

# Vermiremediace čistírenských kalů: vliv žížal na mikropolutanty a naopak

Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

---

Laboratoř environmentální biotechnologie

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.



# Obsah přednášky

---

1. Vermikompostování a vermiremediace obecně
2. Problematika mikropolutantů
3. Design experimentu
4. Postup analýz
5. Výsledky
6. Závěr

# Vermikompostování

---

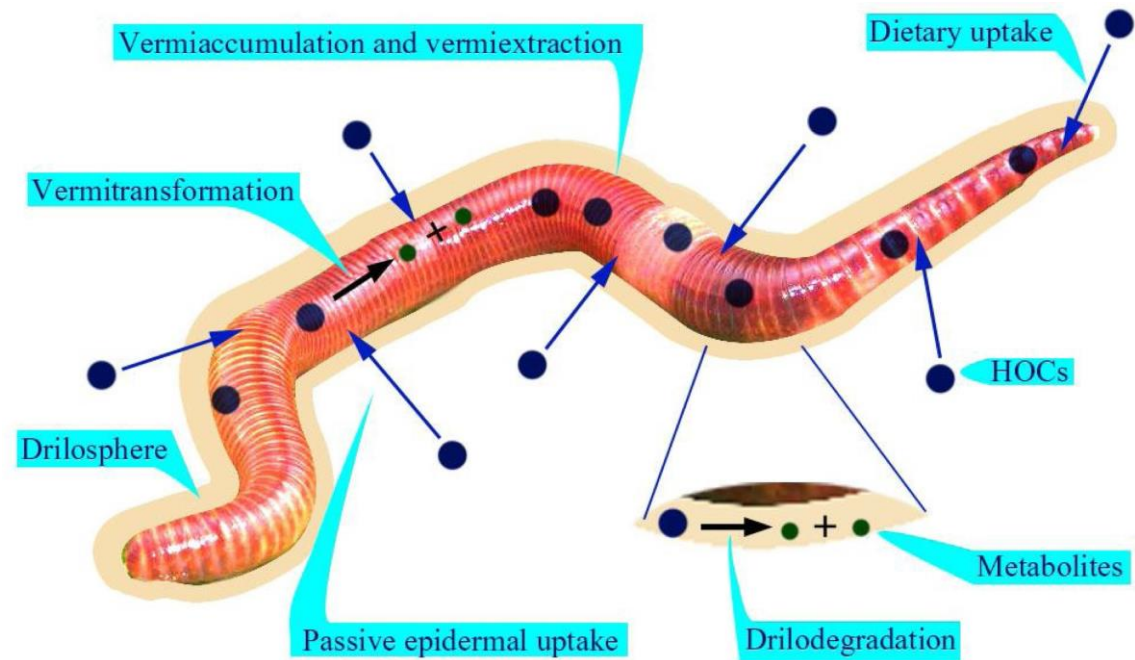
- žížaly rozkládají organickou hmotu a organické polutanty
- celá řada procesů: rozměňování ústy, provzdušňování, činnost mikroorganismů, jejich enzymů a enzymů žížaly
- produkt vermikompost je bohatý na nutrienty
- možná stabilizace a dekontaminace čistírenského kalu



<http://g2nursery.com/product/vermicompost/>

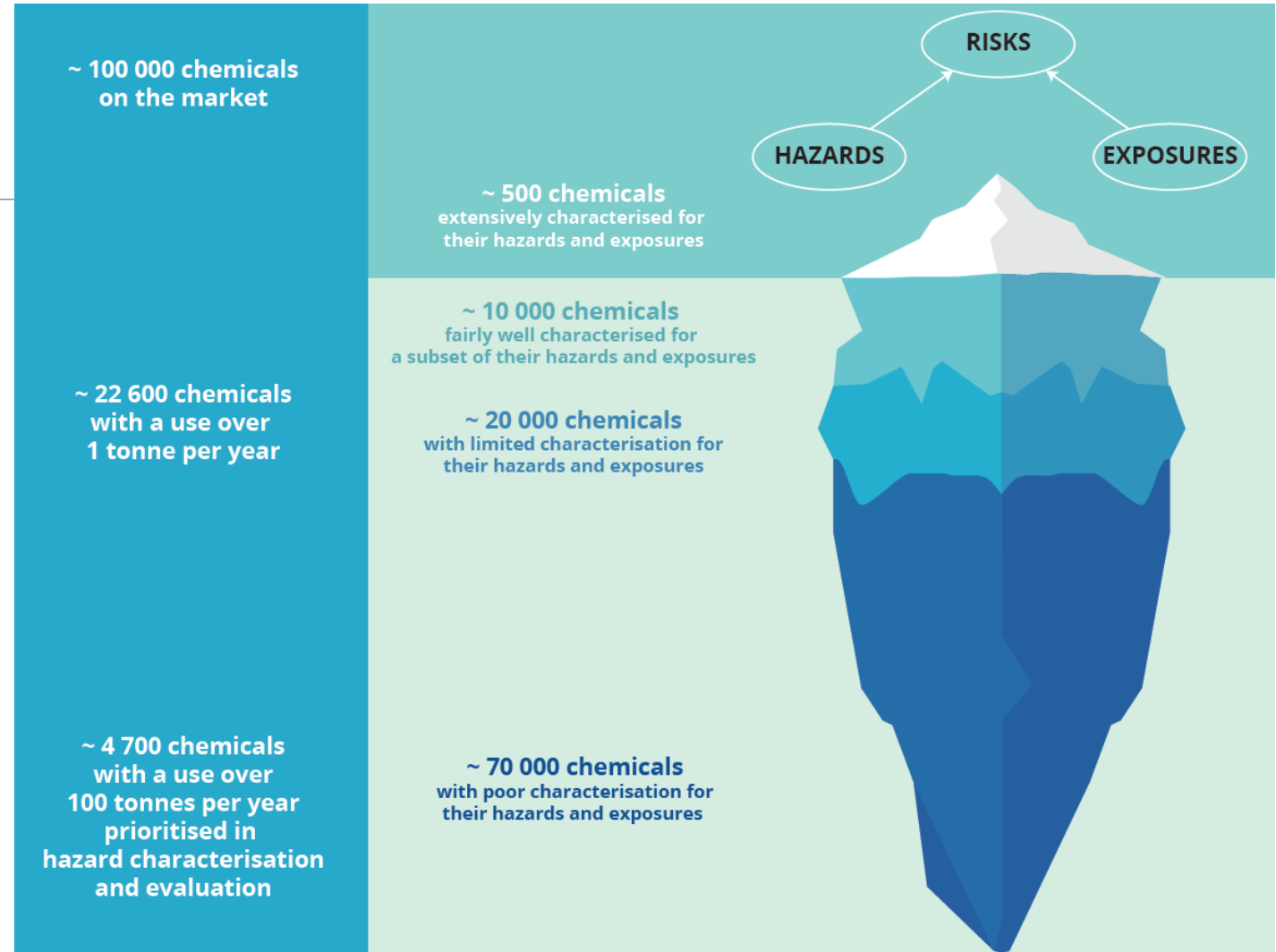
# Vermiremediace

- remediace polutantů pomocí vermikompostování
- těžké kovy, PCB, PAU, ropné uhlovodíky
- mikropolutanty?



Shi et al., 2020. Vermiremediation of organically contaminated soils: Concepts, current status, and future perspectives

# Mikropolutanty



# Mikropolutanty

## Mikropolutanty

- často nově se objevující látky, které nelze účinně odstranit běžnými procesy čištění vod, které jsou detekovány ve velmi malých koncentracích napříč planetou

## Farmaka a látky z produktů osobní spotřeby (Pharmaceuticals and personal care products)

- skupina polutantů (většinou mikropolutantů), které jsou detekovány v ŽP - farmaka, kosmetika, hygienické prostředky apod.

## Nově se objevující polutanty (New emerging pollutants)

- obecně široká skupina látek antropogenního původu, nově se objevujících v ŽP



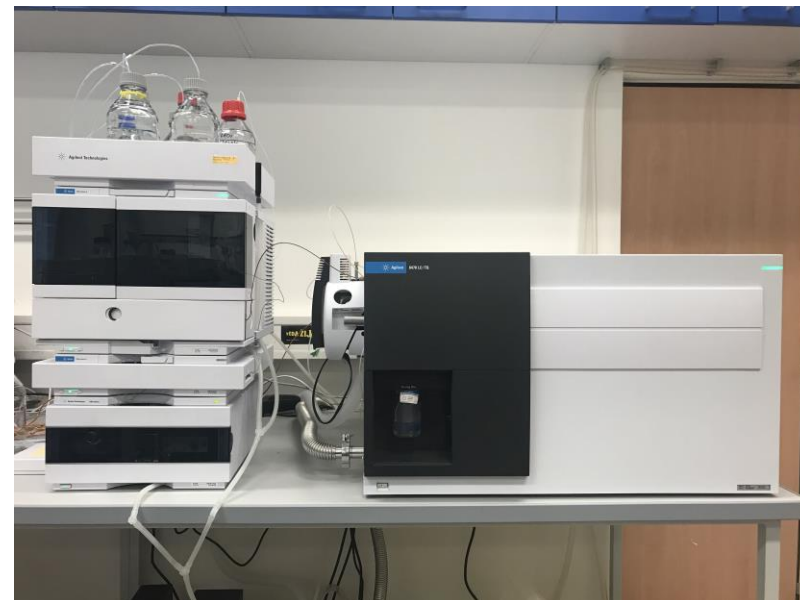
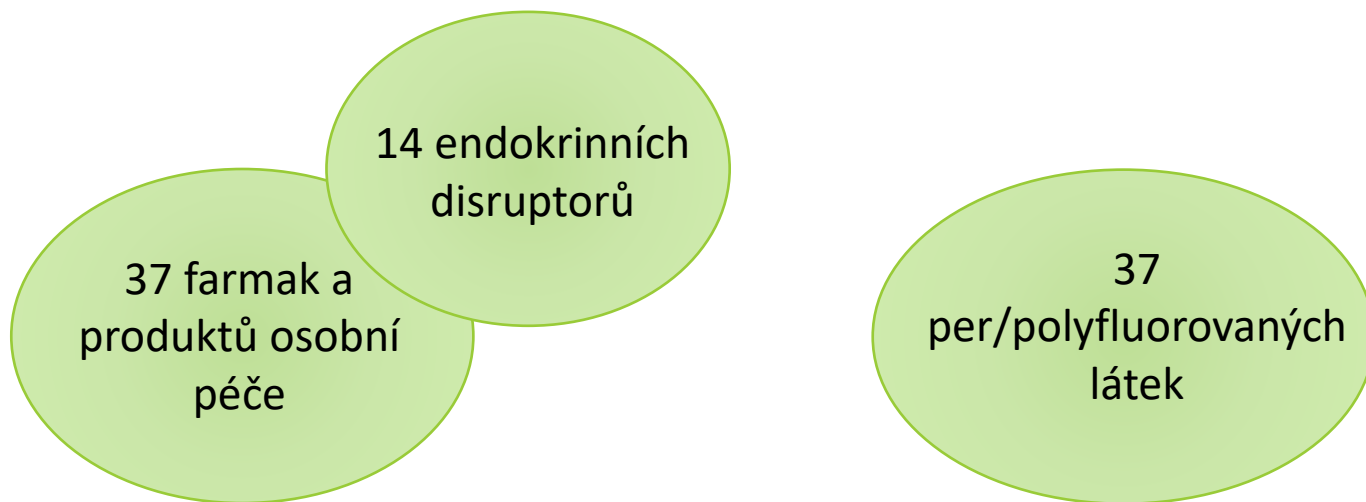
# Design experimentu

- 2 čistírenské kaly (SS – sewage sludge) pocházející ze 2 různých čistíren odpadních vod (WWTP1 a WWTP2)
- kal smíchan s vlhčenými slaměnými peletami v různém poměru– 0, 25, 50 a 75% kalu
- triplikáty
- žížaly *Eisenia andrei*
- 20 žížal/200 g substrátu
- kontrolní vzorky – bez žížal
- 6 týdnů
- textilní sáčky
- stabilní teplota a vlhkost
- tma



# Analýza mikropolutantů

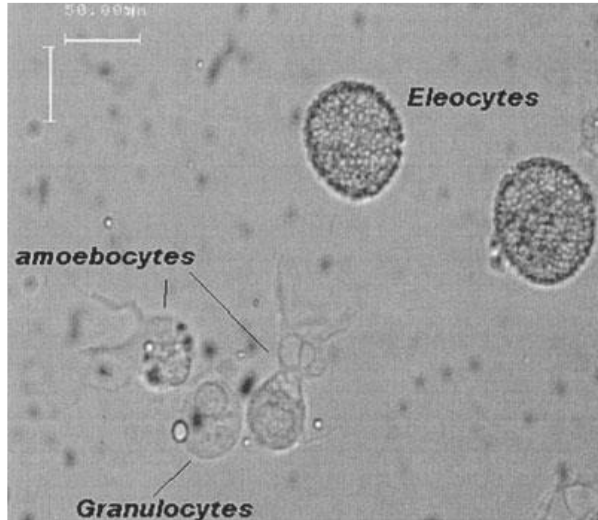
1. lyofilizace vzorků
2. extrakce methanolem (ASE extraktor, Dionex)
3. odpaření
4. cílená analýza na LC/MS trojitým kvadrupólu



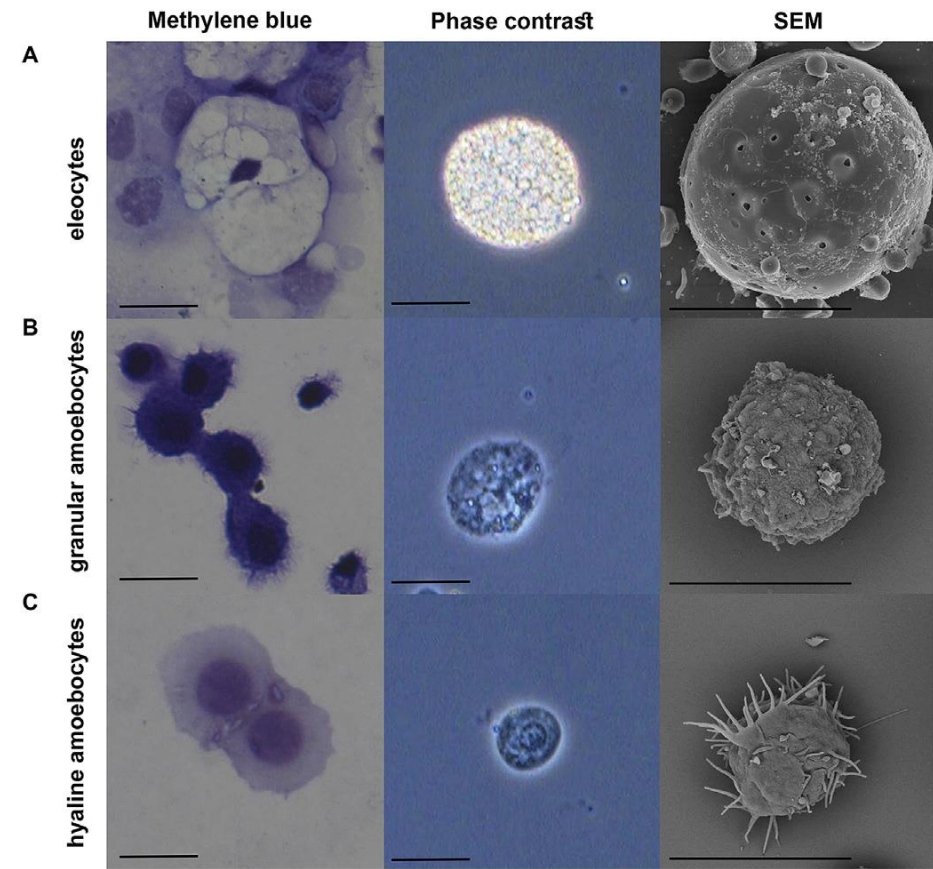
# Cytotoxicita

- imunitní buňky žíží **coelomocyty**

- coelomocyty
  - ↗ eleocyty
  - ↘ amébocyty
  - ↗ hyalinní
  - ↘ granulární



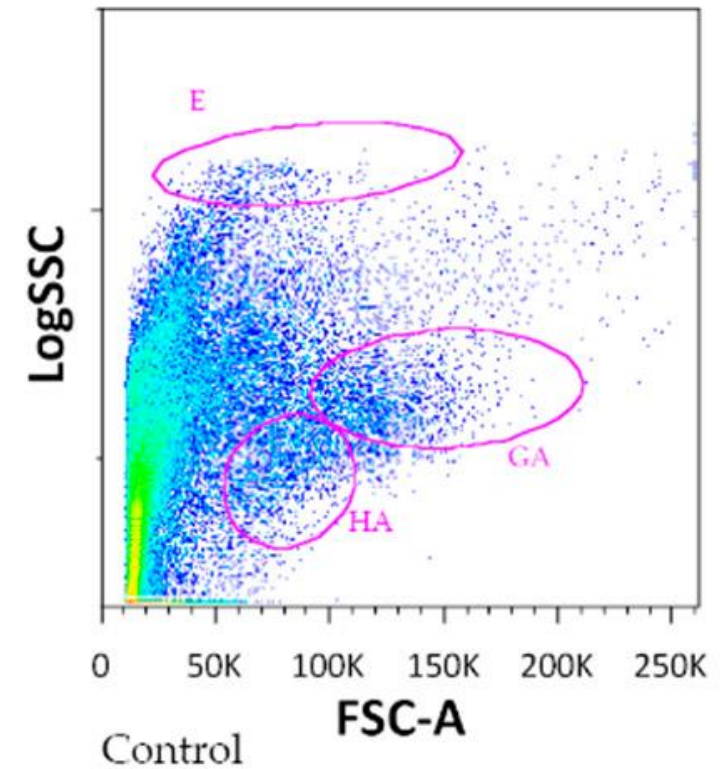
Di Marzio et al., 2005. Improved Single-Cell Gel Electrophoresis Assay for Detecting DNA Damage in *Eisenia foetida*



Prochazkova et al., 2020. Pattern recognition receptors in annelids

# Baterie testů cytotoxicity

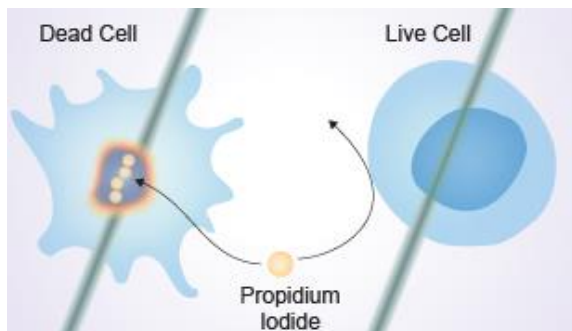
- expozice *in vivo*
- extrakce buněk: **extrakční pufr** – neinvazivní chemická metoda
- fluorescenční barvení (viz další slide)
- analýza na **průtokovém cytometru**



Semerad et al., 2020. In Vitro Study of the Toxicity Mechanisms of Nanoscale Zero-Valent Iron (nZVI) and Released Iron Ions Using Earthworm Cells

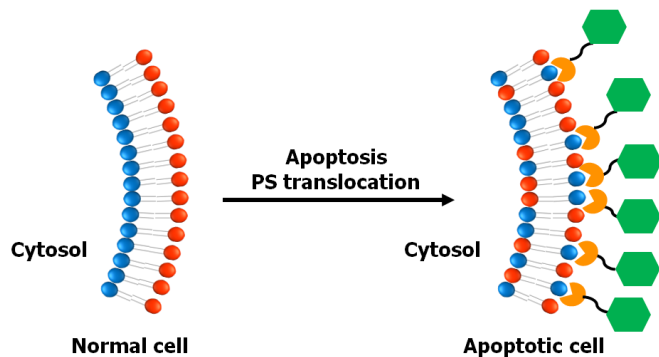
# Fluorescenční barvení buněk

- viabilita – propidium jodid



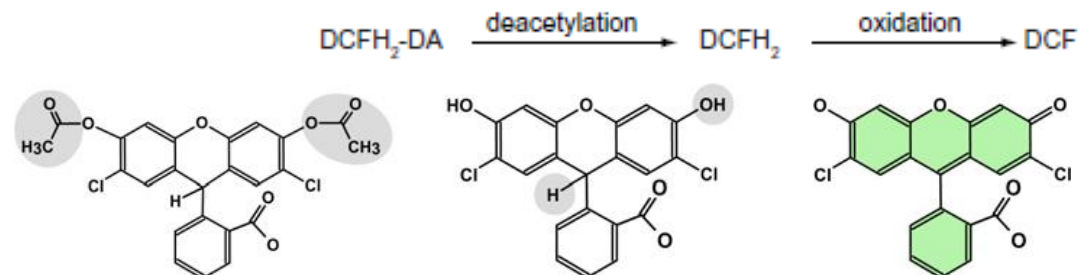
<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>

- apoptóza/nekróza – annexin V



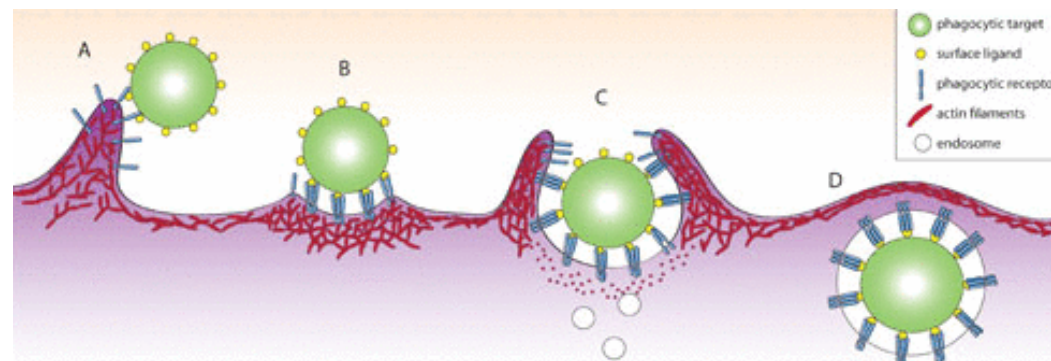
<https://www.abpbio.com/product/annexin-v-binding-assays/>

- reaktivní formy kyslíku – 2',7'-dichlorofluorescein diacetát



Reiners et al., 2012. 2',7'-Dichlorofluorescein is not a probe for the detection of reactive oxygen and nitrogen species

- fagocytóza – Fluoresbrite mikrosféry 1,00 μm



Jaumouillé, Grinstein, 2016. Molecular Mechanisms of Phagosome Formation

# Další analýzy

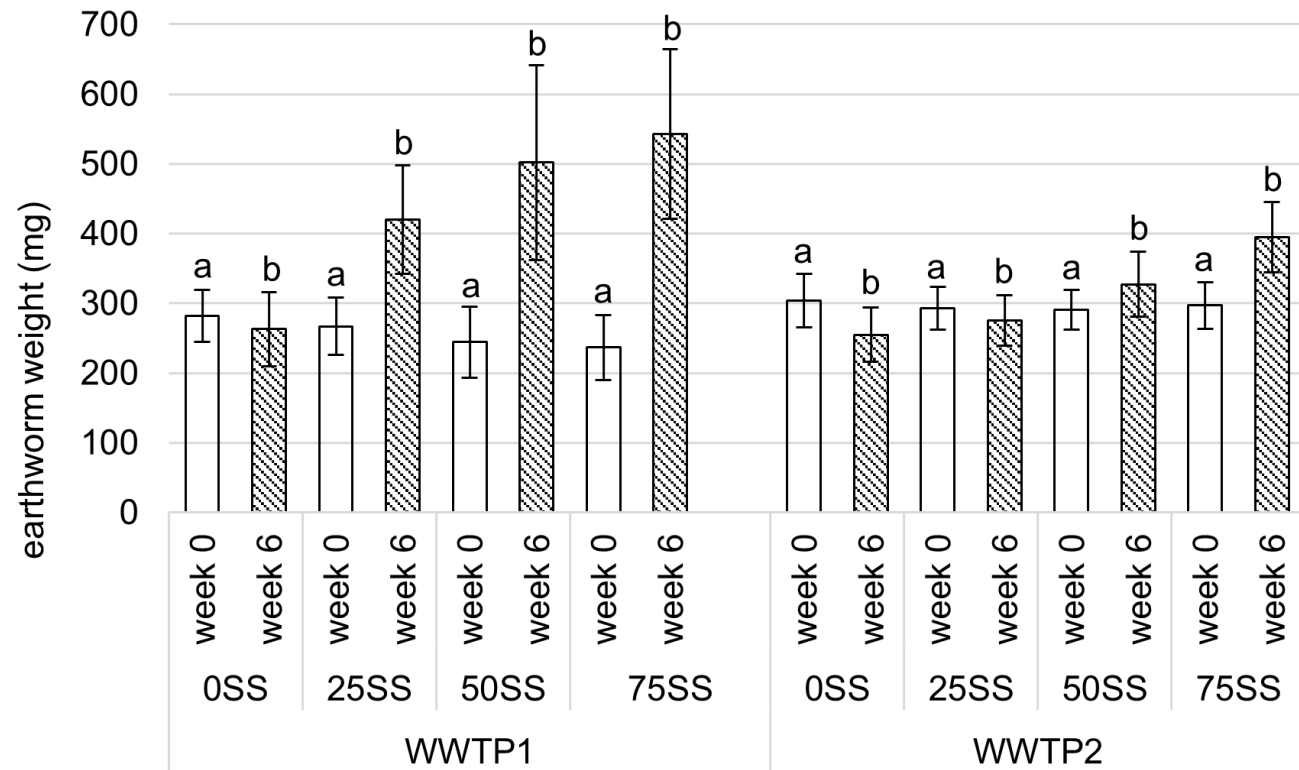
---

- analýza těžkých kovů
- analýza mikrobiální biomasy pomocí sledování PLFA (fosfolipidové mastné kyseliny)
- analýza malondialdehydu – ROS
- genová exprese vybraných molekul - MnSOD, CuZnSOD, lumbricin a fetidin-lysenin

# Výsledky

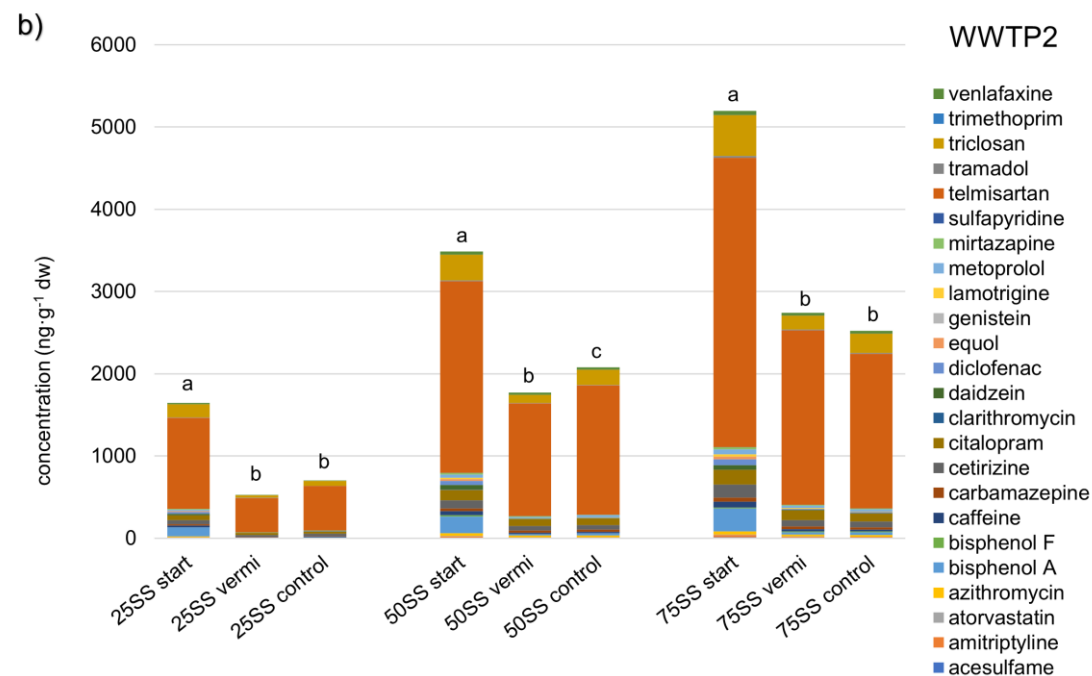
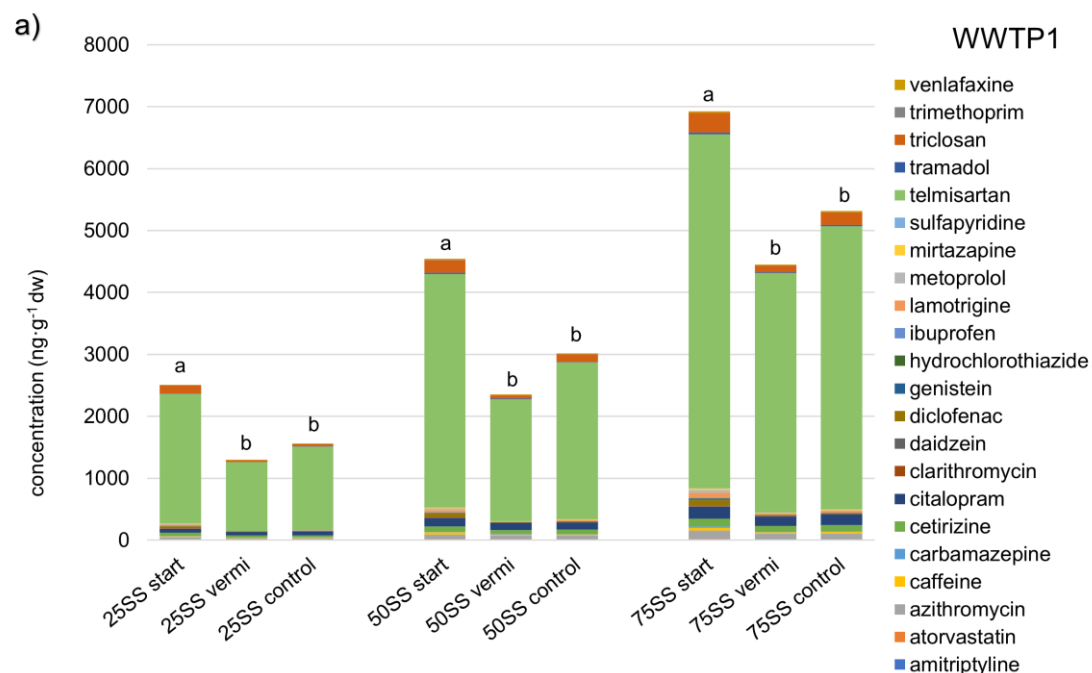
## Biomasa žížal

- u obou použitých kalů (WWTP1 a WWTP2) **stejný trend**
- **pokles biomasy** žížal v **0% kalu** (jen sláma – 0SS) po 6 týdnech
- **nárůst biomasy** žížal ve variantách s **kalem** – čím vyšší % kalu, tím znatelnější nárůst – nejvyšší v **75% kalu**



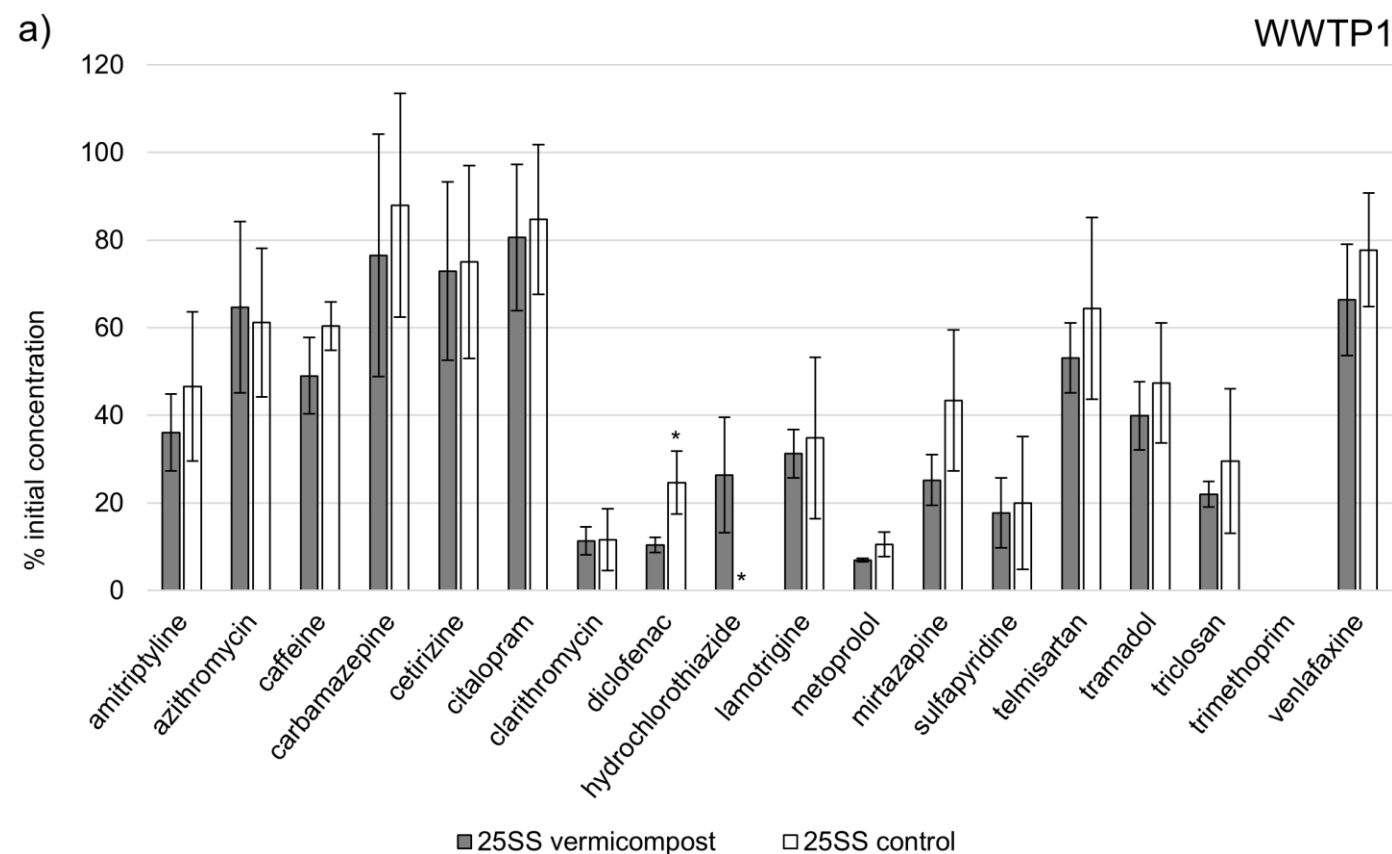
# Farmaka a EDs v sumě

- pokles v případě vermikompostování, ale u většiny případů ne statisticky signifikantní oproti kontrole



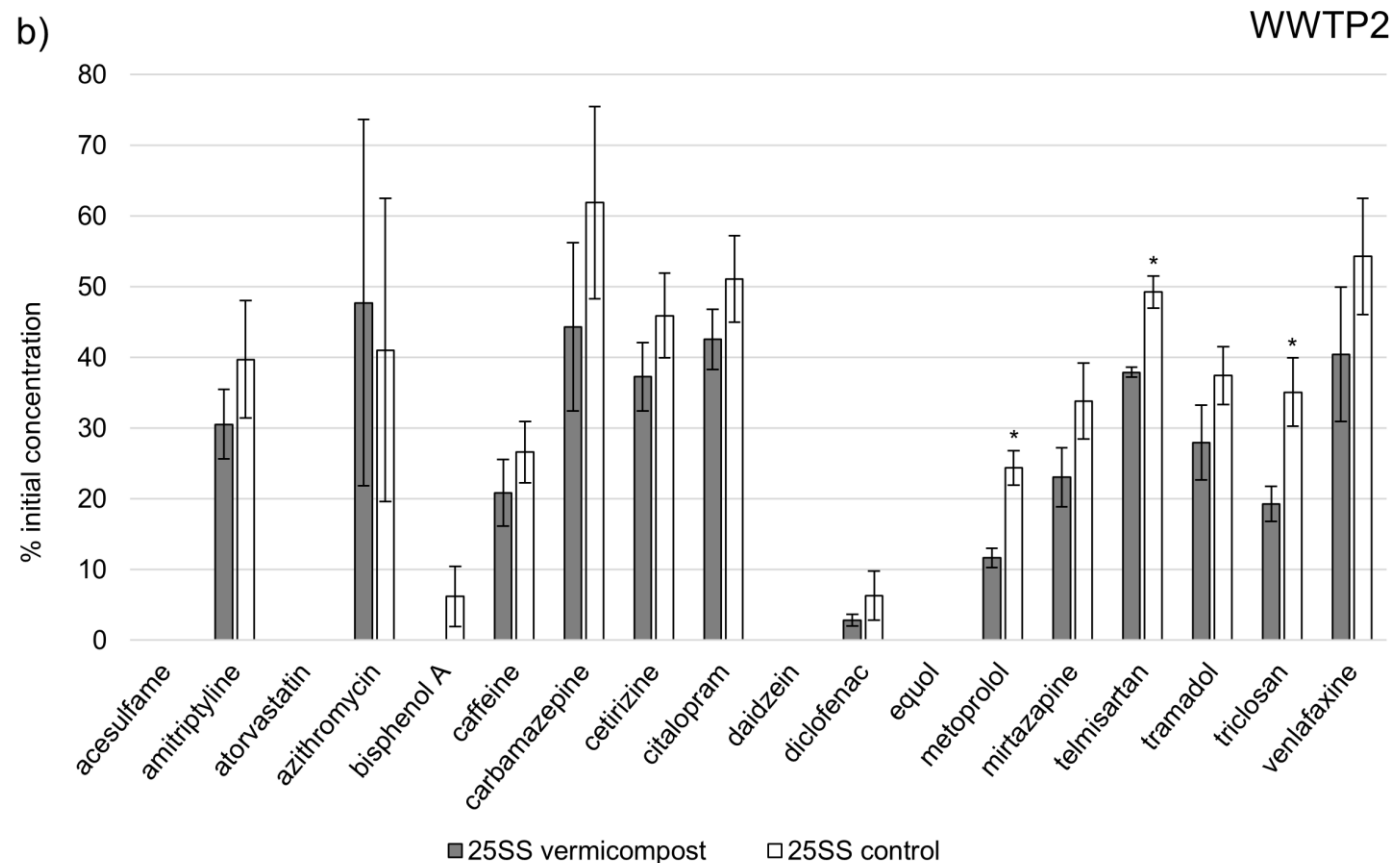
# Farmaka a EDs jednotlivé látky WWTP1 25SS

- detekované látky, jejichž koncentrace poklesla, a to buď v kontrole nebo ve vermikompostu
- WWTP1 – signifikantní pokles ( $P < 0.05$ ) pro diklofenak



# Farmaka a EDs jednotlivé látky WWTP2 25SS

- detekované látky, jejichž koncentrace poklesla, a to buď v kontrole nebo ve vermikompostu
- WWTP2 – signifikantní pokles ( $P < 0.05$ ) pro metoprolol, telmisartan a triclosan

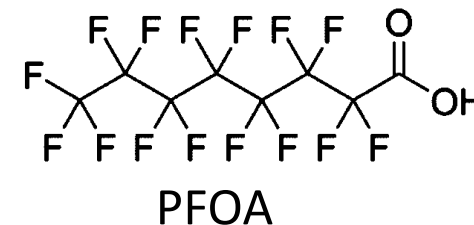


# Farmaka a EDs vermiakumulace

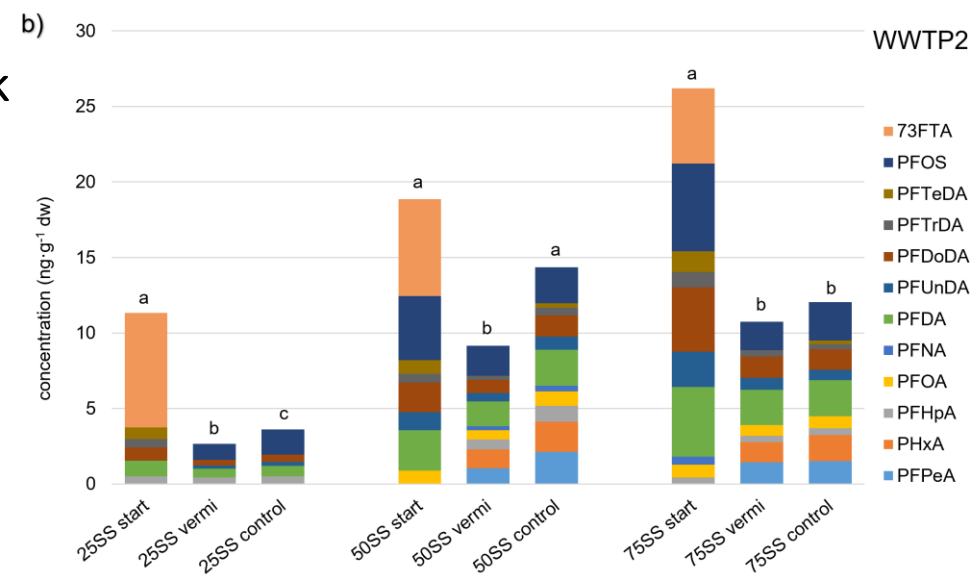
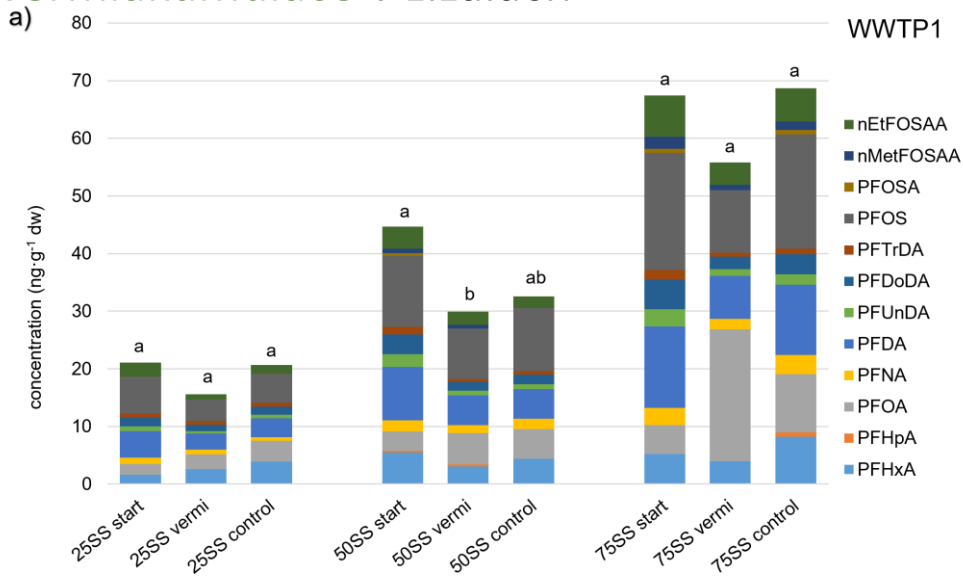
- pro většinu látek nejvyšší v uspořádání 25SS – 25% kalu
- **nezávislé** na hodnotě  $\log K_{ow}$  (ověřeno Spearmanovým korelačním testem)

| PPCPs                            | $\log K_{ow}$ | Bioaccumulated | WWTP1    |          |          | Bioaccumulated | WWTP2    |          |          |
|----------------------------------|---------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------|----------|
|                                  |               |                | BAF 25SS | BAF 50SS | BAF 75SS |                | BAF 25SS | BAF 50SS | BAF 75SS |
| acesulfame <sup>2</sup>          | -1.3          | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| amitriptyline                    | 4.9           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| atorvastatin                     | 6.4           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| azithromycin                     | 4.0           | ✓              | 0.00     | 0.00     | 0.03     | X              | -        | -        | -        |
| bisphenol A <sup>2</sup>         | 3.3           | X              | -        | -        | -        | ✓              | NC       | 0.00     | 0.43     |
| bisphenol F <sup>2</sup>         | 2.9           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| caffeine                         | -0.1          | ✓              | 1.93     | 0.67     | 0.48     | ✓              | 2.13     | 0.75     | 0.39     |
| carbamazepine                    | 2.5           | ✓              | 0.00     | 0.06     | 0.13     | ✓              | 0.14     | 0.02     | 0.05     |
| cetirizine                       | 1.7           | ✓              | 0.09     | 0.06     | 0.05     | ✓              | 0.18     | 0.05     | 0.07     |
| citalopram                       | 3.7           | ✓              | 0.12     | 0.10     | 0.09     | ✓              | 0.05     | 0.07     | 0.07     |
| clarithromycin                   | 3.2           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| daidzein                         | 2.6           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| diclofenac                       | 4.5           | ✓              | 1.61     | 1.52     | 0.74     | ✓              | 1.21     | 0.39     | 0.19     |
| equol <sup>2</sup>               | 3.2           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| genistein                        | 2.8           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| hydrochlorothiazide <sup>1</sup> | -0.1          | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| ibuprofen <sup>1</sup>           | 4.0           | ✓              | -        | -        | NC       | X              | -        | -        | -        |
| lamotrigine                      | 2.6           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| metoprolol                       | 1.9           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| mirtazapine                      | 2.9           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| sulfapyridine                    | 0.4           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| telmisartan                      | 7.7           | ✓              | 0.03     | 0.03     | 0.02     | ✓              | 0.05     | 0.03     | 0.02     |
| tramadol                         | 1.4           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| triclosan                        | 4.8           | ✓              | 0.25     | 0.16     | 0.10     | ✓              | 0.28     | 0.11     | 0.10     |
| trimethoprim                     | 0.9           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| venlafaxine                      | 3.2           | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |

# Per/polyfluorované látky v sumě



- snížení koncentrace v případě některých látek
- možná biotransformace neplně fluorovaných látek (fluorotelomerní sloučeniny)
- vermiakumulace v žížalách



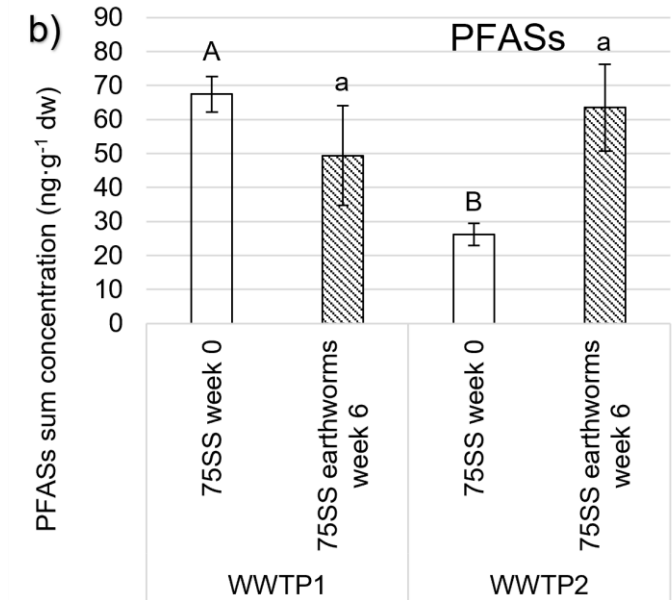
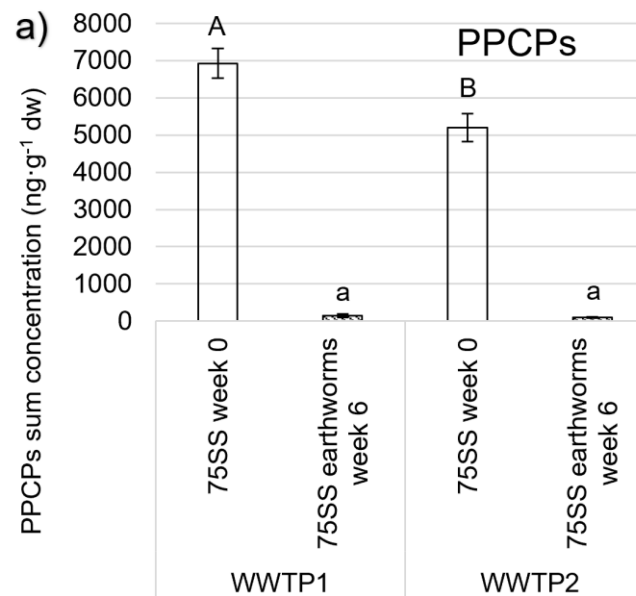
# Per/polyfluorované látky vermiakumulace

- pro většinu látek nejvyšší v uspořádání 25SS – 25% kalu
- **nezávislé** na hodnotě  $\log K_{ow}$
- **závislé** na počtu **fluorovaných uhlíků** v molekule (ověřeno Spearmanovou korelací)

| PFASs                  | Formula                                                          | $\log K_{ow}$ | Per F-C | Bioaccumulated | WWTP1    |          |          | Bioaccumulated | WWTP2    |          |          |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------|---------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------|----------|
|                        |                                                                  |               |         |                | BAF 25SS | BAF 50SS | BAF 75SS |                | BAF 25SS | BAF 50SS | BAF 75SS |
|                        |                                                                  |               |         |                |          |          |          |                |          |          |          |
| PFPeA <sup>2</sup>     | C <sub>5</sub> HF <sub>9</sub> O <sub>2</sub>                    | 2.7           | 4       | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| PFHxA                  | C <sub>6</sub> HF <sub>11</sub> O <sub>2</sub>                   | 3.5           | 5       | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| PFHpA                  | C <sub>7</sub> HF <sub>13</sub> O <sub>2</sub>                   | 4.4           | 6       | X              | -        | -        | -        | ✓              | 3.51     | 3.14     | 3.94     |
| PFOA                   | C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>                   | 5.2           | 7       | ✓              | 2.75     | 1.83     | 0.16     | X              | -        | -        | -        |
| PFNA                   | C <sub>9</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>2</sub>                   | 6.0           | 8       | ✓              | 2.68     | 1.89     | 1.21     | X              | -        | -        | -        |
| PFDA                   | C <sub>10</sub> HF <sub>19</sub> O <sub>2</sub>                  | 6.8           | 9       | ✓              | 1.84     | 1.17     | 0.86     | ✓              | 3.26     | 1.10     | 0.98     |
| PFUnDA                 | C <sub>11</sub> HF <sub>21</sub> O <sub>2</sub>                  | 7.6           | 10      | ✓              | 5.57     | 2.30     | 1.62     | ✓              | 3.09     | 0.00     | 0.00     |
| PFDoDA                 | C <sub>12</sub> HF <sub>23</sub> O <sub>2</sub>                  | 8.4           | 11      | ✓              | 5.95     | 3.95     | 2.81     | ✓              | 6.01     | 2.60     | 1.95     |
| PFTTrDA                | C <sub>13</sub> HF <sub>25</sub> O <sub>2</sub>                  | 9.2           | 12      | ✓              | 4.99     | 9.51     | 5.36     | ✓              | NC       | 4.60     | 4.15     |
| PFTeDA <sup>2</sup>    | C <sub>14</sub> HF <sub>27</sub> O <sub>2</sub>                  | 10.0          | 13      | X              | -        | -        | -        | ✓              | NC       | NC       | NC       |
| PFOS                   | C <sub>8</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S                 | 4.0           | 8       | X              | 3.72     | 1.83     | 1.46     | ✓              | 8.16     | 4.42     | 5.04     |
| PFOSA                  | C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> F <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> S  | 4.8           | 8       | ✓              | -        | NC       | NC       | ✓              | -        | NC       | NC       |
| 53 FTA <sup>2</sup>    | C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> F <sub>11</sub> O <sub>2</sub>     | 4.2           | 5       | X              | -        | -        | -        | ✓              | -        | NC       | NC       |
| 73 FTA <sup>2</sup>    | C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> F <sub>15</sub> O <sub>2</sub>    | 6.0           | 7       | X              | -        | -        | -        | ✓              | -        | NC       | NC       |
| nMetFOSAA <sup>1</sup> | C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> F <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> S | 8.8           | 8       | X              | -        | -        | -        | X              | -        | -        | -        |
| nEtFOSAA <sup>1</sup>  | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> F <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> S | 9.3           | 8       | ✓              | 0.00     | 0.00     | 0.51     | X              | -        | -        | -        |

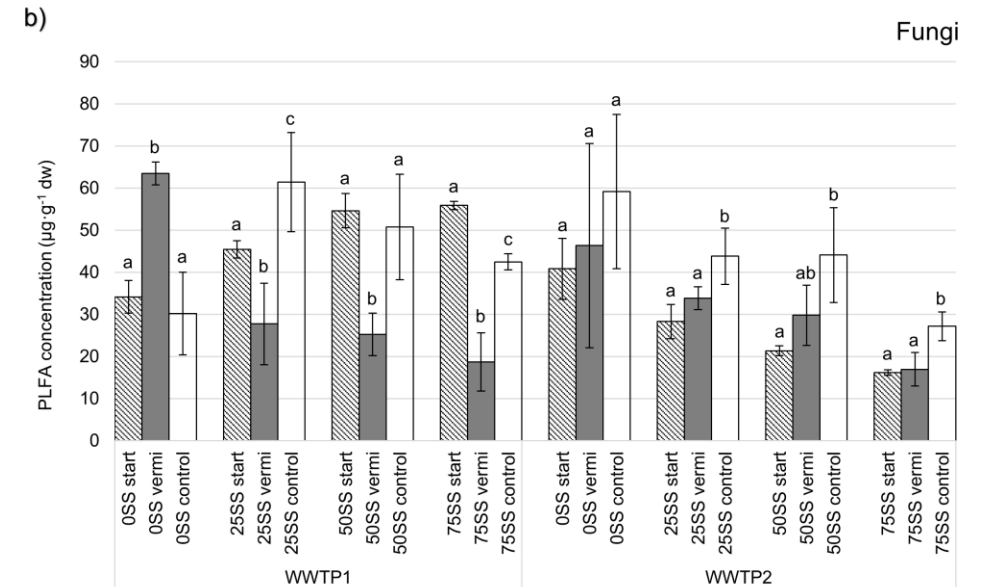
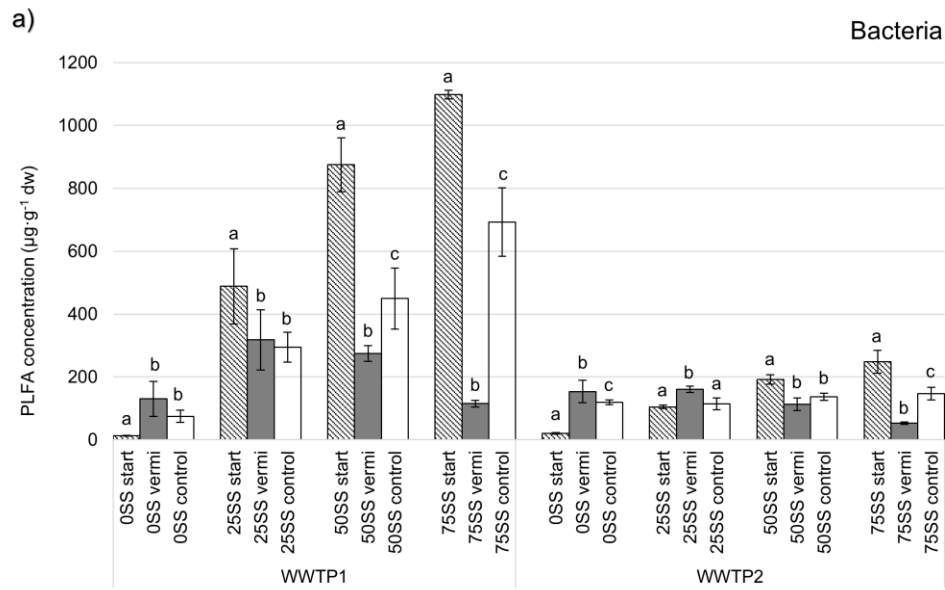
# Mikropolutanty vermiakumulace

- **trend** pozorovaný u skupiny jak farmak a produktů osobní péče + EDs, tak u per/polyfluorovaných látek
- **výsledná koncentrace sumy látek v žížalách** nebyla signifikantně rozdílná ( $P < 0.05$ ), i když **výchozí koncentrace sumy látek ve směsi kalu** pro WWTP1 a WWTP2 byly odlišné ( $P < 0.05$ )
- **mechanismus vermiakumulace?**



# Mikroorganismy - PLFA

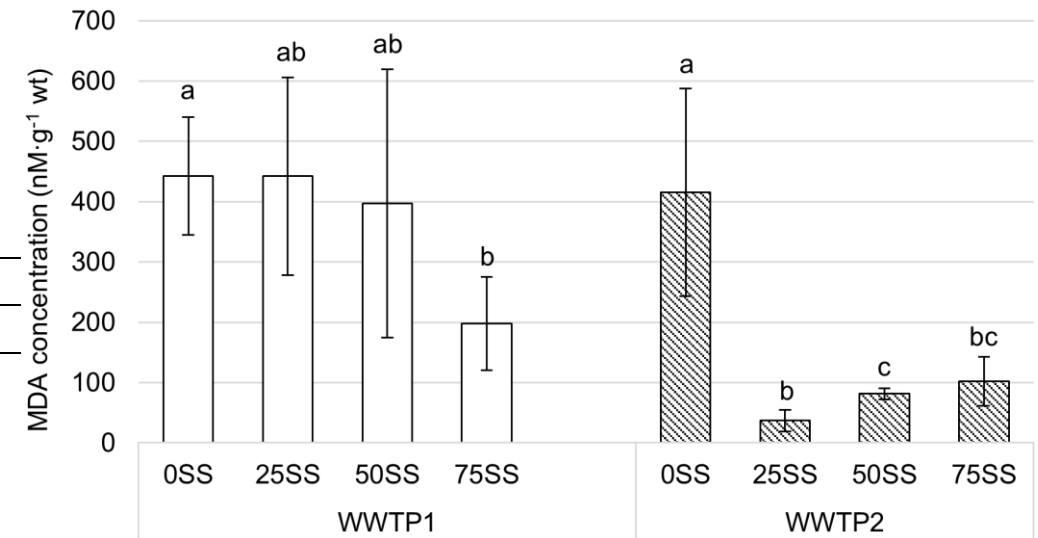
- pokles bakteriální biomasy po vermikompostování substrátů s kalem
- nejvyšší pokles u substrátu s nejvyšším % kalu a nejvyšším množstvím žížalí biomasy (75SS)
- houby ovlivněny méně



# Toxicita

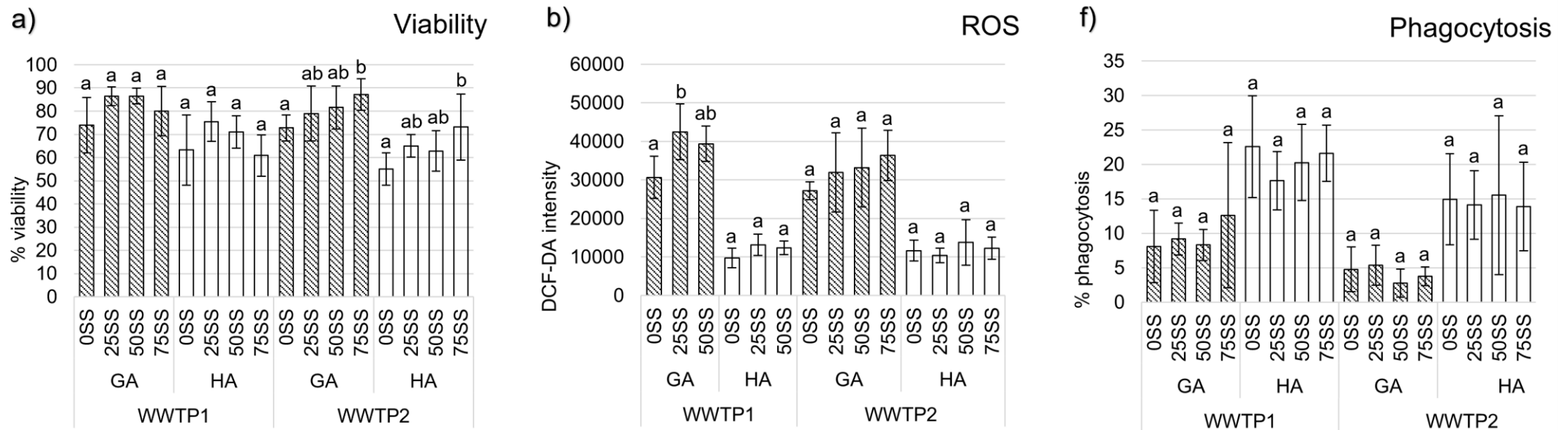
- koncentrace **malondialdehydu** vysoká v případě **0SS** (jen slaměné pelety)
- **upregulovaný gen** pro **fetidin-lysenin** u kalových variant pro WWTP1 – zvýšená antimikrobiální aktivita

| Molecule |      | lumbricin   | fetidin-lysenin     | CuZnSOD          | MnSOD            |
|----------|------|-------------|---------------------|------------------|------------------|
| Function |      | immunity    | immunity            | oxidative stress | oxidative stress |
| WWTP1    | 0SS  | 1.10 ± 0.54 | 1.44 ± 1.11         | 1.03 ± 0.27      | 1.09 ± 0.50      |
|          | 25SS | 1.93 ± 0.67 | <b>6.52 ± 3.36*</b> | 1.31 ± 0.34      | 1.38 ± 0.70      |
|          | 50SS | 1.92 ± 0.35 | <b>5.07 ± 1.38*</b> | 0.92 ± 0.18      | 1.71 ± 0.68      |
|          | 75SS | 1.49 ± 0.70 | <b>5.34 ± 1.99*</b> | 1.03 ± 0.60      | 1.05 ± 0.63      |
| WWTP2    | 0SS  | 1.02 ± 0.19 | 1.08 ± 0.45         | 1.00 ± 0.08      | 1.07 ± 0.47      |
|          | 25SS | 0.66 ± 0.18 | 0.94 ± 0.21         | 0.95 ± 0.29      | 0.69 ± 0.15      |
|          | 50SS | 1.06 ± 0.54 | 1.40 ± 0.40         | 1.33 ± 0.55      | 1.18 ± 0.44      |
|          | 75SS | 0.76 ± 0.48 | 1.13 ± 0.58         | 1.00 ± 0.36      | 1.15 ± 0.47      |



# Cytotoxicita

- ve **viabilitě**, **produkci ROS** a **fagocytóze** nebyly pozorovány značné rozdíly mezi substrátem s 0% kalu a substráty obsahující kal
- **hyalinní amébocyty** vykazovaly podobné trendy jako **granulární amébocyty**



# Závěr

---

- žížaly byly schopny **přežít** a **růst** v **75%** substrátu dvou různých kalů
- oproti kontrole bez žížal došlo k signifikantnímu poklesu u **diklofenaku**, **metoprolu**, **telmisartanu** a **triclosanu**
- některé látky byly **akumulovány** v **žížalách** (nejvyšší BAF u 25% kalu)
- **bioakumulace** sumy sledovaných mikropolutantů **nezáležela na počáteční koncentraci v substrátu** – žížaly byly schopny akumulovat jen určité množství
- žížaly pozměnily **zastoupení mikroorganismů** (pokles bakteriální biomasy)
- **cytotoxicita** použitých kalů nebyla potvrzena

# Poděkování

---

Mgr. Alena Grasserová

MSc. Natividad Isabel Navarro Pacheco, Ph.D.

RNDr. Jaroslav Semerád, Ph.D.

Ing. Alena Filipová

doc. Ing. Aleš Hanč, Ph.D.

RNDr. Petra Innemanová, Ph.D.

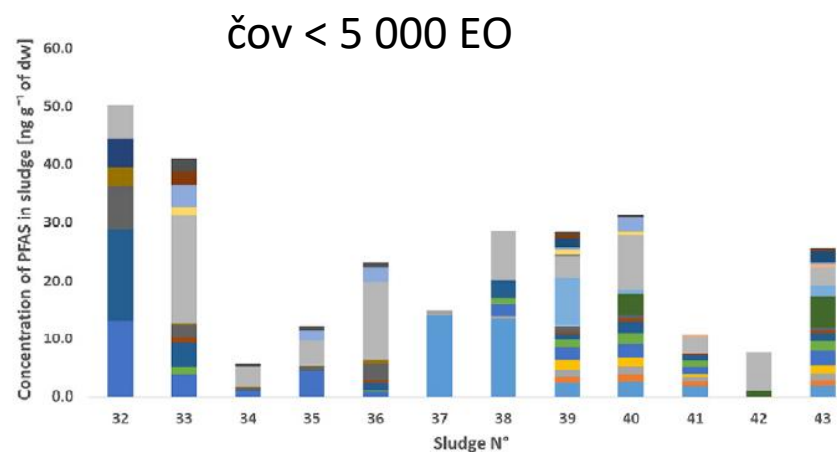
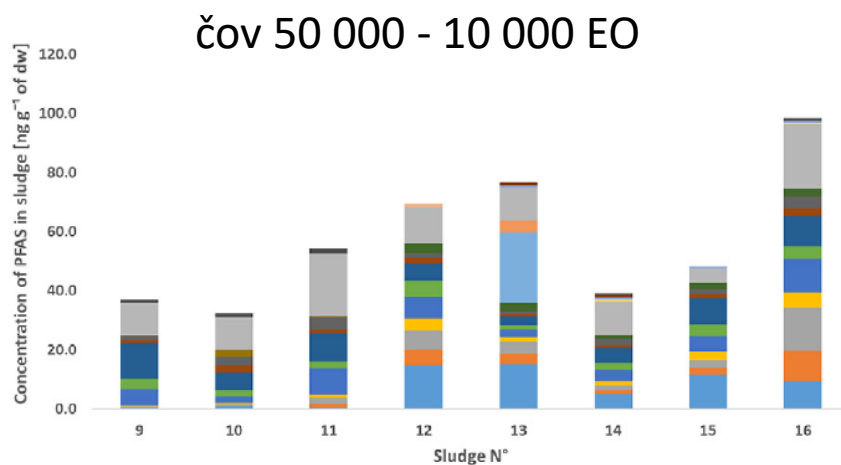
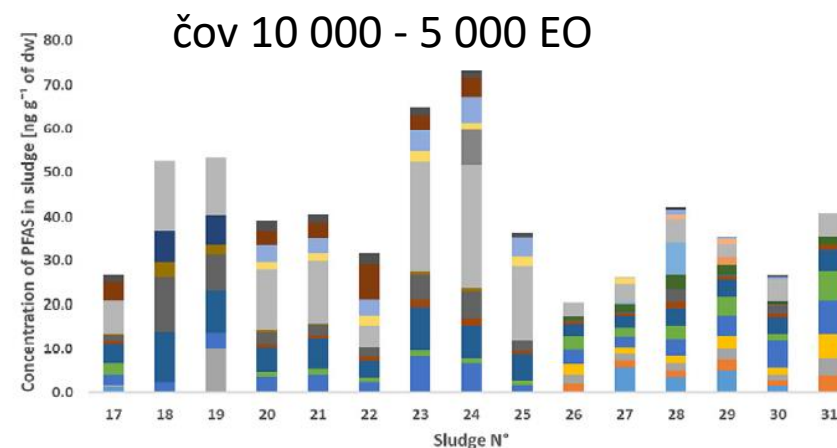
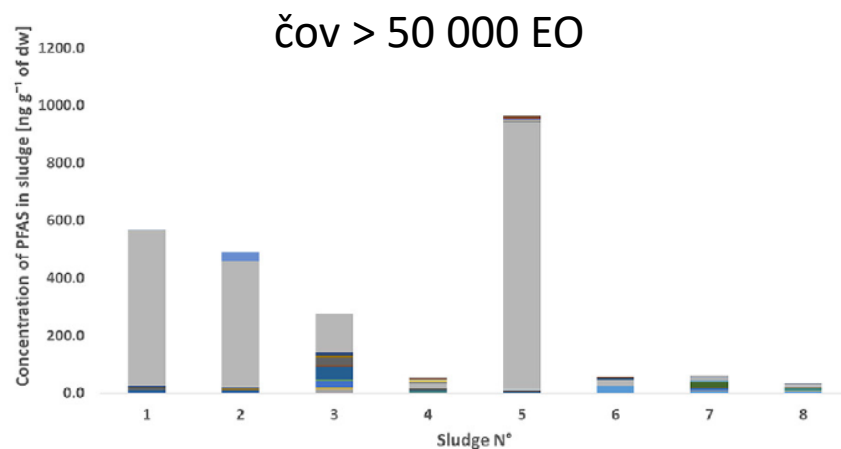
- funding organisations:

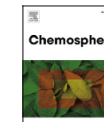


GA UK



# Koncentrace v kalu z čistíren odpadních vod v ČR (2018-2019)





# Koncentrace v kalu z čistíren v ČR (2018-2019)

Screening for 32 per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) including GenX in sludges from 43 WWTPs located in the Czech Republic - Evaluation of potential accumulation in vegetables after application of biosolids

Jaroslav Semerád<sup>a, b</sup>, Nicolette Hatasová<sup>b</sup>, Alena Grasserová<sup>a, b</sup>, Tereza Černá<sup>a, b</sup>, Alena Filipová<sup>a</sup>, Aleš Hanč<sup>c</sup>, Petra Innemanová<sup>b, d</sup>, Martin Pivokonský<sup>e</sup>, Tomáš Cajthaml<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Václavská 108/3, CZ-142 20, Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute for Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, CZ-128 01, Prague 2, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, CZ-165 00, Prague 6, Czech Republic

<sup>d</sup> Dekonta a.s., Dřetovice 109, CZ-273 42 Stehelčevy, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Hydrodynamics of the Czech Academy of Sciences, Pod Patankou 30/5, CZ-166 12, Prague 6, Czech Republic

