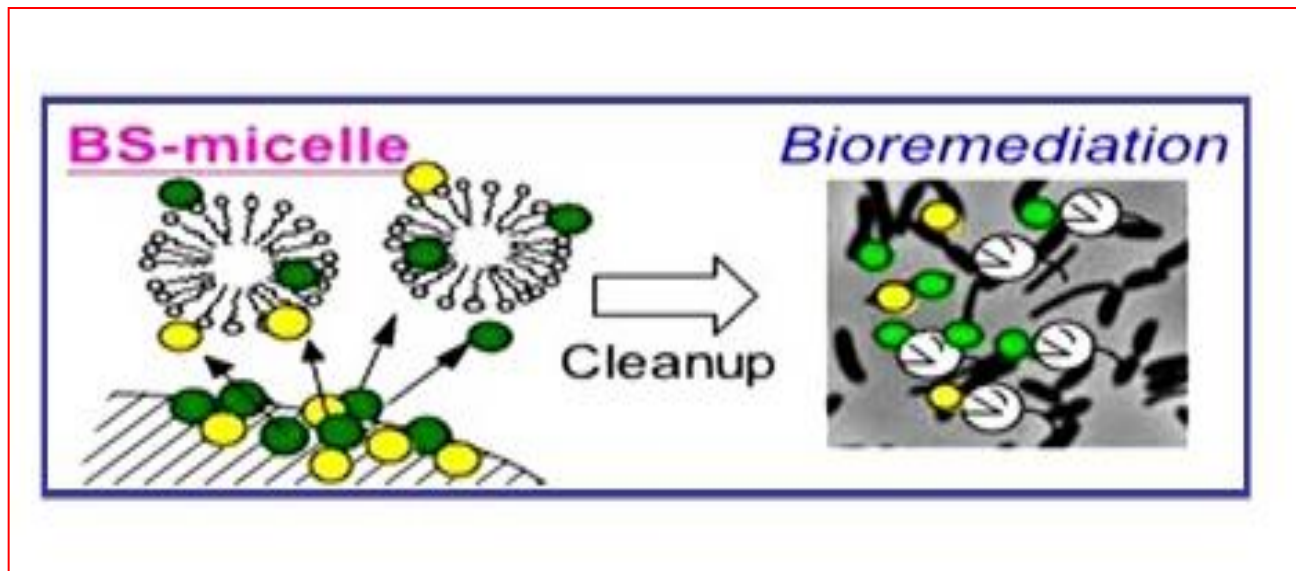
Při tomto způsobu transportu vnesená látka neprochází buněčnou membránou



Vít Matějů

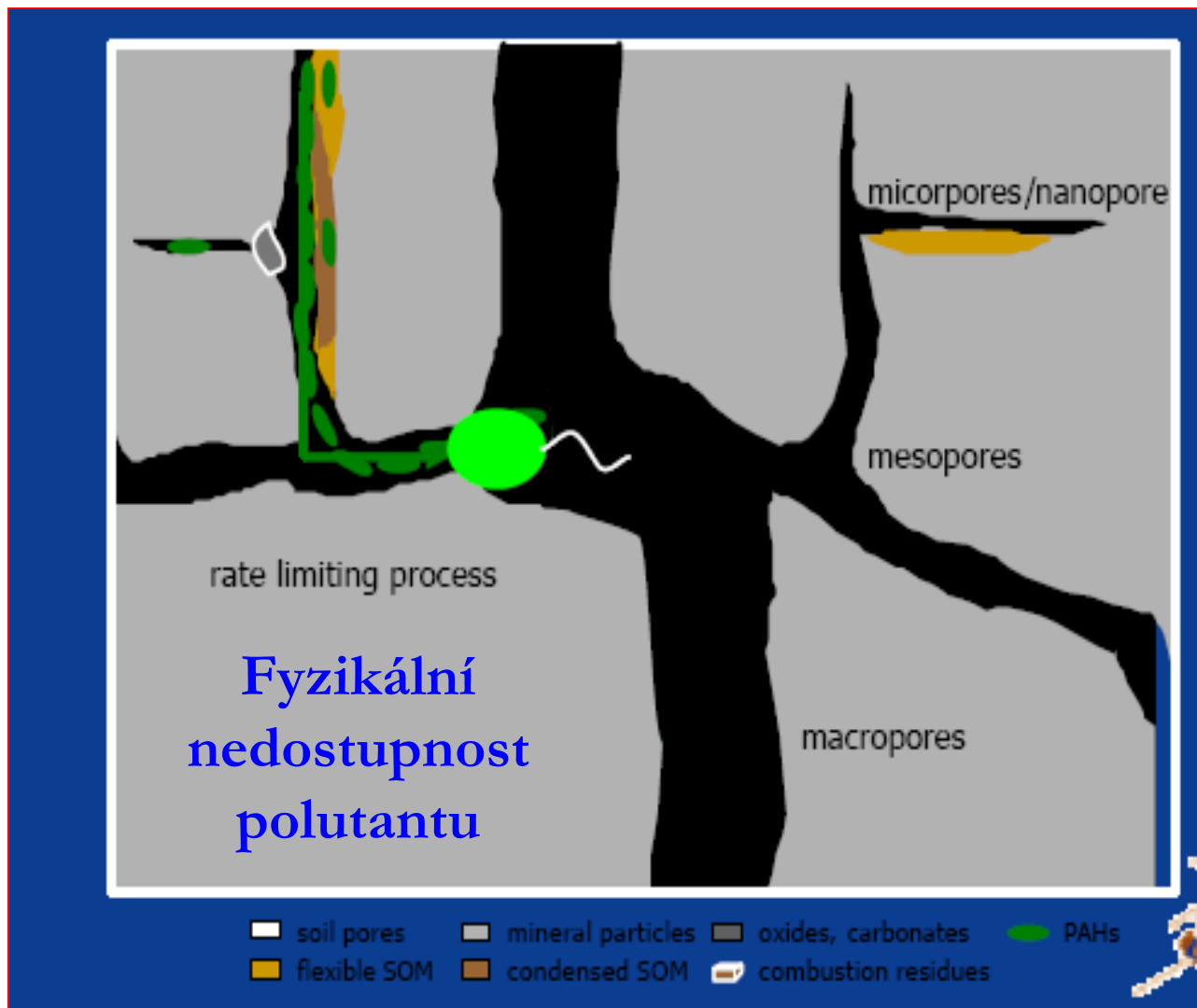
# Transport do buňky – přenos hmoty

- ↪ Rychlost přenosu hmoty do buňky je z hlediska rychlosti biodegradace určujícím krokem, protože je nejpomalejší.
- ↪ U nepolárních sloučenin bakterie podporuje transport tvorbou povrchově aktivních látek (biosurfaktanty), které konjugují s molekulami polutantu a vytvářejí polární konjugovaný komplex, usnadňující přenos do buňky.



Vít Matějů

# Transport do buňky – přenos hmoty



Vít Matěju

# Biodegradace

**V anaerobním prostředí** jsou tyto procesy mnohem pomalejší a většinou nevedou k mineralizaci.

**V methanogenním prostředí** je mineralizace definovaná jako konverze na jednouhlíkaté koncové produkty jako jsou  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ .

Transformace původních organických látek na jiné organické struktury (produkty) je označována jako primární (bio)degradace.

Společenstva heterotrofních mikroorganismů je charakteristická katabolickou všestranností.

# Biodegradace

Tyto organismy jsou schopny větších změn než vyšší organismy, jsou schopny adaptace a aklimatizace.

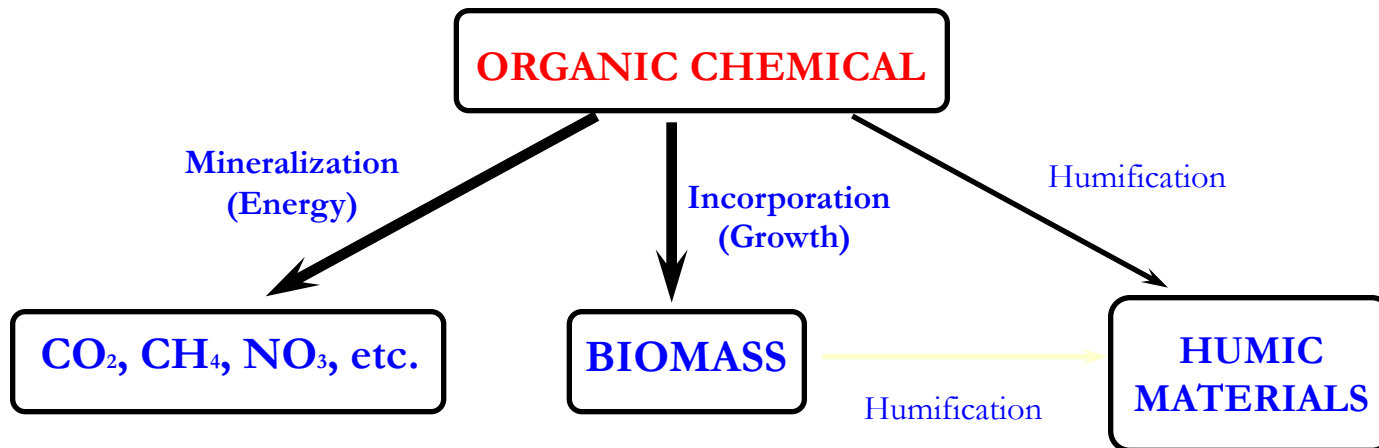
Pro degradaci jsou většinou vhodnější směsné kultury mikroorganismů.

Adaptace je popisována jako změna v mikrobiálních společenstvech – změna rychlosti biodegradace látky jako výsledek předcházející expozice danou látkou.

# Fundamental basis for biodegradation

## I. Organic Chemical = Nutrient

- ↪ Used as a Source of Carbon & Energy by Microbes
- ↪ Degradation Population Increases in Chemical's Presence



## II. Organic Chemical - Cometabolized

- ↪ Nonspecifically and partially metabolized
- ↪ Not used as Nutrient
- ↪ Degradation Population Does Not Increase

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Mechanismy biodegradace



## Mineralizace

- ◆ Úplná destrukce molekul na základní anorganické komponenty (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O..)



## Ko-metabolismus

- ◆ Ko-oxidace molekul
- ◆ Vznik dead-end metabolitů



## Detoxifikace

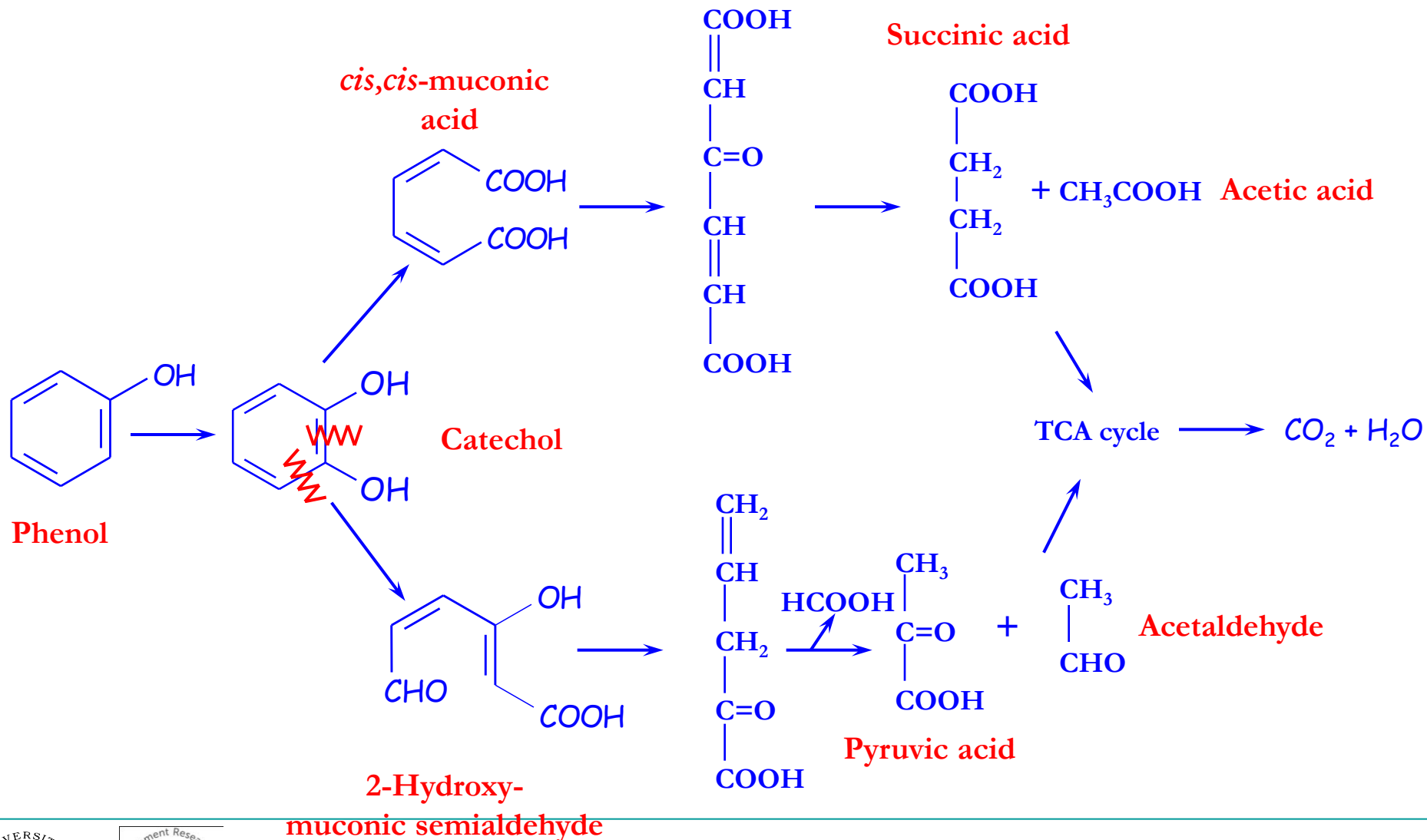
- ◆ Tvorba méně/ne-toxických metabolitů



## Polymerizace

- ◆ Vazba molekuly na části stejné molekuly

# Mineralizace – úplný rozklad molekuly





# Kometabolismus

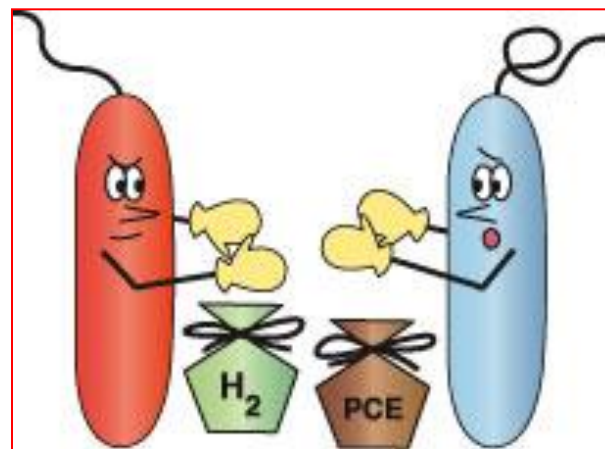
“Metabolismus organické sloučeniny (nebo jedné její základní části) mikroorganismem, který není schopen využít sloučeninu jako zdroj energie (nebo živiny)”

- ↪ Není spojen s růstem a není znám významný nutriční zisk
- ↪ Získané organické produkty mohou se mohou hromadit
- ↪ Uhlík není zabudováván do typických buněčných složek (odchází do odpadu)

# Kometabolismus

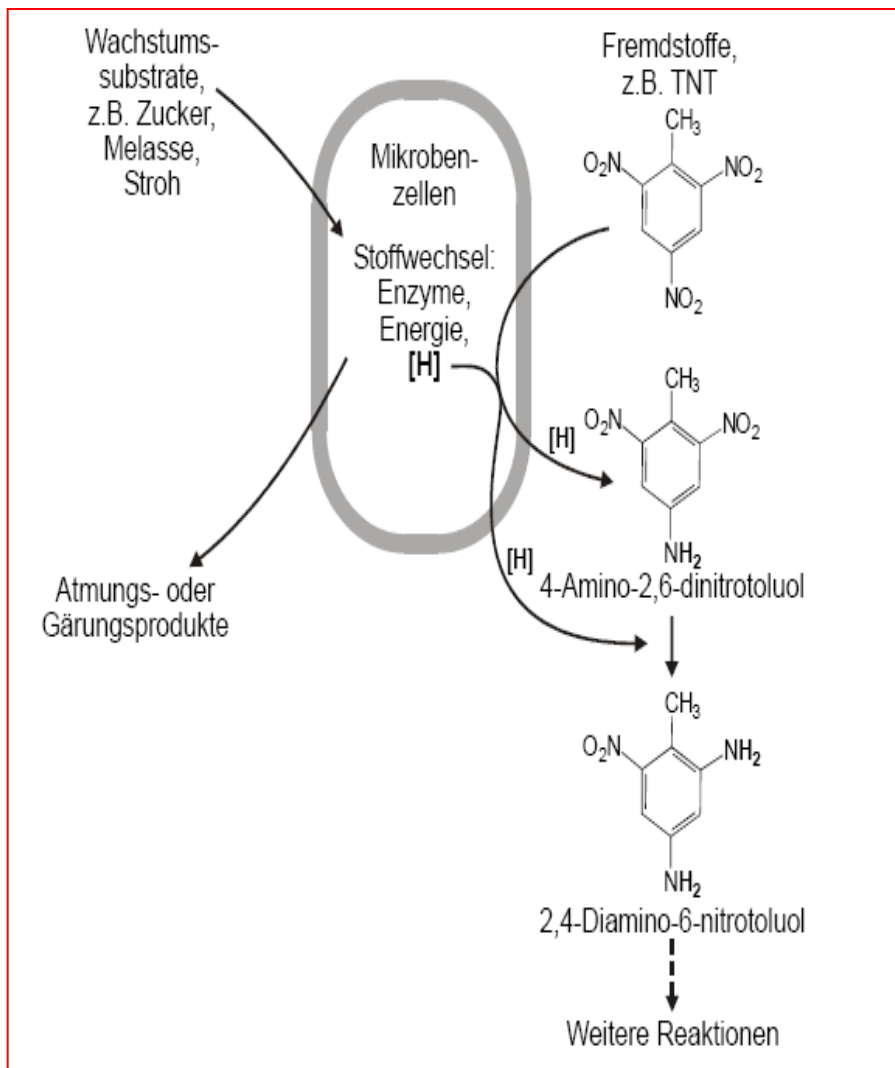
**Kometabolismus** je transformace organické sloučeniny organismy, které nejsou schopné tuto látku využívat jako zdroj energie.

Nespecifické enzymy pro jeden substrát jsou schopné využívat i jiné látky, strukturně podobné (např. monooxygenasy)



Vít Matějů

# Kometabolismus



Trichlorethylen (aerobně)

Trinitrotoluen

1,1,1-trichlorethan

MTBE

Chloroform

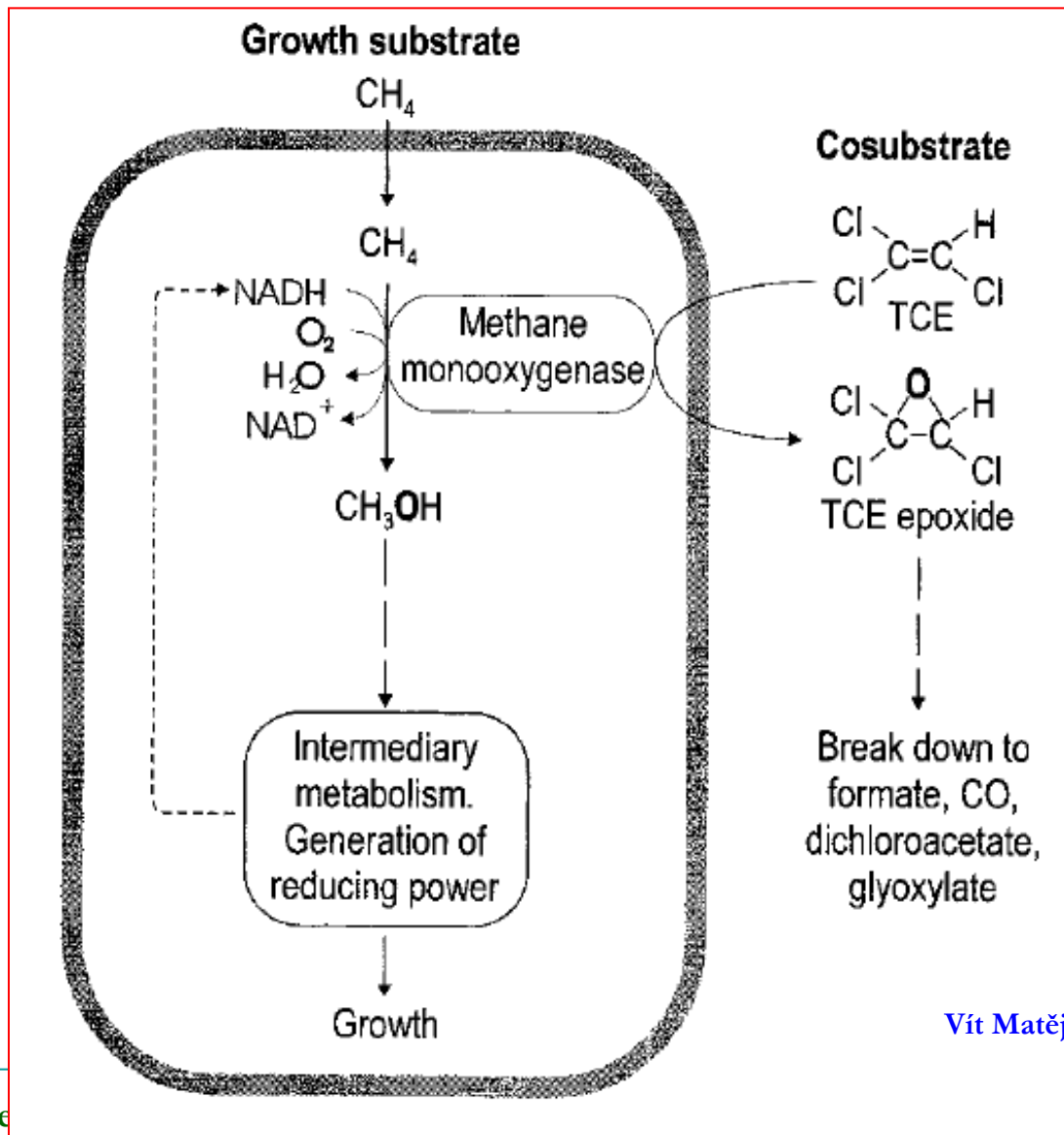
PCB

Polyaromatické uhlovodíky a mnoho dalších

Vít Matějů

# Kometabolismus

Kometabolická  
dehalogenace  
trichlorethylenu za  
aerobních podmínek



Vít Matějů

# Kometabolismus

Existuje široký rozsah sloučenin, u kterých byl detekován kometabolismus

↪ Cyklohexan (na cyklohexanol)

↪ PCBs

↪ Některé chlorfenoly

↪ 3,4-dichloranilin

↪ 1,3,5-trinitrobenzen

↪ Alachlor, Ordram, Propachlor

↪ Chlorbenzen (3-chlorokatechol)

↪ Parathion (4-nitrofenol)

↪ DDT (DDE, DDD, DBP)

↪ Propan (propionát, aceton)

↪ Methyl flourid (formaldehyd)

# Proč kometabolismus probíhá ?

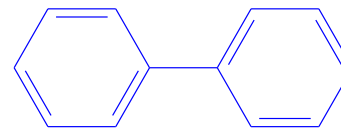
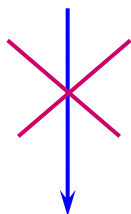
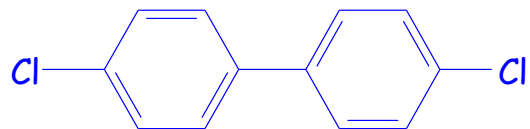
- ↪ Enzym existující v organismu nastartuje degradaci řetězce, ale nepokračuje nebo ji nedokončí na „užitečné“ koncové produkty.
- ↪ Produkty vznikající při počáteční degradaci později mohou inhibovat enzymy degradující řetězec nebo zastaví celkový růst organismu.
- ↪ Organismus tak aktuálně potřebuje druhou látku způsobující požadovanou degradaci (druhý substrát působí například jako elektron donor).

# Kometabolismus

## Analogie obohacování...

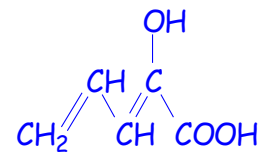
...kde mineralizovatelná přidávaná sloučenina je strukturně podobná (analog) té, jejichž metabolismus zkoušíme podporovat – přídavek bifenyly na podporu metabolismu PCBs.

# Kometabolismus PCBs

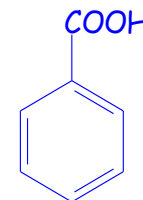


Biphenyl  
dioxygenase

+ O<sub>2</sub>



An aliphatic  
acid

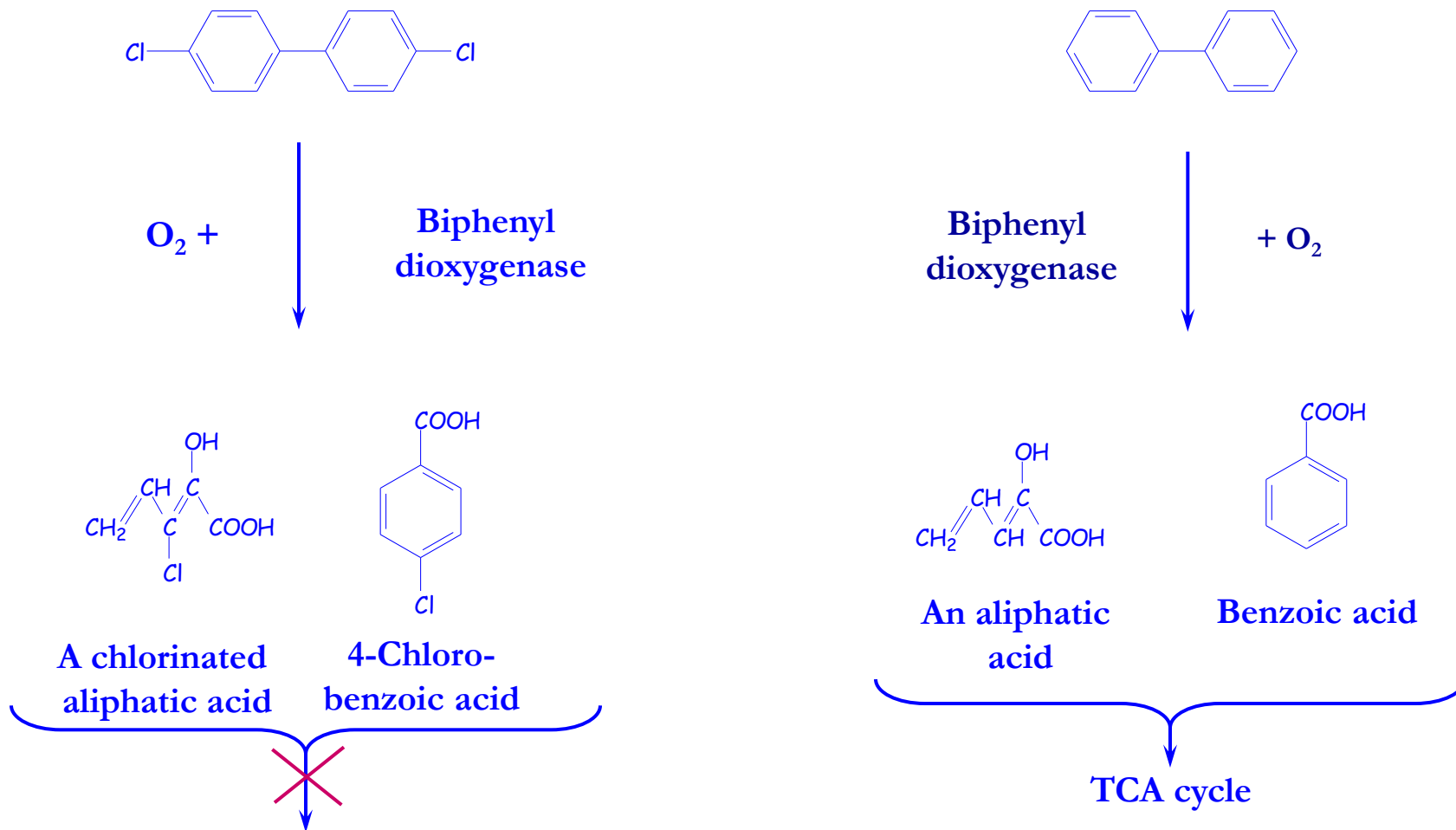


Benzoic acid

TCA cycle



# Kometabolismus PCBs



# Detoxikační reakce

Nejdůležitější role mikroorganismů v biodegradaci je jejich schopnost **detoxikace látek** širokou škálou reakcí:

- ↪ Hydrolyza (adice vody)
- ↪ Hydroxylace (adice OH)
- ↪ Dehalogenace (dechlorace – odstranění atomu Cl)
- ↪ Demethylace (dealkylace) (odstranění Me skupiny)
- ↪ Methylace
- ↪ Nitro redukce
- ↪ Deaminace
- ↪ Štěpení etherů
- ↪ Konverze nitrilu na amid
- ↪ Konjugace

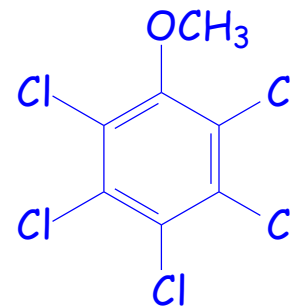
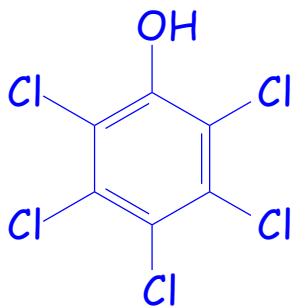
# Detoxikační reakce

Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy, obvykle v buňce a přes řadu enzymatických kroků může být toxická látka rozložena a poté:

- ↪ Meziprodukty (detoxifikované) mohou být vyloučeny.
- ↪ Rozklad může pokračovat normální metabolickou cestou za ultimativního vyloučení C jako organického odpadu nebo jako CO<sub>2</sub>.

# Detoxikační reakce

Pentachlor-  
fenol



Pentachlor-  
anisol

# Biodegradace

## Typy biodegradačních reakcí:

**Dealkylace** – biologické odstraňování methyly nebo dalších alkylů z dusíkového atomu

**Dealkoxylace** – biologické odstraňování methoxy skupiny z dusíkového atomu

**Dekarboxylace** – biologické nebo abiotické odstraňování jednoho nebo dvou kyslíkových atomů z karboxylové skupiny

**Dehalogenace** – biologická náhrada atomů chloru vodíkovým atomem (degradace chlorovaných insekticidů)

**Štěpení etherů** – biologické štěpení etherů na vazbě mezi kyslíkem a uhlíkem

**Hydrolyza** – biologické či chemické štěpení molekul adicí vody za vzniku alkoholů nebo karboxylových kyselin

**Hydroxylace** – biologické zavádění hydroxylových skupin na alifatické nebo aromatické sloučeniny

# Biodegradace

## Typy biodegradčních reakcí:

**Methylace** – biologická adice methylové skupiny na alkohol nebo fenol za vzniku methyl etheru

**Oxidace** – biologická nebo chemická oxidace alkoholu za vzniku aldehydu, které mohou být oxidovány na karboxylové kyseliny – vznik epoxidů je hlavním krokem mnoha oxidačních procesů

**$\beta$  – oxidace** – biologické odstraňování dvou atomů uhlíku z alkánového řetězce vedoucí ke struktuře aromatického kruhu

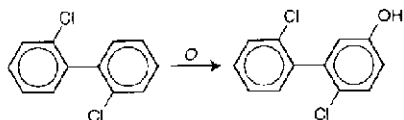
**$\omega$  – oxidace** – počáteční atak alifatického řetězce na koncové methylové skupině, která je oxidována na mastné kyseliny

**Redukce** – biologická redukce nitroskupiny na amino skupinu

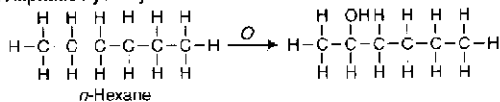
**Štěpení kruhů** – biologické štěpení aromatických kruhů

# Typy biodegradčních reakcí

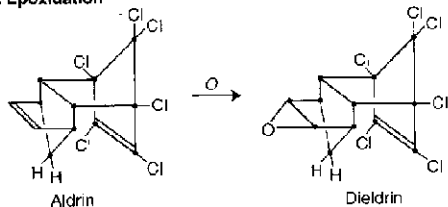
## 1. Aromatic hydroxylation



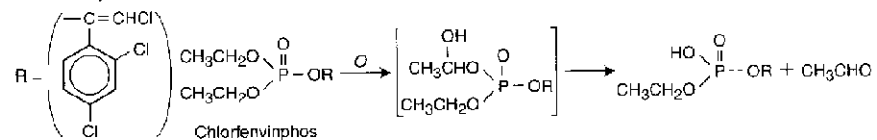
## 2. Aliphatic hydroxylation



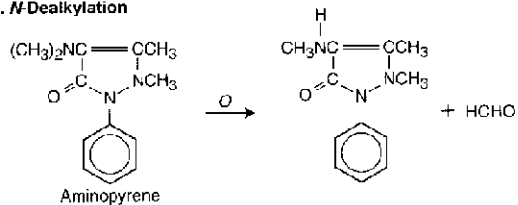
## 3. Epoxidation



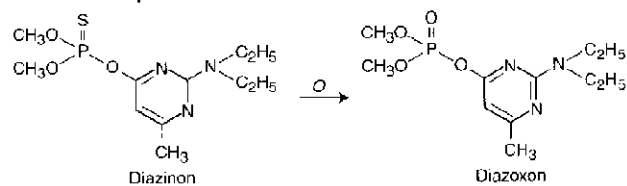
## 4. O-Dealkylation



## 5. N-Dealkylation

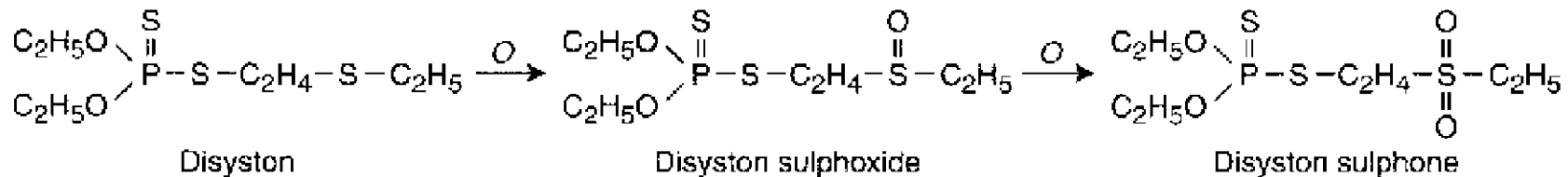


## 6. Oxidative desulphuration



# Typy biodegradačních reakcí

## 7. Sulphur oxidation



## 8. N-Hydroxylation

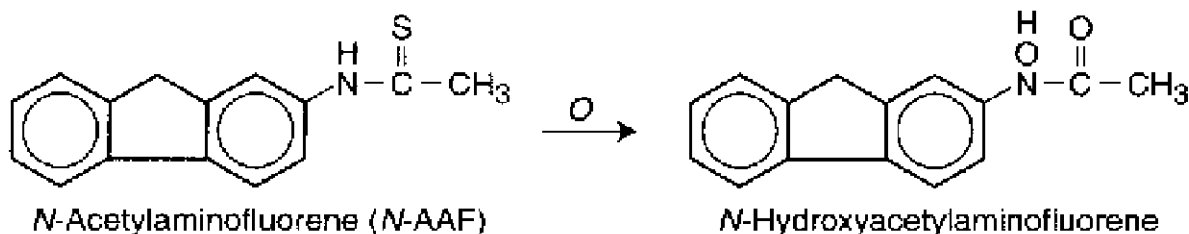


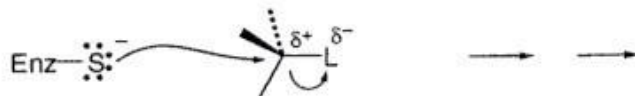
FIGURE 2.5 *Biotransformations by cytochrome P450.*



# Biodegradation - Hydrolysis

Hydrolysis through enzymatically mediated nucleophilic attacks  
 – uneven electron density due to heteroatoms – oxic or anoxic environment:

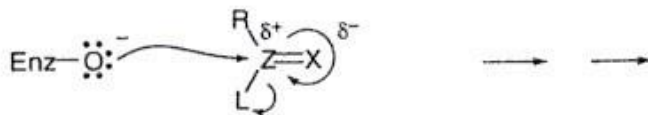
1. If leaving group on sterically accessible position



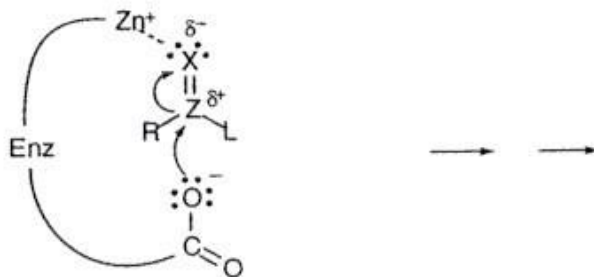
then nucleophilic attack, e.g., via  $-\text{CH}_2-\text{S}^-$



2. If ester-like structure (Z = C, P, or S; X = O, S, or NR)



then hydrolysis with  
 a) base catalysis (e.g., serine-O⁻) or  
 b) acid catalysis ( $\text{Zn}^{2+}$  and  $-\text{COO}^-$ )



Stacy Simonich

# Biodegradation - Oxidation

Oxidation using an electrophilic form of oxygen – even electron density – oxic environment:

3. If  $\pi$ , n electrons (N or S), alkyl  $\sigma$ -electrons

then **oxidation** via electrophilic oxygen (e.g.  $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}^\bullet$ )

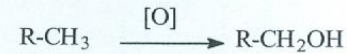


Stacy Simonich

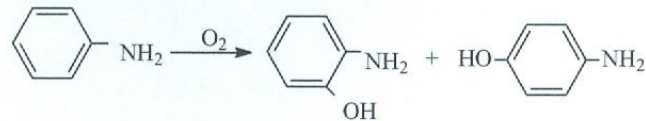
# Typy biodegradčních reakcí

## OXIDATION

### 1. Side-chain oxidation



### 2. Aromatic hydroxylation



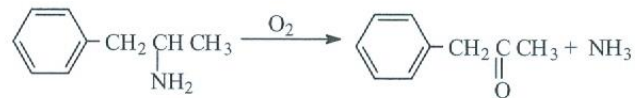
### 3. N-dealkylation



### 4. O-dealkylation



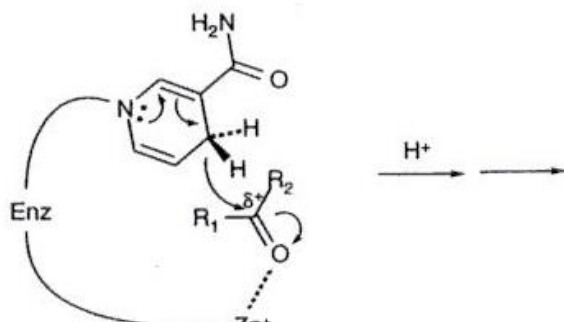
### 5. Deamination



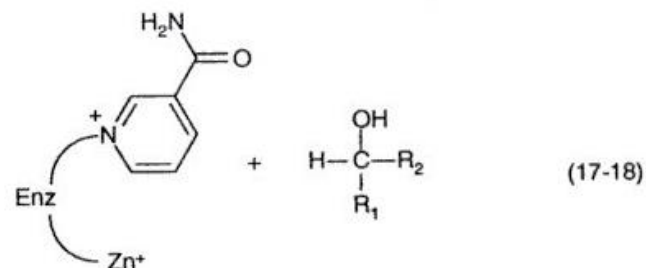
# Biodegradation - Reduction

## Reduction by a nucleophilic form of hydride or reduced metals like cobalt:

4. If aliphatic  $-C(=O)-$ ,  $-OH$  have partially oxidized / reduced carbon atoms

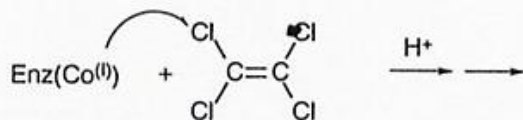


then **reduction / oxidation** via nucleophilic  $H^-$  transfers (e.g., from NAD(P)H) and Lewis acid catalysis (e.g.,  $Zn^{2+}$ )



*Sterically Limited Access Due to Substitution; Anoxic (Micro)Environment*

8. If polyhalogenated



then **electron transfer** from metals ( $Co^{(I)}$ ,  $Fe^{(II)}$ ) to halogen and addition of  $H^+$  to the compound

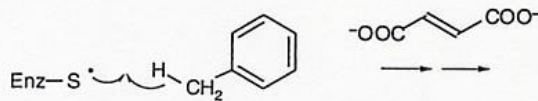


Stacy Simonich

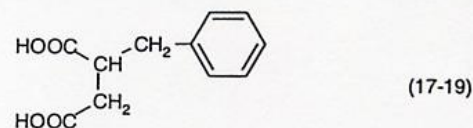
# Biodegradation - Additions

Additions using electrophilic carboxyl, nucleophilic hydroxyl, or free radical H-abstraction and addition of fumarate (even electron density – anoxic):

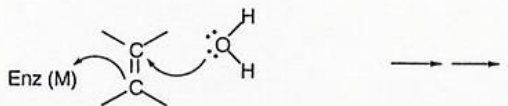
5. If benzyl, allyl, alkyl  $\sigma$ -electrons



then H-abstraction via  $-S^{\bullet}$  radical and addition to fumarate



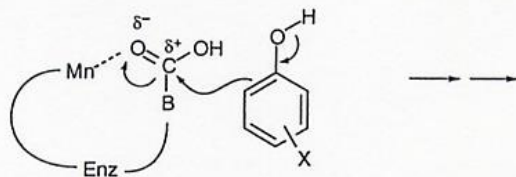
6. If alkene



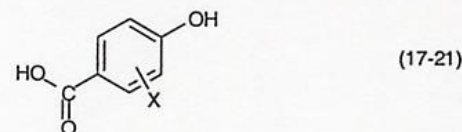
then addition of water



7. If enol (including phenol)

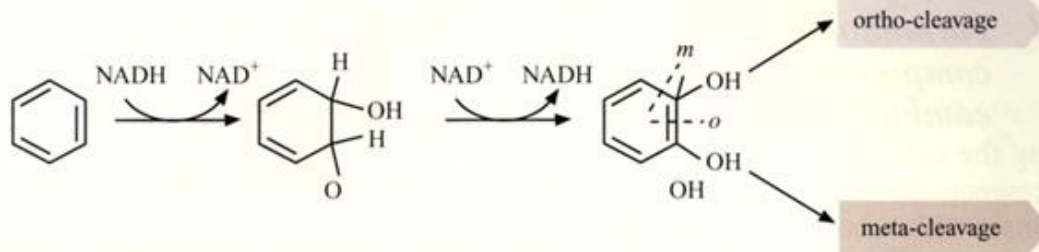


then addition of carboxyl group via  $-B-COOH$

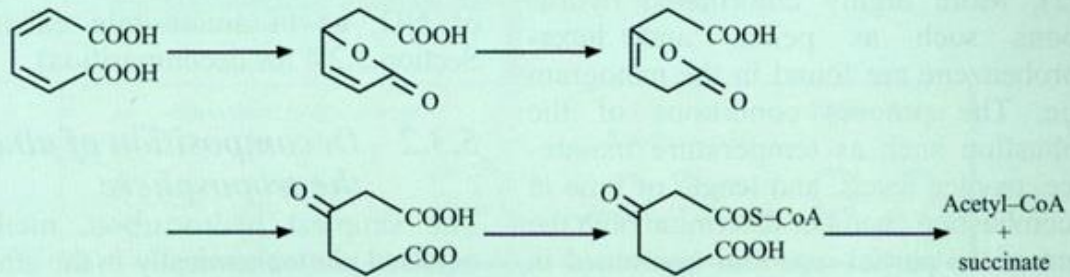


Stacy Simonich

# Biodegradace



## *o*-cleavage



## *m*-cleavage

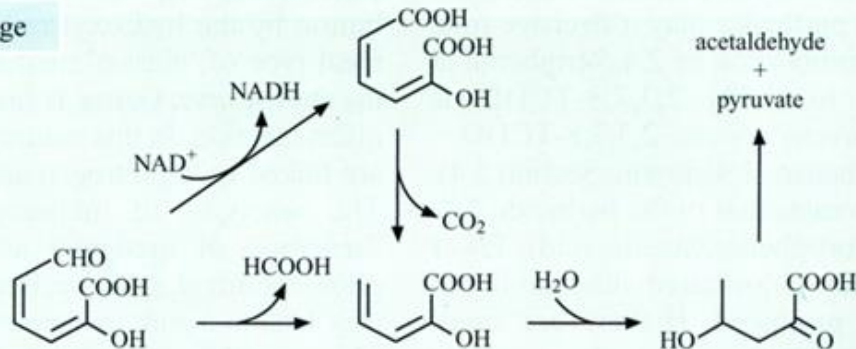
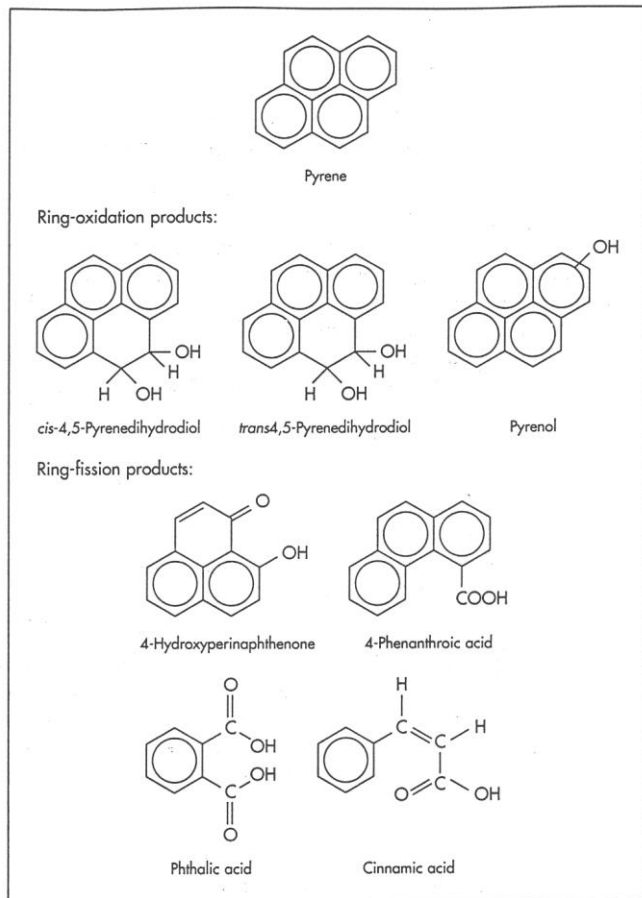





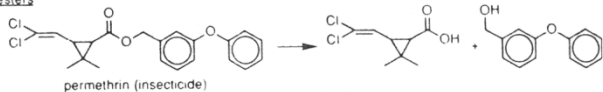



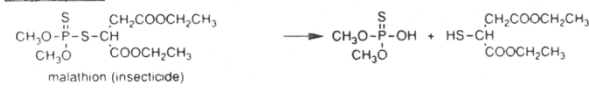
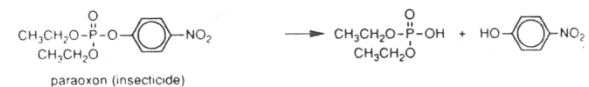
Figure 5.2.3 Bacterial decomposition of aromatic compounds (after Korte, 1992)

# Biodegradace



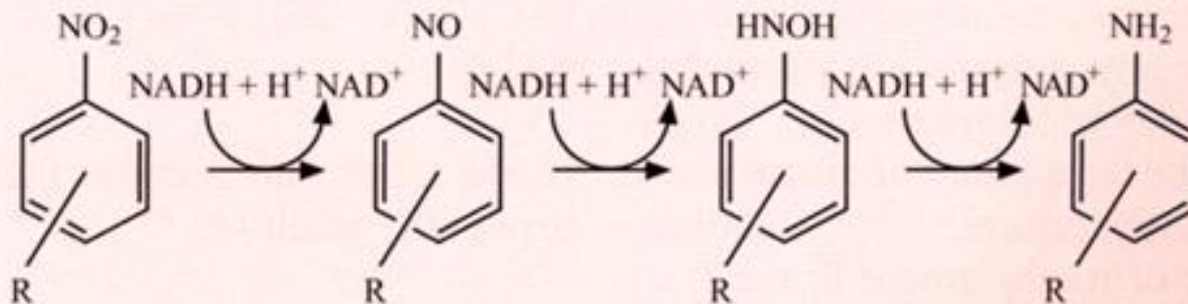
**FIGURE 7.12** Structure of identified pyrene metabolites produced by *Mycobacterium* sp. Source: M. A. Heitkamp et al., *Applied and Environmental Microbiology* 54, no. 10, (1988):2556–65.

**TABLE 14.5** Some Microbially Mediated Hydrolysis Reactions

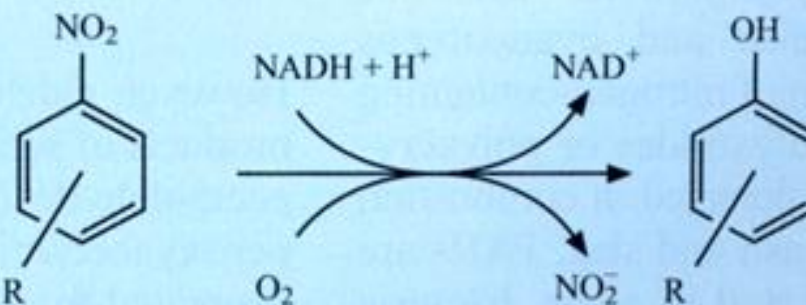
Substrate	Product(s)
<b>alkyl halides</b>	
	
	
	
<b>esters</b>	
	
<b>amides</b>	
	
<b>carbamates</b>	
	
<b>ureas</b>	
	
<b>(thio)phosphates</b>	
	
	



# Biodegradace



1. Reductive decomposition



2. Oxidative decomposition

Figure 5.2.4 Decomposition of aromatic nitro compounds



# Biodegradace

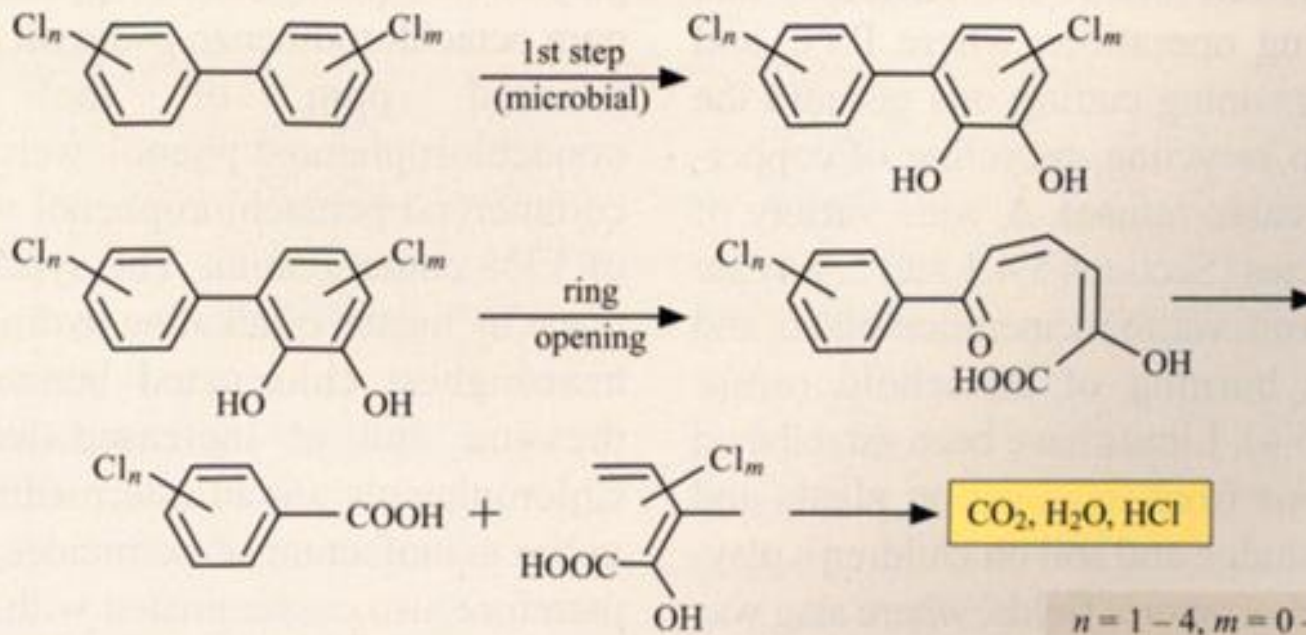
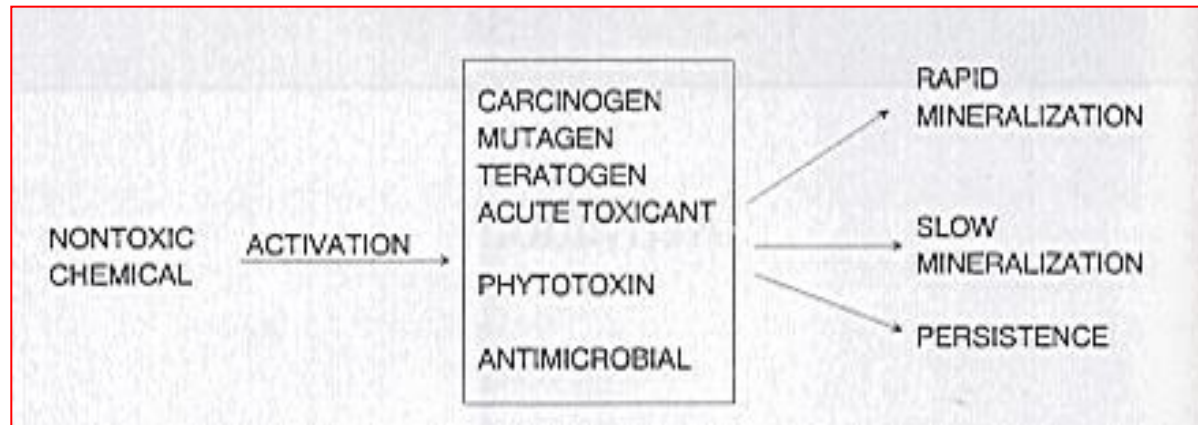


Figure 5.3.7 Decomposition of PCBs

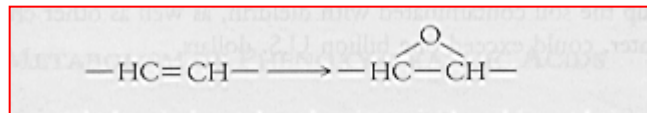
# Ale také aktivace...

“Proces vzniku toxických produktů z neškodných prekurzorů.”



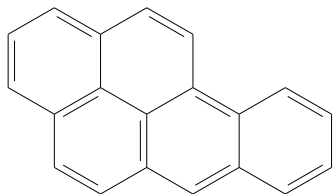
Příklady:

- Dehalogenace (TCE na vinyl chlorid nebo chloral hydrát)
- Halogenace (Fenol na pentachlorfenol)
- Tvorba nitrosaminu (Dimethylamin na *N*-nitrosodimethylamin)
- Epoxidace (Aldrin na dieldrin)



- Fosforothionát-fosfát konverse (Parthion na paraoxon, (S náhrada kyslíkem) )
- Oxidace thioetherů (-C-S-C- oxidace)
- Hydrolýza esterů (Herbicidy na bázi esterů aktivace vodou)

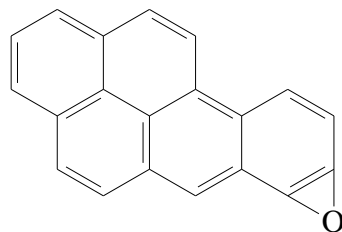
# Aktivace benzo[a]pyrenu (B[a]P)



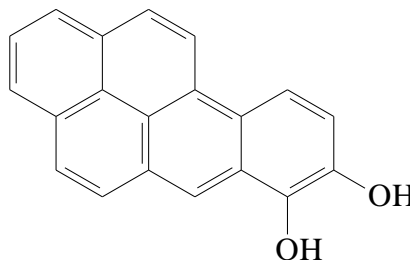
Benzo[a]pyren

Vznik DNA aduktů

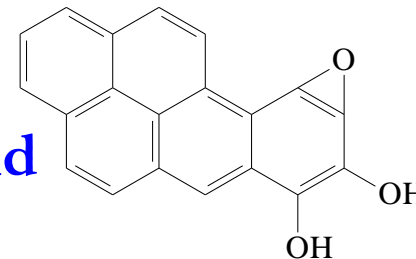
Benzo[a]pyren-  
7,8-epoxid



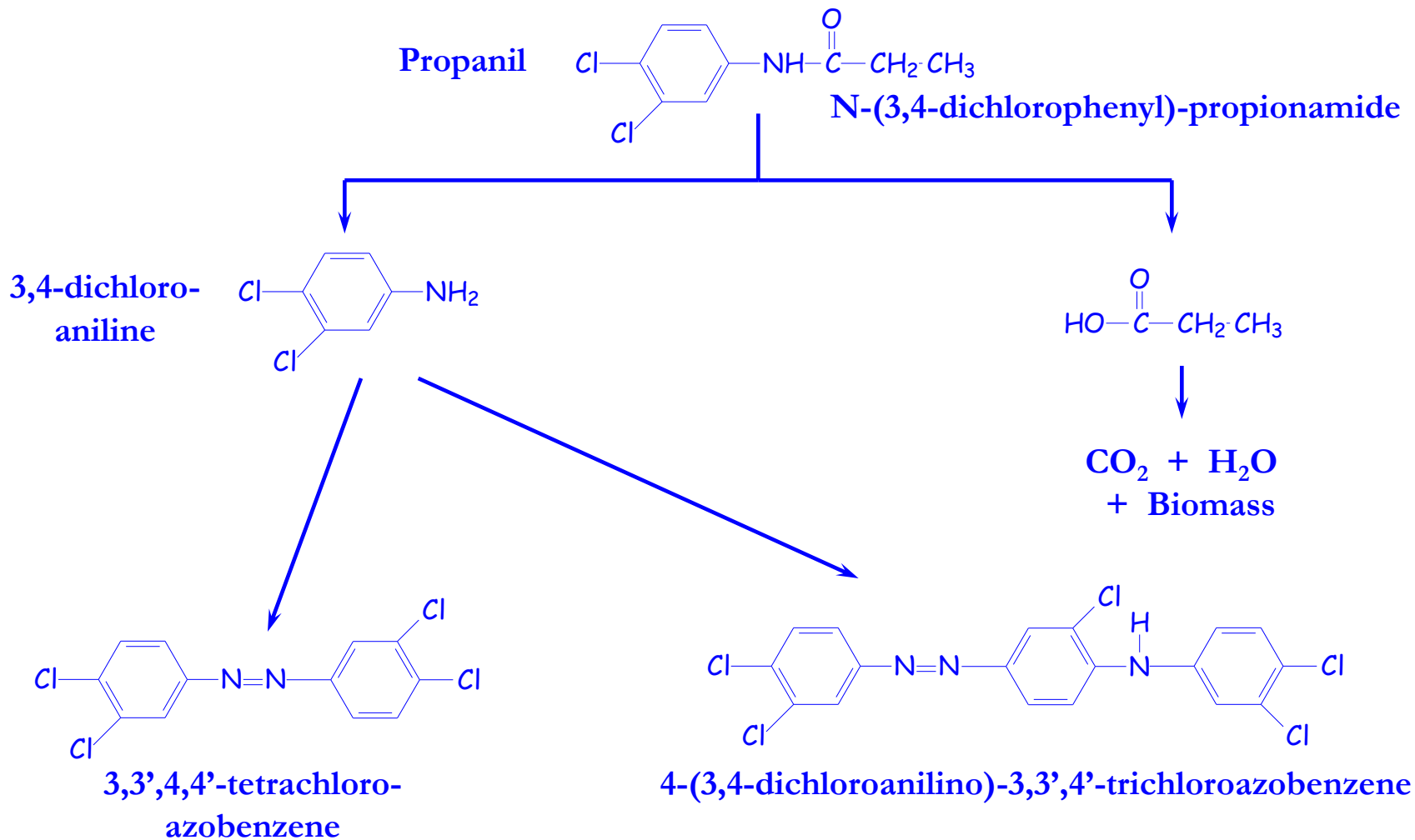
Benzo[a]pyren-  
7,8-diol



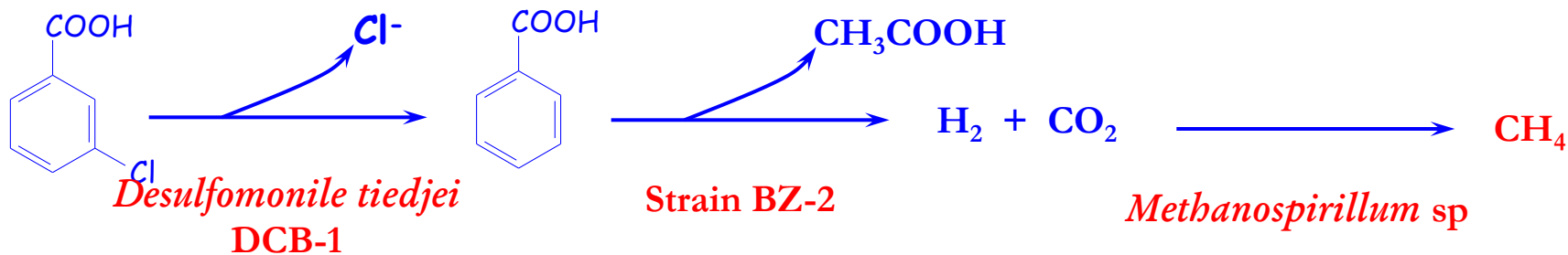
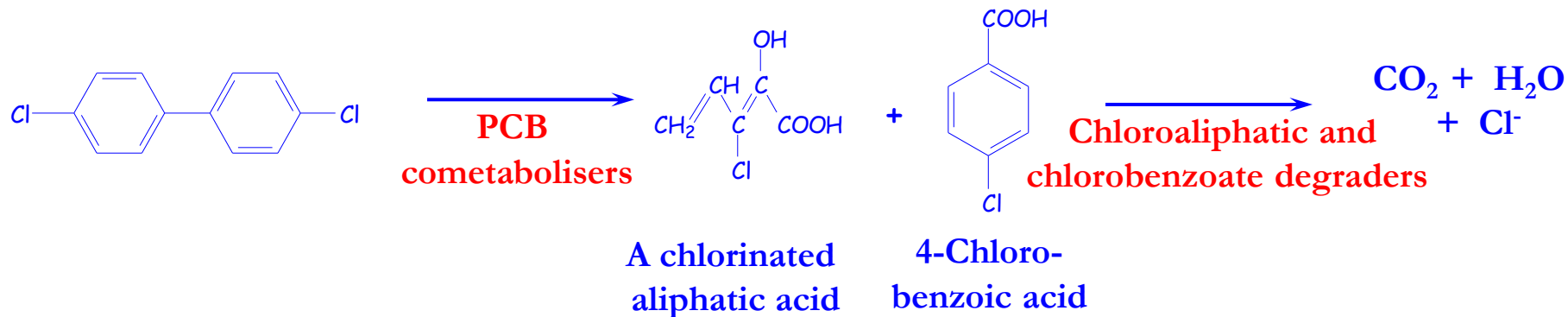
Benzo[a]pyren-  
7,8-diol-9,10-epoxid



# Polymerace



# Mikrobiální konsorcia a biodegradace



# Kinetika biodegradace

Látka je považována za „substrát“ a limituje bakteriální růst.

Většina kinetických modelů kombinuje přenos hmoty (ze substrátu na biomasu) s jevem nasycení a jsou analogické nelineární kinetice **Michaelis-Menten pro biotransformace**.

Biodegradace v sedimentech a půdách se často vyjadřuje **biologickým poločasem života**.

# Kinetika biodegradace

Pokud je biologický poločas života látky nezávislý na její koncentraci, je **degradační rychlostní rovnice** rovnicí prvního řádu:

$$dC / dt = - k * C = - (\ln 2 / t_{1/2}) * C$$

Kde:

C – koncentrace látky v mokřém sedimentu nebo půdě [mg.l<sup>-1</sup>]

t<sub>1/2</sub> – biologický poločas života [d]

k – rychlostní konstanta biodegradace [d<sup>-1</sup>] pro mokřý sediment nebo půdu

# Kinetika biodegradace

Pokud se půda (či sediment) skládají pouze z pórové vody a částic, celková koncentrace v mokré půdě může být vyjádřena:

$$C = R * C_s + \Theta * C_{pw}$$

Kde:

$C$  – celková koncentrace v půdě [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]

$R$  – hustota tuhé fáze [ $\text{kg.l}^{-1}_{\text{soil}}$ ]

$\Theta$  - objem frakce vodní fáze [ $\text{l.l}^{-1}_{\text{soil}}$ ]

$C_s$  – koncentrace látky v tuhé fázi [ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]

$C_{pw}$  – koncentrace látky v pórové vodě [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]



# Kinetika biodegradace

**Biodegradace v systému tuhá fáze-voda závisí na sorpci degradovaných látek:**

- ↪ **rozdělení látky mezi tuhou fází a vodní fází je řízeno termodynamickou rovnováhou,**
- ↪ **biodegradace ve vodní fází je relativně rychlejší, ale celková eliminace ze systému tuhá fáze-voda je řízena pomalou desorpcí.**

# Kinetika biodegradace

Ad 1)

**Koncentrace látky v pórové vodě  $C_{pw}$  může být nízká, protože rozdělovací koeficient  $K_p (= C_s / C_{pw} )$  je vysoký.**

**Eliminační rychlost biodegradace je relativně nízká, koncentrace v pórové vodě je úměrná celkové koncentraci v mokré půdě:**

$$C_{pw} = [1 / ( \Theta + R * K_p )] * C$$

# Kinetika biodegradace

Ad 2)

Za předpokladu, že látka je dostupná pro biodegradaci pouze ve fázi pórové vody, **celková rychlostní konstanta biodegradace** ve vlhké půdě ( $k$ ) může být snadno odvozen z hodnot  $k_{pw}$  – rychlostní konstanty prvního řádu pro biodegradaci ve fázi pórové vody a půdních charakteristik jako jsou  $R$  a  $\Theta$ .

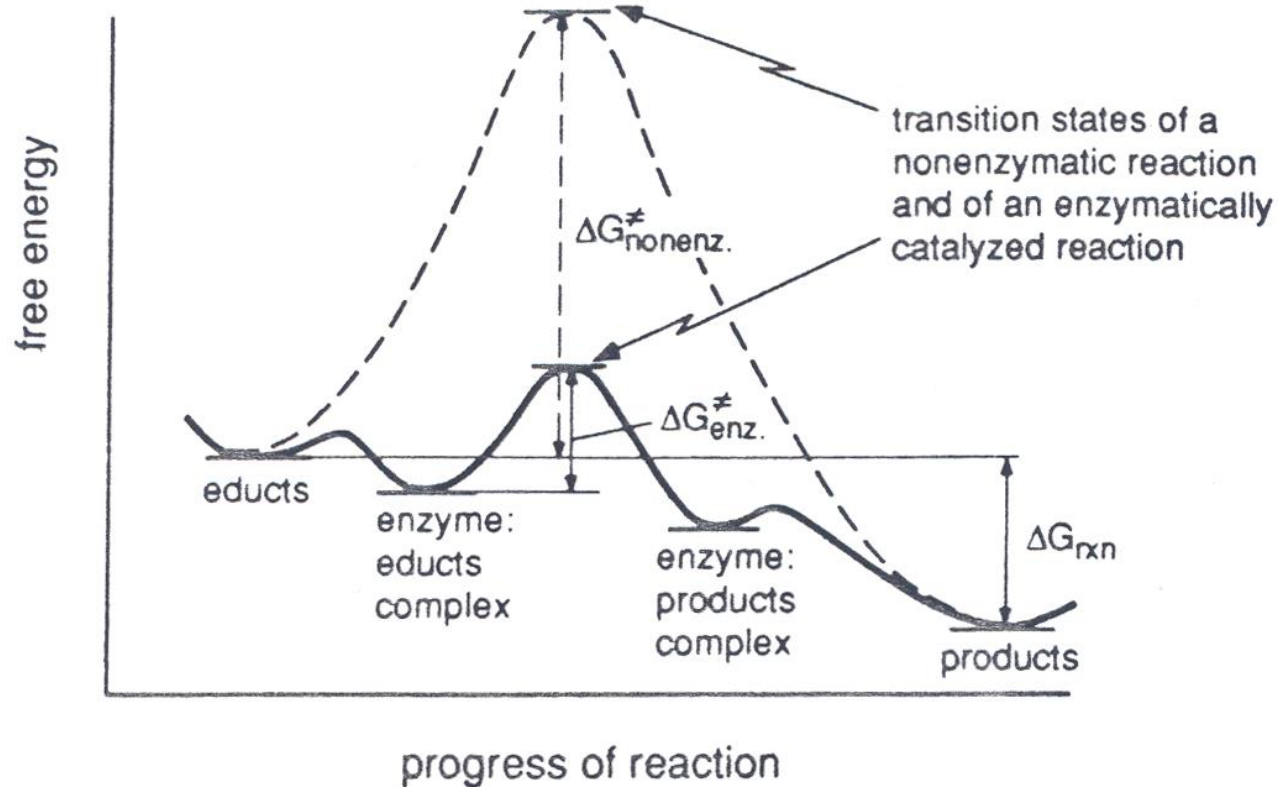
**Rychlost rozkladu látky na objem mokré půdy ( $V * k * \Theta$ ) je rovna rychlosti rozkladu v pórové vodě ( $\Theta * V * k_{pw} * C_{pw}$ ):**

$$k = k_{pw} / [1 + (r * K_p)]$$
$$r = R / \Theta$$

kde:

$r$  - poměr suché hmoty k vodní  $[\text{kg.l}^{-1}]$

# Kinetika biodegradace



**Figure 14.1** Schematic representation of the change in activation energy barriers for an enzymatically mediated reaction as compared to the analogous noncatalyzed chemical reaction.

# Biodegradace

## Aerobní biodegradace a metabolické mechanismy

Řada chemických látek může sloužit jako zdroj živin pro bakterie, jež jsou využity pro jejich růst a energetické požadavky.

Důležitými reakcemi jsou oxidační procesy:

- ↪ **Aromatická oxidace** – enzymy katalyzovaná oxidace s molekulárním kyslíkem – kruh je štěpen mezi nebo (na přilehlých vazbách) mezi uhlíky nesoucími OH skupiny. Aromatickou oxidací začíná vznik katecholu z benzenu nebo benzoátů, fenolů a dalších sloučenin.
- ↪  **$\omega$  – oxidace** – oxidace alifatických řetězců na koncové methylové skupině vedoucí přes primární alkoholy a odpovídající aldehydy ke karboxylovým kyselinám – zavedení kyslíku pomocí oxygenáz

# Biodegradace

## Aerobní biodegradace a metabolické mechanismy/II

**$\beta$  – oxidace** – postupná oxidace – po dvouuhlíkatých částích – mastných kyselin katalyzovaná enzymy; nejprve vzniká thioester karboxylové skupiny pomocí koenzymu A – odstraněním dvou H vznikají  $\alpha,\beta$ -nenasycené deriváty.

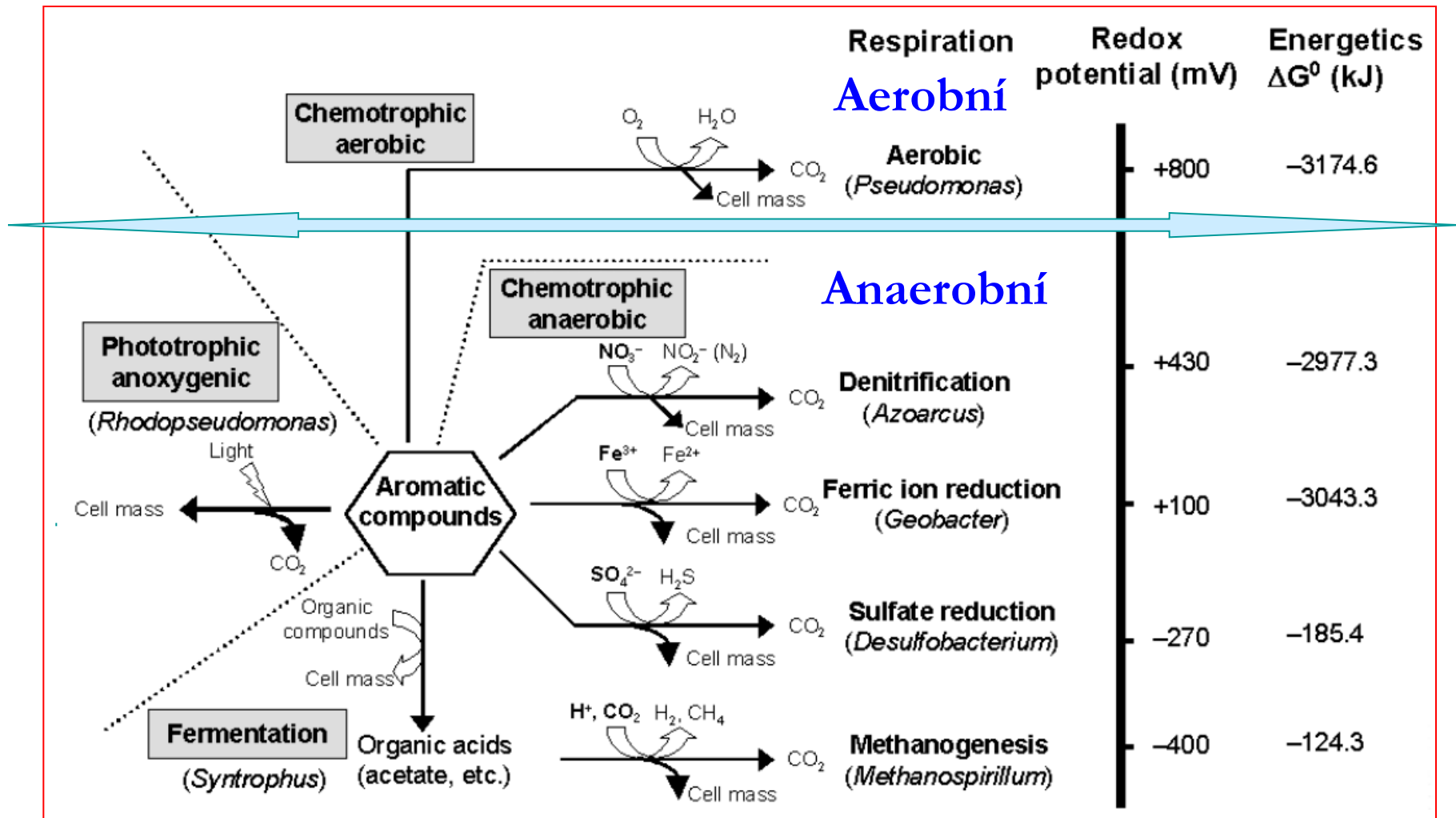
Hydratací vzniká  $\beta$ -hydroxy- a dehydrogenací  $\beta$ -ketoderivát.

Koenzym A (CoA) se aduje mezi  $\alpha$ - a  $\beta$ -uhlíky, acetylCoA je odštěpen a vzniká CoA mastné kyseliny o dva uhlíky kratší.

Tato reakce probíhá ve všech živých organismech a nepotřebuje molekulární kyslík.

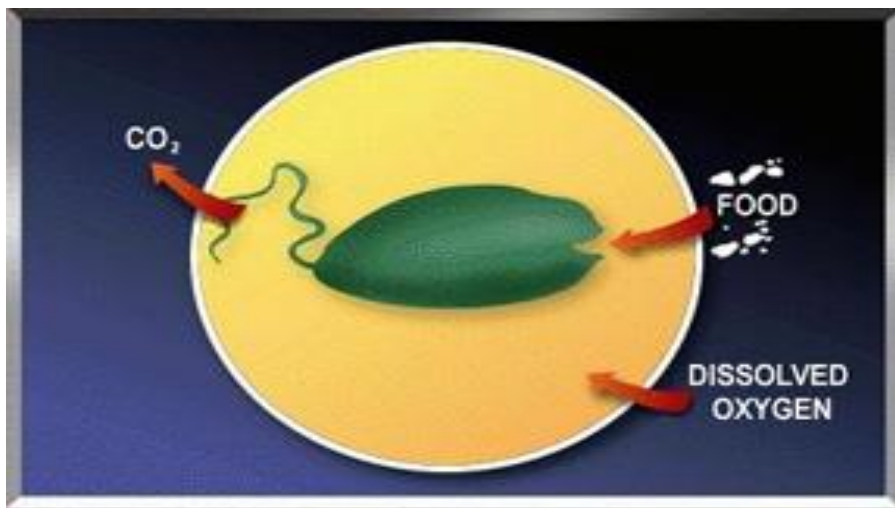
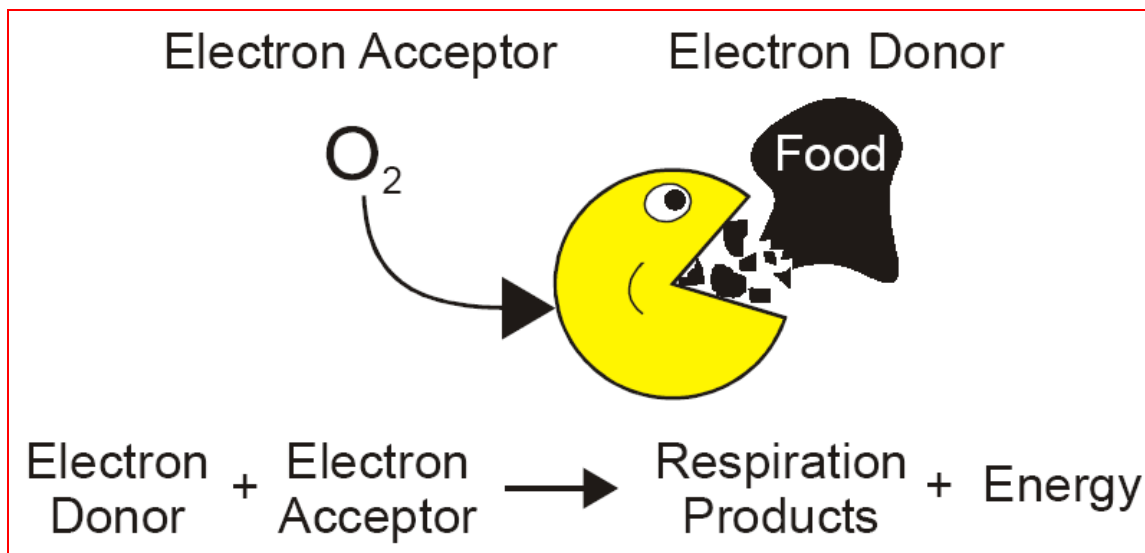
Reakce je stíněna methylem v  $\alpha$ -poloze.

# Mikrobiologie – finální akceptory elektronů



Vít Matějů

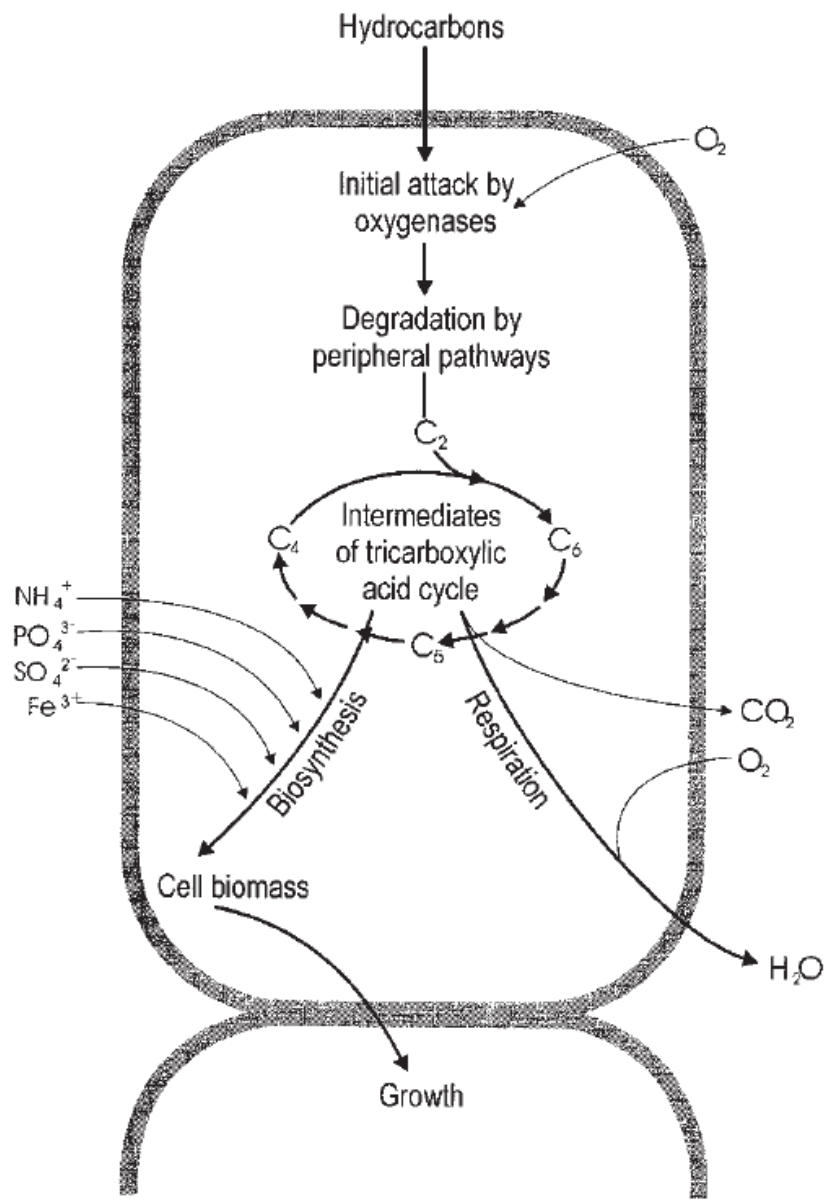
# Aerobní metabolismus



Vít Matějů



# Aerobní metabolismus



**Hlavní principy aerobní  
degradace uhlovodíků**  
**Proces spojený s růstem**

Vít Matějů

# Stechiometrie aerobního rozkladu uhlovodíků

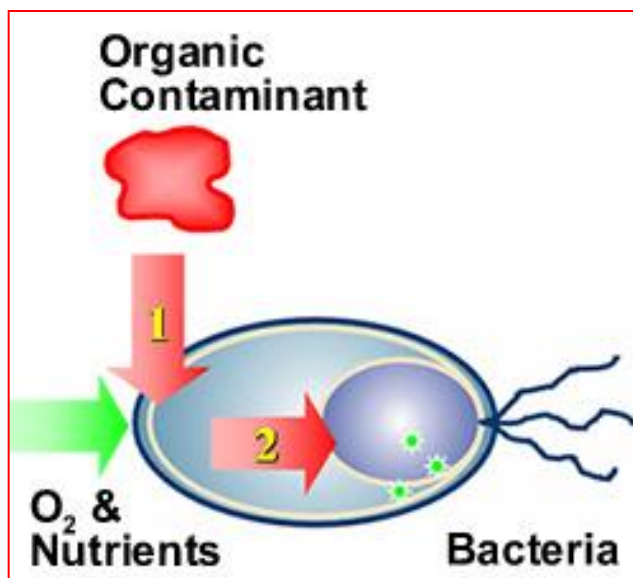
Oxidační reakce:



Redukční reakce:



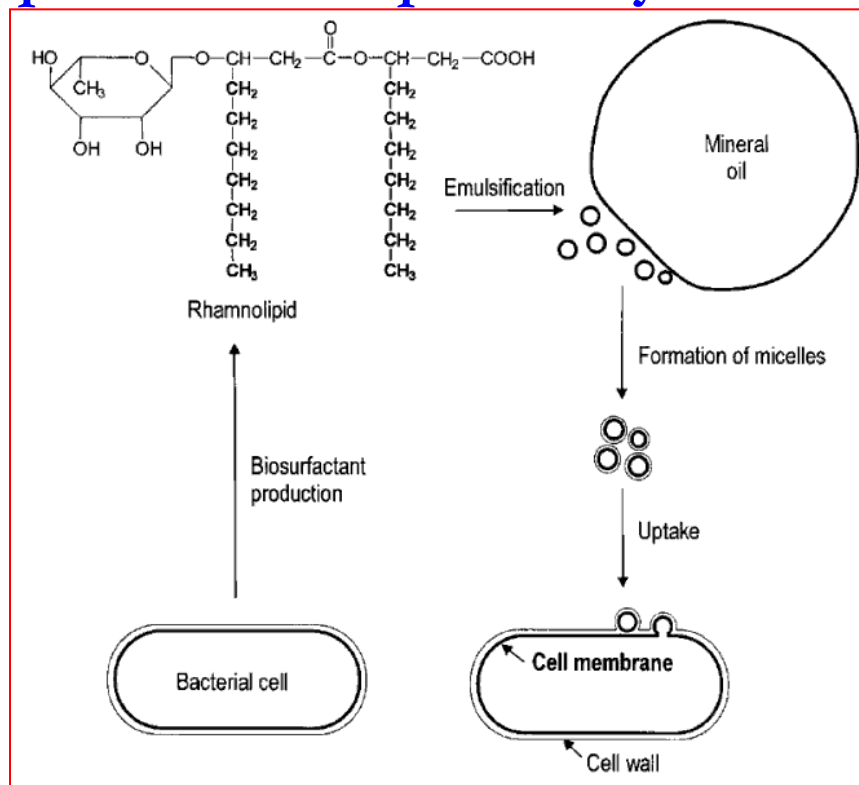
1 g  $\text{C}_6\text{H}_6$  potřebuje na úplnou oxidaci 3 g  $\text{O}_2$



Vít Matějů

# Aerobní metabolismus

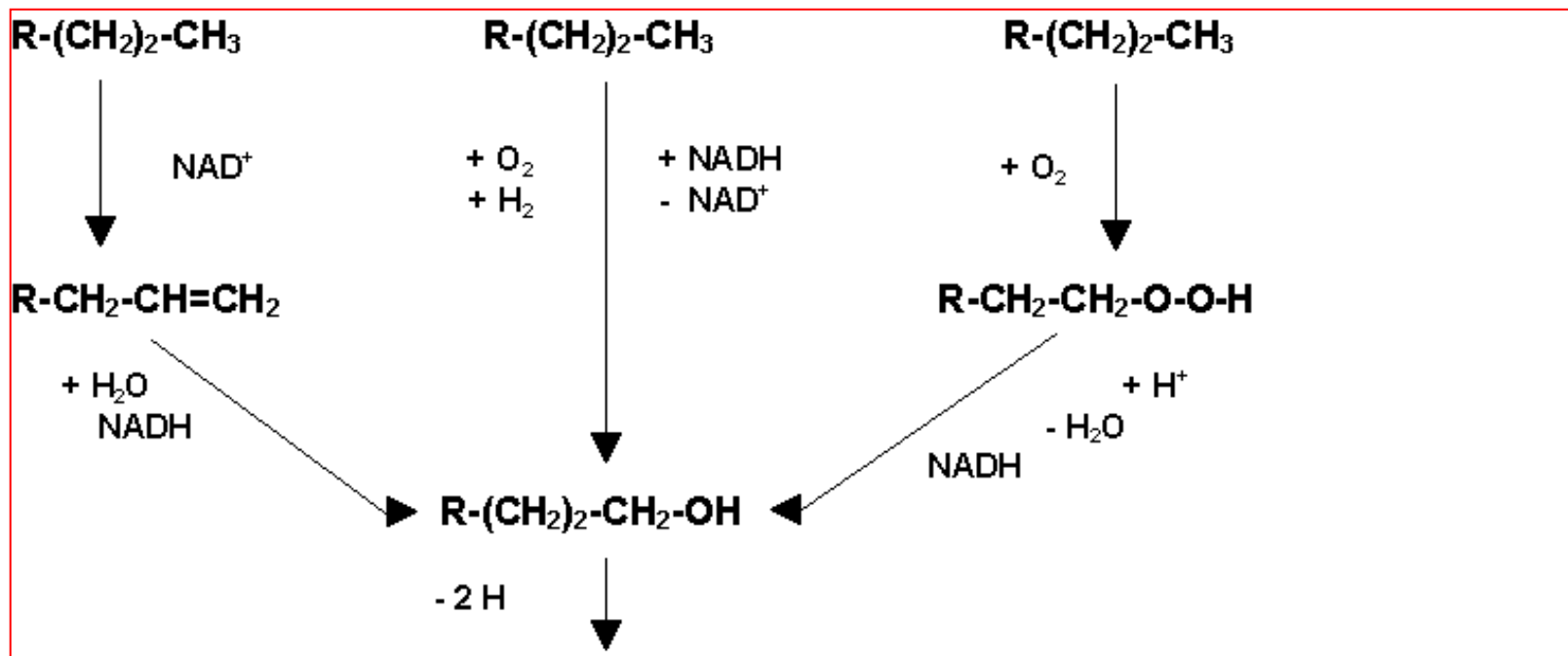
1. **Metabolické procesy** pro zlepšení kontaktu mezi bakteriální buňkou a organickým polutantem. **Molekuly polutantu musí být dopraveny do buňky**, protože bakterie nemají exoenzymy pro degradaci polutantů. **Například syntéza biologických surfaktantů:**



Vít Matějů

# Aerobní metabolismus

2. Počáteční atak organického polutantu začíná **oxidačním procesem, aktivací kyslíku a inkorporací kyslíku do molekuly polutantu**. Všechny reakce jsou katalyzovány enzymy oxygenasami a peroxidasami.



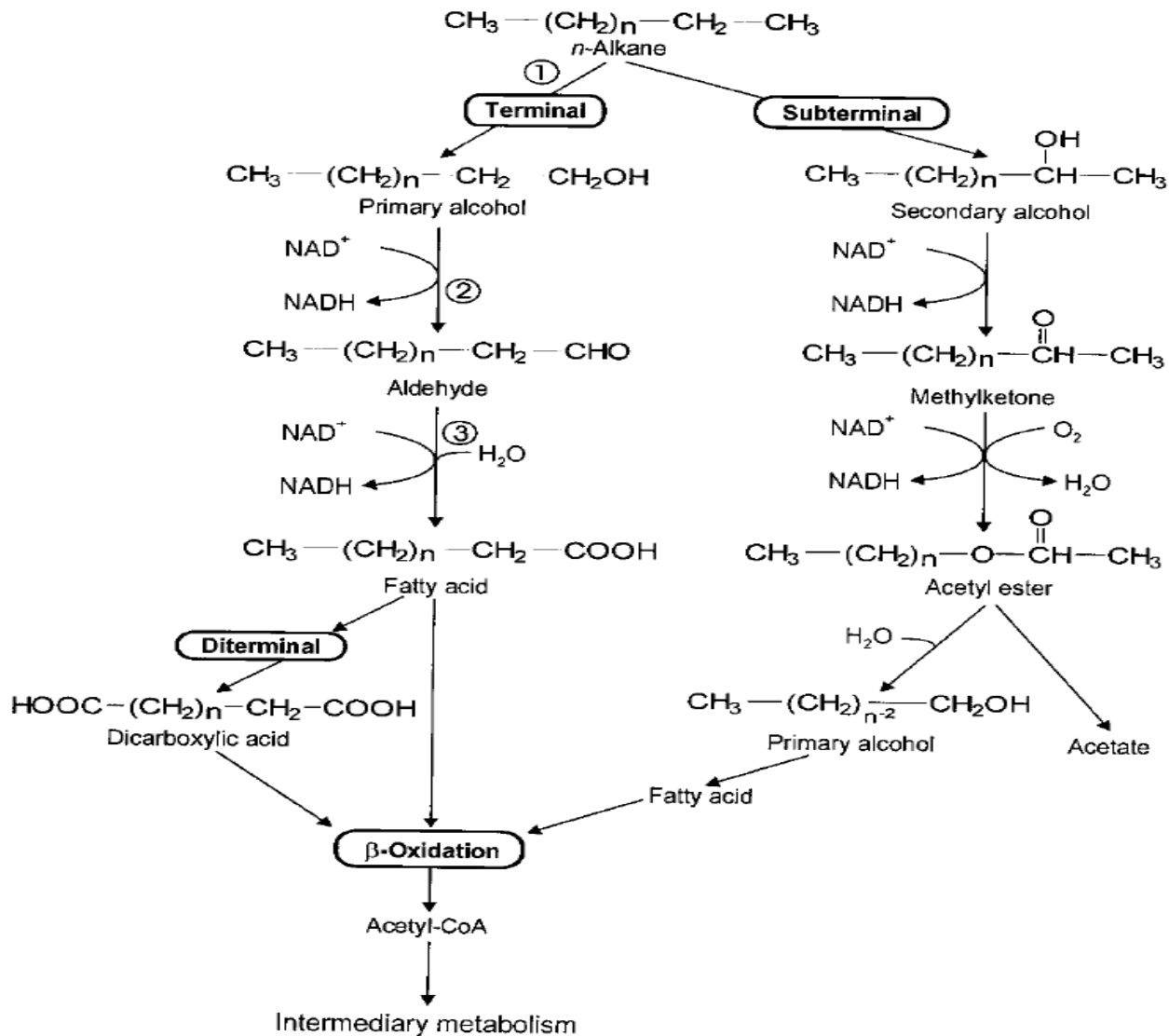
Vít Matějů

# Aerobní metabolismus

3. **Periferní degradační cesta** převádí organický polutant krok za krokem na **meziprodukty centrálního metabolismu**, například na **trikarboxylové kyseliny**.
4. **Biosyntéza buněčné hmoty z prekurzorů vzniklých v centrálním metabolismu**, např. **acetylCoA, sukcinát, pyruvát**. Cukry se syntetizují **glukoneogenezí** (syntéza glukosy v buňce *de novo*).

Vít Matějů

# Aerobní degradace n-alkánů

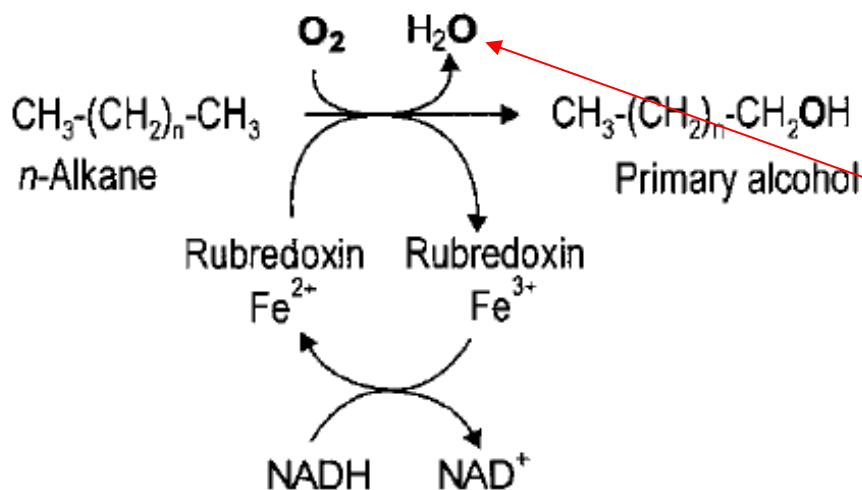


Vít Matějů

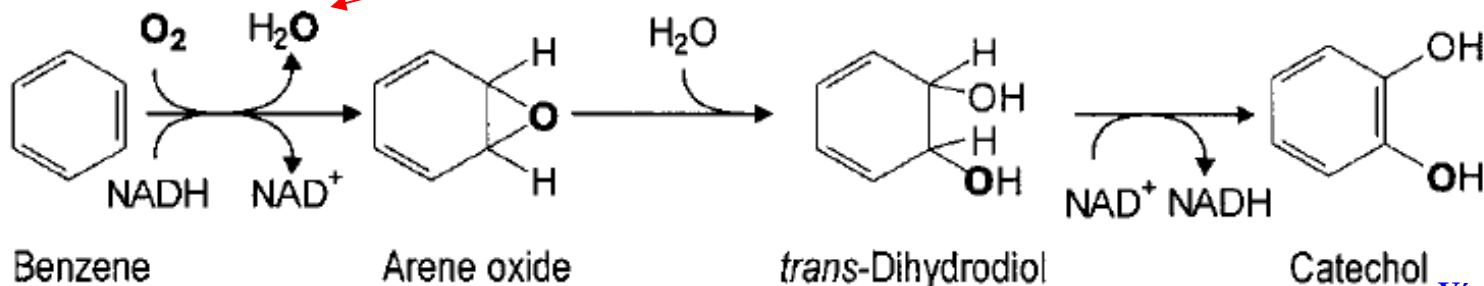


# Aerobní metabolismus

## Monooxygenase reactions



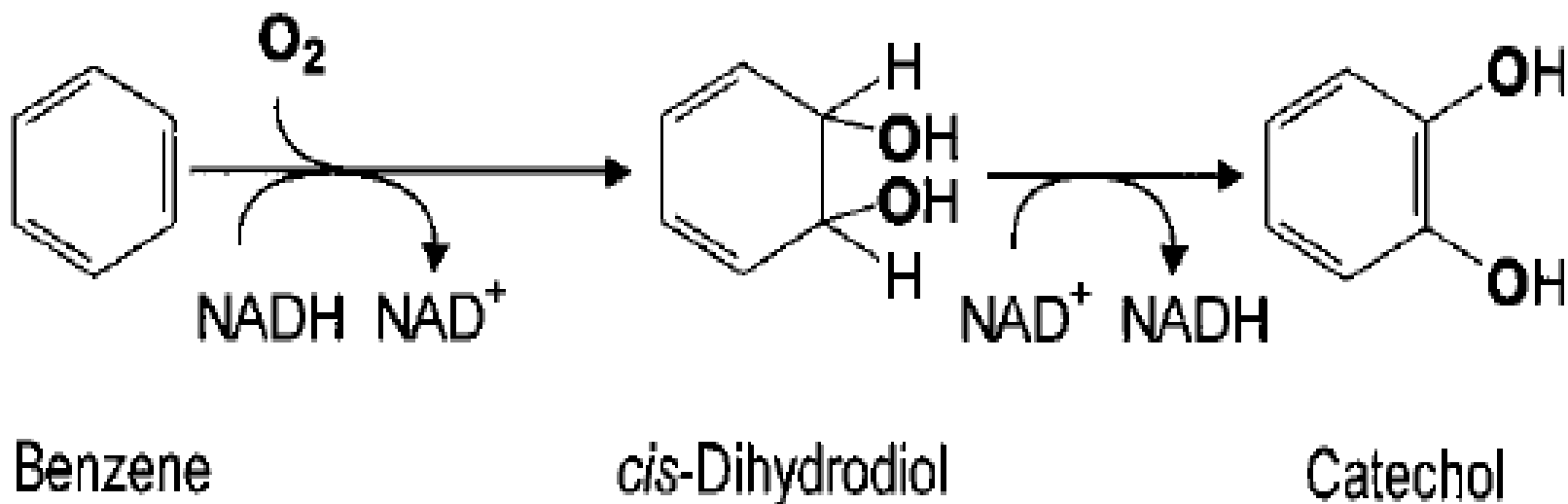
Monooxygenasa do substrátu inkorporuje 1 atom kyslíku, druhý se redukuje na  $\text{H}_2\text{O}$



Vít Matějů

# Aerobní metabolismus

## Dioxygenase reaction



Dioxygenasa inkorporuje do molekuly substrátu 2 molekuly kyslíku

Vít Matějů

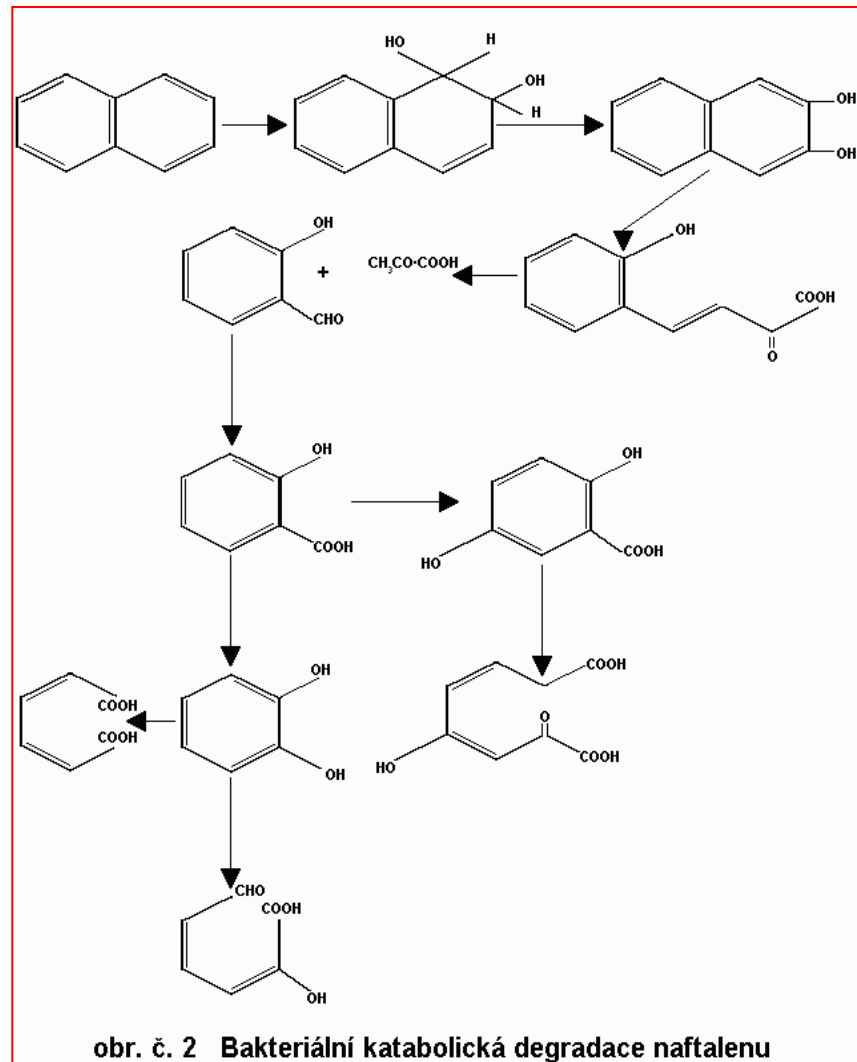


# Aerobní metabolismus

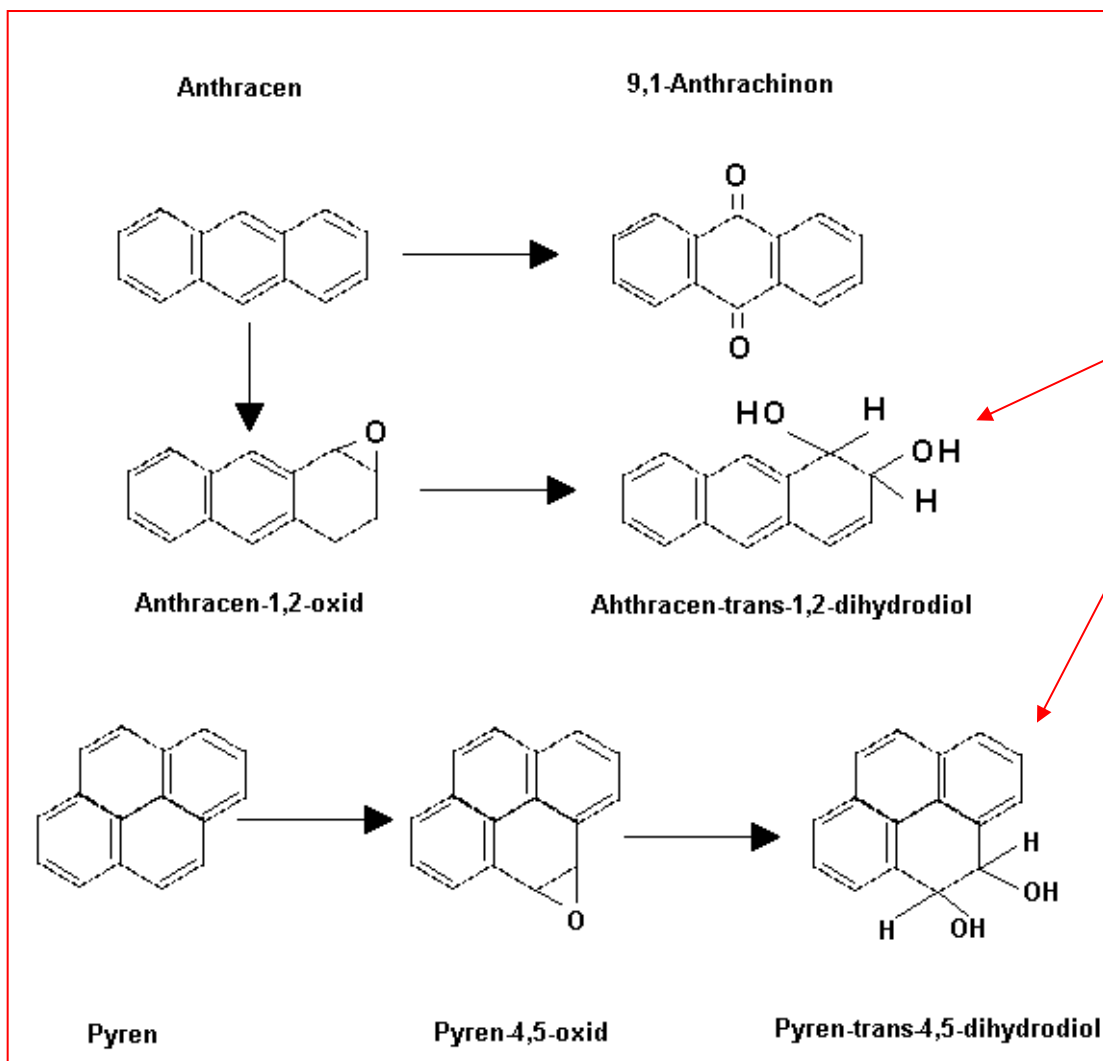
**Prvním krokem je dioxygenasou katalyzovaný přenos dvou atomů kyslíku do molekuly naftalenu následovaný štěpením aromatického kruhu.**

**U polyaromatických uhlovodíků s více aromatickými jádry to však funguje trochu jinak.**

**Důvodem jsou termodynamické vlastnosti molekuly.**

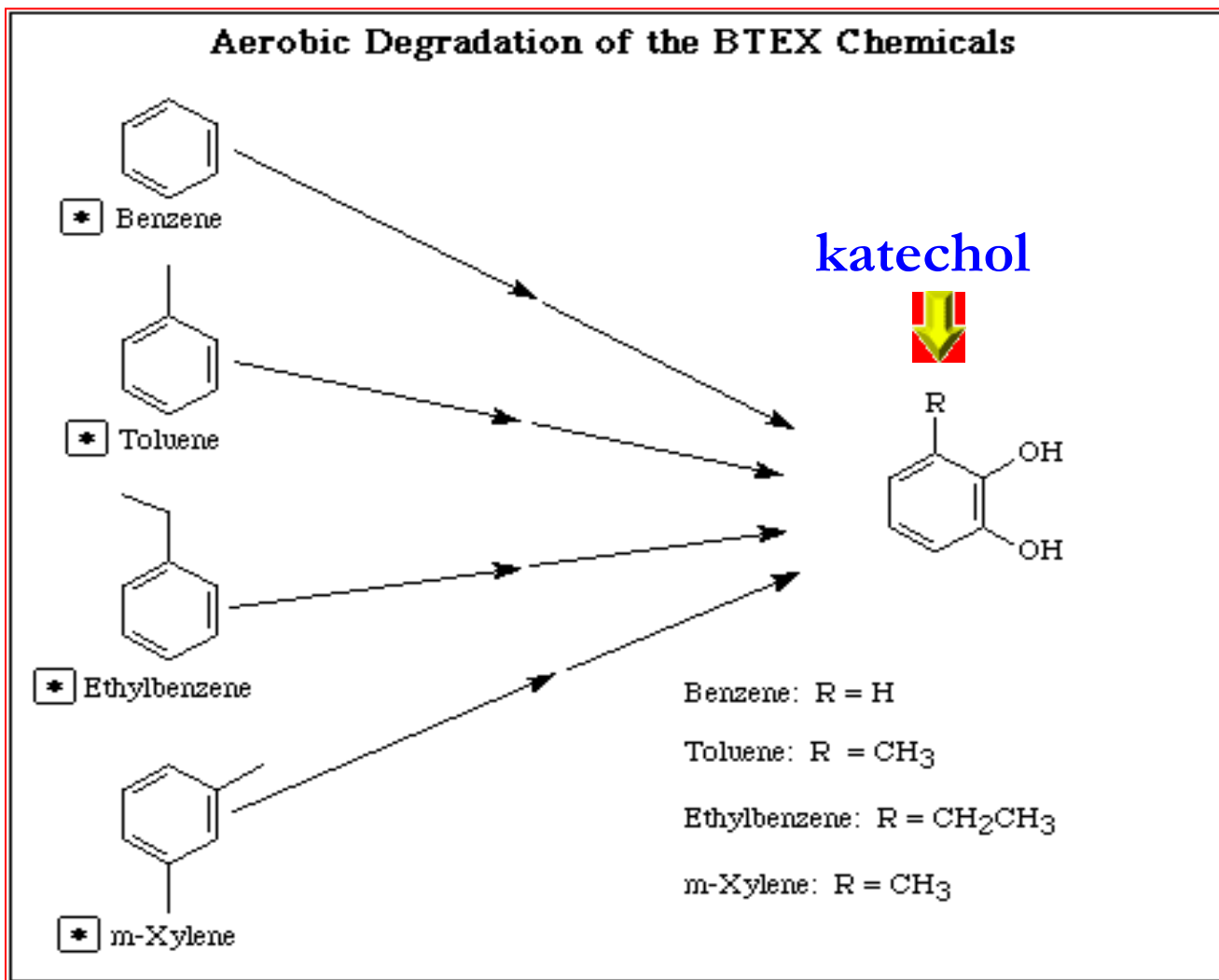


# Aerobní degradace PAHs



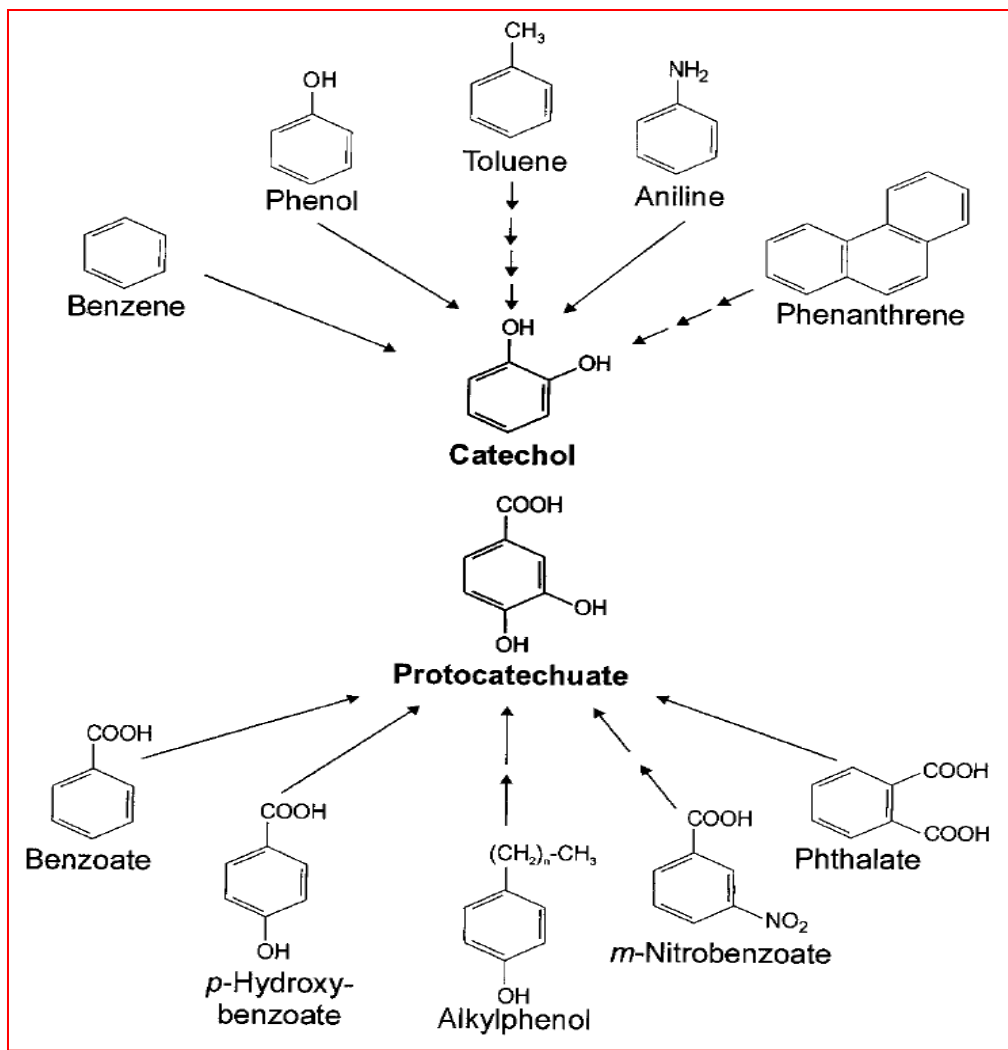
Vít Matějů

# Aerobní degradace monoaromatických uhlovodíků



Vít Matějů

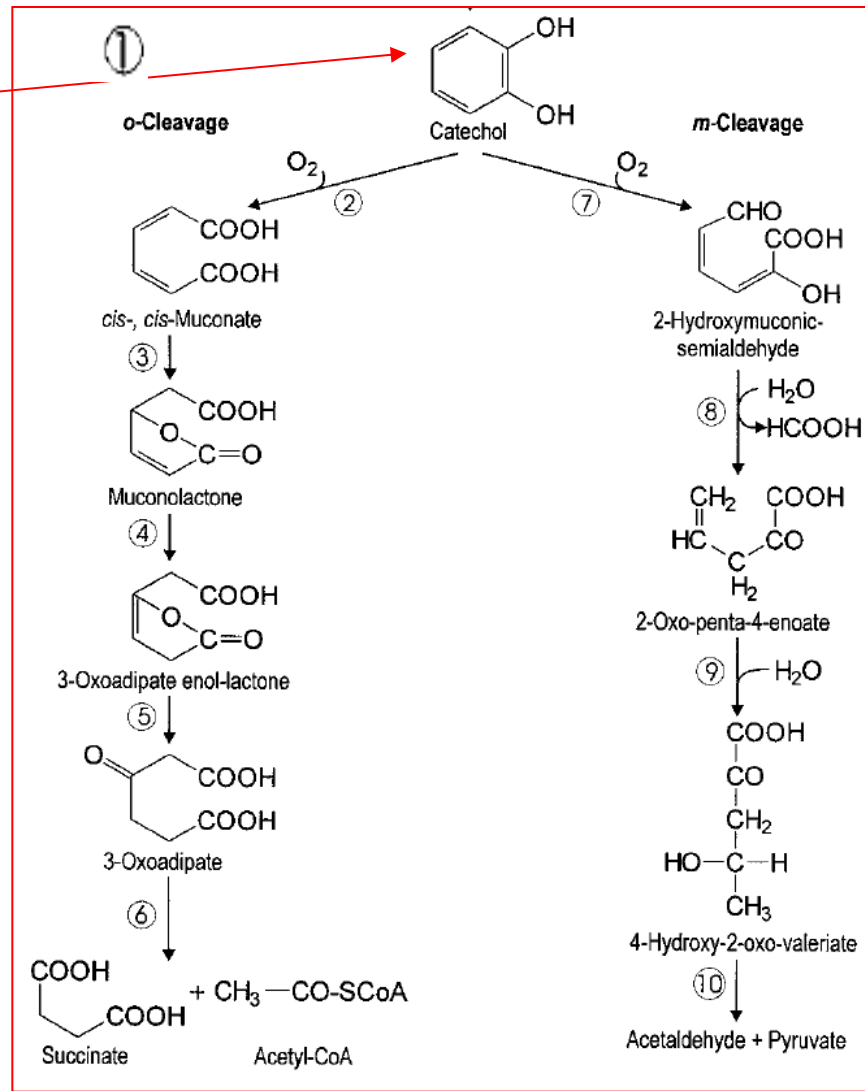
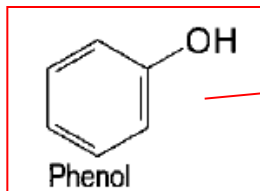
# Aerobní degradace monoaromatických uhlovodíků



Vít Matějů

# Aerobní rozklad

**Ortho a meta štěpení katecholu za aerobních podmínek je nejčastější finální metabolická cesta degradace aromatických uhlovodíků**



1. Fenol monooxygenasa
2. katechol-1,2-dioxygenasa
3. Laktonizační enzym
4. Isomereasa mukonolaktonu
5. Oxoadipát enollakton hydrolasa
6. Oxoadipát sukcinylCoA transferasa
7. Katechol 2,3-dioxygenasa
8. Hydrolasa semialdehydu kyseliny mukonové
9. Hydrolasa oxopentoové kyseliny
10. Aldolasa 4-hydroxy-2oxovalerové kyseliny

# Aerobní metabolismus

## Polutanty, které lze biologicky odbourávat za aerobních podmínek:

- ↙ *n*-alkany
- ↙ Alkeny
- ↙ MTBE
- ↙ Organické kyseliny
- ↙ Aldehydy
- ↙ Alkoholy alifatické
- ↙ Fenoly
- ↙ Katechol (dvojsytné fenoly)
- ↙ Trichloethen
- ↙ Dichloethyleny
- ↙ Vinylchlorid
- ↙ Monoaromatické uhlovodíky (benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny)

- ↙ Substituované alkany
- ↙ Neutrální tuky
- ↙ Kresol
- ↙ Polyaromatické uhlovodíky do 4 až 5 kondenzovaných aromatických jader
- ↙ Topný olej
- ↙ Letecký petrolej
- ↙ Chlorbenzeny
- ↙ Aniliny
- ↙ Substituované aniliny
- ↙ a další . . . . .

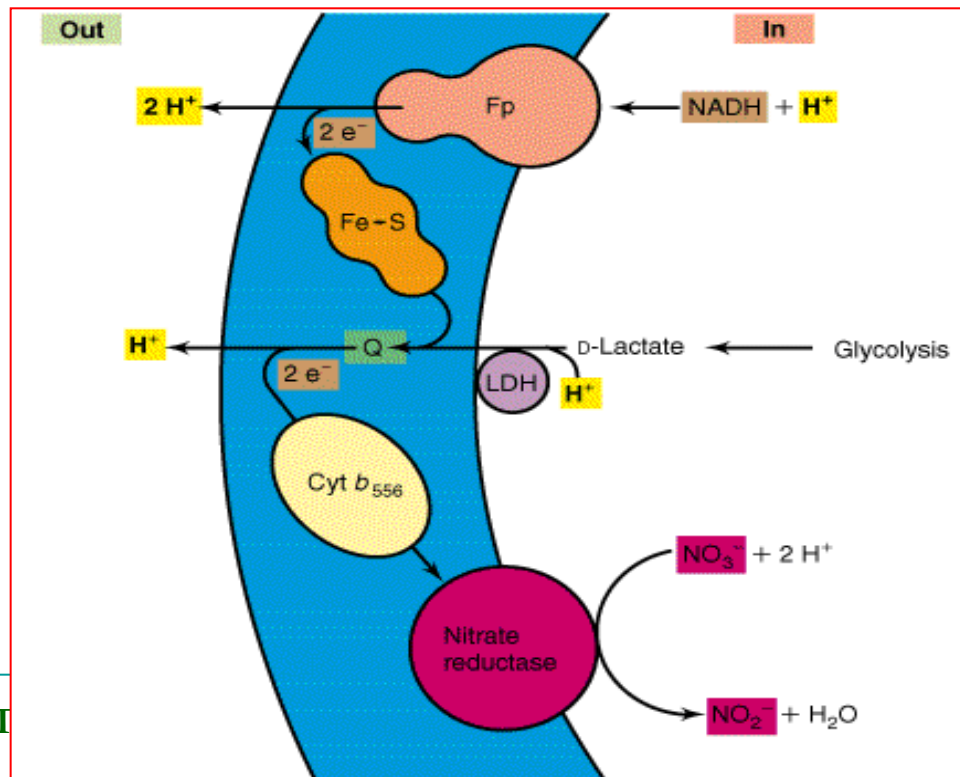
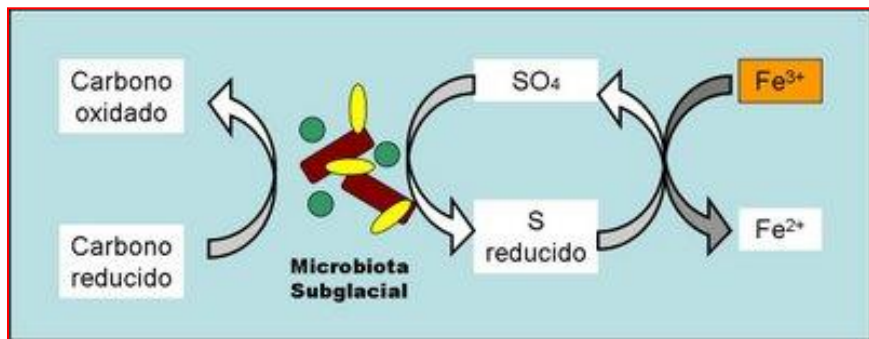
Vít Matějů

# Anaerobní metabolismus

Finální akceptor elektronů je jiný než kyslík: dusičnan, sulfát,  $\text{Fe}^{3+}$ , vodík, oxid uhličitý,  $\text{Mn}^{4+}$ ...

Anaerobní procesy jsou výrazně pomalejší než aerobní.

Vzniká většinou mnohem větší množství vedlejších produktů (některé mohou být toxické) než při aerobním procesu

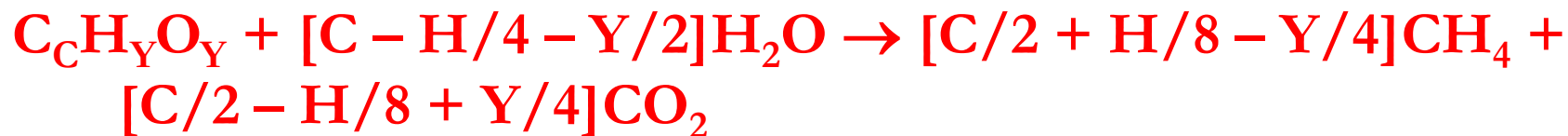


# Anaerobní biodegradace

Probíhá v anoxických sedimentech, půdách nebo podzemních vodách.

Přímá biodegradace látek za methanogenních podmínek.

Stupeň mineralizace je počítán z měřeného množství produkovaného CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> podle rovnice:



Ve srovnání s aerobním mechanismem je omezen počet katabolických cest.



# Anaerobní biodegradace

Tento mechanismus se využívá v biologických čistírnách odpadních vod (čištění, anaerobní stabilizace kalu..).

Produkty vznikající primární degradací v anaerobních reaktorech jsou většinou stabilní – aplikací kalu v zemědělství mohou kontaminovat půdu.

## Typický příklad:

**Reduktivní dehalogenace** – jako produkty vznikají látky méně hydrofóbní.

Reduktivní dehalogenace na aromatickém kruhu vyžaduje striktně anaerobní podmínky.

# Biodegradace – reduktivní dehalogenace

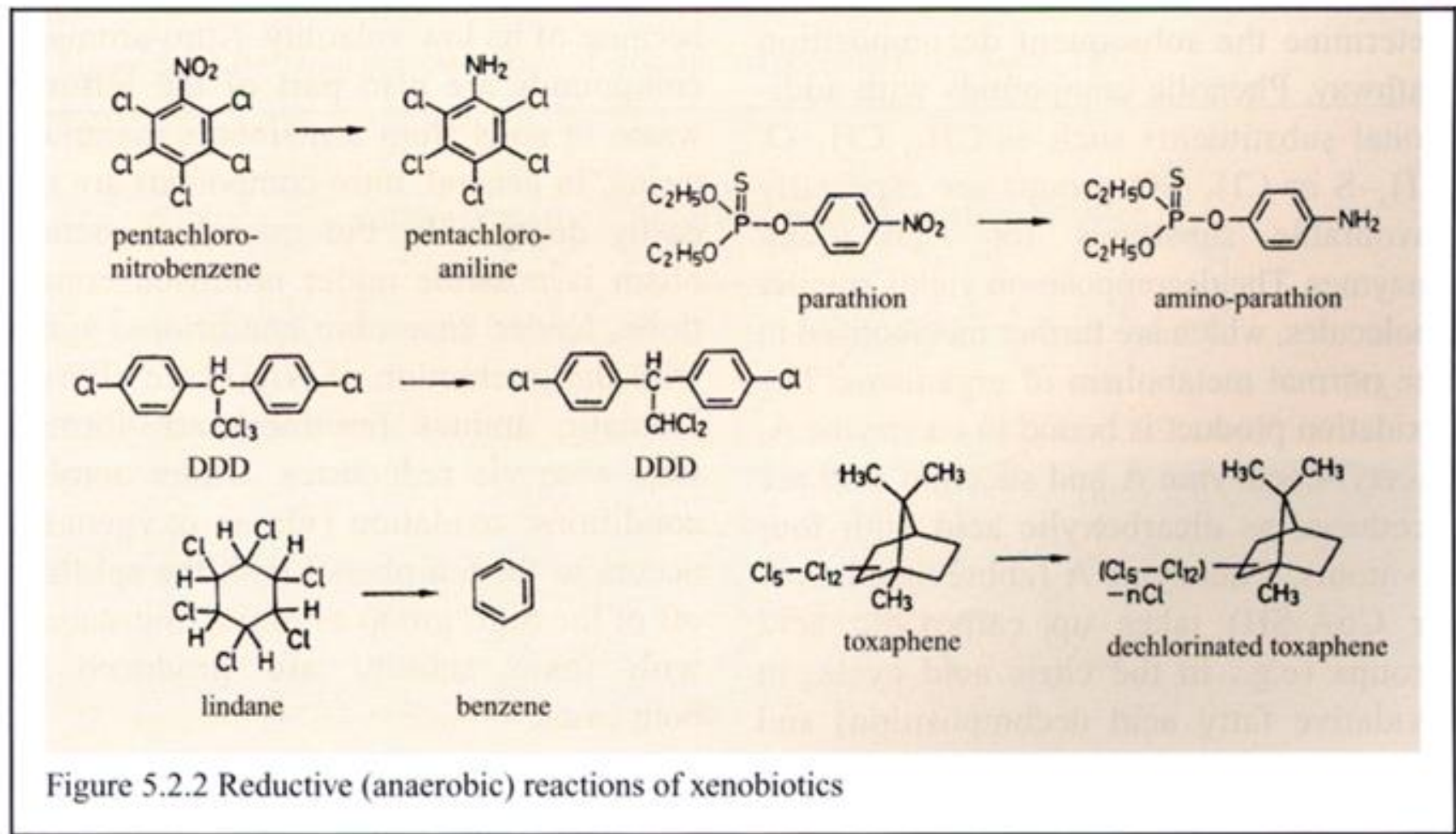


Figure 5.2.2 Reductive (anaerobic) reactions of xenobiotics

# Anaerobní biodegradace

Využívají se **specifické mikrobiální enzymatické systémy**.

Vyšší halogenované aromatické molekuly jsou méně persistentní než jejich níže halogenované kongenery – v půdách a sedimentech to může být ovlivněno změnou biodostupností.

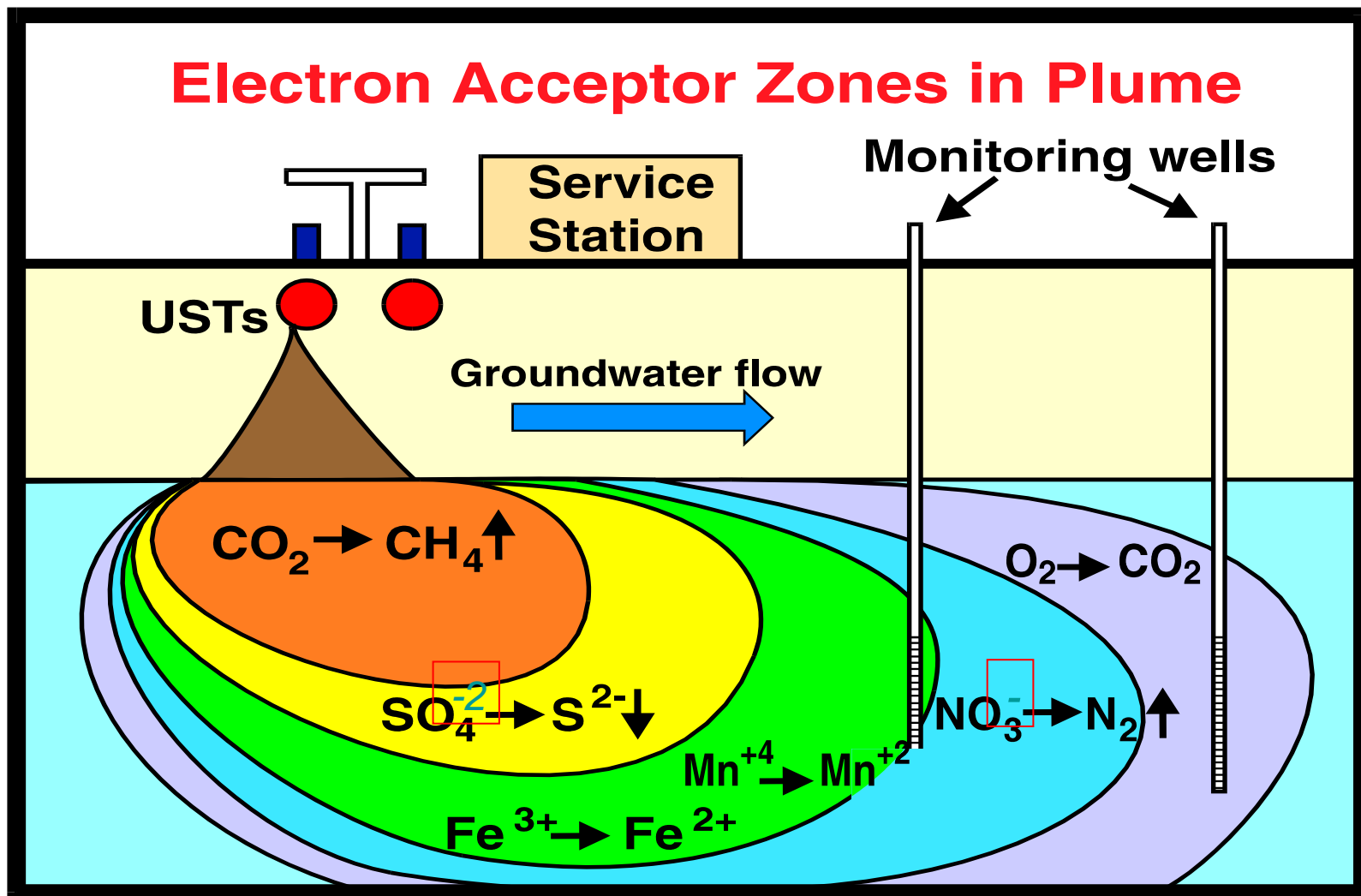
U **aerobní biodegradace** je to opačné – více halogen atomů zamezuje přístupu kyslíku.

**Biodegradace je tedy obecně závislá na chemické struktuře a environmentálních podmínkách.**

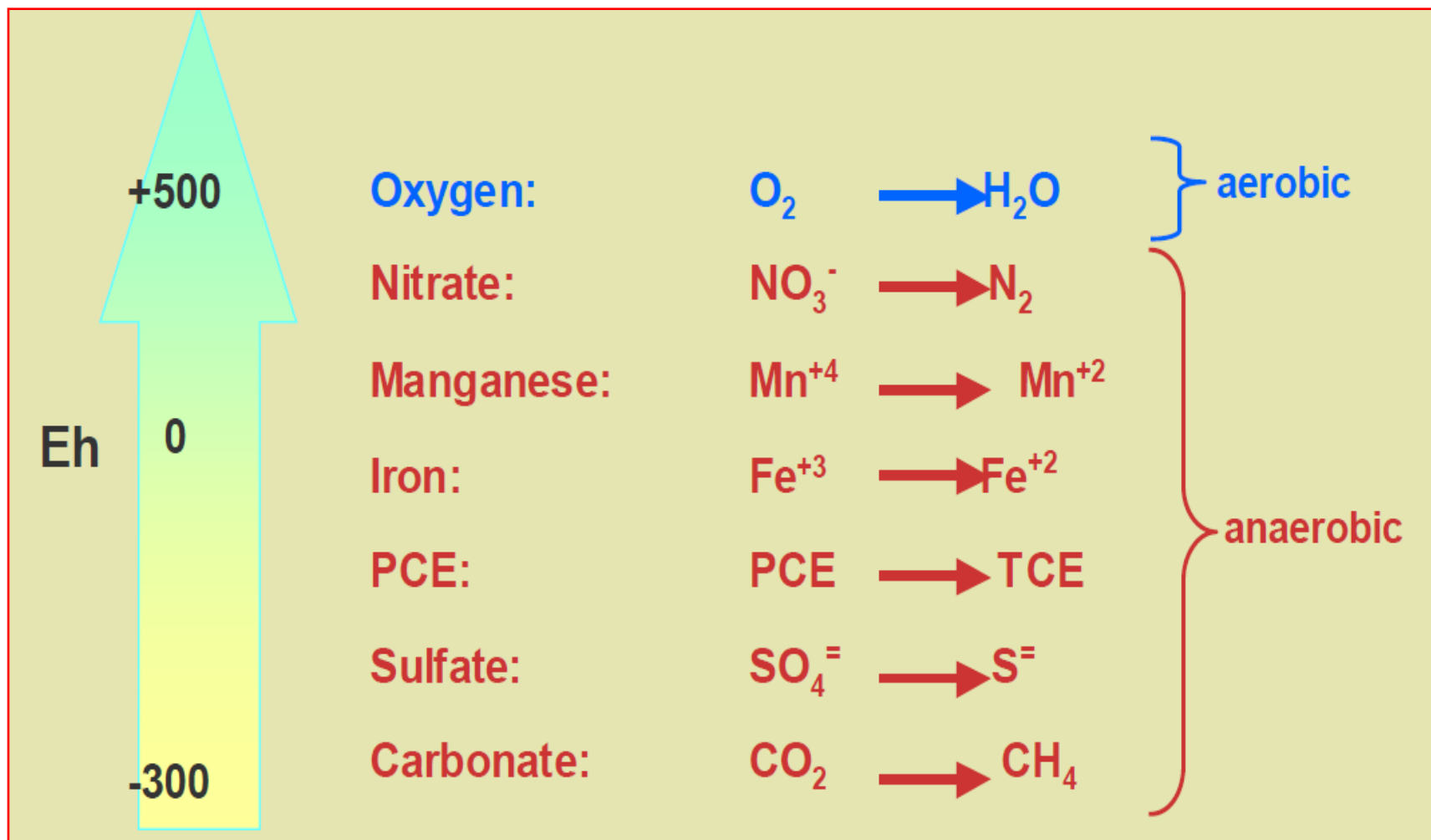
Důvody pro environmentální persistenci látek

- ↪ Chemická struktura
- ↪ Environmentální podmínky
- ↪ Biodostupnost

# Finální akceptory elektronů



# Finální akceptory elektronů

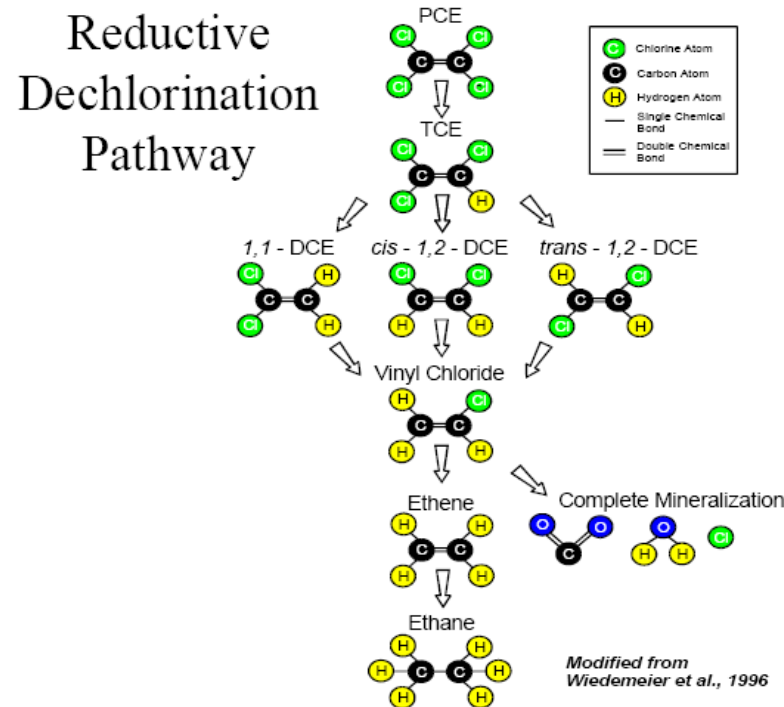


Vít Matějů

# Anaerobní metabolismus

Prakticky se využívá při dehalogenaci substituovaných uhlovodíků a chlorovaných organických sloučenin.

Nejznámější je redukční dechlorace perchlorethylenu, který má uhlík v maximálním oxidačním stupni, takže ho oxidačně nelze rozkládat.

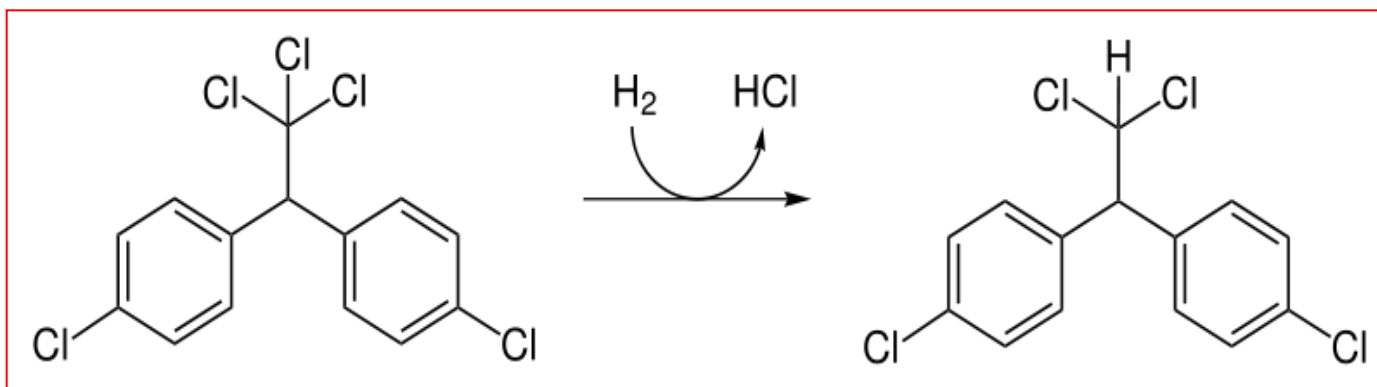


Vít Matějů

# Anaerobní metabolismus

Anaerobní procesy se hojně využívají jako **předúprava při ošetřování kontaminace** polyhalogenovanými sloučeninami, například DDT, polychlorované dioxiny, PCB, chlorované pesticidy, polybromovaná zhašedla či TNT, RDX, HRX apod.

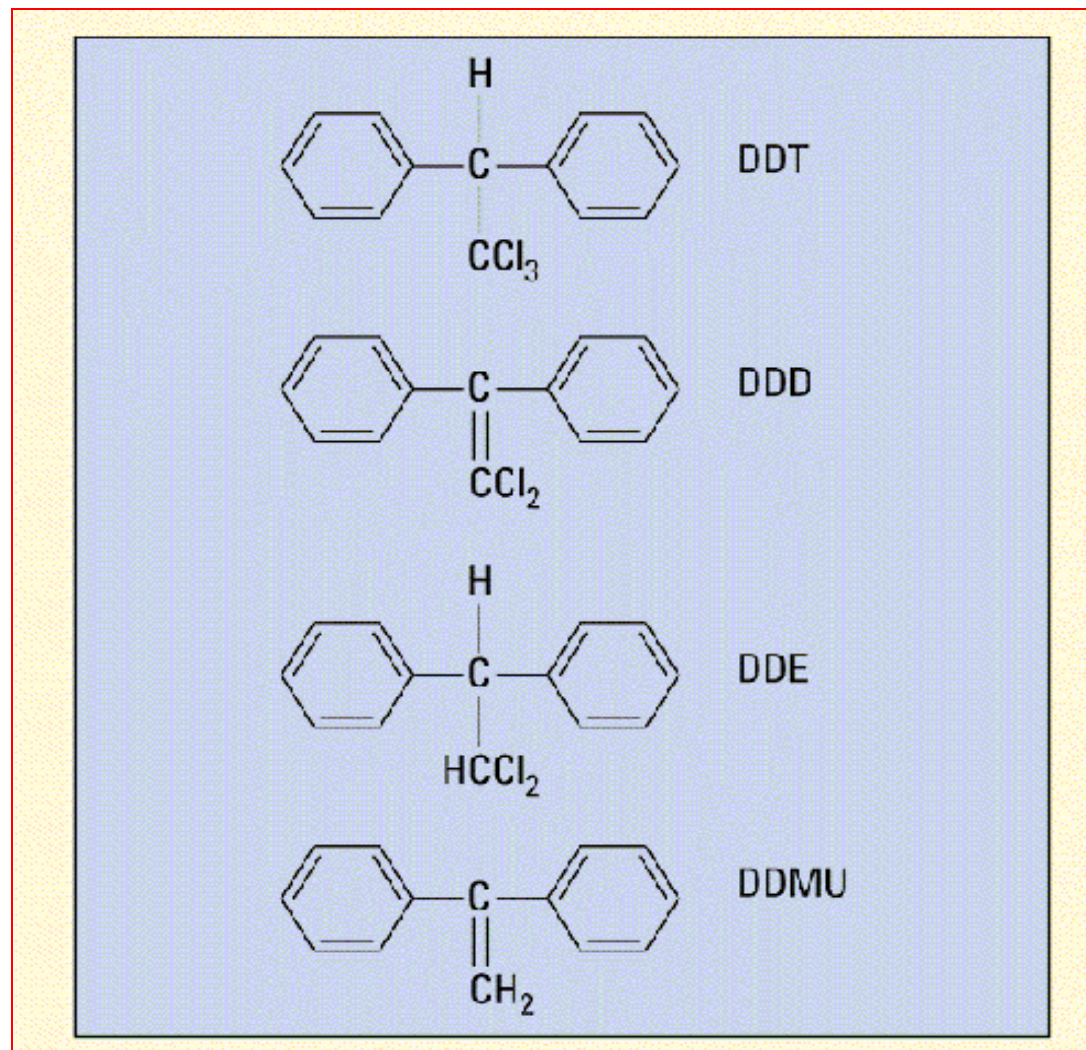
DDT



Vít Matějů



# Anaerobní metabolismus



Vít Matějů



# Anaerobní metabolismus

**Reduktivní dehalogenací** dojde ke změně molekuly, která je potom snáze biologicky odbouratelná.

Samotné **biologické čištění polyhalogenovaných sloučenin** se proto provádí v **sekvencích**: anaerobní fáze – aerobní fáze

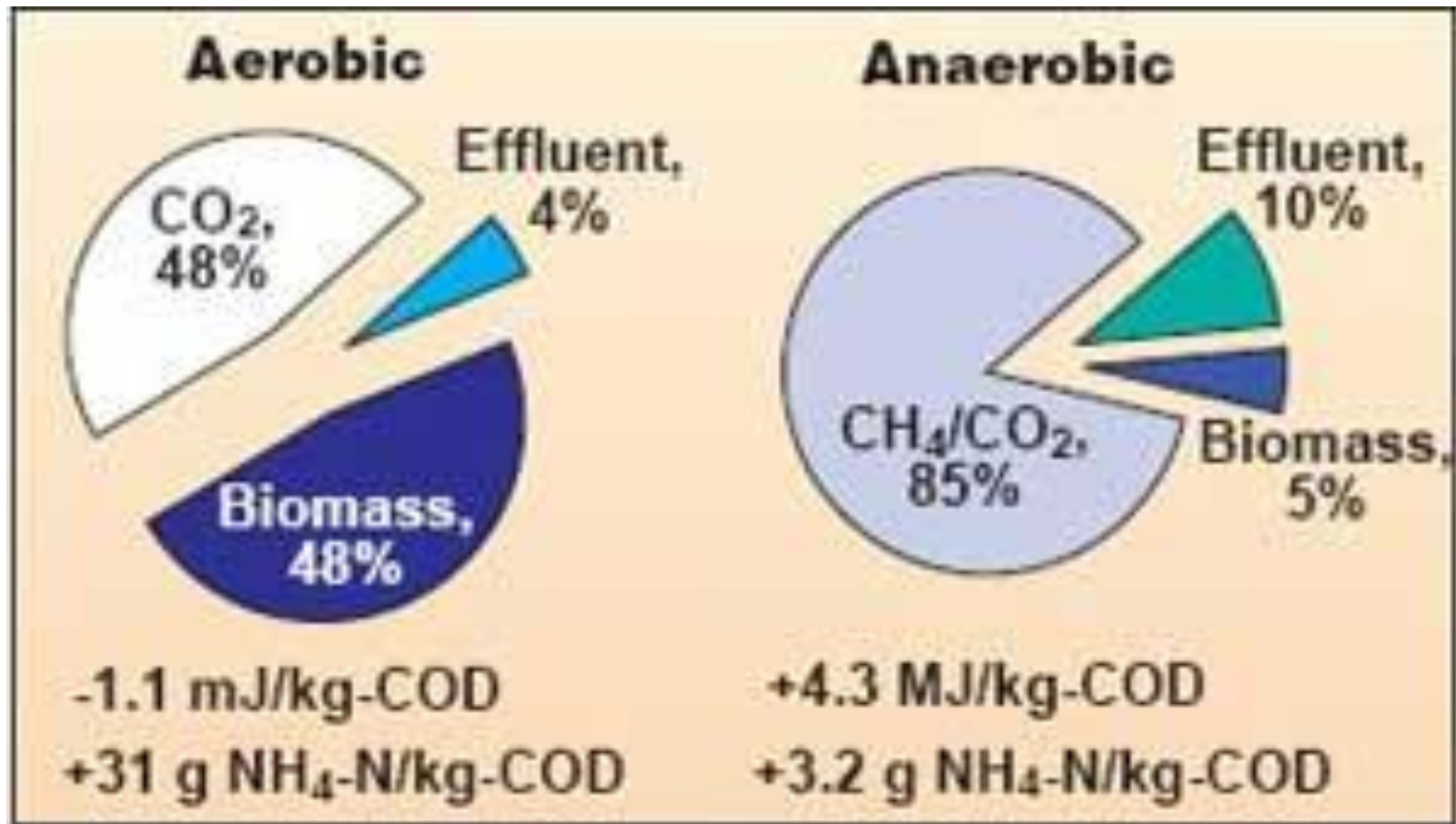
**Anaerobní rozklad *n*-alkanů** a dalších alifatických uhlovodíků **je možný, ale je tak pomalý, že nenašel praktického využití.**

Podmínky, za kterých může probíhat, se dosahují jen obtížně.

**Náklady na anaerobní čištění materiálů kontaminovaných ropnými uhlovodíky by byly velmi vysoké a trvaly by neúnosně dlouho.**

Vít Matějů

# Srovnání



Vít Matějů

# Anoxický stres

**Přechod mezi aerobním a anaerobním metabolismem tvoří anoxické podmínky (koncentrace rozpuštěného kyslíku v podzemní vodě  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  až  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ).**

**Při nízkých koncentracích kyslíku v prostředí vzniká tzv. anoxický stres, který způsobuje m.j. zvyšování specifické spotřeby kyslíku na odbourání jednotkového množství organického substrátu (až 10násobně).**

**Tím se výrazně zvyšují náklady na eliminaci organických látek například při čištění odpadních vod ale i při sanacích.**



Vít Matějů

# Zdroje informací

<http://umbbd.msi.umn.edu/>

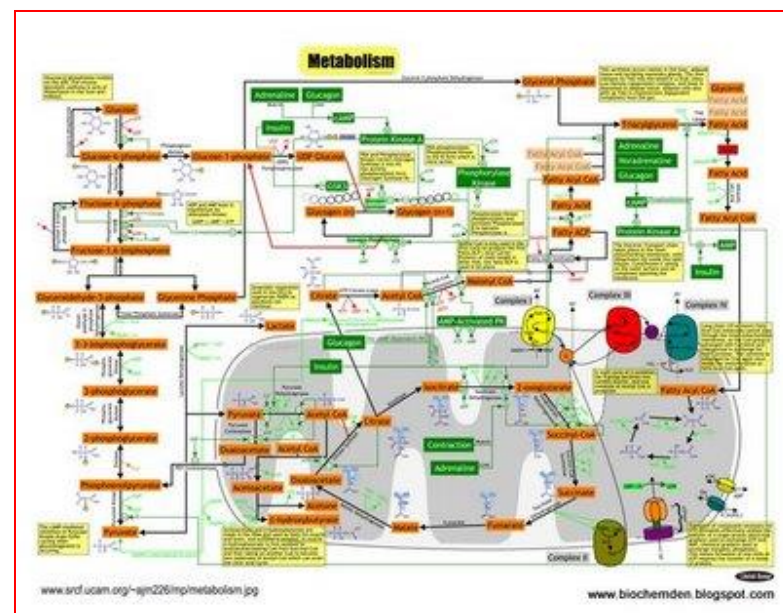
University of Manitoba Biocatalysis/Biodegradation Database -  
UM – BBD



UNIVERSITY  
OF MANITOBA

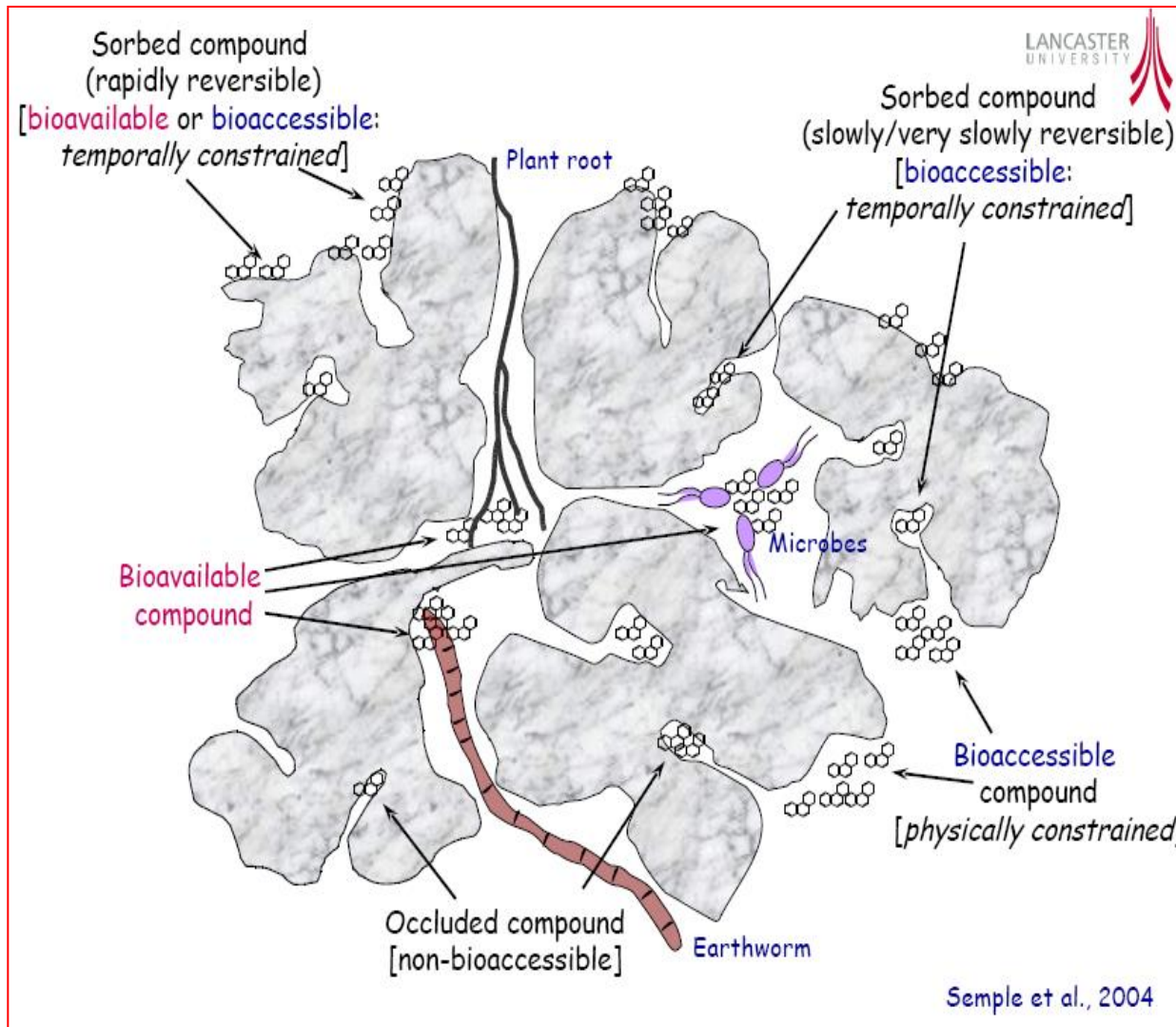
- 1) 203 metabolických cest
- 2) 1405 reakcí
- 3) 1301 látek
- 4) 920 enzymů
- 5) 510 mikroorganismů
- 6) 246 biotransformačních pravidel
- 7) 50 organických funkčních skupin
- 8) 76 reakcí nafthalen 1,2-dioxygenasy
- 9) 109 reakcí toluendioxygenasy

21.8.2011



Vít Matěju

# Biodostupnost polutantů



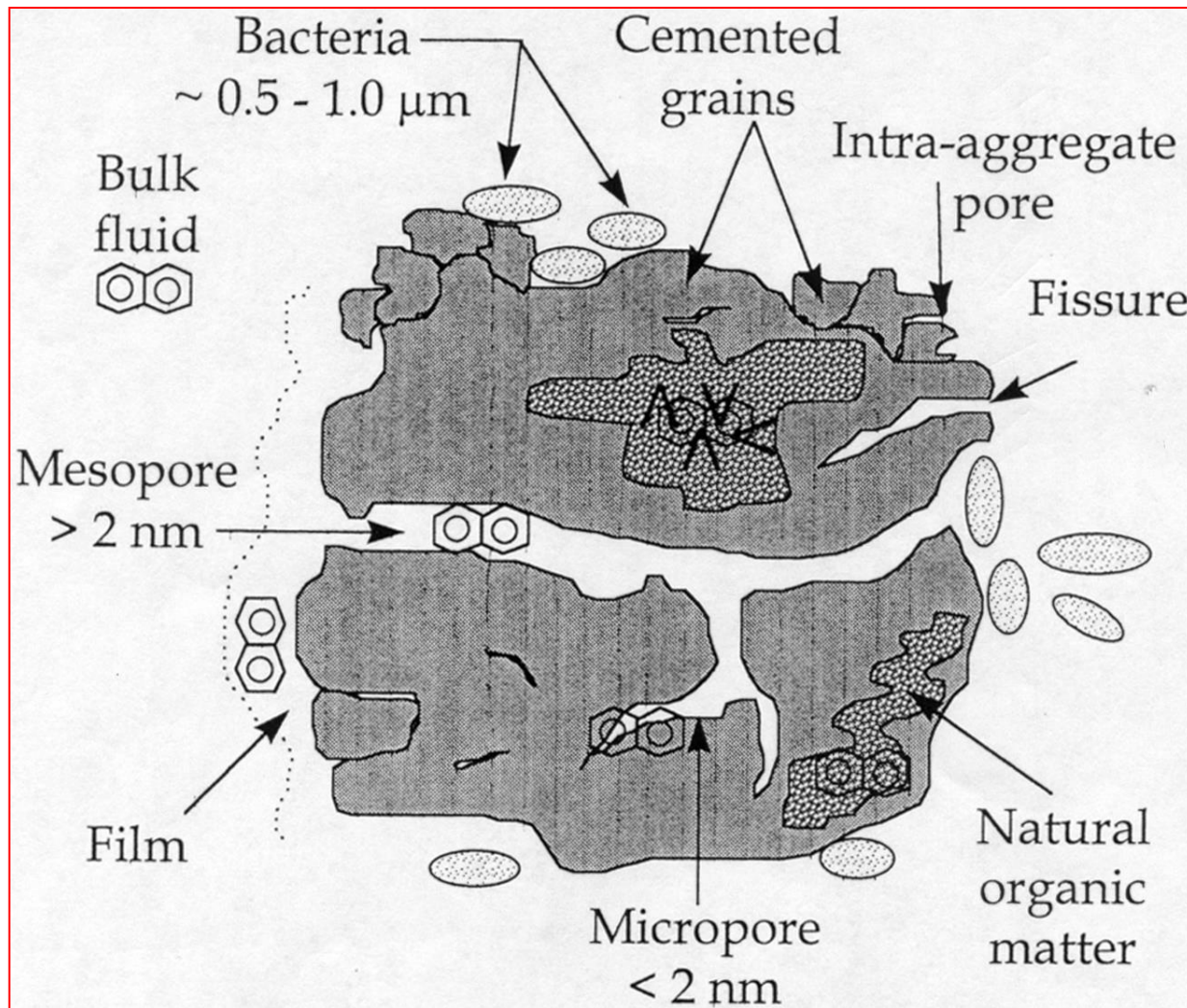
# Větrání (stárnutí) polutantu

Na stárnutí polutantů a snižování dostupnosti se podílí:

- ↪ Sorpce na pevné částice půdy (jíl)
- ↪ Sorpce na organické látky v půdě (huminové látky)
- ↪ Difúze do mikropórů a makropórů
- ↪ Odpar těkavých složek
- ↪ Úbytek dobře odbouratelných složek znečištění



# Větrání (stárnutí) polutantu



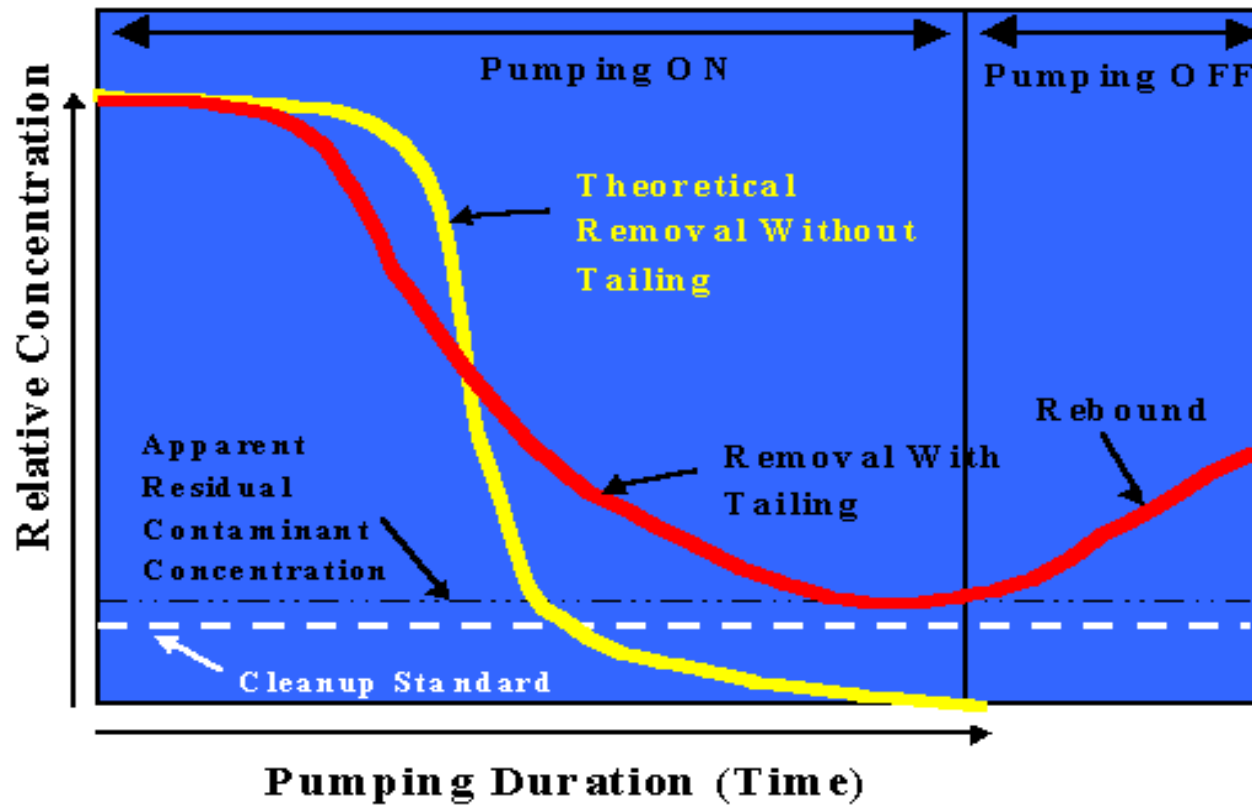
# Větrání (stárnutí) polutantu

- 1) **v systémech s jedním polutantem:** dochází při zvyšování kontaktního času mezi polutantem a půdou ke snižování biologické dostupnosti a odbouratelnosti
- 2) **v systémech s více polutanty** přítomnost dalších látek zpomaluje stárnutí a zvyšuje biologickou dostupnost polutantu
- 3) **Sorbované molekuly** jsou nejčastěji důvodem „reboundingu“



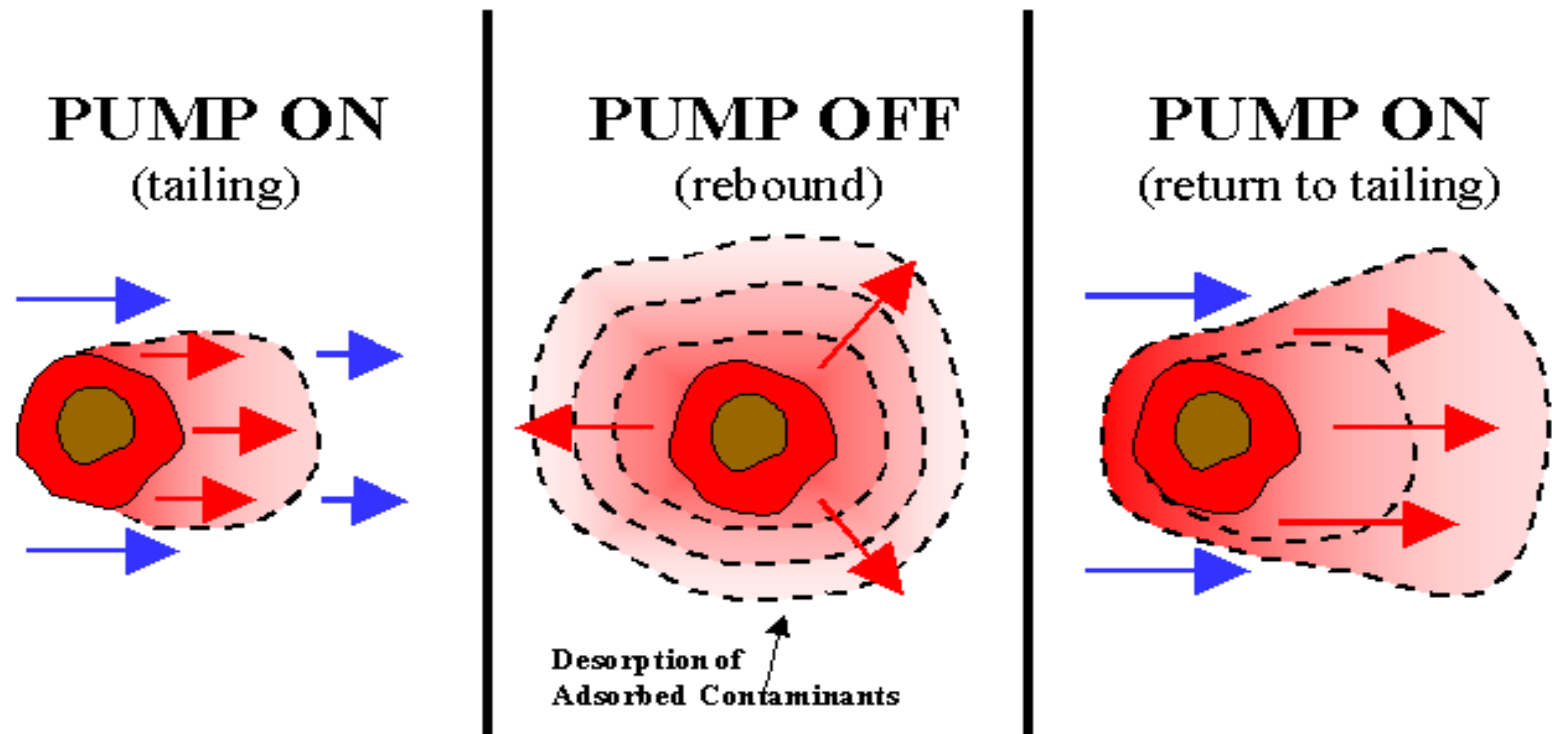
# Rebounding

## Tailing and Rebound Effects



# Rebounding

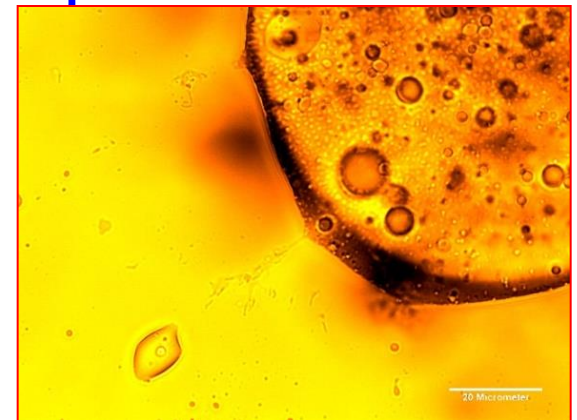
## Tailing and Rebound Effects



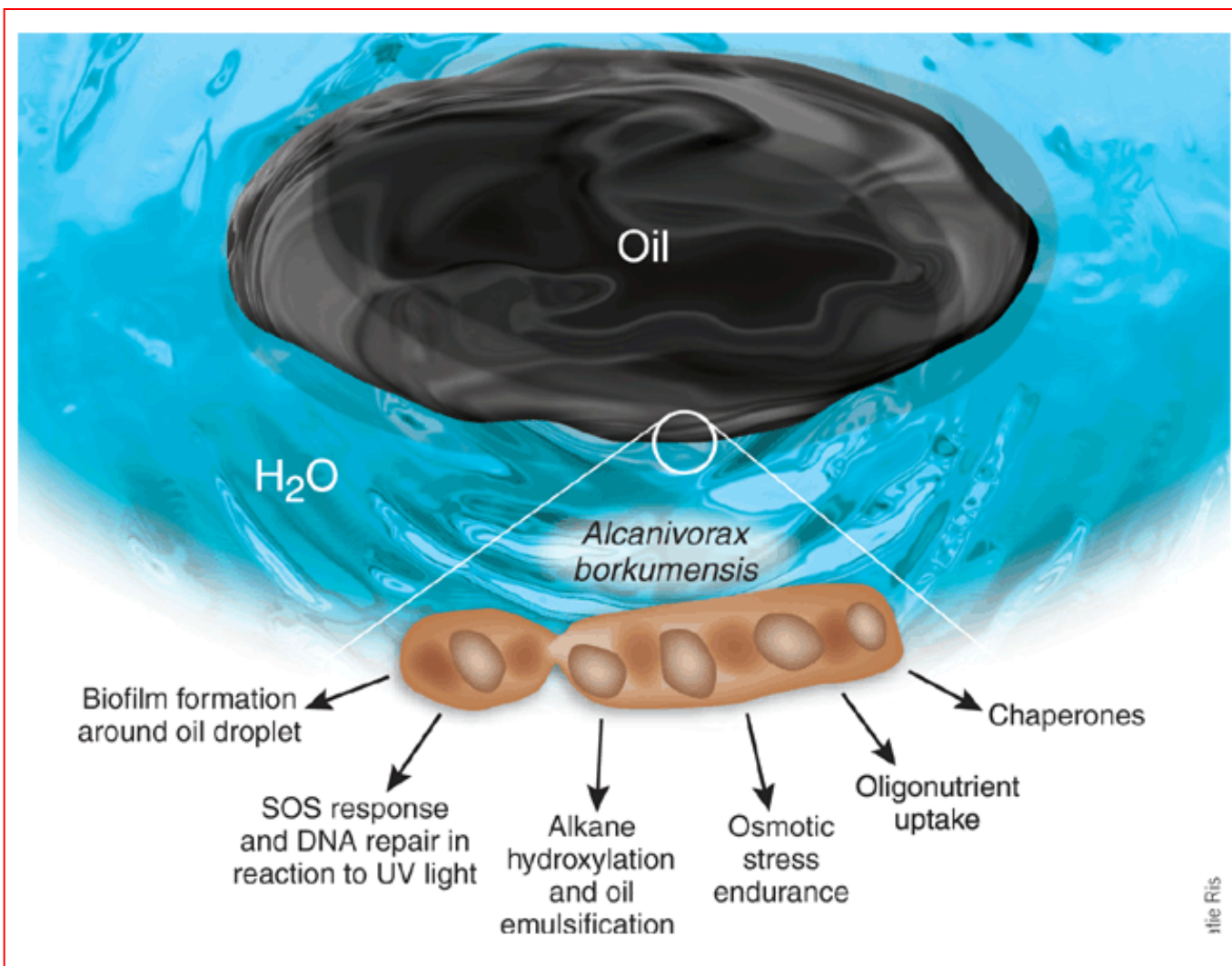
# Podpora přenosu hmoty

## Vlastnosti bakterií podporující přenos hmoty:

- ↪ tvorba biologických povrchově aktivních látek a jejich exkrece do prostředí
- ↪ vznik struktur na povrchu buňky, které podporují emulgaci hydrofobních molekul polutantu
- ↪ systém příjmu s vysokou afinitou k polutantu
- ↪ zvýšená adheze buněk k pevnému nebo kapalnému substrátu



# Biofilm



# Biodegradovatelnost polutantů

Podle biologické rozložitelnosti lze polutanty seřadit podle snižující se biologické rozložitelnosti:

jednoduché alifatické uhlovodíky, paliva > monoaromatické uhlovodíky > alkoholy, estery > nitrobenzeny, ethery > chlorované uhlovodíky > polycyklické aromatické uhlovodíky > pesticidy.

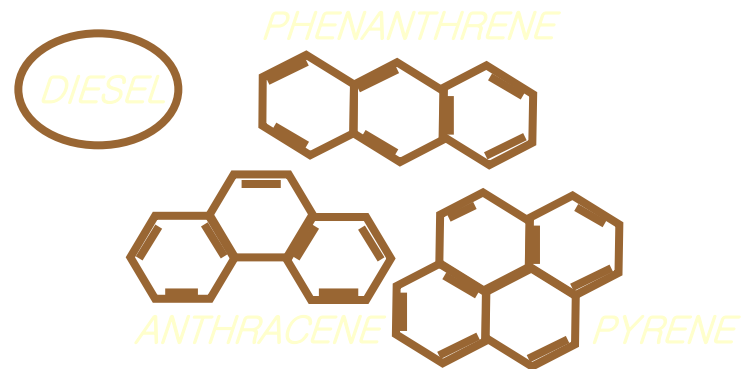
*n*-Alkany:

- ↪ Nejsnáze molekuly C<sub>10</sub> až C<sub>16</sub>
- ↪ C<sub>1</sub> až C<sub>4</sub> jsou plynné, rozkládají je jen vysoce specializované bakterie
- ↪ C<sub>5</sub> až C<sub>9</sub> jsou pro většinu mikroorganismů **toxické**

# Podpora přenosu hmoty

Zpřístupnění molekul polutantů pro buňky:

- ↪ Přídavkem neionogenní povrchově aktivní látky (NPAL)
- ↪ Částečná chemická oxidace



# Podpora přenosu hmoty

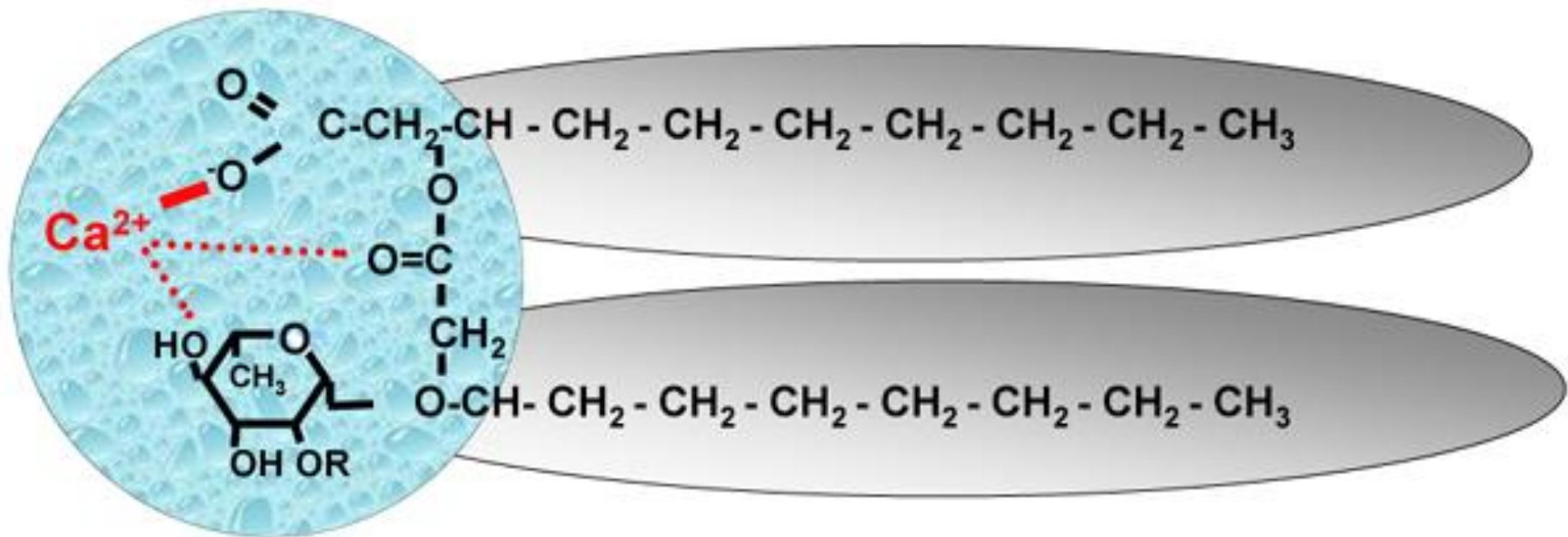
- ↪ Ohřev horninového prostředí (odporové ohřívání, vhánění páry.....)



- ↪ Uvolnění sorpčních vazeb molekul polutantů ultrazvukem
- ↪ Podpora tvorby biosurfaktantů

# Podpora přenosu hmoty – tvorba biosurfaktantů

The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* produces a nontoxic, degradable biosurfactant (detergent) called rhamnolipid



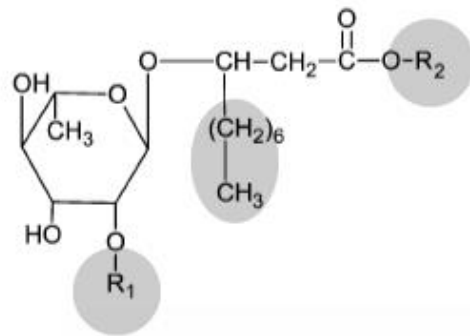
Courtesy Raina M. Maier



# Biosurfaktanty

## Glycolipids

rhamnolipids,  
sophorolipids,  
trehalolipids

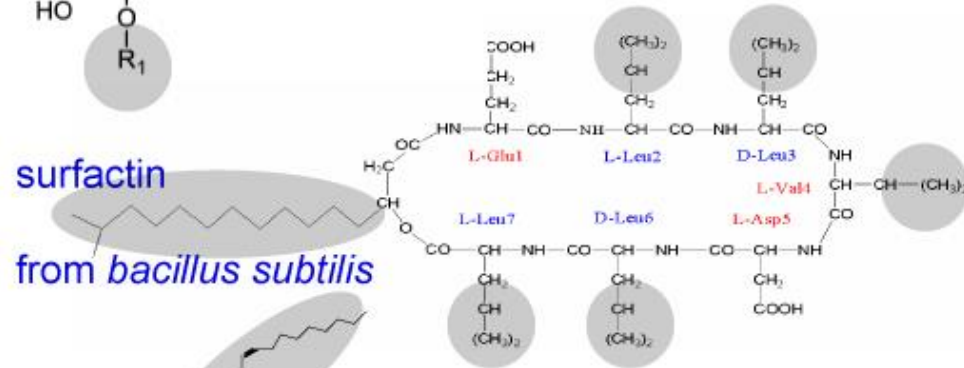


rhamnolipid  
from *Pseudomonas sp.*

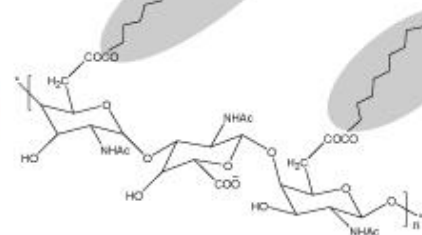
## Lipopeptides

surfactin,  
iturin,  
fengycin

surfactin  
from *Bacillus subtilis*



## Polymeric surfactants



bioemulsan  
from *Acinobacter sp.*

Other surface active biomolecules in natural and man-made use, especially in food products

**Phospholipids**

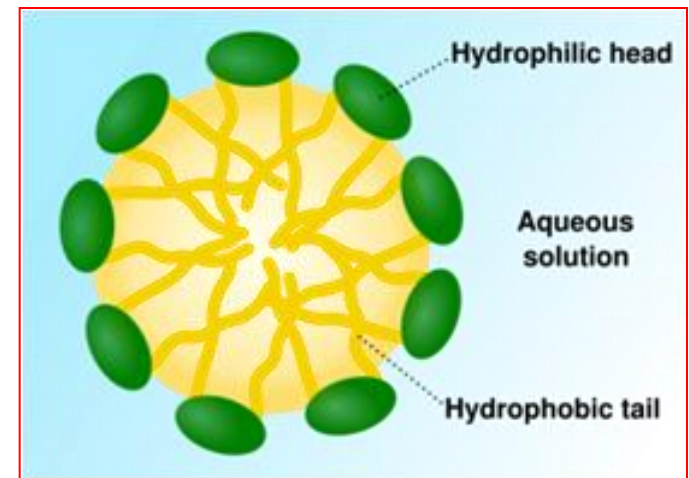
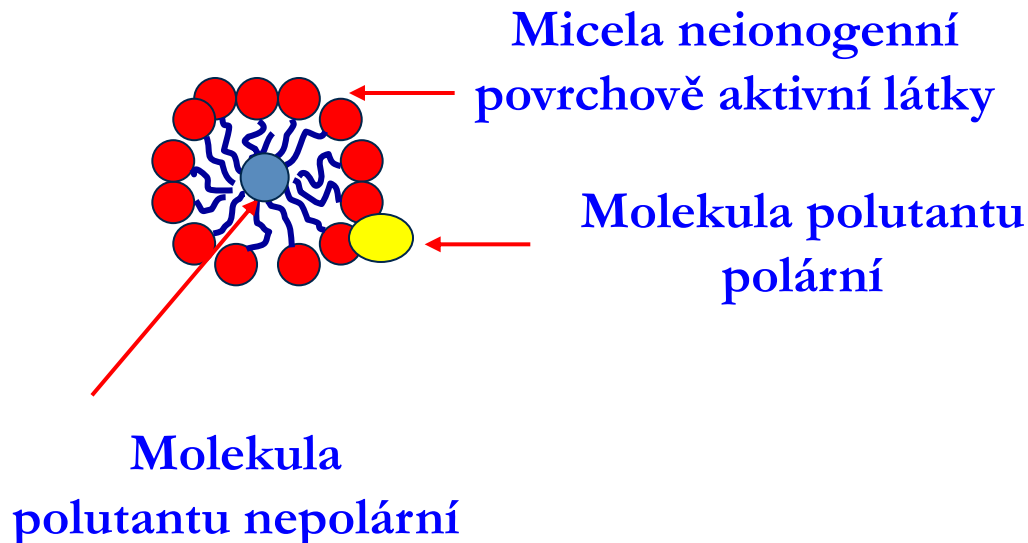
e.g. lecithin

**Proteins**

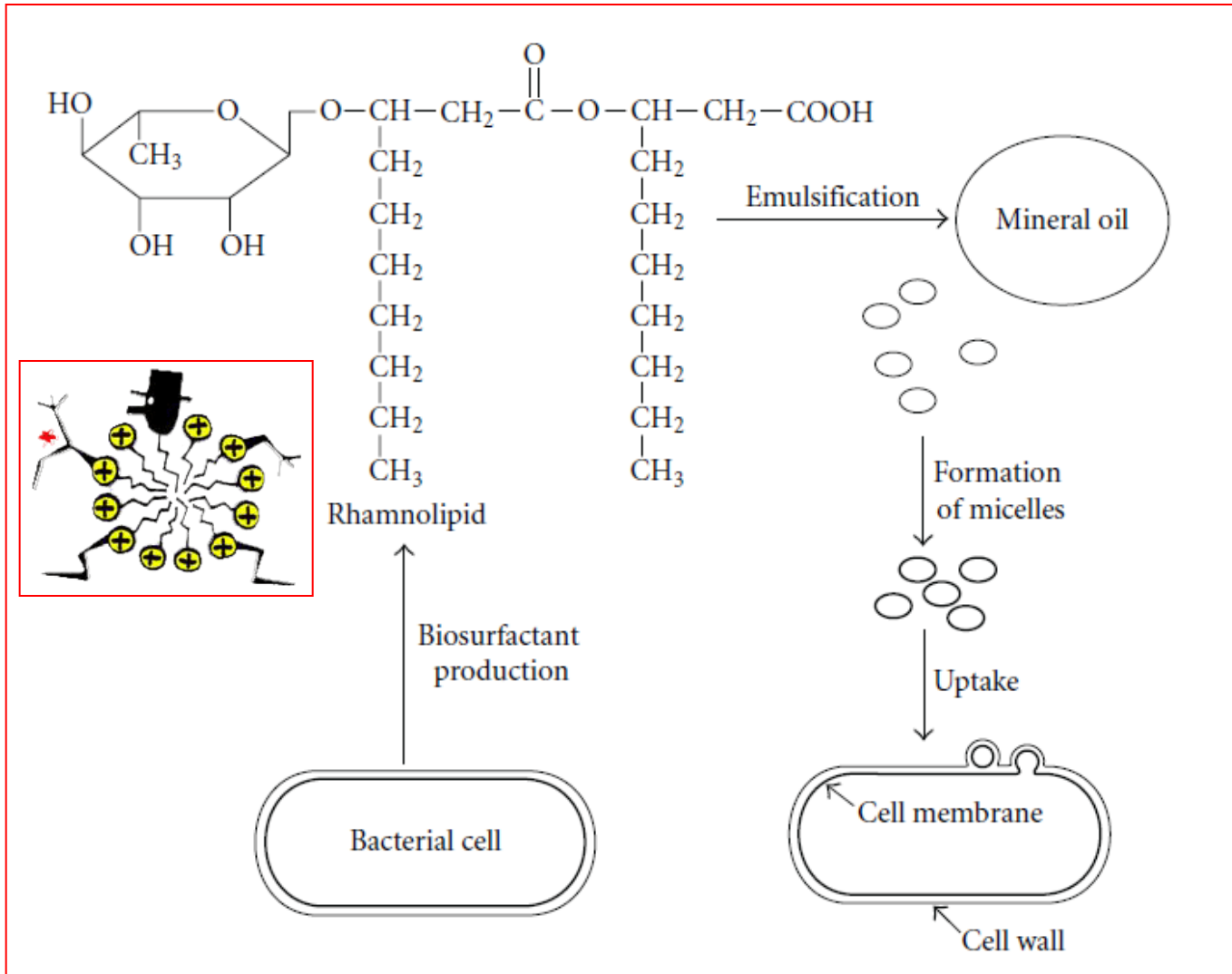
e.g. b-casein

# Biosurfaktanty

- ↪ **Všechny bakterie, které jsou schopné využívat nepolární substráty, mají schopnost biosurfaktant vytvářet a uvolňovat do prostředí**
- ↪ **Bez biosurfaktantu by nebyly schopné dopravit substrát do buňky**



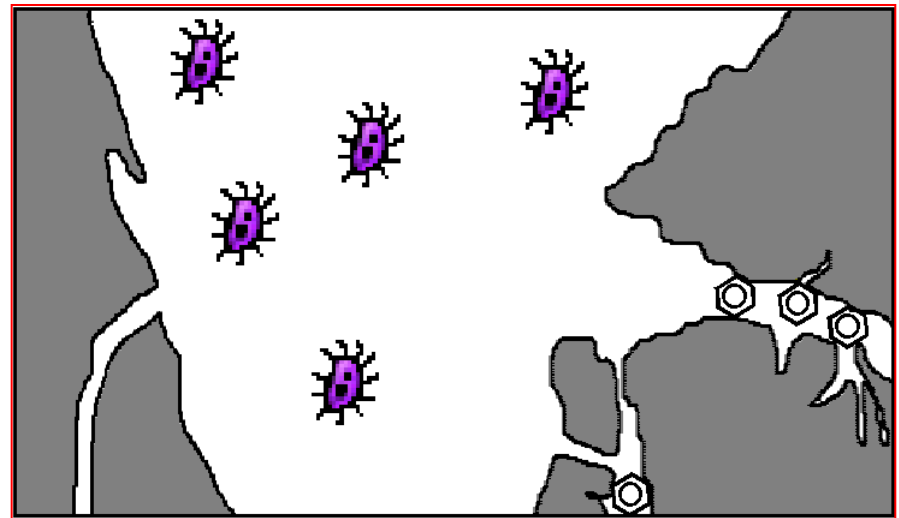
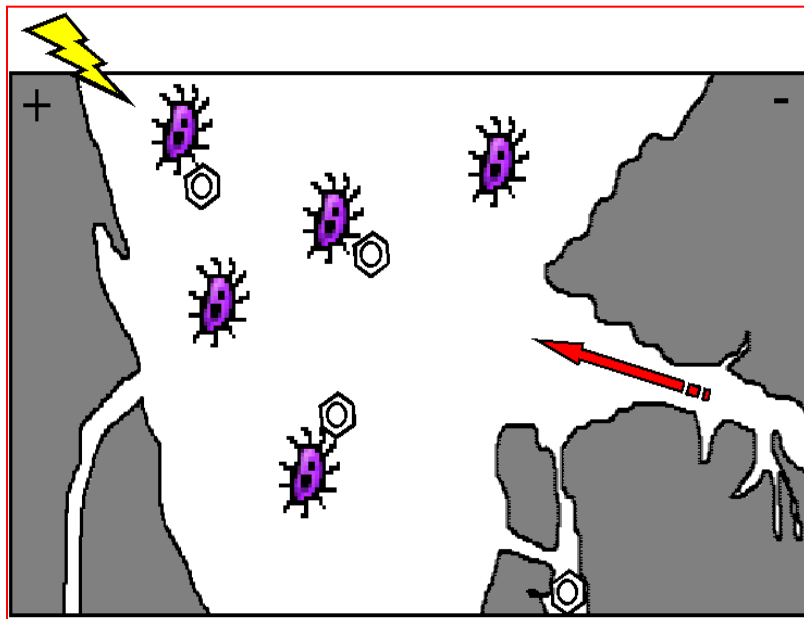
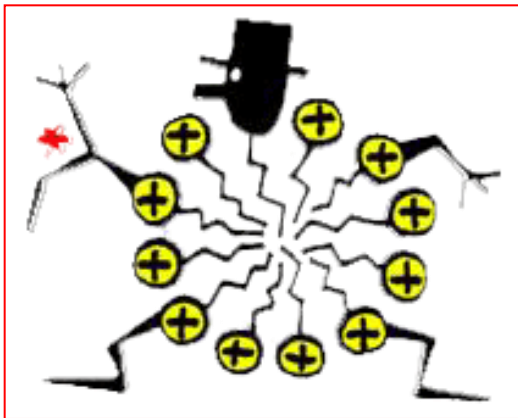
# Biosurfaktanty



# Faktory omezující biodegradace

- ↪ Přenos hmoty do buňky
- ↪ Dostupnost molekul polutantu pro mikroorganismy (sorpce, rozpustnost)
- ↪ Enzymatický aparát mikroorganismů
- ↪ Tvorba toxických metabolitů
- ↪ Inhibiční podmínky v prostředí (toxicita polutantů, pH, teplota, nedostatek vlhkosti, nedostatek finálních akceptorů elektronů, limitace makro a mikrobiotickými prvky .....
- ↪ Neschopnost odbourávat některé polutanty vedle sebe (např. toluen a chlorbenzen)

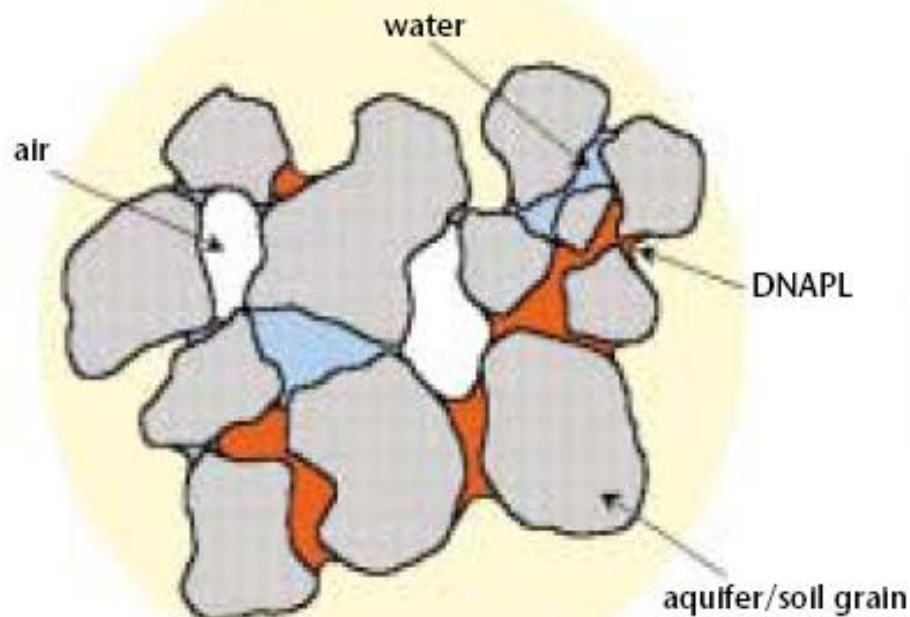
# Podpora vymytím



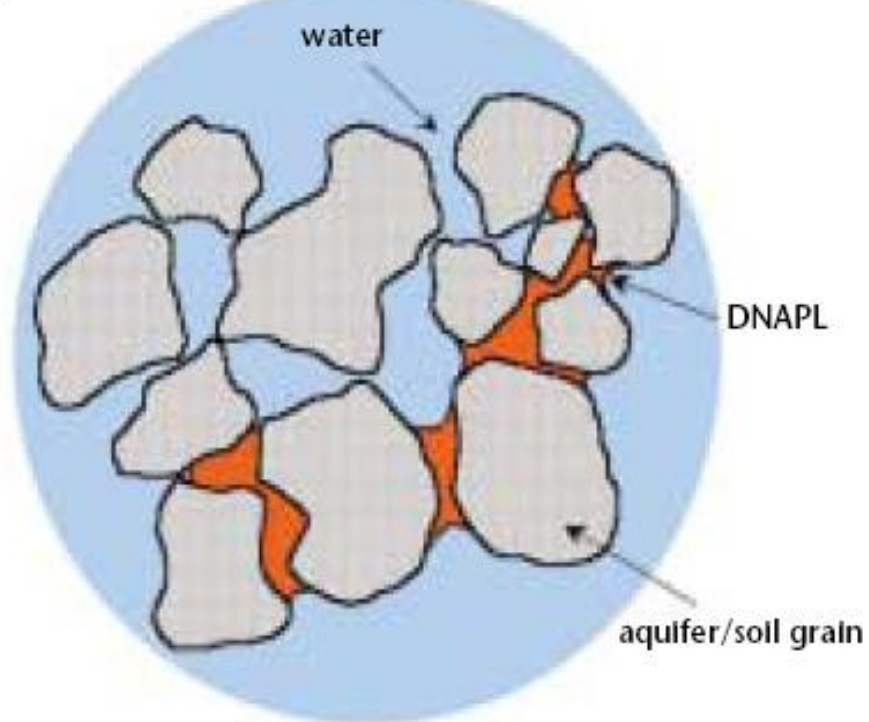
Vymytí povrchově aktivní látkou

# Rozdělení zbytkového znečištění

(a) **Nenasycená zóna**

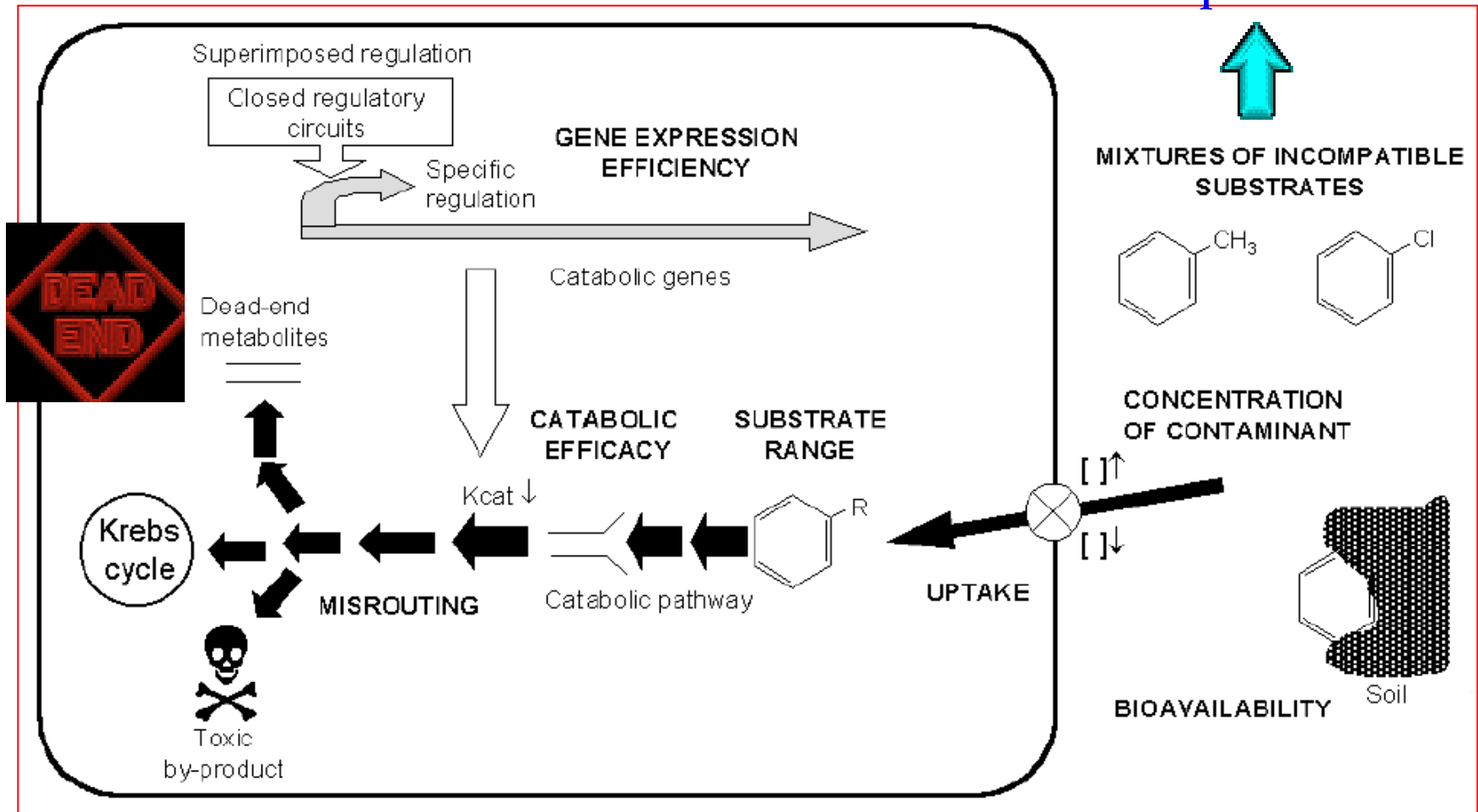


(b) **Saturovaná zóna**



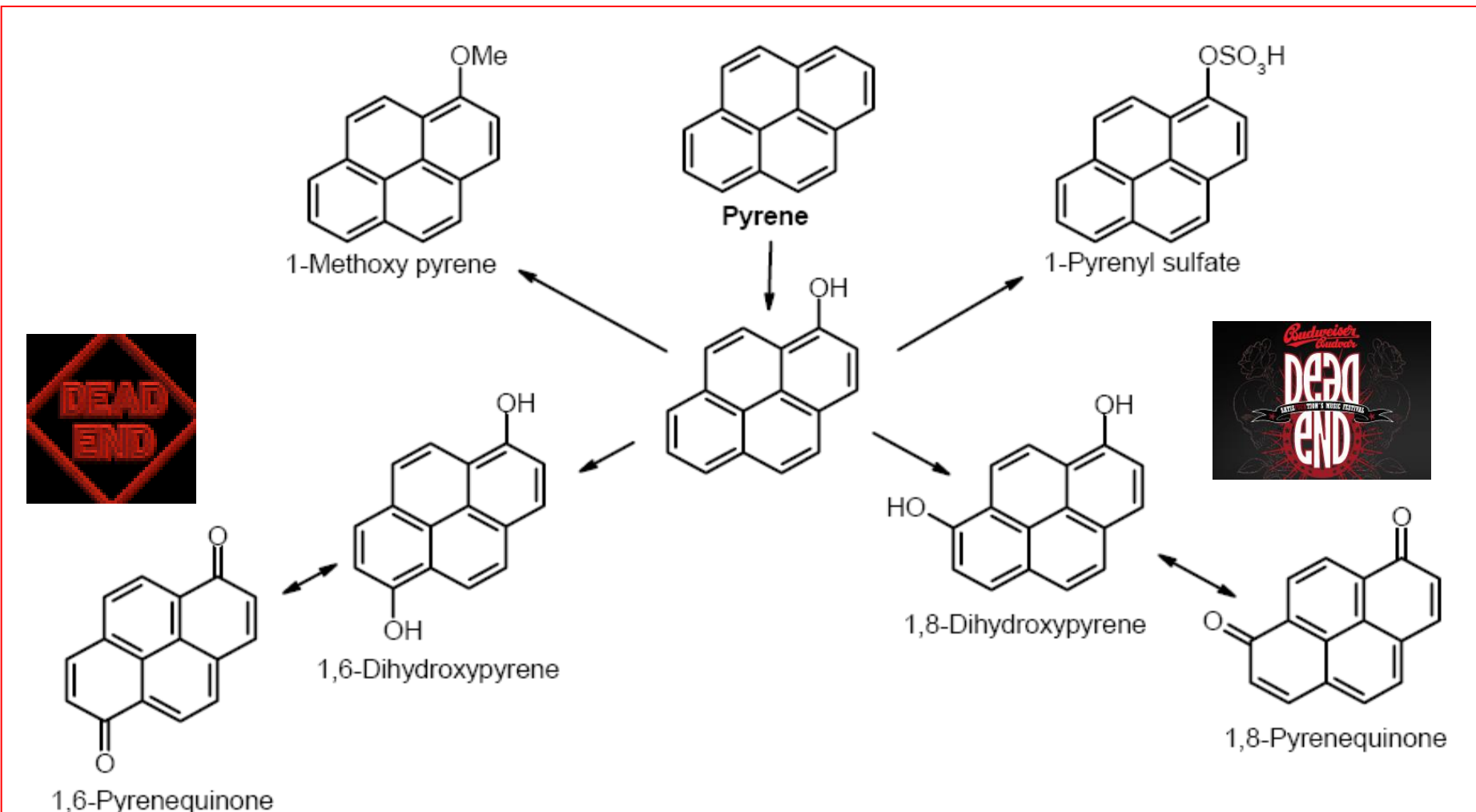
# Souhrn omezujících faktorů

Galaktosa a glukosa  
pro *E. coli*



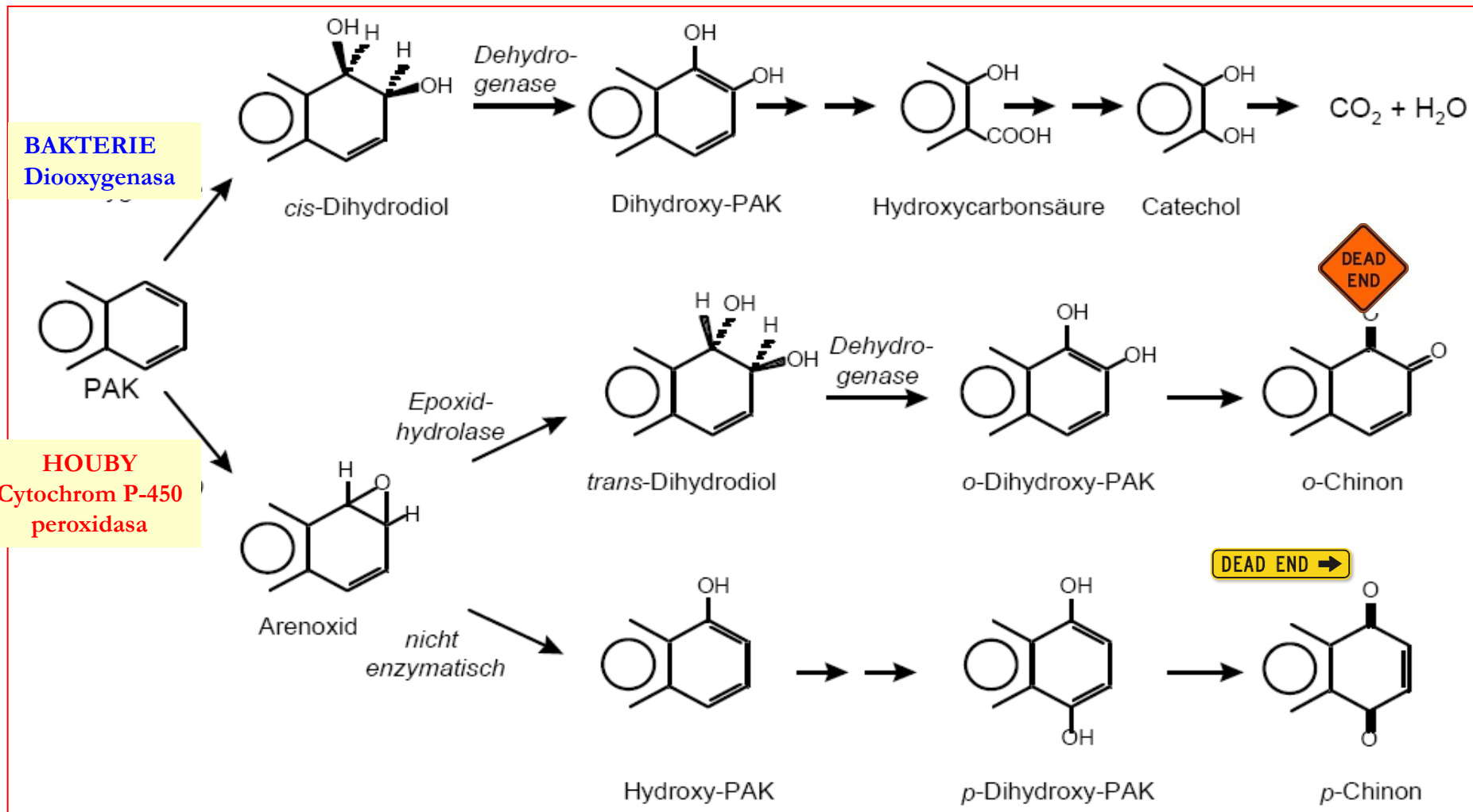


# Dead-end produkty pyrenu - houby





# Odbourávání PAHs



# Důsledky tvorby dead-end produktů

## 1. PROBLÉM

- ↪ Stanovení PAHs po extrakci nepolárními rozpouštědly
- ↪ Biotransformační produkty jsou polární – nestanoví se, nastává pokles koncentrace PAHs - je to vyřešení problému ???

### Skutečnost

- ↪ Biotransformační produkty a dead-end produkty jsou ve vodě mnohem rozpustnější a tedy mobilnější, jsou však často i toxičtější než původní PAHs, takže zemina se sníženou koncentrací PAHs po biodegradaci je z hlediska životního prostředí mnohem škodlivější, má podstatně vyšší ekotoxicitu a genotoxicitu

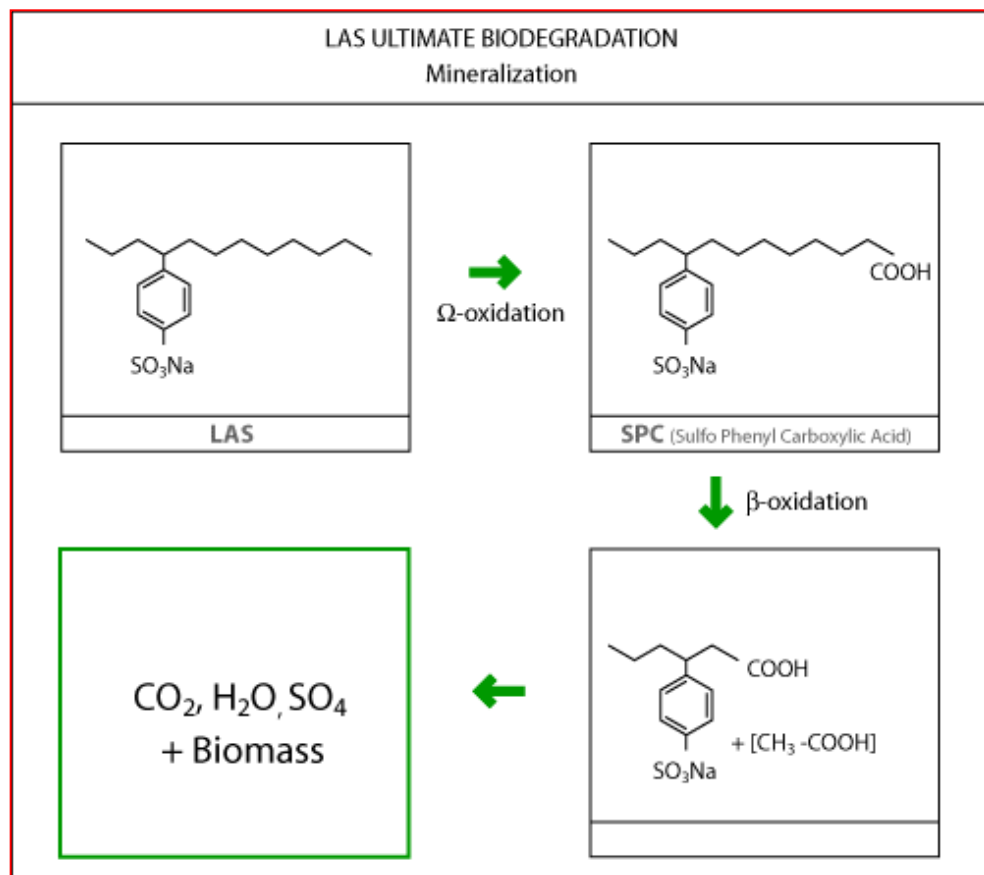
# Důsledky tvorby dead-end produktů

## 2. PROBLÉM

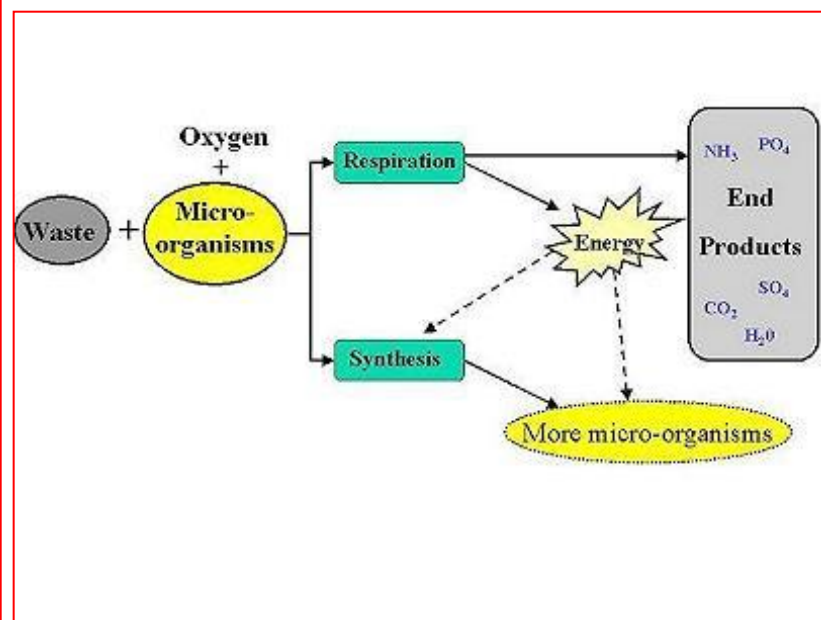
- ↪ **Heterocyklické sloučeniny podléhají rovněž biotransformaci – vznikají toxičtější produkty**
- ↪ **Pentachlorfenol tvoří v technické směsi jen 30 až 35 %, jsou tedy přítomny další kongenery – ale ty se nesledují (analyticky)**
- ↪ **Vedlejší produkt z chlorace fenolu – polychlorované dioxiny!!!!**

# Biotransformace místo biodegradace

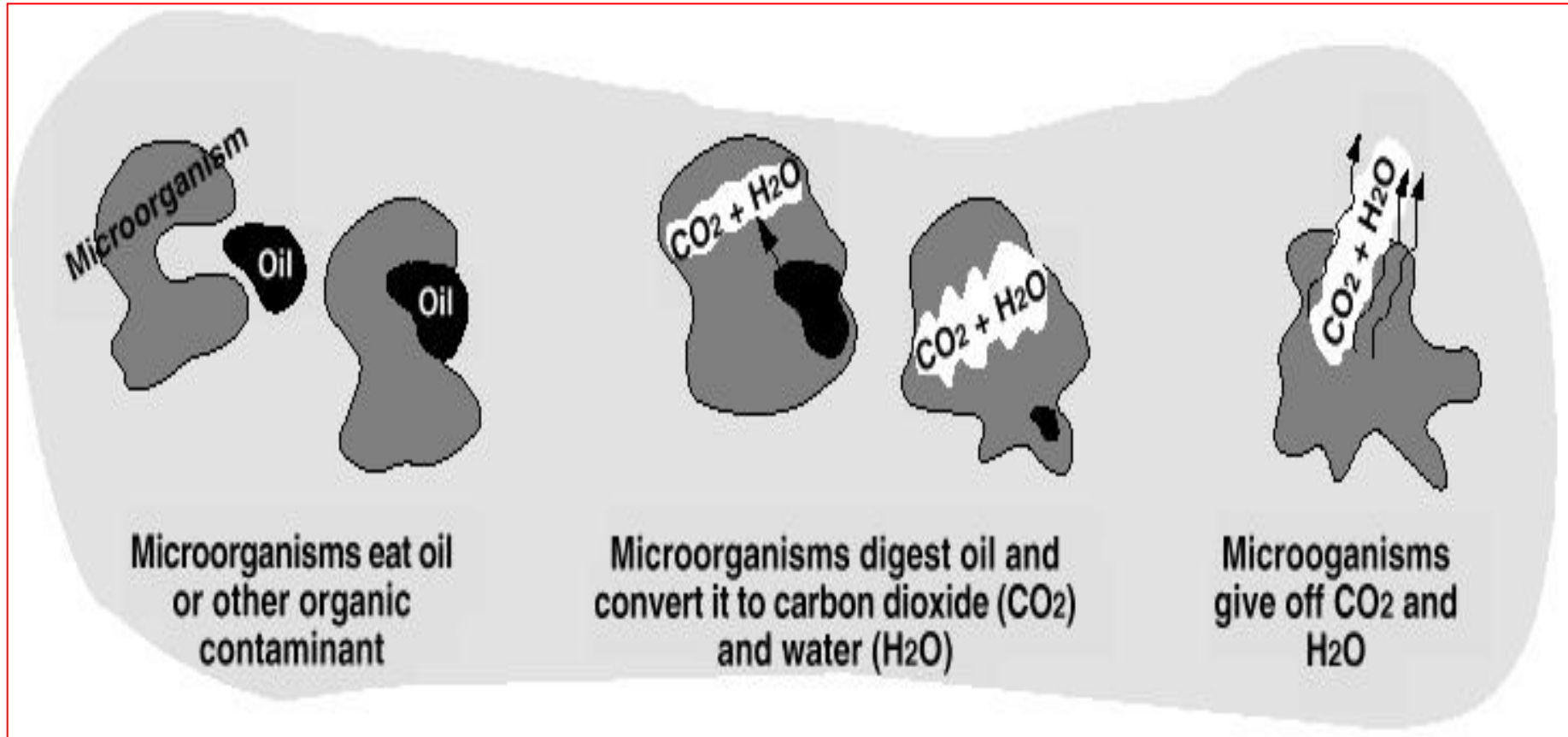
↪ Často se stává, že rozklad polutantu není totální (nenastává mineralizace)



## Lineární alkylsulfonáty



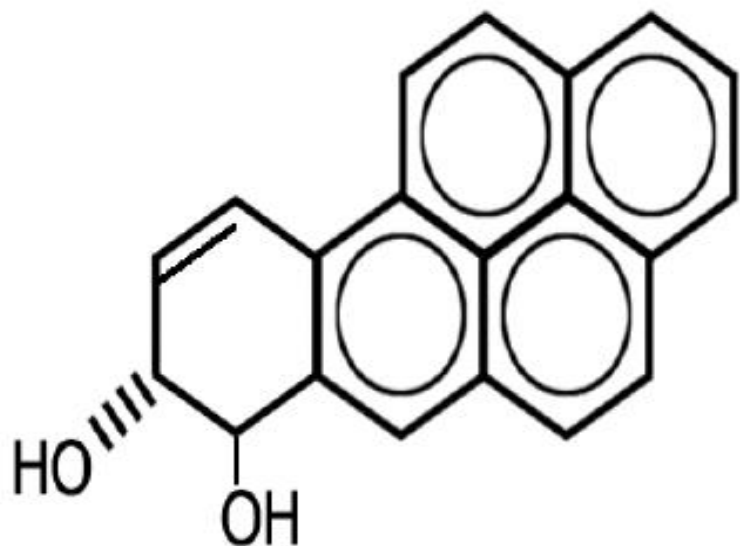
# Biotransformace místo biodegradace



# Biotransformace místo biodegradace

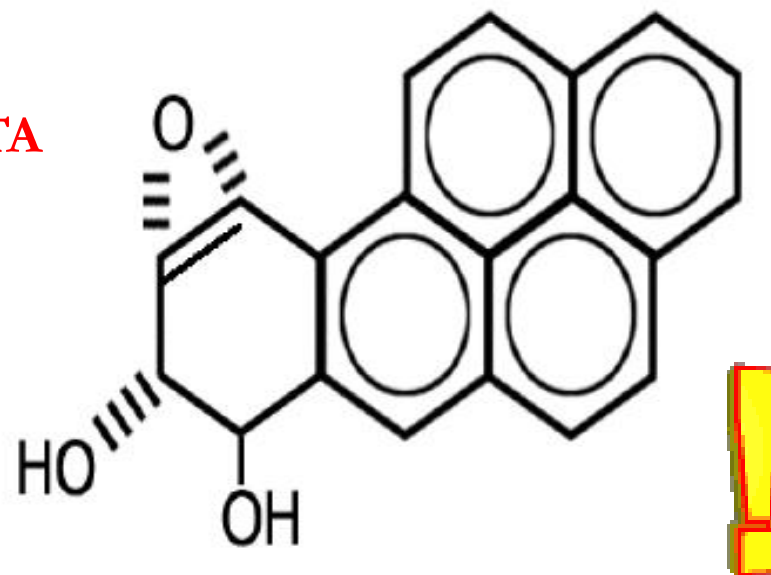
- ↪ **Nedochází k rozkladu až na H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, k tvorbě biomasy a energie.**
- ↪ **Dochází jen k biotransformaci molekul polutantu na nové sloučeniny, které jsou buď dead-end produkty, nebo nemohou být dále rozkládány vzhledem k podmínkám v prostředí**
- ↪ **Tyto meziprodukty mohou mít mnohem nepříznivější vlastnosti pro životní prostředí než původní polutanty**

# Biotransformace místo biodegradace



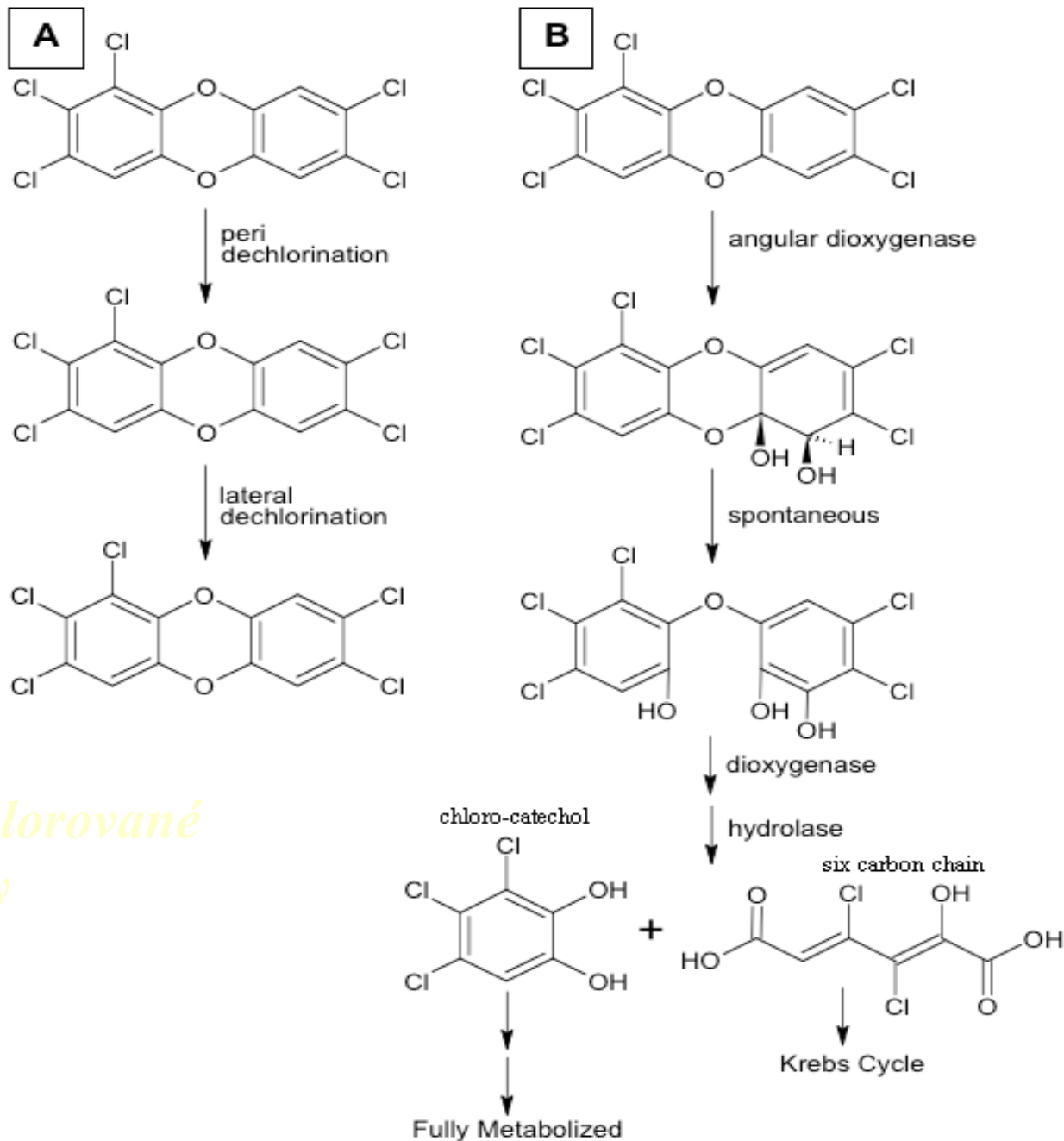
*Benzo[a]pyrene  
7,8-dihydrodiol*

TOXICITA



*Benzo[a]pyrene 7,8-  
dihydrodiol-9,10-epoxide*

# Polychlorované dioxiny





# Biotransformace místo biodegradace

**Biotransformace může způsobit:**

- 1) Vyšší toxicitu
- 2) Endokrinní disrupci
- 3) Mutagenitu
- 4) Další negativní vlastnosti podle druhu vzniklého metabolitu
- 5) Zvýšit polaritu a mobilitu v horninovém prostředí

# Bioremediace – co musíme znát ???

- ↪ Z pohledu degradované látky či spíše směsi látek
- ↪ Z pohledů využívaných mikroorganismů
- ↪ Z pohledu prostředí, ve kterém se má proces realizovat

# Bioremediace – co musíme znát ???

**Z pohledu degradované látky či spíše směsi látek:**

- ↪ **Strukturu zájmové látky či směsi látek**
- ↪ **Fyzikálně-chemické vlastnosti – persistenci/reaktivitu, rozpustnost, těkavost, tendenci ke kumulaci v abiotickém prostředí a potenciál pro bioakumulaci**
- ↪ **Její/jejich koncentrace**
- ↪ **Produkty degradace a jejich vlastnosti**
- ↪ **Biodostupnost v daném prostředí**

# Bioremediace – co musíme znát ???

## Z pohledů využívaných mikroorganismů

- ↪ Jejich schopnost degradovat danou látku či směs látek
- ↪ Životní optimální podmínky – živiny, vlhkost, pH, kyslík
- ↪ Přítomnost látek toxických pro používané mikroorganismy nebo jejich konsorcia

# Bioremediace – co musíme znát ???

Z pohledu prostředí, ve kterém se má proces realizovat

- ↪ Sorpční schopnosti – ovlivnění biodostupnosti
- ↪ Fyzikálně-chemické vlastnosti
- ↪ Mechanické vlastnosti
- ↪ Toxicita prostředí

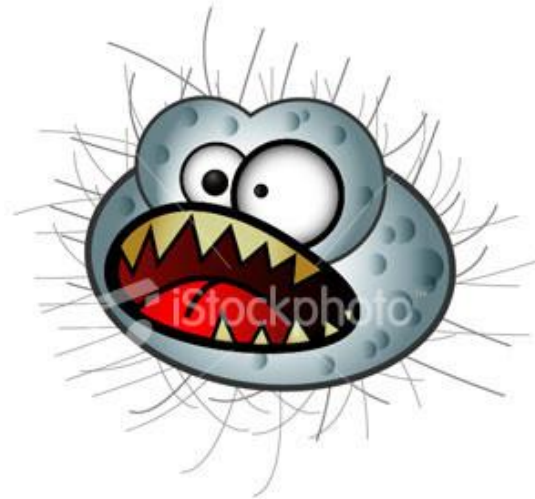
# Zásady pro využívání mikrobiálních technologií

- ↪ Mikroorganismy pro nás nepracují proto, že my chceme, ale proto, že jim to přináší různé výhody, především energii pro množení a tvorbu biomasy a pro nezbytné fyziologické pochody
- ↪ Pokud jim zlepšíme podmínky v prostředí, pracují o to lépe.

Vít Matějů

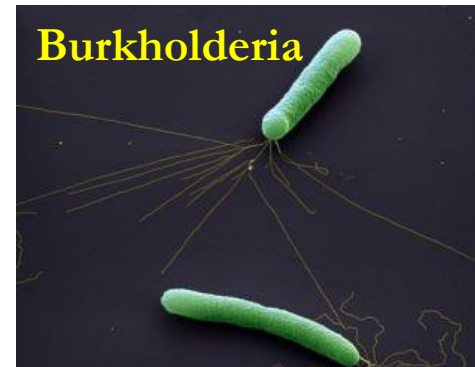
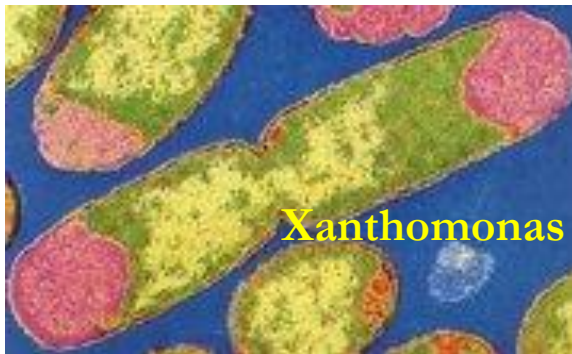
# Bakterie využívané při sanacích

- ↪ Pseudomonas sp.
- ↪ Burkholderia sp.
- ↪ Xanthomonas sp.
- ↪ Acinetobacter sp.
- ↪ Micrococcus sp.
- ↪ Rhodococcus sp.
- ↪ Ralstonia metallidurans
- ↪ Deinococcus radiodurans
- ↪ Arthrobacter sp.
- ↪ Sphingomonas aromaticivorans
- ↪ Nocardia sp.
- ↪ Comamonas sp.



Vít Matějů

# Bakterie využívané při sanacích



Bakterie rodů *Xanthomonas* sp. a *Burkholderia* sp. jsou schopné využívat > 100 chemických sloučenin jako substrát.

*Rhodococcus* sp. – lipofilní složky buněčné stěny (peptydoglykan) usnadňují transport lipofilních polutantů do buňky. Vytvářejí biosurfaktant. Jsou schopné velkého množství metabolismů.



Vít Matějů

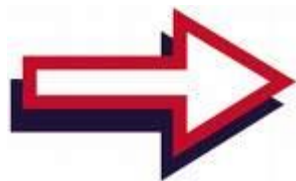


# Mikrobiální sanace

Pro **biologickou sanaci** se jen výjimečně využívá jediný bakteriální kmen.

Prakticky vždy se jedná o **vznik bakteriálního konsorcia**, které je vytvořeno vnesenými aktivními kmeny a kmeny vzniklými pod selekčním tlakem kontaminace v prostředí.

Mikrobiální konsorcium  
dehalogenující  
tetrachlorethan



Vít Matějů

# Biodegradability Test Methods

## 1) Screening Level Methods

- ↪ determine inherent & ready biodegradability
- ↪ applicable mainly to sewage and soils
- ↪ unrealistically high ratio of test substances to biomass
- ↪ non-specific (indirect) detection methods
- ↪ used for registering new chemicals in Europe & Japan

## 2) Realistic Methods

- ↪ determine ultimate & practical biodegradability (kinetics)
- ↪ applicable to all relevant environmental compartments
- ↪ realistic ratio test substance to biomass
- ↪ utilize radiolabeled test substances
- ↪ specific detection methods

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Ready tests

Highly standardized batch systems

Low level of inoculum (no pre-exposure)

High test substance concentration (risk for toxicity)

Test material is sole carbon & energy source

Non-specific analytical methods

- ↙ Oxygen consumption (indirect)
- ↙ DOC disappearance
- ↙ CO<sub>2</sub> evolution

Pass Criteria

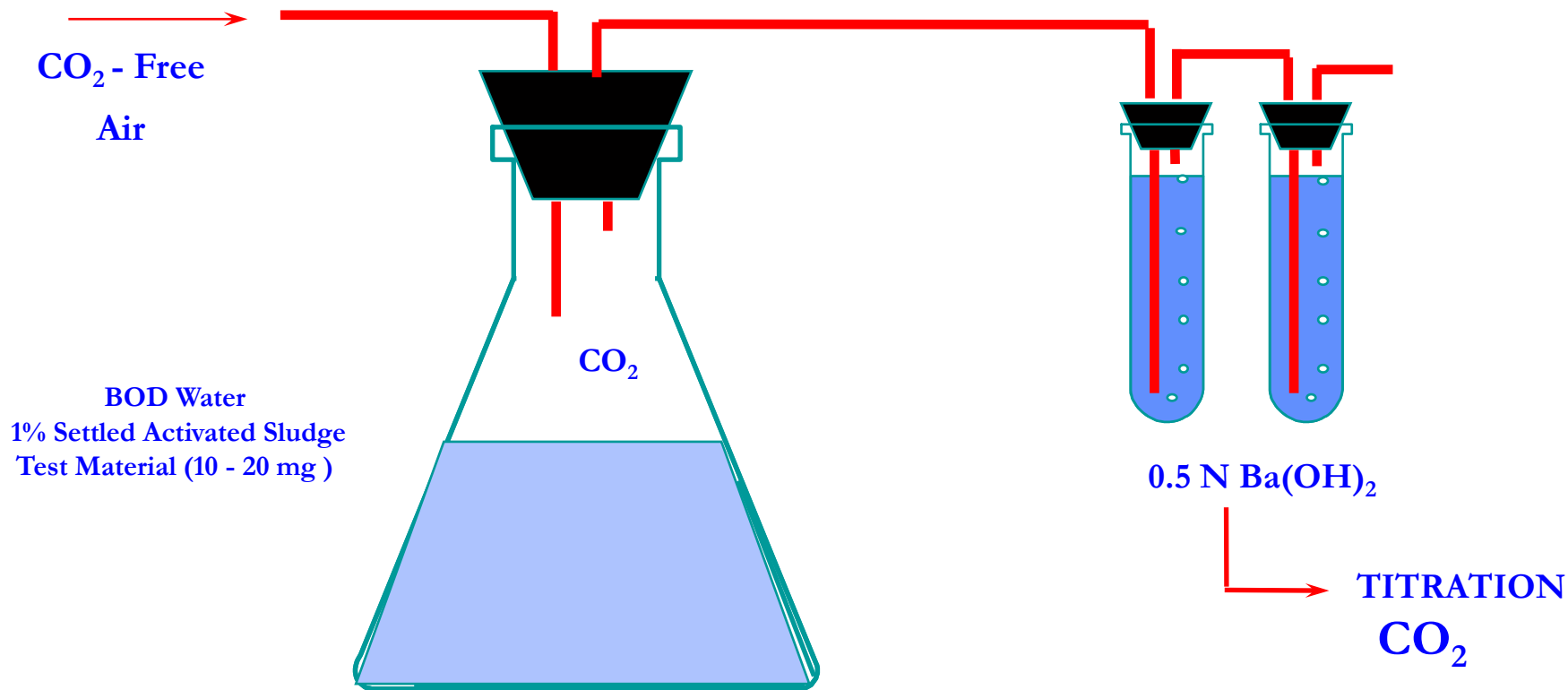
- ↙ DOC Loss exceeding 70% in 28 days or
- ↙ Oxygen consumption or CO<sub>2</sub> evolution exceeding 60% in 28 days

And these levels must be reached within 10 days of biodegradation exceeding 10% (Ten day Window)

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Ready Test



$$\% \text{ Mineralized} = \frac{\text{CO}_2 \text{ Test} - \text{CO}_2 \text{ Blank}}{\text{ThCO}_2} \times 100$$

\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Realistic radiolabeled ( $^{14}\text{C}$ , $^3\text{H}$ and $^{35}\text{S}$ ) testing – design considerations

- ↪ Based upon known chemistry, test the chemical species most likely to enter the environment
- ↪ Based upon known physical/chemical properties, test in the compartments in which the material will most likely reside e.g. most relevant compartment for slow-degrading, sorptive polymer = soil
- ↪ Dose the chemical in a relevant environmental form
- ↪ Choose test concentrations based upon likely environmental concentrations estimated from usage information and modeling
- ↪ Position the radiolabel in the portion of the molecule most resistant to biodegradation.

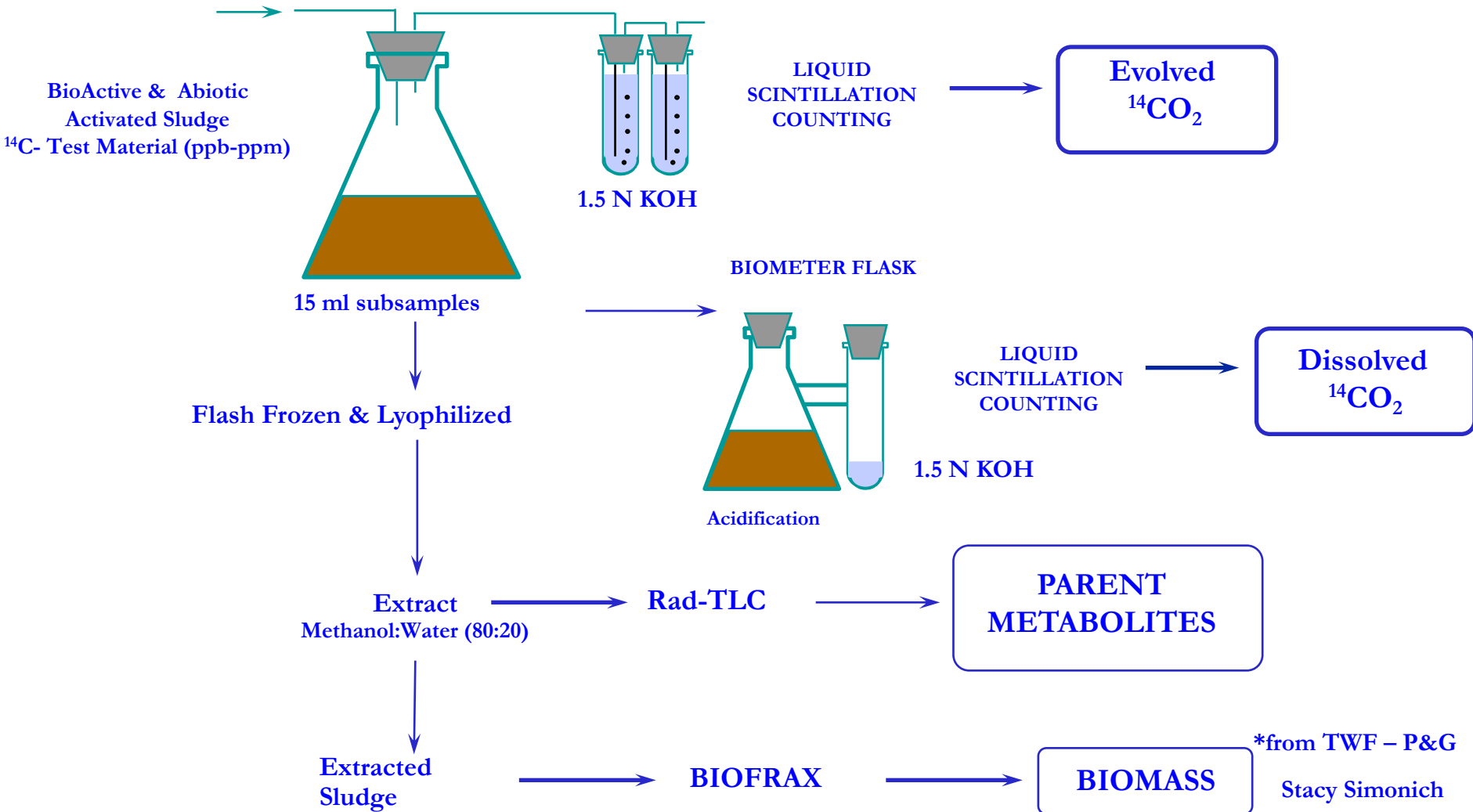
AES (Alkyl Ethoxylate Sulfate)  $\text{C}_{14}\text{E}_3\text{S}$



\*from TWF – P&G

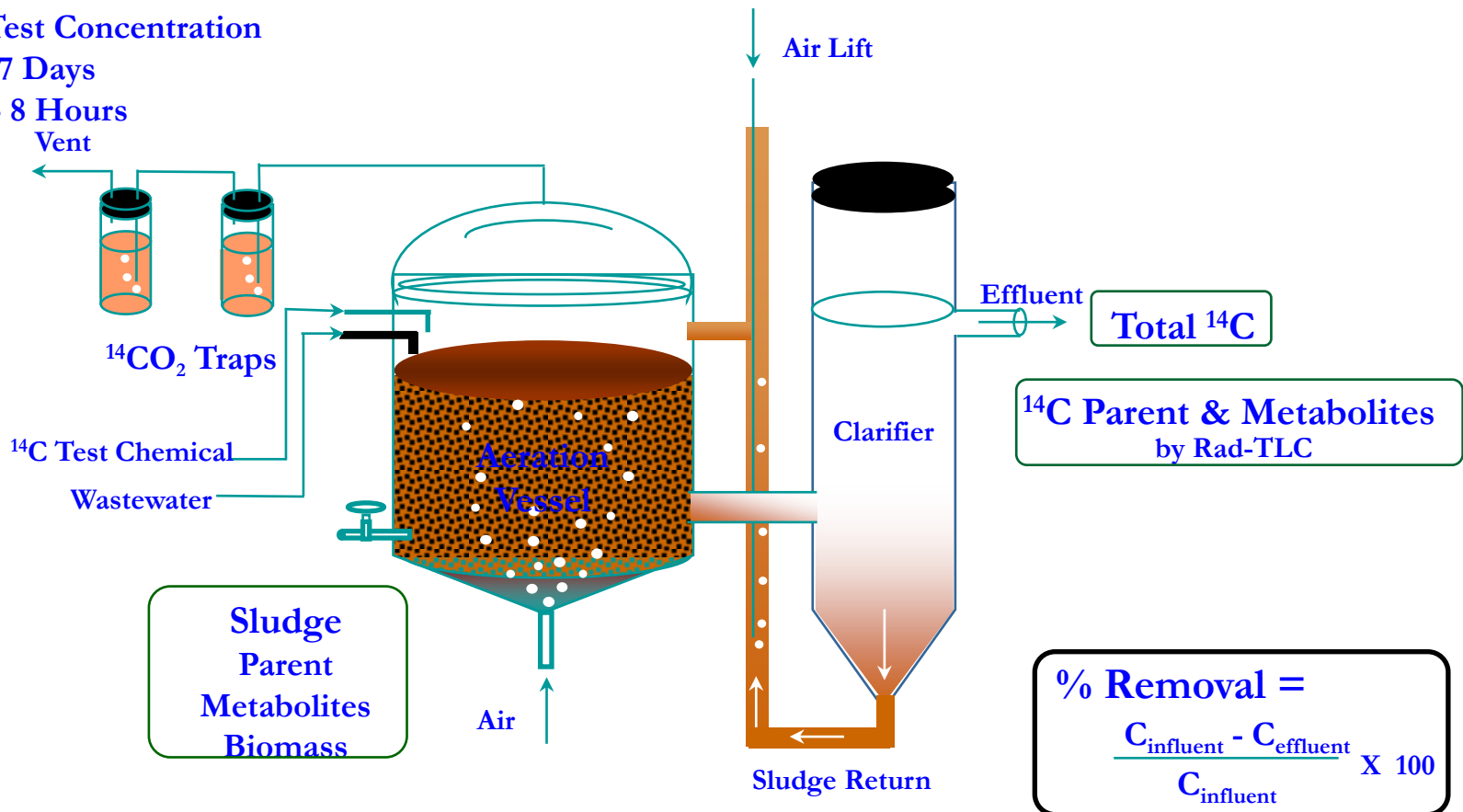
Stacy Simonich

# Activated sludge die-away test



# Continuous Activated Sludge System

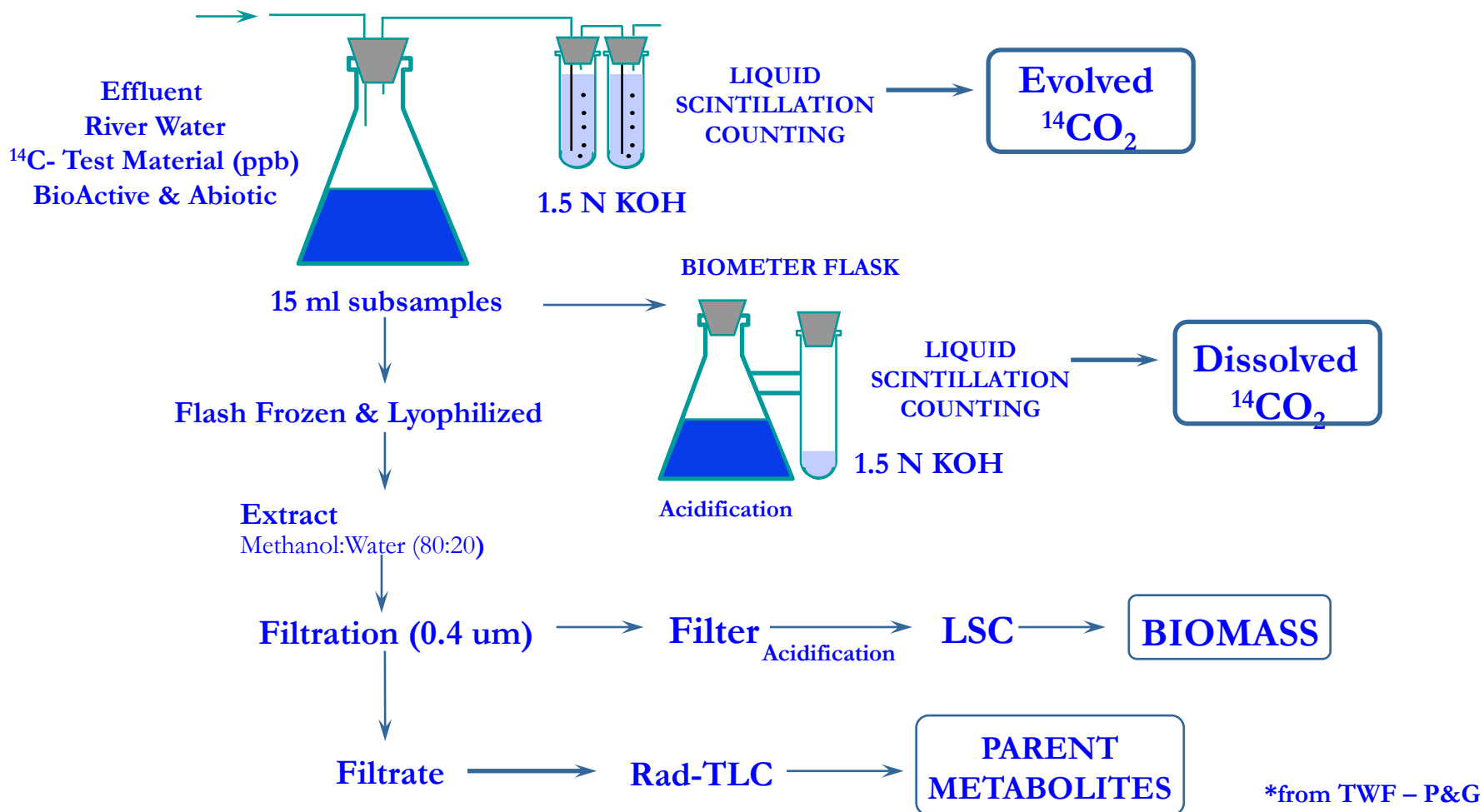
- Realistic Test Concentration
- SRT = 5 - 7 Days
- HRT = 6 - 8 Hours



\*from TWF – P&G

Stacy Simonich

# Effluent in river water die-away test



Stacy Simonich



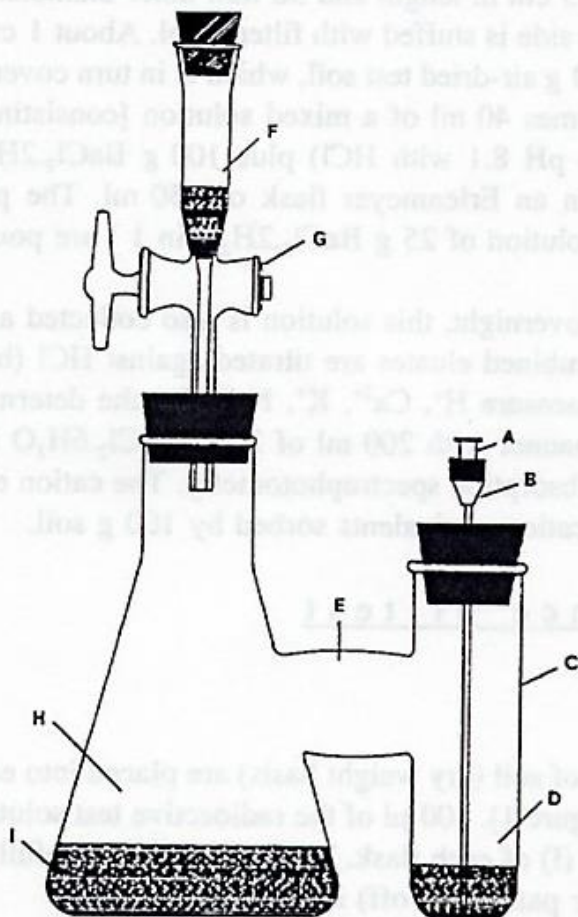
# Converting Biodegradation Test Data to Rate Constants

- ↗ If chemical passes Ready Test (including 10-day window) - assume rate constant =  $1 \text{ hr}^{-1}$
- ↗ If chemical passes Ready Test (but not 10-day window) - assume rate constant =  $0.3 \text{ hr}^{-1}$
- ↗ If chemical passes an inherently biodegradable test - assume rate constant =  $0.1 \text{ hr}^{-1}$
- ↗ If chemical biodegrades in a realistic test at realistic concentrations ( $^{14}\text{C}$ ) - use measured rate constant

Stacy Simonich

# Biodegradability Test for Soil

- ↪ OECD 304A – Inherent Biodegradability in Soil
- ↪ Evaluation of mineralization rate of a  $^{14}\text{C}$  labeled compound in soil
- ↪ 50 g soil sample spiked with  $^{14}\text{C}$  compound and mixed, experiment run up to 64 days
- ↪  $^{14}\text{CO}_2$  trapped in alkali solution
- ↪ If compound vapor pressure  $> 0.0133$  Pa polyurethane foam used to trap volatilized compound
- ↪  $^{14}\text{CO}_2$  evolution measured over time



Stacy Simonich

# Estimating Probability of Biodegradation – BIOWIN

- ↪ Estimates probability of rapid biodegradation
- ↪ **Training set** = 295 chemicals, 186 classified as “biodegrades rapidly” (dependent variable = 1) and 109 classified as “does not biodegrade rapidly” (dependent variable = 0)
- ↪ **Probability  $\geq 0.5$**  then biodegrades fast; probability  $< 0.5$  does not biodegrade fast
- ↪ **Multiple linear and nonlinear regressions** of dependent variables against 37 independent variables (36 structural fragments + molecular weight):

$$Y_j = a_0 + a_1f_1 + a_2f_2 + \dots + a_{36}f_{36} + a_mM_w + e_j$$

$$Y_j = \frac{\exp(a_0 + a_1f_1 + a_2f_2 + \dots + a_{36}f_{36} + a_mM_w)}{1 + \exp(a_0 + a_1f_1 + a_2f_2 + \dots + a_{36}f_{36} + a_mM_w)}$$

Stacy Simonich

# BIOWIN Structural Fragments and Coefficients

fragment or parameter	BIODEG models			survey models		
	freq <sup>a</sup>	linear coeff	nonlinear coeff	freq <sup>a</sup>	primary coeff	ultimate coeff
equation constant		0.748	3.01		3.848	3.199
$M_w$	295	-0.000476	-0.0142	200	-0.00144	-0.00221
unsubstituted aromatic ( $\leq 3$ rings)	2	0.319	7.191	1	-0.343	-0.586
phosphate ester	5	0.314	44.409	6	0.465	0.154
cyanide/nitrile (C $\equiv$ N)	5	0.307	4.644	11	-0.065	-0.082
aldehyde (CHO)	4	0.285	7.180	5	0.197	0.022
amide (C(=O)N or C(=S)N)	9	0.210	2.691	13	0.205	-0.054
aromatic (C(=O)OH)	24	0.177	2.422	6	0.0078	0.088
ester (C(=O)OC)	23	0.174	4.080	25	0.229	0.140
aliphatic OH	34	0.159	1.118	18	0.129	0.160
aliphatic NH <sub>2</sub> or NH	13	0.154	1.110	7	0.043	0.024
aromatic ether	11	0.132	2.248	11	0.077	-0.058
unsubstituted phenyl group (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	25	0.128	1.799	22	0.0049	0.022
aromatic OH	46	0.116	0.909	21	0.040	0.056
linear C4 terminal alkyl (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	44	0.108	1.844	26	0.269	0.298
aliphatic sulfonic acid or salt	4	0.108	6.833	4	0.177	0.193
carbamate	4	0.080	1.009	6	0.194	-0.047
aliphatic (C(=O)OH)	33	0.073	0.643	10	0.386	0.365
alkyl substituent on aromatic ring	36	0.055	0.577	36	-0.069	-0.075
triazine ring	5	0.0095	-5.725	4	-0.058	-0.246
ketone (CC(=O)C)	12	0.0068	-0.453	10	-0.022	-0.023
aromatic F	1	-0.810	-10.532	1	0.135	-0.407
aromatic I	2	-0.759	-10.003	2	-0.127	-0.045
polycyclic aromatic hydrocarbon ( $\geq 4$ rings)	6	-0.657	-10.164	2	-0.702	-0.799
N-nitroso (NN=O)	4	-0.525	-3.259	1	0.019	-0.385
trifluoromethyl (CF <sub>3</sub> )	1	-0.520	-5.670	2	-0.274	-0.513
aliphatic ether	11	-0.347	-3.429	16	-0.0097	-0.0087
aromatic NO <sub>2</sub>	14	-0.305	-2.509	13	-0.108	-0.170
azo group (N=N)	2	-0.242	-8.219	3	-0.053	-0.300
aromatic NH <sub>2</sub> or NH	32	-0.234	-1.907	23	-0.108	-0.135
aromatic sulfonic acid or salt	11	-0.224	-1.028	8	0.022	0.142
tertiary amine	10	-0.205	-2.223	10	-0.288	-0.255
carbon with 4 single bonds and no H	9	-0.184	-1.723	32	-0.153	-0.212
aromatic Cl	40	-0.182	-2.016	27	-0.165	-0.207
pyridine ring	18	-0.155	-1.638	8	-0.019	-0.214
aliphatic Cl	12	-0.111	-1.853	14	-0.101	-0.173
aromatic Br	5	-0.110	-1.678	4	-0.154	-0.136
aliphatic Br	5	-0.046	-4.443	2	0.035	0.029

<sup>a</sup> Number of compounds in the training set containing the fragment.

Stacy Simonich

# Biotransformace

Organismy v prostředí jsou v kontaktu s řadou látek, jež mohou mít potenciálně škodlivé účinky.

Řada těchto látek je přijímána organismy.

Vyšší koncentrace určitých látek v organismu mohou ovlivňovat jeho funkce.

**Organismus má dvě cesty pro eliminaci látek:**

- ↪ látka je vyloučena v nezměněné podobě
- ↪ látka je v organismu transformována a v této změněné podobě je vylučována – **biotransformace**

Biotransformace ovlivňuje osud látky snížením jejího množství konverzí na nový typ xenobiotika – metabolit.

# Biotransformace

**Biotransformace** může být definována jako enzymaticky katalyzovaná konverze jedné chemické látky (xenobiotické, odpadní produkty organismu) v jinou.

## Vlivy biotransformací na xenobiotika

Všeobecně – biotransformace vede ke konverzi rodičovské látky na ve vodě rozpustnější formu – hydrofilnější látka může být snadněji vyloučena z organismu než látka původní.

**Biotransformace** ovlivňuje také toxicitu látky:

- ↪ transformace na toxičtější formu – bioaktivace,
- ↪ snížení toxicity - detoxikace

# Mechanismy biotransformací xenobiotik v živých organismech

Prostředí

Xenobiotika v organismu

Superhydrofóbní

Hydrofóbní

Polární

Hydrofilní

Akumulace  
v tukové tkáni

Fáze I

Bioaktivace nebo detoxikace  
Oxidace, redukce, hydrolýza

Fáze II

Bioaktivace nebo detoxikace  
Konjugace

Vylučování



# Biotransformace

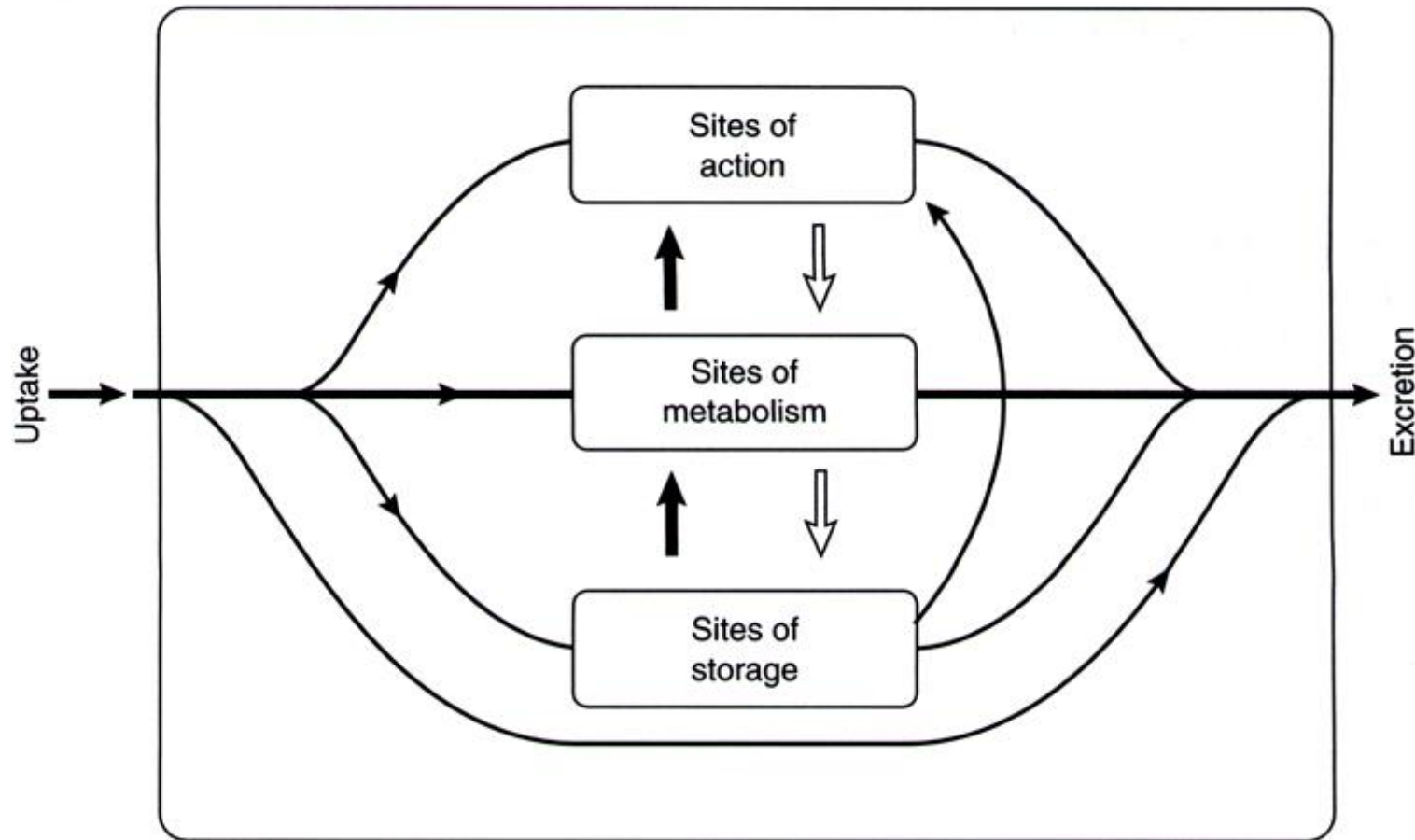


FIGURE 2.1 *Toxicokinetic model.*



# Biotransformace

## Typy biotransformačních reakcí

Dva typy:

**Fáze I - nesyntetické reakce** – hydrolýza, oxidace, redukce – molekuly látky jsou měněny zaváděním polárních skupin (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>) – **produkty jsou reaktivní látky snadno konjugující ve fázi II**

**Fáze II – syntetické reakce** – konjugace – tvorba glukuronidů, sulfátů, acetyl a glutathion konjugátů – **výsledkem je konjugovaný produkt schopný exkrece**

# Biotransformace

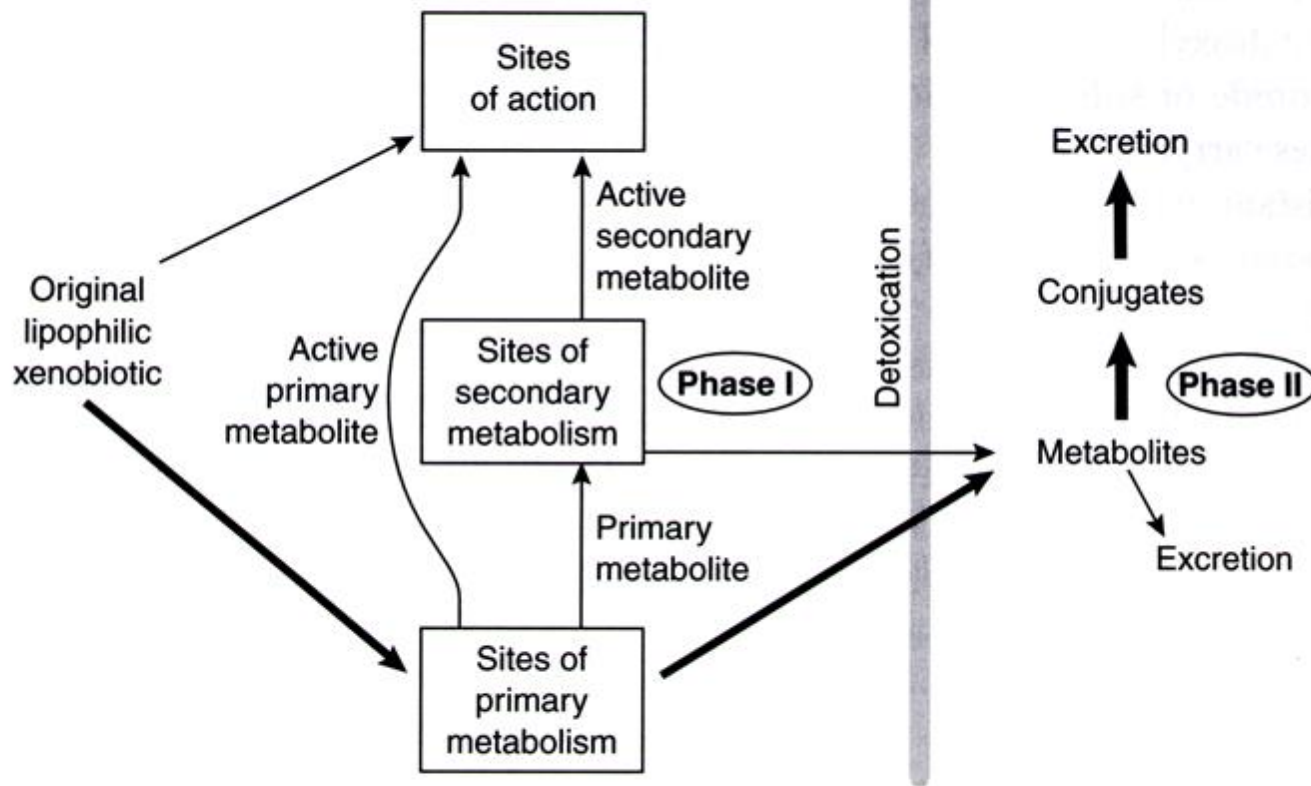


FIGURE 2.2 *Metabolism and toxicity.*

# Biotransformace

Probíhá v játrech

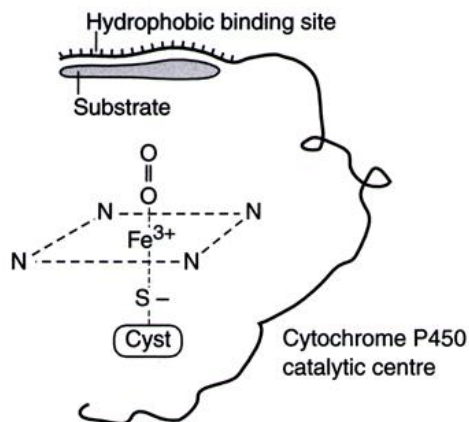
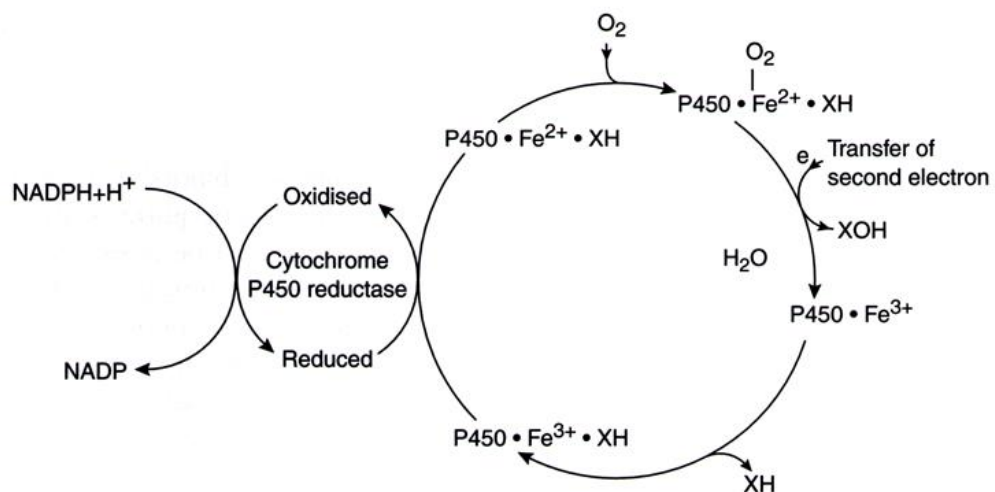


FIGURE 2.3 Oxidation by microsomal monooxygenases.

# Biotransformace

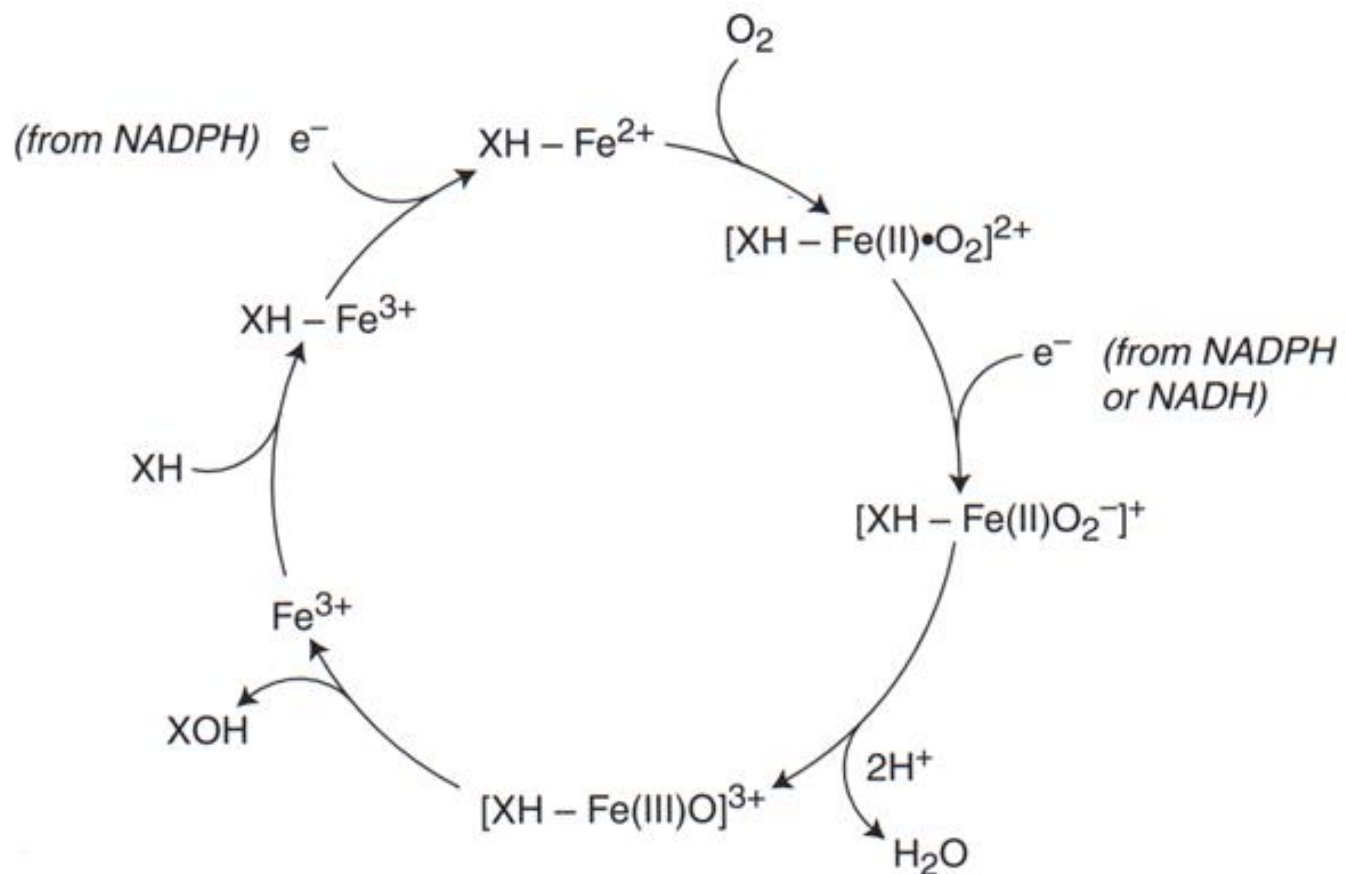


FIGURE 2.4 Proposed mechanism for monooxygenation by cytochrome P450.

# Biotransformace

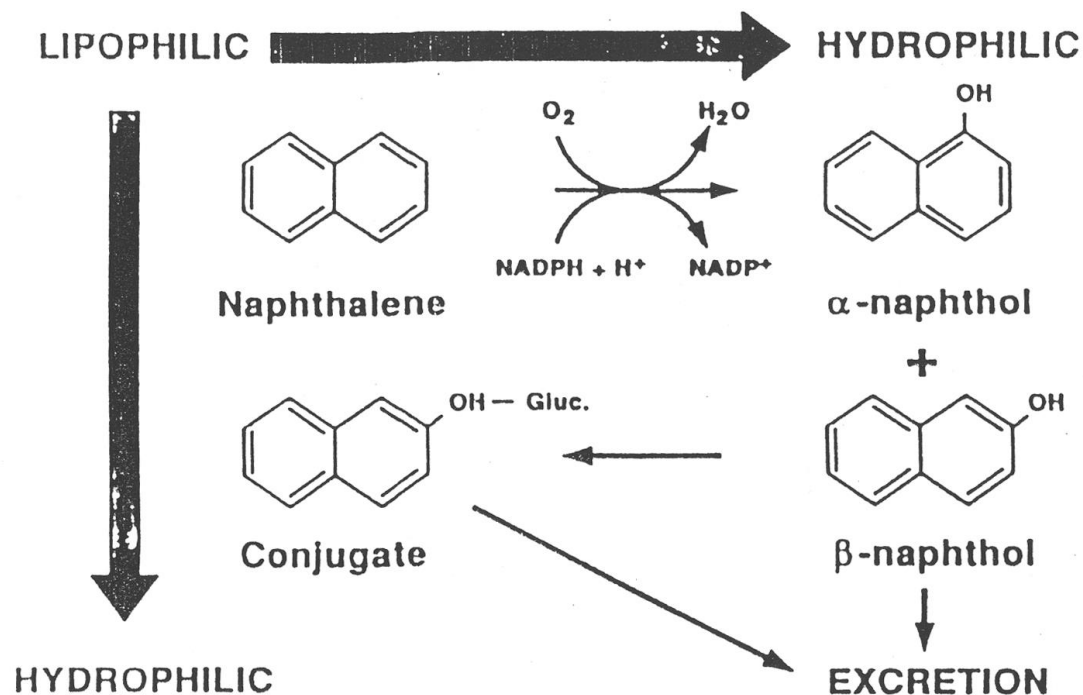
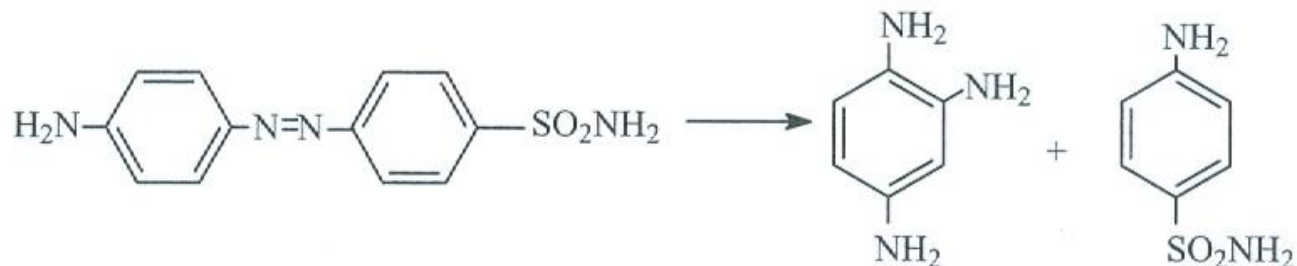


Figure 1. The cytochrome P-450 mixed function oxidase system facilitates excretion of lipophilic organic substrates in terrestrial and aquatic animals by producing metabolites that are more water soluble than the parent compound. Common metabolites of naphthalene are shown (after 2).

# Typy biodegradačních reakcí

## REDUCTION



## HYDROLYSIS

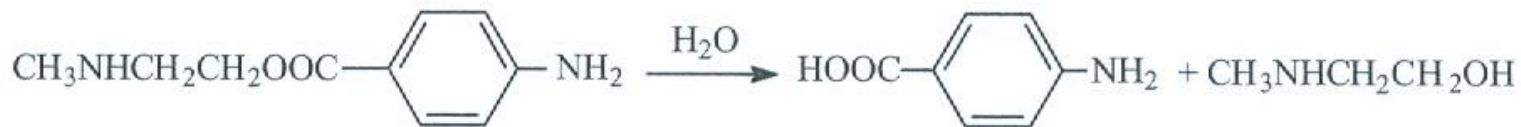


FIGURE 9.28. Examples of Phase I biotransformation reactions.

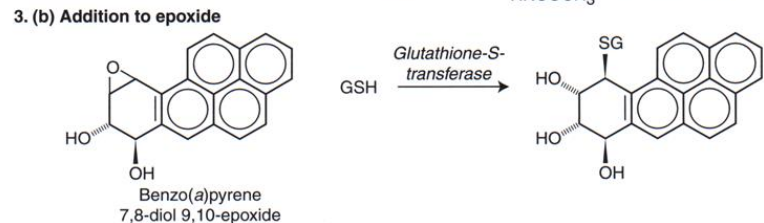
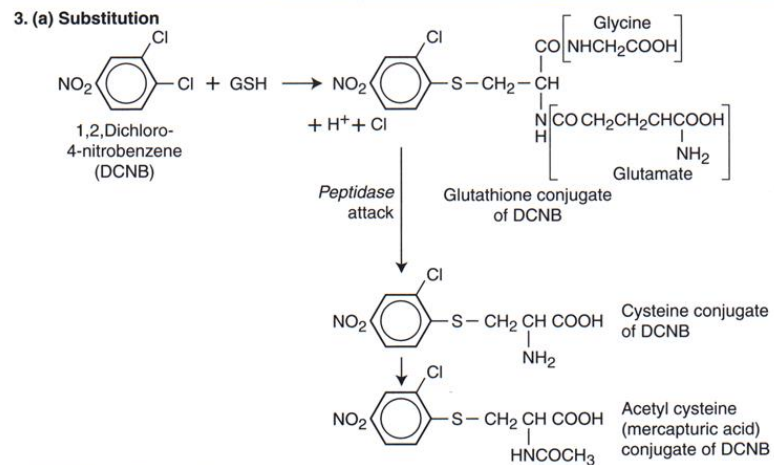
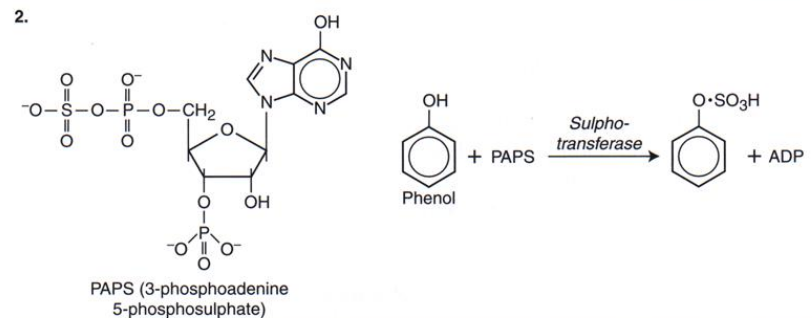
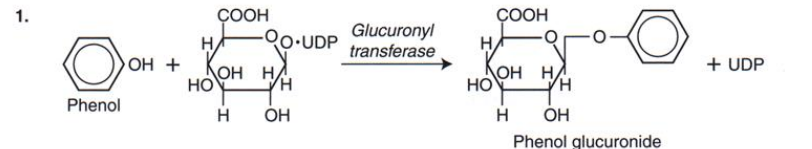


FIGURE 2.14 Phase II biotransformation—conjugation. 1. Glucuronide formation. 2. Sulphate formation. 3. Glutathione conjugation.



# Biotransformace

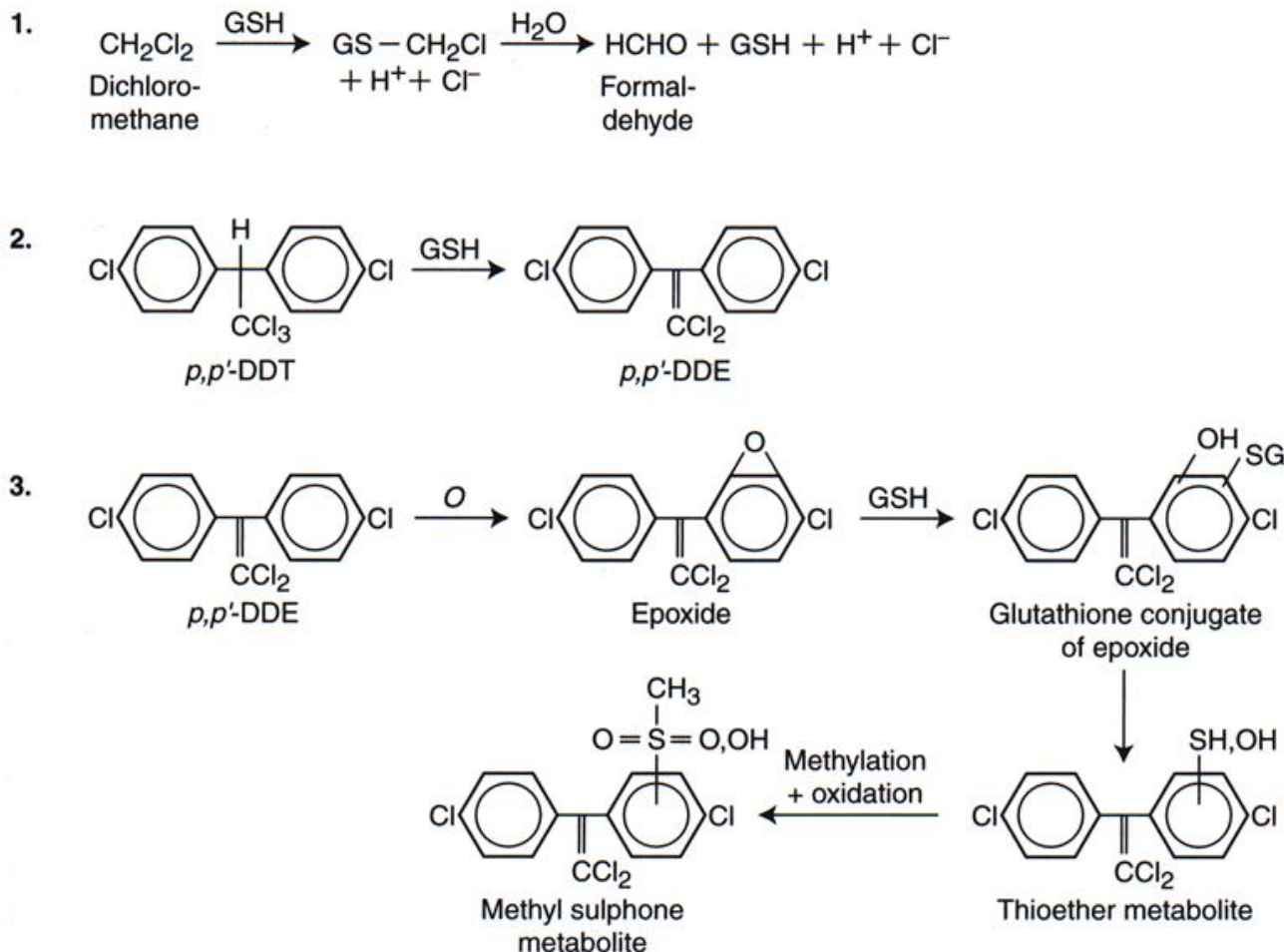


FIGURE 2.15 *Glutathione-S-transferase attack on organochlorine compounds.*



# Typy biodegradčních reakcí

## CONJUGATION

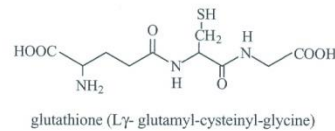
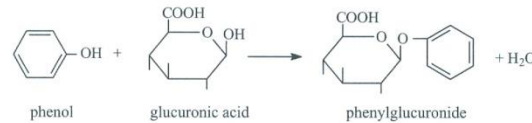
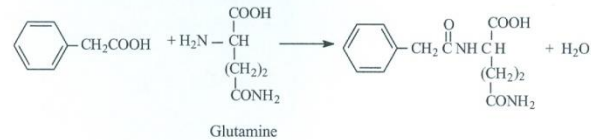


FIGURE 9.29. Examples of Phase II biotransformation reactions.

# Biotransformace

