

ВЛИЯНИЕ НА НЯКОИ ОСНОВНИ ЕКОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ ВЪРХУ ДИСИМИЛАТИВНАТА МИКРОБНА СУЛФАТ-РЕДУКЦИЯ

Светлана Браткова, Стоян Грудев, Пламен Георгиев

Минно-геоложки университет
"Св.Иван Рилски"
София 1700, България

РЕЗЮМЕ

В лабораторни условия бе изследвано влиянието на някои тежки метали (Mn, Fe, U) и арсен върху дисимилативната микробна сулфат-редукция. Установен бе растеж на сулфатредуциращите бактерии при концентрации на Mn^{2+} , As^{5+} и U^{6+} над 50 mg/l, но скоростта на редукция на сулфати намаляваше с 15 – 55% при различните експерименти. В присъствие на високи концентрации Fe^{2+} (0,5 – 2,0 g/l) скоростта на сулфат-редукция се увеличаваше. Сулфатредуциращите бактерии ефективно утаяваха горепосочените токсични елементи, както и феройоните. Микробната сулфат-редукция протичаше при стойности на рН над 4,9. рН на средата се повишаваше до неутралния пункт или в леко алкалната област в резултат на генерирането на бикарбонатни йони в процеса на дисимилативната редукция на сулфати. При едновременното присъствие на нитратни и сулфатни йони, дисимилативната редукция на нитрати винаги беше доминиращия процес. Нитратите в концентрации над 500 mg/l инхибираха протичането на микробната сулфат-редукция.

ВЪВЕДЕНИЕ

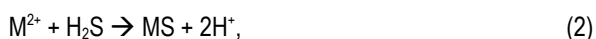
Установено е, че дисимилативната микробна сулфат-редукция е важен механизъм, участващ в отстраняването на тежки метали, токсични и радиоактивни елементи от дренажни води от находища на въглища и метали (Gazea A. et al. 1995; James J. et al. 1995).

Сулфатредуциращите бактерии окисляват прости органични съединения (такива като лактат, ацетат, бутират и други продукти на ферментации) в анаеробни условия като използват сулфат като електронен акцептор и генерират сероводород и бикарбонатни йони:



където CH_2O представлява органичната материя.

Продуцираният сероводород реагира с разтворените тежки метали, формирайки неразтворими метални сулфиди, които в следствие преципитират съобразно реакцията:

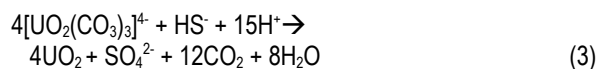


където М включва метали като Fe, Cu, Zn, Ni, Cd.

Сероводородът може химично да редуцира петвалентния арсен до As^{3+} , в резултат на което се формират минерали като аурипигмент (As_2S_3) и/или твърда фаза от As-Fe сулфид (Ronalds S., 2000). Някои сулфатредуциращи бактерии при култивиране образуват аурипигмент посредством биологична редукция на As^{5+} ,

последвана от редукция на сулфат по време на растежа им (Newman K. et al. 1997).

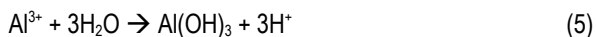
Сулфатредуциращите бактерии могат ензимно да редуцират също така и добре разтворимия шествалентен уран до слабо разтворимата четиривалентна форма (U^{4+}). Редуцираният уран в следствие абиотично преципитира като уранинит (UO_2) (5). Редукция на U^{6+} може да бъде осъществена и от микробно генериран сероводород при условие, че двата реагента са във високи концентрации и/или при високи температури (Christina E. et al. 1993) в съответствие със следната реакция:



Въпреки, че ниските стойности на рН инхибират растежа и активността на сулфатредуциращите бактерии, те могат да се развиват в екстремално кисели води прикрепени към твърда органична фаза, тъй като жизнената им дейност води до нарастване на рН в непосредствено обкръжаващата ги околна среда. Генерираните в резултат на сулфатредукцията бикарбонатни йони реагират с протони, образувайки CO_2 и H_2O , което води до намаляване на киселинността на средата:



Бикарбонатните йони буферират рН на водите до определена стойност, обикновено в диапазона 6 – 7. Нарастването на рН на киселите води води до хидролизата на някои метали и преципитацията им като неразтворими хидроокиси или окиси; например,



Микробната сулфатредукция намира широко приложение в третирането на кисели руднични води посредством СРБ-биореактори, реактивни бариери и пасивни системи. Отстраняването на замърсителите се осъществява в стриктни анаеробни условия с използването на отпадъчна органична материя (говежда, конска, овча тор, отработен гъбен компост, дървени стърготини) или евтини суровини (ацетат, етанол), служещи като източник на въглерод и енергия за сулфатредуциращите бактерии.

Целите на настоящата работа са да се оцени влиянието на тежките метали Mn, U, Fe и арсена върху растежа и активността на сулфатредуциращите бактерии; ефективността на преципитиране на горепосочените токсични елементи; да се установи най-ниската стойност на рН, при която е възможна сулфатредукция; да се изследва влиянието на високи концентрации нитрати върху протичането на процеса.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Лабораторните експерименти са проведени в стъклени банки от 500 ml, съдържащи органични съединения и соли разтвор. Като органични субстрати (поотделно или в смес за различните експерименти) са използвани Na-лактат, Na-ацетат, Na-пропионат и глицерол, както и отпадъчна органична материя (говежда тор, отработен гъбен компост и дървени стърготини). Банките са инокулирани със смесена набогатена култура на сулфатредуциращи бактерии от родовете *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*.

Влияние на U, As, Mn и Fe върху протичането на дисимилативната микробна сулфатредукция

Използваният соли разтвор бе със следния състав (в g/l): безв. Na_2SO_4 , 3.0; KH_2PO_4 , 0.2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5; KCl, 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; дрождев екстракт, 0.1; разтвор на микроелементи – 1ml. Като източник на въглерод и енергия за сулфатредуциращите бактерии са използвани Na-лактат, Na-ацетат, Na-пропионат и глицерол (3:1:1:1) – общо 6g/l. Уранът под формата на $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, арсенът като $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и манганът като $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ са добавени поотделно за различните експерименти до достигане на крайни концентрации в диапазона 5 - 50 mg/l. Желязото е добавено под формата на $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с крайни концентрации в интервала 50 – 3000 mg/l. рН на средата е коригирано до 6.5. Дифузията на кислород от въздуха е елиминирана посредством 1 см слой стерилен течен парафин. Експериментът е проведен при температура 35°C.

Влияние на рН на средата върху протичането на дисимилативната микробна сулфатредукция

Сулфатредуциращите бактерии са култивирани на среда, съдържаща Na-лактат (6.0 g/l), като единствен източник на въглерод и енергия. Съставът на солевия разтвор е описан по-горе. Началните стойности на рН за

различните експерименти са доведени до стойности в интервала от 2 до 7 през един пункт посредством HCl. Култивирането е осъществено при температура 30 °C.

Влияние на високи концентрации нитрати върху протичането на дисимилативната микробна сулфатредукция

Използвани са три различни хранителни среди в зависимост от източника на въглерод и енергия: I – Na-лактат – 10.0 g/l; II – Na-ацетат – 10.0 g/l; III – органична материя (смес от говежда тор, отработен гъбен компост и дървени стърготини в равни обемни отношения) – 100 g абсолютно сухо вещество/l. Солеви разтвори имаше следния състав, g/l: безв. Na_2SO_4 – 3.0; KH_2PO_4 – 0.2; KNO_3 – 4.9; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5; KCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1. Концентрациите на сулфати и нитрати са съответно 2.5 и 3.0 g/l. рН на хранителните среди е коригирано до 7.0. Разтворите са инокулирани със смесена набогатена култура на сулфатредуциращи бактерии и други метаболитно свързани физиологични групи бактерии. Култивирането на микроорганизмите се извърши при температура 30 °C.

Аналитични методи

Концентрацията на разтворените метали и арсена се определяше посредством ICP-спектrophотометрия. Концентрацията на урана се измерваше фотометрично с използването на реагента арсеназо III. Концентрацията на сулфатите и нитратите се определяше фотометрично. Количеството на разтворената органика се определяше посредством измерването на нейната окисляемост (чрез KMnO_4).

Идентификацията и количествената характеристика на микроорганизми от основни физиологични групи се осъществи по стандартни микробиологични методи, включващи метод на пределните разреждания и метод на Кох.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните за максималната и средната скорост на редукция на сулфати, и инхибирането на процеса (в %) от използваните концентрации U, As и Mn са представени в Таблица 1. Динамиката на концентрацията на сулфатите в присъствието на As, U и Mn съответно 5, 15, 25 и 50 mg/l, и на контролата (без наличие на токсични елементи) е представена на Фигура 1. Максималната скорост на сулфатредукция за всички експерименти бе измерена през логаритмичната фаза на развитие на бактериите (до 10 ден от началото на опита), а средната – за целия период на култивиране (30 дни).

Изследваните концентрации U, As и Mn, типични за дренажни води в реални условия не оказаха съществен инхибиращ ефект върху скоростта на протичане на дисимилативната микробна сулфат-редукция.

Уранът, в концентрации под 10 mg/l и Mn – под 15 mg/l, водят до намаляване на скоростта на редукция на сулфати между 7 и 25% за различните експерименти. По-негативен

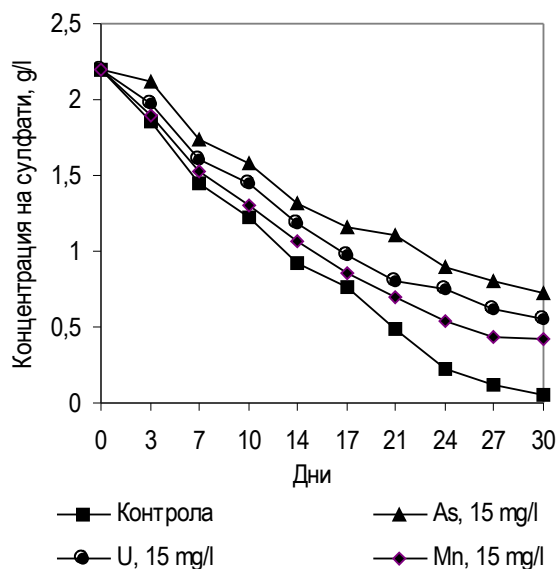
ефект (44 – 52 % инхибиране) горепосочените токсични елементи оказват при висока концентрация – 50 mg/l.

Таблица 1. Влияние на различни концентрации U, As и Mn върху скоростта на протичане на дисимилативната микробна сулфатредукция.

Елемент	Съдържание, mg/l	Максимална скорост, mg SO ₄ ²⁻ /l.d	Средна скорост, mg SO ₄ ²⁻ /l.d	Инхибиране, в %
Контрола	0	98,0	74.4	
U	5	85,0	69.5	7– 14
	10	75.3	62.2	17 – 24
	15	66.4	57.9	22 – 32
	25	57,6	46,5	38 – 42
	50	47,3	40,6	46 – 52
As	5	81.2	64.2	14 – 17
	10	73.7	57.8	25 – 32
	15	69.8	48.4	29 – 35
	25	60,5	41,6	41 – 45
	50	51,0	31,7	48 – 57
Mn	5	89.2	69.2	7 – 9
	10	82.0	66.8	10 – 16
	15	74.0	60.3	19 – 25
	25	63,7	54,6	26 – 35
	50	52,3	41,7	44 - 47

Установено бе, че най-токсично действие върху сулфатредуциращите бактерии оказват йоните на As⁵⁺. Дори ниски концентрации на арсен (5 – 10 mg/l) водят до намаляване на скоростта на процеса с 14 – 32%, а наличието на 50 mg As/l в средата доведе до намаляване на скоростта на процеса над два пъти.

Йоните на арсена и мангана оказват негативен ефект и върху растежа на сулфатредуциращите бактерии. През стационарната фаза бе отчетен максимален брой 10⁴ – 10⁶ кл/ml, при контрола 10⁷ кл/ml. Независимо от измерената по-ниска скорост на сулфатредукция, не бе установено влияние на изследваните концентрации уран върху числеността на сулфатредуциращите бактерии. Техният брой в стационарната фаза бе еднакъв с този на контролата – 10⁷ кл/ml.



Фигура 1. Влияние на U, As и Mn, 15 mg/l върху протичането на микробната сулфатредукция.

Посредством дисимилативната сулфат-редукция се постигна намаляване на концентрациите на разтворените токсични елементи във всички експерименти. СРБ ензимно редуцират добре разтворимия шествалентен уран до UO₂, поради което още на 20 ден от опита е установено 98 – 99% утаяване на радиоактивния елемент. Катионните анализи показват плавно намаляване на концентрациите на As и Mn във времето. Отчетените по-ниски концентрации на Mn²⁺ в края на опита вероятно се дължат на процеси, като биосорбция и биоаккумуляция от присъстващата микрофлора, и на образуването на MnCO₃, тъй като редукиционните условия в средата не позволяват окислението му до Mn⁴⁺ и формирането на неразтворим MnO₂. По-голямата част от арсена е отстранен от разтвора чрез преципитирането му до As₂S₃ и As₂S₅ или посредством сорбцията му от микробната биомаса. В края на опита е установено от 60 до 80% утаяване на мангана и арсена за различните експерименти.

За разлика от йоните на U, Mn и As, двувалентното желязо в концентрации 0,5 – 2 g/l повишава скоростта на микробната сулфатредукция, консумирайки микробно генерирания H₂S, който във високи концентрации е токсичен за самите сулфатредуциращи бактерии. Най-висока скорост – 118 mg SO₄²⁻/l.d е измерена в присъствието на 1,5 g Fe²⁺/l в периода от началото на опита до 21 ден. В последствие е установена тенденция на поддържане на концентрацията на сулфатите поради изчерпване на източниците на въглерод и енергия за сулфатредуциращите бактерии (Фигура 2). Съдържание на ферройони около 3000 mg/l, обаче доведе до съществено инхибиране (42%) на процеса на микробната сулфатредукция поради частично окисление на двувалентното желязо с последваща хидролиза и преципитация на Fe(OH)₃, както и поради повишаването на окислително-редукционния потенциал на средата до стойности, неблагоприятни за протичането на процеса.

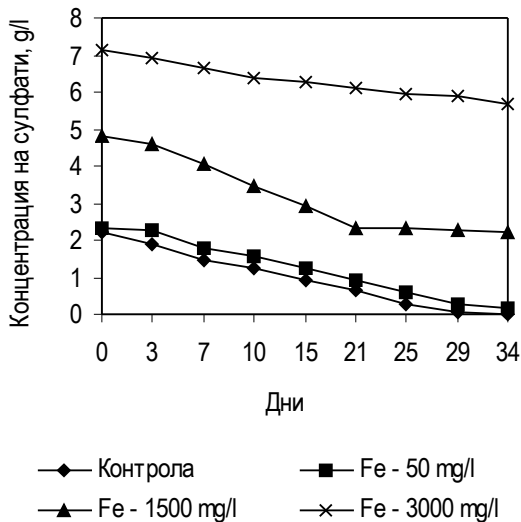
Установено бе ефикасно утаяване на желязото под формата на FeS (96,5 – 99 %) при начални концентрации на ферройоните в диапазона 50 – 1500 mg/l.

Съдържанието на 3000 mg/l желязо намали не само скоростта на микробната сулфатредукция, а оказа инхибиращ ефект и върху самите сулфатредуциращи бактерии - техният брой в стационарната фаза бе сведен до 10⁴ кл/ml. Количеството на микробно генерирания сероводород бе недостатъчно за преципитиране на цялото количество ферройони – само 39% от желязото бе утаено в края на експеримента.

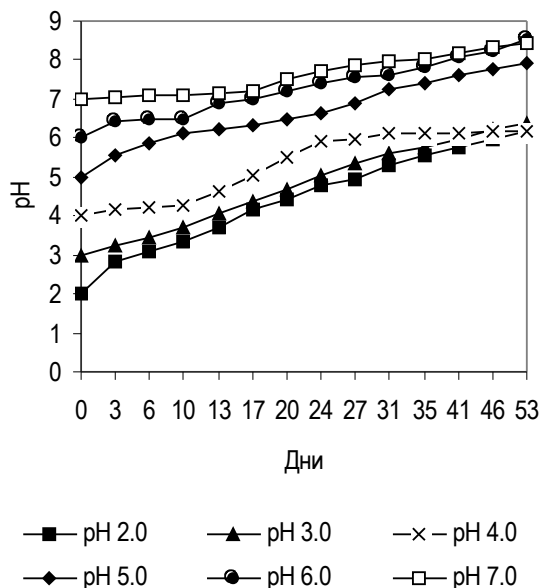
Влияние на pH върху микробната сулфатредукция

При всички експерименти, независимо от началните стойности на рН, се наблюдава алкализирание на средата (Фигура 3).

Промяната на киселинността във времето се дължи както на микробната сулфатредукция (свързана с продуцирането на бикарбонатни йони при стойности на рН в слабокиселата и неутрална област), така и на амонифицирането от анаеробната микрофлора на богатия на протеини дрождев екстракт, влизащ във състава на хранителната среда.



Фигура 2. Влияние на Fe^{2+} върху скоростта на протичане на дисимилативната сулфатредукция

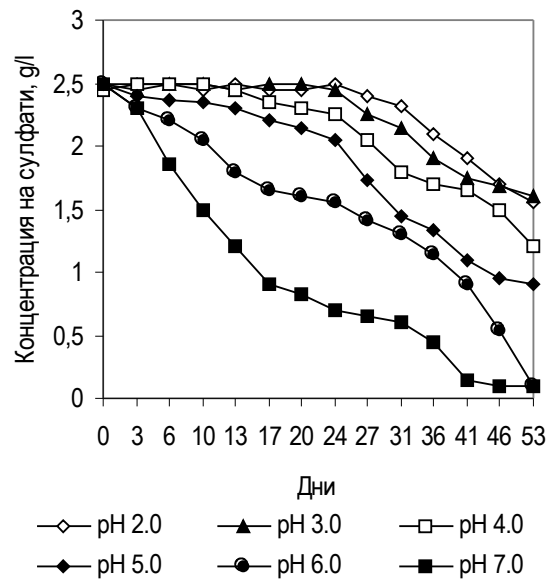


Фигура 3. Динамика на рН на средата при протичане на дисимилативната микробна сулфатредукция

Микробната сулфатредукция протече с най-висока средна скорост - 94 $mg SO_4^{2-}/l.d$ от началото на опита до 17 ден при начална стойност на рН 7.0 (Фигура 4). В слабо киселата област скоростта на редукция на сулфати бе в диапазона 50 – 80 $mg SO_4^{2-}/l.d$.

Сулфатредуциращите бактерии имат активност след повишаване на рН на средата до стойности над 4,9 – 5,1 за различните експерименти. Много ниска средна скорост на сулфатредукция - 26 - 33 $mg SO_4^{2-}/l.d$ се установи при начални стойности на рН на разтворите в силно киселата област. Процесът започна след 24 ден, когато условията за развитие на СРБ не са вече благоприятни, поради консумация на част от разтворената органика от останалата анаеробна хетеротрофна микрофлора.

Сулфатредуциращите бактерии достигат най-висока численост през стационарната фаза - $10^7 - 10^8$ кл/ml при начални стойности на рН 5 - 7. За останалите експерименти техният брой бе в диапазона $10^2 - 10^3$ кл/ml.



Фигура 4. Влияние на рН върху скоростта на протичане на дисимилативната микробна сулфатредукция.

Влияние на високи концентрации нитрати върху протичането на дисимилативната микробна сулфатредукция

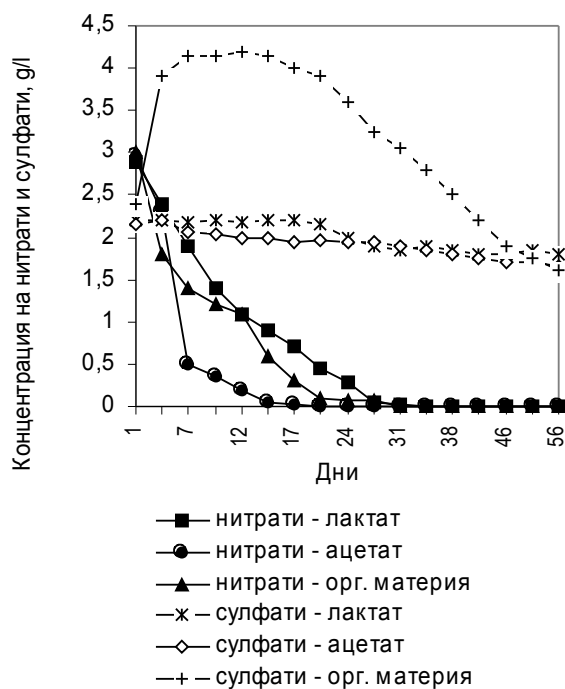
При едновременното протичане на дисимилативна нитратредукция и сулфатредукция, денитрификацията бе доминиращия процес. Редукция на сулфати започна след като концентрацията на нитрат спадна под 0,5 g/l за всички експерименти (Фигура 5.).

Използваните източници на въглерод и енергия оказват влияние върху скоростта на протичане и на двата процеса. Максимална скорост на редукция на нитрати - 400 $mg NO_3^-/l.d$ бе установена в първите дни от опита при източник на въглерод ацетат.

С най-висока скорост - 80 $mg SO_4^{2-}/l.d$ сулфатредукцията протече при прилагането на отпадъчна органична материя (смес от говежда тор, отработен гъбен компост и дървени стърготини) като източник на въглерод и енергия. Увеличаването на концентрацията на сулфатите до 4,2 g/l в началото на опита се дължи на разтваряне на гипса, използван в технологията за производство на гъбен компост.

Неразтворимите биополимери (целулоза, хемицелулоза и др.) в анаеробни условия се разграждат бавно от комплекс метаболитно свързани микроорганизми, в резултат на което постоянно се поддържат високи концентрации нисши органични киселини и алкохоли – донори на електрони за СРБ. Микробната сулфатредукция при останалите експерименти бе лимитирана от изчерпването на органиката в процеса на денитрификацията, както и на повишаването на рН до стойности над 8,5 – 9,0 още в началото на опита.

Анализът на микрофлората показва динамика в числеността на популациите, изграждащи сложните микробни ценози. Първоначално, доминиращи бяха денитрифициращите бактерии, като броят им достигна 10^6 – 10^7 кл/мл на 20 ден от началото на експеримента. Числеността на сулфатредуциращите бактерии започна да нараства след 30 ден, като в края на опита бе в диапазона 10^5 – 10^7 кл/мл. В течната фаза на отпадъчната органична материя бе установен голям брой целулозо-разграждащи, ферментиращи и други анаеробни бактерии.



Фигура 5. Динамика на концентрациите на сулфати и нитрати при едновременното протичане на дисимилативната сулфатредукция и денитрификация.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сулфатредуциращите бактерии притежават висока устойчивост към йоните на U, Mn и As. Дори и при концентрации 50 mg/l, многократно надвишаващи реалните в дренажни води от минерални находища, процесът протича със скорост, позволяваща генерирането на високи количества сероводород. Силният редуктор утаява голяма част от тежките метали във вид на неразтворими метални

сулфиди. Посредством микробната сулфатредукция ефикасно (98 - 99%) се отстранява и разтворен U^{6+} в концентрации 5 – 50 mg/l чрез утаяването му под формата на неразтворимия уранинит. Присъствието на двувалентно желязо в концентрации до 2 g/l стимулира протичането на процеса, а от там и неговата ефективност.

Генерираните бикарбонатни йони в процеса на жизнената дейност на сулфатредуциращите бактерии водят до нарастване на рН в непосредствено обкръжаващата ги околна среда. Формирането на микрозони с неутрално рН позволява осъществяването на процеса в изразено кисели води (рН 2 – 3), а също така и отстраняването на някои замърсители под формата на хидроокиси при по нататъшно повишаване на рН на средата.

Процесът микробна сулфатредукция е напълно инхибиран при наличие на нитрати, в концентрации над 0,5 g/l. Това лимитиране е от значение при прилагането на биологично третиране на кисели руднични води след смесването им с богати на нитрат битови или промишлени отпадъчни води.

ЛИТЕРАТУРА

- Gazea, A., Adam, K. & Kontopoulou, A. 1995. A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage, Paper presented at the Minerals Engineering '95 Conference, St. Ives, England, June 14-16.
- James J., Gusek, P.E., Dr Thomas R. Wildeman. 1995. New developments in passive treatment of acid rock drainage, Paper presented at the Engineering Foundation Conference on Technological Solutions for Pollution Prevention in the Mining and Mineral Processing Industries, Palm Coast Florida, USA, January 23.
- Ronalds S., Oremland and John Stolz. 2000. Dissimilatory reduction of selenate and arsenate in nature, In: Environmental Microbe-Metal Interactions, D. R. Loveley, (Ed.) ASM Press, Washington, D.C., pp.199-224.
- Newman, D.K., T.J. Beveridge and F.M. Morel. 1997. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*, Appl. Environ. Microbiol. 63: 2022-2028.
- Rajagopalan Ganesh, Kevin G. Robinson, Gregory D. 1997. Reed and Gary S. Saylor, Reduction of hexavalent uranium from organic complexes by sulfate- and iron-reducing bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 63, 4385-4391.
- Christina E. Barnes and J. Kirk Cochran. 1993. Uranium geochemistry in estuarine sediments: Control on removal and release processes, Geochimica et Cosmochimica Acta, 57, 555-569.
- Darryl H. Dvorak, Robert S. Hedin, Harry M. Edenborn, and Pamela E. Mc ntire. 1992. Treatment of metal-contaminated water – using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors, Biotechnology and Bioengineering, 40, 609-616.
- Derek R. Lovley and Elizabeth J.P. Phillips, 1992. Bioremediation of uranium contamination with enzymatic uranium reduction, Environ. Sci. Technol., 26, 2228 – 2234.

*Препоръчана за публикуване от
катедра "Инженерна геоекология" на ГПФ*

THE EFFECT OF SOME ESSENTIAL ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE MICROBIAL DISSIMILATORY SULPHATE REDUCTION

Svetlana Bratcova, Stoyan Groudev, Plamen Georgiev

University of mining and geology
"St. Ivan Rilski"
Sofia 1700, Bulgaria

ABSTRACT

The effect of some heavy metals (manganese, iron, uranium) and arsenic on microbial dissimilatory sulphate reduction was studied under laboratory conditions. It was found that the sulphate-reducing bacteria were able to grow at concentrations of Mn^{2+} , As^{5+} and U^{6+} as high as 50 mg/l but the rate of sulphate reduction was decreased by about 15 – 55 % in the different experiments. The rate of sulphate reduction, however, was increased in the presence of high concentration of Fe^{2+} (in the range of 0,5 – 2,0 g/l). The sulphate-reducing bacteria efficiently precipitated the above-mentioned agents, as well as the ferrous iron. The microbial sulphate reduction was carried out at pH values higher than 4,9. The bacteria were able to increase the pH of the solutions to neutral or slightly alkaline level by the hydrocarbonate ions generated during the dissimilatory sulphate reduction. In the presence of both nitrate and sulphate ions, the microbial dissimilatory nitrate reduction was always the prevalent process. The concentrations of nitrate as high as 500 mg/l inhibited strongly the rate of sulphate reduction.

INTRODUCTION

Bacterial sulphate reduction has been identified as a significant mechanism for removing contaminant heavy metals, toxic and radioactive elements from coal and metal-mine drainage (Gazea *et al.*, 1995; James *et al.*, 1995). Sulphate-reducing bacteria oxidize simple organic compounds (such as lactate, acetate, butyrate and another products of fermentations) with sulphate under anaerobic conditions, and thereby generate hydrogen sulphide and bicarbonate ions:



where CH_2O represent the organic matter.

The produced hydrogen sulphide reacts with dissolved metals to form insoluble metal sulphides that subsequently precipitate according to the reaction:

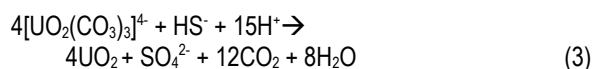


where M includes metals such as Fe, Cu, Zn, Ni, Cd.

The hydrogen sulphide can chemically reduce As^{5+} to As^{3+} , resulting in the formation of minerals such as orpiment (As_2S_3) and/or an arsenic-iron sulphide solid phase (Ronalds *et al.*, 2000). Some of sulphate-reducing bacteria formed orpiment in culture by mediating biological reduction of As^{5+} followed by the reduction of sulphate during growth.

Certain sulphate-reducing bacteria can enzymatically reduce also highly soluble hexavalent uranium to the sparingly soluble tetravalent form U^{4+} . Reduced uranium then abiotically precipitates as uraninite (UO_2) (Ganesh *et al.*, 1997). The reduction of U^{6+} can be carried out by a bacterial produced hydrogen sulphide in the presence of high concentrations of

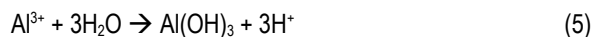
both U and sulphide and/or elevated temperatures (Barnes *et al.*, 1993) according to the following reaction:



Although at low pH the growth and activity of sulphate-reducing bacteria are inhibited, their activity results in pH increments in their immediate environment, allowing their viability in the solid organic substrate, independent of drainage extremely acidic waters. Bicarbonate ions formed during sulphate reduction react with protons to form CO_2 and water and remove acidity from solutions as CO_2 gas:



The bicarbonate ions buffer the water pH to a particular value, typically in the range of 6 – 7 (Darryl *et al.*, 1992). Raising the pH of acidic water will cause some metals to hydrolyze and precipitate as insoluble hydroxides or oxides; for example,



The process of microbial sulphate reduction has been found a large application in treatment of acid mine waters by SRB-bioreactors, reactive barriers and passive systems. The pollutants are retained in strict anaerobic conditions by used of waste organic matter (a mixture of cow, horse and sheep manure, spent mushroom compost and sawdust) or chip row materials (acetate, ethanol, etc.) as sources of carbon and energy by sulphate-reducing bacteria.

The purpose of this study was to evaluate the effect of heavy metals Mn, U, Fe and arsenic on the growth and activity of sulphate-reducing bacteria; the efficiency of precipitation of above-mentioned toxic elements; to find the lowest pH value, in which the bacterial sulphate-reduction is possible; to

evaluate the effect of high concentrations nitrate on the rate of the process.

MATERIALS AND METHODS

Batch experiments were carried out in 500 ml glasses bottles containing organic substrates and nutrient solution. Simple organic compounds (Na-lactate, Na-acetate, Na-propionate, glycerol) or solid organic matter (cow manure, spent mushroom compost and sawdust) were used as organic substrates. The bottles were inoculated with mixed enrichment culture of sulphate-reducing bacteria belong to *p.Desulfotomaculum*, *p.Desulfovibrio* and *p.Desulfobacter*.

The effect of U, As, Mn and Fe on dissimilatory sulphate reduction

The nutrient solution used in these tests contained (in g/l): Na₂SO₄, 3.0; KH₂PO₄, 0.2; (NH₄)₂SO₄, 0.5; KCl, 0.5; CaCl₂·2H₂O, 0.15; MgSO₄·7H₂O, 0.2; yeast extract, 0.1; trace element solution – 1 ml. Na-lactate, Na-acetate, Na-propionate, and glycerol (3:1:1:1) – 6 g/l were used as source of carbon and energy for sulphate-reducing bacteria. Uranium (in the form of uranyl acetate), arsenic (Na₃AsO₄·7H₂O) and manganese (MnSO₄·H₂O) were added separately to the bottles reach to final concentration in the range of 5 to 50 mg/l for the different experiments. Iron (FeSO₄·7H₂O) was added in final concentration 50 – 3000 mg/l. pH of inoculated solutions was adjusted to 6.5. The oxygen diffusion was eliminated by 1 cm layer sterile liquid paraffin. The bottles were incubated at 35 °C.

The effect of pH on dissimilatory sulphate reduction

Sulphate-reducing bacteria were grown in a medium with Na-lactate – 6 g/l as a source of carbon and energy. The nutrient solution had the previously mentioned composition. The initial pH of the inoculated solutions was adjusted to levels varying from 2.0 to 7.0 by adding HCl. The bottles were incubated at 30 °C.

The effect of high concentration nitrate on dissimilatory sulphate reduction

Three different kind of medium were used for growth of sulphate-reducing bacteria, depending of source of organic carbon: I - Na-lactate – 10.0 g/l; II - Na – acetate - 10 g/l; III – solid organic matter (mix of cow manure, spent mushroom compost and sawdust) – 100 g/l. The nutrient solution used in these tests contained (in g/l) Na₂SO₄ – 3.0; KH₂PO₄ – 0.2; KNO₃ – 4.9; (NH₄)₂SO₄ – 0.5; KCl – 0.5; MgSO₄·7H₂O – 0.1; FeSO₄·7H₂O – 0.1. The concentration of sulphate and nitrate were accordingly 2,5 and 3,0 g/l. pH of solutions was adjusted to 7,0. The bottles were inoculated with mixed enrichment culture of sulphate-reducing bacteria and other metabolically interdependent microorganisms. The bacteria were incubated at 30 °C.

Analytical techniques

The dissolved metal concentrations were determined by ICP spectrophotometry. Uranium concentration was measured

photometrically using the arsenazo III reagent. Sulphate and nitrate concentrations were determined photometrically. The content of soluble organic compounds was determined by measuring its oxidativity (by KMnO₄).

The identification and enumeration of the microorganisms inhabiting the bottles were carried out by standart microbiological methods.

RESULTS AND DISCUSSION

The data about maximum and average rate of the bacterial sulphate-reduction and inhibition of the process (in %) by used concentration U, As and Mn are represented at table 1. Change of sulphate concentration in presence of As, U and Mn, accordingly 5,15, 25 and 50 mg/l and control (without toxic elements) are represented at figure 1. The maximum rate of sulphate reduction was calculated during logarithmic phase (up to 10 day) of bacterial growth for all tests, whereas the average rate – for overall cultivation (30 days).

The concentrations of U, As and Mn, which were typically for real drainage waters have been no essential reducing influence on the rate of the dissimilatory sulphate reduction.

The concentrations of uranium, below 10 mg/l and manganese – below 15 mg/l have brought to decrease of the rate of sulphate reduction in range 7 to 25% for different experiments. The abovementioned toxic elements have been proved much more negative effect (44 – 52%) in higher concentration – 50 mg/l.

Table 1. The effect of U, As and Mn in different concentration on dissimilatory sulphate reduction

Element	Contents, mg/l	Maximum rate, mg SO ₄ ²⁻ /l.d	Average rate, mg SO ₄ ²⁻ /l.d	Inhibition, %
Control	0	98,0	74.4	
U	5	85,0	69.5	7 – 14
	10	75.3	62.2	17 – 24
	15	66.4	57.9	22 – 32
	25	57,6	46,5	38 – 42
	50	47,3	40,6	46 – 52
As	5	81.2	64.2	14 – 17
	10	73.7	57.8	25 – 32
	15	69.8	48.4	29 – 35
	25	60,5	41,6	41 – 45
	50	51,0	31,7	48 – 57
Mn	5	89.2	69.2	7 – 9
	10	82.0	66.8	10 – 16
	15	74.0	60.3	19 – 25
	25	63,7	54,6	26 – 35
	50	52,3	41,7	44 – 47

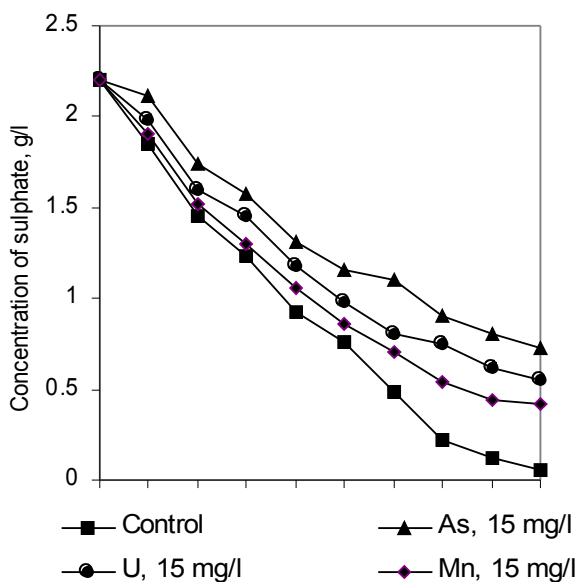
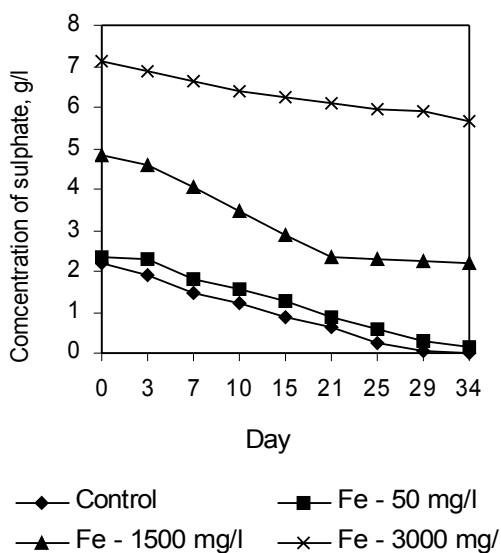


Figure 1. The effect on U, As and Mn, 15 mg/l on dissimilative sulphate reduction

It was found that arsenate ions have most toxic effect on sulphate reducing bacteria. Even low concentration of As^{5+} - 5 - 10 mg/l has brought to abatement of the process rate with 14 - 32%, while in presence of 50 mg As/l the rate of sulphate reduction has fallen more than twice.

The cat ions of arsenic and manganese also had negative effect on growth of sulphate reducing bacteria. It was counted maximum number of microorganisms - $10^4 - 10^6$ cells/ml at stationary phase, while their number in control was 10^7 cell/ml. It wasn't found influence of studied concentrations uranium on number of sulphate reducing bacteria independent of measured lower rate of sulphate reduction.

The concentrations of dissolved toxic elements were decrease by carry out of dissimilatory sulphate reduction. Sulphate reducing bacteria enzymatically reduced highly soluble hexavalent uranium, wherefore it was found efficiently precipitation (98 - 99%) of radioactive element as far back as 20 day. The cat ionic analyses showed gradual decrease of concentrations of arsenic and manganese during the experiments. Lower concentration of Mn^{2+} measured at the end of test probably to be due to processes such as biosorption and bioaccumulation by present micro flora, as well as by formation of $MnCO_3$. Reducing conditions in medium didn't allow oxidation of Mn^{2+} and formation of insoluble MnO_2 . Major part of arsenic was removed by means of both precipitation of As_2S_3 and As_2S_5 , and sorption by microbial biomass. It was found 60 - 80% removal of manganese at the end of different experiments.

The concentrations of ferrous ions in range 0,5 to 2 g/l were raised the rate of sulphate reduction in difference of U, Mn and As, because Fe^{2+} consumed microbial generated H_2S , which is toxic for sulphate reducing bacteria in high concentration. It was measured highest rate of the process - 118 mg SO_4^{2-} /l.d in the presence of 1,5 g Fe/l at first to 21 day of cultivation. Subsequently it was found the lack of change of sulphate concentration by reason of exhausted source of carbon and energy for sulphate reducing bacteria (figure 2). Concentration of ferrous ions about 3 g/l lead to materially reduce of the microbial sulphate reduction (42%) because of partial oxidized of Fe^{2+} , succeeded of hydrolyze and precipitation of $Fe(OH)_3$, as well as increased of Eh of medium to unfavourable value for carry out of the process.

It was found efficiently precipitation of iron in form of FeS (96,5 - 99%), when initial concentration of ferrous ions was 0,5 - 1,5 g/l.

Figure 2. The effect of Fe^{2+} on dissimilative microbial sulphate reduction.

Contents of 3 g Fe/l decreased both the rate of microbial sulphate reduction and growth of sulphate reducing bacteria - their number in stationary phase was only 10^4 cells/ml. Amount of microbial generated H_2S was not enough to react with all quantity ferrous ions - only 39% of iron was precipitated at the end of experiment.

The effect of pH on dissimilative microbial sulphate-reduction

It was observed neutralization of medium independently of initial values of pH in all experiments.

The change of acidity at time was due to both of microbial sulphate-reduction, related with producing of bicarbonate ions (when pH is neutral or slight acid) and amination of rich of proteins yeast extract, involved in medium of anaerobic microflora.

The highest rate of dissimilative sulphate-reduction - 94 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{l.d}$ was measured to 17 day from beginning of experiment in case of initial pH 7 (Figure 4). The rate of sulphate-reduction on slightly acid level was in range 50 to 80 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{l.d}$.

Sulphate reducing bacteria had activity after increasing pH of medium above 4,9 – 5,1 for different experiments. It was found very low rate of sulfate-reduction when initial pH of solutions were strongly acid. The process was began after 24 day, when the conditions for growth of sulphate reducing bacteria was unfavorable because a part of soluble organic matter was used of remaining anaerobic heterotrophic microflora.

It was enumerated highest number of sulphate reducing bacteria at stationary phase – 10^7 – 10^8 cells/ml in cases of initial pH values from 5.0 to 7.0. Their number was in range 10^2 – 10^3 cells/ml for the rest of experiments.

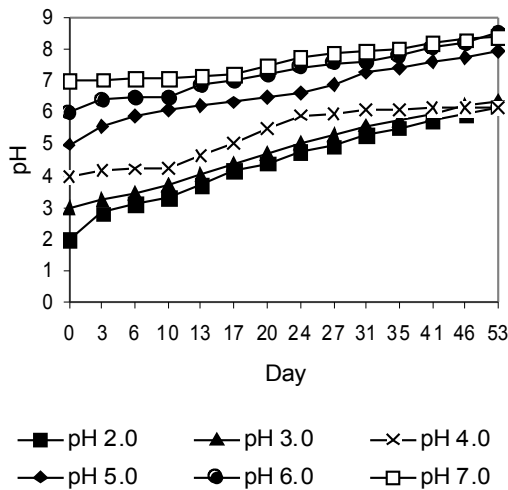


Figure 3. Dynamic of pH of medium during microbial sulphate reduction

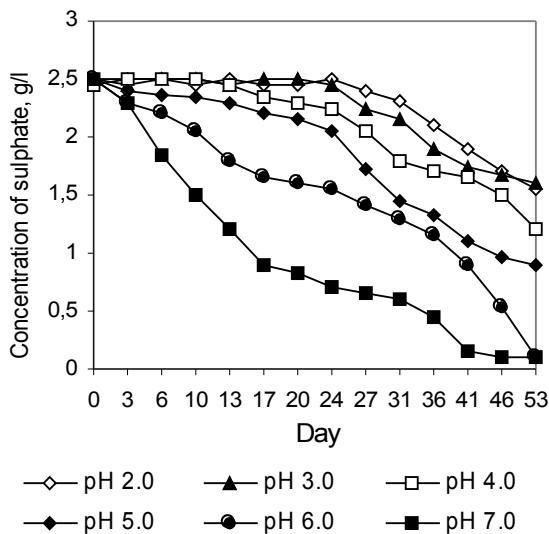


Figure 4. The effect of pH on dissimilative microbial sulphate reduction

The effect of high concentration of nitrate on dissimilatory sulphate reduction

It was found dominance of reduction of nitrate at concomitant carried out of sulphate-reduction and denitrification. Microbial sulphate-reduction was began after decreased nitrate concentration below 0,5 g/l for all tests (Figure 5). The type of used sources of carbon and energy influenced on the rate of both processes. It was measured highest rate of nitrate reduction - 400 mg $\text{NO}_3/\text{l.d}$ at the beginning of experiment with used of acetate

Maximum rate of sulphate-reduction - 80 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{l.d}$ was estimated with used of waste organic matter (mix of cow manure, spent mushroom compost and sawdust) as source of carbon and energy. The sulphate concentration was increased to 4,2 g/l at beginning of experiment because dissolution of gypsum, which have been added in mushroom compost preparation.

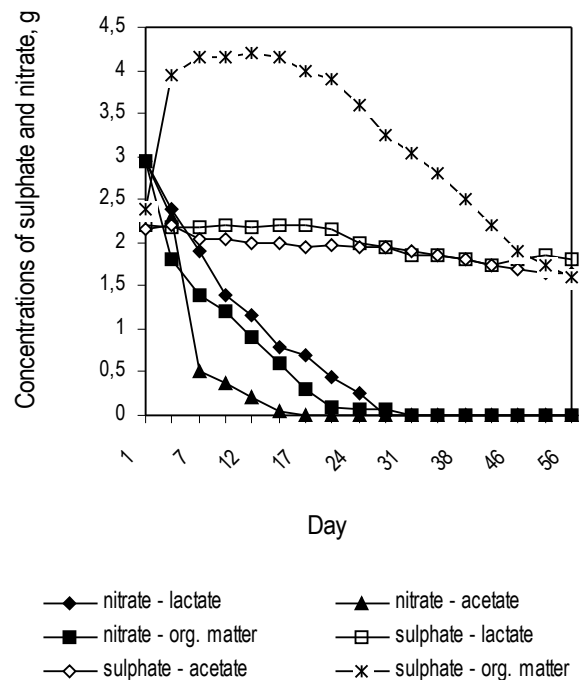


Figure 5. Dynamic of the concentrations of sulphate and nitrate at concomitant carried out of sulphate and nitrate reduction.

Insoluble biopolymers (cellulose, hemicellulose and etc.) in anaerobic conditions were slowly digested by complex of metabolically related microorganisms. As a result of this the concentrations of soluble organic acids and alcohols (donors of electrons for sulphate reducing bacteria) were high. The microbial sulphate reduction was limited for remaining experiments as result of exhausted of assimilated organic during the process of genitrification, as well as increased of pH above 8,5 – 9,0. The microflora date revealed dynamics in population density involved in complex microbial cenoses. At the beginning the denitrified bacteria were dominant (their number reached 10^6 – 10^7 cells/ml at 20 day). The sulphate reducing bacteria number started to increase after 30 day and reach 10^5 – 10^7 cells/ml. It was found a large number of cellulolytic, fermenting bacteria and other anaerobic microorganisms in the liquid phase of waste organic matter.

CONCLUSIONS

The sulphate reducing bacteria showed high resistance to ionic forms of U, Mn and As. The process carried out with rate, which enable generation of high concentrations H₂S even at concentration of toxic elements 50 mg/l, which are much then real of drainage waters of mining areas. The strong reducing agent has precipitated most of heavy metals as insoluble sulfides. The concentration of hexavalent uranium in range 5 to 50 mg/l has efficiently removed (98 – 99%) as insoluble uraninite by microbial sulphate reduction. The presence of ferrous ions in range 40 – 2 000 mg/l stimulated both the process and its efficiency.

The bicarbonate ions generated by activity of sulphate-reducing bacteria lead to increase of pH in surround environment. After forming of these microzones with neutral pH is possible to outgoing of the process even in strong acid drainage waters and precipitation of some pollutants in the form as hydroxides.

The process of microbial sulphate reduction has been inhibited completely in presence of nitrates in concentration above 0.5 g/ l. This limitation has been important at the biological treatment of mixed acid drainage waters with sewage/ industrial waters, which contain high concentration of nitrates.

REFERENCE

Gazea, A., Adam, K. & Kontopoulos, A. 1995. A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage,

- Paper presented at the Minerals Engineering '95 Conference, St. Ives, England (June 14-16).
- James J., Gusek, P.E., Dr Thomas R. Wildeman. 1995. New developments in passive treatment of acid rock drainage, Paper presented at Engineering Foundation Conference on Technological Solutions for Pollution Prevention in the Mining and Mineral Processing Industries, Palm Coast Florida, January 23.
- Ronalds S., Oremland and John Stolz. 2000. Dissimilatory reduction of selenate and Arsenate in nature, Environmental Microbe-Metal Interactions, Edited by Derek R. Lovley, ASM Press, Washington, D.C., 199-224.
- Newman, D.K., T.J. Beveridge and F.M. Morel. 1997. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*, Appl. Environ. Microbiol. 63: 2022-2028.
- Rajagopalan Ganesh, Kevin G. Robinson, Gregory D. Reed and Gary S. Saylor. 1997. Reduction of Hexavalent Uranium from Organic complexes by sulfate- and Iron-reducing Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, Nov. p. 4385-4391.
- Christina E. Barnes and J. Kirk Cochran. 1993. Uranium geochemistry in estuarine sediments: Control on removal and release processes, Geochimica et Cosmochimica Acta Vol.57, pp.555-569.
- Darryl H. Dvorak, Robert S. Hedin, Harry M. Edenborn, and Pamela E. McIntire, 1992. Treatment of Metal-contaminated water – using bacterial Sulfate reduction: results from pilot-scale reactors, Biotechnology and Bioengineering, Vol.40, pp 609-616.
- Derek R. Lovley and Elizabeth J.P. Phillips. 1992. Bioremediation of Uranium Contamination with Enzymatic Uranium Reduction, Environ. Sci. Technol., 26, 2228 – 2234.

*Recommended for publication by Department
of Engineering Geology, Faculty of Geology*