

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta,

Katedra fyzickej geografie a geoekológie

## **Keď mikroorganizmy dolujú**

**(Biooxidácia a heterotrofná bioextrakcia)**

**doc. RNDr. Martin Urík, PhD.**

**Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave**

TEXT K PREDNÁŠKE

2019

---

*Prednáška a text sú súčasťou riešenia projektu: KEGA č. 003UK-4/2017: Terénne vyučovanie geovied s využitím vybraných náučných chodníkov*

## Úvod

V prírodných podmienkach je mikrobiálna deteriorácia tuhých substrátov asociovaná s biochemickými procesmi týchto všadeprítomných organizmov. Jedným z významných dôsledkov biochemického zvetrávania tuhých povrchov geologických materiálov mikroorganizmami je biologicky indukované uvoľňovanie prvkov v dôsledku produkcie mikrobiálnych metabolitov - bioextrakcia.

Mikroorganizmy kolonizujúce substráty s obsahmi potenciálne toxických prvkov a vďaka svojej prirodzenej aktivite môžu zmeniť mobilitu, rozpustnosť, a tým aj biologickú dostupnosť alebo (eko)toxicitu mnohých nežiaducich látok. Tieto výnimočné vlastnosti mikroorganizmov sú však pre človeka aj prospešné, napríklad v aplikácii mikroorganizmov v spätnom získavaní (extrakcii) priemyselne zaujímavých prvkov z geologických alebo odpadových materiálov. Tieto procesy, využívajúce metabolickú aktivitu a produkty mikroorganizmov na extrakciu (polo)kovov z tuhých substrátov do rozpustnej formy, označujeme ako autotrofná (biooxidácia) a heterotrofná bioextrakcia.

## Mechanizmus biooxidácie

V sulfidových mineráloch, ktoré sú v kyselinách nerozpustné (napr.  $\text{FeS}_2$ ,  $\text{MoS}_2$ , a  $\text{WS}_2$ ), zanikajú chemické väzby medzi sírou a kovom mechanizmom, ktorého dôsledkom je oxidácia síry na tiosíran. Preto sa tento mechanizmus biooxidácie sulfidových minerálov označuje aj ako „*tiosulfátový*“. Oxidácia síry na tiosíran prebieha postupným prenosom elektrónov z valenčného pásma kovu v sulfide na katióny  $\text{Fe(III)}$  v roztoku. V tomto prostredí pravdepodobne dochádza aj k rozkladu vody za vzniku hydroxylových radikálov, ktoré účinne oxidujú síru.

Vznikajúci tiosíran je v kyslom prostredí nestály a oxiduje účinkom  $\text{Fe(III)}$  alebo aktivitou síru oxidujúcich baktérií cez rôzne medziprodukty až na síran. Vďaka tomu je síran

hlavným produktom tiosulfátového reakčného mechanizmu biooxidácie. V prostredí, v ktorom však nie sú prítomné síru oxidujúce baktérie môže vznikat' „chemickou oxidáciou“ tiosíranu relevantné množstvo elementárnej síry.

V kontexte tohto aj nasledujúceho mechanizmu je nevyhnutné si uvedomiť, že katióny Fe(III) spotrebované v jednotlivých reakčných krokoch sa regenerujú v kyslom prostredí účinkom železo oxidujúcich baktérií (napr. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*). Preto je rýchlosť biologickej oxidácie Fe(II) vo vodnom prostredí aj určujúcim krokom tiosulfátového mechanizmu biooxidácie.

V sulfidových mineráloch, ktoré sú rozpustné v kyslých roztokoch (napr. ZnS, PbS, FeAsS, CuFeS<sub>2</sub>, MnS<sub>2</sub>) je však mechanizmus zániku chemickej väzby medzi kovom a sírou odlišný. Okrem oxidačných účinkov Fe(III) ja proces uľahčený pôsobením kyslých vodíkov, ktoré po naviazaní na síru sulfidu produkujú sulfán. Ak sú v prostredí prítomné oxidačné činidlá, najmä však ióny Fe(III), oxiduje sa sulfán na radikál, ktorý polymerizuje na rôzne formy polysulfidov. Preto tento mechanizmus označujeme ako „*polysulfidový*“. Ďalšou oxidáciou vznikajúcich polysulfidov kationmi Fe(III) v kyslom prostredí dochádza k uvoľneniu elementárnej síry. V prostredí, kde prebieha táto reakcia bez prítomnosti síru oxidujúcich mikroorganizmov sa môže na elementárnu síru chemicky oxidovať až 90 % z celkového obsahu síry.

Oxidácia elementárnej síry prebieha výlučne účinkom síru oxidujúcich baktérií. Elementárna síra je totiž pri bežných tlakoch a teplotách voči účinku abiotickej oxidácie v kyslých až neutrálnych prostrediach inertná. Dôsledkom je, že sa v prípade zníženej aktivity alebo neprítomnosti síru oxidujúcich baktérií elementárna síra v prostredí akumuluje a môže ovplyvniť biooxidačný proces tvorbou inertnej vrstvy na povrchu minerálu. Ďalšie negatívum vyplývajúce z akumulácie síry je, že sa spätne neregenerujú kyslé vodíky. Síru oxidujúce

baktérie sú teda schopné svojou aktivitou okrem oxidácie síry na síran aj regenerovať kyslé vodíky v prostredí.

Keďže väzby sa v týchto sulfidoch rozrušujú pôsobením kyslých vodíkov, nie je priamo závislý na prítomnosti katiónov Fe(III) ako oxidačných činidiel. Akceptorom elektrónov z minerálu sulfidu môže byť aj molekulárny kyslík, ktorý sa bude redukovať cez superoxidový radikál a peroxid až na molekulu vody. Preto niektorí autori uvádzajú, že mechanizmus biooxidácie sulfidových minerálov, ktorý nevyžaduje priamy účinok Fe(III) katiónov, môžeme zaradiť ako tretiu kategóriu mechanizmu oxidácie, tzv. „*hydrogénsulfidový*“ mechanizmus.

Reťazec metabolických oxidačno-redukčných dráh, ktoré súvisia s biooxidáciou sulfidových minerálov sú najpodrobnejšie preskúvané pri mierne termofilnej proteobaktérii *Acidithiobacillus ferrooxidans*, najmä z dôvodu jej širokého komerčného uplatnenia v priemyselnej biooxidácii. V prípade tejto a iných Gram-negatívnych baktérií ide v princípe o prenos elektrónov z donora z vonkajšej membrány cez periplazmatický priestor na cytochróm oxidázu, ktorá je viazaná na vnútornej cytoplazmatickej membráne a katalyzuje redukciiu molekulárneho kyslíka a využíva týmto procesom získanú voľnú energiu na vytvorenie protónového gradientu medzi vnútorným prostredím bunky a periplazmatickým prostredím. Alternatívou tejto dráhy exergonického charakteru, pri ktorom vzniká voľná energia (a ATP) je taký mechanizmus elektrónového transportu, ktorého výsledkom je redukcia univerzálneho donora elektrónov v bakteriálnom metabolizme. Ten sa využíva napríklad na fixáciu CO<sub>2</sub> v Calvinovom cykle. Ide o endergonickú syntézu redukovanej formy nikotínamid adenín dinukleotidu (NAD(P)H).

Aj elektróny z redukovanej formy síry sú zdrojom energie, ktorú druh *At. ferrooxidans* a jemu príbuzné druhy síru oxidujúcich baktérií (napríklad *At. thiooxidans*) využívajú na syntézu ATP a NAD(P)H. V porovnaní so železo oxidujúcim elektrón transportným systémom *At. ferrooxidans*, je mechanizmus oxidácie síry komplikovanejší. Zložitosť systému vychádza

z rôznorodosti oxidačných stupňov síry a jej foriem. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že elementárna síra vstupuje do periplazmatického priestoru ako persulfidová síra, kde je oxidovaná oxygenázou na siričitan, a ďalej oxidoreduktázou na síran.

Najdôležitejšie mikroorganizmy, ktoré sa zúčastňujú biooxidácie sulfidových minerálov sú tie, ktoré „recyklujú“ Fe(III) alebo produkujú kyslé vodíky (vznikajúce počas biologickej oxidácie síry). Túto vlastnosť splňajú železo a síru oxidujúce chemolitotrofné baktérie a archaea. Tieto druhy sú acidofilné organizmy. Nízke hodnoty pH (často nižšie ako 1,5) umožňujú týmto organizmom využívať rozpustné formy Fe(II) a Fe(III). Tieto mikroorganizmy majú spoločných aj niekoľko ďalších vlastností, vďaka ktorým kolonizujú kyslé prostredia. Predovšetkým sú to autotrofné organizmy (len výnimočne obligátne heterotrofné), teda sú schopné viazať vzdušný CO<sub>2</sub> do organických zlúčenín. Preto im nie je nutné poskytovať iný zdroj uhlíka, čo je významné najmä z aplikačného hľadiska v biohydrometalurgii. Vzduch je aj zdrojom terminálneho akceptora elektrónov – kyslíka. V anaeróbných prostrediach alebo prostrediach s obmedzeným prístupom kyslíka, môžu využívať tieto organizmy ako terminálny akceptor elektrónov ióny Fe(III). Tieto organizmy využívajú ako zdroj metabolickej energie rozdiely v potenciáli medzi redoxnou dvojicou elektrónového donora (Fe(II)/Fe(III) alebo S<sub>0</sub>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) a akceptorom elektrónov (napríklad O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O).

### **Mechanizmus heterotrofnej bioextrakcie**

Niektoré druhy heterotrofných mikroorganizmov sú vďaka produkcii metabolitov kyslej povahy schopné významne znížiť pH prostredia, v ktorom rastú. Táto vlastnosť im poskytuje v konkurenčnom boji o zdroje uhlíka strategickú výhodu, keďže rast mnohých bakteriálnych druhov a vláknitých húb je pri pH nižšom ako 3 značne redukovaný. Chelatačné a kyslé vlastnosti týchto metabolitov tiež zvyšujú rozpustnosť mnohých zlúčenín kovov a poskytujú

tak mikroorganizmom výhodu v prostredí, v ktorom sú esenciálne prvky vo veľmi nízkych koncentráciách alebo v nerozpustnej forme.

Proces kyslými vodíkmi indukovaného uvoľňovania iónov z tuhých substrátov, ktorý označujeme ako *acidolýza*, tvorí spolu s *komplexolýzou* základ chemickej povahy heterotrofnej bioextrakcie. Kyslé mikrobiálne metabolity, ktoré acidolýzu vyvolávajú, vznikajú buď intracelulárne alebo sú produktom enzýmovej oxidácie organických látok v extracelulárnom prostredí.

Keďže aj komplexolýza je procesom uvoľňovania prvkov účinkom biogénnych organických molekúl, oba deje prebiehajú vo väčšine prípadov súbežne a v podmienkach mikrobiálnej kultivácie sú preto neoddeliteľné. Najmä mikroskopické huby produkujú rôzne primárne a sekundárne extracelulárne metabolity, ktoré tvoria s dostupnými iónmi kovov stabilné organokovové zlúčeniny. Sú to najmä exopolysacharidy, karboxylové kyseliny, siderofóry, deriváty fenolu a aminokyseliny.

Vo všeobecnosti je kvalita a kvantita mikrobiálnych metabolitov závislá od druhej skladby spoločenstva mikroorganizmov, obsahu a charakteru dostupných živín a niektorých vlastností prostredia, ovplyvňujúcich fyziológiu organizmu. Napríklad množstvá akumulovanej kyseliny citrónovej druhom *Aspergillus niger*, významne ovplyvňuje obsah katiónov mangánu a pH prostredia. Intenzita a rozsah výtoku uvedených kyslých a chelatačných metabolitov je jedným z významných rýchlost' určujúcich faktorov heterotrofnej bioextrakcie.

Čiastočne sa na heterotrofnej bioextrakcii podieľajú aj redoxné transformácie chemických prvkov, ktoré prebiehajú v bezprostrednej blízkosti bunkových povrchov alebo priamo v nich. Iniciátor týchto dejov je výtok alebo extracelulárna syntéza nízkomolekulových redoxne aktívnych látok (najmä radikálov) a je spojená s aktivitou oxidoreduktáz.

Určenie, ktorý z procesov bude kľúčový pri uvoľňovaní prvkov v bioextrakcii je závislé od viacerých faktorov a externých a interných parametrov v systéme. Na migráciu prvkov

nepôsobí acidolýza, komplexolýza a redoxolýza ako procesy izolovane, ale v mnohých interakciách. Tie môžu mať na extrakciu prvkov zo substrátu synergický alebo antagonistický účinok.

### **Využitie bioextrakcie v biohydrometalurgii a bioremediáciách**

Kým autotrofné mikroorganizmy sa väčšinou aplikujú na získavanie vybraných kovov zo sulfidových minerálov, heterotrofné mikroorganizmy sú pri dodaní potrebných živín efektívne počas deteriorácie kremičitanov a oxidov. Biologicky indukovanú transformáciu rôznych typov tuhých substrátov možno využiť v biohydrometalurgii pri spätnom získavaní komerčne zaujímavých kovov a polokovov z minerálov a polymetalických rúd, odpadov alebo iných substrátov. Biohydrometalurgický proces je podobný prírodným biogeochemickým cyklom a využíva priame aplikovanie mikroorganizmu na substrát alebo použitie sekundárnych metabolitov mikroorganizmov bez priameho kontaktu mikroorganizmu v dynamických alebo statických podmienkach. Efektívnejšie je využitie dvoj-stupňového procesu, keďže produkcia sekundárnych metabolitov nie je ovplyvnená toxickým vplyvom extrahovaných prvkov. Uvoľnené prvky navyše nie sú akumulované biomasou, ani transformované do iných fáz.

Biotechnologické získavanie vybraných prvkov sa zameriava nielen na využitie prírodných geogénnych materiálov ako minerálov a hornín, ale v poslednom období aj na recykláciu antropogénnych sekundárnych surovín - odkaliskového a haldového materiálu, antropogénne znečistených pôd a sedimentov a priemyselných odpadov. Mikroorganizmy sú napríklad schopné spätne získavať prvky zo spotrebovaných katalyzátorov obsahujúcich oxidy a sulfidy kovov s potenciálne toxickými prvkami. Úspešná aplikácia mikroorganizmov na zníženie obsahu vybraných ťažkých kovov bola realizovaná aj v prípade popolčeka vznikajúcom po spaľovaní uhlia alebo aj priemyselného odpadu. Moderné je najmä získavanie prvkov z elektronických odpadov (e-waste), ktoré sa zdá byť ekonomicky výhodné, pretože

obsahy niektorých záujmových prvkov viacnásobne (niekedy aj 100 násobne) prevyšujú ich prirodzený výskyt v horninách.

## Záver

Biooxidácia a heterotrofná bioextrakcia sú komplexné chemické deje, v ktorých mikroorganizmy (mikroskopické huby, baktérie a archeae) zohrávajú významnú úlohu, aj keď nie priamo, ale prostredníctvom produktov svojho metabolizmu. Dôsledkom ich aktivity je postupné uvoľňovanie zložiek tuhých fáz do prostredia, čo má pre tento prirodzený proces, významný environmentálny, ale aj komerčný dosah. Bioextrakcia je prirodzenou súčasťou biogeochemických cyklov prvkov v prostredí. Ich využitie v biohydrometalurgii v procesoch recyklácie kovov je výhodnou environmentálne akceptovateľnou alternatívou pre získavanie prvkov z nebilančných rúd, druhotných surovín a rôznych typov odpadov napr. popolčiekov a elektronických odpadov.

## Literatúra

- Boriová K, Urík M, Matúš P (2015) Biosorption, bioaccumulation, biovolatilization of potentially toxic elements by microorganisms. *Chemicke Listy* 109:109-112.
- Ehrlich HL (1998) Geomicrobiology: Its significance for geology. *Earth-Science Reviews* 45:45-60.
- Gadd GM (2004) Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18:60-70.
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111:3-49.
- Kolenčík M, Urík M, Štubňa J (2014) Heterotrofné lúhovanie a jeho využitie v biohydrometalurgii. *Chemicke Listy* 108:1040-1045.
- Polák F, Urík M, Matúš P (2019) Low molecular weight organic acids in soil environment. *Chemicke Listy* 113:307-314.
- Urík M, Littera P, Mikušová P (2013) Microbial oxidation of sulfides. *Chemicke Listy* 107:292-297.
- Valix M (2016) Biohydrometallurgical processing of metallic components of E-Wastes. In: *Sustainable Solid Waste Management*. pp 365-410.
- Watling HR (2014) Review of biohydrometallurgical metals extraction from polymetallic mineral resources. *Minerals* 5:1-60..