

BIOSORPCIA, BIOAKUMULÁCIA A BIOVOLATILIZÁCIA POTENCIÁLNE TOXICKÝCH PRVKOV MIKROORGANIZMAMI

KATARÍNA BORIOVÁ, MARTIN URÍK
a PETER MATÚŠ

Ústav laboratórneho výskumu geomateriálov, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina 1, 842 15 Bratislava
boriova@fns.uniba.sk

Došlo 28.6.13, prepracované 29.1.14, prijaté 13.2.14.

Kľúčové slová: biosorpcia, bioakumulácia, biovolatilizácia, mikroorganizmy

Obsah

1. Úvod
2. Biosorpcia – teória a aplikácie v bioremediácii
 - 2.1. Hodnotenie sorpčných vlastností biomasy
 - 2.2. Forma a úprava mikrobiálnej biomasy aplikovanej v biosorpcii
3. Bioakumulácia potenciálne toxických prvkov mikroorganizmami
4. Biovolatilizácia potenciálne toxických prvkov
5. Záver

1. Úvod

Potenciálne toxické prvky patria aj napriek ich rizikám medzi často používané látky v priemysle a poľnohospodárstve, avšak aj v potravinárstve a liečivách. Antropogénna kontaminácia prostredia tak významne zvyšuje nebezpečenstvo pre ich prestup do organizmov. Jedným z najdôležitejších faktorov určujúcich riziko potenciálne škodlivých prvkov vyskytujúcich sa v prostredí je ich bio-prístupnosť v kontexte so zmenou ich mobility. To, či sa toxický kov nachádzajúci sa v pôde aj v nízkych koncentráciách dostane do kolobehu látok alebo zostane fixovaný a imobilizovaný v pôdnej matrici, ovplyvňuje mnoho faktorov, vrátane aktivity mikroorganizmov. Široké spektrum mikroorganizmov, ktoré sa vyskytujú v pôdach a vodách, má na geochemické cykly prvkov dôležitý vplyv. Pôsobenie mikroorganizmov môže viesť k adsorpcii či precipitácii potenciálne toxických prvkov mechanizmami biosorpcie a bioakumulácie, ale zároveň aj k zvyšovaniu ich rozpustnosti alebo tvorbe prchavých zlúčenín dejmi ako biolúhovanie a biovolatilizácia.

2. Biosorpcia – teória a aplikácie v bioremediácii

Biosorpcia je schopnosť biomasy viazať, koncentrovať a imobilizovať prvky z vodných roztokov na bunkový povrch. Biosorpcia sa realizuje prostredníctvom chemisorpcie (napr. tvorba organokovových komplexov s funkčnými skupinami biomasy) a fyzikálnej adsorpcie (napr. van der Waalsove sily, elektrostatické interakcie). Viazania polokovov a kovov na bunkových povrchoch sa však väčšinou zúčastňujú rôznou mierou oba deje¹. Dominantným mechanizmom podieľajúcim sa na viazaní katiónov kovov na povrch biomasy je iónová výmena a dôležité väzbové miesta na mikrobiálnych povrchoch sú najmä karboxylové alebo fosfátové skupiny. V prípade aniónov kovov a polokovov dominuje viazanie na amidové skupiny a amin². Osobitným prípadom biosorpcie je dej, pri ktorom v blízkosti alebo v rámci špecifického prostredia bunkových stien, alebo na bunkových povrchoch biomasy dochádza k tvorbe málo rozpustnej zlúčeniny kovov a polokovov, ktorá je imobilizovaná v biomase – bioprecipitácia³.

Pri biosorpcii existuje možnosť účinnej desorpcie kovu z povrchu biomasy. Desorpciou je možné skúmaný kov prekoncentrovať do menšieho objemu, čo umožňuje jeho ľahšie spätné získanie v elementárnej forme alebo skládkovanie. Pri komerčnom využití biosorpcie je desorpcia sorbátu a následná regenerácia sorbentu dôležitým a ekonomicky výhodným krokom. Desorpcia môže byť termická alebo vytesňovacia. V druhom prípade sa biomasa premýva vhodne zvoleným eluentom podľa typu sorbátu⁴.

2.1. Hodnotenie sorpčných vlastností biomasy

Sorpčné vlastnosti biomasy rôzneho pôvodu môžeme porovnať pomocou rovnovážnej sorpčnej kapacity sorbentu (S_{eq}), ktorá vyjadruje množstvo sorbátu, ktoré sa po dosiahnutí rovnováhy naviaže na jednotku hmotnosti sorbentu. Ak by sme chceli porovnať efektivitu dvoch sorbentov len na základe jednej hodnoty S_{eq} , táto by musela byť u oboch sorbentov stanovená pri rovnakej rovnovážnej koncentrácii sorbátu v roztoku (C_{eq}), ktorej dosiahnutie je v praxi náročné. Preto častejšie využívame na porovnanie sorpčných vlastností sorbentov konštanty rovnovážnych modelov izoteriem⁴. Sú to matematické vzťahy, empirické modely, ktoré vyjadrujú vzťah medzi S_{eq} a C_{eq} . Tieto modely sú všeobecne charakterizované obmedzeným počtom nastaviteľných parametrov. Pomocou konštánt z izoteriem je teda možné charakterizovať a porovnávať sorpčnú kapacitu sorbentov v potrebnom rozsahu hodnôt C_{eq} . Existuje pomerne veľa typov izoteriem, najčastejšie používanými sú Langmuirova a Freundlichova izoterma, ktoré sú však vhodné len pre jednoduché jednoprvkové modely. Kým Langmuirova izoterma počítá iba so stálym počtom väzbo-

vých miest s rovnocennou energiou, kde jedna častica sorbátu reaguje len s jedným väzbovým miestom a zároveň nedochádza k interferenciám medzi viazanými časticami navzájom, Freundlichova izoterma zohľadňuje heterogénny povrch sorbentu, s rôznym počtom väzbových miest s rôznou väzbovou energiou⁵. Najznámejším modelom zohľadňujúci viacvrstvovú adsorpciu je Brunauer-Emmett-Tellerov model využívajúci Langmuirovu rovnicu pre každú vrstvu sorbátu⁵.

Ďalším parametrom charakterizujúcim biosorbent je čas nevyhnutný na dosiahnutie sorpčnej rovnováhy. Sorpcie kovov a polokovov na mikrobiálnu biomasu sú pomerne rýchle, rovnováha je počas experimentov dosiahnutá niekedy už po niekoľkých minútach⁶. Kinetiku biosorpcie možno vyjadriť niekoľkými modelmi. Model pseudo-prvého poriadku (Lagergrenov model) vyjadruje, že rýchlosť viazania sorbátu je priamo úmerná množstvu neobsadených väzbových miest na povrchu sorbentu. Model pseudo-prvého poriadku bol použitý pri viacerých štúdiách reakčnej kinetiky biosorpcie⁷, vo všeobecnosti je vhodnejší pre koncentrované roztoky a veľmi rýchle sorpčné deje. Model pseudo-druhého poriadku predpokladá, že rýchlosť viazania je priamo úmerná druhej mocnine zostávajúcich väzbových miest na biomase.

2.2. Forma a úprava mikrobiálnej biomasy aplikovanej v biosorpcii

Mikrobiálna biomasa môže byť získaná z rôznych zdrojov. Odpadová biomasa z rôznych výrobných odvetví (farmaceutický alebo potravinársky priemysel) je lacným zdrojom, avšak jej aplikácii musí predchádzať jej čistenie, resp. jej úprava. Keďže biosorpcia je proces spojený s interakciami bunkového povrchu biomasy, jej rôzne modifikácie môžu výrazne zmeniť efektívnosť viazania potenciálne toxických prvkov. Je mnoho metód využívaných na modifikáciu mikrobiálnych bunkových stien za účelom zvýšenia sorpčnej kapacity biomasy. Modifikácie môžu byť realizované priamo počas rastu biomasy, alebo na vypestovanej biomase. Podmienky, v ktorých biomasa rastie, významne ovplyvňujú fenotyp bunkového povrchu. Napríklad zmenou podmienok dostupnosti živín (C, N, P, S, Mg a K) počas kultivácie *Saccharomyces cerevisiae* sa mení sorpčná kapacita biomasy⁸. Efektívna môže byť aj úprava vlastností biomasy prostredníctvom génového inžinierstva⁹.

Získaná odpadová biomasa, alebo vykultivovaná biomasa môže prejsť celou sériou fyzikálnych a chemických úprav, s cieľom prispôsobiť väzbové vlastnosti povrchov konkrétnym požiadavkám. Fyzikálne či mechanické spôsoby úpravy (zahrievanie, varenie, mrazenie, sušenie či lyofilizácia) sú zvyčajne jednoduché a ekonomicky nenáročné, avšak vo všeobecnosti menej efektívne ako chemické modifikácie biomasy¹⁰. Chemické úpravy biomasy zahŕňajú pranie biomasy v rôznych detergentoch alebo predúpravu s kyselinou alebo silnou zásadou. Predúpravou rôznymi chemickými látkami sa modifikujú vlastnosti povrchu odstránením alebo maskovaním väzbových skupín, alebo

naopak ich vytvorením¹¹. Schopnosť regenerácie biomasy a desorpcie toxikantu je tiež dôležitým parametrom pri zavádzaní biosorpcie do praxe¹⁰.

Biomasa, používaná na komerčné účely, môže byť imobilizovaná alebo voľná. Správny výber biomasy použitej ako biosorbent je kľúčovým krokom. Komerčné využitie biomasy na procesy biosorpcie si vyžaduje aj jej jednoduché používanie a vhodné mechanické vlastnosti. Pre tieto účely je zavádzaný do praxe proces imobilizácie/fixácie biomasy. Imobilizácia biomasy ponúka mnoho výhod, vrátane lepšej opätovnej využiteľnosti, minimalizuje riziko upchávania prietokového systému pri kolónových experimentoch, či zvyšuje odolnosť biomasy voči chemickej či mikrobiálnej degradácii¹¹. Imobilizácia biomasy v tuhých štruktúrach vytvára materiál správnej veľkosti, ktorý má dostatočnú mechanickú pevnosť, tuhosť a pórovitosť nutnú pre použitie v rôznych typoch reaktorov. Na imobilizáciu biomasy sú využívané rôzne techniky, založené na adsorpcii na inertný nosič, imobilizácii v polymérnej matici alebo cross-linking tzv. zosieťovanie¹².

Na biosorpciu s voľnou biomasou sa využívajú najmä rôzne rastlinné materiály, ale aj biomasa mikroskopických vláknitých húb, ktoré tvoria kompaktné mycéliá¹². Voľná mikrobiálna biomasa môže byť v rôznych formách. Kultiváciou za stáleho trepania získame biomasu vo forme peliet. Tie sa následne dajú ďalej povrchovo upravovať a využívať na sorpciu. Biomasa, získaná či už kultiváciou, alebo z komerčnej produkcie, môže byť aj sušená a granulovaná, vzniknutý granulát môže byť taktiež ďalej upravovaný⁶.

3. Bioakumulácia potenciálne toxických prvkov mikroorganizmami

Mikroorganizmy viažu a uskladňujú ióny alebo elektroneutrálne anorganické a organické formy potenciálne toxických prvkov nielen na bunkových povrchoch, ale aj vo vnútri bunky. Ako sme uviedli, viazanie látok z prostredia na bunkový povrch je na metabolizme nezávislý proces, ktorý prebieha mechanizmami charakteristickými pre biosorpciu. Prestup látok do vnútrobunkového prostredia však vyžaduje aktívny alebo pasívny transport skrz selektívne priepustnú cytoplazmatickú membránu s využitím rôznych typov prenášačov alebo kanálov. Keďže biologická membrána má hydrofóbne vlastnosti, pasívnou difúziou prestupujú len nepolárne alebo neutrálne molekuly. Väčšina environmentálne relevantných kovov a polokovov prestupuje do cytosolu pomocou špecifických bielkovinových prenášačov¹³. Veľkou skupinou proteínov sprostredkujúcich príjem a homeostázu kovov v bunkách aktívnym transportom sú ATPázy P-typu podrodiny 1_B, ktoré boli identifikované v prokaryotických aj eukaryotických bunkách a umožňujú prechod napr. jednomocných (Cu(I), Ag(I)) aj dvojmocných (Zn(II), Cd(II), Pb(II)) ťažkých kovov^{14,15}.

Bioakumulácia však nerozlišuje medzi „(ad)sorbovanou“ a „transportovanou“ koncentráciou prvkov

v biomase organizmu, čo je zdrojom rôznych problémov s definovaním obsahu tohto pojmu. Biosorpciu preto niektorí autori považujú za čiastkový proces bioakumulácie prvkov metabolicky aktívnou biomasou. Po naviazaní prvku však nemusí nevyhnutne nasledovať fáza transportu do cytosolu, resp. (bio)transformácie⁶. Táto hranica je dôsledkom snahy aplikovaného výskumu poukázať na výhody, resp. nevýhody využitia aktívnych mikroorganizmov alebo mŕtvej biomasy pri odstraňovaní potenciálne toxických prvkov z prostredia, najmä v súvislosti s mechanickými vlastnosťami biomasy, aplikáciou genetického inžinierstva pri zvýšení efektivity akumulácie, nákladov spojených so zabezpečením optimálnej aktivity mikroorganizmov (prísun živín, teplota) a ich citlivosťou/rezistenciou na toxikanty v prostredí¹⁶. Viazanie kovov mechanizmom bioakumulácie je zároveň ireverzibilným dejom, keďže podiel kovu a polokovu viazaného v bunkových kompartmentoch na rôzne makromolekuly nie je možné eluovať bez deštrukcie bunkových povrchov a narušenia plazmatickej membrány, čo vedie k smrti mikrobiálneho organizmu.

Viazanie potenciálne toxických prvkov na makromolekuly vo vnútri bunky je efektívnym detoxikačným mechanizmom, napr. tvorbou stabilných chelátov s aminokyselinami (napr. prolín, cysteín, histidín), ktoré môžu byť súčasťou iných molekúl s vysokou afinitou ku kovu a polokovu ako glutatión¹⁷, tiež s alkoholmi, polysacharidmi alebo organickými kyselinami (citrát, malát, oxalát)¹⁸.

4. Biovolatilizácia potenciálne toxických prvkov

Niektoré prvky, ako arzén, antimón, bizmut, selén, telúr, olovo, cín, ortuť a iné, môžu byť premenené metyláciou, alkyláciou alebo hydrogenáciou na prchavé deriváty¹⁹. Tento proces premeny látok na ich prchavé formy prostredníctvom metabolizmu organizmov, ktorý môžeme v určitých prípadoch považovať za detoxikačný mechanizmus, označujeme ako biovolatilizácia²⁰. Avšak v niektorých prípadoch vznikajú v procese transformácie zlúčeniny, ktoré sú toxickéjšie ako ich anorganické prekurzory²¹. V prostredí vznikajúce prchavé látky sa uvoľňujú do ovzdušia, kde rýchlo podliehajú demetylácii, oxidácii a sú rozptýlené vzdušnými prúdmi²². Za túto premenu, významne ovplyvňujúcu biogeochemické cykly prvkov ako ortuť, selén alebo arzén²³, sú zodpovedné predovšetkým mikroorganizmy, či už spoločenstvá baktérií alebo mikroskopických húb.

Počiatky výskumu syntézy prchavých derivátov potenciálne toxických prvkov mikroorganizmami boli už v 19. st., kedy Bartolomeo Gosio sériou niekoľkých experimentov preukázal, že niekoľko druhov z triedy Ascomycetes bolo schopných transformovať arzén na prchavú látku cesnakového zápachu. Tá bola neskôr identifikovaná pracovným kolektívom Frederika Challengea (1933) ako trimetylarzín²².

Do procesu metylácie sa zapájajú tri metylačné činidlá: *S*-adenozyl-metionín, metylkobalamín a *N*-metyl-

tetrahydrofolát. Mechanizmus metylácie ako prvý, na príklade biologickej transformácie arzénu, opísal Challenger²⁴. Tzv. Challengerov mechanizmus metylácie arzénu zahŕňa prenos metylovej skupiny z donora *S*-adenozyl-metionínu na substrát, ktorý obsahuje trojmocný arzén, a zároveň jeho oxidáciu na päťmocnú formu. Táto „oxidatívna metylácia“ predpokladá vznik trojmocných foriem dimetylarzínov a monometylarzínov ako medziproduktov metylačnej reakcie. Ako redukčné činidlo vystupuje v tejto metabolickej dráhe glutatión, ktorý sa využíva aj pri redukcii arzeničnanu na arzenitan, reakcii limitujúcej volatilizáciu arzénu²⁵.

Mikrobiálnu transformáciu anorganických zlúčenín selénu do prchavých organických a anorganických derivátov môžeme využiť aj ako účinný mechanizmus dekontaminácie znečistených pôd, sedimentov a vôd, resp. pri jeho spätnom získavaní. Selén, ktorý sa nachádza v roztokoch najmä ako mobilný oxoanión, je zvyčajne odstraňovaný z odpadových vôd chemickým zrážaním pomocou železitých solí. Avšak tento proces generuje obrovské množstvo chemických kalov s vysokým obsahom aj ďalších kontaminantov²⁶. Biovolatilizáciou selénu však vznikajú prchavé produkty, ktorých regenerácia je pomerne nenáročná a získaný selén je bez ďalších chemických nečistôt²⁷. Metylácia anorganického selénu na dimetylselenidy pozostáva z redukcie zlúčenín selénu na H₂Se a následnej oxidatívnej metylácie na dimetylselenid v prítomnosti *S*-adenozyl-metionínu. Metylované formy selénu, ktoré sú menej toxické ako seleničtany a selényany, sa vďaka vysokej prchavosti rýchlo uvoľňujú z mikrobiálnych buniek²⁸.

Z environmentálneho hľadiska je najviac riziková mikrobiálna biovolatilizácia ortuti mechanizmom biometylácie²⁹, ktorej metylovaná forma je vysoko toxická, keďže sa jej transformáciou na organokovovú formu zvyšuje rozpustnosť v tukoch a tým aj miera bioakumulácie v živočíšnych tkanivách. Metylácia Hg, ale aj niektorých ďalších kationov (napr. Sn, Pb), neprebíha procesom oxidatívnej metylácie, ako v prípade selénu a arzénu, keďže ako metylačný agent je pravdepodobne metylkobalamín³⁰.

5. Záver

Vplyv na mobilitu látok v prirodzenom prostredí majú mnohé faktory a mikroorganizmy v tomto prípade zohrávajú taktiež dôležitú úlohu. Procesy bioakumulácie, biosorpcie a biovolatilizácie sú dôležitými procesmi, prebiehajúcimi pri biogeochemickom cykle látok. Ovpľývajú aj toxicitu a biodostupnosť potenciálne toxických prvkov práve zmenami ich mobility a špeciácie v prostredí. Vplyvom mikroorganizmov môže dochádzať k imobilizácii prvkov v biomase, či naopak k ich mobilizácii a premene na organokovové zlúčeniny.

Procesy biosorpcie a bioakumulácie sú považované za alternatívne techniky odstraňovania znečisťujúcich látok. Experimenty zamerané na porovnanie bioakumulačnej a biosorpcnej kapacity rôznych druhov umožnia posúdenie ich vhodnosti na využitie v remediačných technológiách.

Sorpčné vlastnosti biomasy závisia od jej povrchu a od jeho chemického zloženia závisia aj mechanizmy viazania, ktoré pri biosorpcii prebiehajú.

Sledovanie procesov bioakumulácie, biosorpcie a biovolatilizácie potenciálne toxických prvkov prinesie nielen poznatky o prípadnom využití týchto procesov na bioremediácie, ale aj priblíži prirodzene prebiehajúce zmeny mobility sledovaných prvkov vplyvom mikroorganizmov, ktoré sú dôležitou súčasťou biogeochemických cyklov látok.

LITERATÚRA

- Ramrakhiani L., Majumder R., Khowala, S.: Chem. Eng. J. 171, 1060 (2011).
- Chubar N., Carvalho J. R., Correia M. J. N.: Colloids Surf., A 230, 57 (2003).
- Li L., Hu Q., Zeng J., Qi H., Zhuang G.: J. Environ. Sci. 23, 108 (2011).
- Volesky B.: *Sorption and biosorption*. BV-Sorbex Inc., St.Lambert, Quebec 2004.
- Gadd G. M.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 84, 13 (2009).
- Chojnacka K.: Environ. Int. 36, 299 (2010).
- Dotto G. L., Costa J. V., Pinto L. A.: J. Environ. Chem. Eng. 1, 1137 (2013).
- Dostalek P., Patzak M., Matejka P.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 54, 203 (2004).
- Li P. S., Tao H. C.: Crit. Rev. Microbiol., v tisku.
- Fomina M., Gadd G. M.: Bioresour. Technol. 160, 3 (2014).
- Wang J., Chen C.: Biotechnol. Adv. 27, 195 (2009).
- Park D., Yun Y.-S., Park J.: Biotechnol. Bioprocess Eng. 15, 86 (2010).
- Worms I., Simon D. F., Hassler C. S., Wilkinson K. J.: Biochimie 88, 1721 (2006).
- Rutherford J. C., Cavet J. S., Robinson N. J.: J. Biol. Chem. 274, 25827 (1999).
- Rensing C., Ghosh M., Rosen B. P.: J. Bacteriol. 181, 5891 (1999).
- Ahluwalia S. S., Goyal D.: Bioresour. Technol. 98, 2243 (2007).
- Lima A. I. G., Corticeiro S. C., De Almeida Paula Figueira E. M.: Enzyme Microb. Technol. 39, 763 (2006).
- Gadd G. M.: Geoderma 122, 109 (2004).
- Bentley R., Chasteen T. G.: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 250 (2002).
- Gadd G. M.: FEMS Microbiol. Rev. 11, 297 (1993).
- Styblo M., Del Razo L. M., Vega L., Germolec D. R., Lecluyse E. L., Hamilton G. A., Reed W., Wang C., Cullen W. R., Thomas D. J.: Arch. Toxicol. 74, 289 (2000).
- Meyer J., Michalke K., Kouril T., Hensel R.: Syst. Appl. Microbiol. 31, 81 (2008).
- Michalke K., R. Hensel, v knize: *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment* (Hirner A., Emons H., ed.) kap. 7. Springer, Berlin 2004.
- Challenger F.: Q. Rev., Chem. Soc. 9, 255 (1955).
- Zhang S.-Y., Sun G.-X., Yin X.-X., Rensing C., Zhu Y.-G.: Chemosphere 93, 47 (2013).
- Soda S., Takahashi H., Kagami T., Miyake M., Notaguchi E., Sei K., Iwasaki N., Ike M.: Jpn. J. Water Treat. Biol. 48, 63 (2012).
- Kagami T., Narita T., Kuroda M., Notaguchi E., Yamashita M., Sei K., Soda S., Ike M.: Water Res. 47, 1361 (2013).
- Thayer J. S.: Appl. Organomet. Chem. 16, 677 (2002).
- Mason R. P., v elektronické knize: *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment* (Dricu A., ed.) kap. 11. Intech, 2012.
- Choi S. C., Chase T., Bartha R.: Appl. Environ. Microbiol. 60, 1342 (1994).

K. Boriová, M. Urík, and P. Matúš (*Institute of Laboratory Research on Geomaterials, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava*): **Biosorption, Bioaccumulation, Biovolatilization of Potentially Toxic Elements by Microorganisms**

This review deals with the current state of knowledge of biosorption, bioaccumulation and biovolatilization. The changes in mobility of elements occurring in the environment by biosorption, bioaccumulation and biovolatilization are an important part of their biogeochemical cycles. Biosorption and bioaccumulation can also be applied as an alternative methods for removal of contaminants from the environment. Biosorption is a process of passive binding of substances by adsorption on biomass surface, mainly driven by physicochemical forces. At present, biosorption is a well-known concept in bioremediation and its use for commercial purposes is becoming common. Bioaccumulation is active process of binding substances on cell surface together with accumulation of elements in the intracellular space of microorganisms. It is a complex enzymatic process, associated with the cell metabolism.