

## Využitie bioremediácie pri ochrane životného prostredia

Alena Luptáková<sup>1</sup> a Mária Praščáková

### *Exploitation of bioremediation in the environment protection*

*Soils and waters contaminated with toxic metals pose a major environmental problem that needs an effective and affordable technological solution. Many areas remain contaminated with no remediation in sight because it is too expensive to clean them up with available technologies. Bioremediation may provide an economically viable solution for remediation of some of these sites. The bioremediation is an application of the biological treatment to the cleanup of hazardous chemicals and is an example of the environmental biotechnology.*

*The aim of this paper is to give a theoretical and practical view concerning the possibility of the bioremediation exploitation in the environment protection. This paper includes some results of the bioremediation of the acid mine drainage by sulphate-reducing bacteria.*

**Key words:** bioremediation, microorganisms, acid mine drainage, sulphate-reducing bacteria.

### Úvod

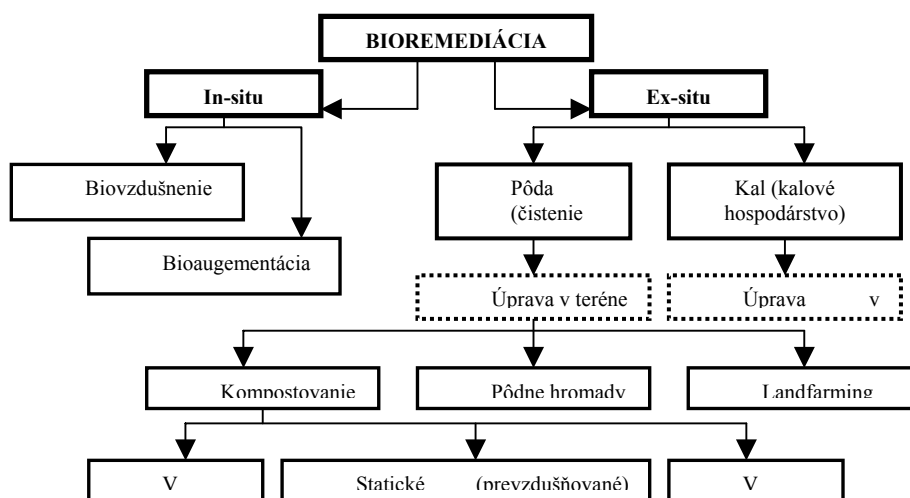
Neustále sa zvyšujúca priemyselná výroba a intenzívne poľnohospodárstvo sú príčinou vysokej koncentrácie rôznych látok v pôdach, vodách a v ovzduší, ktoré vo väčšine prípadov nemajú prírodný charakter. Sú „cudzie“ životnému prostrediu a spôsobujú tak jeho kontamináciu. Výrobné, ekologické a ekonomické požiadavky posunuli do popredia záujem o výskum prírodných procesov, umožňujúcich bez väčších finančných požiadaviek a ďalšej záťaže pre prírodu odstrániť kontaminanty. Ide o remediálne technológie, využívajúce biologické postupy degradácie anorganických a organických látok, tzv. bioremediácie. Podstatou bioremediácie je využitie metabolickej činnosti „živých“ mikroorganizmov pri odstraňovaní kontaminantov zo životného prostredia. Nie je to nový koncept riešenia environmentálnych problémov. Používanie mikroorganizmov pri spracovaní mestského odpadu, najmä vôd, je známe už z obdobia Rímskej ríše (Alexander, 1999). Bioremediácia zaznamenala najväčší rozvoj za posledných 30 rokov. Prispela k tomu aj najväčšia ekologická havária v dejinách, ktorou je havária tankera Exxon Valdez v roku 1989 na Aljaške. Do vody vtedy uniklo 41 miliónov ton ropy. Z environmentálneho hľadiska bolo okrem iných fyzikálno-chemických metód pre odstránenie ropnej škvŕny vhodné použiť aj mikroorganizmy (Ronald, 1995). Zájmová oblasť o používanie „prírodných čističov“ schopných degradovať organické polutanty, bola postupne rozšírená a v súčasnej dobe rastie záujem o aplikáciu bioremediácií pri eliminácii látok aj anorganickej povahy. Laboratórny výskum tak našiel praktické uplatnenie v mnohých technológiách úpravy kontaminovaných pôd a vôd. Z hľadiska realizácie je možné bioremediálne metódy rozdeliť do dvoch základných skupín: in-situ a ex-situ bioremediácie (obr. 1).

Vývoj bioremedičných technológií závisí od charakteru toxického materiálu, kvality a kvantity mikroflóry, špecifických podmienok znečisteného prostredia, ekonomického pozadia a pod.. Bioremediálne techniky môžu byť navzájom vhodne kombinované. Cieľom je vždy vytvoriť optimálne podmienky pre metabolickú činnosť autochtónnych alebo exogénnych mikroorganizmov, ktorých prostredníctvom dochádza k transformácii toxických látok na ich menej toxické formy, ktoré môžu byť ekologicky akceptovateľné formy. Pochopenie ekológie, fyziológie a evolúcie degradujúcich mikroorganizmov je základnou podmienkou pre využívanie biologických postupov pre remediáciu vôd, pôd a sedimentov.

In-situ metódy sú uskutočňované priamo na mieste znečistenia, iniciovaním rastu pôvodnej alebo pridanej vhodnej mikroflóry. V porovnaní s ex-situ metódami sú ekonomicky výhodnejšie, pretože nevyžadujú náklady na vyčistenie kontaminovanej pôdy alebo odčerpanie znečistenej vody. Aj náklady na spracovanie vzniknutých odpadov sú menšie, nakoľko ich objem nie je veľký. Základným krokom in-situ metód je dodanie nutričných látok, kyslíka a optimalizácia fyzikálnych a chemických parametrov (napr. prídanie organickej hmoty, úprava hodnôt pH, zvlhčenie a pod.) na stimuláciu a zvýšenie intenzity degradácie mikrobiálnej populácie. Kyslík môže byť dodaný pumpovaním vzduchu tzv. bioventingom. V niektorých prípadoch je vhodná bioaugmentácia, čo znamená pridávanie (inokulácia) allochtónnych mikroorganizmov (laboratórne selektovaných), alebo autochtónnych mikroorganizmov (pôvodné mikrobiálne konzorcium) pomnožených v laboratórnom reaktore, do znečistenej pôdy s cieľom zrýchliť a zvýšiť efektívnosť bioremediálneho procesu. Vo väčšine prípadov je koncentrácia autochtónnej

<sup>1</sup> Ing. Alena Luptáková, PhD., Ing. Mária Praščáková, Ústav geotechniky SAV, Watsonova 45, 043 53 Košice  
(Recenzovaná a revidovaná verzia dodaná 14. 9. 2005)

mikroflóry na mieste znečistenia dostatočná pre kompletnú biodegradáciu. Okrem toho ak bola pôda dlhodobo znečistená, pôvodná mikroflóra sa dokáže adaptovať na prítomnosť daného kontaminantu a je možné predpokladať výskyt mikrobiálnych druhov s degradačnou schopnosťou. K nevýhodám in-situ metód v porovnaní s ex-situ metódami patria najmä ich pomalý priebeh a náročnosť regulácie.



Obr. 1. Bioremediačné metódy.

Fig. 1. Bioremediation methods.

Ex-situ metódy sú realizované mimo miesta znečistenia. Sú rýchlejšie, lepšie kontrolovateľné a môžu byť použité na úpravu rôznych typov kontaminovaných vôd a pôd. Avšak pred začiatkom vlastnej bioremediácie vyžadujú vyťaženie pôdy alebo odčerpanie vody a následný transport na miesto dekontaminácie. Táto skutočnosť, ako aj vytvorenie vhodných reaktorov, vybudovanie nádrží alebo bazénov, práca manipulačných zariadení a pod., zvyšujú finančné náklady ex-situ metód. Jednou zo základných ex-situ metód je kompostovanie t.j. termofilný a diskontinuálny proces zneškodňovania odpadov s vysokou koncentráciou biodegradovateľného organického uhlíka. Vyžaduje prídavok organickej hmoty, dostupný ľahko využiteľný zdroj uhlíka a areáciu. Organická hmota napr. drevené piliny alebo odrezky, slama a pod., pozitívne vplývajú na porozitu a prevzdušnenie materiálu a jej prídanie závisí od koncentrácie a zloženia prítomných kontaminantov. Prídavok ľahko využiteľného zdroja uhlíka napr. melasy, živočíšneho hnojiva a pod., zvyšuje mikrobiálnu aktivitu, teplotu a kometabolickú degradáciu. Sú známe tri druhy kompostovania: kompostovanie v hromadách, statické alebo prevzdušňované hromady a kompostovanie v nádobách. Kompostovanie v hromadách predstavuje otvorený systém, v ktorom je kompost rozložený v podlhovastých hromadách a mechanicky je preorávaný kvôli aerácii. Statické alebo prevzdušňované hromady sú otvoreným systémom, v ktorom je aerácia dosahovaná umelým prevzdušňovacím distribučným systémom. Kompostovanie v nádobách je prepracovaná inžinierska metóda, ktorá predstavuje uzatvorený reaktorový systém. Druhou základnou bioremediačnou metódou je tvorba tzv. pôdnych hromád. Je to diskontinuálny proces, v ktorom je vyťažená pôda premiešavaná so živinami a následne prevzdušňovaná umelým aeračným systémom. Je vhodná pre zneškodňovanie zvlášť prchavých kontaminantov. Tretou základnou bioremediačnou metódou je obrábanie pôdy (angl. landfarming). Ide o modifikáciu fyzikálnych, chemických a biologických pôdnych parametrov s cieľom rozložiť odpad. Môže byť realizovaná in-situ a to manipuláciou s pôdou pomocou klasických poľnohospodárskych operácií (preorávanie, zavlažovanie a prídavok živín), konštrukciou nepriepustnej bariéry okolo lokality, úpravou sklonu svahu a pod., alebo ex-situ, teda vyťažením kontaminovanej pôdy a jej dekontamináciou v uzavretých priestoroch.

Bioremediácia je ekonomickou a ekologickou alternatívou konvenčných fyzikálno-chemických procesov eliminácie kontaminantov z pôd, vôd a sedimentov. Využíva genetickú diverzitu a metabolickú mnohostrannosť mikroorganizmov na transformáciu kontaminantov na menej škodlivé alebo neškodné látky, integrovateľné do prirodzených biogeochemických cyklov. Napriek tomu, že bioremediácia predstavuje vhodný variant eliminácie kontaminantov životného prostredia, a to predovšetkým v kombinácii s inými technológiami, sú faktory, ktoré jej efektívnosť a úspešnosť znižujú. K limitujúcim faktorom bioremediačných metód patrí napr. mutácia mikroorganizmov, vyčerpanie preferenčných substrátov, inhibičné vplyvy, rozpustnosť kontaminantov, dostupnosť elektrónových akceptorov, sorpčná rovnováha a pod. (Klein, 2000).

Bioremediácia je veľmi aktuálna aj pri riešení negatívnych vplyvov starých banských záťaží, najmä čo sa týka úpravy kyslých banských vôd (Acid Mine Drainage – AMD). V podstate ide o riadené

zintenzívnenie biogeochemických cyklov kovov a metaloidov, bežne prebiehajúcich v prírodných vodách pod vplyvom mikroorganizmov, ktoré sa na základe svojich základných metabolických procesov podieľajú na solubilizácii a imobilizácii prvkov v AMD (Gadd, 2000). Imobilizácia kovov a metaloidov pod vplyvom mikroorganizmov môže byť výsledkom biosorpcie, bioakumulácie (intracelulárnej alebo extracelulárnej), volatizácie alebo extracelulárnej precipitácie. Vhodným kandidátom bioremediácie AMD je využitie síran-redukujúcich baktérií (SRB). Základným metabolickým procesom SRB je anaeróbná redukcia síranov za vzniku sulfánu, ktorý vo vodnom prostredí ľahko reaguje s kationmi kovov za vzniku málo rozpustných sulfidov (Kontopoulos, 1998). Takto sú kovy prevedené z mobilnej formy do imobilnej formy. K výhodám bakteriálnej redukcie síranov, vzhľadom na tradičnú, doposiaľ najviac používanú metódu úpravy AMD – neutralizáciu, patrí možnosť selektívnej precipitácie kovov, vznik omnoho menšieho objemu kalov, produkcia elementárnej síry a simultánna eliminácia kovov a síranov.

Pre úpravu AMD pomocou SRB bolo v zahraničí vyvinutých niekoľko postupov, ktoré sú navzájom rozdielne v závislosti od prírodných, technických, finančných a iných faktorov. Na Slovensku je aplikácia tejto metódy pri úprave AMD na úrovni základného výskumu a prakticky všetky doteraz publikované výsledky v tejto oblasti, boli vypracované výskumným tímom (Luptáková a kol., 2002). Doposiaľ bola študovaná bioremediácia modelových roztokov a reálnych roztokov (AMD z lokality Smolník) s obsahom ťažkých kovov (Cu a Zn) pomocou SRB rodov *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum*.

### Materiál a metódy

Experimentálne práce eliminácie Cu z modelových roztokov a z AMD vytekajúcej zo starej banskej záťaže Smolník zo šachty Pech, boli uskutočňované ex-situ pri diskontinuálnych a kontinuálnych podmienkach.

Diskontinuálne podmienky boli realizované v batch-reaktore, po dobu 10 dní v anaeróbnych podmienkach (inertný plyn – dusík) pri teplote 30 °C, pod vplyvom baktérií rodov *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum*, vyizolovaných z prírodnej minerálnej vody Gajdovka (SRB-Gj). Ako živné médium bola použitá selektívna živná pôda pre síran-redukujúce baktérie DSM-63, pri hodnotách pH 7,5. Zdrojom Cu s počiatočnou koncentráciou 10 mg.l<sup>-1</sup>, bol v prípade modelového roztoku CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O. V prípade eliminácie Cu z uvedenej AMD bola jej koncentrácia 2,98 mg.l<sup>-1</sup>. Pozitívny priebeh procesu indikoval vznik čierneho-hnedých precipitátov t.j. sulfidov železa a medi na dne reaktora.

Kontinuálna precipitácia Cu so SRB-Gj prebiehala v troch po sebe naväzujúcich etapách v dvoch navzájom prepojených reaktoroch:

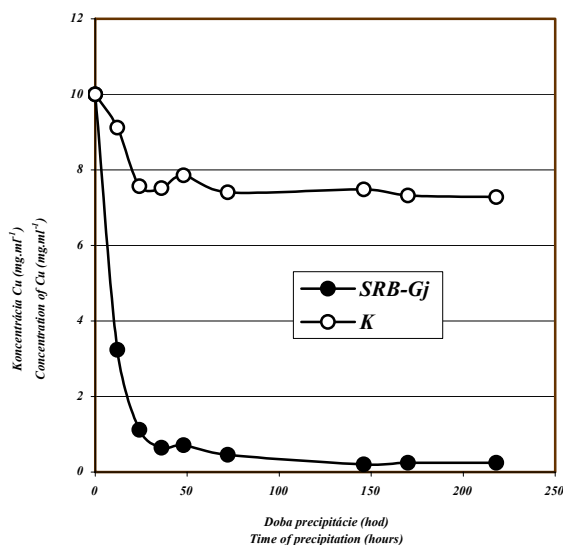
1. etapa – mikrobiálna produkcia H<sub>2</sub>S, tj. kultivácia SRB - bola uskutočnená za anaeróbnych podmienok v diskontinuálnom a hermeticky uzavretom reaktore, pri teplote 30 °C, pH 7,5, staticky a pri použití kvapalného selektívneho živného média pre rast SRB (Postgate's C médium),
2. etapa – precipitácia Cu<sup>2+</sup> bakteriálne vyprodukovaným H<sub>2</sub>S - nasledovala po 48 hodinách od začiatku kultivácie SRB. Prebiehala kontinuálnym privádzaním plynnej fázy (pomocou prúdu inertného plynu - N<sub>2</sub>) z prvého reaktora do druhého reaktora naplneného modelovým roztokom s obsahom Cu (10 mg.l<sup>-1</sup>) resp. AMD s obsahom Cu 2,98 mg.l<sup>-1</sup>,
3. etapa – separácia precipitátov – bola realizovaná filtráciou pri použití membránových filtrov.

V práci boli použité nasledujúce analytické metódy:

- koncentrácia Cu bola stanovovaná atómovou absorpčnou spektroskopiou (Spektrometer AA – 30, Varian);
- koncentrácia síranov v priebehu kultivácie SRB t.j. síran-redukcie, bola sledovaná nefelometricky (APHA, 1989) vo forme koloidného BaSO<sub>4</sub>, na prístroji Spektromom 195 pri vlnovej dĺžke 420 nm,
- vznik a prítomnosť sulfánu bola stanovovaná orientačnou skúškou, ktorej podstatou je reakcia Cu<sup>2+</sup> kationov so sulfánom v kyslom prostredí, pričom vzniklo hnedé zafarbenie (vznik CuS), ktorého intenzita je úmerná množstvu sulfánu,
- meranie pH bolo realizované kombinovanou sklenenou elektródou so zabudovanou (Ag/AgCl) referenčnou elektródou, ktorá bola pripojená k digitálnemu pH-metru GPRT 144AGL,
- kvalitatívne chemické zloženie vytvorených precipitátov Cu bolo hodnotené bodovou energiovou-disperznou analýzou (EDS) a pevné vzorky boli pred EDS analýzou pokovované s Au.

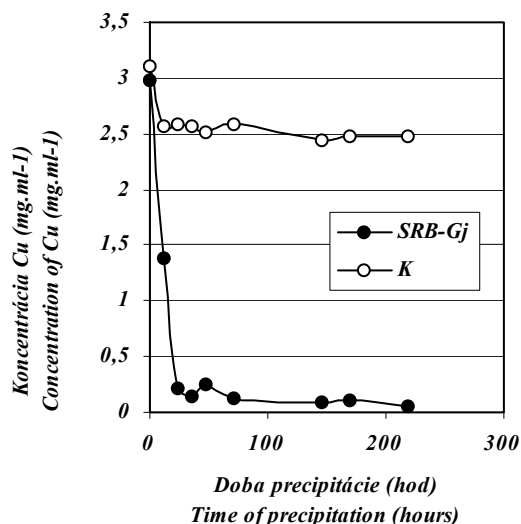
### Výsledky a diskusia

Obrázky 2 – 7 dokumentujú dosiahnuté výsledky precipitácie Cu z modelových roztokov a z AMD vytekajúcej zo starej banskej záťaže Smolník zo šachty Pech pomocou SRB, ktoré boli realizované ex-situ pri diskontinuálnych a kontinuálnych podmienkach.



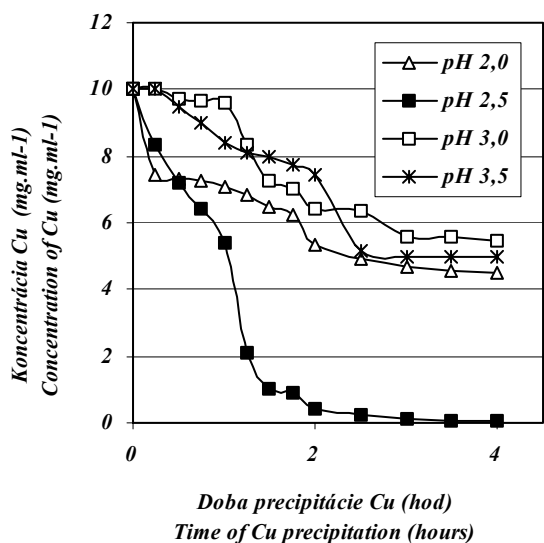
Obr. 2. Precipitácia Cu bakteriálne vyprodukovaným sulfánom z modelového roztoku, (diskontinuálne podmienky). SRB – baktérie rodu *Desulfovibrio*, K – abiotická kontrola.

Fig. 2. Precipitation of Cu by bacterially produced hydrogen sulphide from the model solution, (discontinuous conditions). SRB – bacteria of genera *Desulfovibrio*, K – abiotic control.



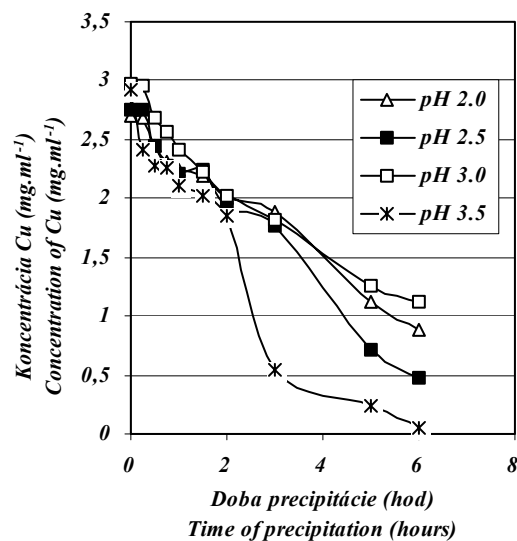
Obr. 3. Precipitácia Cu bakteriálne vyprodukovaným sulfánom z AMD zo šachty Pech (lokalita Smolník), (diskontinuálne podmienky). SRB – baktérie rodu *Desulfovibrio*, K – abiotická kontrola.

Fig. 3. Precipitation of Cu by the bacterially produced hydrogen sulphide from AMD of shaft Pech (the locality Smolník), (discontinuous conditions). SRB – bacteria of genera *Desulfovibrio*, K – abiotic control.



Obr. 4. Precipitácia Cu bakteriálne vyprodukovaným sulfánom z modelového roztoku pri rôznych hodnotách pH (kontinuálne podmienky).

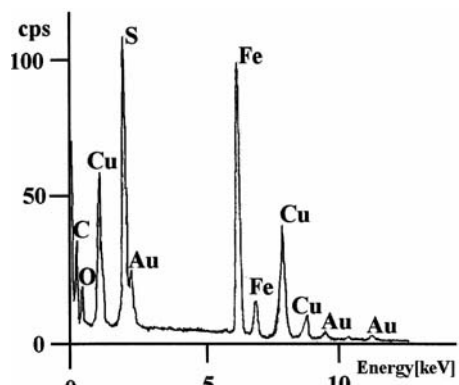
Fig. 4. Precipitation of Cu by bacterially produced hydrogen sulphide from the model solution at different pHs (continuous conditions).



Obr. 5. Precipitácia Cu bakteriálne vyprodukovaným sulfánom z AMD zo šachty Pech (lokalita Smolník) pri rôznych hodnotách pH (kontinuálne podmienky).

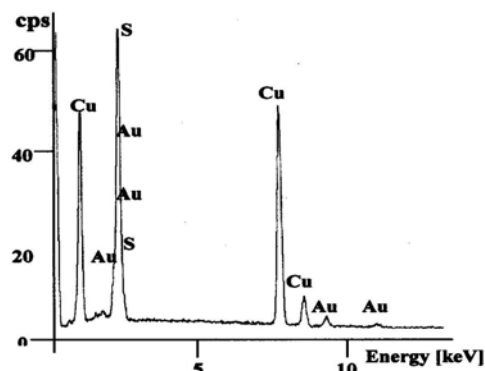
Fig. 5. Precipitation of Cu by bacterially produced hydrogen sulphide from AMD of shaft Pech (the locality Smolník) at different pHs (continuous conditions).

Efektívnosť precipitácie Cu bola pri použití, ako modelového roztoku, tak aj reálnej AMD za obidvoch podmienok realizácie vysoká (98 – 99 %), no v prípade kontinuálnych podmienok bola v porovnaní s diskontinuálnymi podmienkami dosiahnutá za podstatne kratšiu dobu (4, resp. 6 hodín). Okrem toho porovnanie obrázkov 6 a 7, t.j. kvalitatívneho zloženia vytvorených precipitátov, vznikajúcich pri pôsobení bakteriálne vyprodukovaného sulfánu na kovy prítomné v AMD dokumentuje výhodu kontinuálnych podmienok z pohľadu možnosti selektívnej precipitácie sulfidov Cu (obr. 7.), pretože v prípade diskontinuálnych podmienok vytvorené precipitáty obsahovali okrem sulfidov Cu a aj sulfidy Fe (obr. 6.). Prezentované výsledky potvrdzujú vyššiu rýchlosť a efektívnosť procesu pri kontinuálnych podmienkach.



Obr. 6. Kvalitatívna EDS analýza precipitátov vznikajúcich pri precipitácii Cu z AMD zo šachty Pech (lokalita Smolník) s bakteriálne vyprodukovaným sulfánom (diskontinuálne podmienky).

Fig. 6. EDS qualitative analysis of precipitates originating at the precipitation of Cu from AMD of shaft Pech (the locality Smolník) by biologically produced hydrogen sulphide (discontinuous conditions).



Obr. 7. Kvalitatívna EDS analýza precipitátov vznikajúcich pri precipitácii Cu z AMD zo šachty Pech (lokalita Smolník) s bakteriálne vyprodukovaným sulfánom (kontinuálne podmienky).  
Fig. 7. EDS qualitative analysis of precipitates originating at the precipitation of Cu from AMD of shaft Pech (the locality Smolník) by biologically produced hydrogen sulphide (continuous conditions).

### Záver

Prezentované výsledky potvrdzujú vyššiu rýchlosť a efektívnosť procesu pri kontinuálnych podmienkach, ako aj možnosť selektívnej precipitácie kovov.

V súčasnosti sa zaoberáme vplyvom AMD vytekajúcich zo zatopeného ložiska Smolník na okolitý biotop, pomocou modelovania ich geochemického vývoja (Šlesárová, 2005), ako aj návrhom in-situ experimentov ich úpravy.

Z dosiahnutých výsledkov je zrejmé, že zatopené ložisko v dôsledku pôsobenia exogénnych, endogénnych a v značnej miere biogénnych faktorov nie je prvково stabilné a v určitom štádiu sa môže prejaviť ako spontánny biogeoreaktor a negatívne ovplyvníť okolité životné prostredie.

*Podakovanie: táto práca vznikla v rámci riešenia grantovej úlohy č. 2/5148/5 grantovej agentúry VEGA, projektu č. 124 Slovensko-Českej MVTS, štátnej objednávky No. 51/03R 06 042 a projektu č. 11 Slovensko-Talianskej MVTS.*

### Literatúra - References

- Alexander, M.: Biodegradation and bioremediation., *New York, USA, Academic Press, 1999.*  
 Gadd G., M.: Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization., *Current Opinion in Biotechnology 11, 271-279, 2000.*  
 Klein, J.: Biotechnology, Vol. 11b Environmental Processes. Weinheim, Wiley-Verlag, 2000.  
 Kontopoulos, A.: Acide Mine Drainage Control. In: *Castro S. H., Vergara F., Sánchez M. A. (eds.) Effluent Treatment in the Mining Industry, University of Concepcion- Chile, 1998, pp. 57-118.*  
 Luptáková, A., Kušnierová, M., Fečko, P.: Minerálne biotechnológie II., sulfuretum v prírode a v priemysle. ES VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2002, ISBN 80-248-0114-0.  
 Ronald, M.: Principles of Microbiology., *New York, USA, Mosby, 1995.*  
 Šlesárová, A.: Úloha geochemického modelovania pri prognóze vývoja kvality kyslých bankských vôd., *Acta Montanistica Slovaca, 9, 2004, s. 462 – 466.*