

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### MOŽNOSTI BIOLOGICKÉHO ODSTRAŇOVANIA MEDI Z ODPADNÝCH VÔD

ALENA LUPTÁKOVÁ<sup>a</sup> a JANA KADUKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav geotechniky, Slovenská akadémia vied, Watsonova 45, 043 53 Košice, <sup>b</sup>Ústav metalurgie a materiálov, Hutnícka fakulta, Technická univerzita, Letná 9, 042 00 Košice, Slovenská republika

e-mail: [luptakal@saske.sk](mailto:luptakal@saske.sk), [kadukova@hfnov.tuke.sk](mailto:kadukova@hfnov.tuke.sk)

Došlo dňa 16.XI.2001

Kľúčové slová: sulfát-redukujúce baktérie, biosorpcia, *Chlorella kessleri*, zelené riasy, ťažké kovy

### Úvod

Ochrana kvality vody reprezentuje jednu z kľúčových úloh environmentálnej politiky vyspelých štátov sveta. Kvalita vôd je závislá od prírodných podmienok (hydrometeorologických, hydrogeologických, hydrochemických a pod.). Sekundárne ju ovplyvňujú antropogénne vplyvy (priemyselná činnosť, poľnohospodárske aktivity a osídlenie). Typickými predstaviteľmi rizikových polutantov antropogénneho pôvodu vo vodách sú ťažké kovy. Ich výskyt vo vodách je zvlášť nežiadúci z dôvodu ich toxicity a vysokej mobility v kvapalnom prostredí, v ktorom môžu byť v niektorých prípadoch transformované na ešte toxickejšie zlúčeniny<sup>1</sup>.

Existuje mnoho rôznych technológií na odstraňovanie ťažkých kovov z vôd. V súčasnej dobe však rastie záujem o rozvoj technológií, ktoré by účinne a pokiaľ možno nevratne, s čo najmenším dopadom na životné prostredie znížili koncentráciu daných rizikových faktorov. Vysokú mieru aktuálnosti majú v tomto smere biotechnológie, t.j. biologické procesy, ktoré riadene využívajú vhodné mikroorganizmy alebo ich metabolické produkty na technologické účely. Priemyselný biologický proces čistenia odpadových vôd od kovov možno chápať ako riadené zintenzívnenie environmentálnych procesov bežne prebiehajúcich v prírodných vodách, ku ktorým dochádza na základe bioakumulácie kovov, prostredníctvom metabolickej činnosti mikroorganizmov v aeróbných alebo anaeróbných podmienkach<sup>2</sup>.

Procesy, ktorými mikroorganizmy alebo aj ich produkty reagujú s ťažkými kovmi, sú rozdielne a ich znalosť z hľadiska biochemických a fyzikálnych pochodov, ktorými dochádza k väzbe kovu na živú alebo mŕtvu organickú hmotu, umožňuje špecifikovať a riadiť tieto mikrobiálne procesy tak, aby sa zvýšilo množstvo, rýchlosť a selektivita akumulácie kovov. Z hľadiska spôsobu akumulácie kovov mikroorganizmami rozlišujeme päť hlavných mechanizmov<sup>3</sup>:

- väzba kovu k povrchu bunky (biosorpcia),
- intracelulárna (vnútrobunková) akumulácia,

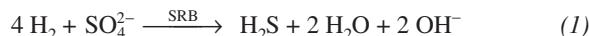
- volatizácia (vyparovanie),
- extracelulárna (mimobunková) akumulácia, ktorú predchádza tvorba komplexov kovov,
- extracelulárne (mimobunkové) zrážanie kovov.

### Teoretická časť

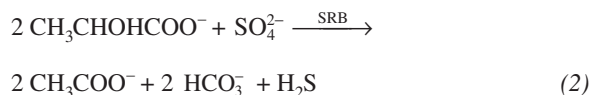
Precipitácia ťažkých kovov aplikáciou sulfát-redukujúcich baktérií

Sulfát-redukujúce baktérie (SRB) sa v prírode vyskytujú v anaeróbných zónach pôdy, vôd (banské, stokové, odpadové), ale aj v črevách človeka a zvierat.

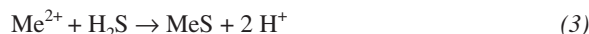
Sulfát-redukujúce baktérie majú nenahraditeľnú funkciu v kolobehu síry v prírode a predstavujú skupinu chemoorganotrófnych, striktno anaeróbných, gramnegatívnych a nespórotvorných (okrem rodu *Desulfotomaculum*) baktérií. Charakteristická je pre nich schopnosť využívať pri anaeróbných respiračných pochodoch ako akceptory elektrónov sulfáty, ktoré redukujú na sulfidy, a vzhľadom na túto skutočnosť sa proces nazýva bakteriálna redukcia sulfátov<sup>4</sup>. Donorom elektrónov môže byť plynný vodík (autotrófna sulfát-redukcia):



alebo organický substrát (heterotrófna sulfát-redukcia):



Sulfát-redukujúce baktérie tak produkujú značné množstvo sulfánu, ktorý vo vodnom prostredí ľahko reaguje s kationmi ťažkých kovov za vzniku málo rozpustných sulfidov:



Prírodné biologické aktivity sulfát-redukujúcich baktérií popísané uvedenými rovnicami (1), (2) a (3) je možné, ako už bolo vyššie uvedené, použiť pre odstránenie ťažkých kovov a aj sulfátov z odpadových vôd. Je to nekonvenčná biologicko-chemická metóda, ktorú z hľadiska mechanizmu akumulácie kovu mikroorganizmami klasifikujeme ako extracelulárne zrážanie kovov.

Biosorpcia ťažkých kovov aplikáciou zelených rias

Druh *Chlorella kessleri* patrí medzi zelené riasy (oddeľenie Chlorophyta)<sup>5</sup>. Bunky sú sférické alebo široko elipsoidné, relatívne malé, 2–12 μm v priemere, s hladkou bunkovou stenou, bez škrobu. Zvyčajne vytvára 4 autospóry, uvoľňujúce sa prasknutím materskej bunkovej steny. Niekedy sú bunky

do vytvorenia autospór usporiadané tetraedricky. Vyskytuje sa v pôdach a vo vodách<sup>6,7</sup>.

Biosorpcia je pasívna schopnosť buniek zachytávať kovy. Je zapríčinená množstvom fyzikálno-chemických mechanizmov závisiacich od existencie rôznych vonkajších faktorov, typu kovu, jeho iónovej formy v roztoku a od typu aktívnych väzbových miest na povrchu bunky. Dôležitým znakom biosorpcie je, že tieto procesy môžu prebiehať aj v čase, keď je bunka neaktívna alebo mŕtva. V širšom slova zmysle ju môžeme chápať ako proces zachytenia a akumulácie kovu z prostredia bunkou.

Biosorpciu bunkou riasy môžeme rozdeliť do dvoch fáz<sup>8,9</sup>:

- prvá je rýchla, nezávislá od metabolizmu,
- druhá je pomalá, od metabolizmu závislá.

Prvá zahŕňa akumuláciu kovu v zložkách bunkovej steny a trvá asi 5–10 minút. Druhá súvisí s transportom kovu do bunky, je oveľa pomalšia a je inhibovaná metabolickými inhibítormi, ako je nízka teplota, nedostatok energetických zdrojov (svetlo) a pod.

Pri biosorpcii sa uplatňuje mnoho rôznych mechanizmov viazania kovov. Za základné sú považované chemisorpcia (iónová výmena, tvorba komplexných zlúčenín, tvorba chelátov), fyzikálna adsorpcia a mikroprecipitácia, ale predpodobne dochádza aj ku oxidačným a redukčným reakciám. Je možné, že na biosorpcionom procese sa podieľajú viaceré mechanizmy súčasne v závislosti na type biosorbentu a zložení roztoku.

## Experimentálna časť

### Materiál a metódy (sulfát-redukujúce baktérie)

Sulfát-redukujúce baktérie boli vyizolované metódou podľa J. Postgata<sup>10</sup>, za použitia selektívneho živného média DSM-63, zo vzorky odpadovej vody používanej na umývanie strojov v hutníckych prevádzkach. Voda bola značne znečistená, s ostrým zápachom po H<sub>2</sub>S a s pH 7,5.

Modelové roztoky s koncentráciou Cu<sup>2+</sup> 5, 10 a 20 mg.l<sup>-1</sup> boli pripravené z CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O (stupeň čistoty p.a.) a ich pH bolo upravené na vhodnú hodnotu s 2 M-HCl alebo 2 M-NaOH.

Boli použité nasledujúce analytické metódy – koncentrácia sulfátov v priebehu sulfát-redukcie bola sledovaná nefelometricky vo forme koloidného BaSO<sub>4</sub>; koncentrácia Cu<sup>2+</sup> bola stanovovaná atómovou absorpčnou spektroskopiou (Spektrometer AA – 30, Varian); meranie pH bolo realizované pH-metrom a kombinovanou sklenenou elektródou s nasýtenou kalomelovou elektródou (SKE); koncentrácia CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>S bola sledovaná analyzátorom plynov OLDHAM MX-21.

Precipitácia Cu<sup>2+</sup> z modelového roztoku so sulfát-redukujúcimi baktériami prebiehala v troch po sebe naväzujúcich etapách:

1. mikrobiálna produkcia H<sub>2</sub>S – bola uskutočnená za anaeróbnych podmienok v diskontinuálnom a hermeticky uzavretom vsádkovom reaktore pri teplote 30 °C, pH 7,5, staticky a za použitia selektívneho živného média podľa DSM-63,
2. precipitácia Cu<sup>2+</sup> mikrobiálne vyprodukovaným H<sub>2</sub>S – nasledovala po naštartovaní bakteriálnej sulfát-redukcie v prvom reaktore. Prebiehala kontinuálnym privádzaním

plynnej fázy z prvého reaktora do druhého reaktora naplneného modelovým roztokom,

3. separácia precipitátov, t.j. sulfidov medi.

### Materiál a metódy (zelené riasy)

Čistú kultúru riasy *Chlorella kessleri* sme získali z Botanického ústavu SAV v Bratislave. Biomasa bola pomnožená v médiu Z (ZEHNDER in STAUB 1961). Počas pomnožovania bola kultúra prevzdušňovaná a osvetľovaná 4 žiarivkami s výkonom 40 W. Počet buniek bol stanovovaný počítaním v Bürkerovej komôrke, prepočet na suchú hmotu bol urobený na základe experimentu. Suchá mŕtva biomasa bola získaná sušením pri teplote 50–55 °C.

Sorpčné experimenty boli robené v umelo pripravenom médiu s objemom 50 ml. Riasy v koncentrácii 3,33 g.l<sup>-1</sup> (približne 10<sup>7</sup> buniek v 1 ml) boli prefiltrované cez membránový filter a pridané do média s kovom. pH bolo udržiavané na hodnote 5, bolo merané digitálnym pH-metrom (testo 252) a upravované pridávaním 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10% NaOH. Teplota sa počas pokusu pohybovala v rozmedzí 23 a 24 °C. Vzorky s objemom 10 ml boli odobraté po 60 a 120 minútach a 24 hodinách z média s nižšou koncentráciou medi a po 30, 60, 90, 120 a 360 minútach a 24 hodinách od začiatku pokusu z média s vyššou koncentráciou medi. Množstvo kovu bolo stanovené atómovou absorpčnou spektroskopiou (Perkin-Elmer 3100). Okrem toho bola stanovená vstupná koncentrácia kovu pred pridaním rias.

Špecifická adsorpcia  $q$  (mg.g<sup>-1</sup>) bola vypočítaná na základe vzťahu:

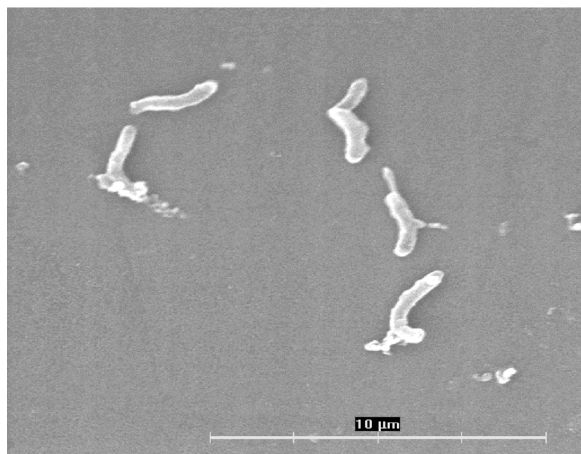
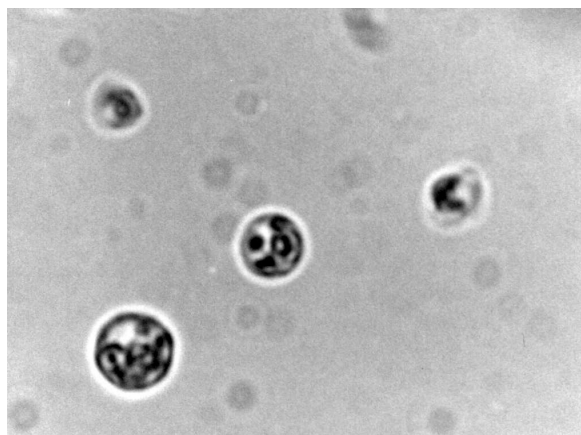
$$q = V(c_i - c_f) / S \quad (4)$$

kde  $V$  (l) je objem média,  $c_i$  (mg.l<sup>-1</sup>) vstupná a  $c_f$  (mg.l<sup>-1</sup>) rovnovážna koncentrácia kovu a  $S$  (g) je hmotnosť pridaného sorbentu.

## Výsledky a diskusia

Izolácia sulfát-redukujúcich baktérií bola pozitívna v skúmanej vzorke odpadovej vody, čo sa vizuálne prejavilo po uplynutí 7–9 dní intenzívnym sčernaním živného média v dôsledku tvorby sekundárnych sulfidov železa podľa reakcie (1), (2) a (3) a charakteristickým zápachom po sulfáne. Na základe mikroskopického pozorovania morfológie, charakteru bunkovej steny (gramnegatívna) a charakteristickej produkcie sulfánu môžeme konštatovať, že bakteriálna kultúra sulfát-redukujúcich baktérií obsahovala prednostne baktérie *Desulfovibrio* sp. (obr. 1).

Vyizolované sulfát-redukujúce baktérie boli ďalej testované v experimentoch eliminácie mednatých kationov z modelových roztokov s obsahom Cu<sup>2+</sup> 5, 10 a 20 mg.l<sup>-1</sup> pri hodnote pH 2,5. Koncentrácia iónov Cu<sup>2+</sup> v roztoku v druhom reaktore od počiatku kontinuálneho privádzania plynnej fázy z 1. etapy procesu, t.j. z prvého reaktora, klesla v dôsledku zrážania sa iónov Cu<sup>2+</sup> sulfánom (3). Plyná fáza v počiatkovej fáze obsahovala okrem H<sub>2</sub>S (15 ppm) aj CO<sub>2</sub> (5000 ppm), CO (6 ppm) a H<sub>2</sub> (24 ppm). Koncentrácie uvedených plynov sa v priebehu procesu znižovali a pri kontinuálnom priebehu dosahovali koncentrácie H<sub>2</sub>S 5 ppm, CO<sub>2</sub> 1000 ppm, CO 1 ppm

Obr. 1. Snímka baktérií *Desulfovibrio sp.* (elektrónový rastrovací mikroskop)<sup>11</sup>Obr. 3. *Chlorella kessleri* (zväčšené 1000×)

Tabuľka I

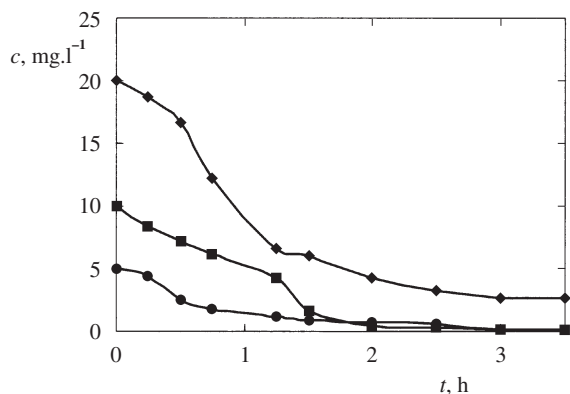
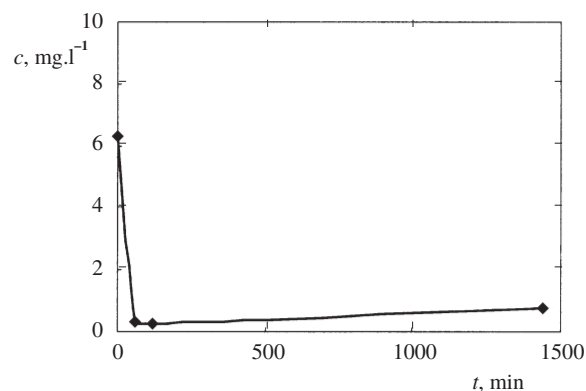
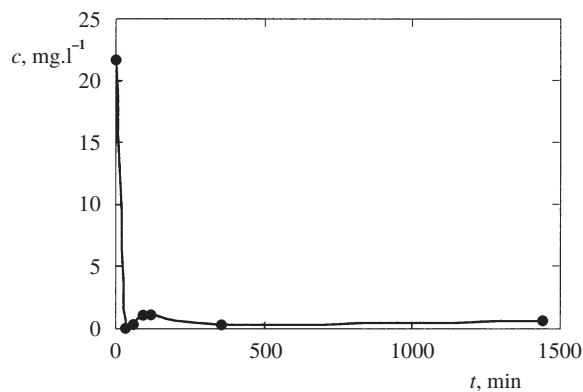
Porovnanie špecifickej adsorpcie  $q$  pre živú a suchú biomasu *Chlorella kessleri*

Forma biomasy	Vstup. konc. $\text{Cu}^{2+}$ [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$q$ [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]
Bunky živé	6,288	1,69
živé	21,61	7,6
suché	15,38	10,87

a  $\text{H}_2\text{S}$  8 ppm. Výsledky precipitácie  $\text{Cu}^{2+}$  mikrobiálne vyprodukovaným  $\text{H}_2\text{S}$  sú znázornené na obrázku 2 a svedčia o efektívnej eliminácii medi (99,9 %) vo forme „hnedo-čiernych“ mednatých sulfidov.

K odstraňovaniu mednatých kationov dochádzalo aj v prípade aplikácie rias *Chlorella kessleri* (obr. 3).

Koncentrácia mednatých iónov v roztoku po pridaní bun-

Obr. 2. Precipitácia  $\text{Cu}^{2+}$  z modelového roztoku pri pH 2,5;  $c$  – koncentrácia  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $t$  – čas, ● 5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , ■ 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , ◆ 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Obr. 4. Zníženie koncentrácie medi po pridaní riasy *Chlorella kessleri* (vstupná koncentrácia  $\text{Cu}^{2+}$  bola 6,3  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )Obr. 5. Zníženie koncentrácie  $\text{Cu}^{2+}$  po pridaní riasy *Chlorella kessleri* (vstupná koncentrácia  $\text{Cu}^{2+}$  bola 21,61  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )

kovej suspenzie poklesla prudko už v prvých minútach. Závislosť koncentrácie medi v roztoku po pridaní riasy od času je uvedená na obrázkoch 4 a 5.

Po počiatkovom prudkom znížení koncentrácie  $\text{Cu}^{2+}$  došlo k jej miernemu zvýšeniu. Tento jav pozorovali aj iní autori<sup>12</sup>. Vyskytuje sa len pri živých bunkách. Pravdepodobne dochá-

Tabuľka II

Porovnanie eliminácie ťažkých kovov aplikáciou sulfát-redukujúcich baktérií (A) a aplikáciou zelených rias *Chlorella kessleri* (B)

Popis procesu	A	B
Princíp procesu	biosorpcia	mikrobiálna redukcia sulfátov
Mechanizmus eliminácie	adsorpcia a iónová výmena (zачytenie iónu kovu bunkovou stenou organizmu)	extracelulárne zrážanie (tvorba H <sub>2</sub> S a následné vyzrážanie kovu z roztoku vo forme sulfidu)
Typ organizmu	zelené riasy (eukaryota)	baktérie (prokaryota)
Názov organizmu	<i>Chlorella kessleri</i>	<i>Desulfovibrio sp.</i>
Prostredie	aeróbne	anaeróbne
Eliminovaný kov	meď	meď
Forma kovu	CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O
Vstupná koncentrácia kovu	5, 20 mg.l <sup>-1</sup>	5, 10, 20 mg.l <sup>-1</sup>
Optimálne pH	5	2,5–2,8
Optimálna teplota	22 °C	30 °C
Doba eliminácie	10–30 min	10–120 min
Priebeh procesu	diskontinuálny aj kontinuálny	diskontinuálny aj kontinuálny
Separácia biomasy od roztoku	membránová filtrácia	membránová filtrácia
Vzťah účinnosti procesu k metabolizmu organizmu	nezávislý od metabolizmu (možnosť použiť mŕtvu biomasu)	závislý od metabolizmu
Konečný produkt	vysoko koncentrovaný roztok kovu	sulfid kovu (málo rozpustná zrazenina)

dza k intoxikácii buniek a následnej čiastočnej strate ich väzbových schopností. Pri použití mŕtvych buniek väzbové schopnosti ostávajú neporušené, pričom špecifická adsorpcia je ešte vyššia ako u živých (tabuľka I). Ich použitie je preto výhodnejšie než použitie živých buniek.

## Záver

V práci sú popísané možnosti aplikácie sulfát-redukujúcich baktérií a zelených rias *Chlorella kessleri* pri odstraňovaní ťažkých kovov z priemyselných odpadových vôd. Dané orientačné výsledky poukazujú, že uvedené biologicko-chemické metódy sú účinné pri eliminácii ťažkých kovov, konkrétne iónov Cu<sup>2+</sup>. Vzájomné porovnanie obidvoch vybraných metód je znázornené v tabuľke II.

*Táto práca vznikla v rámci riešenia grantových úloh č. 2-610 399 a č. 1-7438-20 grantovej agentúry VEGA.*

## LITERATÚRA

1. Ronald M. A.: *Principles of Microbiology, Year Book*. Mosby, New York 1995.
2. Chudoba J., Dohányos M., Wanner J.: *Biologické čistenie odpadných vod*. SNTL, Praha 1991.
3. Borovec Z.: *Rudy 12*, 375 (1989).
4. Hector F. C., Norris H. W., Andrev O.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 1 (1999).
5. Fott B.: *Sinice a riasy*. Academia, Praha 1967.
6. Hindák F.: *Sladkovodné riasy*. SPN, Bratislava 1978.

7. Urban Z., Kalina T.: *Systém a evoluce nižších rostlin*. SPN, Praha 1980.
8. Genter R. B.: *Ecotoxicology of Inorganic Chemical Stress to Algae, Algal Ecology*. Academic Press, New York 1996.
9. Cho D. Y., Lee S. T., Park S. W., Chung A. S.: *J. Environ. Sci. Health, Part A* 29, 389 (1994).
10. Postgate J. R.: *The Sulphate-Reducing Bacteria*, 2. vyd. Cambridge University Press, Cambridge 1984.
11. Luptáková A.: *Dizertačná práca*. ÚGt SAV, Košice 2001.
12. Danihelka P., Chovancová I., Špinková K.: *Proceedings of Sixth International Symposium on Mine Planning and Equipment Selection, Ostrava, September 3–6, 1997*.

**A. Luptáková<sup>a</sup> and J. Kaduková<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Geotechnics, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia*, <sup>b</sup>*Institute of Metallurgy, Faculty of Metallurgy, Technical University, Košice, Slovak Republic*): **Facilities for Biological Removal of Copper from Waste Water**

There are many technologies of heavy metal removal from water, including biological-chemical processes. The aim of this work was to study and compare two methods suitable for wastewater treatment. The first involves three stages: production of H<sub>2</sub>S by sulfate-reducing bacteria, precipitation of metals by the produced H<sub>2</sub>S and filtration of metal sulfides. The other is biosorption of metals, which proceeds in two phases: a rapid, metabolism-independent phase (5–10 min) and a slow, metabolism-dependent phase. The studies confirm that both methods are able to remove copper and other metals from aqueous solutions.