

## Úloha povrchových vlastností *Thiobacillus ferrooxidans* a minerálov v mikrobiálnej adhézii

Jiří Škvarla<sup>1</sup>, Milan Grohol<sup>1</sup> a Daniel Kupka<sup>2</sup>

### *The role of surface properties of Thiobacillus Ferrooxidans and minerals in microbial adhesion*

To explain the selective microbial adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* on pyrite, zeta potential of both the bacterium cells and the mineral was measured using the electrophoretic light scattering (ELS) technique. Simultaneously, relative hydrophobicity of the cells and the mineral was determined by the liquid-liquid partition (BATH) test and the thin-layer wicking method (TLW), respectively. Heteroaggregation of the cells with the pyrite particles has been evaluated qualitatively from the ELS spectra provided by their mixtures at different pH and interpreted in terms of the Lifshitz-van der Waals and acid-base surface thermodynamics model of microbial adhesion

**Key words:** *Thiobacillus ferrooxidans*, pyrite, adhesion, zeta potential, TLW method.

### Úvod

Agregácia mikroorganizmov a ich adhézia na tuhých povrchoch sa uplatňuje v rôznych prírodných a priemyselných biologických procesoch, ako je napr. imobilizácia v bioreaktoroch, minerálne lúhovanie, degradácia ropných produktov, pôdne a vodné procesy, atď. Vo všeobecnosti sa rozlišujú nasledovné štádiá mikrobiálnej adhézii (Busscher et al., 1990; Mozes et al., 1987):

- (1) priblíženie sa buniek k povrchu konvekciou, sedimentáciou, elektroforézou alebo difúziou;
- (2) prichytenie sa buniek na povrch (počiatočná adhézia) za účasti fyzikálno-chemických interakcií;
- (3) mikrobiálna kolonizácia povrchu pomocou extracelulárnych polymérnych exkrementov (prípadne iných fyziologických faktorov), ktoré adhéziu umocňujú.

Napriek dôležitosti tohto fenoménu však o mechanizme mikrobiálnej adhézii vieme pomerne málo. Platí to tiež o adhézii baktérií na minerálne a iné anorganické povrchy v súvislosti s ich flotáčnou separáciou. Na druhej strane, niektoré výsledné efekty pôsobenia baktérií pri flotácii, ako je napr. potlačujúci vplyv *Thiobacillus ferrooxidans* na flotovateľnosť pyritu (Ohmura et al., 1993a; Ohmura and Saiki, 1994; Attia et al., 1993), sú dobre známe.

Fyzikálno-chemické alebo koloidné faktory počiatočnej fázy mikrobiálnej adhézii boli zahrnuté do viacerých teoretických modelov tohoto javu. Najvýraznejšie sa však uplatnili dva prístupy:

- (1) modely vychádzajúce z DLVO teórie, založené na spolupôsobení van der Waalsovej a elektrostatickej interakcie medzi povrchom baktérií a substrátu, príp. tzv. rozšírenej DLVO teórie (XDLVO), uvažujúcej tiež so štruktúrnou (hydrofóbnou a hydrofilnou) interakciou;
- (2) modely odvodené z povrchovej termodynamiky.

Spojením uvedených dvoch prístupov vznikol zovšeobecnený model mikrobiálnej adhézii (van Oss, 1991; Škvarla, 1993). V tomto modeli vystupujú hydrofóbnosť a povrchový náboj oboch interagujúcich povrchov (buniek a substrátu) ako rozhodujúce faktory. V súvislosti so spomenutým potlačujúcim účinkom *T. ferrooxidans* na flotáciu pyritu, bola preto skúmaná hydrofóbnosť a povrchový náboj buniek tejto baktérie aj pyritu. Následne boli modelové predpoklady porovnané s experimentálnymi výsledkami bakteriálnej adhézii pri rôznych hodnotách pH.

### Teoretická časť

V rozšírenom DLVO (XDLVO) modeli mikrobiálnej adhézii sa van der Waalsova (vdW) voľná energia interakcie medzi povrchom sférickej bakteriálnej bunky (b) a plochým povrchom substrátu (s) v kvapaline (l),  $V^{vdW}$ , vyjadruje ako funkcia vzdialenosti týchto povrchov  $h$  nasledovne:

$$V^{vdW}(h) = -A_{pls}a/6h = 2\pi a\Delta G_{adh}^{vdW}h_c^2/h. \quad (1)$$

Vo vzťahu (1) je  $a$  polomer baktérie a  $h_c$  je kontaktná vzdialenosť medzi oboma povrchmi (okolo 0,2 nm). Pre daný trojzložkový (heterogénny) systém baktéria (b) – kvapalina (l) – substrát (s) (konfigurácia sféra-plocha)

<sup>1</sup> doc. Ing. Jiří Škvarla, CSc. a Ing. Milan Grohol, Katedra mineralurgie a environmentálnych technológií, Technická univerzita, Park Komenského 19, 043 84 Košice

<sup>2</sup> MVDr. Daniel Kupka., Ústav geotechniky, SAV, Watsonova 45, 043 53 Košice  
(Recenzované, revidovaná verzia dodaná 20.5.2001)

je celková Hamakerova konštanta  $A_{bls}$  určená Hamakerovou konštantou baktérie ( $A_b$ ), kvapaliny ( $A_l$ ) a substrátu ( $A_s$ ) vzťahom:

$$A_{bls} = (\sqrt{A_b} - \sqrt{A_l})(\sqrt{A_s} - \sqrt{A_l}). \quad (2)$$

Zo vzťahu (2) je zrejme, že ak  $A_b < A_l < A_s$  alebo  $A_b > A_l > A_s$ ,  $A_{bls}$  bude negatívna a  $V^{vdW}(h)$  následne pozitívna (repulzívna).  $\Delta G_{adh}^{vdW}$  vo výraze (1) je vdW voľná energia adhézie (konfigurácia plocha-plocha), ktorú možno určiť pomocou rôznych povrchovo-termodynamických koncepcií. Podľa kombinovanej Lifšic - van der Waalsovej a acido-bázickej (LW-AB) teórie (van Oss et al., 1988), možno  $\Delta G_{adh}^{vdW}$  (v tomto prípade označenú ako  $\Delta G_{adh}^{LW}$ ) vyjadriť z LW parametrov povrchovej energie baktérie, kvapaliny a substrátu ( $\gamma_b^{LW}$ ,  $\gamma_l^{LW}$  a  $\gamma_s^{LW}$ ):

$$\Delta G_{adh}^{vdW} \equiv \Delta G_{adh}^{LW} = 2(\sqrt{\gamma_b^{LW}} - \sqrt{\gamma_l^{LW}})(\sqrt{\gamma_l^{LW}} - \sqrt{\gamma_s^{LW}}). \quad (3)$$

Z porovnania vzťahov (2) a (3) je zrejme, že celková Hamakerova konštanta je teoreticky priamo úmerná LW voľnej energii adhézie:

$$A_{bls} \cong 1.5 \times 10^{-18} \Delta G_{adh}^{LW} \quad (4)$$

Vychádzajúc z kritérií  $\gamma_b < \gamma_l < \gamma_s$  alebo  $\gamma_b > \gamma_l > \gamma_s$  (analogicky ako pri Hamakerových konštantách), bolo zistené, že  $V^{vdW}(h)$  interakcia je pre systém b-l-s spravidla príťažlivá (atrakčná), resp.  $V^{vdW}(h) < 0$  (Škvarla, 1993).

Elektrostatická El voľná energia interakcie adhézneho b-l-s heterosystému je daná tzv. HFF vzťahom (Hogg et al., 1966):

$$V^{El}(h) = \pi \varepsilon a (\varphi_b^2 + \varphi_s^2) \{ \varphi \ln(A/B) + \ln C \}, \quad (5)$$

kde

$\varphi = 2\varphi_b^2\varphi_s^2/(\varphi_b^2 + \varphi_s^2)$ ,  $A = 1 + e^{-\kappa h}$ ,  $B = 1 - e^{-\kappa h}$ ,  $C = 1 - e^{-2\kappa h}$ ,  $\varepsilon$  je permitivita kvapaliny,  $\varphi_b$  a  $\varphi_s$  sú elektrostatické alebo Sternove potenciály (obvyčajne vyjadrené  $\zeta$ -potenciálmi) na rozhraniach baktéria/kvapalina a substrát/kvapalina, odrážajúce ich povrchový elektrostatický náboj, a  $\kappa$  je prevrátená hodnota tzv. hrúbky difúznej vrstvy (recipročná Debyeho dĺžka). V prípade, že obidva povrchy - rozhrania (bunky a substrátu) nesú rovnaký náboj, t.j.  $\varphi_b \cong \varphi_s$ , je  $V^{El}(h)$  repulzívna a funkcia celkovej (DLVO) voľnej energie interakcie  $\{V^{vdW}(h) + V^{El}(h)\}$  prechádza cez maximum, ktoré predstavuje energetickú bariéru, brániacu adhézii baktérie v tzv. primárnom minime, kde by došlo k priamemu kontaktu medzi povrchom baktérie a substrátu. V takomto prípade je však možná adhézia vo vzdialenejšom, tzv. sekundárnom minime. Na druhej strane, ak má baktéria a substrát opačný náboj,  $V^{El}(h)$  je atrakčná pri každej vzdialenosti povrchov a energetická bariéra nevzniká. Komplikovanejšia situácia nastane v prípade, ak  $\varphi_b$  a  $\varphi_s$  majú rovnaké znamienko, ale rôznu hodnotu.

Voľná energia štruktúrálnej S interakcie medzi sférickou baktériou a plochým substrátom sa dá vyjadriť empirickou exponenciálnou funkciou v tvare (Škvarla, 1993):

$$V^S(h) = 2\pi a \lambda \Delta G_{adh}^{AB} \exp^{(hc - h)/\lambda}, \quad (6)$$

kde  $\Delta G_{adh}^{AB}$  je acido-bázická AB voľná energia adhézie a  $\lambda$  ( $\approx 1$  nm) je parameter vyjadrujúci pokles interakcie s rastom  $h$ . Hodnotu  $\Delta G_{adh}^{AB}$  je možné vypočítať zo vzťahu (Van Oss et al., 1988).

$$\Delta G_{adh}^{AB} = 2[\sqrt{\gamma_l^+}(\sqrt{\gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_l^-}) + \sqrt{\gamma_l^-}(\sqrt{\gamma_b^+} + \sqrt{\gamma_s^+} - \sqrt{\gamma_l^+}) - \sqrt{\gamma_b^+}\gamma_s^- - \sqrt{\gamma_b^-}\gamma_s^+], \quad (7)$$

kde parametre  $\gamma$  s indexom + označujú elektrón-akceptorové (hydrogén-donorové) povrchovo-energetické parametre a parametre  $\gamma$  s indexom - označujú elektrón-donorové (hydrogén-akceptorové) povrchovo-energetické parametre povrchov baktérie, kvapaliny a substrátu. Pôvod interakčnej zložky  $V^S(h)$  sa spája s perturbáciou štruktúr polárnych kvapalín (hlavne vody) v blízkosti b/l a s/l rozhraní. Táto zložka je atrakčná medzi hydrofóbnymi povrchmi, teda  $\Delta G_{adh}^{AB} < 0$ , ale repulzná medzi hydrofilnými povrchmi,  $\Delta G_{adh}^{AB} > 0$ . Pre povrchy s výrazne rôznou hydrofóbnosťou nebude mať  $\Delta G_{adh}^{AB}$  veľký význam. Napriek tomu môže  $V^S(h)$  značne ovplyvniť celkovú DLVO voľnú energiu interakcie.

O výraznom vplyve zmáčateľnosti povrchu substrátu na mikrobiálnu adhéziu existuje viacero dôkazov. Pokiaľ ide o mikroorganizmy, možno ich v podstate, podobne ako povrchy samotné, rozdeliť do troch skupín:

- hydrofóbné (so styčným uhlom vodnej kvapky  $\theta_w > 90^\circ$ ),
- stredne hydrofóbné ( $\theta_w = 40-90^\circ$ ),
- hydrofilné ( $\theta_w < 40^\circ$ ).

Vychádzajúc z navrhnutého modelu sú pre adhéziu v rámci uvedených skupín charakteristické tieto špecifiká (Škvarla, 1993):

- hydrofóbné baktérie sa na hydrofóbné povrchy adherujú nevratne, a to v tzv. primárnom alebo kontaktnom minime, dokonca aj pri silnej elektrostatickej repulzii;
- stredne hydrofóbné baktérie sa adherujú vratne v tzv. sekundárnom minime (v prípade hydrofóbných povrchov podobne ako u hydrofóbných baktérií);
- hydrofilné baktérie sa adherujú výlučne v sekundárnom minime; táto adhézia je pomerne slabá, vratná a vo väčšine prípadov vyžaduje elektrostatickú atrakciu.

### Materiál a metodika

***Thiobacillus ferrooxidans***. Použitý kmeň *T. ferrooxidans* [CCM 3973] bol pôvodne izolovaný z banskej vody zo Smolníka. V experimentoch boli použité bunky aeróbne kultivované v 9K médiu s  $\text{FeSO}_4$  ako hlavným zdrojom energie pri pH 1,6 a teplote  $30^\circ\text{C}$ . Použité boli bunky z počiatočnej stacionárnej rastovej fázy, oddelené membránovou filtráciou a viacnásobne premyté 0,1 M HCl a destilovanou vodou, s cieľom odstrániť Fe-zrazeniny. Bunky boli nakoniec vytrepané v destilovanej vode. Elektroforetická pohyblivosť buniek  $\mu_e$ , alebo  $\zeta$ -potenciál (mera povrchového náboja) boli merané pri rôznych hodnotách pH (pH suspenzie bolo upravované pomocou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) použitím techniky elektroforetického rozptylu svetla ELS (electroforetic light scattering) na prístroji Zeta Plus fy Brookhaven Instruments.

Hydrofóbnosť buniek sa stanovovala kvalitatívne ako podiel buniek extrahovaných do uhl'ovodíkovej fázy (BATH test: bacterial adhesion test of hydrophobicity). V tomto teste bol do plastickej ELS kvvety obsahujúcej 1,4 ml vodnej bakteriálnej suspenzie (okamžite po meraní náboja buniek prístrojom Zeta Plus) pridávaný hexán (0,14 ml). Suspenzia bola miešaná 1 min. Po separácii fáz (10 min) bola meraná absorbancia spodnej vodnej fázy  $A$  pri vlnovej dĺžke 546 nm v spektrofotometri Spectronic 401 fy Milton Roy. Relatívna hydrofóbnosť buniek  $H$  bola vypočítaná z percentuálneho poklesu absorbancie v tomto čase  $A_{10}$  voči počiatočnej absorbancii suspenzie  $A_0$ :  $H = 100(1 - A_{10}/A_0)$ . Relatívna hydrofóbnosť buniek bola posudzovaná aj meraním  $\mu_e$  použitím prístroja Zeta Plus v prítomnosti iónových surfaktantov (James, 1991).

**Pyrit.** Vzorka pyritu bola pripravená suchým mletím v achátovom mlyne Pulverisette 4 počas 30 min. Distribúcia častíc vo vodnej suspenzii (12g/100 ml) bola zistená sedimentačne (Microphotosizer SKC 2000). Približne 70% (hm) častíc spadalo do zrnitostnej triedy 10 až 30  $\mu\text{m}$ . Následne bola meraná elektroforetická pohyblivosť v závislosti od pH na prístroji ZetaPlus. Prírodné pH suspenzie pyritu malo hodnotu 3. Na jeho zvyšovanie sa používal roztok KOH.

Hydrofóbnosť pyritu bola posudzovaná styčným uhlom vody použitím metódy TLW (thin-layer wicking). Táto metóda je založená na meraní rýchlosti kapilárneho vztlínania vybraných testovacích kvapalín (hexadekán, voda a iné) v tenkej homogénnej vrstve pyritového prášku usadeného z vodnej suspenzie na čisté mikroskopické sklíčko. Rýchlosť kapilárneho vztlínania (v závislosti od sily kapilárneho vztlínania a viskozity, zanedbávajúc gravitačnú silu) udáva Washburnova rovnica (Van Oss et al., 1992; Subrahmanyam et al., 1996):  $h^2/t = R\cos\theta\gamma_L/2\eta$ , kde  $R$  je efektívny polomer pórov (faktor zohľadňujúci komplikovanosť systému kanálikov medzi časticami pyritu vo vrstve),  $\eta$  je viskozita kvapaliny,  $\gamma_L$  je povrchové napätie kvapaliny a  $\theta$  je hľadaný styčný uhol kvapaliny na povrchu pyritu. Sklíčka pokryté pyritom boli sušené v sušiarňi pri  $60^\circ\text{C}$  počas 180 min. Hodnota  $R$  (rovnaká pre celú sadu vzoriek na sklíčkach) bola zistená pomocou merania rýchlosti vztlínania kvapaliny s veľmi nízkym povrchovým napätím, dokonale zmáčajúcej pyrit (hexadekán), pre ktorú je možné uvažovať vo Washburnovej rovnici  $\cos\theta = 1$ . Sklíčka sa ponárali do kvapaliny užšou stranou vo vertikálnej polohe.

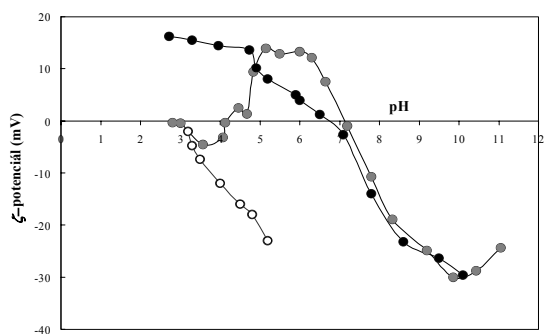
**Mikrobiálna adhézia.** 50 ml vysokokoncentrovanej suspenzie buniek *T. ferrooxidans* ( $1,8 \cdot 10^9$  buniek/ml) bolo pridávaných do 100 ml pyritovej suspenzie. Hodnota pH oboch suspenzií bola predtým upravená na 3. Pri tomto pH sa adhézia buniek na pyrit hodnotila meraním ELS spektier v prístroji Zeta Plus. Dodatočne boli urobené merania ELS spektier bakteriálno-pyritovej suspenzie pri vyšších hodnotách pH.

### Výsledky a diskusia

ELS spektrá rôznych kmeňov baktérií *T. ferrooxidans* pri rôznom pH, iónovej sile a koncentrácii buniek boli merané a publikované už skôr (Škvarla, 1995; Škvarla and Kupka, 1996; Rohal', 1996). Zistilo sa, že bunky poskytujú ideálne monomodálne ELS spektrá. Charakteristická hodnota izoelektrického bodu (pH pri ktorom  $\mu_e = \zeta = 0$ ) väčšiny z nich bola zistená pri  $\text{pH} \approx 3$  (pozri obr.1), podobne ako uvádza Solari (1992). Bolo tiež pozorované, že merané hodnoty  $\mu_e$ , resp.  $\zeta$  (polohy vrcholov v ELS spektrách) sú vysoko reprodukovateľné (Hanudel'ová, 1998).

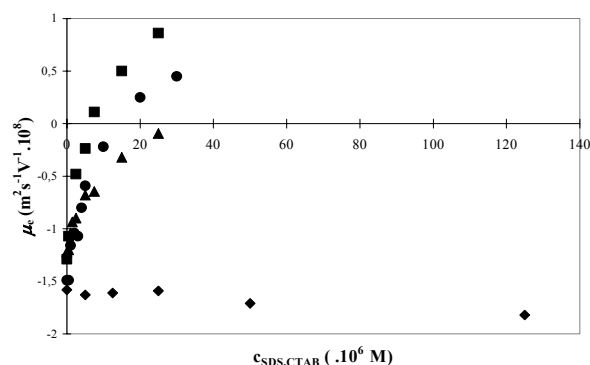
Pri BATH teste sa hodnota absorbancie  $A_{10}$  po separácii fáz takmer nelíšila od počiatočnej hodnoty  $A_0$ , takže (relatívna) hydrofóbnosť buniek *T. ferrooxidans* je zanedbateľná ( $H \approx 0$ ) (Kállay, 1997; Bercíková, 1997). Hydrofóbnosť bakteriálnej steny sa tiež hodnotila podľa vplyvu kationického surfaktantu (hexadecyl-

trimetylamonium bromidu CTAB) a aniónického surfaktantu (dodecylsulfát sodný SDS) na hodnotu  $\mu_e$  buniek (obr.2). Zvyšovaním koncentrácie CTAB sa pôvodne negatívne nabité bunky (bez ohľadu na ich koncentráciu, vyjadrenú absorbancom  $A_0$ ) stávajú kladne nabité, a to pri koncentrácii  $c_{CTAB}$  cca. 7  $\mu\text{M}$  ( $A_0 = 0,018$ ), 13  $\mu\text{M}$  ( $A_0 = 0,021$ ) a  $>30 \mu\text{M}$  ( $A_0 = 0,043$ ). To znamená, že organické CTAB katióny sa adsorbujú na povrch buniek svojimi polárnymi koncami, pričom ich uhlíkové reťazce smerujú do roztoku. Výsledkom tejto adsorpcie je hydrofobizovanie pôvodne hydrofilného povrchu baktérií. Na potvrdenie hydrofilnosti baktérií bol použitý anionaktívny surfaktant (SDS). Ako je možné vidieť na obr.2 ( $A_0 = 0,025$ ), zmena elektroforetickej pohyblivosti je s rastom  $c_{SDS}$  pomerne malá, a to aj pri  $c_{SDS} = 30 \mu\text{M}$ , alebo dokonca 125  $\mu\text{M}$ . Môžeme teda povedať, že vonkajšia stena buniek *T. ferrooxidans* je prirodzene hydrofilná – tvorená v prevažnej miere lipopolysacharidmi. Potvrďuje to aj práca Ohmuru a kol. (1993b), kde bol meraný styčný uhol vody (pri pH 2) na suchom filme *T. ferrooxidans*, v rozpätí 22,7 až 24,0° a BATH testom bol zistený 75%-ný podiel buniek vo vodnej fáze.



Obr.1. Závislosť  $\zeta$ -potenciálu na pH pre bunky *T. ferrooxidans* (prázdne krúžky), pyritové častice (plné krúžky) a ich spoločnú zmes (sivé krúžky) v prítomnosti  $10^{-3}$  M KCl.

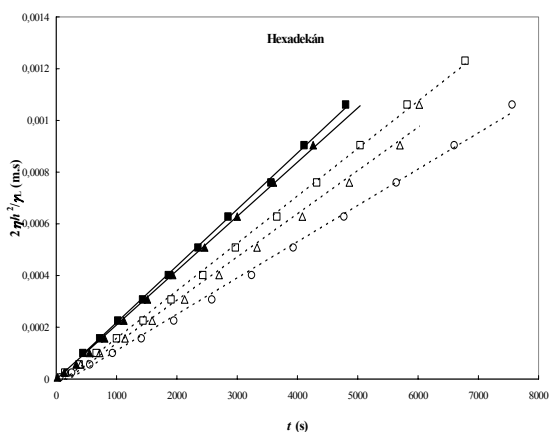
Fig.1 Dependence of the  $\zeta$ -potential on pH for *T. ferrooxidans* cells (empty circles), pyrite particles (full circles) and their mixture (gray circles) in presence of  $10^{-3}$  M KCl.



Obr.2 Závislosť elektroforetickej mobility buniek *T. ferrooxidans* na koncentrácii surfaktantu; CTAB:  $A_0 = 0,018$  (štvrce),  $A_0 = 0,021$  (krúžky),  $A_0 = 0,043$  (trojuholníky). SDS:  $A_0 = 0,025$  (kosoštvorce).

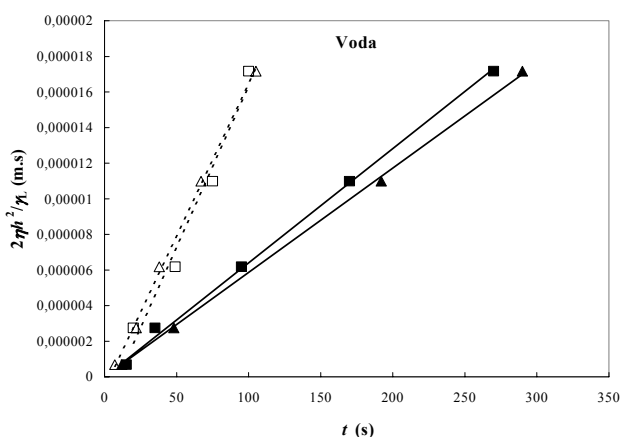
Fig.2 Dependence of the electrophoretic mobility of *T. ferrooxidans* cells on the surfactant concentration; CTAB:  $A_0 = 0,018$  (squares),  $A_0 = 0,021$  (circles),  $A_0 = 0,043$  (triangles). SDS:  $A_0 = 0,025$  (rhombs).

Závislosť  $\zeta$ -potenciálu pyritu na pH ukazuje obr.1. Izoelektrický bod oxidovaného pyritu sa nachádza približne pri pH 6,7. Táto hodnota spadá do intervalu hodnôt pH 6,2 až 6,9, publikovaných už skôr (Gaudin and Sun, 1946; Fuerstenau et al., 1968; Fornasiero et al., 1992). V neoxidovanom stave je však  $\text{pH}_{IEP}$  pyritu okolo 1,2 (Fornasiero et al., 1992). S cieľom posúdiť hydrofóbnosť pyritu, merala sa opakovane časová závislosť hod-



Obr.3. Rýchlosť kapilárneho vzliania hexadekánu cez vrstvu častíc pyritu bez buniek *T. ferrooxidans* (plné symboly, dve nezávislé merania) a v ich prítomnosti (prázdne symboly, tri nezávislé merania).

Fig.3. Rate of capillary wicking of hexadecane through a layer of pyrite particles in the absence (full symbols, two independent measurements) and in the presence of *T. ferrooxidans* (empty symbols, three independent measurements).



Obr.4. Rýchlosť kapilárneho vzliania vody cez vrstvu častíc pyritu bez buniek *T. ferrooxidans* (plné symboly, dve nezávislé merania) a v ich prítomnosti (prázdne symboly, dve nezávislé merania).

Fig.4. Rate of capillary wicking of water through a layer of pyrite particles in the absence (full symbols, two independent measurements) and in the presence of *T. ferrooxidans* (empty symbols, two independent measurements).

noty  $2\eta h^2/\gamma_L$  (kapilárneho vzlínania) pre rôzne kvapaliny, penetrujúce kompaktnú vrstvu pyritových častíc, nanesených na podložné sklíčka. Pre hexadekán sa sklon dvoch experimentálnych (podľa predpokladu lineárnych) závislostí trochu líši (obr.3, plné body), podobne ako pre vodu (obr.4, plné body). Preto vo výpočte efektívneho polomeru pórov vo Washburnovej rovnici ( $R = 2,12 \cdot 10^{-7}$  m) bola použitá priemerná hodnota sklonu závislosti hexadekánu. Z tejto priemernej hodnoty  $R$  bol potom vypočítaný styčný uhol pyritových zrn s vodou, a to  $\theta_w = 73,3 \pm 1^\circ$ . Táto hodnota je porovnateľná s hodnotou publikovanou Ohmurou a kol. (1993b), ktorí určovali styčný uhol ( $68,9^\circ$ ) medzi pyritom pokrytými platničkami a kvapkami roztoku kyseliny sírovej (pH =2).

Adhézia buniek *T. ferrooxidans* na povrch pyritu bola zisťovaná meraním rýchlosti penetrácie hexadekánu a vody cez tenkú vrstvu častíc pyritu, ktoré boli vopred v kontakte s bunkami. V týchto TLW meraniach sa preukázalo mierne zúženie priemerného efektívneho polomeru pórov ( $R = 1,76 \cdot 10^{-7}$  m) oproti samotnému pyritu. Následne bol vypočítaný styčný uhol pre vodu:  $\theta_w = 38,9^\circ \pm 0,9^\circ$ , z ktorého možno usudzovať, že povrch pyritu sa do značnej miery hydrofilizoval (pravdepodobne priamou adhéziou hydrofilných baktérií *T. ferrooxidans*).

Na obr.1 je tiež závislosť  $\zeta$ -potenciálu na pH pre pyrit v prítomnosti buniek. Vidíme, že hodnota  $\zeta$ -potenciálu bakteriálno-pyritovej suspenzie je pri nízkej hodnote pH 3 totožná s hodnotou  $\zeta$ -potenciálu samotných buniek. Avšak, so zvyšujúcim sa pH sa  $\zeta$ -potenciál zmesi už značne líši od  $\zeta$ -potenciálu buniek, resp. prechádza do kladných hodnôt. Pri pH nad 5 sa však zhoduje so  $\zeta$ -potenciálom samotného pyritu (presnejšie povedané, na obr.1 je  $\zeta$ -potenciál bakteriálno-pyritovej suspenzie v intervale pH 5 – 7 vyšší ako u pyritu, pravdepodobne v dôsledku dlhšieho pobytu suspenzie vo vode, a teda silnejšej oxidácie pyritu (pričom izoelektrický bod sa posunul na pH 7,2). Každopádne, spoľahlivé vysvetlenie spomenutých trendov je možné len po dôkladnej analýze ELS spektier získaných pre spomínané zmesi. (Detailnejšie hodnotenie stability heteroagregácie pomocou multimodálnych ELS spektier sa nachádza v práci (Škvarla, 1996a,b). Vyhodnotenie však komplikuje prítomnosť viacerých vrcholov v spektrách, t.j. okrem hlavného (primárneho) vrcholu s relatívnou energiou rovnou jednej sa tu spravidla vyskytujú vedľajšie vrcholy, ktoré poukazujú na prítomnosť viacerých fáz (na obr.1 sú vynesené len hodnoty hlavných  $\zeta$ -potenciálov).

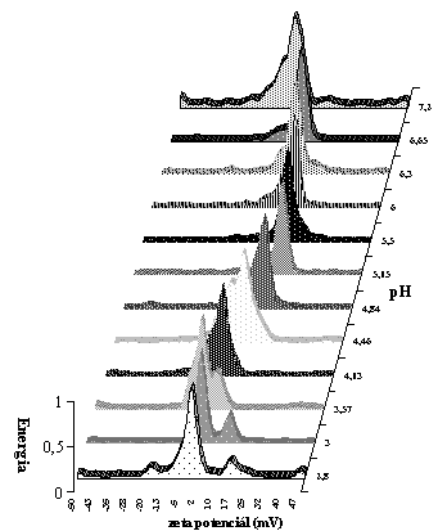
Na obr.5 sú preto zobrazené úplné ELS spektrá pre zmesi pyrit-bunky pre pH od 2,8 do 7,3. U týchto spektier bolo zistené, že v intervale pH od 2,8 do 3,6 existujú dva vrcholy, primárny – zrejme prislúchajúci bunkám a sekundárny – pre pyritové častice. Na základe toho možno usudzovať, že v danom intervale pH nedochádza k adhézii. Táto interpretácia je však v protirečení s výsledkami TLW experimentov, ktoré potvrdili značný stupeň adhézie buniek pri pH 3. Pri pH 4,1 už sekundárny vrchol splyva s primárnym vrcholom a pri pH 4,5 sa objavuje popri spomenutých dvoch vrcholoch aj tretí, reprezentujúci pravdepodobne bakteriálno-pyritové heteroagregáty. V rozmedzí pH 4,8 až 5,5 je pozorovateľný len jeden vrchol. Tento vrchol vznikol pravdepodobne detekovaním buniek pokrytých najjemnejším pyritom, čo môže poukazovať na maximálnu adhéziu. Pri pH nad 5,5 vznikajú opäť dva vrcholy, ktoré poukazujú na desorpciu pyritu z baktérií.

Tab.1. Hodnoty sekundárneho minima interakčnej energie pri rôznom pH, vypočítané podľa modelu.

Tab.1. Magnitudes of the secondary minimum of the total interaction energy at various pH, as calculated according to the model.

pH	3,0	3,6	4,1	4,5	4,8	5,2	5,5	6,0	6,3	6,6	7,2
Sekundárne minimum (kT)	-3,0	-11,5	-22,2	-41,1	-42,5	-34,4	-24,0	-18,1	-14,8	-6,9	-

Parametre a podmienky modelu :  $a_b = 5 \cdot 10^{-7}$  m (polomer „sférickej“ bunky),  $a_s = 1 \cdot 10^{-7}$  m (polomer nesedimentujúcich pyritových častíc),  $\Delta G_{adh}^{LW} = -2 \cdot 10^{-3}$  J/m<sup>2</sup>,  $\Delta G_{adh}^{AB} = 10^{-2}$  J/m<sup>2</sup>,  $\kappa = 10$  nm ( $c = 10^{-3}$  M KCl),  $\lambda = 1$  nm, hodnoty  $\phi_b$  a  $\phi_s$  boli nahradené  $\zeta$ -potenciálmi.



Obr.5. ELS spektrá bakteriálno-pyritovej suspenzie pri rôznom pH.

Fig.5. ELS spectra of the bacterium-pyrite suspension at various pH.

Keďže v bimodálnom spektre pri pH 3 dominuje vrchol typický pre bunky, domnievame sa, že v suspenzii sa pri opakovaných meraniach (trvajúcich niekoľko desiatok minút) nachádzajú len veľmi pomaly sedimentujúce, a teda veľmi jemné pyritové častice, ktoré môžu byť dokonca aj menšie ako samotné bunky (vysoká merná hmotnosť pyritu). To je dôvod, prečo bol použitý interakčný model adhézie pre konfiguráciu sféra-sféra, a nie sféra-plocha. Bolo zistené, že pre mikrobiálnu adhéziu je hraničnou hodnotou  $\Delta G_{adh}^{LW} = 2 \cdot 10^{-3}$  J/m<sup>2</sup> ( $A_{bls} = 4 \cdot 10^{-21}$  J), a teda slabo atraktívna vdW interakcia nemôže výrazne ovplyvniť celkovú interakčnú energiu (XDLVO). Pre študovaný heterosystém (hydrofilná batéria vs. mierne hydrofóbny mineralný povrch), sa hodnota  $\Delta G_{adh}^{AB}$  pohybuje okolo  $10^{-2}$  J/m<sup>2</sup> a preto slabá repulzívna S interakčná zložka je zodpovedná za vy-

tvorenie sekundárneho minima (tab.1) na profile celkovej interakčnej energie pre suspenzie pod pH 7 (Škvarla, 1991, 1993).

Z tab.1 vyplýva, že adhézia pri  $\text{pH} \leq 3$  nie je pre jemné častice pyritu teoreticky možná, lebo sekundárne minimum je príliš plytké (menej ako  $-3 \text{ kT}$ ). Adhézia je možná nad  $\text{pH} 3,5$ , v zhode s experimentami. Maximálna miera adhézie by mala byť pri  $\text{pH} 5,1$ , kde je sekundárne minimum najhlbšie ( $-42,5 \text{ kT}$ ). Pri  $\text{pH}$  nad  $7,2$  sekundárne minimum zaniká a nad  $7,8$  prevláda silná repulzia. Fakt, že TLW metóda poukazuje na adhéziu už pri  $\text{pH} 3$  je možné vysvetliť prítomnosťou väčších častíc pyritu vo vztlínacej vrstve. Pre ne je sekundárne minimum hlbšie a adhézia je možná aj pri tomto  $\text{pH}$ .

### Záver

Pomocou multimodálnych ELS spektier bola zachytená heteroagregácia veľmi jemných častíc pyritu a buniek *T. ferrooxidans* (v prítomnosti  $1 \text{ mM}$  KCl elektrolytu) v oblasti  $\text{pH}$  nad  $3,5$ . Maximálna, zjavne reverzibilná, heteroagregácia bola zistená pri  $\text{pH}$  okolo  $5$ . Nad  $\text{pH} 6$  bola pozorovaná redispersia. Pomocou metódy TLW sa dokázala adhézia buniek na hrubšie častice pyritu aj pri  $\text{pH} 3$ . Tieto závery sú v zhode s rozšírenou DLVO teóriou, do ktorej boli integrované elektrostatické potenciály buniek a pyritu, ako aj experimentálne zistená hydrofóbnosť.

### Literatúra

- ATTIA, Y.A., ELZEKY, M., ISMAIL, M.: *Int. J. Miner. Process.*, 1993, 37, 61.
- BERCÍKOVÁ, M.: A study of hydrophobicity of the cell wall of *Thiobacillus ferrooxidans* by the ELS method and its influencing, Thesis. *Technical University, Košice*, 1996 (in Slovak).
- BLAKE II, R.C., SHUTE, E.A., HOWARD, G.T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60, 3349.
- BUSSCHER, H.J., SJOLLEMA, J., VAN DER MEI, H.C.: In: *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, R.J. Doyle and M. Rosenberg, eds., *American Society of Microbiology*, Washington, 1990, p.335..
- FORNASIERO, D., EIJT, V., RALSTON, J.: *Colloids Surfaces*, 1992, 62, 63.
- FUERSTENAU, M.C., KUHN, M.C., ELGILLANI, D.: *Trans. AIME*, 1968, 241, 148.
- GAUDIN, A.M., SUN, S.C.: *Trans. AIME*, 1946, 169, 347.
- HANUDELOVÁ, Z.: The influence of the growth phase on the electrokinetic potential of the cell wall of *Thiobacillus ferrooxidans*, Thesis, *Technical University, Košice*, 1998 (in Slovak).
- HOGG, R., HEALY, T.W., FUERSTENAU, D.W.: *Trans. Faraday Soc.*, 1966, 62, 1638.
- JAMES, A.M.: Charge properties of microbial cell surface. In: *Microbial Cell Surface Analysis*, N. Mozes, P.S. Handley, H.J. Busscher, and P.G. Rouxhett, eds., *VCH publ.*, 1991, 221.
- KÁLLAY, D.: A study of hydrophobicity of the cell wall of *Thiobacillus ferrooxidans* by the MATH method, Thesis. *Technical University, Košice*, 1996 (in Slovak).
- MOZES, N., MARCHAL, F., HERMESSE, M.P., VAN HAECHE, J.L., REULIAUX, L., LEONARD, A.J., ROUXHET, P.G.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, 30, 439.
- OHMURA, N., KITAMURA, K., SAIKI, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1993a, 41, 671.
- OHMURA, N., KITAMURA, K., SAIKI, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993b, 59, 4044.
- OHMURA, N., SAIKI, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44, 125.
- ROHAL, P.: A study of the physico-chemical properties of cell walls of the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, Thesis, *Technical University, Košice*, 1995 (in Slovak).
- SISOL, M.: The evaluation of adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* on pyrite by the ELS method, Thesis. *Technical University, Košice*, 1998 (in Slovak).
- SOLARI, J.A., HUERTA, G., ESCOBAR, B., VARGAS, T., BADILLA, J., OHLBAUM, R., RUBIO, J.: *Colloids Surfaces*, 1992, 69, 159.
- SUBRAHMANYAM, T.W., PRESTIDGE, C.A., RALSTON, J.: *Minerals Engineering*, 1996, 9, 727.
- ŠKVARLA, J.: *J. Disp. Sci. Technol.*, 1991, 12, 349.
- ŠKVARLA, J.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1993, 89, 2913.
- ŠKVARLA, J.: *Thiobacillus ferrooxidans* – Study of the surface charge by the method of electrophoretic light scattering. In: *Proceedings of the conference „Mineral Proc. Tech. – Pres. and Fut.“*, Košice 150-157.
- ŠKVARLA, J.: *Colloids Surfaces*, 1996a, 110, 135.
- ŠKVARLA, J.: *Int. J. Miner. Process.*, 1996b, 48, 95.
- ŠKVARLA, J., KUPKA, D.: *Mineralia Slovaca*, 1996, 28, 395.
- VAN OSS, C.J., CHAUDHURY, M.K., GOOD, R.J.: *Chem. Rev.*, 1988, 88, 927.
- VAN OSS, C.J.: *Biofouling*, 1991, 4, 25.
- VAN OSS, C.J., GIESE, R.F., LI, Z., MURPHY, K., NORRIS, J., CHAUDHURY, M.K., GOOD, R.J.: *J. Adhesion Sci. Technol.*, 1992, 6, 413.