

MIKROBIÁLNA OXIDÁCIA SULFIDOV

MARTIN URÍK, PAVOL LITTERA
a PETRA MIKUŠOVÁ

Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Prírodovedná fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina 1, 842 15 Bratislava
urik@fns.uniba.sk, littera@fns.uniba.sk,
gardosova@fns.uniba.sk

Došlo 29.3.12, prepracované 14.5.12, prijaté 7.6.12.

Kľúčová slová: biooxidácia železa a síry, sulfidové minerály, mikroorganizmy

Obsah

1. Úvod
2. Tiosulfátový mechanizmus biooxidácie
3. Polysulfidový mechanizmus biooxidácie
4. Typy biooxidujúcich mikroorganizmov
5. Biooxidácia železa
6. Biooxidácia síry
7. Význam extracelulárnych polymérnych látok pri biooxidácii
8. Záver

1. Úvod

Už v 70. rokoch minulého storočia boli klasifikované dva základné mechanizmy oxidačných účinkov baktérií na minerály sulfidov – priamy a nepriamy. V súčasnosti sa však akceptuje názor, že baktérie nerozrušujú povrch sulfidových minerálov priamo, teda pôsobením svojho enzymatického aparátu. Pôvodný „priamy“ mechanizmus biooxidácie, ktorý predpokladal enzymatickú oxidáciu síry v sulfidoch minerálov na síran, nebol dodnes spoľahlivo potvrdený^{1,2}. Mierne upravená bola aj definícia „nepriameho“ mechanizmu biooxidácie. Nepriamy mechanizmus biooxidácie predpokladá účinok anorganických oxidačných činidiel na povrch minerálov, najmä však katiónov Fe(III). Význam baktérií v nepriamom mechanizme biooxidácie spočíva v recyklácii redukovaných foriem železa a v generovaní kyslých vodíkov (pozri ďalej). Dnes kategorizujeme nepriamy mechanizmus do dvoch podskupín – kontaktný a nekontaktný mechanizmus biooxidácie^{3–5}.

V prípade nekontaktného mechanizmu sú Fe(II) katióny oxidované planktonickými baktériami, teda baktéria-

mi, ktoré sa neviažu na povrchy tuhých substrátov. Regenerované katióny Fe(III) prichádzajú opäť do kontaktu s povrchom minerálu, kde sa redukujú a cyklus sa uzatvára¹. Kontaktný mechanizmus biooxidácie predpokladá, že baktérie sú viazané na povrch minerálu a prostredníctvom Fe(III) viazaného v ich extracelulárnych polymérnych produktoch oxidujú sulfidový minerál. Význam baktérií v tomto procese je v regenerácii katiónov Fe(III) a kyslých vodíkov a tiež prekoncentrácia týchto oxidačných a lúhovacích činidiel na rozhraní minerálu a roztoku. Z uvedeného je zrejmé, že baktérie sa zúčastňujú biooxidácie len nepriamo a z hľadiska mechanizmu je preto vhodné vnímať biooxidáciu skôr ako chemický dej než dej biologický.

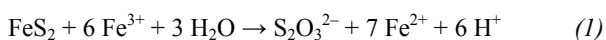
Vo všeobecnosti by sme mohli predpokladať, že „chemický“ mechanizmus biooxidácie bude vyplývať z kryštálovej štruktúry minerálu. Rozhoduje je však spôsob zániku väzby medzi sírou a kovom. Väčšina kovových sulfidov je polovodičom. V prípade pyritu, molybdenitu a tungstenitu sú valenčné pásma tvorené len orbitálnymi kovových atómov sulfidu, zatiaľ čo na stavbe valenčného pásma iných sulfidových minerálov sa podieľajú aj orbitály síry. Dôsledkom je, že valenčné pásma pyritu, molybdenitu a tungstenitu sa nezúčastňujú na tvorbe väzby medzi sírou a kovom v sulfide a takýto typ väzby môže byť preto rozrušený len účinkom oxidačných činidiel (tiosulfátový mechanizmus biooxidácie). V ostatných prípadoch môžu odoberať elektróny z valenčného pásma kyslé vodíky, ktoré týmto spôsobom rozrušujú väzbu medzi sírou a kovom (polysulfidový mechanizmus).

To znamená, že v prípade, že valenčné pásmo tvoria len orbitály kovu, je minerál voči účinku kyslých vodíkov odolný. Rozpustnosť minerálu v kyslých roztokoch sa so zvyšujúcim sa podielom orbitálov síry pri tvorbe valenčného pásma zvyšuje.

2. Tiosulfátový mechanizmus biooxidácie

V sulfidových mineráloch, ktoré sú v kyselinách nerozpustné (napr. FeS₂, MoS₂, a WS₂), zanikajú chemické väzby medzi sírou a kovom mechanizmom, ktorého dôsledkom je oxidácia síry na tiosíran^{6–8}. Preto sa tento mechanizmus biooxidácie sulfidových minerálov označuje aj ako „tiosulfátový“.

Reakcia prebieha postupným prenosom elektrónov z valenčného pásma kovu v sulfide na katióny Fe(III) (1; príklad je uvedený na pyrite). Akumulácia elektrónov železom (vznik Fe(II) v reakčnej oblasti) vyvoláva zmenu elektródového potenciálu, ktorý umožní oxidáciu síry. V takomto prostredí pravdepodobne dochádza k rozkladu vody za vzniku hydroxylových radikálov, ktoré sú natoľko silné oxidačné činidlá, že oxidujú síru.



V kyslých aj neutrálnych oblastiach pH sú primárnymi akceptormi elektrónov zo sulfidov katióny Fe(III), nikdy nie kyslík, ktorý však môže prijímať elektróny z nakumulovaných katiónov Fe(II).

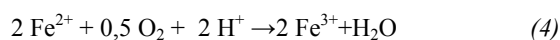
Tiosíran, ktorý vznikol v prvom kroku reakcie, je v kyslom prostredí nestály a oxiduje sa účinkom Fe(III) alebo pôsobením baktérií oxidujúcich síru cez viacero medziproduktov (napr. tetratiónt, polytiónt) až na síran (2). Síran je preto hlavným produktom (takmer 90 %) tiosulfátového reakčného mechanizmu biooxidácie.



V prostredí, v ktorom nie sú prítomné baktérie oxidujúce síru (napr. len v prítomnosti druhov oxidujúcich železo ako je *Leptospirillum ferrooxidans*) môžu vznikať aj relatívne veľké množstvá (10–20 %) elementárnej síry (3), ktorá však nikdy nie je dominantným produktom⁹. Elementárna forma síry môže tiež vzniknúť aj v prípade, že biooxidácia prebieha len chemickou oxidáciou Fe(III)¹⁰.



Katióny Fe(III) spotrebované v jednotlivých fázach reakcie sú regenerované účinkom baktérií oxidujúcich železo (napr. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*) (4). Keďže je kapacita prostredia pre abiotickú oxidáciu Fe(II) v kyslých podmienkach biooxidácie zanedbateľná¹³, aktivita mikrobiálnych druhov v regenerácii Fe(III) je rýchlosť určujúcim krokom tiosulfátového mechanizmu biooxidácie¹⁴.



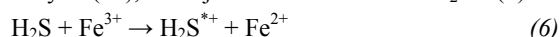
(v prítomnosti acidofilných druhov oxidujúcich železo)

3. Polysulfidový mechanizmus biooxidácie

V sulfidových mineráloch, ktoré sú rozpustné v kyslých roztokoch (napr. ZnS, PbS, FeAsS, CuFeS₂, MnS₂), zanikajú chemické väzby medzi kovom a sírou spolupôsobením kyslých vodíkov (H⁺) a oxidačných činidiel. Po naviazaní dvoch protónov na síru sulfidu vzniká najskôr sulfán (5). Baktérie oxidujúce síru sú schopné svojou aktivitou oxidovať vzniknutý sulfán z prvého kroku biooxidácie polysulfidovým mechanizmom (5) až na kyselinu sírovú (8) (cit.¹⁵). Výsledkom je regenerácia kyslých vodíkov v prostredí. Niektorí autori uvádzajú, že tento mechanizmus biooxidácie sulfidových minerálov nevyžaduje priamy účinok Fe(III) katiónov, alebo iných oxidačných činidiel, a preto ho zaraďujú ako tretiu kategóriu mechanizmov oxidácie, tzv. „hydrogénsulfidový“ mechanizmus.



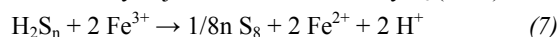
Ak sú v prostredí prítomné oxidačné činidlá, najmä však ióny Fe(III), oxiduje sa sulfán na radikál H₂S^{•+} (6).



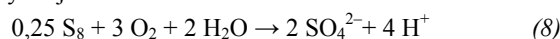
Vzniknutý radikál je silnou kyselinou, a preto reaguje s vodou. Molekula radikálu odštiepi vodíkový protón a následne dimerizuje na disulfidový anión HS₂⁻. Polyme-

rizáciou molekuly radikálovým mechanizmom vznikajú polysulfidy (H₂S_n). Vzhľadom na množstvo variabilných medziproduktov polysulfidového charakteru, označujeme tento mechanizmus biooxidácie ako „polysulfidový“¹⁶.

Ďalšou oxidáciou vznikajúcich polysulfidov katiónmi Fe(III) v kyslom prostredí dochádza k uvoľneniu elementárnej síry z polysulfidových cyklov (7). V prostredí, kde prebieha táto reakcia bez prítomnosti mikroorganizmov oxidujúcich síru (ktoré, ako sme už naznačili, oxidujú elementárnu síru na vyššie oxidačné stupne až síran) sa môže na elementárnu síru chemicky oxidovať až 90 % z celkového obsahu síry najmä vo forme molekuly S₈ (cit.¹⁶).



Oxidácia elementárnej síry prebieha výlučne účinkom baktérií oxidujúcich síru (8). Elementárna síra je totiž pri bežných tlakoch a teplotách voči účinku abiotickej oxidácie v kyslých až neutrálnych prostrediach inertná. Dôsledkom je, že sa v prípade zníženej aktivity alebo neprítomnosti baktérií oxidujúcich síru elementárna síra v prostredí akumuluje a môže ovplyvniť biooxidačný proces tvorbou inertnej vrstvy na povrchu minerálu (najmä pri nízkych redoxných potenciáloch v prostredí). Tým sa menia elektrochemické vlastnosti povrchu minerálu a tvorí sa difúzna bariéra pre prestup iónov a kyslíka. Ďalšie negatívum vyplývajúce z akumulácie síry je, že sa spätne neregenerujú kyslé vodíky. Oba tieto faktory negatívnym spôsobom ovplyvňujú biooxidáciu minerálov.



(v prítomnosti acidofylov oxidujúcich síru)

Keďže tento mechanizmus biooxidácie sulfidov využívajú na rozrušenie väzby kyslé vodíky, nie je tento reakčný mechanizmus priamo závislý na prítomnosti katiónov Fe(III) ako oxidačných činidiel. Akceptorom elektrónov z minerálu sulfidu môže byť aj molekulárny kyslík, ktorý sa bude redukovať cez superoxidový radikál a peroxid až na molekulu vody¹⁷. Katióny Fe(III) sú však v prenose elektrónov ďaleko efektívnejšie ako molekulárny kyslík¹⁸.

4. Typy biooxidujúcich mikroorganizmov

Na základe predchádzajúcej kapitoly môžeme usúdiť, že najdôležitejšie mikroorganizmy, ktoré sa zúčastňujú biooxidácie sulfidových minerálov, sú tie, ktoré recykľujú Fe(III) alebo produkujú kyselinu sírovú. Túto vlastnosť spĺňajú chemolitotrofné baktérie oxidujúce železo a síru a archaea. Keďže v dôsledku biooxidácie zlúčenín síry vzniká kyselina sírová, musia byť tieto druhy acidofilné organizmy. Nízke hodnoty pH (často nižšie ako 1,5) umožňujú týmto organizmom využívať rozpustné formy Fe (II) a Fe(III). Tieto mikroorganizmy majú spoločných aj niekoľko ďalších vlastností, vďaka ktorým kolonizujú kyslé prostredia.

Predovšetkým sú to autotrofné organizmy (len výnimočne obligátne heterotrofné), teda sú schopné viazať vzdušný CO₂ do organických zlúčenín. Preto im nie je

nutné poskytovať iný zdroj uhlíka, čo je významné najmä z aplikačného hľadiska v biohydrometalurgii. Vzduch je aj zdrojom terminálneho akceptora elektrónov – kyslíka. V anaeróbných prostrediach alebo prostrediach s obmedzeným prístupom kyslíka môžu využívať¹⁹ tieto organizmy ako terminálny akceptor elektrónov ióny Fe(III).

Tieto organizmy využívajú ako zdroj metabolickej energie rozdiely v potenciáli medzi redoxnou dvojicou elektrónového donora (Fe(II)/Fe(III) alebo S(0)/SO₄²⁻) a akceptorom elektrónov (napríklad O₂/H₂O)²¹.

Biooxidácia môže prebiehať v širokom rozsahu teplôt a samozrejme, zloženie mikrobiálneho spoločenstva mikroorganizmov oxidujúcich železo a síru je od tohto faktoru závislé. Väčšinu zo známych druhov acidofilných mikroorganizmov, ktoré sa podieľajú na biooxidácii sulfidových minerálov, môžeme na základe ich evolučných vzťahov a teplotného optima pre rast zaradiť do jednej z troch všeobecnejších skupín. Sú to (a) mezofilné proteobaktérie, (b) Gram-pozitívne mierne termofily a (c) termofilné archaea. Toto rozdelenie je z hľadiska priemyselnej aplikácie praktické, nie však celkom presné, keďže niektoré fylogeneticky koherentné skupiny majú určité mikrobiálne druhy aktívne v širokom rozsahu teplôt.

Väčšina v priemysle využívaných proteobaktérií (z komerčného hľadiska sú zaujímavé predovšetkým rody *Acidithiobacillus* a *Leptospirillum*) sú metabolicky najaktívnejšie pri teplotách nižších ako 45 °C.

Druh *Acidithiobacillus ferrooxidans* (pôvodne označovaný ako *Thiobacillus ferrooxidans*) je detailne preštudovaným acidofilným bakteriálnym druhom²² oxidujúcim železo a síru. Z bakteriálnych druhov patriacich do skupiny mikroorganizmov oxidujúcich minerály sulfidov bol izolovaný ako prvý²³ a je fyziologicky pomerne flexibilným druhom. Je schopný metabolizovať v aeróbných aj anaeróbných podmienkach a dokáže prijímať elektróny z elementárnej síry, mravčanu, Fe(II) a vodíka²⁴ a fixovať dusík²⁵.

Vďaka intenzívnemu výskumu genómu tejto proteobaktérie je *At. ferrooxidans* uvádzaný ako modelový organizmus pri štúdiu biooxidácie²⁶. Pôvodne bol tento druh považovaný za dominantný (v niektorých prípadoch za jediný) biologický činiteľ zodpovedný za biooxidáciu sulfidových minerálov, ktoré sú odolné voči účinku kyselín. V súčasnosti sa predpokladá, že viac prevalentnými druhmi sú iné baktérie (pravdepodobne *Leptospirillum* sp.) alebo archaea.

Pôvodný zástupca rodu *Leptospirillum*, na základe ktorého bola vytvorená táto skupina, bol izolovaný z mednej bane v Arménsku v roku 1972. Je to Gram-negatívna železo oxidujúca baktéria *Leptospirillum ferrooxidans*, ktorá je bežným druhom v kyslých banských vodách^{27,28}.

Jednou z prvých izolovaných mierne termofilných Gram-pozitívnych baktérií bol druh *Acidimicrobium ferrooxidans*. Uvedený druh je výhradne druhom oxidujúcim železo (zlúčeniny síry neoxiduje) a ako zdroj uhlíka dokáže využiť vzdušný CO₂, ale aj organické látky²⁷. *Am. ferrooxidans* je pomerne rozšíreným druhom v kyslých oblastiach s geotermálnou aktivitou a v substrátoch so sulfidmi minerálov.

Jedna z prvých acidofilných archaea oxidujúcich síru bola izolovaná z termálneho prameňa v Yellowstonskom národnom parku (USA)²⁹. Tento druh bol neskôr identifikovaný ako *Acidianus brierleyi*. Názov rodu *Acidianus* je odvodený z mena starorímskeho boha s dvoma tvármi Ianus. Toto meno má alegorický význam, keďže druhy v tomto rode sú schopné využiť síru ako donor elektrónov v aeróbných podmienkach, ale aj ako akceptor v podmienkach anaeróbných.

Ďalšími významnými rodmi, ktoré patria do skupiny termofilných archaea sú *Metallosphaera* a *Sulfolobus*, ktoré majú veľký potenciál pri vysokoteplotnej biooxidácii minerálov³⁰. Zmes uvedených archaea bola využitá pri príprave prvého komerčného postupu vysokoteplotnej biooxidácie koncentrátov chalkopyritu (BioCopTM; BHP Billiton, USA), z ktorého výťažok medi dosahoval až 98 %.

5. Biooxidácia železa

Reťazec metabolických oxidačno-redukčných dráh, ktoré súvisia s biooxidáciou sulfidových minerálov, je najpodrobnejšie preskúmaný pri mierne termofilnej proteobaktérii *At. ferrooxidans*, najmä z dôvodu jej širokého komerčného uplatnenia v priemyselnej biooxidácii minerálov. V prípade tejto a iných Gram-negatívnych baktérií ide v princípe o prenos elektrónov z donora elektrónov (Fe(II) alebo redukované formy síry) z vonkajšej membrány cez periplazmatický priestor na cytochróm oxidázu, ktorá je viazaná na vnútornej cytoplazmatickej membráne³¹. Cytochróm oxidáza je terminálnym akceptorom elektrónov v rámci elektrón transportného reťazca, ktorá katalyzuje redukciu molekulárneho kyslíka a využíva týmto procesom získanú voľnú energiu na vytvorenie protónového gradientu medzi vnútorným prostredím bunky a periplazmatickým prostredím. Prenos vodíkových kationov na vyrovnanie tohto gradientu slúži na tvorbu energie využiteľnej v metabolizme bunky (syntéza ATP)³².

Napriek intenzívnemu výskumu nebol dosiaľ jednoznačne identifikovaný celý mechanizmus prenosu elektrónov z Fe(II) na cytochróm oxidázu. Jednoznačné je len to, že sa na ňom podieľa niekoľko typov cytochrómov *c* a rusticyanín (ktorý pravdepodobne súvisí aj s viazaním bunky proteobaktérie na povrch sulfidu), ktoré sú lokalizované v periplazmatickom priestore. Tiež je naďalej otázkou primárny akceptor elektrónov z Fe(II). Je však pravdepodobné, že ním bude vysokomolekulový cytochróm *c* lokalizovaný na vonkajšej membráne, ktorý je kódovaný génom *cyc2* (cit.³³). Uvedený cytochróm *Cyc2* pravdepodobne prenáša elektróny z Fe(II) na rusticyanín, z ktorého potom prechádzajú elektróny na priplazmatický cytochróm typu *c* (cit.³⁴). Cytochróm *c4* prenáša elektróny na terminálnu cytochróm *c* oxidázu typu *aa₃* alebo *ba₃* (cit.³⁵). Katalyzovaná redukcia kyslíka na cytochróm oxidáze pravdepodobne prebieha na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány (ako je pozorované v mitochondriách alebo niektorých neutrofilných druhoch baktérií), alebo

v periplazmatickom priestore (predpoklad na základe pH optima oxidázy, ktoré je približne 3,5).

Doteraz sme sa venovali vysvetleniu elektrón transportnej dráhy exergonického charakteru, teda deja, pri ktorom vzniká voľná energia (a ATP). Obligátne chemolitotrofné baktérie však vyžadujú aj taký mechanizmus elektrónového transportu, ktorého výsledkom bude redukcia univerzálneho donora elektrónov v bakteriálnom metabolizme. Ten sa využíva napríklad na fixáciu CO_2 v Calvinovom cykle. Ide o endergonickú syntézu redukovanej formy nikotinamid adeninukleotidu³⁶ (NAD(P)H).

Rovnako ako v predchádzajúcom elektrón transportnom reťazci je primárnym akceptorom elektrónov z Fe(II) cytochróm Cyc2, ktorý prenáša elektróny na rustycianín a ďalej na cytochróm c_4 (cit.³¹). Uvedený cytochróm c_4 (CycA1) je však kódovaný odlišným operónom (*petI*) ako v prípade transportnej dráhy exergonického typu. Operón *petI* tiež kóduje komplex *bc₁I*, ktorý je akceptorom elektrónov z cytochrómu c_4 . Tie ďalej prechádzajú lipofilným prenášačom ubichinónom na NAD(P)H dehydrogenázu³⁷. Tá napokon katalyzuje redukcia NAD(P).

U iných druhov však môže byť elektrónový transportný reťazec výrazne odlišný. Napríklad v prípade *Ferroplasma* spp. naznačujú experimentálne výsledky, že neexistuje endergonická dráha z Fe(II) na NAD(P)H:ubichinón oxidoreduktázový komplex. Táto dráha nie je pravdepodobne nutná, keďže tieto druhy dokážu získať elektróny oxidáciou organických zlúčenín a priamo ich poskytnúť už spomínanému komplexu s oxidoredukčnou aktivitou. *Ferroplasma* spp. tiež neobsahujú cytochróm Cyc2, ktorého funkciu nahrádza modrý proteín sulfocyanín. Keďže ide o archaea, neexistuje periplazmatický priestor a vonkajšia membrána typická pre Gram-negatívne baktérie. Preto sulfocyanín prenáša elektróny na terminálnu oxidázu priamo. Komplex *bc₁* pri oxidácii elementárnej síry je nahradený za *b/FeS* komplex³⁸.

Ďalšie priemyselne významné termofilné baktérie *Leptospirillum* spp. majú aj exergonickú aj enedergonickú elektrón transportnú dráhu. Uvedené druhy však nesyntetizujú rustycianín, ktorý v prípade *At. ferrooxidans* tvorí až 5 % zo všetkých enzýmov a ani sulfocyanín, ktorý je typický pre *Ferroplasma*. Funkciu primárneho akceptora elektrónov z Fe(II) má červený cytochróm³⁹. Endergonická dráha prechádza cez komplex podobný *At. ferrooxidans* (*bc₁*), v ktorom absentuje cytochróm c_1 . Dráha na chinón a NAD(P)H:ubichinón oxidoreduktázu je ďalej zhodná s *At. ferrooxidans*³⁹.

6. Biooxidácia síry

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

ných stupňov síry a jej foriem. Navyše je síru oxidujúci mechanizmus *At. ferrooxidans* výrazne odlišný od spôsobu oxidácie inými bakteriálnymi druhmi alebo archae⁴⁰. Identifikácia týchto dráh je aj naďalej vedeckou výzvou.

Vo všeobecnosti sú základnými komponentmi uvedenej elektrón transportnej dráhy oxidácie elementárnej síry tiol-viažuci proteín vonkajšej membrány, ktorý umožňuje transport elementárnej síry do periplazmatického priestoru; persulfid dioxigenáza, ktorá oxiduje persulfid na siričitan; siričitan oxidoreduktáza, ktorá oxiduje siričitan na síran; sulfid:chinón oxidoreduktáza, ktorá oxiduje sulfid na elementárnu síru; tiosíran oxidáza, ktorá katalyzuje transformáciu tiosíranu na tetratióanát; rhodenáza, ktorá rozkladá tiosíran na elementárnu síru a siričitan; a napokon tertatióanát hydroláza, ktorá hydrolyzuje tetratióanát na síran, tiosíran a elementárnu síru^{11,20,41}. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že elementárna síra vstupuje do periplazmatického priestoru ako persulfidová síra, kde je oxidovaná oxygénázou na siričitan, a ďalej oxidoreduktázou na síran⁵.

Elektróny získané z týchto procesov prechádzajú komplexom *bc₁* až na terminálnu oxidázu alebo na cytochróm c . V prípade, že je dominujúcim zdrojom elektrónov elementárna síra, sú hlavnými oxidázami ubichinón oxidázy typu *bd₃* alebo *bo₃* (cit.⁴³). Spomínaný komplex *bc₁* je však odlišný od komplexu, ktorý súvisí s endergonickou dráhou elektrónov v metabolizme železa⁴⁴. V metabolizme síry *At. ferrooxidans* je *bc₁* komplex kódovaný *petIII* operónom a prenáša elektróny v exergonickú metabolickú dráhu na cytochróm c_4 a ďalej na terminálnu oxidázu. Celkový metabolizmus biooxidácie síry má však aj naďalej veľké množstvo nejasností⁴³.

Oxidácia síry môže prebiehať aj v anaeróbnom prostredí, kde je druh *At. ferrooxidans* schopný katalyzovať redukciu Fe(III) za súčasnej oxidácie elementárnej síry⁴⁵. Mechanizmus tejto oxidácie je výrazne odlišný od oxidácie elementárnej síry v aeróbných podmienkach. Najskôr je elementárna síra redukovaná glutatiónom na hydrogén sulfid, ktorý sa následne účinkom periplazmatickej hydrogénsulfid:Fe(III) oxidoreduktázy oxiduje na siričitan. Napokon je na membráne viazanou siričitan:Fe(III) oxidoreduktázou oxidovaný až na síran^{46,47}.

7. Význam extracelulárnych polymérnych látok pri biooxidácii

Vzhľadom na to, že väčšina bakteriálnych druhov rastie na povrchoch minerálov vo forme biofilmov (spoločenstvo mikroorganizmov uzavreté vo vrstve polymérnej matrix), sú vlastnosti tejto komplexnej štruktúry, tvorenej predovšetkým z extracelulárnych polymérnych látok (EPL), významným faktorom ovplyvňujúcim priebeh biooxidácie.

V prípade, že zabezpečíme pri procese biooxidácie dostatočne veľký povrch (napríklad jemnú zrnitosť minerálov), v rámci niekoľkých hodín sa bude viazať na povrch minerálov viac než 80 % mikroorganizmov z pôvodného inokula mikroorganizmov⁴⁸. Ostatné bakteriálne bunky

zostanú vo forme voľného planktónu.

Väzba mikroorganizmu na povrch minerálu je sprostredkovaná vrstvou EPL, ktorej produkcia je spätne stimulovaná prítomnosťou vhodného substrátu na viazanie⁴⁹. Vrstva EPL je heterogénnym systémom s vysokým obsahom sacharidov (napríklad glukózy, ramnózy, xylózy, manózy, fukózy) nasýtených masných kyselín, kyseliny glukurónovej a kationov Fe(III)¹². Komplex Fe(III) a dvoch molekúl kyseliny glukurónovej umožňuje vznik siete kladného náboja, ktorá zabezpečuje afinitu k záporne nabitému substrátu sulfidových minerálov^{50,51}. Hydrofóbne interakcie s povrchom nemajú v prvej fáze viazania baktérie na minerál sulfidu výraznejšie opodstatnenie⁵². Tieto sily sa stávajú významnými až po priblížení vonkajšej bakteriálnej membrány ku minerálnemu povrchu na vzdialenosť do 20 nm (cit.⁵³).

Vlastnosti a chemické zloženie EPS majú preto na bakteriálne viazanie významný vplyv. Zloženie EPS je druhovo špecifické a ani v rámci jedného druhu nie je stále a môže sa meniť v závislosti od typu substrátu alebo dostupných živín. Napríklad v prípade, že baktérie rastú v prostredí s rozpustnými substrátmi (napríklad FeSO₄), k tvorbe EPL nedochádza. V prítomnosti elementárnej síry dochádza k vysokej produkcii EPL bez obsahu Fe(III), v ktorej je navyše znížený obsah sacharidov a kyseliny glukurónovej⁴⁸. To je aj príčina, prečo tieto druhy nemajú afinitu k povrchom sulfidových minerálov. Naopak v EPL dominujú masné kyseliny, ktoré podporujú význam hydrofóbnych interakcií medzi mikrobiálnym povrchom a povrchom síry.

Keďže EPL vyplňa priestor medzi vonkajšou membránou a povrchovou vrstvou minerálu (vzdialenosť 10 až 100 nm), tvorí zároveň aj reakčné miesto, v ktorom dochádza k biooxidačným procesom⁵⁴. Pre iniciáciu týchto procesov je nevyhnutný určitý obsah Fe(III) viazaného v komplexe s organickými látkami v EPL. Ak totiž vezme do úvahy, že elektróny sú schopné prekonať vzdialenosť medzi reakčnými centrami maximálne 2 nm (cit.⁴²), musí byť prenos elektrónu z povrchu minerálu až k membráne premostený dráhou oxidačno-redukčných dejov. Dôsledkom redukcie komplexov s kationom Fe(III) v EPL je vznik redukovaných kationov železa v komplexe, ktorý je nestabilný a vďaka tomu môžu voľné ióny Fe(II) difundovať k vonkajšej membráne, kde je lokalizovaný enzymatický aparát bunky a Fe(II) sa reoxiduje. Organický zvyšok komplexu zachytáva ďalší Fe(III).

8. Záver

Biooxidácia sulfidových minerálov je komplexným chemickým dejom, v ktorom mikroorganizmy (baktérie a archaea) zohrávajú významnú úlohu, i keď nie priamo, ale prostredníctvom produktov svojho metabolizmu. Dôsledkom ich aktivity je postupné uvoľňovanie zložiek minerálov sulfidov do prostredia, čo má pre tento prirodzený proces významný environmentálny, ale aj komerčný dosah.

LITERATÚRA

1. Sand W., Gehrke T., Hallmann R., Schippers A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 961 (1995).
2. Ehrlich H. L.: *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York 2002.
3. Tributsch H.: *Hydrometallurgy* **59**, 177 (2001).
4. Rawlings D. E.: *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 65 (2002).
5. Rohwerder T., Sand W.: *Microbiology* **149**, 1699 (2003).
6. Luther G. W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* **51**, 3193 (1987).
7. Moses C. O., Nordstrom D. K., Herman J. S., Mills, A. L.: *Geochim. Cosmochim. Acta* **51**, 1561 (1987).
8. Schippers A., Jozsa P.-G., Sand W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3424 (1996).
9. Rohwerder T., Schippers A., Sand W.: *Thermochim. Acta* **309**, 79 (1998).
10. Schippers A., Rohwerder T., Sand W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 104 (1999).
11. Silver M., Lundgren D. G.: *Can. J. Biochem.* **46**, 1215 (1968).
12. Gehrke T., Hallmann R., Kinzler K., Sand W.: *Water Sci. Technol.* **43**, 159 (2001).
13. Singer P. C., Stumm W.: *Science* **167**, 1121 (1970).
14. Hansford G. S., v knize: *Bio-mining* (Rawlings D. E., ed.), kap. 8. Springer, Berlin 1997.
15. Sand W., Gehrke T., Jozsa P.-G., Schippers A.: *Hydrometallurgy* **59**, 159 (2001).
16. Schippers A., Sand W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 319 (1999).
17. Tributsch H., Gerischer H.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **26**, 747 (1976).
18. Tributsch H., Bennett J. C.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **31**, 565 (1981).
19. Hatzikioseyan A., Tsezos M.: *Hydrometallurgy* **83**, 29 (2005).
20. Tabita R., Silver M., Lundgren D. G.: *Can. J. Biochem.* **47**, 1141 (1969).
21. Valenzuela L., Chi A., Beard S., Orell A., Guiliani N., Shabanowitz J., Hunt D. F., Jerez C. A.: *Biotechnol. Adv.* **24**, 197 (2006).
22. Rawlings D. E.: *Microb. Cell Fact.* **4**, 13 (2005).
23. Colmer A. R., Hinkle M. E.: *Science* **106**, 253 (1947).
24. Brock T. D., Gustafson J.: *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 567 (1976).
25. Norris P. R., Murrell J. C., Hinson D.: *Arch. Microbiol.* **164**, 294 (1995).
26. Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 239 (2003).
27. Clark D. A., Norris P. R.: *Microbiology* **142**, 785 (1996).
28. Schrenk M. O., Edwards K. J., Goodman R. M., Hammers R. J., Banfield J. F.: *Science* **279**, 1519 (1998).
29. Brierley C. L., Brierley J. A.: *Can. J. Microbiol.* **19**, 183 (1986).
30. Gericke M., Pinches A.: *Miner. Eng.* **12**, 893 (1999).
31. Giudici-Ortoni M.T., Leroy G., Nitschke W., Brus-

- chi M.: *Biochemistry* 39, 7205 (2000).
32. Bird L. J., Bonnefoy V., Newman D. K.: *Trends Microbiol.* 19, 330 (2011).
 33. Yarzabal A., Brasseur G., Ratouchniak J., Lund K., Lemesle-Meunier D., DeMoss J. A., Bonnefoy V.: *J. Bacteriol.* 184, 313 (2002).
 34. Cobley J. G., Haddock B. A.: *FEBS Lett.* 60, 29 (1975).
 35. Appia-Ayme C., Guiliani N., Ratouchniak J., Bonnefoy V.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 64781 (1999).
 36. Holmes D. S., Bonnefoy V., v knize: *Biomining* (Rawlings D. E., Johnson D. B., ed.), kap. 14. Springer-Verlag, Berlin 2007.
 37. Griesbeck C., Hauska G., Schütz M., v knize: *Recent Research Developments in Microbiology* (Pandalai S. G., ed.), sv. IV, kap. 15. Research Signpost, Trivandrum 2000.
 38. Dompson M., Baker-Austin C., Bond P. L.: *Microbiology* 151, 4127 (2005).
 39. Tyson G. W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E. E., Ram R. J., Richardson P. M., Solovyev V. V., Rubin E. M., Rokhsar D. S., Banfield J. F.: *Nature* 284, 37 (2004).
 40. Friedrich C. G., Bardischewsky F., Rother D., Quentmeier A., Fischer J.: *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 253 (2005).
 41. De Jong G. A. H., Hazeu W., Bos P., Kuenen J. G.: *Eur. J. Biochem.* 243, 678 (1997).
 42. Medvedev D., Stuchebrukhov A. A.: *J. Theor. Biol.* 210, 237 (2001).
 43. Brasseur G., Levican G., Bonnefoy V., Holmes D., Jedlicki E., Lemesle-Meunier D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1656, 114 (2004).
 44. Brasseur G., Bruscella P., Bonnefoy V., Lemesle-Meunier D.: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1555, 37 (2002).
 45. Pronk J. T., Johnson D. B.: *Geomicrobiol. J.* 10, 153 (1993).
 46. Sugio T., Hirose T., Ye L. Z., Tano T.: *J. Bacteriol.* 174, 4189 (1992).
 47. Sugio T., Katagiri T., Moriyama M., Zhèn Y. L., Inagaki K., Tano T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 153 (1988).
 48. Gehrke T.: *Dissertation*. University of Hamburg, Hamburg 1998.
 49. Vandevivere P., Kirchman D. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3280 (1993).
 50. Solari J. A., Huerta G., Escobar B., Vargas T., Badilla-Ohlbaum R., Rubio J.: *Colloids Surf.* 69, 159 (1992).
 51. Blake R. C., Shute E. A., Howard G. T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3349 (1994).
 52. Sampson M. I., Phillips C. V., Blake R. C.: *Miner. Eng.* 13, 373 (2000).
 53. Sand W., Gehrke T.: *Res. Microbiol.* 157, 49 (2006).
 54. Rodriguez-Leiva M., Tributsch H.: *Arch. Microbiol.* 149, 401 (1988).

M. Urík, P. Littera, and P. Mikušová (*Institute of Laboratory Research on Geomaterials, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava*): **Microbial Oxidation of Sulfides**

This paper reviews the current state of biooxidation of metal sulfide minerals. The review summarizes microbiological and chemical basics regarding this process, where special attention has been paid to biochemical processes resulting in biooxidation of sulfide and ferrous ions. Basically, there are two main methods of microbial metal sulfide oxidation, thiosulfate and polysulfide pathways. Despite the bacterial participation in mineral oxidation, both pathways are considered to be indirect chemical processes. The function of micro-organisms is primary in regeneration of oxidizing agents or generating H^+ ions. The biochemical pathways of these processes are not yet clearly identified but relevant findings based on biochemical studies of the model organisms *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* have been made. This review also considers the role of extracellular polymeric substances in biooxidation of metal sulfides.