

# CHEMIE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ I

Environmentální procesy

(13)

Environmentální biotické transformace  
chemických látek

Ivan Holoubek

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

**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.

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..).

# 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.

# 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.

# 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

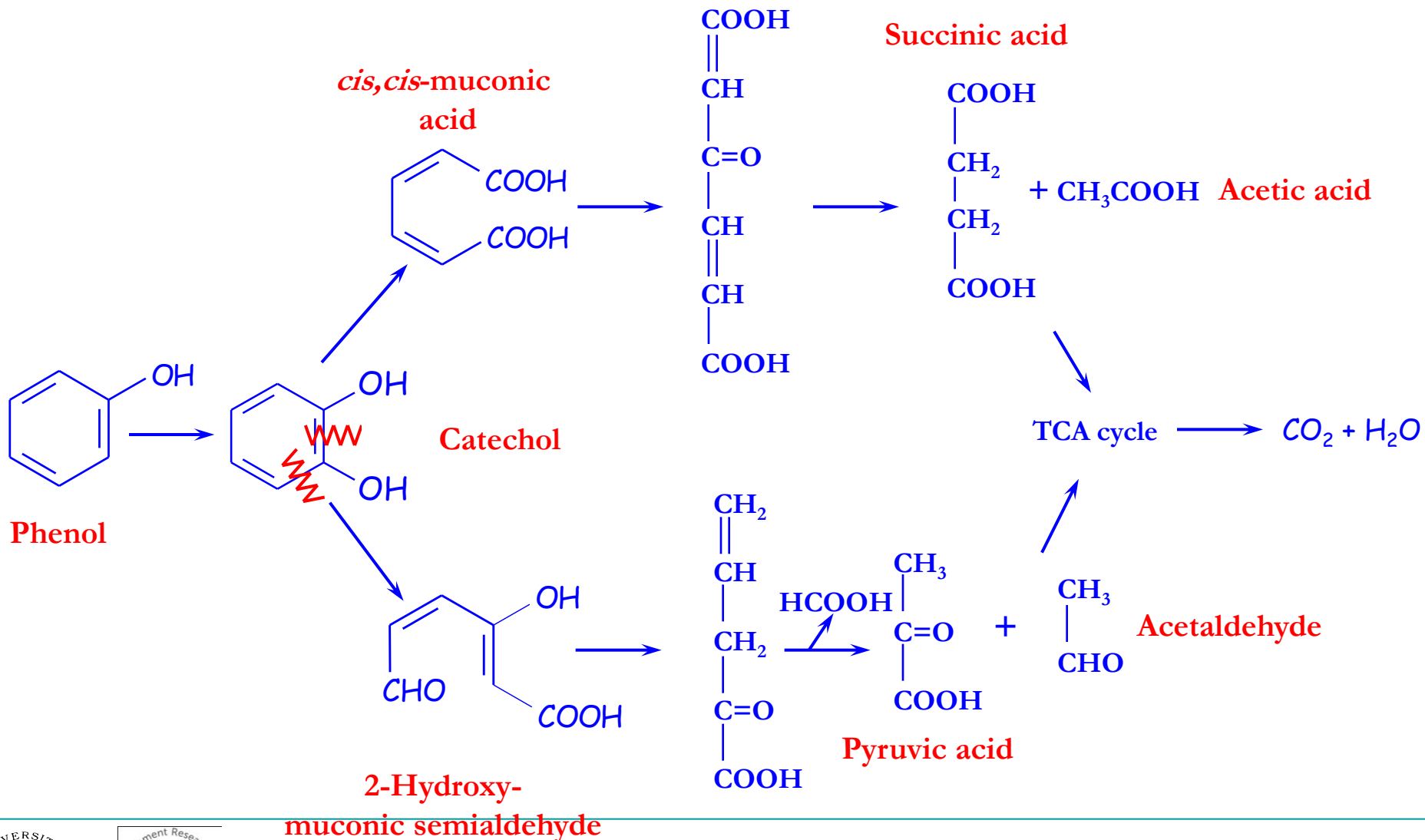
- ◆ Tvorba méně/ne-toxických metabolitů



## 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

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-chlorkatechol)

↪ Parathion (4-nitrofenol)

↪ DDT (DDE, DDD, DBP)

↪ Propan (propionát, aceton)

↪ Methyl flourid (formaldehyd)

# Proč kometabolismus probíhá ?

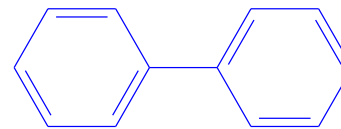
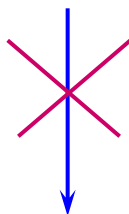
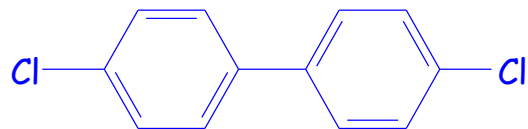
- ↪ Enzym existující v organismu nastartuje degradaci řetězce, ale nepokračuje nebo ji nedokončí na „užitečné“ koncové produkty.
- ↪ Produkty vznikající při počáteční degradaci později mohou inhibovat enzymy degradující řetězec nebo zastaví celkový růst organismu.
- ↪ Organismus tak aktuálně potřebuje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

# Kometabolismus

Analogie obohacování...

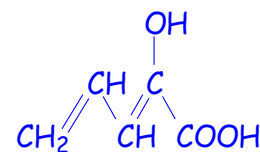
...kde mineralizovatelná přidávaná sloučenina je strukturně podobná (analog) té, jejichž metabolismus zkoušíme podporovat – přídavek bifenyly na podporu metabolismu PCBs.

# Kometabolismus PCBs

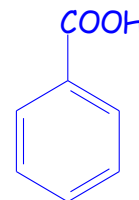


Biphenyl  
dioxygenase

+ O<sub>2</sub>



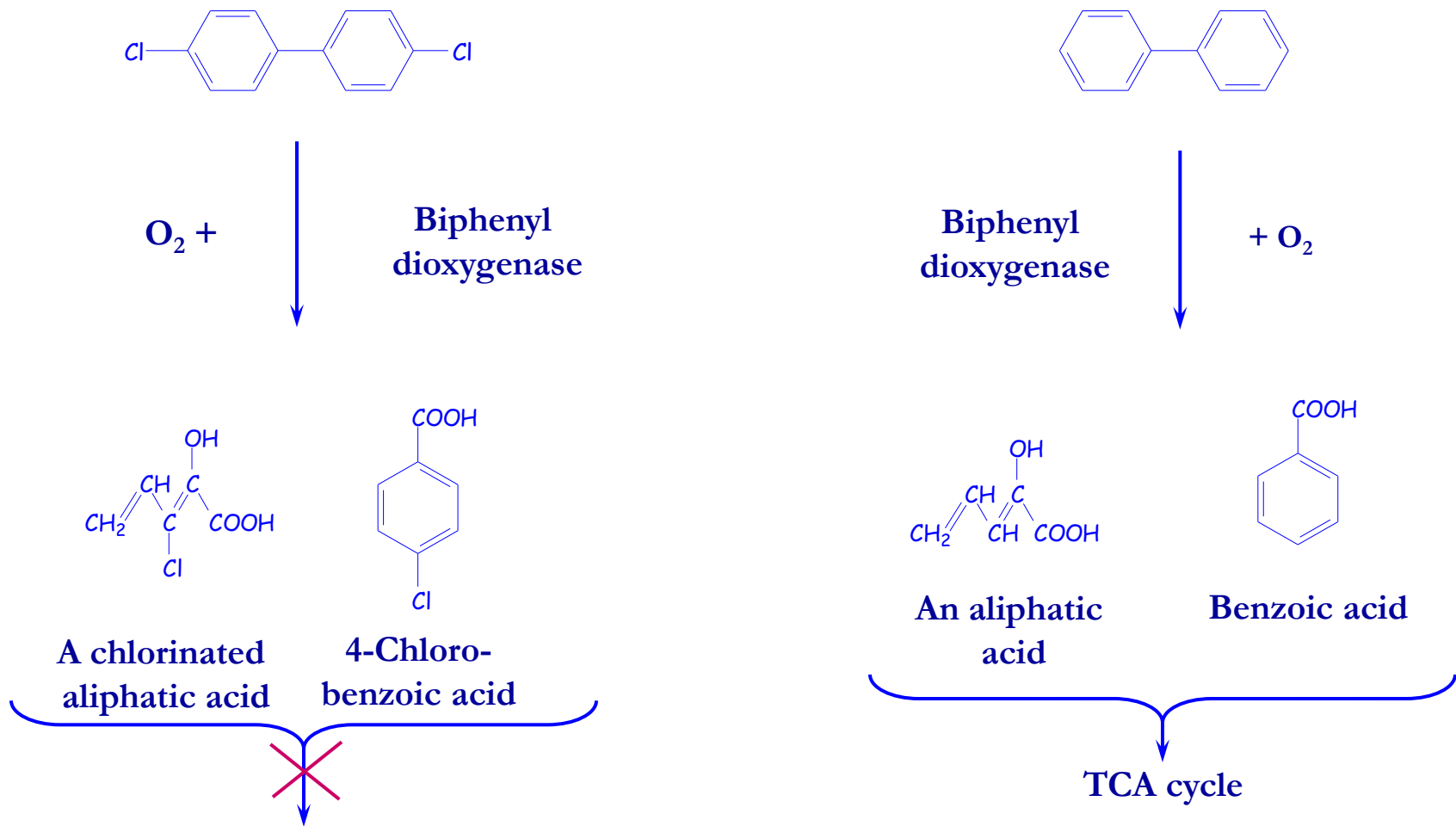
An aliphatic  
acid



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

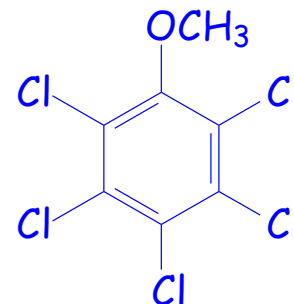
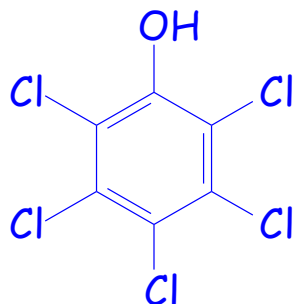
Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy, obvykle v buňce a přes řadu enzymatických kroků může být toxická látka rozložena a poté:

- ↪ 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

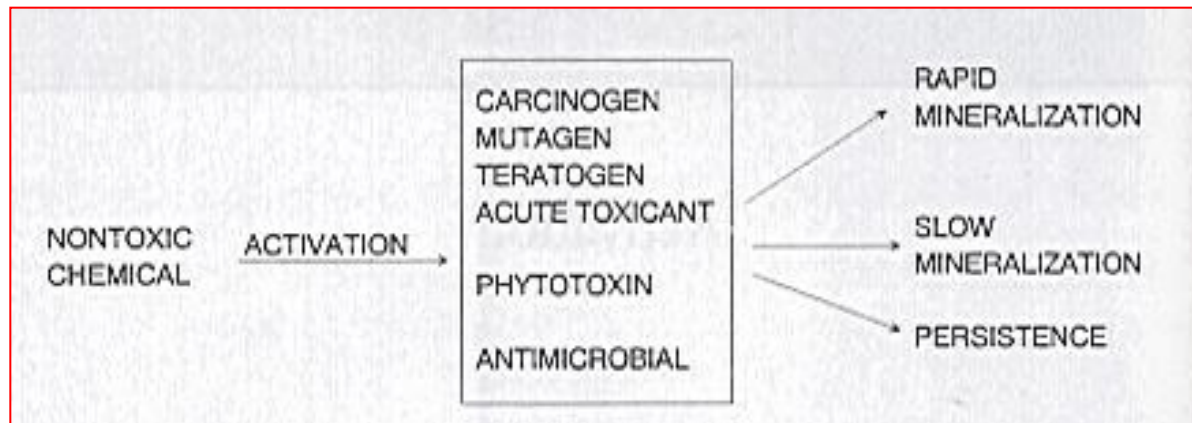
Pentachlor-  
fenol



Pentachlor-  
anisol

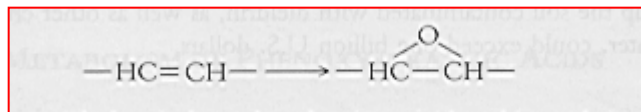
# Ale také aktivace...

“Proces vzniku toxických produktů z neškodných prekurzorů.”



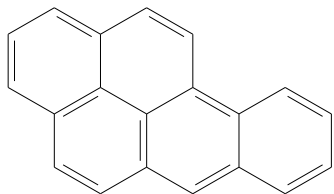
Příklady:

- 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)

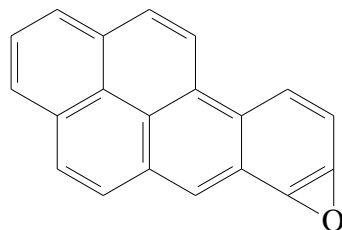
# Aktivace benzo[a]pyrenu (B[a]P)



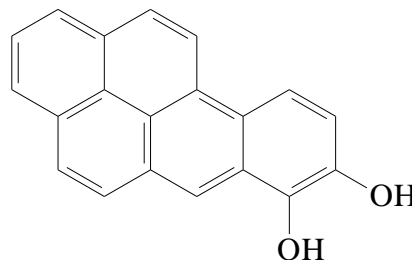
Benzo[a]pyren

Vznik DNA aduktů

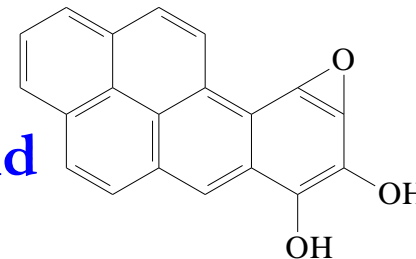
Benzo[a]pyren-  
7,8-epoxid



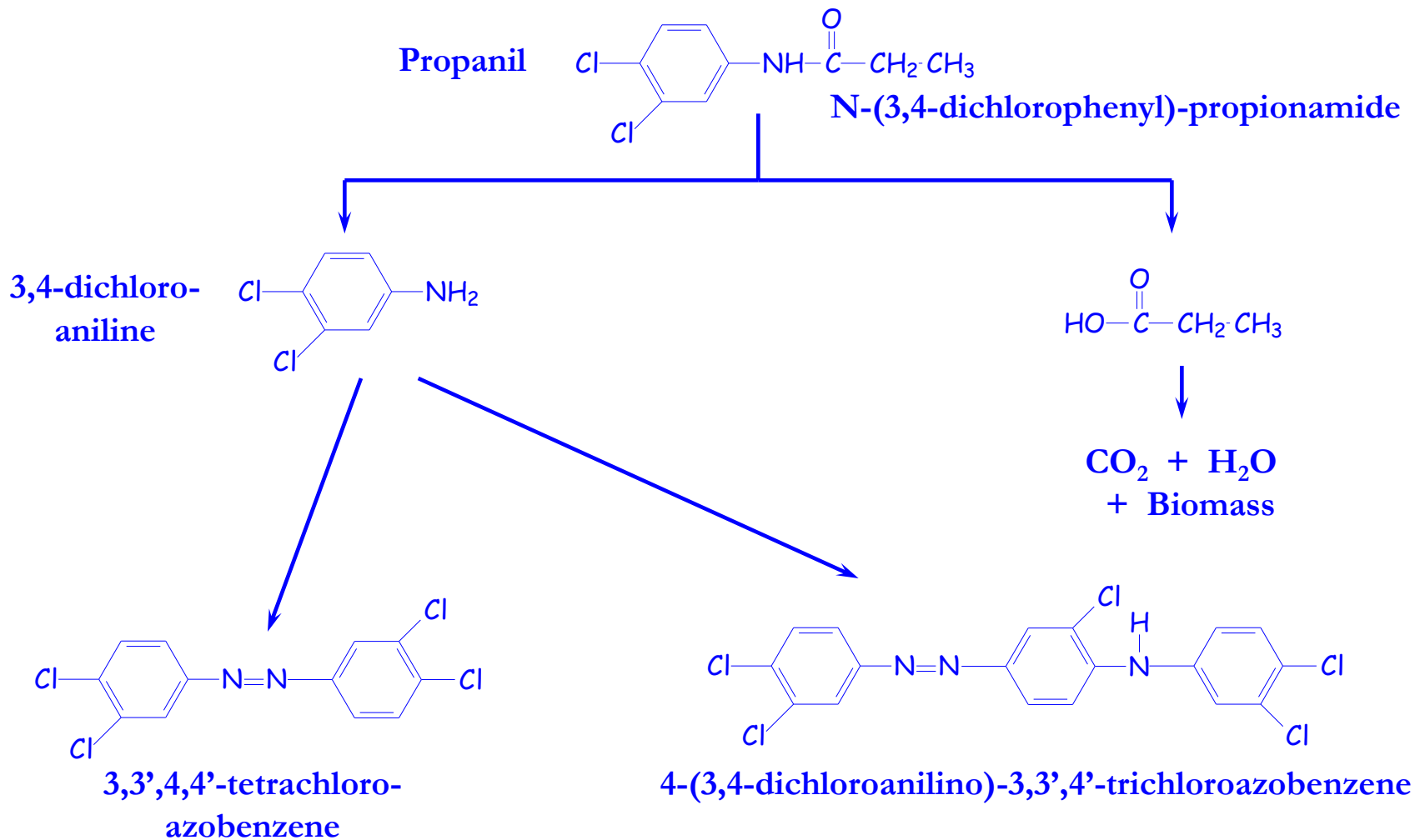
Benzo[a]pyren-  
7,8-diol



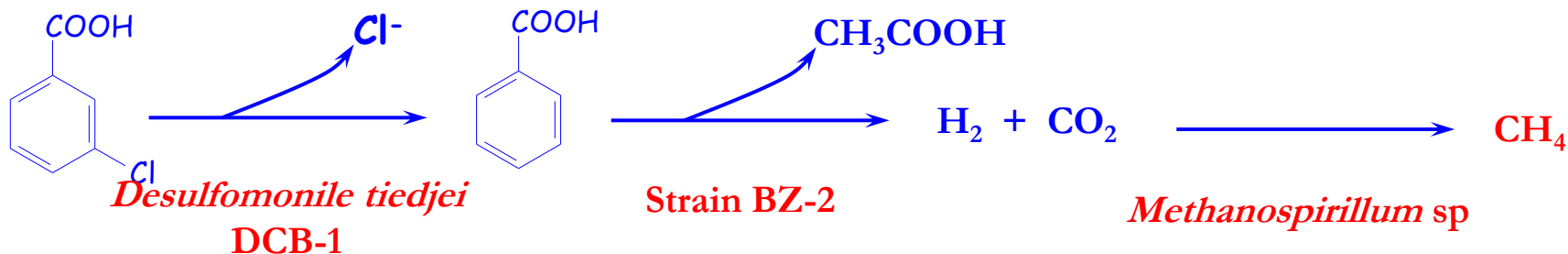
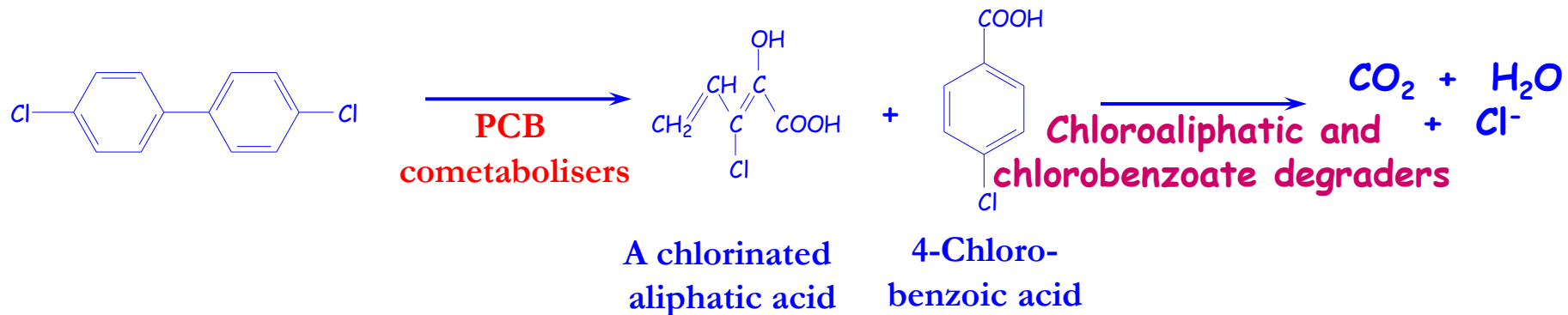
Benzo[a]pyren-  
7,8-diol-9,10-epoxid



# Polymerace

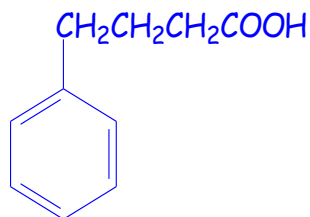


# Mikrobiální konsorcia a biodegradace



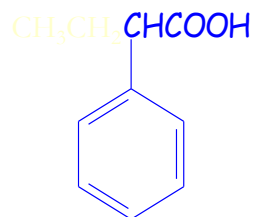
# Chemická struktura a degradace

## 1. Influence of point of linkage



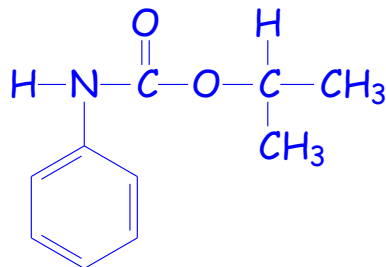
4-phenylbutyric  
acid

Rapidly  
degraded

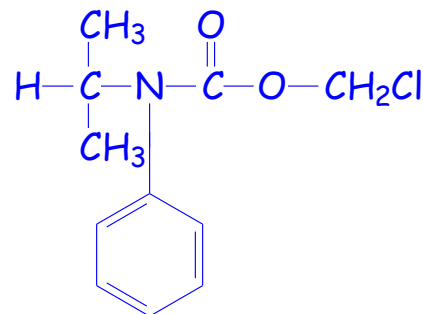


2-phenylbutyric  
acid

Slowly  
degraded



Propam



Propachlor

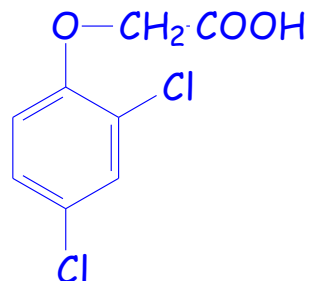
Centre for Toxic Compounds in the Environment

<http://recetox.muni.cz>

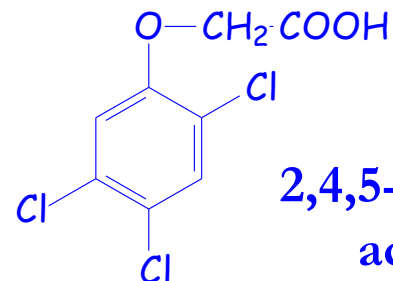
# Chemická struktura a degradace

## 2. Influence of substitution

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

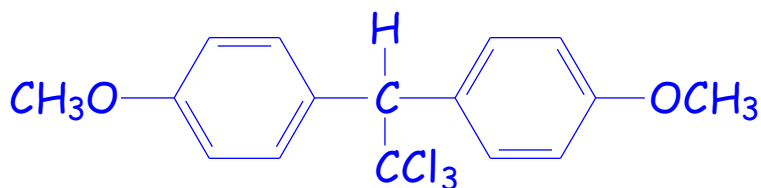


**Rapidly degraded**

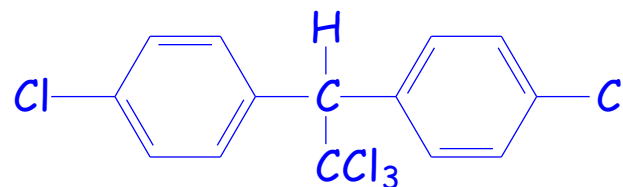


2,4,5-trichloroacetic acid (2,4,5-T)

**Slowly degraded**



Methoxychlor

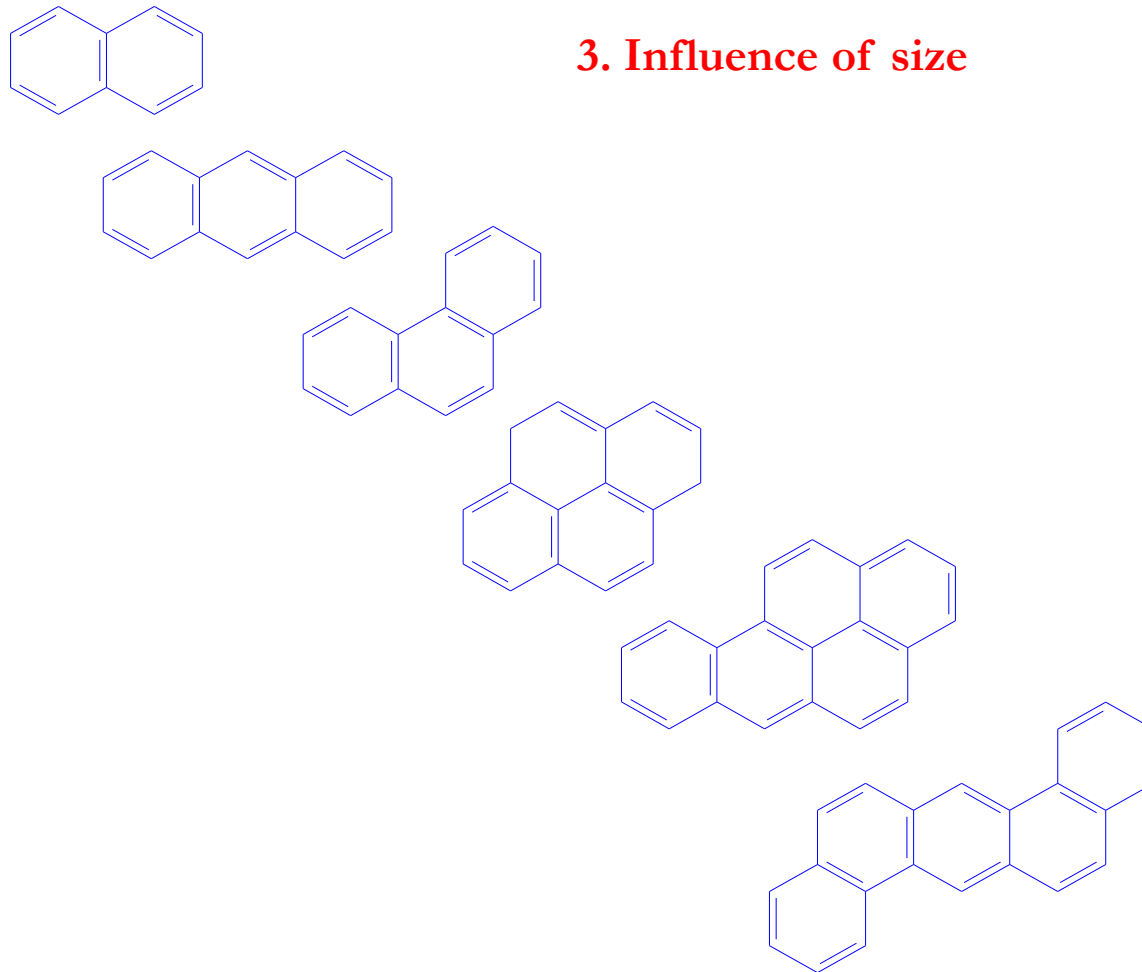


DDT

# Chemická struktura a degradace

Rapidly  
degraded

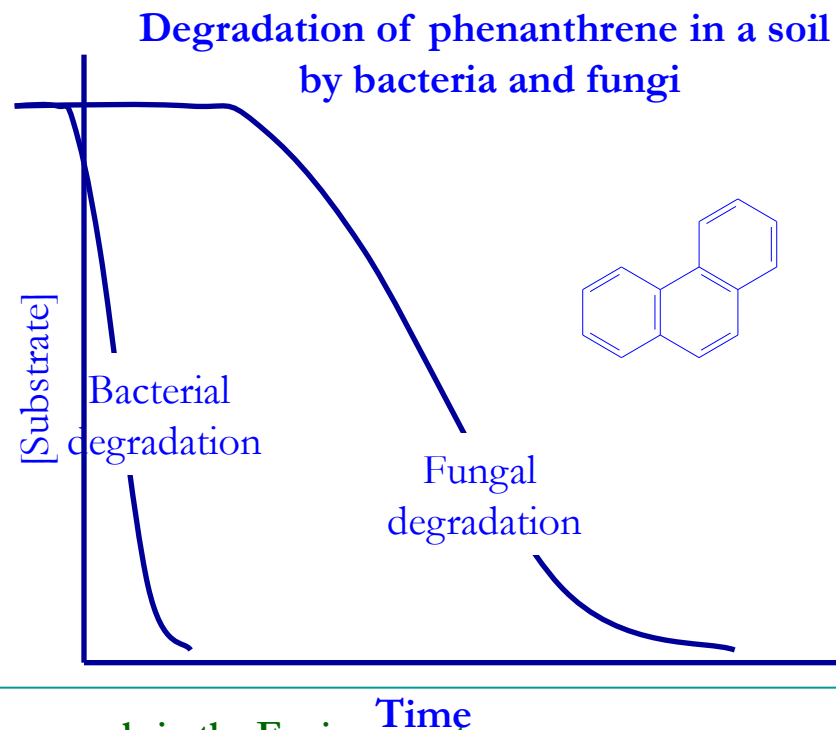
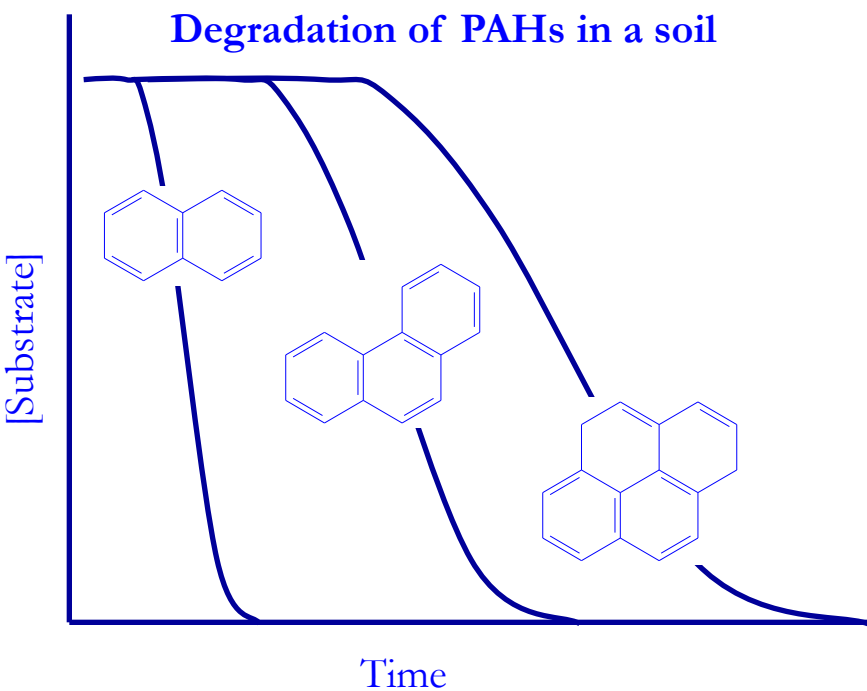
3. Influence of size



Slowly  
degraded



# Chemická struktura a degradace



# Faktory řídicí biodegradace

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

# 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 biodegradačních 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

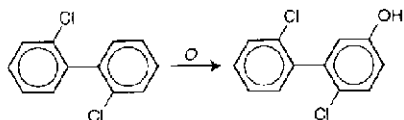
**$\omega$  – oxidace** – počáteční atak alifatického řetězce na koncové methylové skupině, která je oxidována na mastné kyseliny

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

**Štěpení kruhů** – biologické štěpení aromatických kruhů

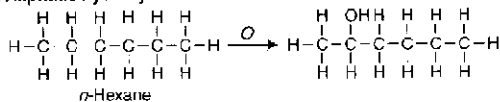
# Typy biodegradčních reakcí

## 1. Aromatic hydroxylation



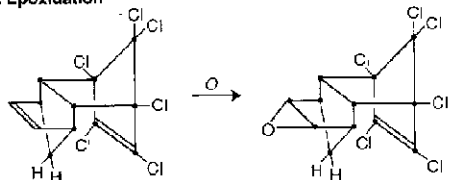
Dichlorophenyl

## 2. Aliphatic hydroxylation



n-Hexane

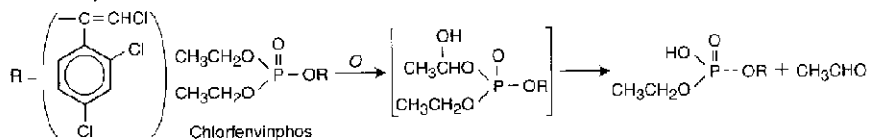
## 3. Epoxidation



Aldrin

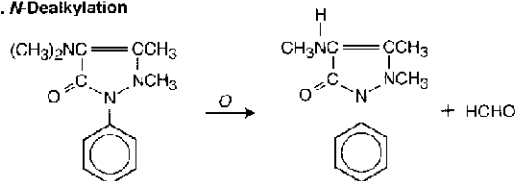
Dieldrin

## 4. O-Dealkylation



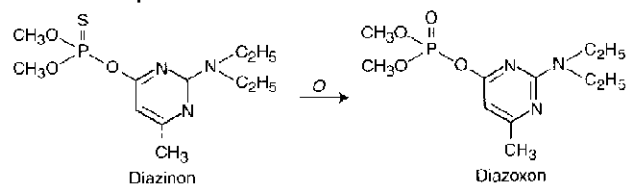
Chlorfenvinphos

## 5. N-Dealkylation



Aminopyrene

## 6. Oxidative desulphuration

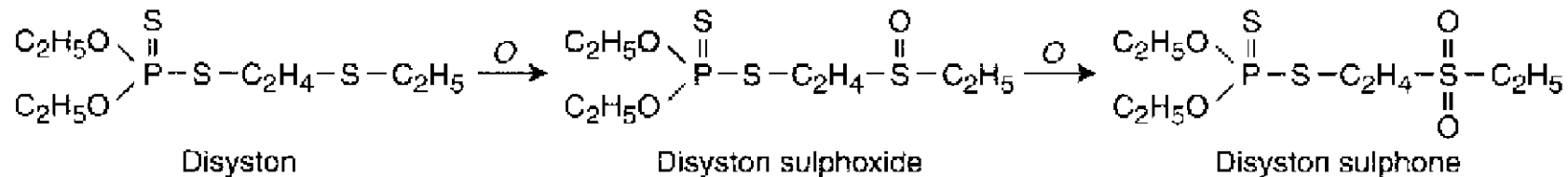


Diazinon

Diazoxon

# Typy biodegradačních reakcí

## 7. Sulphur oxidation



## 8. N-Hydroxylation

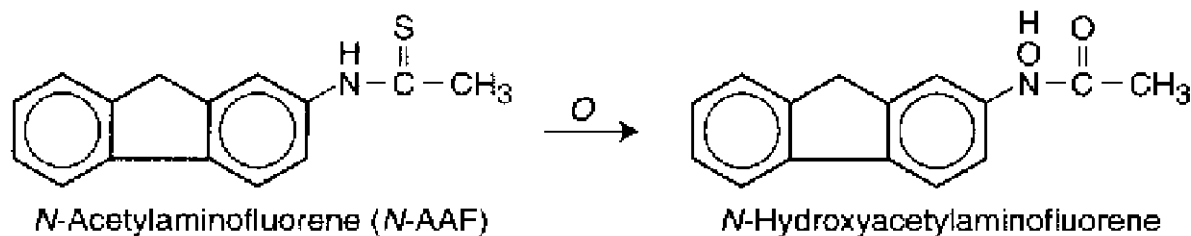
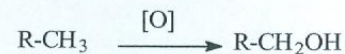


FIGURE 2.5 *Bi transformations by cytochrome P450.*

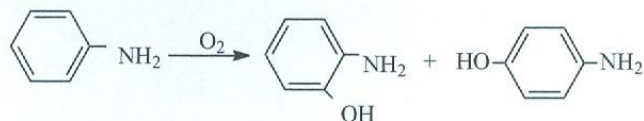
# Typy biodegradačních reakcí

## OXIDATION

### 1. Side-chain oxidation



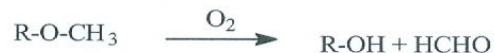
### 2. Aromatic hydroxylation



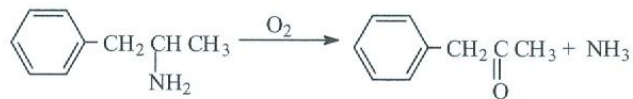
### 3. N-dealkylation



### 4. O-dealkylation

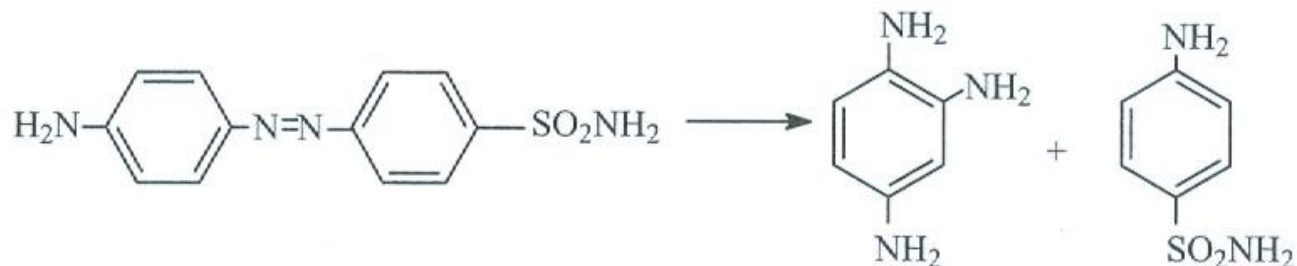


### 5. Deamination



# Typy biodegradačních reakcí

## REDUCTION



## HYDROLYSIS

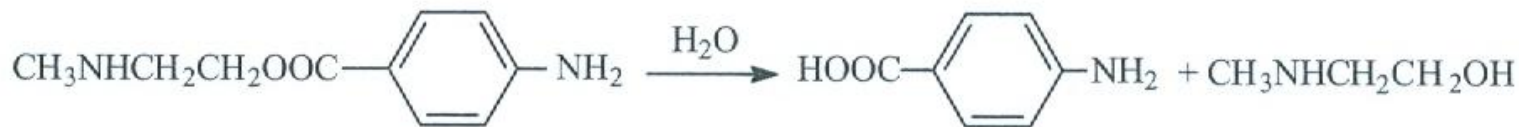


FIGURE 9.28. Examples of Phase I biotransformation reactions.



# Typy biodegradčních reakcí

## CONJUGATION

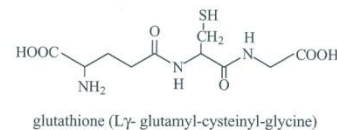
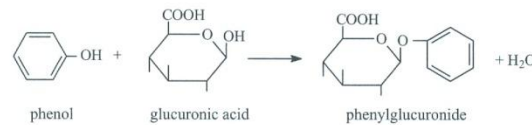
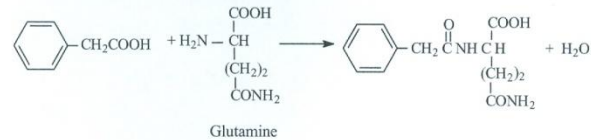


FIGURE 9.29. Examples of Phase II biotransformation reactions.

# 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.

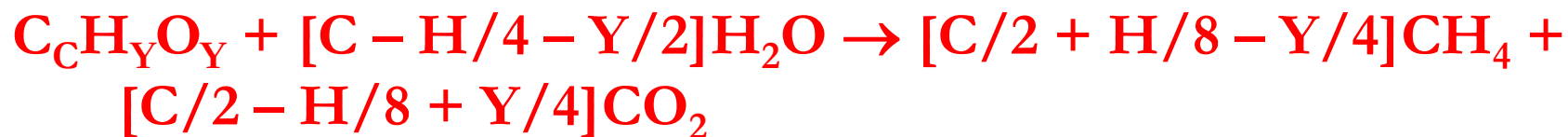
Reakce je stíněna methylem v  $\alpha$ -poloze.

# 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.

# 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

# Biodegradace – reduktivní dehalogenace

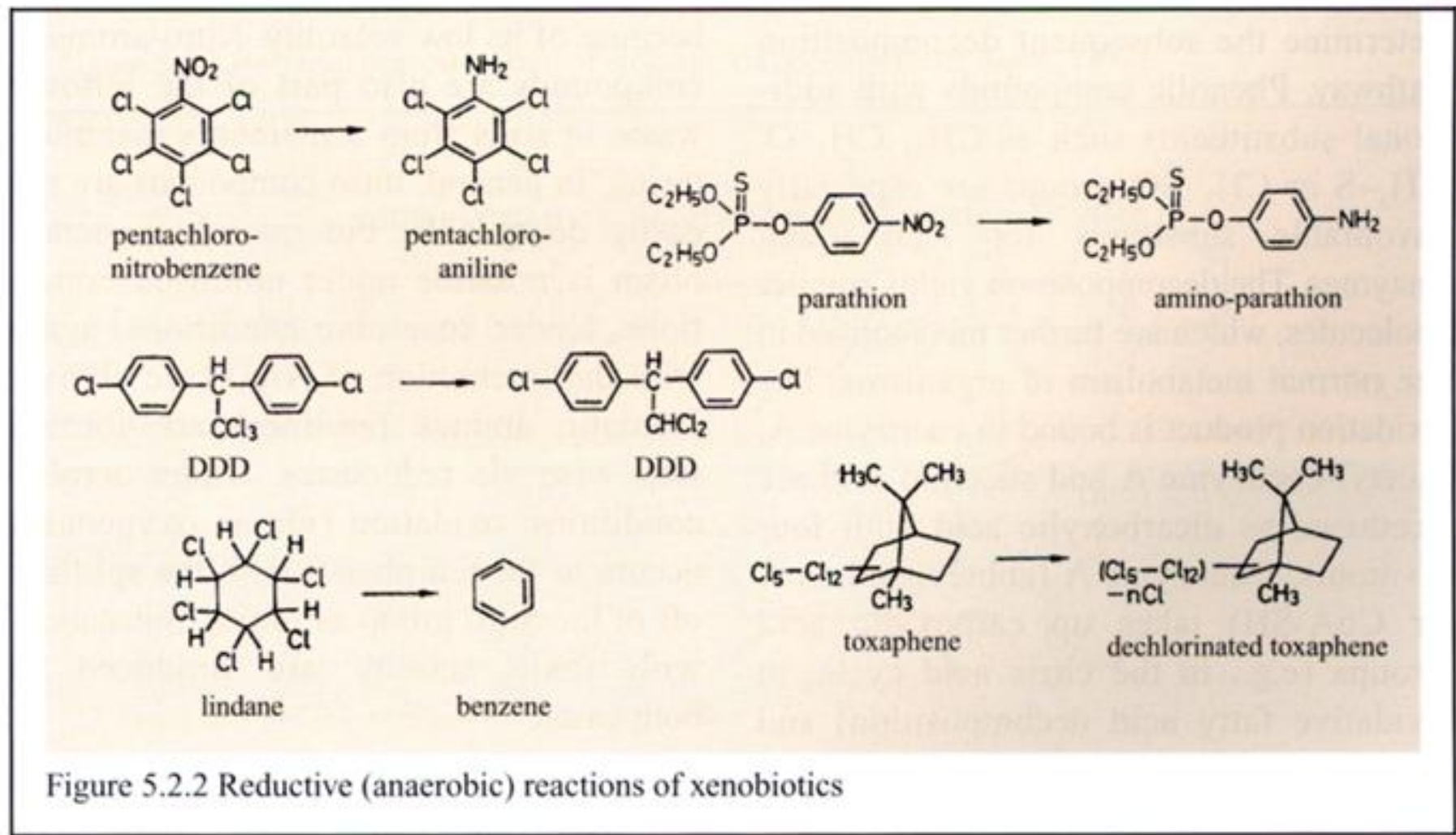


Figure 5.2.2 Reductive (anaerobic) reactions of xenobiotics

# 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  $\Theta$ .

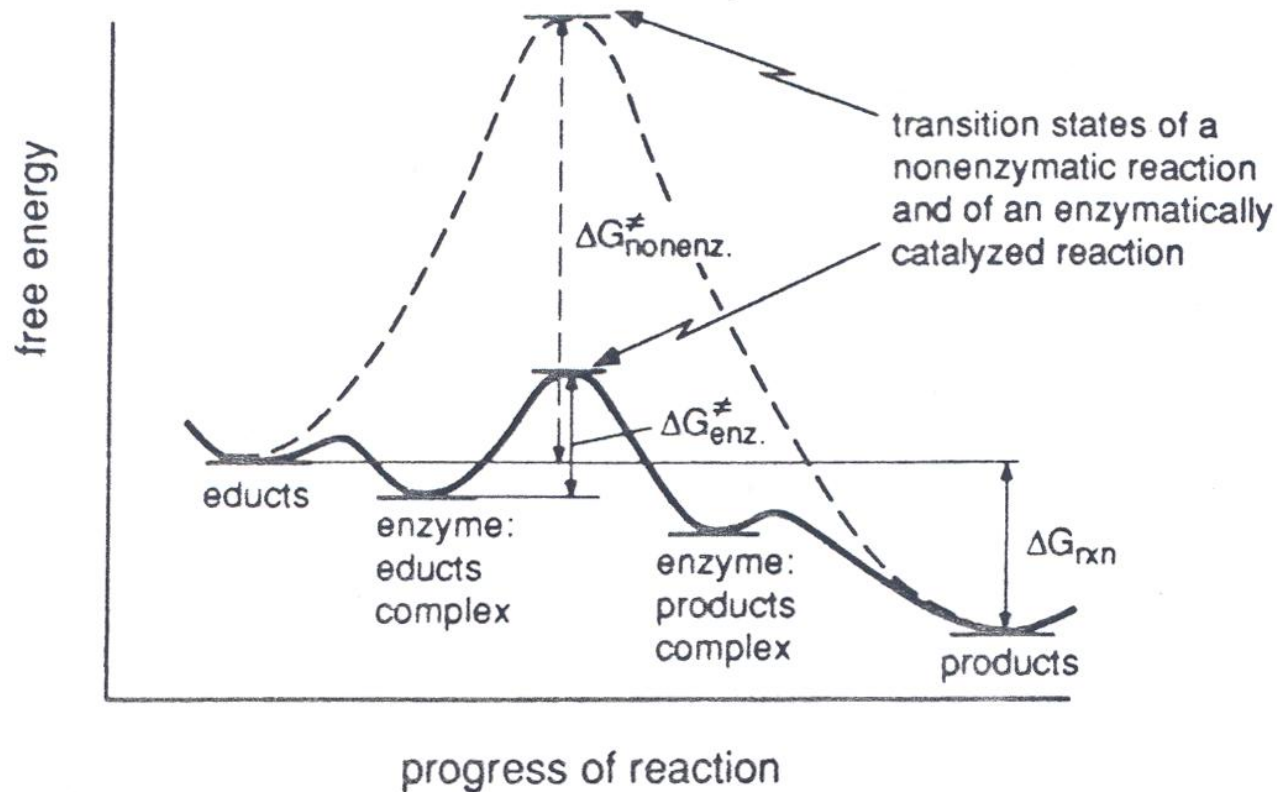
**Rychlost rozkladu látky na objem mokré půdy ( $V * k * \Theta$ ) je rovna rychlosti rozkladu v pórové vodě ( $\Theta * V * k_{pw} * C_{pw}$ ):**

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

kde:

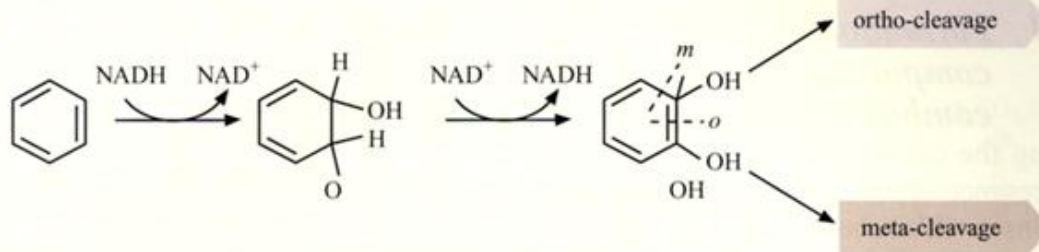
$r$  - poměr suché hmoty k vodní  $[\text{kg.l}^{-1}]$

# Kinetika biodegradace

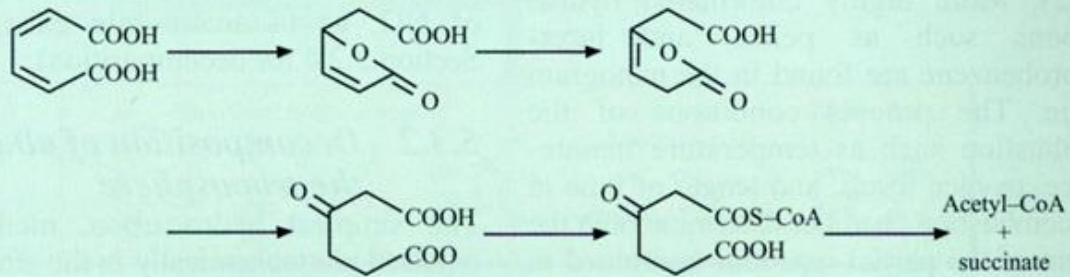


**Figure 14.1** Schematic representation of the change in activation energy barriers for an enzymatically mediated reaction as compared to the analogous noncatalyzed chemical reaction.

# Biodegradace



## *o*-cleavage



## *m*-cleavage

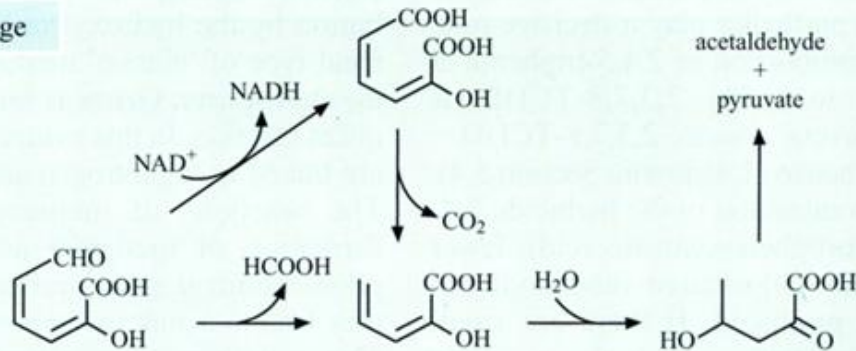
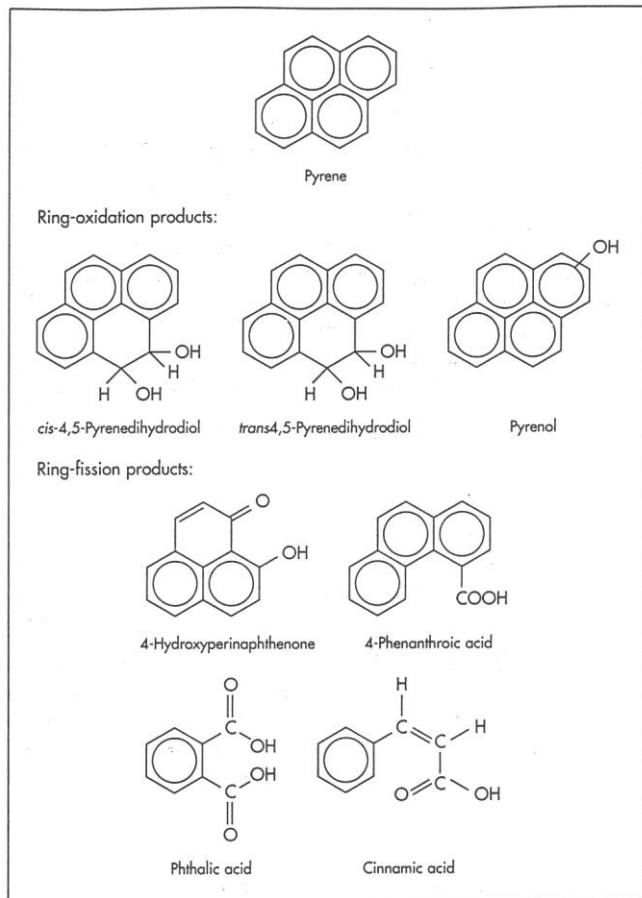





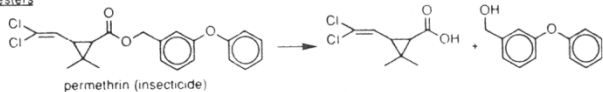



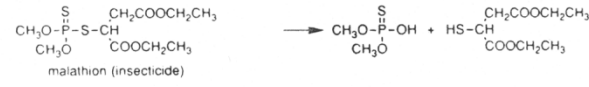
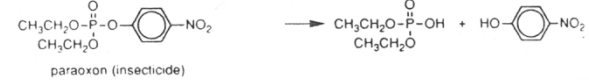
Figure 5.2.3 Bacterial decomposition of aromatic compounds (after Korte, 1992)

# Biodegradace



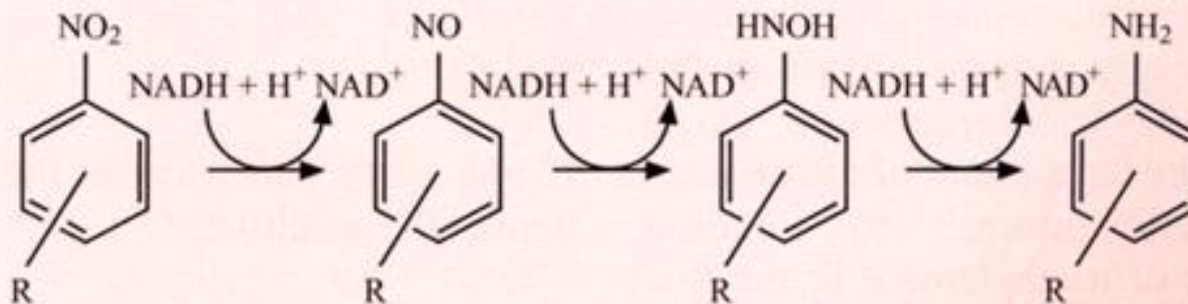
**FIGURE 7.12** Structure of identified pyrene metabolites produced by *Mycobacterium* sp. Source: M. A. Heitkamp et al., *Applied and Environmental Microbiology* 54, no. 10, (1988):2556–65.

**TABLE 14.5** Some Microbially Mediated Hydrolysis Reactions

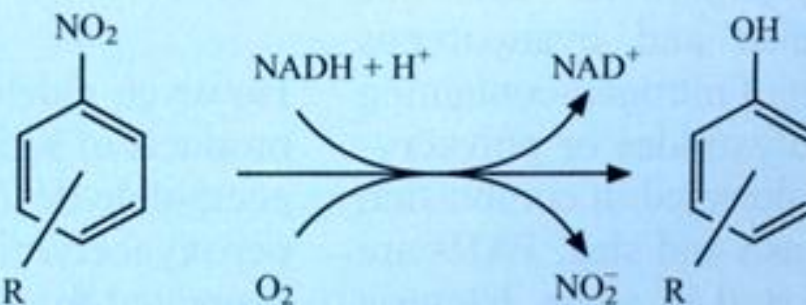
Substrate	Product(s)
<b>alkyl halides</b>	
	
	
	
<b>esters</b>	
	
<b>amides</b>	
	
<b>carbamates</b>	
	
<b>ureas</b>	
	
<b>(thio)phosphates</b>	
	
	



# Biodegradace



1. Reductive decomposition



2. Oxidative decomposition

Figure 5.2.4 Decomposition of aromatic nitro compounds

# Biodegradace

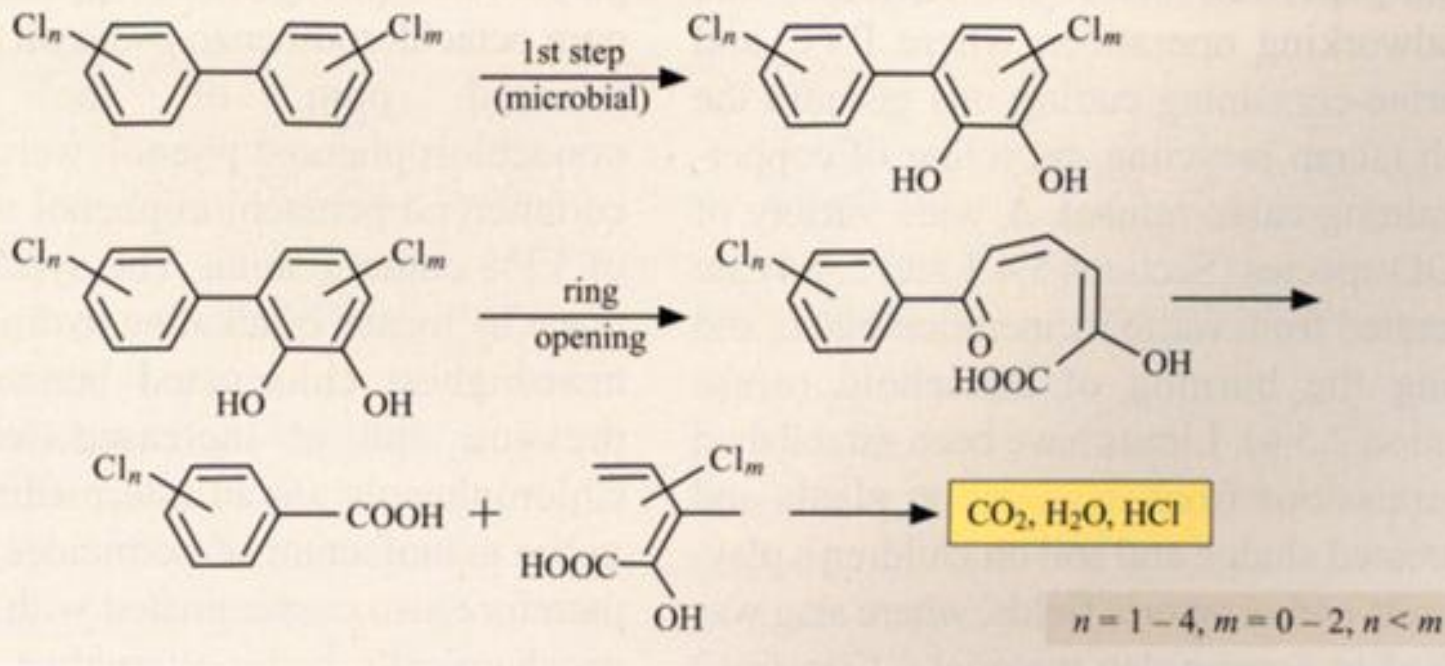


Figure 5.3.7 Decomposition of PCBs

# 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 xenobiotické látky 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

## 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

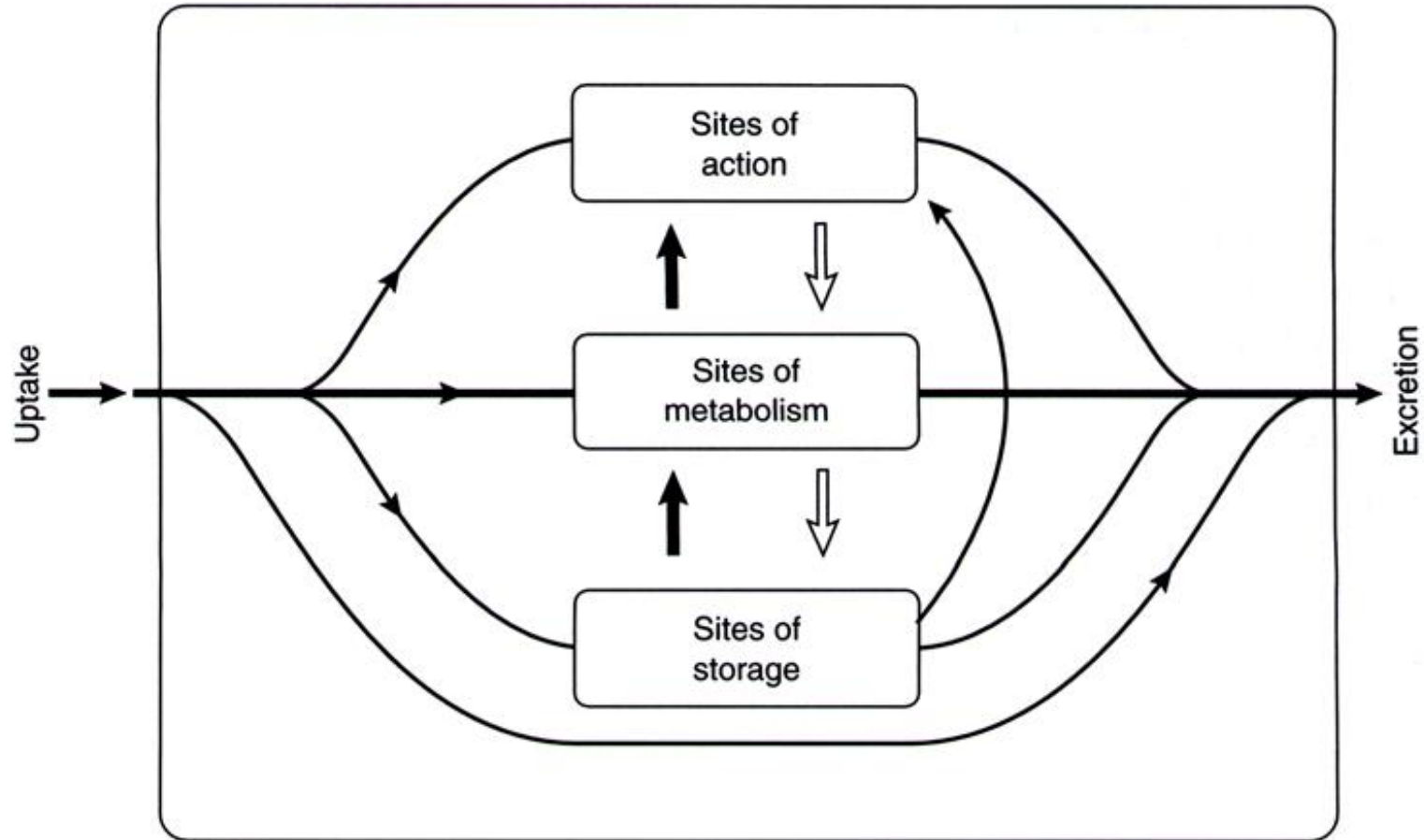


FIGURE 2.1 *Toxicokinetic model.*

# Biotransformace

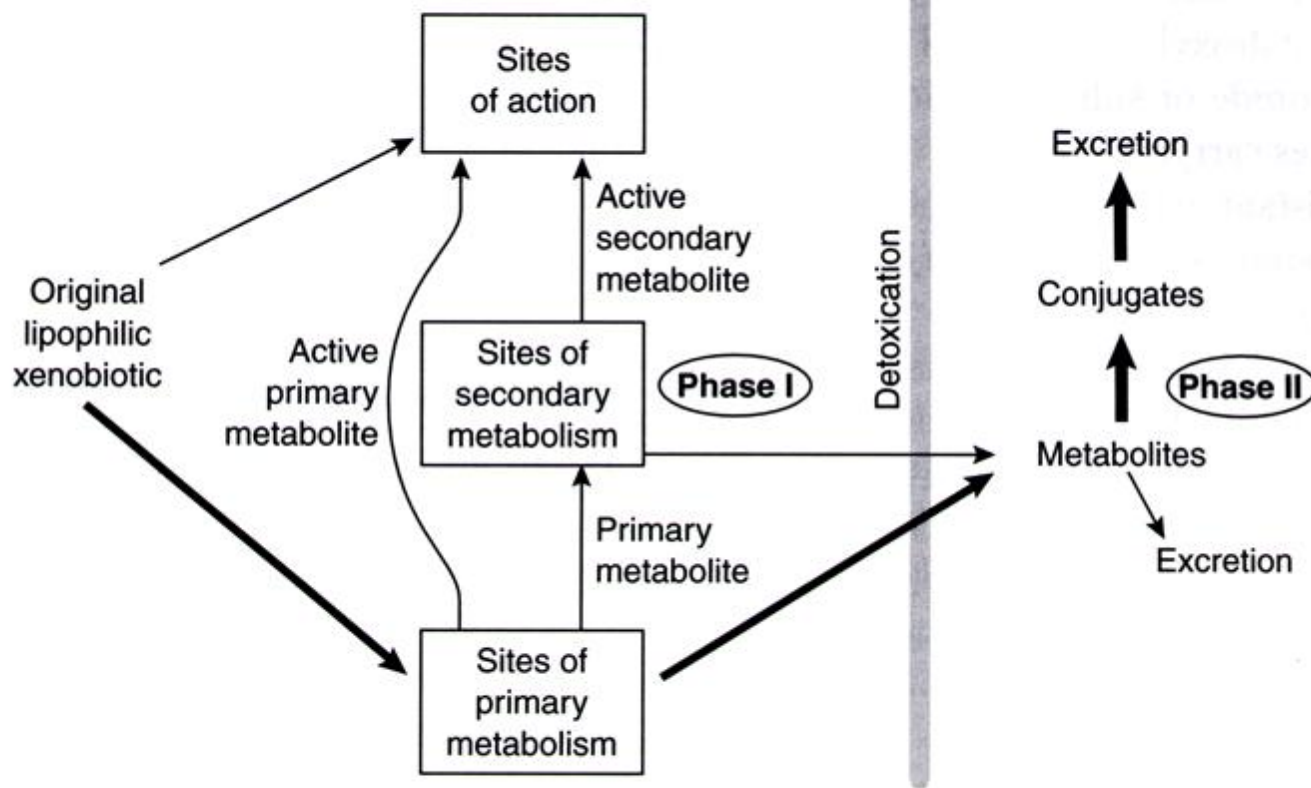


FIGURE 2.2 *Metabolism and toxicity.*



# Biotransformace

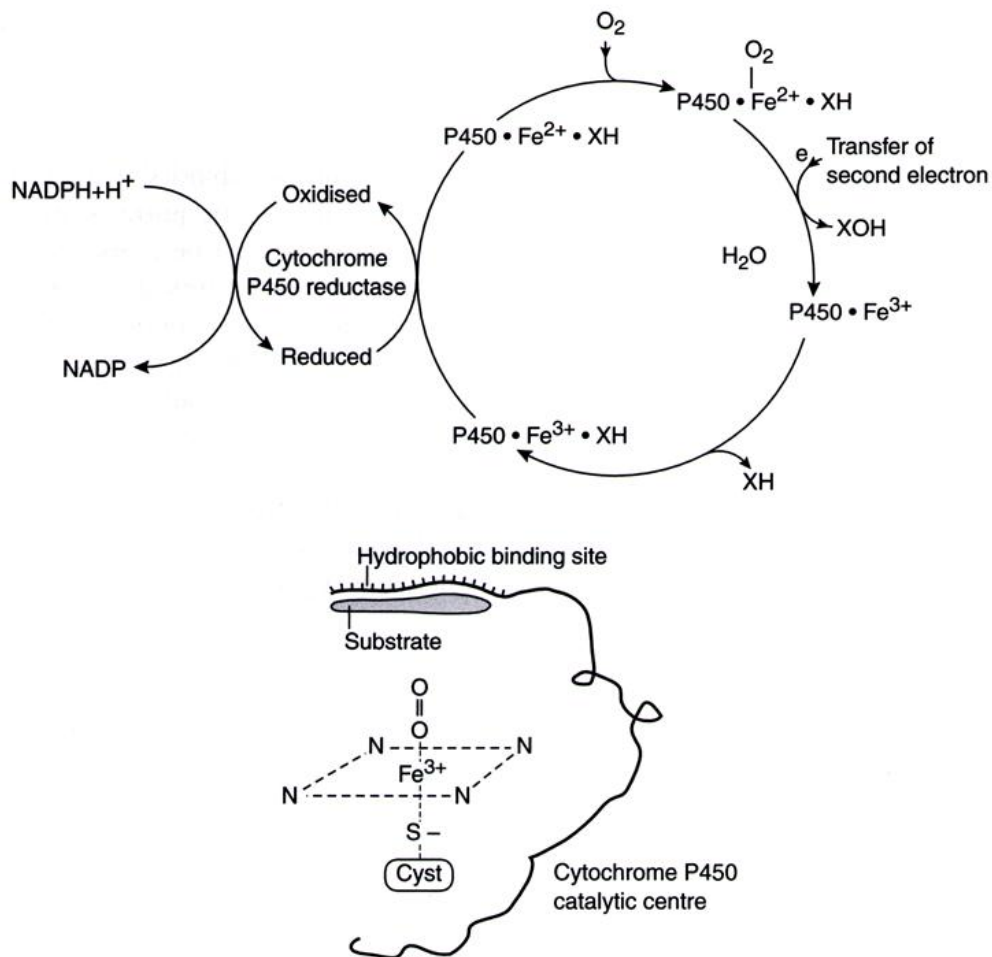


FIGURE 2.3 Oxidation by microsomal monooxygenases.

# Biotransformace

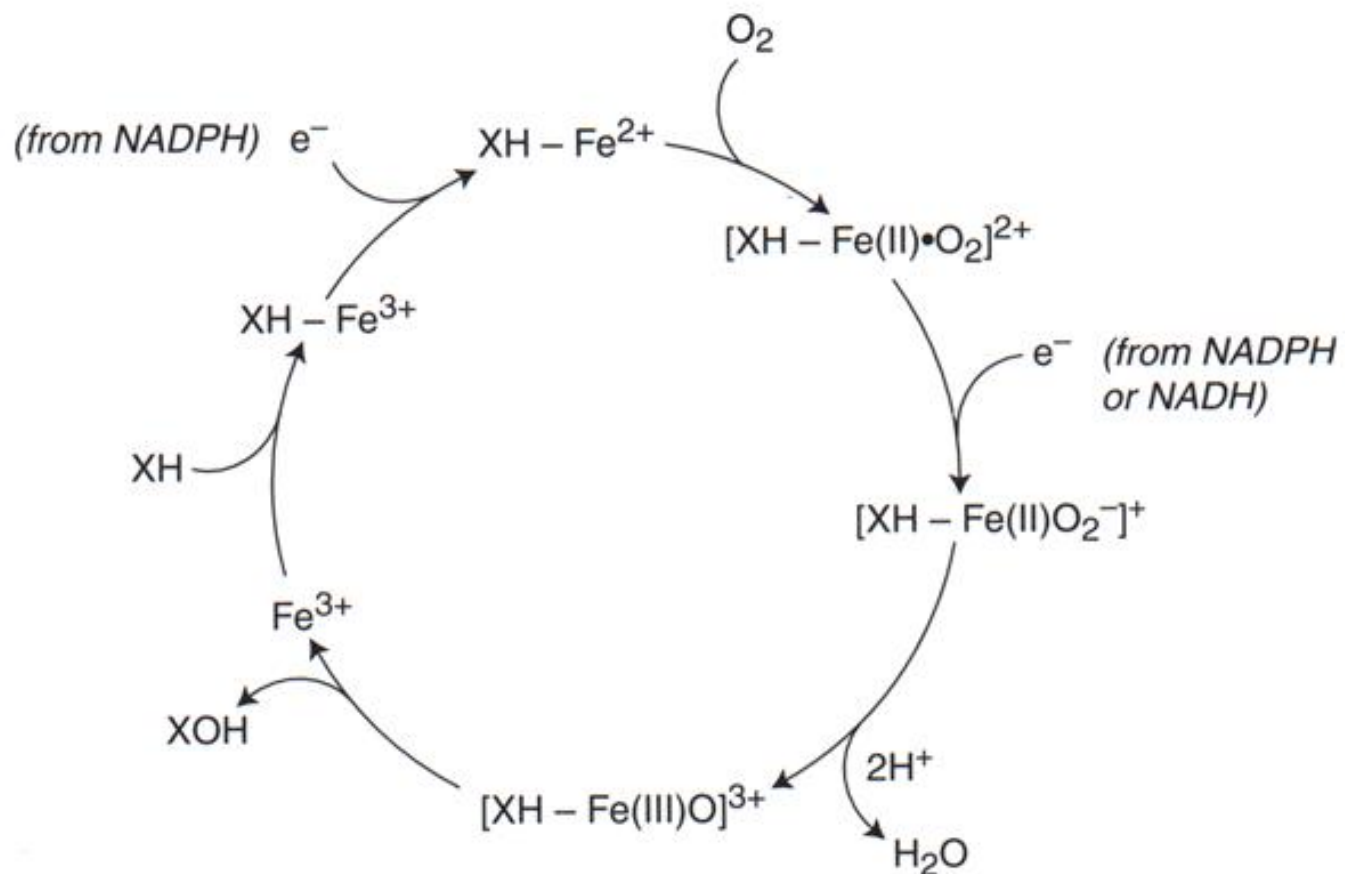


FIGURE 2.4 Proposed mechanism for monooxygenation by cytochrome P450.

# Biotransformace

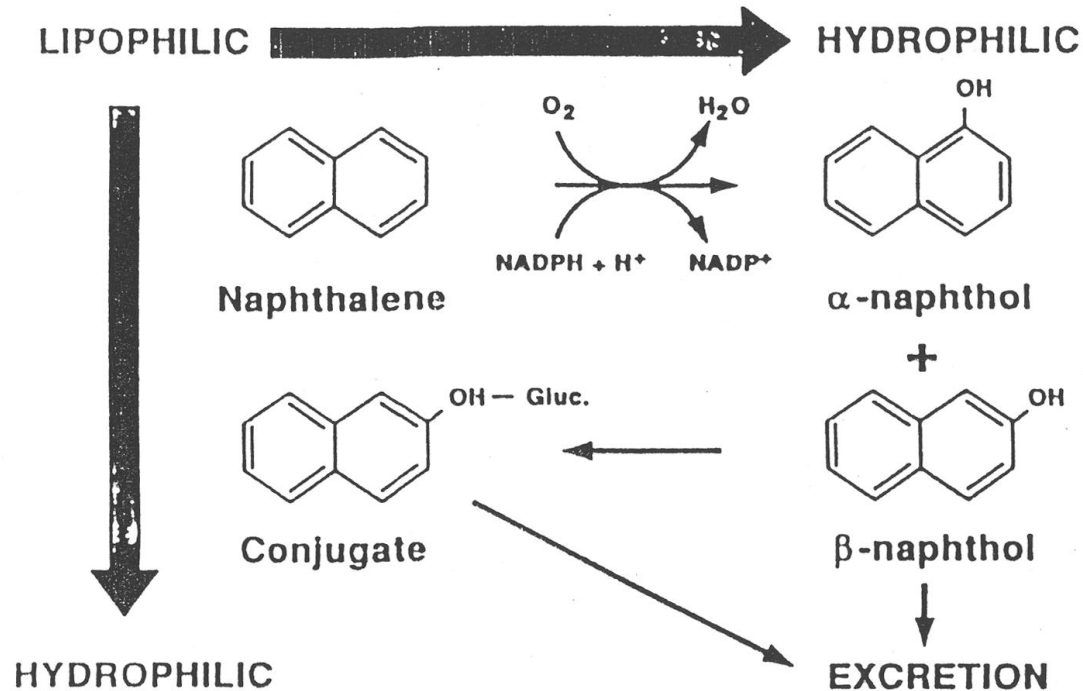
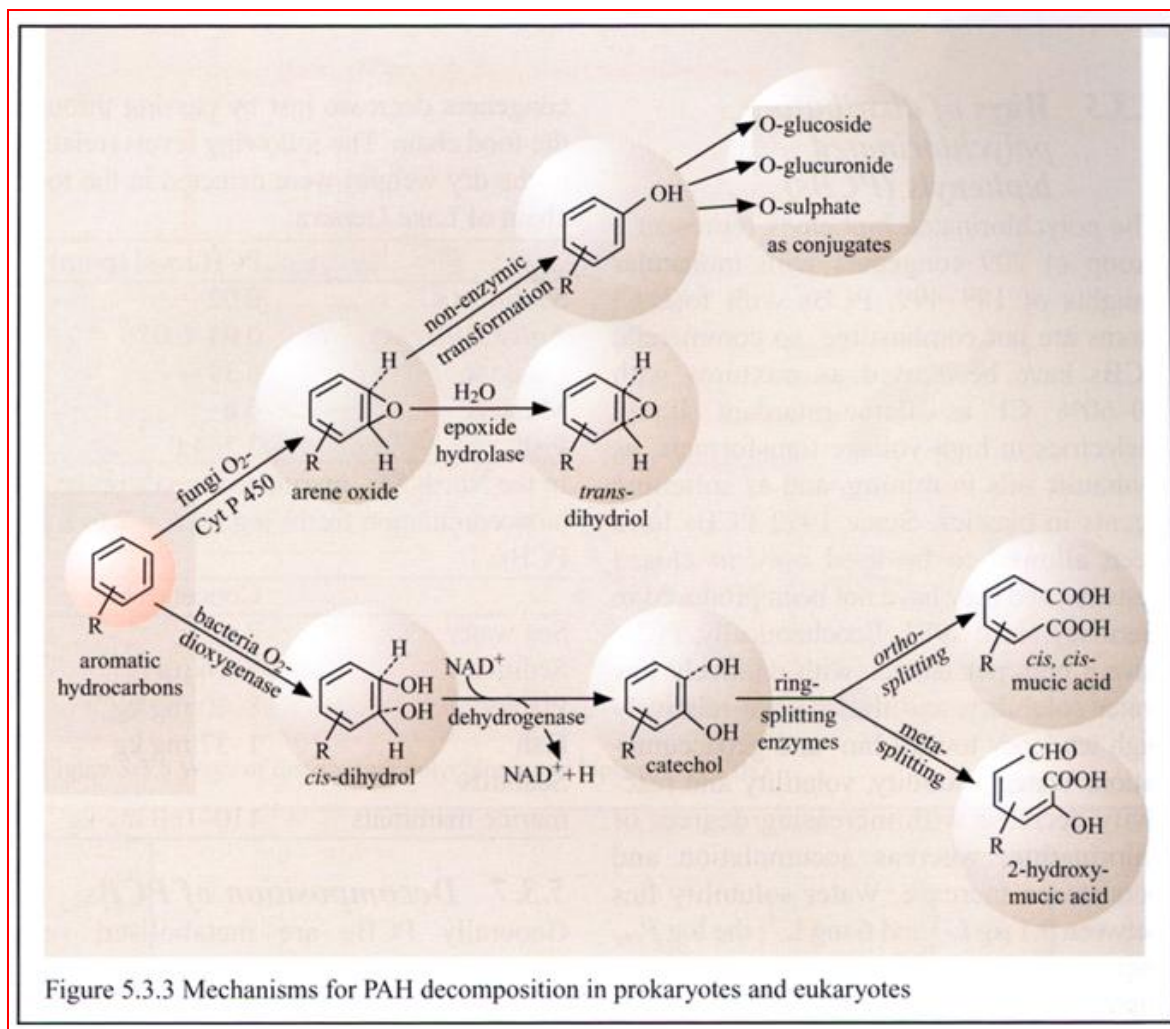
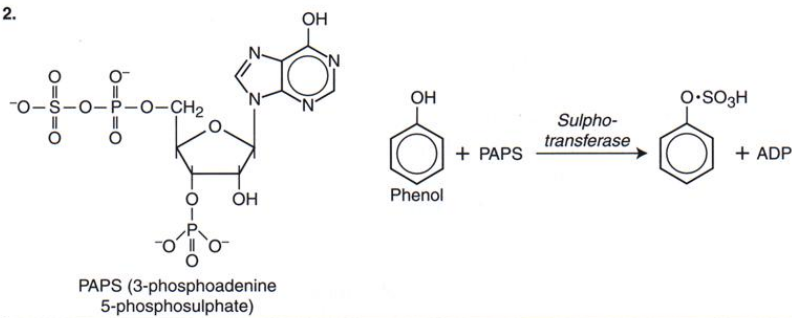
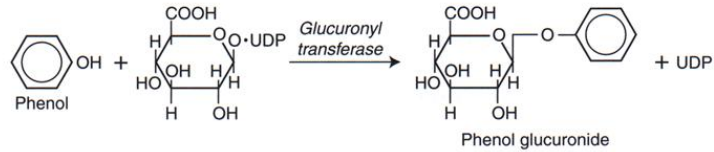


Figure 1. The cytochrome P-450 mixed function oxidase system facilitates excretion of lipophilic organic substrates in terrestrial and aquatic animals by producing metabolites that are more water soluble than the parent compound. Common metabolites of naphthalene are shown (after 2).

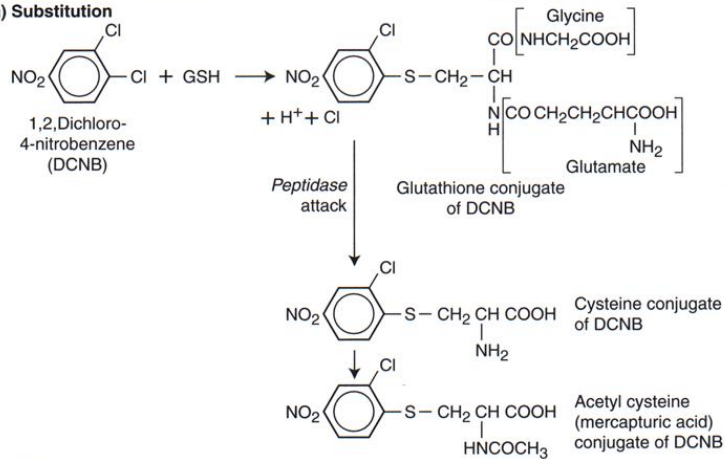
# Biotransformace



# Biotransformace



### 3. (a) Substitution



### 3. (b) Addition to epoxide

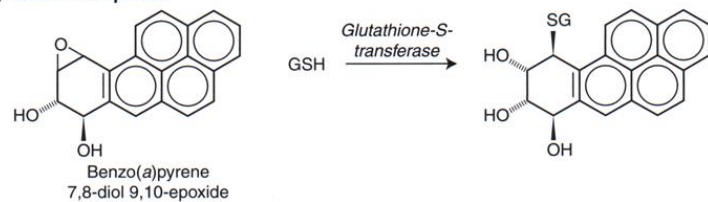


FIGURE 2.14 Phase II biotransformation—conjugation. 1. Glucuronide formation. 2. Sulphate formation. 3. Glutathione conjugation.

# Biotransformace

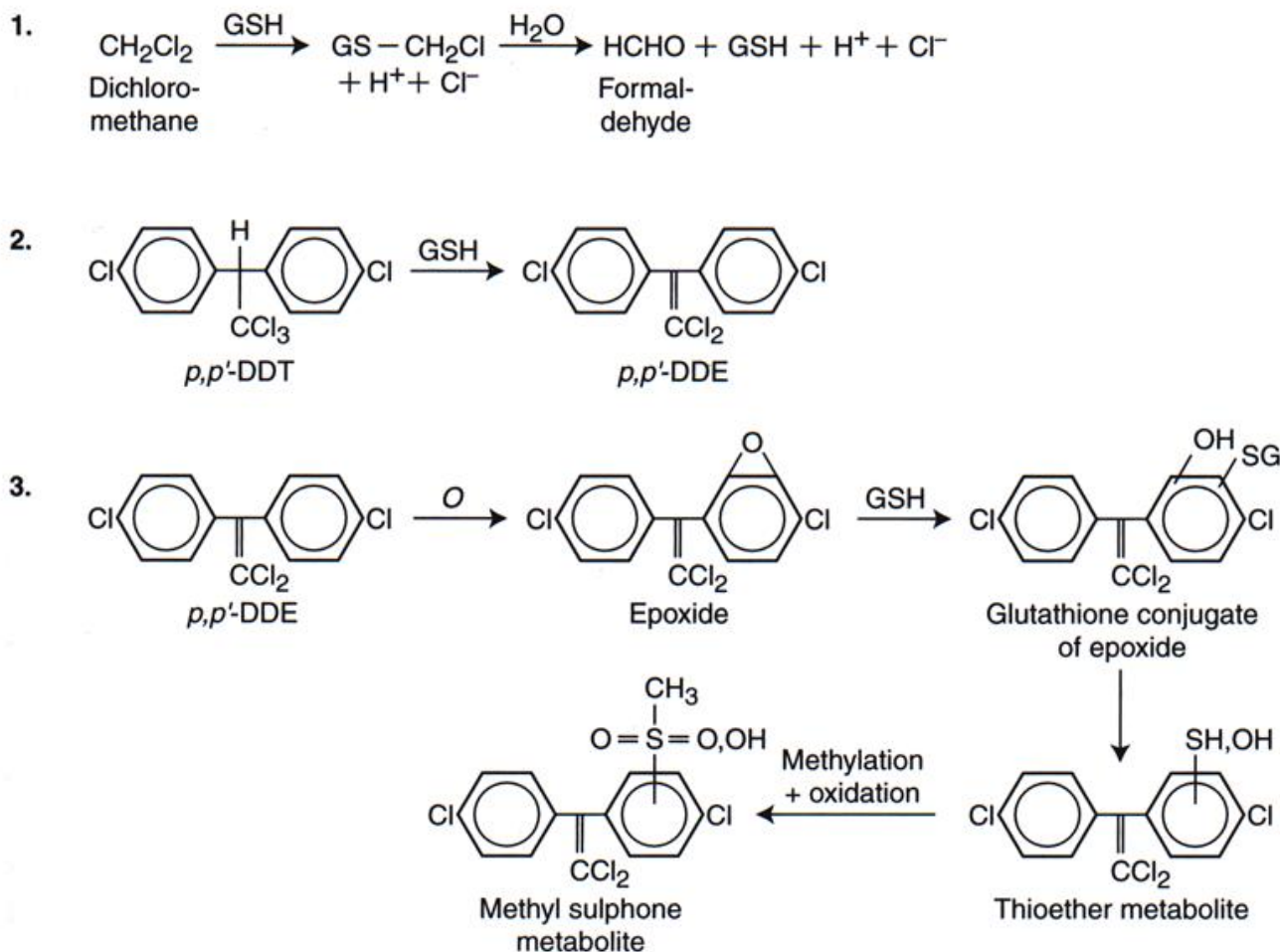


FIGURE 2.15 *Glutathione-S-transferase attack on organochlorine compounds.*