

# INTEGRÁCIA NANOREMEDIÁCIE A BIOREMEDIÁCIE NA DEKONTAMINÁCIU POLYCHLÓROVANÝCH BIFENYLOV



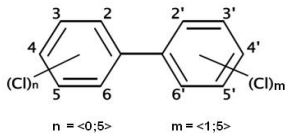
**Katarína Dercová, Hana Horváthová**

Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej  
technológie



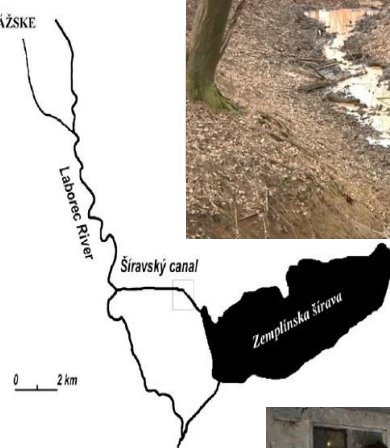
Slovenská technická univerzita Bratislava

# PCB



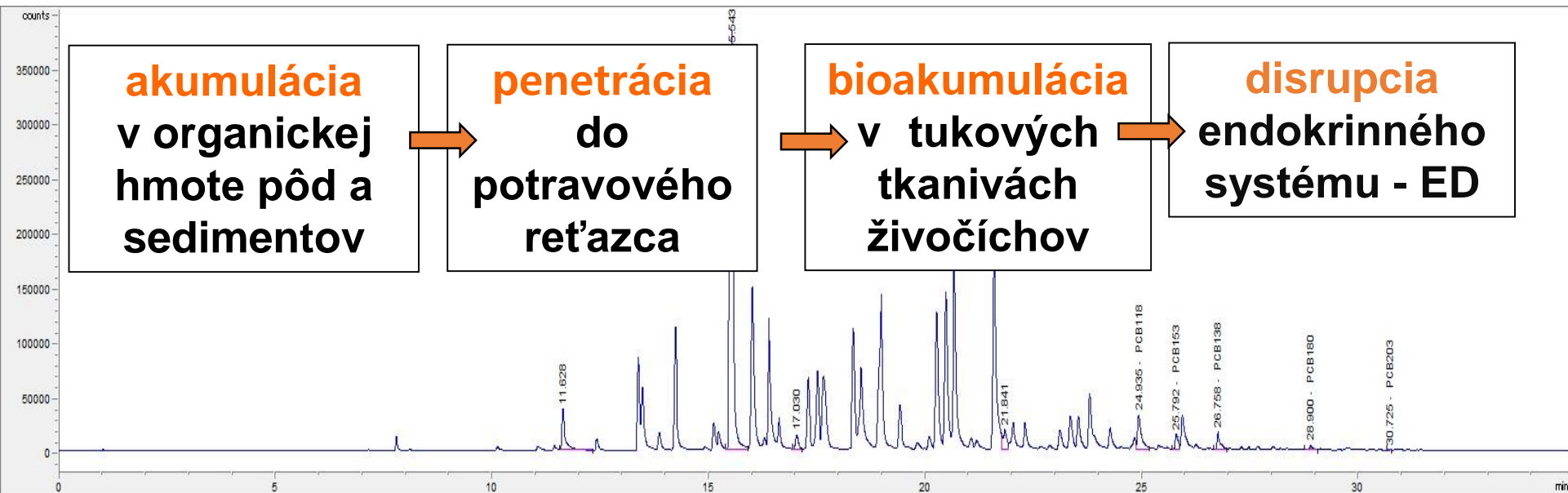
## (polychlórované bifenyly)

STRÁŽSKE



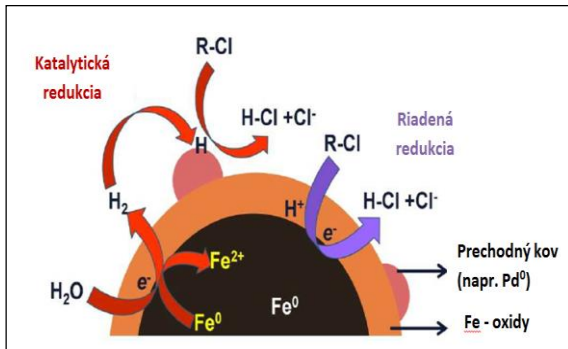
- Chemko Strážske (1956 – 1984)
- **Delor 103** (zmes 60 kongenérov PCB)
- kontaminácia ekosystému

- hydrofóbne, bioakumulatívne, toxické, ťažko rozložiteľné



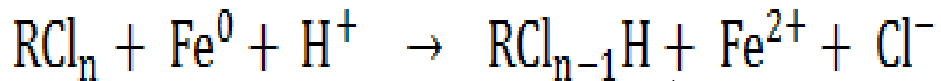
# Nanoremediácia

## nanočastice nulmocného železa



Nanofer 25S (NANO IRON, CR)

- **zníženie stupňa chlorácie**



# Bioremediácia

## bakteriálne kmene



Izolované zo sedimentov  
kontaminovaných PCB

- **štiepenie bifenylového kruhu**

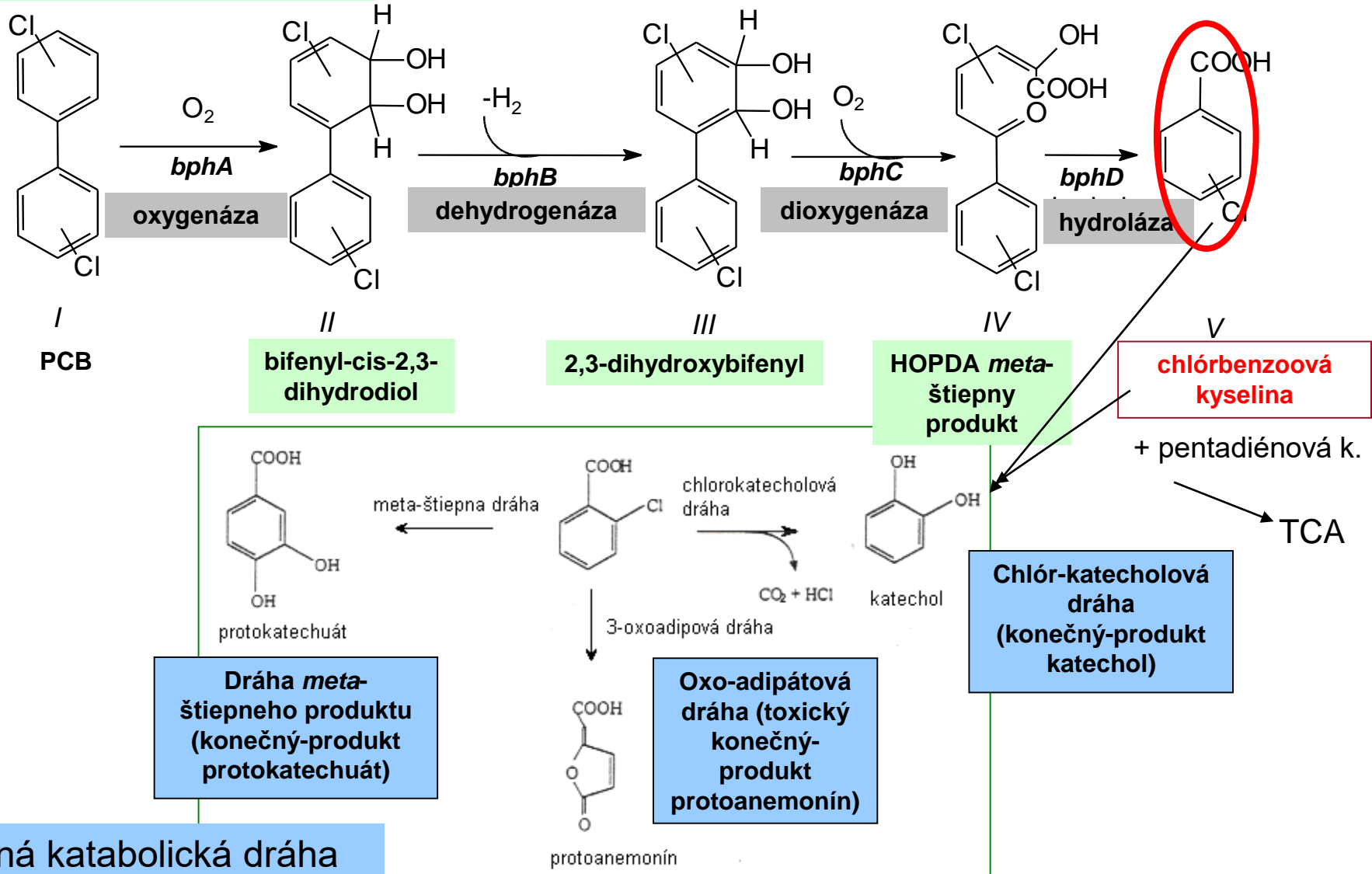
# Nano-Bio-Remediácia

Kombinovaný prístup na dosiahnutie najvyššej možnej  
**degradácie PCB**

# AERÓBNA BIODEGRADÁCIA PCB

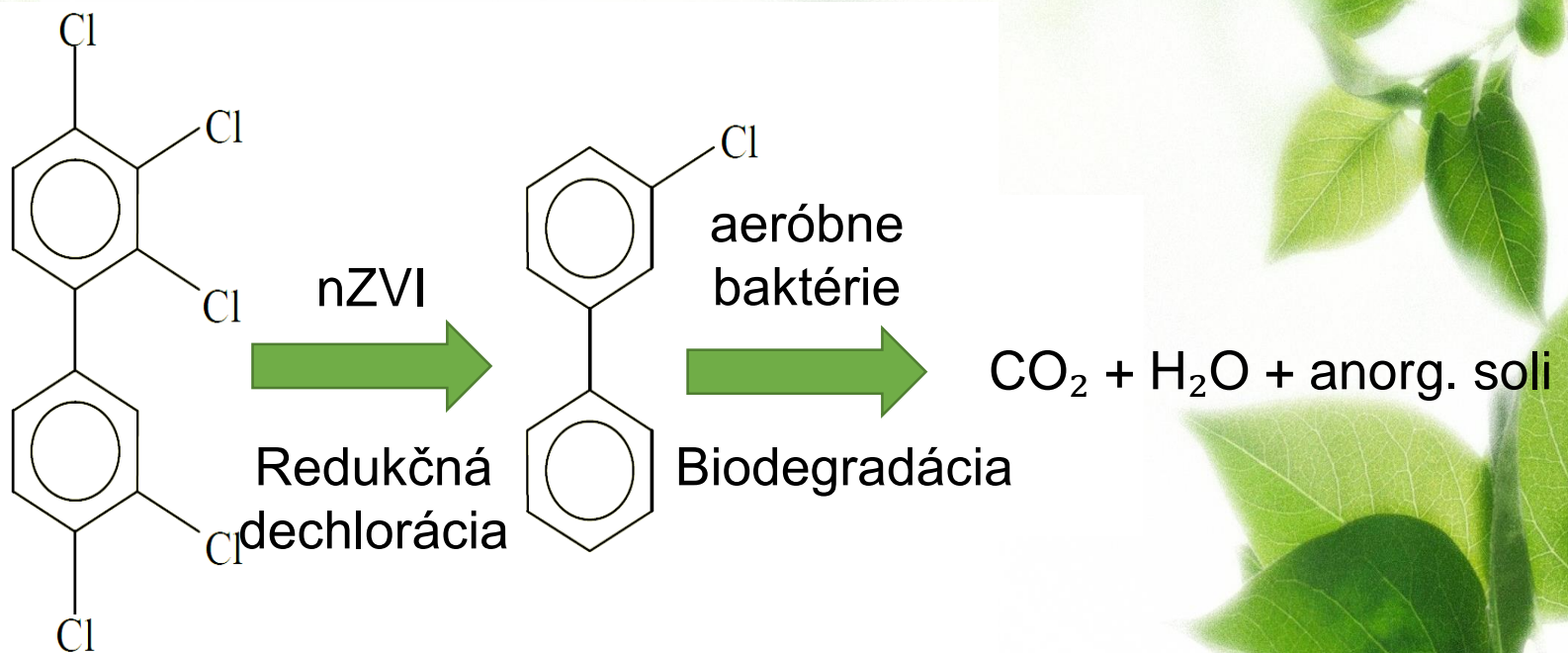
(Murínová a kol., ACS, 2014)

## Horná katabolická dráha



# NANO-BIO-REMEDIÁCIA

**Sekvenčná aplikácia** nanočastíc a bakteriálneho kmeňa na sanáciu PCB

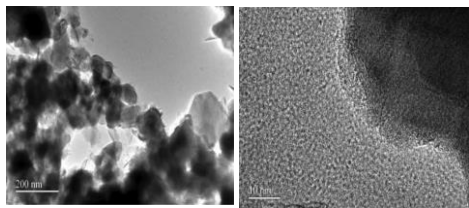


# SYNTÉZA NANOČASTÍC A „BIO“NANOČASTÍC ŽELEZA

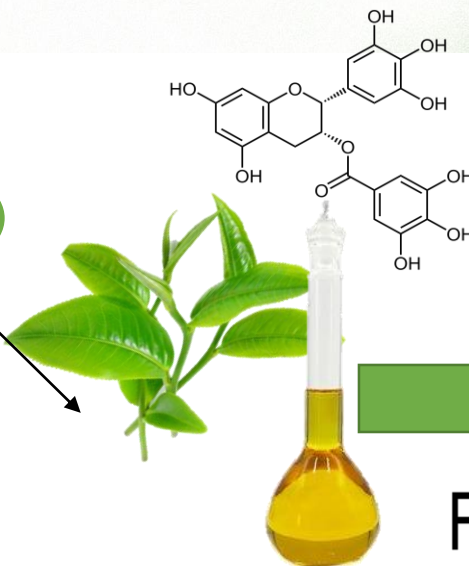
Chemická  
Biologická

## Výhody biologickej syntézy

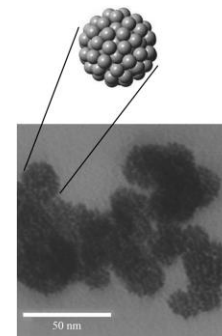
- nevyžaduje vysokú teplotu ani tlak
- bez využitia toxických chemikálií
- produkcia stabilnejších nanočastíc



Nanofer 25S



Rastlinný extrakt  
(polyfenoly)



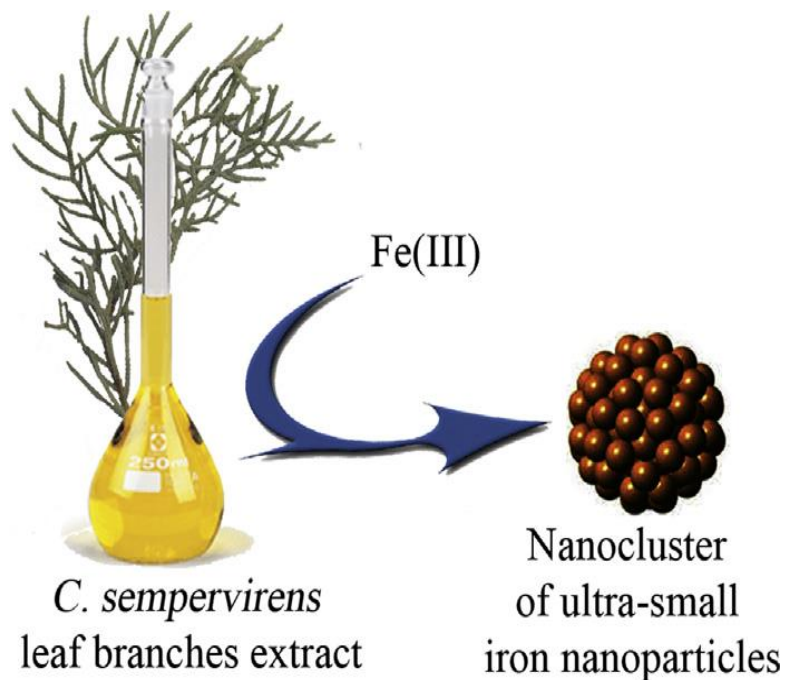
$\text{Fe}^0$  (nZVI)



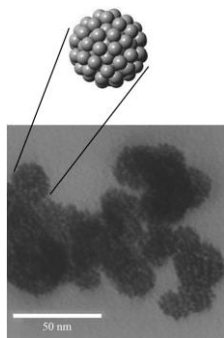
nanočastice uvoľňujú elektróny, sú schopné redukovať protóny na molekulárny vodík, chlór je akceptor elektrónov

$2\text{H}^+ + \text{Fe}^0 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2$  – redukčné činidlo pre dechloračný proces

# BIONANOČASTICE – príprava aglomerátov nanočastíc nZVI z rastlinných matric



(Ebrahiminezhad a kol., 2018)



Vhodné sú rastliny s obsahom **polyfenolov:**

**banánové šupky, zelený čaj, listy magnólie, listy brečtanu, cyprusové vetvičky...**



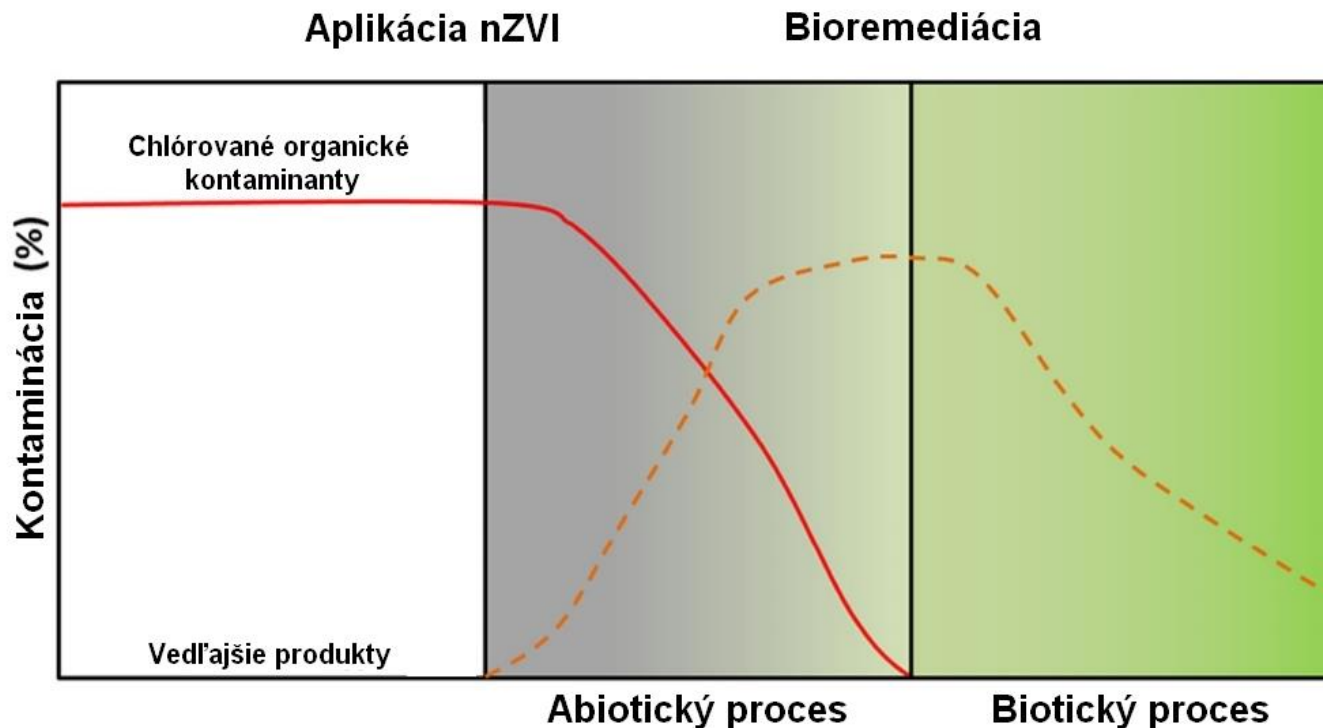
Schematická ilustrácia a morfológia (TEM) nanoklastrov ultra malých (priemer 1.5 nm) nanočastíc železa (Mediterranean cypress – *Cupressus sempervirens*).

Priemer nanoklastrov 9-31 nm.

Charakterizácia bionanočastíc (Transmission EM, FourierTransformIR, XRD-X-ray powder Diffractometer, Image analysis software...)

# Nano-bio-remediácia PCB

Hybridný postup chemickej a biologickej degradácie PCB - nano-bio redoxný systém





# CIELE

1. Biodegradácia PCB vodného umelo kontaminovaného média a reálne kontaminovaného sedimentu za aeróbnych podmienok prídavkom jednotlivých bakteriálnych kmeňov, dvojkonzorcia a sedemkonzorcia
2. Nanodegradácia PCB (redukčná dehalogenácia) syntetickými nanočasticami nZVI Nanofer 25S a bionanočasticami z rastlinných extraktov
3. **Integrovaný, hybridný prístup remediácie PCB: Bio-Nano / Nano-Bio sekvenčný systém**

# METÓDY

## Bioremediácia

500 ml Erlenmeyerove kultivačné fľaše,  
100 ml definovaného vodného  
minerálneho média (MM médium),  
resp. sediment, PCBs (Delor 103) a  
**bakteriálne inokulum**



Aeróbná degradácia

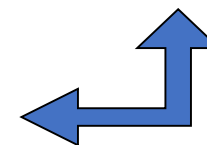
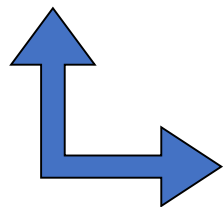
## Nanoremediácia

100 ml uzatvárateľné sklenené Fisherove  
fľaše, 100 ml MM média resp. sediment,  
PCB (Delor 103) a disperzia **nZVI**

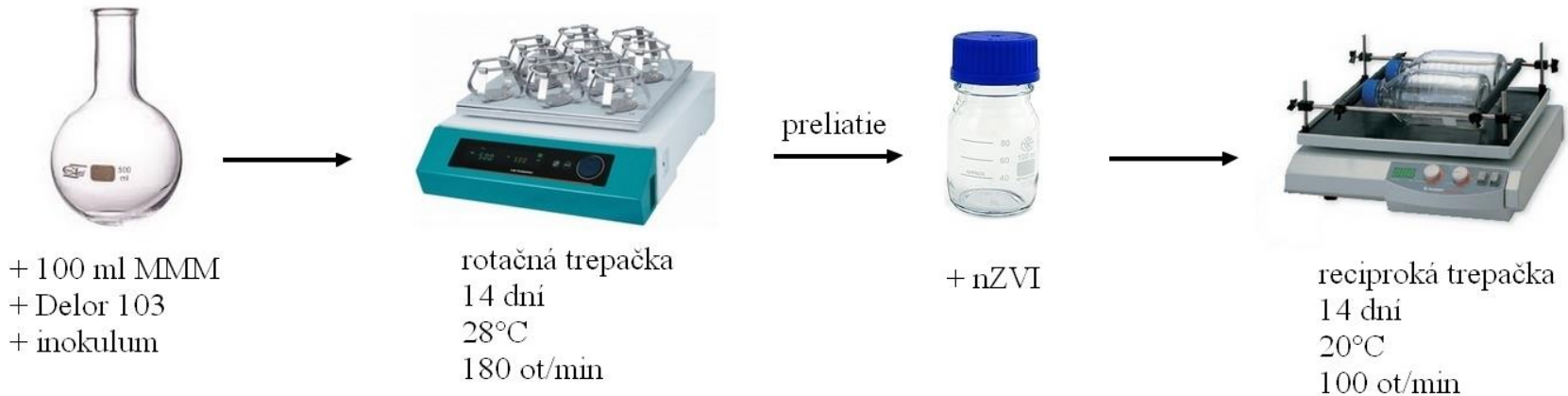


Limitovaný prístup kyslíka

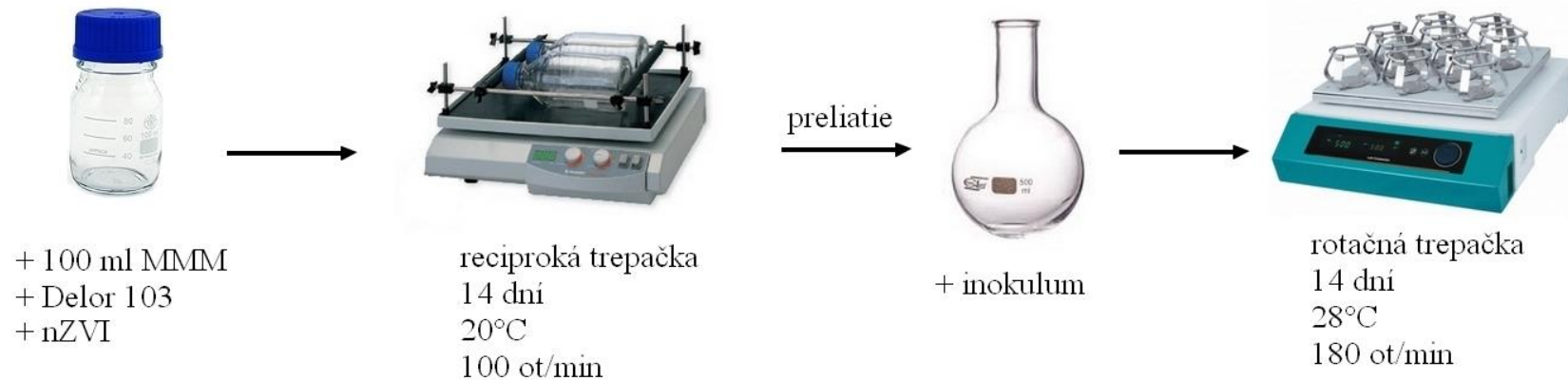
rozdielne nároky na kyslík!



# 1. Sekvenčný bio-nano prístup



# 2. Sekvenčný nano-bio prístup



# Biodegradácia PCB v definovanom vodnom médiu a v sedimente

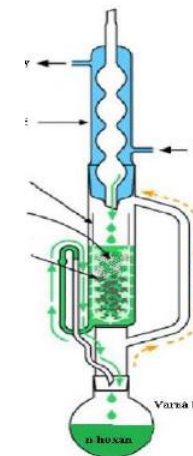


vodné MM médium / sediment

(a) Bioaugmentácia baktériami – jednotlivými, resp. konzorciom (dvoj- a sedem- členným)

(b) Degradácia nanočasticami 25S a bionZVI

(c) Sekvenčná nano-bio-degradácia s postupnými prídavkami + 4×prídavok nZVI (0,5 g.l<sup>-1</sup>) do výslednej koncentrácie 2 g.l<sup>-1</sup>, 4×prídavok 7K (0,5 g.l<sup>-1</sup>) do výslednej koncentrácie 2 g.l<sup>-1</sup> a jednorazový prídavok surfaktantu TRITON-100 X (CMC×2)



Baktérie izolované zo Strážskeho kanála, identifikované PCR a MALDI-TOF metódami: (Lászlóvá a kol, 2017; Horváthová a kol., 2018)

**G-**

*Ochrobacterum anthropi*

*Achromobacter xylosoxidans*

*Stenotrophomonas maltophilia*

*Brevibacterium casei*

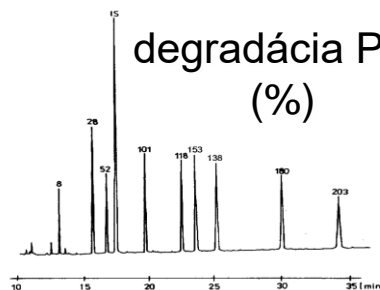
*Starkeya novella*

*Pseudomonas mandelii*

**G+**

*Rhodococcus ruber*

Soxhletova extrakcia



GC-ECD analýza

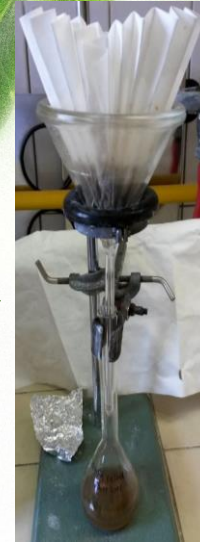
# Príprava rastlinných bionanočastíc železa



Rastlinné zdroje



Príprava rastlinného extraktu



Filtrácia



Prídavok  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$



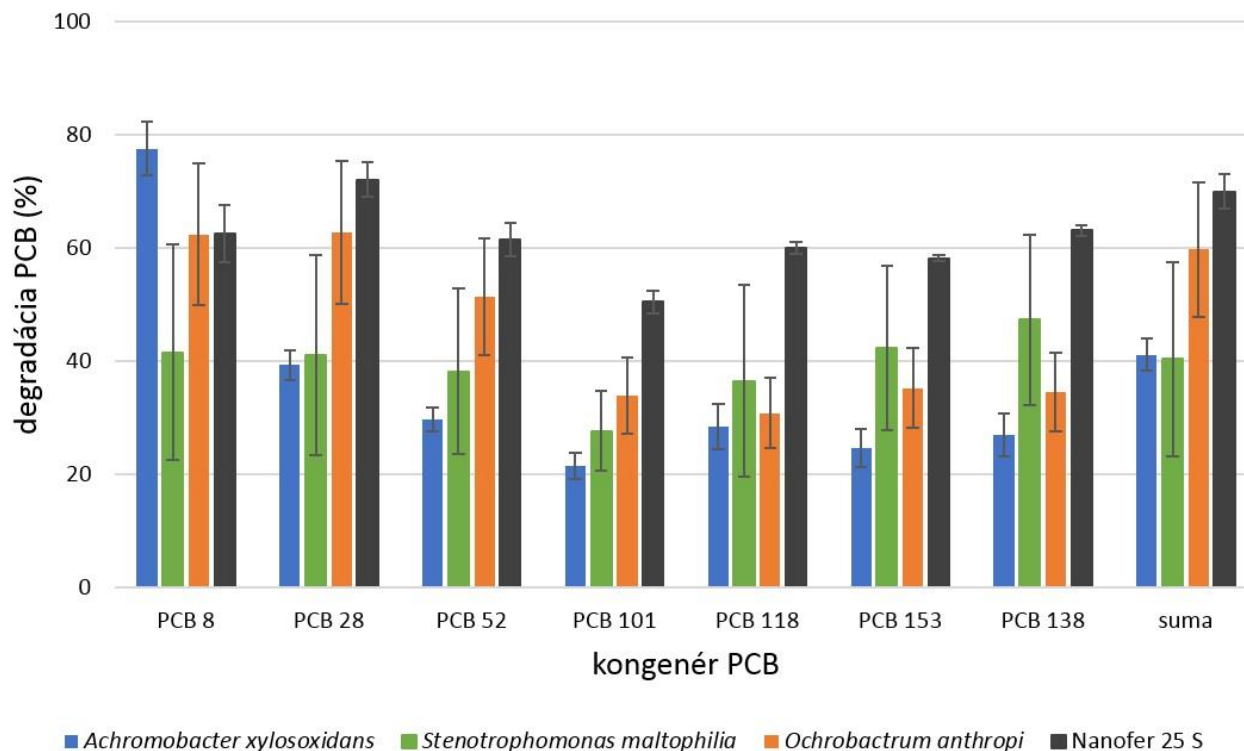
Centrifugácia



Vyzrážané nZVI

# VÝSLEDKY

## Degradácia PCB jednotlivými bakteriálnymi kmeňmi a nZVI



### Biodegradácia bakteriálnymi kmeňmi:

100 ml MM média v 500 ml kultivačných fľašiach  
Delor 103 0.1 g.l<sup>-1</sup>  
Bakteriálne inokulum 1 g.l<sup>-1</sup>  
14 dní

### Redukčná dehalogenácia prídavkom Nanofer 25S:

100 ml of destilovanej vody v 100 ml uzatvárateľnej fľaši  
Delor 103 0.1 g.l<sup>-1</sup>  
nZVI disperzia 2 g.l<sup>-1</sup>  
14 dní

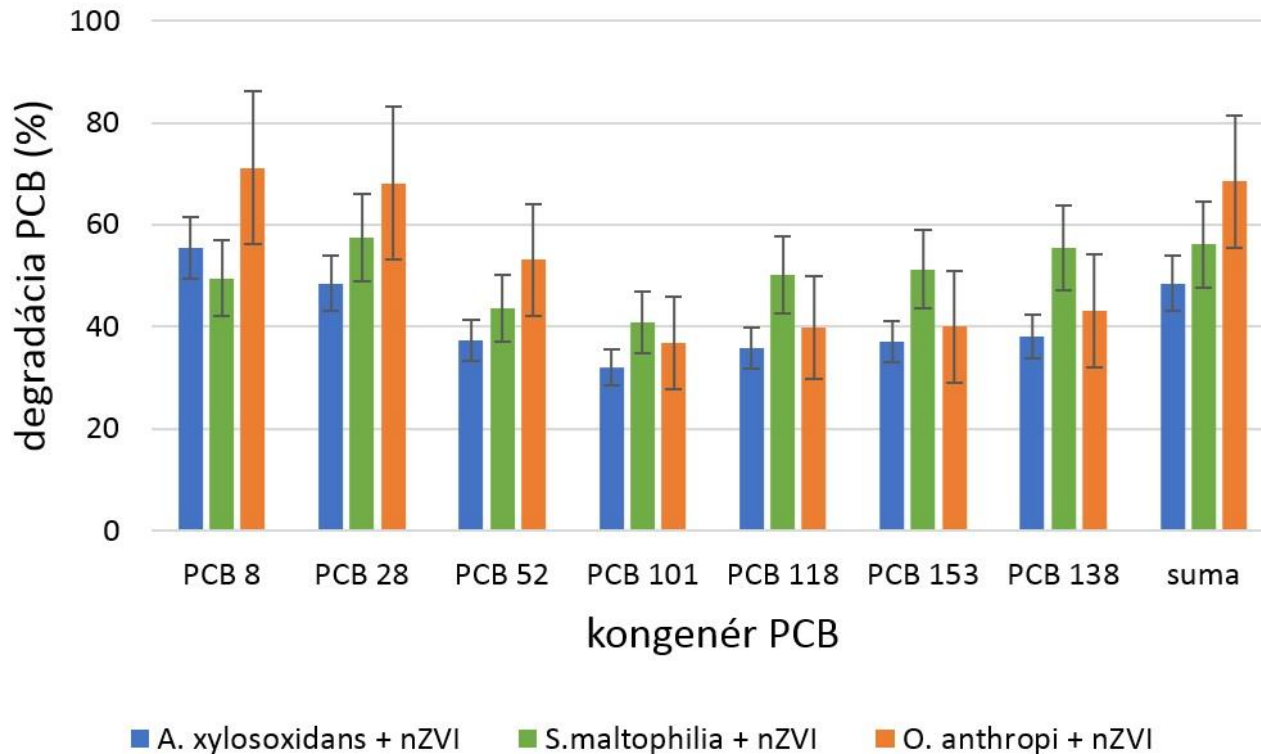
Degradácia sumy  
7 kongenéroov PCB

***A. xylosoxidans*** 41 %  
***S. maltophilia*** 40 %  
***O. anthropi*** 59 %

**Nanofer 25S** 68 %

# INTEGROVANÝ BIOLOGICKO – FYZIKÁLNOCHEMICKÝ PRÍSTUP

jednotlivé bakteriálne kmene  $\Rightarrow$  nZVI: **bio-nano** prístup



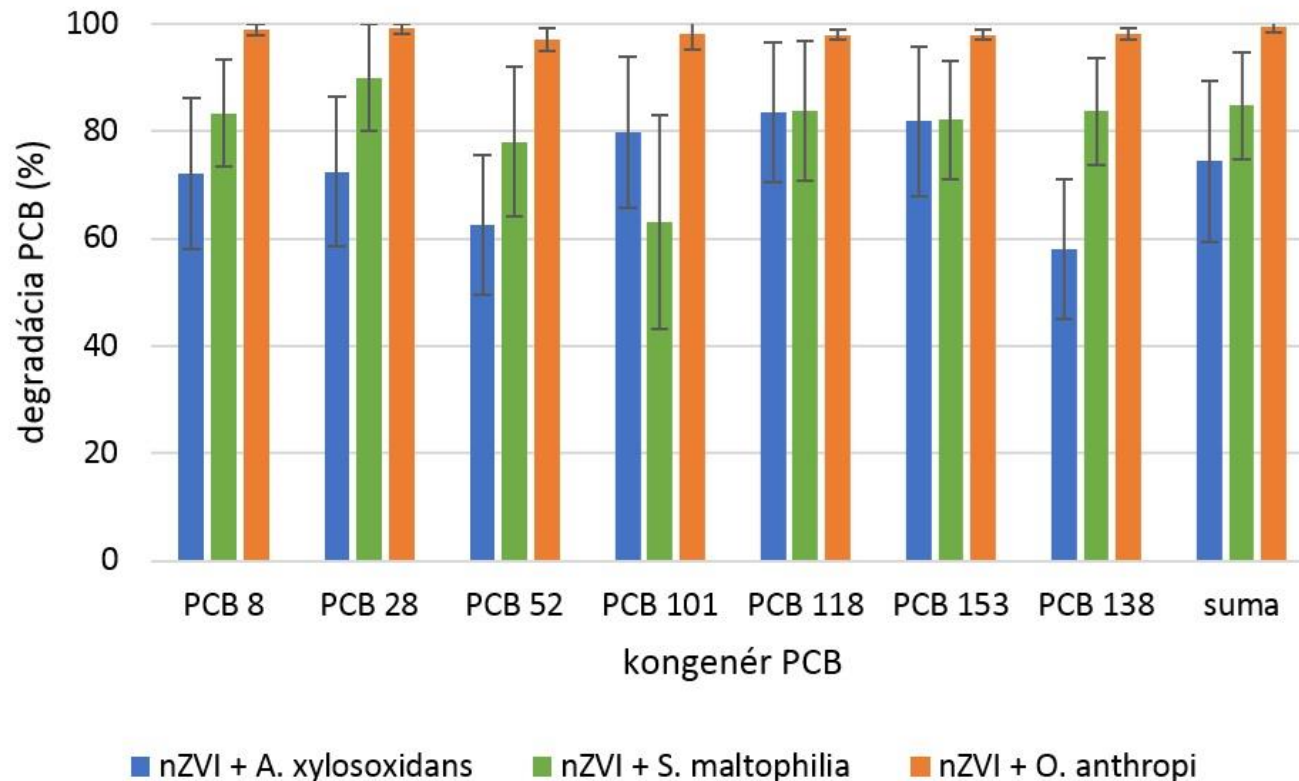
## Kultivačné podmienky

100 ml of MM média  
v 500 ml kultivovateľné fľaše  
Delor 103 0.1 g.l<sup>-1</sup>  
bakteriálne inokulum 1 g.l<sup>-1</sup>  
28 dní, po 14 dňoch transfer do  
reagenčných fliaš  
a prídavok disperzie nZVI 2 g.l<sup>-1</sup>

Degradácia sumy 7  
kongenéroov PCB

**A. xylooxidans** + nZVI 49 %  
**S. maltophilia** + nZVI 57 %  
**O. anthropi** + nZVI 67 %

# nZVI ⇒ bakteriálne kmene: nano-bio prístup



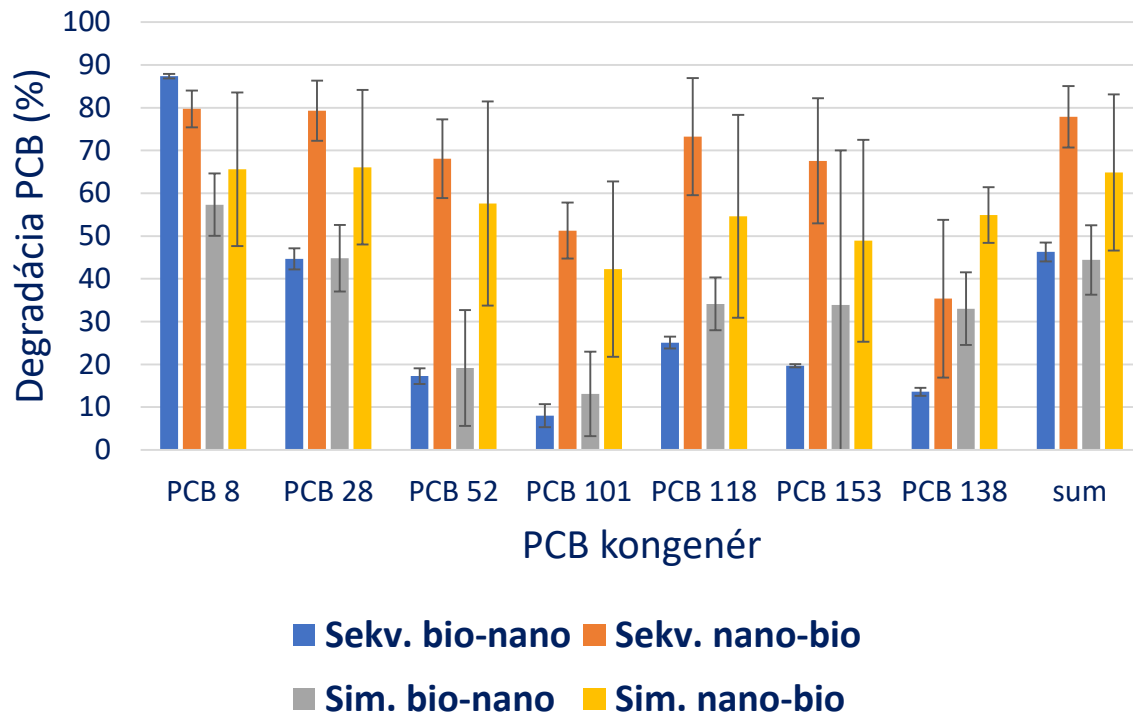
**Kultivačné podmienky**  
100 ml MM média  
v reagenčných  
uzatvárateľných fľašiach,  
Delor 103 0,1 g.l<sup>-1</sup>  
nZVI disperzia 2 g.l<sup>-1</sup> celková  
kultivácia 28 dní, po 14 dňoch  
transfer do kultivačných fliaš  
a prídavok bakteriálneho  
inokula 1 g.l<sup>-1</sup>

Degradácia sumy 7 kongenérovcv PCB:

nZVI + <i>A. xylooxidans</i>	77 %
nZVI + <i>S. maltophilia</i>	89 %
nZVI + <i>O. anthropi</i>	<b>99 %</b>



# Nanobioremediácia PCB nZVI a bakteriálnym dvojkonzorciom vo vodnom médiu



Konzorcium (1 : 1)

*Rhodococcus ruber* G<sup>+</sup>

*Achromobacter xylosoxidans* G<sup>-</sup>

PCB 0,1 g.l<sup>-1</sup>,

nZVI 2 g.l<sup>-1</sup>

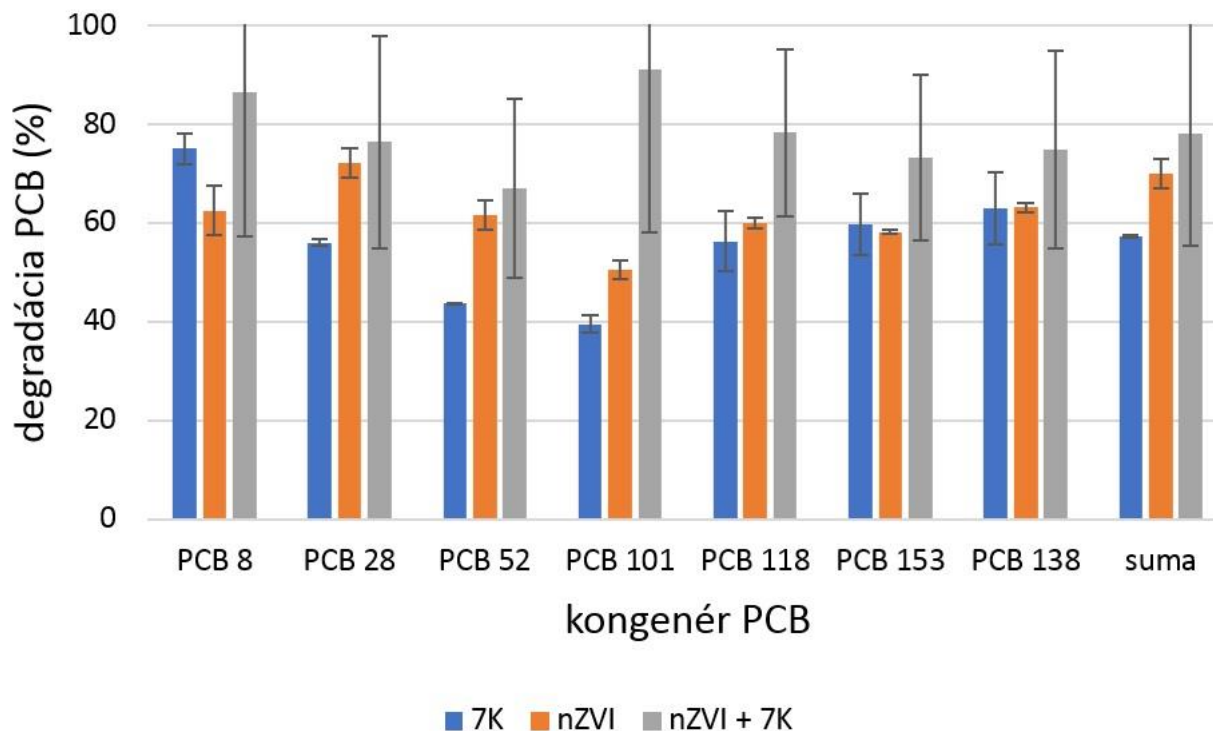
limitácia kyslíkom, 14 dní 100 rpm,

biomasa 1 g.l<sup>-1</sup> (0,5 + 0,5)

aeróbne 14 dní, 28 °C, 180 rpm

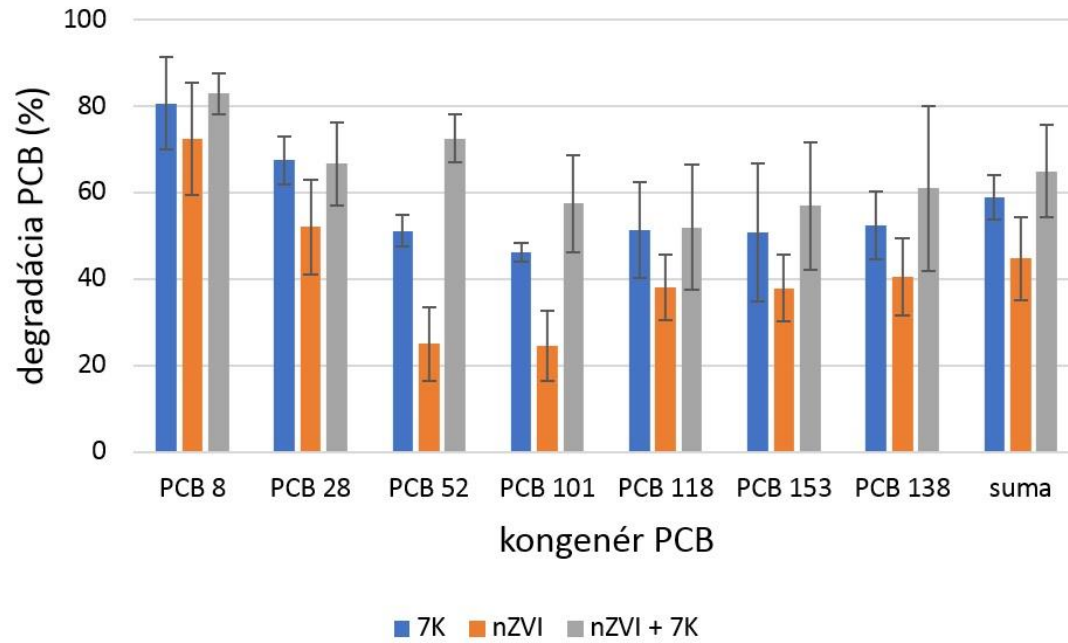
Prístup	Degradácia PCB (%)
1 (sekv bio-nano)	46 %
<b>2 (sekv nano-bio)</b>	<b>78 %</b>
3 (simul bio-nano)	44 %
4 (simul nano-bio)	65 %

# Nanobioremediácia PCB nZVI a bakteriálnym sedemkonzorciom 7K vo vodnom médiu



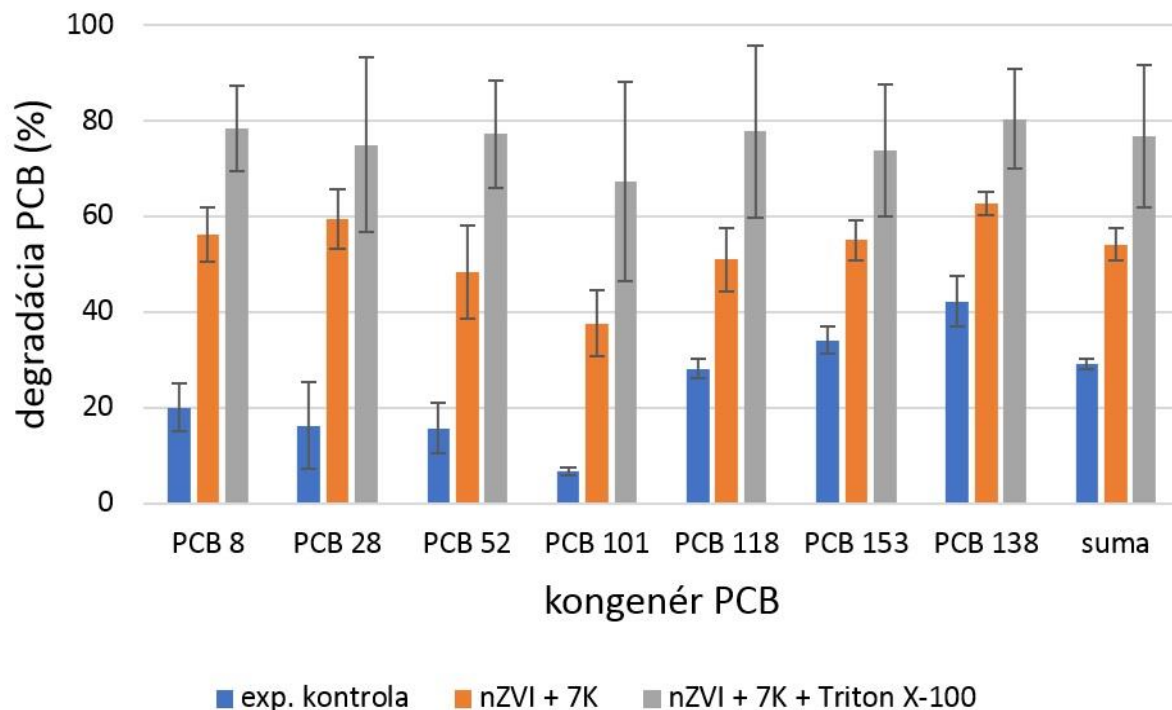
Degradácia PCB vo **vodnom médiu** umelo kontaminovanom priemyselnou zmesou Delor 103 realizovaná bakteriálnym **sedemkonzorciom 7K**, **nZVI** a ich **sekvenčnou aplikáciou**. **konzorcium**: 100 ml MM média v 500 ml kultivačných bankách, Delor 103 (0,1 g.l<sup>-1</sup>), inokulum bakteriálneho konzorcia (10 % v/v), kultivácia 21 dní na rotačnej trepačke (28°C, 180 ot.min<sup>-1</sup>). **nZVI**: 100 ml MM média, Delor 103 (0,1 g.l<sup>-1</sup>), disperzia nZVI Nanofer 25S (2 g.l<sup>-1</sup>), kultivácia 30 dní v reagenčných fľašiach (20°C, 100 ot.min<sup>-1</sup>). **nZVI + konzorcium**: iniciovaná nZVI (2 g.l<sup>-1</sup>) v reagenčných fľašiach, po 14 dňoch prenos média do kultivačných baniek a prídavok inokula (10% v/v). analytická kontrola: MM médium + Delor 103 (0,1g.l<sup>-1</sup>).

# Nanobioremediácia PCB nZVI a bakteriálnym sedemkonzorciom 7K v sedimente



Degradácia PCB v kontaminovanom **sedimente** realizovaná bakteriálnym **7K – sedem konzorciom, nZVI a ich sekvenčnou aplikáciou. konzorcium:** 100 ml MM média v 250 ml kultivačných bankách, 10g suchého sedimentu, biomasa bakteriálneho konzorcia (10 % v/v), stacionárna kultivácia 21 dní pri 28°C s občasým premiešaním. **nZVI:** 100 ml MM média, 10 g suchého sedimentu, disperzia nZVI Nanofer 25S (2 g.l<sup>-1</sup>), kultivácia 30 dní pri 20°C v reagenčných fľašiach s občasým premiešaním. **nano-bio-remediácia:** iniciovaná nZVI (2 g.l<sup>-1</sup>) v reagenčných fľašiach, po 15 dňoch prenos média do kultivačných baniek a prídavok biomasy (10 % v/v). Analytická kontrola: neremediovaný sediment.

# Sekvenčná nano-bioremediácia PCB v sedimente postupnými prídavkami nZVI a 7K a PAL

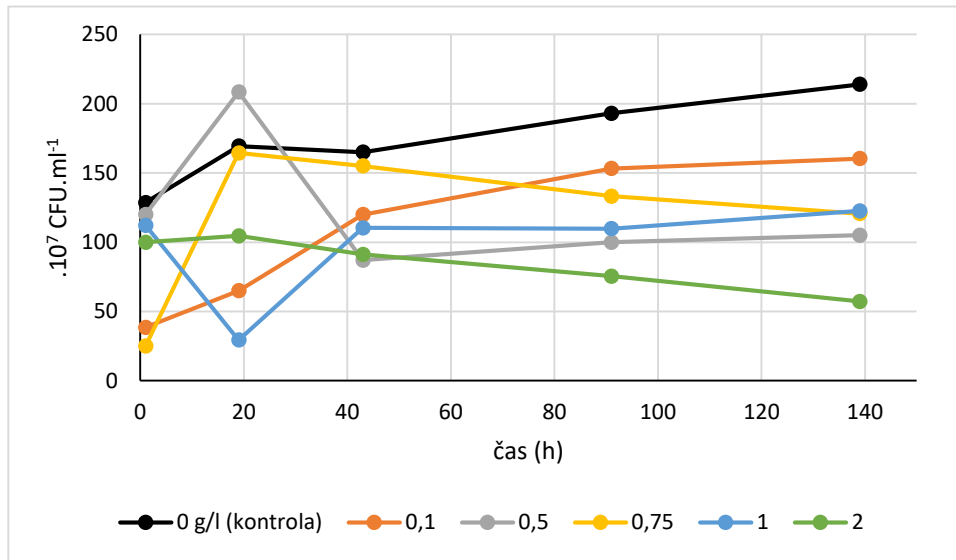


- Najvyššia biodegradácia  $\Sigma 7$  kongenéroov PCB dosiahnutá pri sekvenčnej nano-bioremediácii s prídavkom surfaktantu – 77% (zvýšenie o 23%), bez surfaktantu 54 %.

- PAL – (bio)surfaktant

Podmienky: 50 ml MM média, 5 g sedimentu, **(a) nanoremediácia** –  $4 \times 0,5 \text{ g.l}^{-1}$  prídavky nZVI do dosiahnutia  $2 \text{ g.l}^{-1}$ , 14 dní, v uzavretých reagenčných bankách; **(b) bioremediácia** –  $4 \times 0,5 \text{ g.l}^{-1}$  prídavky 7K do dosiahnutia  $2 \text{ g.l}^{-1}$  a jednorazovo TRITON-100 X ( $\text{CMC} \times 2$ ), 14 dní, v Erlenmeyerových bankách. Kultivácia pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $100 \text{ ot.min}^{-1}$ .

# Toxický účinok nZVI na bakteriálne kmene



Koncentrácia nZVI (g.l<sup>-1</sup>)

Pokles koncentrácie  
biomasy voči kontrole

0,1	25 %
0,5	51 %
0,75	44 %
1	43 %
2	73 %

Bakteriálny kmeň:

*Stenotrophomonas maltophilia*

Počiatkové koncentrácie:

nZVI 0; 0,1; 0,5; 0,75; 1; 2 g.l<sup>-1</sup>,

biomasa 0,5 g.l<sup>-1</sup>.

aeróbne podmienky, 28 °C

Sledovanie toxicity ukázalo, že **stúpajúca koncentrácia** nZVI spôsobuje priamo úmerne **pokles koncentrácie biomasy**, no aj pri najvyššej koncentrácii nZVI 2 g/l bola stále prítomná aktívna biomasa. Vplyv nZVI na bunku závisí najmä od rezistencie daného kmeňa. Počas dechlorácie bude navyše stúpať množstvo pasivovaných nanočastíc železa Fe<sup>2+</sup> a klesať množstvo Fe<sup>0</sup>.

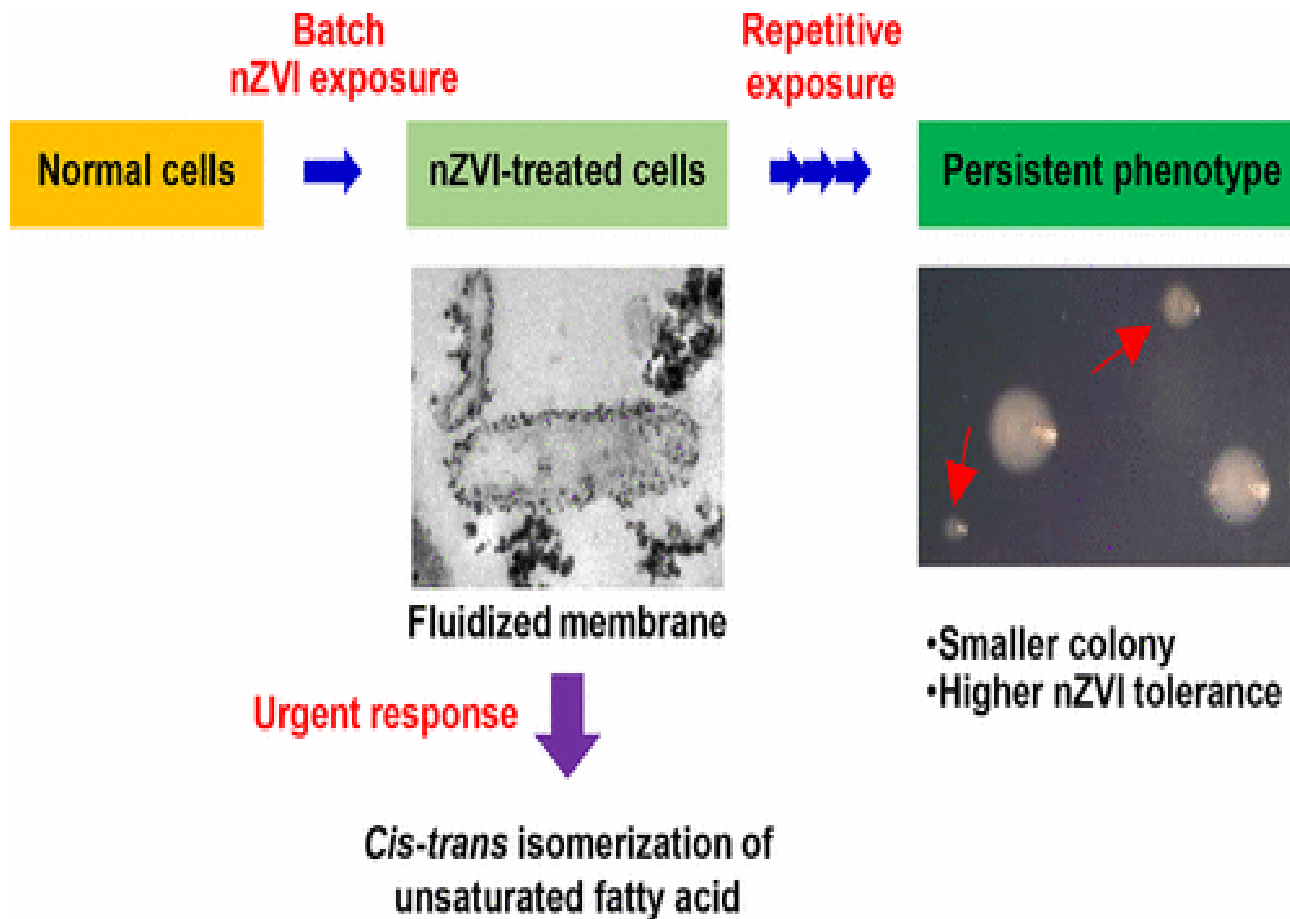
# Expozícia bakteriálneho kmeňa nZVI



Porovnanie makroskopických znakov kmeňa *Rhodococcus ruber* neexponovaného (vľavo) a exponovaného (vpravo) nZVI. Inkubácia 48 hodín v tme v inverznej polohe pri 28°C.

Kongenér PCB	Neexponovaný <i>R. ruber</i>	Exponovaný <i>R. ruber</i>
PCB 8	53 %	83 %
PCB 28	68 %	71 %
PCB 52	40 %	58 %
PCB 101	28 %	42 %
PCB 118	66 %	52 %
PCB 153	60 %	28 %
PCB 138	65 %	21 %
Suma	<b>64 %</b>	<b>72 %</b>

V prítomnosti nZVI boli pozorované morfológické zmeny: odfarbenie kmeňa, tvar kolónií je mierne rozliaty a vypuklejší. Sekvenčná nanobioremediácia PCB týmto kmeňom sa javí úspešnejšia len pre nižšie chlórované kongenéry.

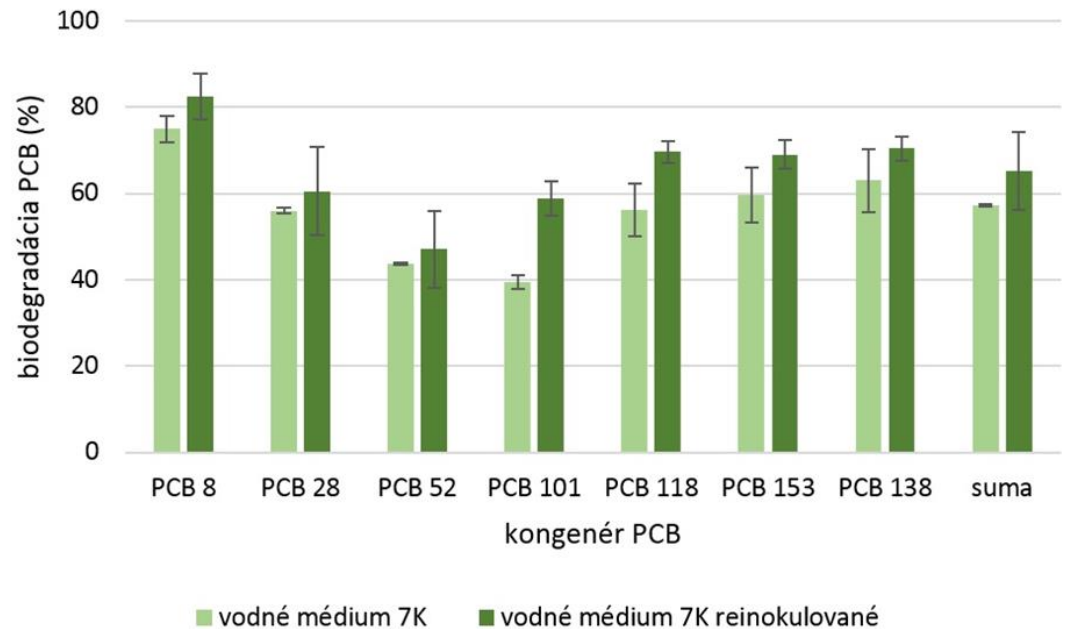


Kotchaplai et al., 2017 EST: Membrane Alterations in *Pseudomonas putida* F1 Exposed to Nanoscale Zerovalent Iron: Effects of Short-Term and Repetitive nZVI Exposure

# Biodegradácia PCB vo vodnom médiu reinokulovaným 7K

Množstvo indikátorových kongenérovaných PCB v zmesi Delor 103 (Taniyasu a kol., 2003).

kongenér	Množstvo kongenéru (% w/w)
PCB 8	5,96
PCB 28	21,58
PCB 52	2,16
PCB 101	0,28
PCB 118	0,23
PCB 153	0,09
PCB 138	0,09
<b>SUMA</b>	<b>30,39</b>

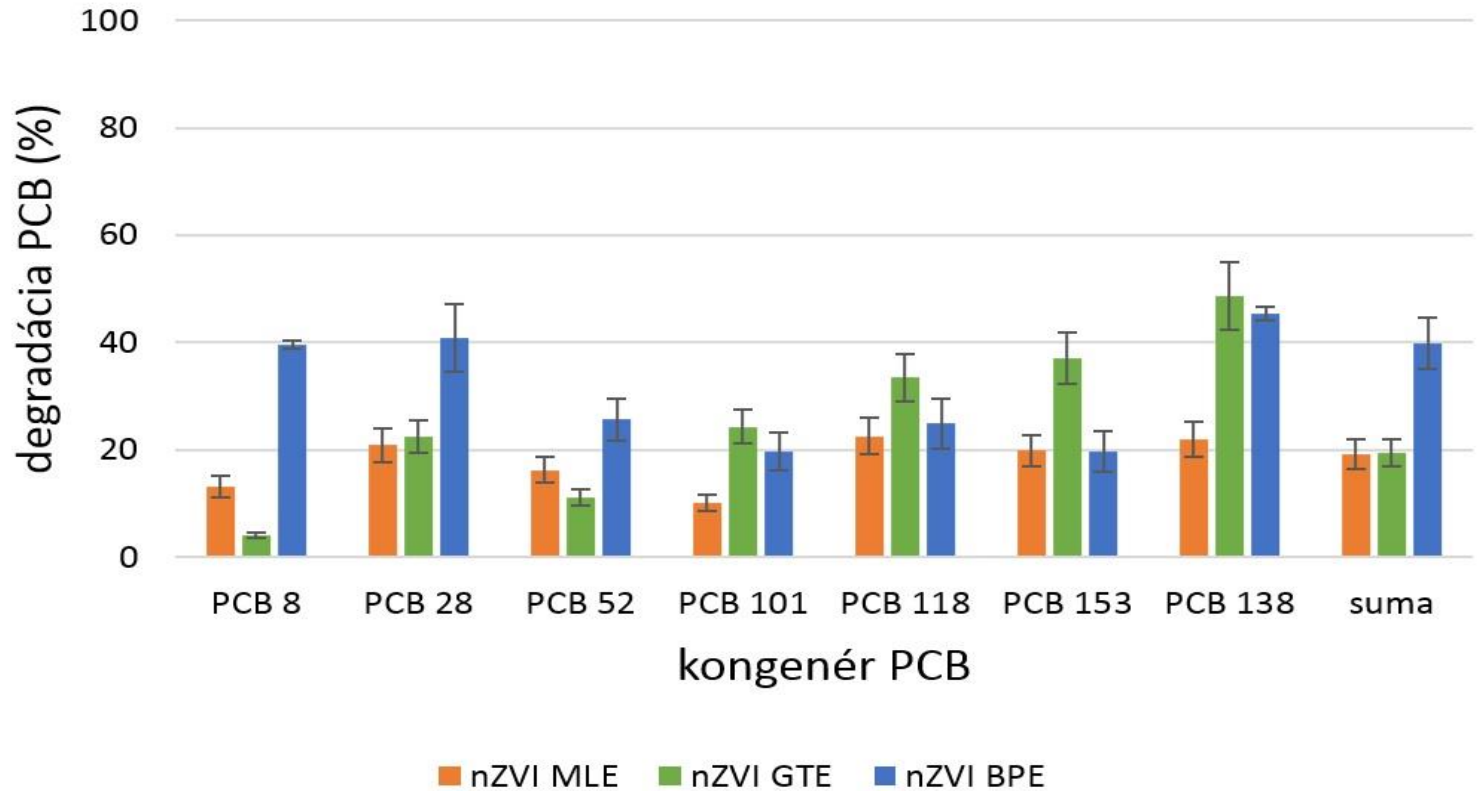
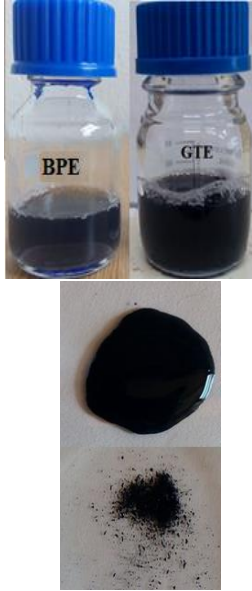


Podmienky: 100 ml MM média, Delor 103 (0,1 g.l<sup>-1</sup>), 10%-ný prídavok 7K. Kultivácia: **reinokulácia 7K 1×/týždeň počas 30 dní**, 28°C, 180 ot.min<sup>-1</sup>.

Reinokulácia bola efektívna, nakoľko došlo k zvýšeniu biodegradácie  $\Sigma$ 7 PCB na **63 %**. Efektívnosť reinokulácie sa prejavila aj pri vyššie chlórovaných kongenéroch PCB.

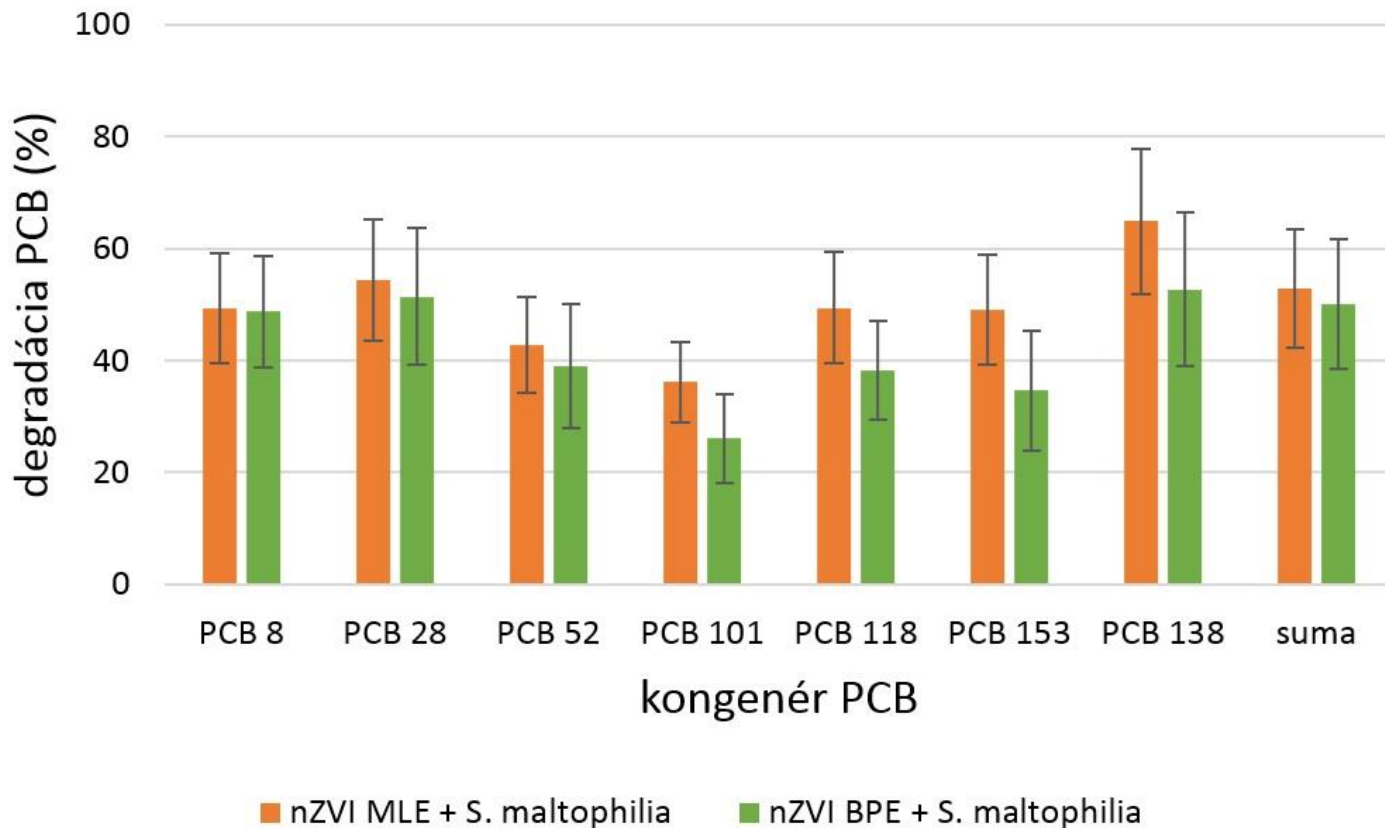


# Degradácia PCB bionanočasticami



Degradácia PCB vo vodnom médiu umelo kontaminovanom zmesou Delor 103 pomocou bionanočastíc pripravených reakciou  $\text{FeSO}_4$  s extraktom zeleného čaju (GTE), listov magnólie (ME) a banánovej šupky (BPE). Podmienky: reagenčná fľaša so 100 ml MM média, Delor 103 ( $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ ) 3 ml nanočastíc, kultivácia 14 dní na rotačnej trepačke ( $20^\circ\text{C}$ ,  $180 \text{ ot.min}^{-1}$ ); analytická kontrola MM médium a Delor 103 ( $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ ).

# Nano-bio-remediácia s bionanočasticami



Podmienky v sedimente: bionZVI 2 g.l<sup>-1</sup>, doba kultivácie nZVI 14 dní vo vodnom médiu, aerácia 100 rpm, 20°C; následne prídavok *Stenotrophomonas maltophilia*, inokulum 1 g.l<sup>-1</sup>, 180 rpm, 28°C.

# ZÁVERY

## BIOLOGICKÝ PRÍSTUP – BIODEGRADÁCIA PCB

Biodegradačná schopnosť bakteriálnych izolátov vo vodnom médiu umelo kontaminovanom PCB (Delor 103, 0,1 g.l<sup>-1</sup>): ***Ochrobacterum anthropi* 60 %**, ***Achromobacter xylosoxidans* 41 %**, ***Stenotrophomonas maltophilia* 40 %**, ***Brevibacterium casei* 33 %**, ***Starkeya novella* 19 %**, ***Rhodococcus ruber* 18 %** a ***Pseudomonas mandelii* 17 %**.

Biodegradácia PCB v reálne kontaminovanom riečnom sedimente: ***R. ruber* 71 %**, ***O. anthropi* 68 %**, ***S. maltophilia* 61 %** a ***A. xylosoxidans* 31 %**.

Z dvojkonzorcií sa ako najúčinnnejšie javilo konzorcium ***R. ruber* + *S. maltophilia***. Vo vodnom médiu degradovalo **70 %** PCB a v sedimente **80 %** PCB. Ekotoxikologický biotest potvrdil najvýraznejšie zníženie toxicity sedimentu použitím práve tohto konzorcia.

**Sedemčlenné bakteriálne konzorcium (7K)** sa preukázalo ako odolný stabilný nástroj na biodegradáciu PCB vo vodnom médiu aj v sedimente, pričom bola pozorovaná **59 %** a **58 %** biodegradácia PCB. Pravidelnou **reinokuláciou 7K** sa zvýšila biodegradácia PCB v umelo kontaminovanom médiu na **65 %**.

# FYZIKÁLNO-CHEMICKÝ PRÍSTUP - NANODEGRADÁCIA PCB

**nZVI** aplikovanými v koncentrácii odporúčenej výrobcom (2 g.l<sup>-1</sup>) sa za 30 dní vo **vodnom médiu** resp. v **sedimente** degradovalo **70 %** resp. **44 %** PCB.

**Bionanočastice** železa z extraktu listov **magnólie**, **zeleného čaju** a z **banánovej šupky** degradovali **20 %**, **20 %** a **40 %** PCB.

# INTEGROVANÝ PRÍSTUP REMEDIÁCIE – NANOBIOREMEDIÁCIA PCB

Nanobioremediáciou PCB v umelo kontaminovanom **vodnom médiu** iniciovanou disperziou **syntetických nZVI** Nanofer 25S v sekvenčnej aplikácii s kmeňom *Ochrobactrum anthropi* sa dosiahla **99 %** degradácia PCB (30 dní).

V reálne kontaminovanom **sedimente** sa nanobioremediáciou degradovalo **78 %** PCB pri sekvenčnej aplikácii **nZVI** a **7K** s pravidelnou **reinokuláciou** a s prídavkom **surfaktantu** Triton X-100 (30 dní).

Sekvenčná nanobioremediácia PCB iniciovaná **bionanočasticami** vyredukovanými z extraktu listu magnólie a banánovej šupky s prídavkom **baktérií** *S. maltophilia* viedla k **53 %** a **50 %** degradácii PCB.

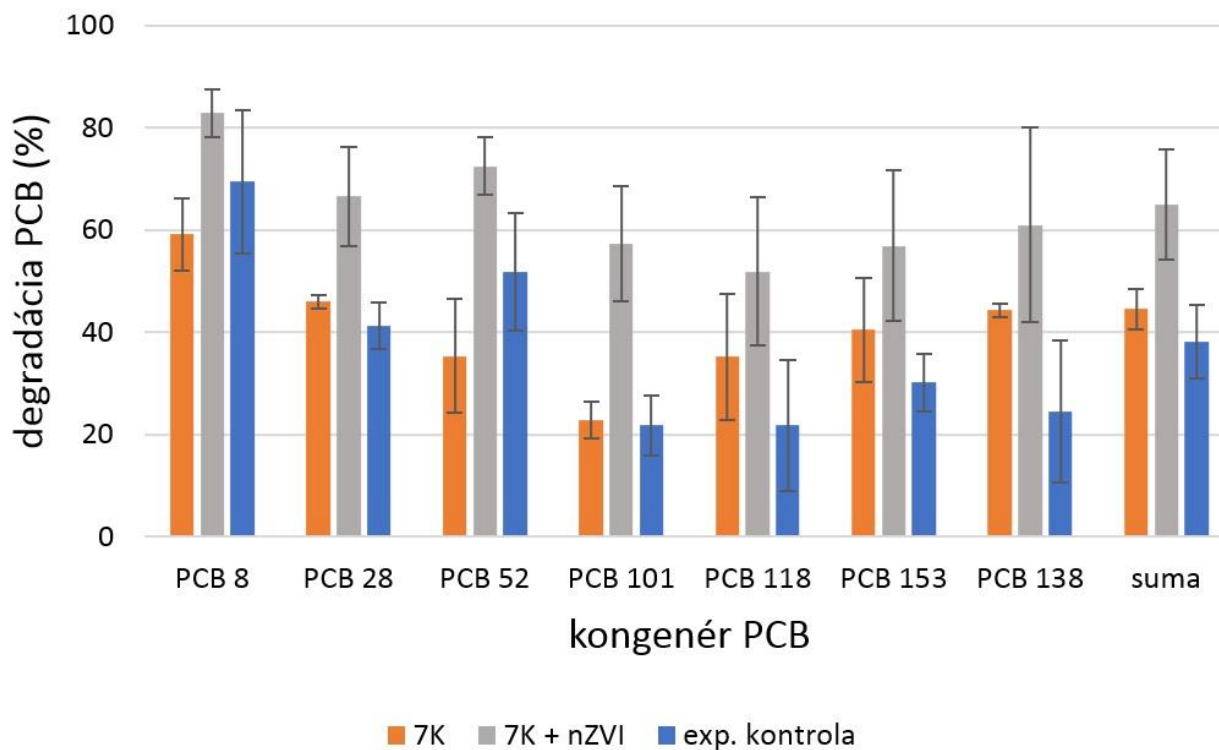
Nanobioremediáciou PCB s **exponovaným** kmeňom *R. ruber* sa v porovnaní s neexponovaným kmeňom **zvýšila degradácia PCB o 12 % (zo 62 % na 74 %)**.

The background of the slide features a soft-focus image of green leaves on a branch, with some leaves in sharp focus in the foreground and others blurred in the background. The lighting is bright and natural, creating a fresh and vibrant atmosphere.

Ďakujem za pozornosť

Výskum bol podporený grantami VEGA (1/0295/15) a APVV (0656-12) MŠVVaŠ SR a grantami STU pre podporu MVP (1683/2017 NanoBiorem a 1624/2019 IntegRem).

# Nano-bio-remediácia PCB v kontaminovanom sedimente simultánnym prídavkom bakteriálneho 7K + nZVI



degradácia PCB: 7K + nZVI > 7K > autochtónnou mikroflórou