

## Bakteriálna redukcia železa a korespirácia O<sub>2</sub> a Fe<sup>3+</sup> pri rôznych koncentráciách kyslíka v prostredí.

Daniel Kupka<sup>1</sup>

### *Bacterial reduction of ferric iron and co-respiration of O<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup> at various oxygen concentrations*

*Acidiphilium SJH*, was cultivated in laboratory bioreactor under aerobic, micro-aerobic and anaerobic conditions. The bacterium oxidized organic substratum D-galactose to carbon dioxide using oxygen and ferric iron as terminal electron acceptor. The reduction of ferric iron to ferrous iron was observed in either fully aerobic or anoxic conditions. Bacterial growth measured as turbidity and the substrate oxidation measured as CO<sub>2</sub> production showed an exponential pattern. The maximum specific growth rate  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  (generation time of 5.8 h) was observed under aerobic conditions. The molar ratio of CO<sub>2</sub> produced to O<sub>2</sub> consumed CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> of approx. 1.16 in fully aerobic conditions indicate bacterial preference of oxygen as electron acceptor though weak reduction of ferric iron by the bacterial culture was apparent. Under conditions with the oxygen limitation, the molar CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> ratio increased to above 4 with a marked prevalence of Fe<sup>3+</sup> as the electron acceptor. The co-respiration of both oxygen and ferric iron regardless of the concentration of soluble oxygen suggests a constitutive synthesis of the "iron-reductase" enzyme system in this bacterium. On the other hand, the bacterial growth was inhibited in cultures sparged with a pure nitrogen gas. The organic substrate oxidation and ferric iron reduction by apparently non-growing bacteria was linear and extremely slow for a few days. The recovery and acceleration of bacterial growth and ferric iron reduction was observed after changing the inconvenient incubation in pure N<sub>2</sub> atmosphere into incubation allowing the CO<sub>2</sub> accumulation within the medium in a closed reactor. Reduction of ferric iron to ferrous iron in micro-aerobic conditions proceeded most rapidly and completely. The change in the Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> ratio caused decrease of the oxidation-reduction potential of the medium (Eh) from approx. 800 mV to approx. 350 mV with respect to the Nernst's equation.

**Key words:** *Acidiphilium*, ferric iron reduction, co-respiration

### Teoretická časť

Disimilačná redukcia trojmocného železa je alternatívny spôsob respirácie mikroorganizmov pri absencii kyslíka v prostredí. Konečným akceptorom elektrónov z oxidácie organických látok (heterotrofné organizmy) alebo anorganického substrátu (v prípade autotrófov) je Fe<sup>3+</sup>, ktoré môže byť vo forme rozpustných alebo nerozpustných zlúčenín.

Respirácia Fe<sup>3+</sup> má veľký význam pri rozklade a kolobehu organickej hmoty v prírode, pretože pri absencii kyslíka umožňuje udržať kontinuitu oxidačných pochodov a následnej degradácie organických látok až na CO<sub>2</sub> a vodu. Bakteriálna redukcia železa zohráva dôležitú úlohu v geochemických procesoch pri transformácii minerálov s obsahom železa (Lowley, 1987; Lowley, 1997).

Redukciou sa Fe<sup>3+</sup> mení na rozpustné Fe<sup>2+</sup>, čo má za následok disolúciu Fe - minerálov, vrátane asociovaných prvkov. Bakteriálnu redukciu železa je možné aplikovať napr. pri eliminácii nežiaducich železitých minerálov z nerudných surovín (Hintz et al., 1977; Štyriaková et al., 2003) alebo pri bioremediácii bankých lokalít s tvorbou kyslých vôd (Johnson, 1995; Bilgin et al., 2004).

V tejto práci je prezentovaný priebeh redukcie trojmocného železa baktériami *Acidiphilium* SJH, ktoré boli pôvodne izolované z kyslých bankých vôd. Baktérie z rodu *Acidiphilium* sú heterotrofné, aeróbne a fakultatívne anaeróbne organizmy, rastúce v kyslej až neutrálnej oblasti pH, s optimom pri pH 3. Oxidujú organický substrát na CO<sub>2</sub> a ako oxidant využívajú kyslík alebo trojmocné železo (Johnson, 1998; Kusel et al., 1999). Acidofilné heterotrofné baktérie sa vzhľadom na svoje jedinečné vlastnosti javia perspektívne s možnosťou využitia pri redukčnom lúhovaní zlúčenín trojmocného železa.

Baktérie *Acidiphilium* SJH redukujú Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> aj v prítomnosti kyslíka. Striktne anoxické prostredie nie je nevyhnutnou podmienkou redukcie železa. Navyše, niektoré druhy rodu *Acidiphilium* dokážu pri oxidácii organických látok súčasne využívať (redukovať) kyslík aj trojmocné železo. Možnosť korespirácie O<sub>2</sub> a Fe<sup>3+</sup> predstavuje významný fenomén, pretože u mnohých iných skupín fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov je absencia kyslíka obligátnou podmienkou respirácie Fe<sup>3+</sup> a redukcia železa je inhibovaná už pri nízkych koncentráciách kyslíka v prostredí (Arnold, 1990).

Predmetom štúdia v tejto práci bolo:

- sledovanie rastu bakteriálneho druhu *Acidiphilium* SJH vo vsádzkovej kultivácii v aeróbnych a anaeróbných podmienkach,
- štúdium redukcie Fe<sup>3+</sup> pri rôznych koncentráciách rozpusteného kyslíka v živnom médiu,
- dôkaz korespirácie O<sub>2</sub> a Fe<sup>3+</sup> pri oxidácii organického substrátu.

<sup>1</sup> MVDr. Daniel Kupka, PhD., Ústav geotechniky Slovenskej akadémie vied, Watsonova 45, 043 53 Košice, [dankup@saske.sk](mailto:dankup@saske.sk)  
(Recenzovaná a revidovaná verzia dodaná 8. 9. 2005)

Práca je súčasťou riešenia čiastkových úloh projektov APVT 51-006304 a VEGA č. 2/5033/5 so zameraním na úpravu nerudných surovín, s možnosťou využitia mikroorganizmov pri eliminácii železitých minerálov ako nežiaducej prímеси.

### Materiál a metódy

Bakteriálny kmeň *Acidiphilium* SJH bol získaný darom od Dr. Barrie Johnsona (University of Wales, Bangor, School of Biol. Sci.) a udržiavaný pravidelným preočkovávaním v tekutom živnom médiu s nasledovným zložením: 6,25 g.l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 g.l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,13 g.l<sup>-1</sup> tryptón sójový bujón, 0,9 g.l<sup>-1</sup> D-galaktóza, 10 ml.l<sup>-1</sup> roztok mikroelementov. Na úpravu pH na konečnú hodnotu 2,5 bola použitá 5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Baktérie boli kultivované v termostate pri 30 °C za aeróbnych podmienok. Rast baktérií bol hodnotený meraním absorbancie roztoku. Vyrastené kultúry boli preočkované v množstve 10 % do čerstvého média. Na štúdium bakteriálnej redukcie bolo do média pridaných 35 mM (cca 2 g.l<sup>-1</sup>) Fe<sup>3+</sup> vo forme síranu železitého.

Kinetické merania prebiehali v laboratórnom bioreaktore s pracovným objemom 1 liter pri teplote 30 °C. Hodnoty pH boli merané pomocou kombinovanej pH elektródy red-rod typu (Radiometer analytical). Oxidačno-redukčný potenciál v priebehu bakteriálnej redukcie Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> bol meraný kombinovanou platinovou elektródou s Ag/AgCl referenčnou elektródou (Chemoprojekt). Koncentrácia Fe<sup>2+</sup> v roztoku bola stanovená spektrofotometricky metódou s o-phenantrolínom (Herera et al., 1988). Koncentrácia Fe<sup>3+</sup> bola meraná v UV oblasti pri vlnovej dĺžke 300 nm (Basaran and Tuovinen, 1986) na UV-VIS spektrofotometri (Thermo-Electron-Corporation). Koncentrácia rozpusteného kyslíka bola meraná kyslíkovým senzorom polarografického typu (Cole-Parmer). Oxid uhličitý produkovaný v priebehu kultivácie bol monitorovaný pomocou IČ-CO<sub>2</sub> analyzátora (Edinburgh Instruments). Koncentrácia baktérií bola hodnotená turbidimetricky pri 450 nm po odfarbení živného roztoku vyviazaním Fe<sup>3+</sup> do bezfarebného komplexu s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Jednotlivé metodické postupy sú podrobne dokumentované v dizertačnej práci (Kupka, 2001).

### Výsledky a diskusia

Metabolizmus mikroorganizmov je ovplyvnený prítomnosťou, alebo absenciou kyslíka v ich životnom prostredí. Aktuálna koncentrácia kyslíka v prostredí je výsledkom rýchlosti spotreby kyslíka (bio)chemickými oxidačnými reakciami a rýchlosti prísunu kyslíka priamou difúziou z atmosféry, alebo sprostredkované z okolia. Koncentračné zmeny rozpusteného kyslíka v roztoku možno vyjadriť nasledujúcim vzťahom:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - r_{O_2} \quad (1)$$

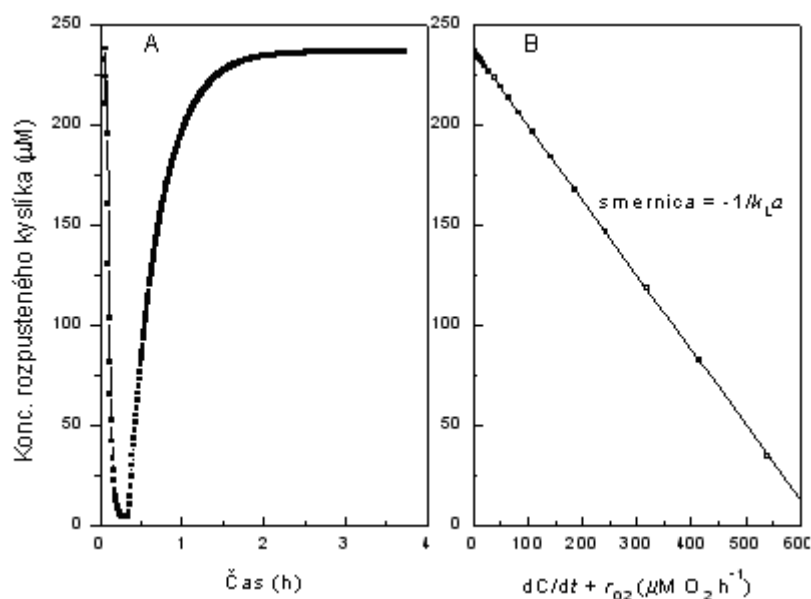
Zmenu koncentrácie kyslíka v roztoku  $dC_{O_2}/dt$  [mM h<sup>-1</sup>] určujú dva parametre rovnice, a to:  
 $k_L a$  objemový koeficient prestupu kyslíka [h<sup>-1</sup>] a  
 $r_{O_2}$  rýchlosť spotreby kyslíka v roztoku [mM h<sup>-1</sup>], pričom  
 $C_{O_2}^*$  je nasýtená koncentrácia kyslíka v roztoku [mM], ktorá je daná rozpustnosťou plynu v kvapaline pri danej teplote a tlaku,  
 $C_{O_2}$  je aktuálna koncentrácia kyslíka v roztoku [mM] meraná kyslíkovou elektródou.

Pomocou rovnice (1) je možné určiť rýchlosť spotreby kyslíka reakciou v roztoku na základe koncentrácie rozpusteného kyslíka za predpokladu, že je známa hodnota konštanty  $k_L a$ . Objemový koeficient prestupu kyslíka ( $k_L a$ ) bol vypočítaný z priebehu sýtenia roztoku kyslíkom zo vzduchu, po predchádzajúcom vytesnení O<sub>2</sub> inertným plynom (Obr. 1-A). V súlade s rovnicou (1) je rýchlosť sýtenia  $dC_{O_2}/dt$  najvyššia v počiatočnej fáze, pri vysokej diferencii  $C_{O_2}^* - C_{O_2}$  a postupne klesá na nulovú hodnotu pri dosiahnutí nasýtenej koncentrácie roztoku. Úpravou rovnice (1) je možné vypočítať  $k_L a$  zo smernice priamky (Obr. 1-B).

$$C = C_{O_2}^* - \frac{1}{k_L a} \left( r_{O_2} + \frac{dC_{O_2}}{dt} \right) \quad (2)$$

Hodnota  $k_L a$ , ktorá je kvantitatívnou mierou intenzity aerácie reaktora závisí od viacerých parametrov. Z nich najdôležitejšie sú: rýchlosť miešania, rýchlosť prietoku, kvalita vstupného plynu a kvalita difúzéra

(veľkosť celkovej styčnej plochy- povrchu bublín). Hodnotu  $k_L a$  významne ovplyvňuje teplota a chemické zloženie roztoku. Rýchlosť miešania a prietok vzduchu, resp. inertu boli v jednotlivých pokusoch nastavené individuálne podľa požiadavky na intenzitu aerácie a potom udržiavané konštantné počas trvania experimentu.



Obr. 1. Časový záznam koncentrácie kyslíka v roztoku (1-A) a výpočet objemového koeficientu prestupu kyslíka zo smernice priamky závislosti rýchlosti sýtenia na koncentrácii rozpusteného kyslíka (1-B). Podmienky experimentu: sterilné živné médium, teplota: 30°C, rýchlosť miešania: 300 ot min<sup>-1</sup>, vzduch dispergovaný sklenou fritou, rýchlosť prietoku vzduchu: 200 ml min<sup>-1</sup>.

Fig. 1. Change of the oxygen concentration in the solution (1-A) and calculation of the volumetric mass transfer coefficient of the oxygen according to eq. 2. (1-B). Experimental conditions: sterile growth medium, temperature: 30 °C, stirrer speed: 300 rpm, air sparged through a glass frit at the airflow rate of 200 ml min<sup>-1</sup>.

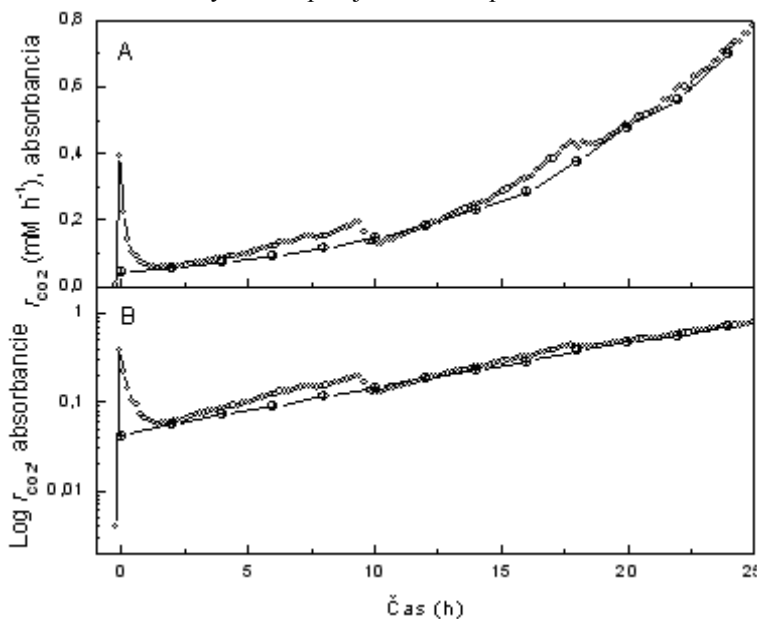
Počiatkový pokles koncentrácie kyslíka (Obr. 1-A) zodpovedá jeho vytesneniu z roztoku pomocou inertného plynu. Následný nárast koncentrácie zodpovedá priebehu sýtenia roztoku kyslíkom z atmosférického vzduchu.

### Aeróbnne podmienky

V priebehu aeróbnneho rastu baktérie v prítomnosti kyslíka oxidovali cukor hexózu na oxid uhličitý a vodu v súlade s rovnicou (3).



Aeróbnna kultivácia bola študovaná pri dvoch vsádzkach, s rôznou intenzitou aerácie. Prvá vsádzka bola intenzívne prevzdušňovaná, s hodnotou objemového koeficientu prestupu kyslíka  $k_L a = 42,9 \text{ h}^{-1}$ , druhá s hodnotou  $k_L a = 21,8 \text{ h}^{-1}$ . Na obr. 2. je zaznamenaný celý priebeh aeróbnnej kultivácie. Záznam koncentrácie kyslíka v živnom médiu (Obr. 2-A.) monitoruje rovnováhu medzi rýchlosťou spotreby kyslíka bakteriálnou kultúrou a rýchlosťou prísunu do roztoku v súlade s rovnicou (1). Vo fáze kulminácie rastovej rýchlosti koncentrácia kyslíka v prvej kultivácii poklesla na hodnotu 205  $\mu\text{M}$  (Obr. 2-A.), čo predstavuje 86 % saturácie. Napriek intenzívnej aerácii dochádza k čiastočnej redukcii  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  (Obr. 2-C.).

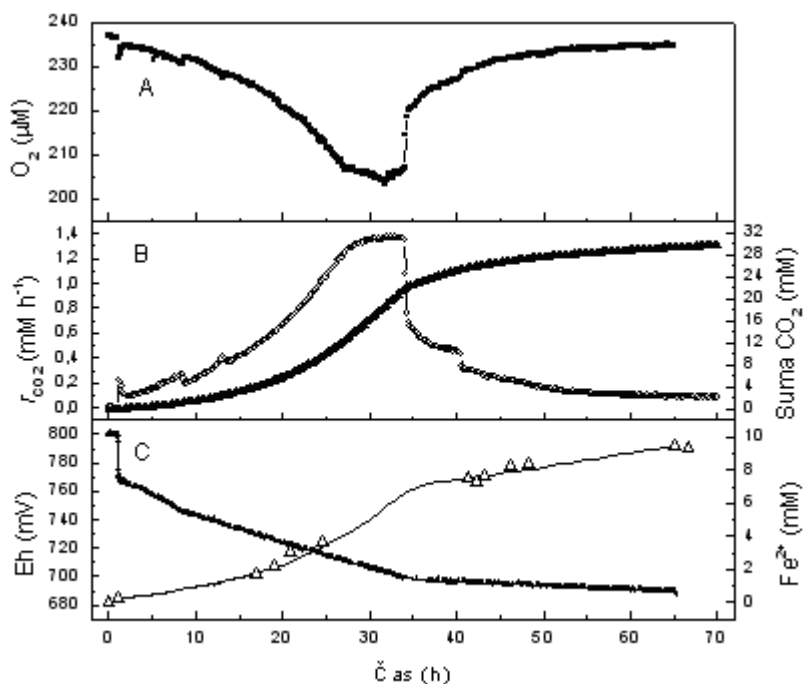


Obr. 2. Aeróbnna kultivácia baktérii Acidiphilium SJH v médiu s 35 mM  $Fe^{3+}$  vo forme  $Fe_2(SO_4)_3$ . Hodnota  $k_L a = 42,9 \text{ h}^{-1}$ . 2-A. Koncentrácia rozpusteného kyslíka (■). 2-B. Rýchlosť produkcie  $CO_2$  (○) a kumulatívne množstvo produkovaného  $CO_2$  (●). 2-C. Pokles oxidačno-redukčného potenciálu roztoku Eh (†) v dôsledku redukcie  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  (△).

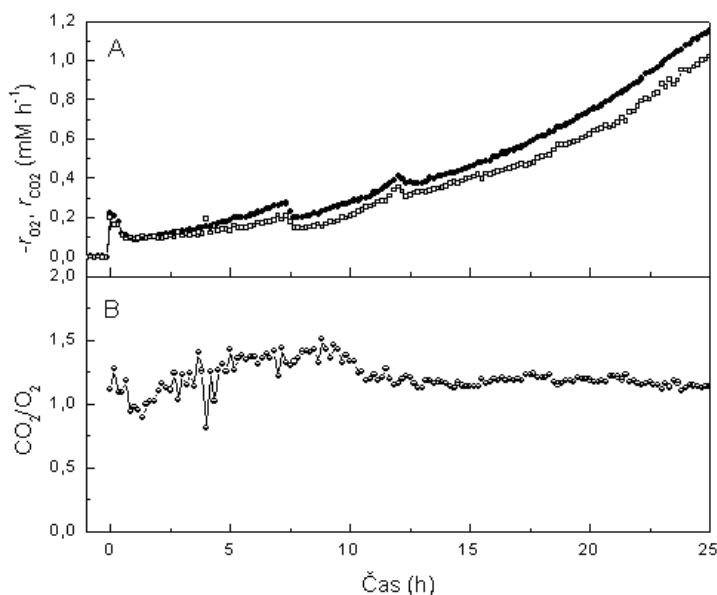
Fig. 2. Aerobic cultivation of Acidiphilium SJH in the medium containing 35 mM of  $Fe^{3+}$  aerated at  $k_L a = 42.9 \text{ h}^{-1}$ . 2-A. Concentration of soluble oxygen in the medium (■). 2-B. Carbon dioxide production rate  $r_{CO_2}$  (○) and the cumulative amount of produced  $CO_2$  (●). 2-C.

Decrease of redox potential of the solution  $Eh (+)$  due to the reduction of  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  ( $\Delta$ ).

V druhej vsádzke s polovičnou intenzitou aerácie (údaje nie sú prezentované) klesla hladina kyslíka až na cca. 44 % nasýtenej koncentrácie. Napriek týmto rozdielom bol priebeh bakteriálneho rastu a redukcie železa v oboch experimentoch podobný (Obr. 2. a 3.). Bakteriálny rast meraný turbidimetricky mal exponenciálny priebeh so špecifickou rýchlosťou  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$ , čo zodpovedá generačnej dobe 5,8 h. Taktiež oxidácia organického substrátu bola exponenciálna, o čom svedčí exponenciálny nárast rýchlosti produkcie  $CO_2$  a rýchlosti spotreby kyslíka (Obr. 3 a 4). Molárny pomer produkovaného  $CO_2$  k spotrebovanému kyslíku mal vo fáze exponenciálneho rastu hodnotu cca 1,16 (Obr. 4). Len zlomok produkcie  $CO_2$  pochádzal z oxidácie cukru  $Fe^{3+}$  iónom v súlade s rovnicou 4.

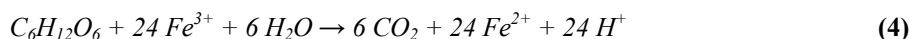


Obr. 3. Aeróbná kultivácia, druhá vsádzka ( $k_{La} = 21,8 \text{ h}^{-1}$ ). Exponenciálna fáza rastu bakteriálnej kultúry. 3-A. Rýchlosť produkcie  $CO_2$  ( $\circ$ ), a exponenciálny nárast počtu buniek meraný absorbanciou roztoku ( $\square$ ). 3-B. Tie isté hodnoty vynesené v semilogaritmickej merítke. (Pozn. počiatočný pik produkcie  $CO_2$  je zapríčinený výronom  $CO_2$  z inokula). 3-C. Tie isté hodnoty vynesené v semilogaritmickej merítke. (Pozn. počiatočný pik produkcie  $CO_2$  je zapríčinený výronom  $CO_2$  z inokula).



Obr. 4. Aeróbná kultivácia, prvá vsádzka ( $k_{La} = 42,9 \text{ h}^{-1}$ ). Priebeh respirácie bakteriálnej kultúry v exponenciálnej rastovej fáze. 4-A. Rýchlosti produkcie  $CO_2$  ( $\bullet$ ) a spotreby kyslíka ( $\square$ ). 4-B. Pomer rýchlosti produkcie  $CO_2$  k rýchlosti spotreby kyslíka ( $\square$ ).

Oxidácia organického substrátu prebiehala za súčasnej redukcie  $O_2$  aj železa. So zvyšovaním koncentrácie bakteriálnych buniek stúpa aj rýchlosť redukcie  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  s maximom cca  $0,4 \text{ mM Fe}^{3+} \cdot \text{h}^{-1}$ . V súlade s Nernstovou rovnicou dochádza pri zmene  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  k poklesu oxidačno-redukčného potenciálu (Obr. 2-C.) a zároveň k poklesu pH roztoku v dôsledku produkcie  $H^+$  protónov (4).



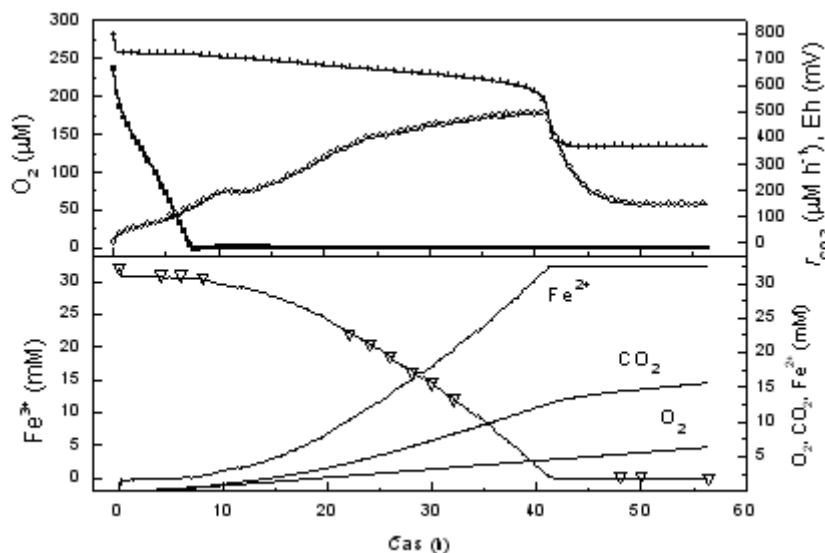
Redukcia železa poukazuje na fakt, že syntéza enzýmov bakteriálneho Fe<sup>3+</sup>-reduktázového systému nie je inhibovaná ani pri vysokej koncentrácii kyslíka, pričom ich aktivita ostáva zachovaná aj v plne aeróbných podmienkach. U bakteriálneho druhu *Acidiphilium* SJH bol dokázany konštitutívny typ enzýmov železo-reduktázového systému a ich syntéza prebieha bez ohľadu na podmienky aerácie (Johnson and Bridge, 2002).

V čase  $t = 34$  h došlo k prudkému poklesu rýchlosti produkcie CO<sub>2</sub>, aj rýchlosti spotreby kyslíka, pravdepodobne v dôsledku vyčerpania organického substrátu. Taktiež rýchlosť redukcie železa sa spomaľuje. V oboch experimentoch aeróbnej kultivácie bolo redukovaných približne 10 mM Fe<sup>3+</sup>, teda necelá tretina počiatočnej koncentrácie železa.

Produkcيا CO<sub>2</sub> cca 30 mM (Obr. 2-B.) zodpovedala oxidácii 5 mM cukru hexózy. Je to približne jedna polovica počiatočnej koncentrácie (10 mM) D-galaktózy prítomnej v živnom médiu. Ak nedochádzalo k tvorbe medziproduktov, zvyšná časť galaktózy bola inkorporovaná do bakteriálnej biomasy.

### Mikroaeróbná kultivácia

Pre vytvorenie podmienok s limitáciou kyslíkom bol prestup kyslíka do média obmedzený len na výmenu z hladiny. Priestor reaktora nad roztokom (head space) bol odvetrávaný atmosférickým vzduchom s rýchlosťou prietoku 100 ml.min<sup>-1</sup>. Rýchlosť miešania vsádzky bola znížená na 75 ot. min<sup>-1</sup>. Pri takto zníženej intenzite aerácie reaktora ( $k_La = 0,5$  h<sup>-1</sup>) došlo po určitom čase k vyčerpaniu kyslíka rastúcou kultúrou. Obr. 5. ukazuje priebeh rastu bakteriálnej kultúry v mikroaeróbných podmienkach. Aeróbná fáza s postupným poklesom koncentrácie kyslíka, trvajúca cca. 8 h, dospela do štádia s limitáciou kyslíkom. Rýchlosť spotreby kyslíka bakteriálnou kultúrou bola limitovaná rýchlosťou transportu O<sub>2</sub> do média, t.j. súčinom  $C_{O_2}^* \cdot k_La \approx 118 \mu M h^{-1}$ . Pokiaľ by bol kyslík jediným oxidantom prítomným v médiu, ďalší rast bakteriálnej kultúry by bol lineárny, limitovaný transportom kyslíka. Oxidácia organického substrátu pokračovala naďalej a rýchlosť produkcie CO<sub>2</sub> sa postupne zvyšovala a v čase  $t \approx 42$  h dosiahla hodnotu  $> 500 \mu M h^{-1}$ , čo je viac ako štvornásobok rýchlosti transportu kyslíka. Tento nárast bol možný vďaka prítomnosti Fe<sup>3+</sup> ako alternatívneho oxidanta. Redukcia Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> zapríčinila pokles oxidačno-redukčného potenciálu roztoku z 800 mV na 380 mV (obr. 5-A). Záznam redox elektródy bol použitý na výpočet koncentrácie Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> pomocou Nernstovej rovnice. Vypočítané údaje sú v dobrej korelácii s experimentálne nameranými hodnotami koncentrácie Fe<sup>3+</sup> (obr. 5-B).



Obr. 5. Mikroaeróbná kultivácia baktérií *Acidiphilium* SJH. 5-A. Koncentrácia kyslíka (■), rýchlosť produkcie CO<sub>2</sub> (○) a oxidačno-redukčný potenciál roztoku Eh (+) 5-B. Redukcia Fe<sup>3+</sup> (▽) bakteriálnou kultúrou oxidujúcou cukor v súlade s rovnicou (4). Koncentrácia Fe<sup>2+</sup> meraná pomocou redox elektródy, kumulatívne množstvo produkovaného CO<sub>2</sub> a spotrebovaného kyslíka. Podmienky experimentu: rýchlosť miešania 75 ot. min<sup>-1</sup>, difúzia vzduchu výmenou cez hladinu,  $k_La = 0,5$  h<sup>-1</sup>.

Fig. 5. Micro-aerobic cultivation of *Acidiphilium* SJH. 5-A. Oxygen concentration in the solution (■), CO<sub>2</sub> production rate (○) redox potential Eh (+). 5-B. Fe<sup>3+</sup> (▽) reduction by the bacterial culture oxidizing sugar in accordance with eq. 4. The concentration of Fe<sup>2+</sup> determined from the redox-measurements using the Nernst's equation and the cumulative amounts of both CO<sub>2</sub> produced and O<sub>2</sub> consumed. Experimental conditions: stirring speed 75 rpm, diffusion of the oxygen was limited by the top surface,  $k_La = 0,5$  h<sup>-1</sup>.

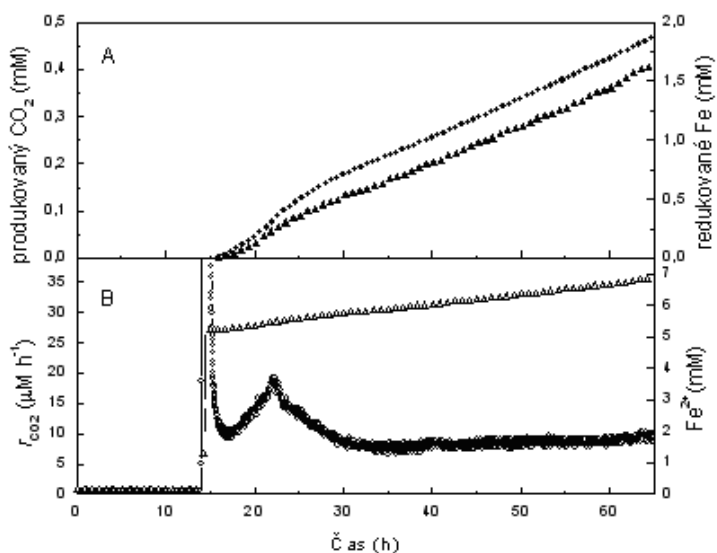
Pomer rýchlosti produkcie CO<sub>2</sub> a spotreby O<sub>2</sub> bol viac ako štvornásobný. Značná časť CO<sub>2</sub> pochádzala z respirácie Fe<sup>3+</sup>. Čistá (netto) produkcia CO<sub>2</sub> a spotreba Fe<sup>3+</sup> a O<sub>2</sub> v čase  $t = 42$  h približne zodpovedala

stechiometrii rovníc (3) a (4). Celkovo 62 % elektrónov z oxidácie organického substrátu bolo prenesených na  $\text{Fe}^{3+}$  a 38 % redukovalo kyslík (pričom na redukcii  $\text{O}_2$  sú potrebné 4 elektróny).

### Anaeróbna kultivácia

Oxidačno-redukčný potenciál sterilného živného roztoku s 35 mM  $\text{Fe}^{3+}$  má hodnotu približne 800 mV. Prítomnosť, či absencia  $\text{O}_2$  neovplyvňuje redox potenciál. Redox elektróda dávala konštantný signál pri striedavom sytíení roztoku vzduchom a dusíkom.

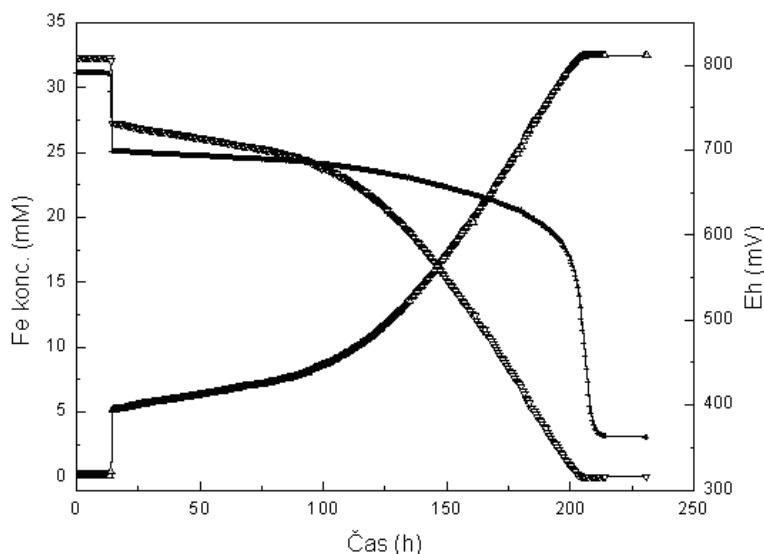
Na obr. 6. je priebeh anaeróbnej kultivácie. Abiotická redukcia  $\text{Fe}^{3+}$  ani produkcia  $\text{CO}_2$  v sterilnom živnom roztoku nebola pozorovaná počas viac ako 14 hodinovej doby. Pri každej inokulácii je zaznamenaný počiatočný výron  $\text{CO}_2$ , ktorý bol naakumulovaný v pôvodnej kultúre. Podobne je zaznamenaný skok redox potenciálu vnesením  $\text{Fe}^{2+}$  spolu s inokulom do čerstvého živného roztoku.



Obr. 6. Anaeróbna kultivácia baktérii *Acidiphilium SJH*. 6-A. Redukcia  $\text{Fe}^{3+}$  (▲) a produkcia  $\text{CO}_2$  (●) je v pomere 4:1 v súlade s rovnicou 4. 6-B. Sterilný živný roztok s 35 mM  $\text{Fe}^{3+}$  v atmosfére  $\text{N}_2$  nevykazoval abiotickú redukciu  $\text{Fe}^{3+}$  ani merateľnú produkciu  $\text{CO}_2$  po dobu > 14 hodín. Počiatočný výron  $\text{CO}_2$  a posun redox potenciálu v čase inokulácie ( $t = 14$  h) je pozorovaný pri každej inokulácii a je dôsledkom vnesenia produktov spolu s vyrastenou kultúrou do čerstvého živného roztoku.

Fig. 6. Anaerobic cultivation of *Acidiphilium SJH*. 6-A. Reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  (▲) and  $\text{CO}_2$  production (●) was in the ratio of 4:1 with respect to eq. 4. 6-B. Sterile culture medium containing 35 mM of  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{N}_2$  atmosphere showed neither the abiotic  $\text{Fe}^{3+}$  reduction nor the measurable  $\text{CO}_2$  production. Initial discharge of  $\text{CO}_2$  and the shift of the redox potential was observed every time in the moment of inoculation.

Správanie sa anaeróbnej kultúry v atmosfére dusíka ( $\text{N}_2$ ) je podstatne odlišné v porovnaní s predchádzajúcimi pokusmi. Zjavne stagnujúca bakteriálna kultúra vykazovala konštantnú ( $\sim 10 \mu\text{M C h}^{-1}$ ), ale rádovo nižšiu rýchlosť oxidácie substrátu v porovnaní s rýchlosťou pri aeróbnej kultivácii. Oxidácia galaktózy a produkcia  $\text{CO}_2$  v spojení s anaeróbnou respiráciou  $\text{Fe}^{3+}$  prebiehala v súlade s rovnicou (4). Dôkazom toho je rovnobežnosť záznamov produkovaného  $\text{CO}_2$  a redukovaného železa na grafe s mierkami ľavej a pravej osi v pomere 1:4 (obr. 6A). Zvýšená produkcia  $\text{CO}_2$ , ktorá sa prejavila pomerne širokým píkom v čase od  $t = 18$  h až  $t = 32$  h (obr. 6-B) nebola spojená s redukcii  $\text{Fe}^{3+}$ . Jej príčinou mohli byť vedľajšie katabolické pochody v mikroorganizmoch spojené s uvoľňovaním  $\text{CO}_2$ . Po viac ako 60 hodinovej stagnácii rastu kultúry bol prietok  $\text{N}_2$  prerušený a kultivácia pokračovala v uzavretom reaktore len s monitorovaním oxidačno-redukčného potenciálu (obr. 7.).



Obr. 7. Anaeróbna kultivácia *Acidiphilium SJH*. Akcelerácia bakteriálneho rastu a respirácie  $\text{Fe}^{3+}$  bola pozorovaná pri zmene nevyhovujúcich podmienok inkubácie v prúde  $\text{N}_2$  na inkubáciu v uzavretom reaktore v čase  $t = 72$  h. Záznam oxidačno-redukčného potenciálu (+) bol použitý na výpočet koncentrácie  $\text{Fe}^{3+}$  (▽) a  $\text{Fe}^{2+}$  (△) pomocou Nernstovej rovnice.

Fig. 7. Anaerobic cultivation of *Acidiphilium SJH*. The acceleration of bacterial growth and of the  $\text{Fe}^{3+}$  respiration was observed after changing the inconvenient incubation in pure  $\text{N}_2$  atmosphere into incubation allowing the  $\text{CO}_2$  accumulation within the medium in a closed reactor. This change was done at the time  $t = 72$  hours. The concentration of  $\text{Fe}^{3+}$  (▽) and of  $\text{Fe}^{2+}$  (△) in the solution was calculated from the record of redox potential (+) according to the Nernst's equation.

Prerušenie odvetrávania kultúry dusíkom umožnilo akumuláciu produkovaného CO<sub>2</sub> v živnom médiu, čím sa vytvorila priaznivejšia atmosféra pre bakteriálny rast. Redukcia železa prebehla kompletne. Finálna hodnota Eh roztoku bola podobná ako v prípade mikroaeróbnej kultivácie (obr. 4-A.).

### Záver

Na základe prezentovaných výsledkov možno konštatovať, že baktérie *Acidiphilium* SJH rastú v aeróbnom i anoxickom prostredí. Najvyššia špecifická rastová rýchlosť  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$ , aj rýchlosť oxidácie organickej hmoty, bola pozorovaná pri aeróbnych podmienkach. Redukcia Fe<sup>3+</sup> v aeróbnych podmienkach bola evidentná, avšak baktérie uprednostnili kyslík ako terminálny akceptor elektrónov. V podmienkach s limitáciou kyslíkom bola redukcia železa výraznejšia s maximálnou nameranou rýchlosťou  $\sim 1,5 \text{ mM Fe}^{3+} \text{ h}^{-1}$ . Abiotická redukcia železa nebola detekovaná v aeróbnych ani v anaeróbných podmienkach.

Súčasná korespirácia O<sub>2</sub> a Fe<sup>3+</sup> bola pozorovaná v celom intervale koncentrácie rozpusteného kyslíka, t.j. od stopových koncentrácií O<sub>2</sub> až po 100 % saturácie. Tento údaj dokazuje, že syntéza enzýmov Fe<sup>3+</sup>-reduktázového systému u baktérií *Acidiphilium* SJH je konštitutívna a nie indukovaná ako v prípade baktérií *Acidiphilium acidophilum* (Johnson, 2002). Odchýlka respiračného kvocientu CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> nad hodnotu 1 indikuje a zároveň kvantifikuje využívanie alternatívneho akceptora elektrónov z oxidácie organického substrátu. Pri aeróbnej kultivácii bol pomer CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>  $\sim 1,16$ . V podmienkach s limitáciou kyslíkom bol pomer CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>  $> 4$ .

V anaeróbných podmienkach v atmosfére 100 % N<sub>2</sub> bol bakteriálny rast inhibovaný. Respirácia Fe<sup>3+</sup> nerastúcou kultúrou bola extrémne pomalá s rýchlosťou oxidácie organického uhlíka  $\sim 10 \mu\text{M h}^{-1}$ . Mikroorganizmy preferujú iné zloženie anaeróbnej atmosféry a pravdepodobne vyžadujú prítomnosť oxidu uhličitého. Akcelerácia bakteriálneho rastu a respirácie Fe<sup>3+</sup> bola pozorovaná pri zmene nevyhovujúcich podmienok inkubácie v prúde N<sub>2</sub> na inkubáciu v uzavretom reaktore s možnosťou akumulácie produkovaného CO<sub>2</sub> v živnom médiu.

Biotechnológie s využitím mikroorganizmov schopných redukovať Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> je možné aplikovať vo viacerých oblastiach spracovania nerastných surovín a odpadov, pri sanácii pôd, odpadových vôd a sedimentov s obsahom kovov, pri sanácii starých banských záťaží vrátane kyslých banských vôd, ako aj pri degradácii organických látok v horninovom prostredí a podzemných vodách.

Výber vhodného biologického objektu (bakteriálneho druhu) bude závisieť od požiadaviek, ktoré musí biologický objekt akceptovať. Jedná sa predovšetkým o fyzikálno-chemické faktory prostredia, ako sú teplota, tlak, pH, chemická povaha spracovaného substrátu, chemické zloženie roztokov, odolnosť voči rôznym inhibítorm a podobne. Zástupcovia rodu *Acidiphilium* redukujú v mierne až extrémne kyslom prostredí tuhé (amorfné a kryštalické) a rozpustné formy trojmocného železa relatívne rýchlo a kompletne. Schopnosť súčasne korespirovať kyslík a trojmocné železo pri oxidácii organickej látky vylučuje požiadavku striktnej anaerobiózy, čo má veľký význam z technologického hľadiska. Acidofilné heterotrofné baktérie, ktorých prirodzeným prostredím sú kyslé banské vody s vysokou koncentráciou rozpustených kovov sa vzhľadom na svoje jedinečné vlastnosti zdajú byť perspektívne využiteľné v rôznych biotechnologických procesoch.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-51-006304 a Vedeckou grantovou agentúrou z projektu VEGA č. 2/5033/5.*

### Literatúra - References

- Arnold, R., G., Hoffmann, M., R., di Christina, T., J., Picardal, F., W.: Regulation of dissimilatory Fe(III) reduction activity in *Shewanella Putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2811-2817, 1990.
- Basaran, A., H., Tuovinen, O., H.: An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of pyrite and ferrous ion oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:338-341, 1986.
- Bilgin, A., A., Silverstein, J., A., Jenkins, J., D.: Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5. *FEMS Microbil. Ecol.* 49, 137-141, 2004.
- Herrera, L., Ruiz, P., Aguillon, J., C., Fehrmann, A.: A new spectrophotometric method for the determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 44, 171-181, 1981.
- Hintz, I., Kiss, S., Papacostea, P., Radulescu, D., Dragan-Bularda, M.: Application of a microbiological method for diminution of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> content of kaolins. *In Fourth Symposium on Soil Biology.* 387-391. Bucharest, Romania: Romanian National Society for Soil Science, 1977.

- Johnson, D., B., S., McGinness: Fe(III) reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 207-211, 1991.
- Johnson, D., B.: Acidophilic microbial communities: Candidates for bioremediation of acidic mine effluents. *Int. Biodeterioration. Biodegradation*, 41-58, 1995.
- Johnson, D., B.: Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 27, 307-317, 1998.
- Johnson, D., B. Bridge, T., A., M.: Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. *J. Appl. Microbiol.* 92, 315-321, 2002.
- Kupka, D.: Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*, *PhD. Thesis, Institute of Geotechnics, Slovak Academy of Sciences, Košice, 2001.*
- Kusel, K. et al.: Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3633-3640, 1999.
- Lowley, D., R.: Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review. *Geomicrobiol. J.* 5, 375-399, 1987.
- Lowley, D., R.: Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 305-313, 1997.
- Štyriaková, I., et al.: Biodestruction and deferritization of quartz sands by *Bacillus* species. *Minerals Engineering* 16, 709-713, 2003.