

Odstraňovanie ťažkých kovov a sulfátov z odpadových vôd pomocou sulfát-redukujúcich baktérií

Alena Luptáková¹ & Mária Kušnierová¹

Removal heavy metals and sulphate from waste waters by sulphate-reducing bacteria

This article is devoted to the process of bacterial sulphate reduction, which is used to removal of heavy metals and sulphate ions from waste waters.

The life of animals and plants depends on the existence of microscopic organisms – microorganisms (MO), which play an important role in cycle changes of biogenic elements on the earth. The sulphur cycle in the nature is considered as one of the oldest and most significant biological systems (Fig. 1). The sulphate-reducing bacteria (SRB) miss the assimilatory part of the cycle and produce sulphides. The microbial population of this dissimilatory part is called "sulfuretum". The SRB can be found in anaerobic mud and sediments of freshwater, thermal or non-thermal sulphur springs, mining waters from sulphide deposits, oil deposits, sea and ocean beds, and in the gastrointestinal tract of man and animals. The SRB represent a group of chemoorganotrophic, strictly anaerobic and gramnegative bacteria, which exhibit a great morphological and physiological diversity. Despite of their considerable morphological variety, they have one property in common, which is the ability to utilise preferentially sulphates (occasionally sulphites, thiosulphates, tetrathionates) as electron acceptors, which are reduced to sulphides, during anaerobic respiration. The electron donors in these processes are simple organic compounds as lactate, malate, etc., (heterotrophically reduction) or gaseous hydrogen (autotrophically reduction). SRB can produce a considerable amount of hydrogen sulphide, which reacts easily in aqueous solution with the cations of heavy metals, forming metal sulphides that have low solubility. The bacterial sulphate reduction can be used for the treatment of acid mine drainage waters, which is considered to be the major problem associated with mining activities.

In order to remove heavy metals from waste waters, e.g., from galvanizing plants, mine waters (Smolník, Šobov locality) and metallurgic plants (works Krompachy) by use of the activity of SRB, mixed strains were isolated, cultivated, and their production of hydrogen sulphide was assessed. The cultures were then tested for the ability to precipitate copper and sulphates from a model solution.

The bacteria were isolated from water samples from two localities: Východoslovenské železiarne (works) – VSŽ and spring Gajdovka – Gj. Isolation, cultivation and eliminating Cu^{2+} and SO_4^{2-} was carried out under following conditions: statically, temperature 30 °C, pH 7,5, nutrient medium by J. Postgate (medium B, C and D) and anaerobic conditions. Residual copper in the solution was measured by atomic absorption photometry. The concentration of sulphates in the solution was measured by the nefelometric method.

Our findings from the isolation of SRB from two Slovak water samples and testing the cultures for their ability to remove copper permit the following conclusions:

- SRB occur in sufficient numbers in sulphur mineral water from natural sources and in industrial waste waters reservoirs,
- the sulphate-reducing activity can be harnessed for the purification of some industrial waste waters.

The nature possesses a great biological potential that can be exploited under certain conditions in the cleanup of environmental pollution resulting from the industrial activity in the past and present.

Key words: sulphate-reducing bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans*, heavy metals, waste waters.

Úvod

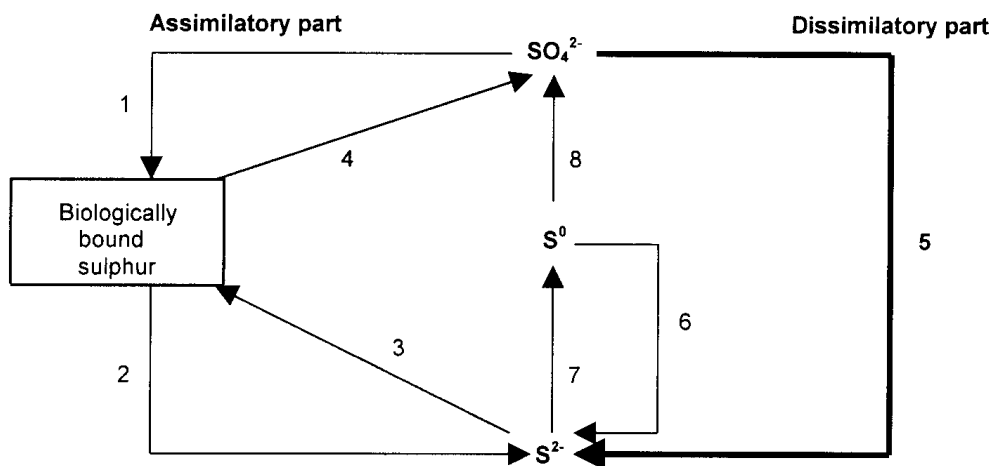
Spoločenstvá rôznych druhov mikroorganizmov (MO) sú schopné na základe svojich životne dôležitých metabolických pochodov rozkladať organické látky na anorganické a opačne, čím napomáhajú kolobehu prvkov v prírode (Rosypal et al., 1981). To je ich dominantná úloha z hľadiska života na Zemi. S uvedenou kľúčovou funkciou MO v biosfére, súvisia aj dôsledky ich existencie a metabolizmu, ktoré môžu byť na jednej strane „pozitívne“ (napr. biotechnologické procesy ako sú výroba piva, enzýmov, antibiotík; bakteriálne lúhovanie sulfidických minerálov, tvorba bioplynu, čistenie odpadových vôd a podobne) a na druhej strane „negatívne“ (napr. choroby, hniloba, korózia a podobne). Špecifické vlastnosti MO sa stále vo väčšej miere využívajú v priemyselných technologických procesoch, ktoré sú označované všeobecným názvom „biotechnológia“.

Pod pojmom biotechnológia rozumieme riadené využívanie vhodných MO alebo ich metabolitov na technologické účely (Vodrážka, 1991). V podstate ide o kontrolované usmernenie činnosti MO. Biotechnológie nachádzajú uplatnenie v rôznych odvetviach priemyslu. V niektorých krajinách je venovaná pozornosť tzv. minerálnym biotechnológiám, tj. spracovaniu alebo úprave rôznych minerálnych surovín a ich odpadov za účasti MO. Do kategórie minerálnych biotechnológií možno zaradiť aj biotechnologické riešenie čistenia a využitia odpadových vôd z banskej, úpravnickej a hutníckej výroby s obsahom ťažkých kovov (Kušnierová, 1993), ktoré predstavujú rizikové polutanty životného prostredia. Jedným zo spôsobov, ako ich z nich odstrániť, je aj aplikácia sulfát-redukujúcich baktérií (SRB) (Groudeva et al., 1997).

¹Ing. Alena Luptáková & Doc. Ing. Mária Kušnierová, PhD., Ústav geotechniky SAV, 043 53 Košice (Recenzované v roku 2000)

Vlastnosti a význam sulfát-redukujúcich baktérií

SRB sa v prírode vyskytujú v anaeróbných zónach: pôdy, termálnych a netermálnych sírnych prameňoch, banských vôd, ložísk ropy, stôk a odpadových vôd, stojatých sladkých vôd a tiež aj na dne morí a oceánov, ale aj v črevách človeka a zvierat. Pre človeka nie sú patogénne. Ich význam spočíva v ich nenahraditeľnej funkcii v kolobehu síry v prírode (obr.1) (Rehm et al., 1981):

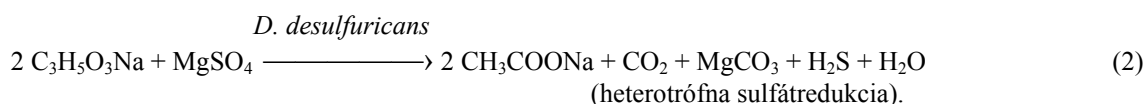


Obr.1. Biologický kolobeh síry v prírode (Rehm et al., 1981). 1-asimilačná redukcia sulfátov rastlinami, hubami a baktériami, 2-úhyn a rozklad hubami a baktériami, 3-asimilácia sulfidov baktériami a niektorými rastlinami, 4-vylučovanie sulfátov živočíchmi, 5-disimilačné sulfát-redukujúce baktérie, 6-disimilačné síru-redukujúce baktérie, fototrófne a chemotrófne sulfid-oxidujúce baktérie, 8-fototrófne a chemotrófne síru-oxidujúce baktérie.

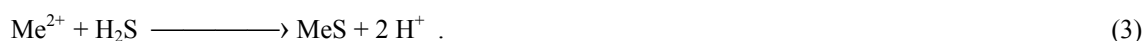
Fig.1. The biological sulphur cycle (Rehm et al., 1981). 1-assimilatory sulphate reduction by plants, fungi and bacteria, 2-death and decomposition by fungi and bacteria, 3-sulphide assimilation by bacteria and some plants, 4-excretion of sulphate by animals, 5-dissimilatory sulphate-reducing bacteria, 6-dissimilatory sulphur-reducing bacteria, 7-phototrophic and chemotrophic sulphide-oxidizing bacteria, 8-phototrophic and chemotrophic sulphur-oxidizing bacteria.

SRB sa zúčastňujú disimilačnej časti uvedeného cyklu, ktorej mikrobiálne spoločenstvo sa nazýva „sulfuretum“ (Postgate, 1984a). SRB predstavujú skupinu chemoorganotrófnych, striktno anaeróbných, gram-negatívnych a nespórtovných (okrem rodu *Desulfotomaculum*) baktérií, vyznačujúcich sa veľkou fyziologickou a morfológickou rozmanitosťou (Odom et al., 1993). Charakteristická je pre ne schopnosť využívať pri anaeróbných respiračných pochodoch ako akceptory elektrónov prednostne sulfáty a príležitostne sulfity, tiosulfáty a tetratonáty, ktoré redukujú na sulfidy. Donorom elektrónov je organický substrát (laktát, malát, nižšie alkoholy a pod.) alebo plynný vodík (Rehm et al., 1981).

Typovým druhom SRB je *Desulfovibrio desulfuricans* (*D. desulfuricans*), ktorý je pôvodcom ako autotrófnej, tak aj heterotrófnej redukcie sulfátov, čo popisujú rovnice (1) a (2):



SRB tak produkujú značné množstvo sulfánu, ktorý vo vodnom prostredí ľahko reaguje s kationmi ťažkých kovov za vzniku málorozpustných sulfidov, čo popisuje rovnica (3):



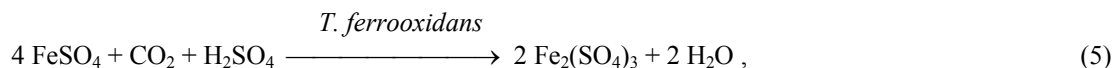
Prirodzené biologické aktivity SRB popísané uvedenými rovnicami (1), (2) a (3) je možné použiť nielen pre odstránenie ťažkých kovov, ale aj sulfátov z odpadových a tiež banských drenážnych vôd (Groudeva et al., 1997). Ide o riešenie závažného environmentálneho problému tzv. kyslých alebo zásaditých banských vôd z ložísk sulfidických minerálov alebo uhoľných baní, ktoré sú výsledkom nekontrolovanej aeróbnej mikrobiálnej oxidácie sulfidov (pyrit, arzenopyrit a pod.), za účasti najmä aeróbných chemolithotrófnych baktérií rodov *Thiobacillus*, *Leptospirillum* a *Sulfolobus*, ktorej dôsledkom je vysoká koncentrácia sulfátov. V anaeróbnom

prostredí dochádza aktívnou činnosťou SRB podľa už vyššie uvedených rovníc (1), (2) a (3) k redukcii vzniknutých sulfátov na sulfán, ktorý potom reaguje s kationmi ťažkých kovov za vzniku sekundárnych sulfidov, pričom je možné nadbytočný sulfán oxidovať na elementárnu síru, ktorá je žiadanou surovinou napr. pre celulóžky a papierne. Uvedená oxidácia sulfánu môže prebiehať:

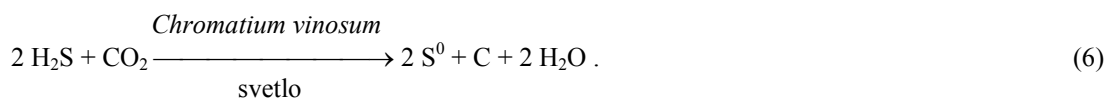
➤ chemicky, čo popisuje rovnica (4):



a ióny Fe^{3+} môžu byť regenerované baktériami *Thiobacillus ferrooxidans*, podľa rovnice (5):



➤ pomocou mikrobiálnej činnosti fotolithotrófných baktérií rodov *Chromatium* alebo *Chlorobium* (Imai et al., 1986), čo vyjadruje rovnica (6):



Kvôli odstraňovaniu ťažkých kovov a sulfátov z odpadových vôd, napr. z galvanizovní, banských vôd (napr. lokalita Smolník, Šobov) a hutníckych prevádzok (napr. Krompachy, VSŽ), s využitím mikrobiálnej činnosti SRB, bola realizovaná ich izolácia, kultivácia a overenie ich schopnosti tvorby sulfánu, s cieľom eliminácie ťažkých kovov a sulfátov, použitím modelových roztokov.

Materiál a metódy

Materiál:

Baktérie boli izolované zo vzoriek vôd z dvoch lokalít:

- voda z Východoslovenských železiarní → (VSŽ) – zberná nádrž odpadových vôd po umývaní strojov z Východoslovenských železiarní, pH 7,5, ostrý zápach po H_2S , silne znečistená, čierneho zafarbenia a olejovitej konzistencie;
- voda z prameňa Gajdovka → (Gj) – minerálna pitná voda, pH 7-8, pramenistá, hygienicky nezávadná, značne zapáchajúca po H_2S .

Metódy:

1. Izolácia SRB - baktérie boli izolované z uvedených vzoriek vôd, použitím kvapalného a aj pevného selektívneho živného média podľa J. Postgate (médiu B), metódou podľa J. Postgate (Karavajko et al., 1988).

2. Kultivácia SRB - prebiehala za nasledovných podmienok:

- staticky,
- pri teplote 30°C ,
- selektívne živné médium podľa J. Postgate (médiu B), pH 7,5,
- anaeróbne prostredie (ANAER-cult pre Petriho misky, rast v hĺbke agaru alebo rast v inertnom prostredí (dusík)).

3. Eliminácia Cu^{2+} z modelového roztoku - koncentrácia Cu^{2+} v testovanom roztoku 20 mg.l^{-1} , bola zvolená na základe priemerných koncentrácií meďi v banských vodách alebo odpadových vodách z hydrometalurgického spracovania medených koncentrátov. Roztok bol pripravený z $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Proces eliminácie prebiehal v diskontinuálnom reaktore („Batch“ reaktor), umiestnenom v termostate pri 30°C po dobu 8 dní v anaeróbných podmienkach, t.j. reaktor bol počas plnenia s roztokom $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pridávania čerstvého živného média (podľa J. Postgate (médiu C), inokulácie so SRB (10% (v/v)) a úpravy pH na hodnotu 7,5 nepretržite prebublávaný inertným plynom – dusíkom a potom hermeticky uzatvorený. Zmeny koncentrácie Cu^{2+} v roztoku boli sledované po odobratí a úprave vzorky atómovou absorpčnou spektrofotometriou (VARIAN spectrometer).

4. Eliminácia sulfátov z modelového roztoku – proces prebiehal v diskontinuálnom reaktore („Batch“ reaktor), umiestnenom v termostate pri 30°C po dobu 8 dní v anaeróbných podmienkach (inertný plyn – dusík). Ako zdroj sulfátov bol použitý $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ o koncentrácii $4,5 \text{ g.l}^{-1}$, ktorá bola zvolená vzhľadom na priemerné koncentrácie sulfátov v priemyselných odpadových vodách (Mikundová et al., 1997; Groudeva et al., 1997). Reaktor bol počas plnenia testovacím roztokom sulfátu sodného, živným médiom podľa J. Postgate (médiu D, t.j. bez sulfátov), inokulácie SRB (15% (v/v)) a úpravy pH na hodnotu 7,5 neustále prebublávaný inertným plynom a potom hermeticky uzatvorený. Zmeny koncentrácie sulfátov v roztoku boli sledované po odobratí a úprave vzorky nefelometricky.

5. Mikroskopické pozorovania – baktérie boli po fixácii teplom podrobené farbeniu podľa Grama (Betina et al., 1977) a potom pozorované svetelným mikroskopom (NIKON ECLYPSE 400) olejovou imerziou pri 1000-násobnom zväčšení.

Výsledky a diskusia

Izolácia SRB s použitím kvapalného selektívneho živného média bola pozitívna v oboch skúmaných vzorkách vôd, čo sa prejavilo po uplynutí 7 – 9 dní intenzívnym sčernaním živného média, v dôsledku tvorby sekundárnych sulfidov železa a medi (reakcie (1), (2) a (3)) a charakteristickým zápachom po sulfáne.

Z takto pripravených tzv. obohatených bakteriálnych kultúr SRB sme ďalej postupným preočkovávaním do pevnej selektívnej živnej pôdy a kultiváciou v anaeróbných podmienkach získali čistú bakteriálnu kultúru SRB. Na základe mikroskopického pozorovania morfológie, charakteru bunkovej steny (farbenie podľa Grama) a zápachu po sulfáne môžeme konštatovať, že bakteriálne kultúry obsahovali nasledovné SRB:

- VSŽ – zmes rodov *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum*,
- Gj – zmes rodov *Desulfovibrio* (obr. 2) a *Desulfotomaculum* (obr. 3).

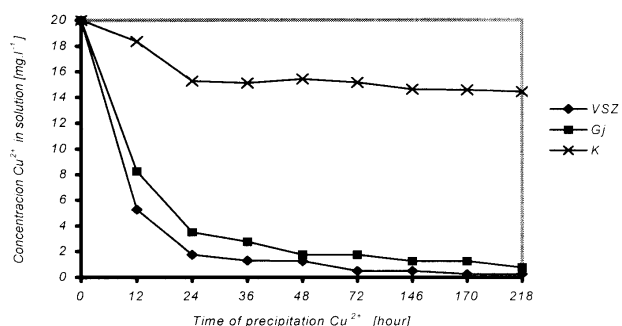


Obr.2. Vzorka (Gj), (1000x), olejová imerzia, rod *Desulfovibrio* – baktérie tvaru vibrií.
Fig.2. Sample (Gj), (1000x) by oil immersion, genera *Desulfovibrio* – vibrio shaped bacteria.

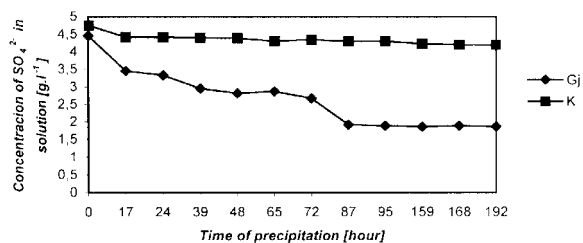


Obr.3. Vzorka (Gj), (1000x), olejová imerzia, rod *Desulfotomaculum* – baktérie tvaru tyčiniek.
Fig. 3. Sample (Gj), (1000x) by oil immersion, genera *Desulfotomaculum* – rod shaped bacteria.

Získané SRB boli následne testované v orientačných experimentoch čistenia modelových roztokov s obsahom meďnatých kationov a sulfátových aniónov. Cieľom testov bolo overenie aktívnej činnosti vyizolovaných SRB, zistenie ich účinnosti a kinetiky procesu eliminácie Cu^{2+} a SO_4^{2-} . Získané výsledky, ktoré sú graficky prezentované na obr.4 a obr.5, potvrdili vysokú aktivitu nami vyizolovaných SRB, o čom svedčí aj dosiahnutá účinnosť odstránenia Cu^{2+} (98 –99 %). V prípade sulfátov bola účinnosť ich odstránenia z roztoku 60%. Proces anaeróbnej sulfátredukcie sa pravdepodobne zastavil v dôsledku nakoncentrovania sulfánu, ktorý následne inhiboval SRB.



Obr.4. Precipitácia Cu^{2+} so sulfát-redukujúcimi baktériami K – abiotická kontrola; Gj - zmes rodov *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum* z lokality Gajdovka; VSŽ - zmes rodov *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum* zo závodu Východoslovenské železiarne.
Fig.4. Precipitation Cu^{2+} with sulphate-reducing bacteria K – abiotic control; Gj - mixture of genera *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* locality Gajdovka; VSŽ - mixture of genera *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* from Východoslovenské železiarne.



Obr.5. Precipitácia SO_4^{2-} so sulfát-redukujúcimi baktériami K – abiotická kontrola; Gj - zmes rodov *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum* z lokality Gajdovka.
Fig.5. Precipitation SO_4^{2-} with sulphate-reducing bacteria K – abiotic control, Gj - mixture of genera *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* locality Gajdovka.

Záver

Prezentované poznatky ako aj prvé výsledky izolácie SRB zo slovenských zdrojov a orientačných testov čistenia modelových roztokov od kationov Cu^{2+} a aniónov SO_4^{2-} umožňujú konštatovať, že:

- SRB sa v dostatočnom množstve vyskytujú v prírodných zdrojoch sírnatých minerálnych vôd, ale aj vo vodojemoch odpadových priemyselných vôd,
- prirodzená činnosť SRB môže byť v princípe využitá v environmentálnych technológiách čistenia priemyselných odpadových vôd.

Uvedené poznatky potvrdzujú, že príroda disponuje nesmiernym biopotenciálom, ktorý za určitých okolností možno považovať za environmentálne bohatstvo, ktoré perspektívne umožní postupne znížiť problémy, ktoré človek svojou činnosťou spôsobil životnému prostrediu v období priemyselnej revolúcie, nevynímajúc súčasnosť.

Táto práca vznikla v rámci riešenia grantovej úlohy č. 2-610 399 grantovej agentúry VEGA.

Literatúra

- BETINA, V. & NEMEC, P. 1977. Všeobecná mikrobiológia, Bratislava, *Alfa*, 1977.
- GROUDEVA, V.I. & GROUDEV, S.N. 1997. Bioremediation of Acide Drainage Waters from a Copper Mine. In: *International Biohydrometallurgy Symposium*, Sydney, 1997.
- IMAI, K. 1986. Utilization of sulphate-reducing bacteria and photolithotrophic bacteria in Biohydrometallurgy. In: *Process metallurgy*, New York, Elsevier, 1986, p. 383 – 394.
- KARAVAJKO, G.I., ROSSI, G., AGATE, A.D., GROUDEV, S.N. & AVAKYAN, Z.A. 1988. Biogeotechnology of metals, *centre of projects GKNT*, Moscow, 1988, p. 19-21, 59-61.
- KUŠNIEROVÁ, M. 1993. Minerálne biotechnológie, *Mineralia Slov.* 4, 25, 1993, s. 2-3.
- MIKUNDOVÁ, Š., OGIER, T. & DANIHELKA, P. 1997. Možnosti recyklácie síranů z odpadních vod při sulfátovém způsobu výroby celulózy. In: *Recyklace odpadu*, Ostrava, VŠB-TU, 1997, p. 67-73.
- ODOM, J.M. & RIVERS SINGLETON J.R. 1993. The Sulphate-reducing bacteria. *Contemporary Perspectives*, New York, Springer-Verlag, 1993.
- POSTGATE, J.R. 1984a. The sulphate-reducing bacteria. 2nd edition, *Cambridge University Press*, Cambridge, 1984a, p. 208.
- REHM, H.J. & REED, G. 1981. Biotechnology, vol. 1, *Verlag Chemie GmbH*, Weinheim, 1981, p. 201-204.
- ROSYPAL, S., HOĐAK, K., MARTINEC, T. & KOCOUR, M. 1981. Obecná bakteriologie, Praha, *SPN*, 1981.
- VODRÁŽKA, Z. 1981. Biotechnologie, Praha, *VŠCHT*, 1981.