

# TROŠENJE MINERALNE PODLOGE UVJETOVANO DJELOVANJEM BAKTERIJA

---

**Rajačić, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:120981>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Geološki odsjek

Ana Rajačić

**TROŠENJE MINERALNE PODLOGE  
UVJETOVANO DJELOVANJEM BAKTERIJA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
GEOLOŠKI ODSJEK

Ana Rajačić

**TROŠENJE MINERALNE PODLOGE  
UVJETOVANO DJELOVANJEM BAKTERIJA**

Diplomski rad  
predložen Geološkom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog stupnja  
magistar/magistra geologije

Mentor:  
prof.dr.sc. Jasenka Sremac

Zagreb, 2021.

## *Zahvale*

*Veliko hvala prof.dr.sc. Jasenki Sremac i prof.dr.sc. Vladimiru Bermancu na strpljenju, vodstvu i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvala prof.dr.sc. Jasni Hrenović i dr.sc. Željki Fiket na pruženoj pomoći i savjetima koji su olakšali pisanje ovog rada.*

*Hvala mojoj obitelji i „kampićima“ na potpori tijekom studiranja.*

*Ana*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Geološki odsjek

Diplomski rad

### TROŠENJE MINERALNE PODLOGE UVJETOVANO DJELOVANJEM BAKTERIJA

**Ana Rajačić**

Rad je izrađen u Mineraloško-petrografskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 95, 10 000 Zagreb, Republika Hrvatska.

#### **Sažetak:**

U porfirnom ležištu u Antofagasti pronađen je bakreni mineral djurleit s vidljivo trošenom površinom prouzročenom bakterijama. Naknadno je dokazana acidofilna bakterija koja uzrokuje procese bioizluživanja na navedenom mineralu. Uzorci su podvrgnuti analitičkim metodama; XRD analizom dobiven je mineraloški sastav uzorka, a ICP-MS metodom napravljena je elementna analiza makroelemenata i mikroelemenata uzorka.

**Ključne riječi:** djurleit, sulfidni minerali, bioizluživanje, acidofilne bakterije

**Rad sadrži:** 58+VI stranica, 20 slika, 6 tablica, 54 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je pohranjen u:** Središnja geološka knjižnica, Geološki odsjek, PMF

**Mentori:** Prof. dr. sc. Jasenka Sremac, PMF, Zagreb

Prof. dr. sc. Vladimir Bermanec, MF, Sisak

**Ocjenjivači:** Prof. dr. sc. Jasenka Sremac, PMF, Zagreb

Prof. dr. sc. Nenad Tomašić, PMF, Zagreb

Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Mezga, PMF, Zagreb

Zamjena: Prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović, PMF, Zagreb

**Datum završnog ispita: 23.9.2021.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Geology

### Graduate Thesis

#### MINERAL SURFACE WEATHERING CAUSED BY BACTERIAL ACTIVITY

Ana Rajačić

Thesis completed at the Institute of Mineralogy and Petrology, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 95, 10 000 Zagreb, Croatia.

#### Abstract:

A copper mineral djurleite with visibly weathered surface caused by bacterial activity was found in porphyry deposit in Antofagasta. Results show us that these bacteria are acidophilic bacteria that perform bioleaching processes on mineral djurleite. Samples were subjected to analytical methods; the mineralogical composition was obtained by XRD analysis and the elemental analysis of macro- and microelements was performed by ICP-MS method.

**Keywords:** djurleite, sulphide minerals, bioleaching, acidophilic bacteria

**Thesis contains:** 58+VI pages, 20 figures, 6 tables, 54 references

**Original in:** Croatian

**Thesis deposited in:** Central Library of Geology, Department of Geology, Faculty of Science

**Supervisor:** Jasenka Sremac, Ph.D. Full Professor, PMF, Zagreb  
Vladimir Bermanec, Ph.D. Full Professor, MF, Sisak

**Reviewers:** Jasenka Sremac, Ph.D. Full Professor, PMF, Zagreb  
Nenad Tomašić, Ph.D. Full Professor, PMF, Zagreb  
Aleksandar Mezga, Pd.D. Associate Professor, PMF, Zagreb  
Blanka Cvetko Tešović, Ph.D. Full Professor, PMF, Zagreb

**Date of the final exam:** 23.9.2021.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled dosadašnjih istraživanja.....	2
2.1. Rasprostranjenost bakterija .....	6
2.2. Bakterije i arheje.....	8
2.2.1. Bakterije značajne za temu ovoga rada .....	13
2.2.2. Pasivna i aktivna adsorpcija metala bakterijama .....	14
2.2.3 Biološki inducirana i kontrolirana mineralizacija .....	15
2.3. Proces bioremedijacije .....	17
2.4. Reaktivnost mineralne površine .....	18
2.4.1. Bakterijska kolonizacija površine .....	19
2.4.2. Model adsorpcije metala.....	19
2.5. Bakterijski biofilm .....	21
2.6. Biorudarenje .....	22
2.6.1. Faktori koji utječu na proces bioizluživanja: .....	25
2.7. Bakrena porfirna ležišta .....	27
2.8. Bioizluživanje sulfidnih minerala.....	30
2.8.1. Mineral djurleit.....	33
3. Materijali i metode istraživanja .....	35
3.1. Detektiranje bakterija i Metoda bojenja po Gramu .....	35
3.2. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD).....	35
3.3. Analiza multielementnog sastava (ICP-MS).....	36
4. Rezultati.....	38
4.1. Rendgenska difrakcijska analiza.....	39
4.2. Masena spektrometrija induktivno spregnutom plazmom .....	43
5. Rasprava .....	44
6. Zaključak .....	51
7. Literatura .....	52

## **1. Uvod**

Mikroorganizmi nastanjuju svaku površinu na planeti. Njihova biosfera se proteže do nekoliko kilometara dubine u zemljinoj kori i predstavljaju važan faktor u formiranju i evoluciji zemljine kore. Mikroorganizmi su ključni u procesima biosfere, osobito u područjima biokemijskih ciklusa, transformacije minerala i metala, stvaranju tla i sedimenata, razgradnji fosilnih goriva te u procesima bioizluživanja; kojima će se detaljnije baviti ovaj rad. Sve vrste mikroorganizama (uključujući prokariote i eukariote) su od velike važnosti pri izluživanju metala iz minerala/rude te mogu pridonijeti boljem razumijevanju geoloških procesa. Svojstva mikroorganizama mogu utjecati na genezu minerala, toksičnost i promjene u specifikacijama minerala. Djelovanje mikroorganizama na metale i minerale može rezultirati uništenjem sintetičkih i prirodnih materijala, građevinskih materijala (poput djelovanja lišajeva i bakterija na vapnence Zagrebačke katedrale, propadanje kamenih spomenika tj. trajno uništenje kulturne baštine), odvodnjavanje kiselina iz rudnika i time zagađivanje okoliša (Cerro Colorado- Čile, Quebrada Blanca - Čile, Toquepala – Peru, Nifty Copper – Australija i sl.) što rezultira velikim ekonomskim gubitcima. Navedeni procesi čine granu znanosti zvanu geomikrobiologija koja zahtijeva interdisciplinarni pristup definiranju važnosti utjecaja mikroorganizama na okoliš i eksploatacijsku biotehnologiju (GADD, 2010).

Proces bioizluživanja događao se na Zemlji skoro od samog početka nastanka planeta Zemlje. Biorudarenje/bioizluživanje je tehnologija za vađenje metala iz ruda nižeg stupnja i mineralnih koncentrata, koja se najčešće koristi na zlatonosnim rudama, rudama bakra i urana. Primjena procesa reakcija bioizluživanja za bakar je veoma istražena i dokumentirana te su razvijene metode za izvlačenje bakra iz otopina bogatih bakrom. Izluživanje bakra se prakticira već nekoliko desetljeća, najčešće s rudnim oksidima bakra (SCHNELL, 1997). Mikroorganizmi imaju donekle nepredvidivo „ponašanje“ što otežava potpuno razumijevanje različitih mehanizama djelovanja mikroorganizama na minerale i stijene.

Svrha ovog diplomskog rada jest opisati i analizirati proces bioizluživanja rudnog minerala djurleita uzrokovanog acidofilnim bakterijama. Cilj ovomu diplomskom radu jest odrediti mineraloške i geokemijske karakteristike uzorka djurleita iz Antofagaste.



## 2. Pregled dosadašnjih istraživanja

Mikroorganizmi u interakciji s metalima i mineralima mijenjaju njihova fizička i kemijska svojstva. Minerali istovremeno utječu na rast, aktivnost i preživljavanje mikroorganizama (GADD, 2010). Mnogi minerali su biogenog podrijetla te njihovo nastajanje ima geološko i industrijsko značenje, kao i važne strukturne komponente za mnoge organizme uključujući foraminifere, dijatomeje i radiolarije (EHRlich, 1996; GADD i RAVEN, 2010). Znanost geomikrobiologija proučava interakcije minerala i metala s mikroorganizmima te procese biomineralizacije; odnosno ključne procese propadanja, stvaranja i kemijske transformacije metala i minerala djelovanjem mikroorganizama (Tablica 1).

Tablica 1. Uloga mikroorganizama u biokemijskim ciklusima metala i drugih elemenata (prilagođeno iz GADD, 2010)

U tablici 1. su prikazani samo reprezentativni elementi. Puno različitih minerala koji sadrže mnoge metale su nastali kao neizravni ili izravni rezultat djelovanja mikroorganizama te su zato neki od njih izostavljeni iz tablice.

Elementi	Uloga mikroorganizama u ciklusu elemenata
C, H, O	Unos, asimilacija, razgradnja i metabolizam organskih i anorganskih spojeva; disanje (proizvodnja CO <sub>2</sub> ); fotosinteza; fotorespiracija; biosinteza polimera; izlučivanje organskih i anorganskih metabolita; stvaranje humusa; proizvodnja CN <sup>-</sup> ; stvaranje karbonata; stvaranje oksalata; oksalatno-karbonatni ciklus; otapanje karbonata; metanogeneza (Arheje); razgradnja ugljikovodika; organometalna razgradnja; biometilacija i demetilacija metala; transport vode, oksidacija i proizvodnja vodika
N	Razgradnja dušičnih spojeva; asimilacija i transformacija organskih i anorganskih N spojeva; N <sub>2</sub> fiksacija (samo prokarioti), nitrifikacija i denitrifikacija; oksidacija amonijaka i nitrita; anaerobna nitrifikacija; biosinteza biopolimera koji sadrže N (npr. hitin); proizvodnja metabolita i plinova koji sadrže N (npr. N <sub>2</sub> O); fermentacija amonijaka u anaerobnim uvjetima; prijenos mikoriza N na biljke, fiksni prijenos N na biljke (simbiotski N <sub>2</sub> fiksatori)
P	Otapanje anorganskih fosfata i minerala koji sadrže P u tlima i stijenama; razgradnja organskih spojeva koji sadrže P; stvaranje netopivog P (npr. polifosfat); sekundarni fosfatni minerali; asimilacija i transformacija anorganski vrsta P; oksidacija reduciranih oblika fosfata, proizvodnja difosfata i fosfonata; P prijenos na biljke (mikoriza)
S	Razgradnja organskih spojeva koji sadrže S; organsko-anorganske S transformacije; unos i asimilacija organskih i anorganskih spojeva S; akumulacija S(0); redukcija i asimilacija SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ; S(0) redukcija;

	oksidacija reduciranih S spojeva; oksidacija H <sub>2</sub> S u S(0), redukcija S(0) u H <sub>2</sub> S, otapanje minerala koji sadrže S u tlima i stijenama (npr. sulfidi i sulfati)
Fe	Bioizluživanje minerala i stijena koji sadrže Fe, otapanje Fe sideroforima, organskim kiselinama, metabolitima itd.; redukcija Fe(III) u Fe(II); oksidacija Fe(II) u Fe(III), Fe biomineralizacija (npr. oksidi, hidroksidi, karbonati, sulfidi); sorpcija metala na Fe okside
Mn	Oksidacija i imobilizacija Mn(II) kao Mn (IV) oksida; redukcija Mn(IV); indirektna Mn(IV)O <sub>2</sub> redukcija metabolitima (npr. oksalat); bioakumulacija Mn oksida na površinama i egzopolimerima; biosorpcija; akumulacija; Mn biomineralizacija (npr. oksidi, hidroksidi, sulfidi, oksalati); sorpcija metala na Mn okside
Cr	Redukcija Cr (VI) na Cr(III); oksidacija Cr(III); akumulacija Cr oksianoina
Mg,Ca,Co, Ni,Zn,Cd, Sr	Bioizluživanje minerala u stijenama i tlu; biosorpcija; unos i akumulacija; bioprecipitacija (npr. oksalati, sulfidi, fosfati, karbonati); redukcija Co(III)
Ag	Redukcija Ag(I) u Ag(0); biosorpcija; bioakumulacija
K, Na, Cs	Unos i akumulacija; translokacija kroz micelij (gljive); koncentracija u voćnim tijelima (gljive); mobilizacija iz metala u tlima
Cu	Mobilizacija minerala koji sadrže Cu u stijenama i tlima; formacija CuS; biosorpcija; unos i akumulacija; bioprecipitacija (npr. oksalati)
Se	Reduktivna transformacija Se oksianionsa (npr. Se(VI) u Se (IV) u Se(0)); oksidacija; biometilacija i demetilacija spojeva Se; asimilacija organskih i anorganskih spojeva Se
Te	Reduktivna transformacija te oksianiona (npr. Te(VI) u Te(IV) u Te(0)); biometilacija, asimilacija organskih i anorganskih Te spojeva
Pb	Biosorpcija, stvaranje oksalata olova; biometilacija
Cl,Br,I	Dehaorespiracija; biometilacija; akumulacija u biomasi
Sn	Razgradnja organotina; sorpcija i akumulacija topivih Sn spojeva; biometilacija
Au	Redukcija topivog Au u Au(0); Au mineralna disperzija i otapanje
As	Biometilacija As spojeva (npr. arsenit do trimetilarina, redukcija As oksianiona)
Hg	Hg biometilacija; redukcija Hg(II) u Hg(0); oksidacija Hg(0) u Hg (II); biosorpcija; akumulacija
Al	Mobilizacija Al iz minerala koji sadrže Al u tlima i stijenama; otapanje alumosilikata; Al precipitacija kao oksidi; biosorpcija
Si	Unos topivih vrsta Si; organsko stvaranje kompleksa Si iz anorganskih silikata; organsko stvaranje siloksana; razgradnja silicija, silikata i alumosilikata; mobilizacija Si produkcijom kiselina, baza, egzopolimera; silicifikacija; biomineralizacija (neke alge i protozoe)
U, Th	Biosorpcija; taloženje produkata hidrolize; redukcija U(VI) u U(IV); oksidacija U(IV) u U(VI), biomineralizacija, formacija UO <sub>2</sub>
Tc	Redukcija Tc(VII) u Tc(IV), formacija oksida
V	Akumulacijavanadata; redukcija V(V) u V(IV)

Primjeri skupina mikroorganizama koje provode procese oksidacije ili redukcije, izravno uključenih u geokemijske transformacije uključuju željezo, mangan, sulfat i sumpor. Neki eukarioti mogu stvoriti ili razgraditi silikate, karbonate, fosfate i druge minerale (GADD, 2007; KIM i GADD 2008, GADD i RAVEN, 2010). Mikrobnu aktivnost možemo podijeliti na mikrobnu koroziju (MIC), redukciju sulfata (SRB), metal oksidirajuće i metal reducirajuće (MRB), te bakterije koje proizvode kiselinu. Mikroorganizmi, osim važnosti u prirodnim procesima biosfere, imaju veliku primjenu u bioremedijaciji, procesu uklanjanja organskog i anorganskog zagađenja gdje su bakterije i gljive najvažniji organizmi za detoksikaciju metalnih zagađivača. Mikroorganizmi u anaerobnim uvjetima imaju mogućnost sanacije metala poput bakterija koje reduciraju  $U^{4+}$  u podzemnim vodama. Metali često djeluju toksično na mikroorganizme, međutim, bez obzira na toksičnost, mnogi mikroorganizmi, ipak, rastu na mjestima zagađenim metalima. Većina mehanizama preživljavanja mikroorganizama ovisi o promjenama metalnih specifikacija, poput otapanja metala, redoks reakcija, proizvodnje peptida ili proteina koji se vežu na metal. Interakcije metal-mineral-mikroorganizam su posebno važne u tzv. „kritičnoj zoni“ - okruženje u kojem složene interakcije uključuju stijenu, tlo, vodu, zrak gdje živi organizmi reguliraju prirodno stanište i određuju dostupnost resursa koji ih održavaju na životu (SPARKS, 2005; CHOROVER i sur., 2007; AMUNDSON i sur., 2007; BRANTLEY i sur., 2007). Metali mogu utjecati na mikrobne procese poput stvaranja biofilma, proizvodnje energije i hranjivih sastojaka. Svojstva mineralne površine (zagađivači okoliša, uključujući metale koji se mogu apsorbirati na mineralne površine, naboj i hidrofobnost) imaju važnu ulogu u vezivanju mikroorganizama i time utječu na biofilm, mogućnosti kolonizacije i cijelu populaciju povezanu s mineralnom podlogom. Dokazano je da mikroorganizmi i njihovi izvanstanični produkti mogu utjecati na mobilnost metala, npr. na bakar s odlagališta otpada, čak i pod relativno malim protokom hranjivih tvari koji dominiraju u potpovršinskim uvjetima (BOULT i sur., 2006). Mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u procesu metilacije. Metilacija Hg, Sn, Pb, As, Se i Te može biti posredovana nizom mikroorganizama uključujući sulfat-reducirajuće bakterije u anaerobnim uvjetima i gljivice *Penicillium* i *Alternaria* spp. Metilirani metalni spojevi razlikuju se po svojoj topljivosti, hlapljivosti i toksičnosti (GADD, 2010).

Najveća klasa poznatih enzima koji mogu transportirati i vezati željezo u staničnu membranu jesu siderofori. Ti specifični Fe (III) ligandi se izlučuju na površini stanice nekih mikroorganizama. Iako bi se navedeni mehanizam mogao koristiti i za „nabavljanje“ drugih

metala, Fe je jedini poznati element za koji djeluju ti organski spojevi, vjerojatno zbog potrebe za većom količinom željeza u stanicama. Zbog sposobnosti vezivanja metala postoji potencijal za siderofore postoji potencijal za siderofore u medicini, preradi nuklearnog goriva, bioremedijaciji i obradi industrijskog otpada (RENSHAW i sur., 2002).

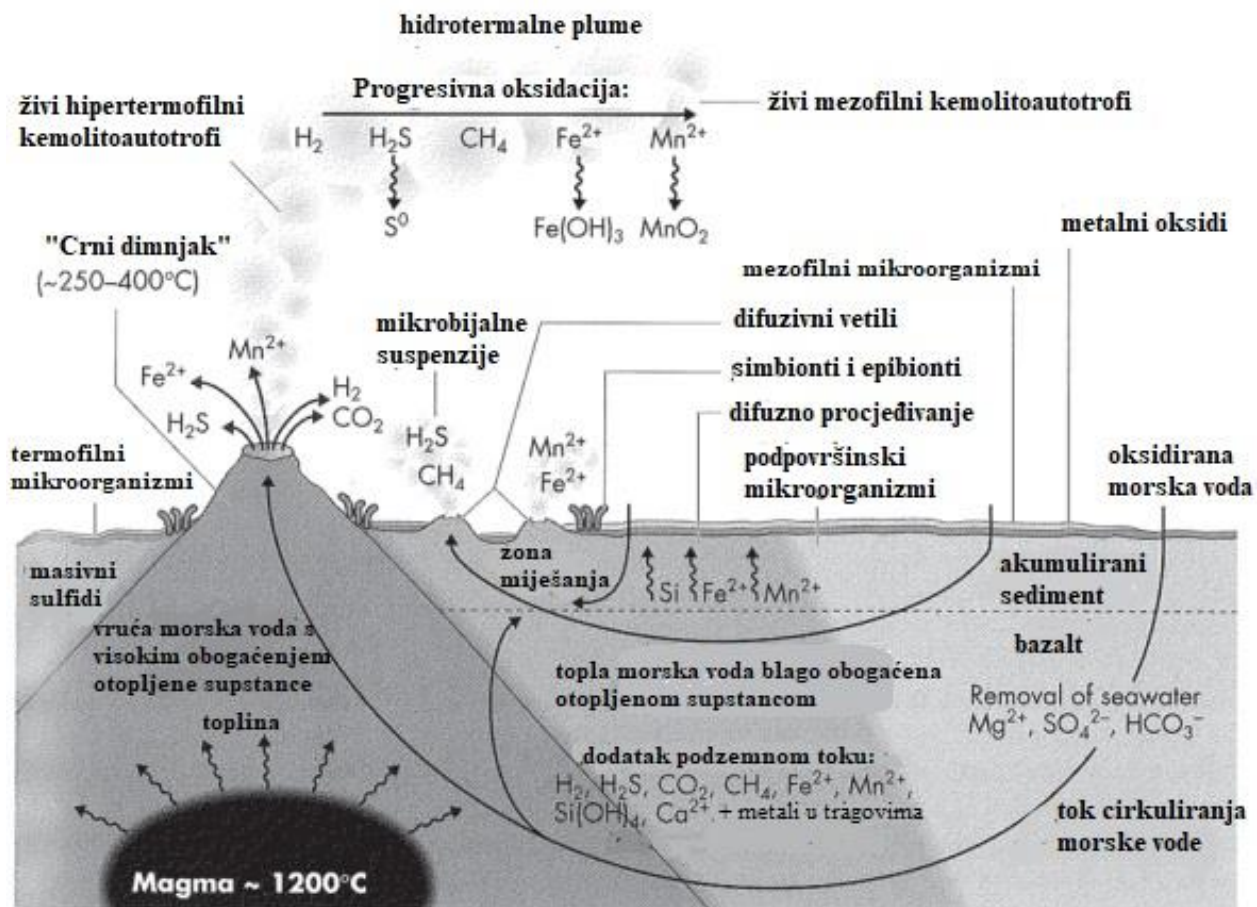
Neke bakterije poput *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus* spp., *Acidianus brierleyi* i *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* mogu oksidirati Fe(II) pomoću enzima s generiranjem energije gdje je Fe(II) najmanje osjetljiv pri oksidaciji ispod pH 5. Fe (III) također može biti lokalno koncentriran na površini mikroorganizama i metalnim oksidima (GADD, 2010). Jedna od najčešćih mikrobnih aktivnosti i sposobnosti mikroorganizama je razgradnja organske tvari: prirodnih polimera (celuloza, pektin, lignin, hitin, škrob), ugljikovodika i pesticida. Arheje, metanogene bakterije, sulfat i nitrat reducirajuće bakterije pokazuju sposobnost redukcije Fe (III) minerala (LOVLEY i sur., 2004). Metali služe za stabilizaciju negativnih naboja anionskih skupina ili pružaju „privremeni“ pozitivni naboj za suzbijanje negativnog naboja.

Organomineralizacija se koristi kao pojam koji obuhvaća procese biomineralizacije. Mineral na koji utječu organske tvari povezane sa živim bićima, ali ih stanice ne proizvode izravno, se zove „organomineral“. Minerali koji su izravno nastali utjecajem organizama (mikrobna oksidacija, izlučivanje metabolita – npr. sulfid, oksalat; redukcija metala) zovu se biominerali. Svojstva minerala nastalih biomineralizacijom mogu ovisiti o mikrookolišu, svojstvima stanične površine i prisutnosti reaktivnih aniona. Osim bakterija, ulogu u formiranju minerala imaju i mikroalge, cijanobakterije i gljivice. Mikroalge i cijanobakterije imaju veći značaj u vodenim sustavima, dok gljive imaju ulogu u procesima otapanja minerala, aniona i metala, stvaranja minerala u simbiotskim uvjetima u kopnenim okolišima. Goethit ( $\alpha$ -FeO(OH)), montmorillonit ( $((\text{OH})_4\text{Si}_8\text{Al}_4\text{O}_{20}\cdot n\text{H}_2\text{O})$ ), uranov fosfat ( $\text{O}_8\text{P}_2\text{U}$ ) i forsterit ( $\text{Mg}_2\text{SiO}_4$ ) neki su od produkata djelovanja gljiva. Taloženje materijala unutar i na staničnoj stjenici mikroorganizma utječu na sastav stanične stjenke i pH.

Biomehaničko propadanje stijena i minerala može nastati prodiranjem i ukopavanjem u raspadajući materijal i duž kristalnih osi npr., na kalcitnim i dolomitnim stijenama (STERFILINGER, 2000; GOLUBIĆ i sur., 2005; SMITS, 2006; GADD, 2007; COCKELL i HERRERA, 2008.) Prilagođavanjem metabolizma i stvaranjem biofilma mikroorganizmi postaju otporni na promjenu pH i salinitet.

## 2.1. Rasprostranjenost bakterija

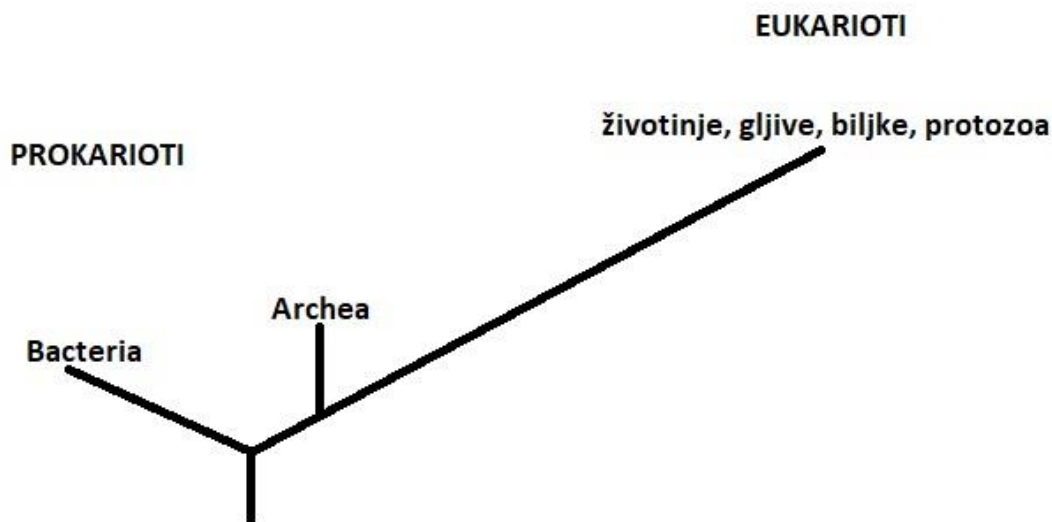
Bakterije možemo naći u svim dijelovima biosfere, odnosno u litosferi, hidrosferi i atmosferi. Termofilne, anaerobne, fermentirajuće bakterije (*Thermoanaerobacter* sp., *Thermoanaerobium* sp., *Clostridium thermohydrosulfuricum*) pronađene su u istražnim bušotinama na dubini od 3500 m u podzemnim vodama u granitnim stijinama u Švedskoj (SZEWZKY i sur., 1994). Hidrosferu obogaćuje živi svijet do dubine od 11 000 metara. U hidrotermalnim izvorima na srednjeoceanskim riftnim zonama razvili su se posebni ekosistemi čiji su primarni izvori energije geotermalni procesi (JANNASCH, 1983). Autotofne bakterije koje žive oko hidrotermalnih izvora zbog nemogućnosti vršenja fotosinteze koriste sumporovodik kao izvor energije pretvarajući ugljikov dioksid u organsku tvar. Toplina iz magmatskih komora prodire kroz bazalt i time morska voda penetrira i reagira s navedenim bazaltom što rezultira mobilizacijom nekih metala poput Fe i Mg (u nekim slučajevima Zn i Cu) i nastankom sumporovodika (slika 1). U području atmosfere, pronađene su bakterije 77 km iznad Zemljine površine (IMSHENETSKY i sur., 1978; LYSENKO, 1979). Na Antarktici, u bušotini dubine 3500 metara pronađene su bakterije roda *Deinococcus*. Navedeni rod bakterije, uz još nekoliko vrsta mikroorganizama, mogu preživjeti u ekstremnim uvjetima visokog UV zračenja i bez vode u tekućem stanju. U kiselim okolišima, poput kiselih rudnih voda pronađene su kemolitoautotrofne arheje i bakterije koje oksidiraju  $S^0$  i  $H_2S$ . Hipersalini okoliš bilježi veliku raznolikost ionskog sastava, pH i ukupne koncentracije soli. Arheje poput *Natronococcus* sp. i bakterije poput *Ectothiorhodospira* pronađene su u brinama unatoč hipersalinitnim uvjetima (KONHAUSER, 2007).



Slika 1. Hipotetički prikaz hidrotermalnog dubokomorskog sistema koji prikazuje emisiju reduciranih plinova i otopljenih tvari iz visokotemperaturnih dimnjaka i difuznih voda ispod sedimenata. Reducirani plinovi i otopljene tvari služe kao primarni izvor energije za razne bakterijske i arhejske zajednice (prilagođeno iz KONHAUSER, 2007).

## 2.2. Bakterije i arheje

Bakterije su prokariotski organizmi bez pravog nukleusa, mitohondrija i kloroplasta, veličine 500 nm do 2  $\mu\text{m}$  (slika 2). U hijerarhiji biološke taksonomije prokariotske organizme dijelimo u dvije domene: bakterije (Eubacteria) i arheje (Archeae).

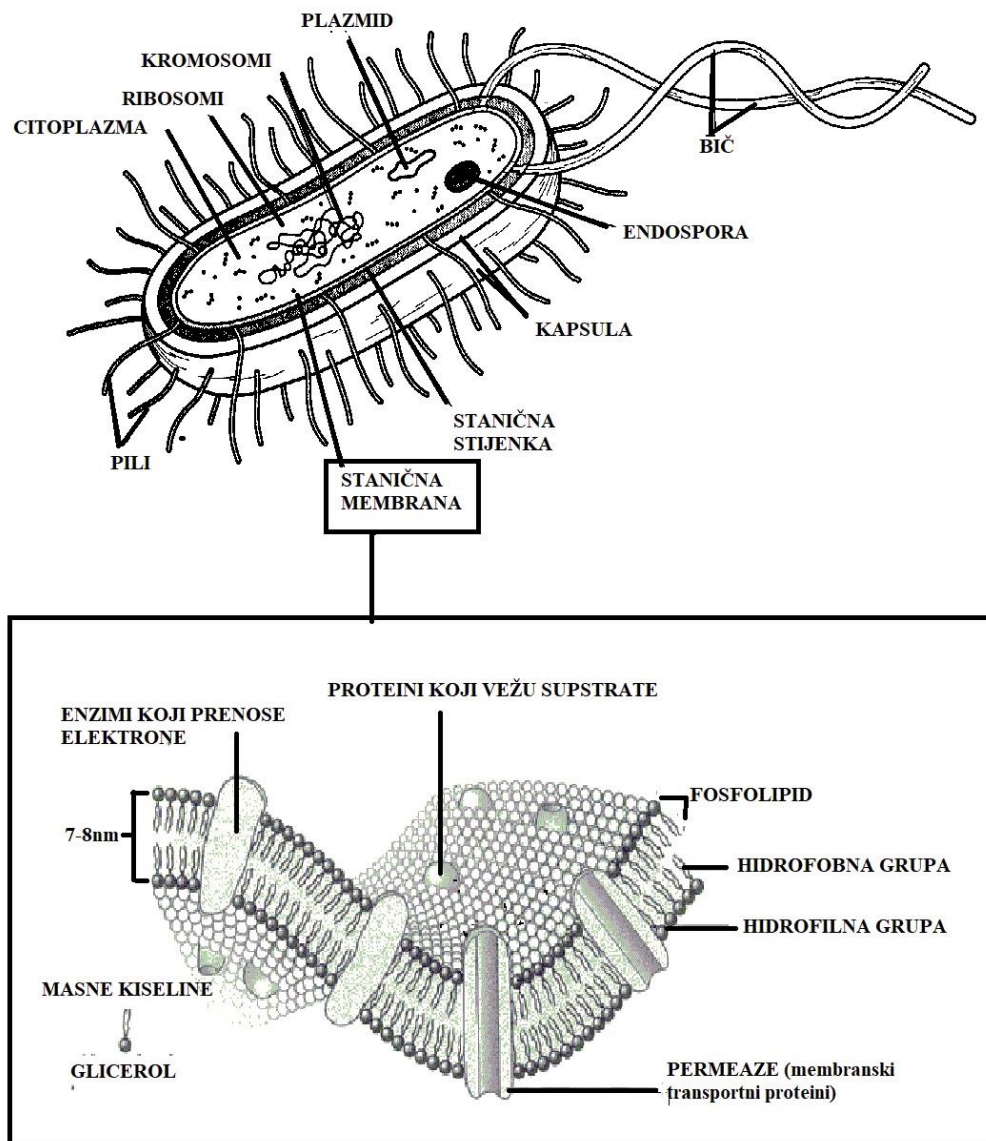


Slika 2. Prikaz odnosa prokariota s domenama Bacteria - Archea i Eucaria

Njihovi „bakterijski kromosomi“ ne sadrže protein poput histona i nisu okruženi jezgrinom ovojnicom. Bakterije i arheje se razlikuju po strukturi stanične ovojnice, membrane i strukturi ribosoma koji su mjesta sinteze proteina u bakterijama. Također se razlikuju po ključnim enzimima koji sudjeluju u sintezi nukleinske kiseline i proteina (BROCK i MADIGAN, 1988; Atlas, 1997; SCHAECHTER i sur., 2006). Arheje i bakterije posjeduju staničnu membranu koja obavija stanicu i odvaja unutrašnjost od vanjske okoline. Primarna funkcija stanične membrane je reguliranje protoka materijala unutar i izvan stanice. Stanična membrana eubakterija sastoji se od slojeva lipida s masnim kiselinama koja se nalazi između dva sloja glicerola, dok se u arhejama stanična membrana sastoji od molekula ugljikovodika. Vanjski dio glicerola odnosno fosfolipidi čine hidrofilnu grupu, a unutarnji dio glicerola čini hidrofobnu grupu. Sastav masnih kiselina čine hidrofobni nepolarni ugljikovodični lanci (slika 3). Staničnu membranu također čine različiti proteini koji služe za transport različitih molekula ili proizvodnju energije. Unutar citoplazme,

koja sadrži i genetski materijal, dolazi do razgradnje različitih tvari pomoću enzima (KONHAUSER, 2007).

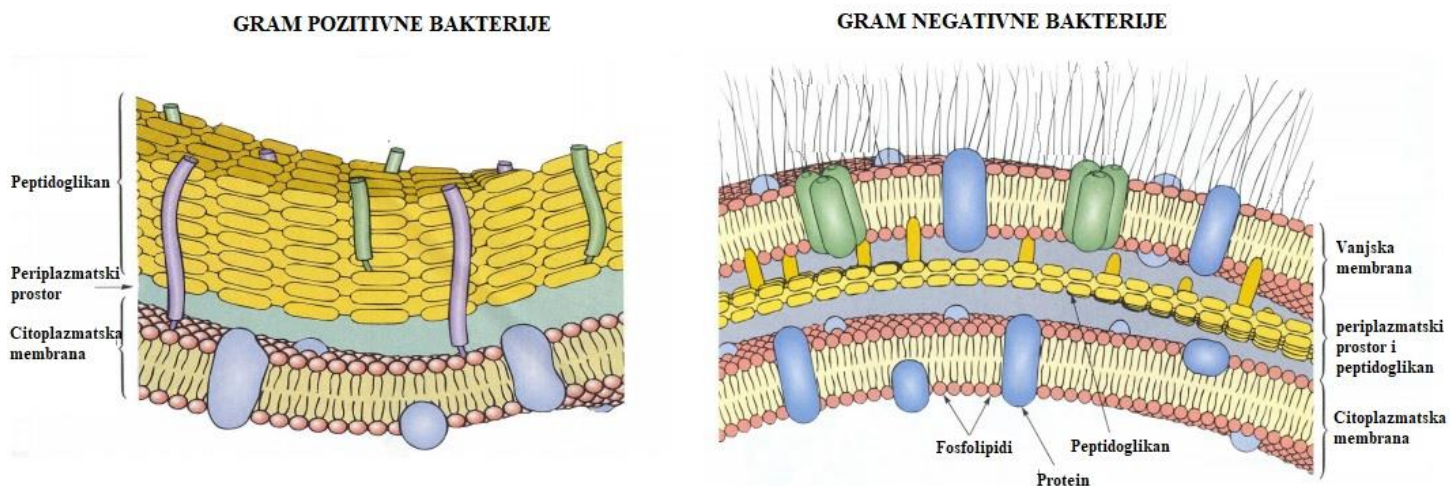
Bakterije i arheje mogu imati čitav niz morfoloških oblika stanice npr. štapičaste, kuglaste, spiralne, poput zarez, te one bez stalnog oblika.



Slika 3. Struktura stanica bakterije i stanične membrane (prilagođeno KONHAUSER, 2007)



Površine bakterija su veoma različite, ali uobičajen sastojak među njima je jedinstveni materijal peptidoglikan (neke gram-negativne bakterije ga ne sadrže), polimer koji se sastoji od mreže linearnih polisaharida (ili glikanskih) niti povezanih proteinima (SCHLEIFER i KAANDLER, 1972). Peptidoglikan staničnoj stijenci gram-pozitivnim bakterijama daje naboj i čvrstoću. Na temelju fizičko-kemijskih svojstava stanične stijenke. Bakterije možemo podijeliti u dvije skupine: Gram-pozitivne i Gram-negativne. Gram-pozitivne bakterije odlikuje viši postotak peptidoglikana u staničnoj stijenci nego u Gram-negativnih bakterija. Gram-negativne bakterije, osim kompleksnije strukture stanične stijene i tankog sloja peptidoglikana odlikuje periplazma na koju se nastavlja vanjska membrana (slika 4). Vanjska membrana gram-negativnih bakterija sastavljena je od fosfolipida i lipopolisaharida koji su nabijeni anionima i imaju afinitet za  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  kationima. Lipopolisaharidi (LPS) su glavni faktori u procesu biomineralizacije zbog visoke koncentracije karbonskih i fosfatnih grupa.



Slka 4. Struktura stanične stijenke gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. (URL 1)

Membrane arheja također pokazuju gram-negativne i gram-pozitivne karakteristike bojenja, ali se razlikuju od eubakterija po kemijskom sastavu staničnih stijenaka. Neke arheje (gram-pozitivne) karakterizira pseudomurein u sastavu stanične stijenke. S slojevi, koji su smješteni na vanjskom dijelu stanične membrane, su negativnog naboja koje pokazuju afinitet prema metalnim kationima. Kapsule, sastavljene od proteina ili polisaharida, vezane su za površinu stanice bakterije i bogate su karboksilnim i fosfatnim grupama i time daju negativan naboj površini stanice. Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije poprimaju crvenu ili ružičastu boju.

Bakterije i arheje posjeduju sposobnost vršenja oksidacije i redukcije, odnosno redoks reakcije. Neki „nosači“ elektrona su fiksirani u membrani (KONHAUSER, 2007). Arheje poput halofila, termoacidofila, metanogena (bakterije koje stvaraju metan) i onih koje oksidiraju i reduciraju sumpor bitne su za geomikrobiologiju. Prema utjecaju bakterija, posebno su značajne neke aerobne i anaerobne bakterije koje metaboliziraju vodik, oksidiraju i reduciraju željezo, magnezij, bakterije, denitrifikacijske bakterije, reduciraju sulfat, oksidiraju i reduciraju sumpor, anaerobne fotosintetske sumporne bakterije, cijanobakterije i mnoge druge (EHRLICH i NEWMAN, 2009). Navedene bakterije se mogu razvrstati po fiziološkim karakteristikama:

Kemolitoautotrofne uključuju obje skupine, arheje i bakterije. Oksidacija anorganskih spojeva ( $H_2$ ,  $Fe(II)$ ,  $Mn(II)$ ,  $S^0$ ,  $H_2S$ ,  $NH_4^+$ ) izvori su energije za ovu grupu bakterija. Većina kemolitoautotrofnih bakterija su Gram-negativne bakterije. Mogu se podijeliti na temelju oksidirane vrste anorganskog supstrata, stoga se dijele na vodik oksidirajuće, metanogene, metilotofe, sumpor-oksidirajuće, željezo-oksidirajuće, magnezij-oksidirajuće...

Fitolitoautotrofne mogu biti samo bakterije. Procesiraju fotosintezu čime stvaraju energiju potrebnu za apsorpciju ugljika kao  $CO_2$ ,  $HCO_3^-$ , i  $CO_3^{2-}$ . Neke od bakterija ne stvaraju kisik kao produkt fotosinteze pa ih zovemo kemotrofske. Na temelju pigmentacije fotosintetske bakterije možemo podijeliti na zelene sumporne bakterije, zelene nesumporne bakterije, purpurne sumporne bakterije, purpurne nesumporne bakterije (KONHAUSER, 2007).

Miksotropne bakterije uključuju bakterije i arheje. Izvor energije može biti simultani proces oksidacije reduciranih ugljikovih spojeva i oksidacije anorganskih spojeva, a ugljik može biti organske ili anorganske prirode.

Fotoheterotrofne bakterije uključuju skupinu bakterija i ekstremne halofilne arheje. Sunčeva svjetlost i ugljik apsorbiran iz organskih spojeva izvor su energije za ovu grupu bakterija.

Heterotrofne bakterije uključuju bakterije i arheje. Energija je produkt oksidacije/fermentacije organskih spojeva i apsorpcije ugljika iz organskih spojeva. Oksidacija organskih spojeva može biti aerobni ili anaerobni proces (EHRLICH i NEWMAN, 2009).

Bakterije imaju velik utjecaj u geološkim procesima poput litifikacije, akumulacije sedimenata, dijageneze i trošenja stijena. Mogu djelovati kao katalizatori te biti potrošači ili proizvođači geokemijske aktivnih tvari. Djeluju kroz svoj metabolizam, koji ima dvije komponente; katabolizam i anabolizam. Katabolizam stanici osigurava potrebnu energiju oksidacijom hranjive tvari sa ili bez prisutnosti kisika (anaerobni, aerobni, mikroaerofilni, fakultativni), a anabolizam, koristeći kemijsku energiju za pretvaranje nutrijenata u kompleksnije makromolekule, doprinosi povećanju mase, razmnožavanju i rastu.

Enzimi unutar stanice ubrzavaju reakciju tj. služe kao katalizatori, ali ne utječu na potrošnju energije. Pretvaranje supstrata u „proizvod“ događa se na aktivnom mjestu - enzimu koji se fizički ne mijenja tijekom reakcije oksidacije ili pojednostavljenja kemijske strukture supstrata. Međutim, enzimi imaju tendenciju zasićenja supstratom, što dovodi do toga da brzine reakcije postaju neovisne o koncentraciji supstrata (KONHAUSER, 2007). Dio proizvedene energije utroši se na formaciju biokemijskih spojeva. ATP ili adenzin trifosfat koji se sastoji od šećera riboze, adeninske baze i tri fosfatne skupine ima funkciju skladištenja energije. Fosforilacija je proces vezanja dodatnog fosfata na adenzin monofosfat (AMP) te nastaje adenzin difosfat (ADP), istim procesom vezanja još jednog fosfata nastaje ATP odnosno adenzin trifosfat. Proces obrnut od fosforilacije je hidroliza ATP-a gdje dolazi do pucanja fosfatne veze i nastanka energetski siromašnijeg spoja ADP-a. Transport elektrona s jedne strane plazmatske membrane na drugu, tj. iz citoplazme na periplazmu u Gram-negativnim stanicama, ili na područje staničnog zida u Gram-pozitivnim stanicama se događa zbog asimetričnog rasporeda enzima nosača (HINKLE i MCCARTY, 1978). Nakupljanje protona izvan stanice rezultat je oslobođenja protona kao iona kad enzimski nosač može „prihvatiti“ samo elektrone.

### 2.2.1. Bakterije značajne za temu ovoga rada

Bakterije koje mogu utjecati na mineralne podloge mogu biti vrlo raznolike, međutim, u ovom radu ću se fokusirati na nekoliko rodova bakterija:

- ***Leptospirillum***

*Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum*, *ferrooxidans* i *Thiobacillus ferrooxidans* su vrste bakterija kojima pogoduje temperature između 25-35°C (KLAUS i BOSECKER, 1997). *L. ferrooxidans* je acidofilna kemolitotrofna vrsta bakterija koja oksidira Fe (II). *L. ferrooxidans* podnosi niski pH i visoke koncentracije molibdena i urana naspram *T. ferrooxidans*. *L. ferrooxidans* osjetljiva je na Cu te ne može oksidirati S, što je posljedica njenog nalaženja na sulfidnim mineralima.

- ***Thiobacillus***

Najaktivnije bakterije bioizluživanja pripadaju Gram-negativnom rodu *Thiobacillus*. Pogoduje im kiseli okoliš, odnosno pH između 1.5 i 3. Većina tiobacila koriste ugljikov dioksid iz atmosfere kao izvor ugljika za sintezu tvari u stanici. Energija proizlazi iz oksidacije reduciranih spojeva sumpora, uključujući sulfide i elementarni sumpor, krajnji produkt je sulfat (KLAUS i BOSECKER, 1997). Jedne od poznatijih vrsta roda *Thiobacillus* su *T.thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* i *T.prosperus*.

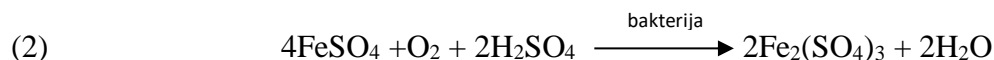
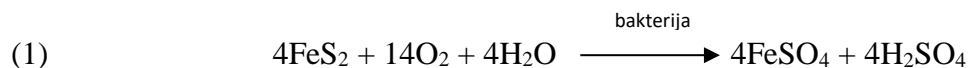
- ***Termofilne bakterije***

Termofilne bakterije nalazimo pri temperaturama od oko 50°C na pentlanditu, piritu i halkopiritu. Ion  $Fe^{2+}$  koriste kao izvor energije.

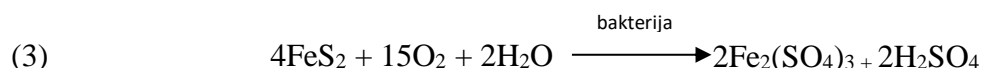
- ***Heterotrofne bakterije***

Heterotrofne bakterije zahtijevaju organske suplemente za rast. Heterotrofne bakterije nemaju koristi od izluživanja metala, međutim zbog opskrbe energije može doći do bioizluživanja. Pripadnici roda *Bacillus* su najučinkovitiji u izluživanju metala.

Pri reakciji bioizluživanja, bakterija je u direktnom kontaktu s površinom minerala. Primjer ću objasniti na mineralu piritu. Pirit se oksidira u Fe(III) sulfat (KLAUS i BOSECKER, 1997):



Što možemo sumirati ovako:



### 2.2.2. Pasivna i aktivna adsorpcija metala bakterijama

Proces pasivne adsorpcije metala posljedica je rasta bakterija u koncentriranim otopinama s obiljem metala. Na pasivnu adsorpciju metalnog kationa izravno utječe pH, koji diktira razdvajanje metala unutar i između topljivih i čvrstih faza, a time i kontrolira njegovu pokretljivost, reaktivnost i toksičnost u vodenom okruženju (KONHAUSER, 2007). Stupanj međusobnog umrežavanja metala u peptidoglikan ukazuje na količinu vezanih metala na bakterije. Stvaranjem peptidne veze umrežavanjem metala gube se nabijene skupine za svaku stvorenu vezu, odnosno povećava se kompaktnost stanične stijenke i time potrebna količina kationa za neutralizaciju aniona se smanjuje. Veće koncentracije metala mogu dovesti do flokulacije ili stvaranja metalnih kapsula oko bakterija što dovodi do bolje tolerancije na veću koncentraciju metala od onih bakterija koje ne stvaraju metalne kapsule. Pretpostavlja se da stvaranje metalnih kapsula vezana je sa zaštitom i većom otpornošću na toksične metale. Ne postoji sprega između količine anionskih liganada i količine metala koji se vežu na stanične stijenke što dovodi do mehanizma za proces adsorpcije metala. Elektrostatička interakcija između metalnih kationa i anionskih liganda u staničnoj stijenci djeluje kao mjesto nukleacije za taloženje više metalnih kationa iz otopine (što potencijalno vodi do biomineralizacije; ovisno o koncentraciji metala u otopini) čiji je krajnji rezultat obilna količina metala na bakterijskoj stijenci, čija je masa često slična masi same bakterijske stanice (BEVERIDGE, 1984). Na ista žarišna mjesta na površini bakterija djeluju i

metali i protoni na koje utječe promjena pH otopine. Neki metali se primarno vežu na različite ligande u staničnoj stijenci poput trovalentnog La i Fe koji se lakše vežu na staničnu stijenu nego jednovalentni kationi Na i K pri interakciji s bakterijom *Bacillus subtilis* (BEVERIDGE i MURRAY, 1976). Čimbenici koji utječu na vezanje metala na stanicu su: ionski potencijal, stehiometrija liganda, tip liganda i kovalentna veza. Zbog većeg naboja i manjih radijusa, trovalentni metali tvore jače veze s organskim ligandima (STONE, 1997).

Procesom aktivne apsorpcije metala bakterije, da bi funkcionirala stanica, „zahtijevaju“ različite metale. Bakterije pomoću funkcionalnih skupina u stanici reguliraju i zadržavaju određene metale potrebne za operativnu cjelovitost, optimalan rast i metabolizam stanice. Adsorpcija metala na površini stanice ima važan utjecaj na dielektrična svojstva jer metalni kationi utječu na provođenje električnih energije niske frekvencije (KONHAUSER, 2007).

### **2.2.3 Biološki inducirana i kontrolirana mineralizacija**

Sinteza minerala tj. biomineralizacija može biti kategorizirana u dvama standardnim modelima: biološki induciranu mineralizaciju (BIM – biologically induced mineralization) i biološki kontroliranu mineralizaciju (BCM- biologically controled mineralization) (GADD, 2010). Za bakterije koje žive u anaerobnim uvjetima značajna je biološki inducirana mineralizacija (BIM). Do biološki inducirane mineralizacije (BIM) dolazi pri modifikaciji lokalnog mikrokruženja mikroorganizmima stvarajući uvjete izvanstanične kemijske precipitacije mineralne faze gdje mikroorganizam ne kontrolira biomineralizacijski proces kao kod biološki kontrolirane mineralizacije (BCM). (BRAZYLINSKI, 2001; HAMILTON, 2003.; DUPRAZ i sur., 2009). Minerali nastali procesom biološki inducirane mineralizacije su nusprodukt međudjelovanja stanice s vodenim okolišem ili su nusprodukt metaboličkih procesa stanice, dok procesom biološki kontrolirane mineralizacije mikroorganizmi precipitiraju minerale potrebne za fiziološke svrhe. Stvaranje minerala procesom biomineralizacije uključuje rast mineralnih jezgri otpornih na otapanje u određenom stupnju prezasićenja. Minerale formirane BIM-om karakteriziraju inkluzije i nedostajanje specifične kristalne morfologije. Minerali nastali BCM-om karakterizira bolja struktura i habitus zbog manje osjetljivosti na vanjske utjecaje naspram BIM-a. Homogenom nukleacijom smatramo nasumično sudaranje iona u prezasićenoj čistoj otopini u kojoj su prisutni

samo mineralni sastojci. Razvoj mineralnih jezgri na površini krutih tvari (npr. idealno raspoređeni ligandi) nazivamo heterogenom nukleacijom. Karakteristike formirane mineralne faze su amorfnost, topivost i manjak strukturne uređenosti s visokim stupnjem hidratacije. Mikroorganizmi doprinose razvoju (većinom pasivno) sitnozrnatih (<1 μm) mineralnih faza te utječu na mineralizaciju na dva načina (KONHAUSER, 2007):

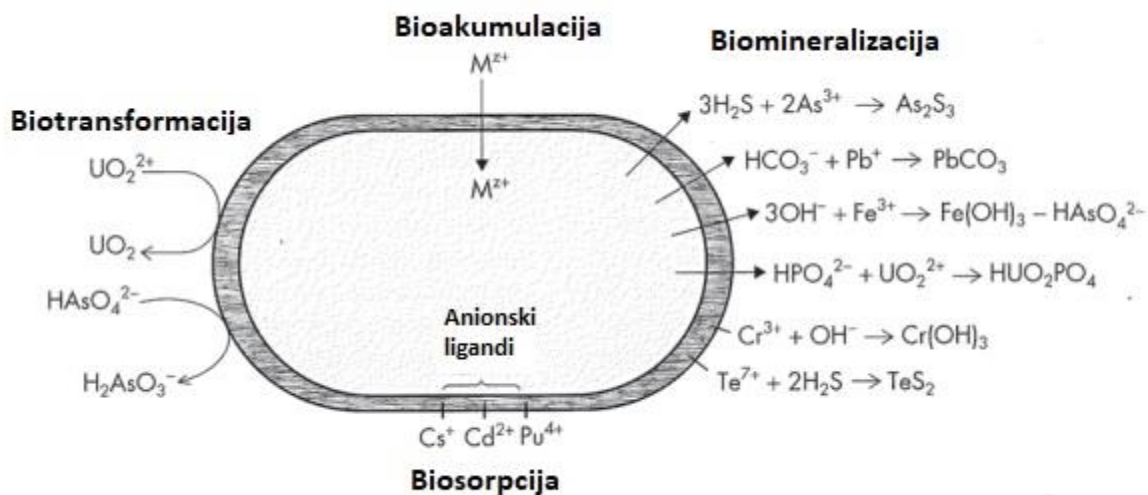
- 1) Metabolizam - aktivnost mikroorganizama može utjecati na zasićenje minerala izlučivanjem metabolita neposredno izvan stanice poput povećanja pH otopine (cijanobakterije), sulfat reducirajuće bakterije potiču stvaranje metalnih sulfida.
- 2) Reaktivna površina – površina stanice sadržava ionizirane ligande koji su mjesta odvijanja apsorpcijskih reakcija. Razmak liganada utječe na vezanje kationa, a neki mikroorganizmi imaju sposobnost određivanja orijentacije početne mineralne jezgre. Mikroorganizmi poboljšavaju kinetiku precipitata u prezasićenim otopinama.

Minerali nastali biološki induciranim mineralizacijskim procesima uključuju Mn, Fe i druge okside metala, karbonate, fosfate, sulfate metala, sulfide metala i Fe-Al silikate. Mineralne tvorevine prvotno neutraliziraju kemijski reaktivna mjesta na stanici, te se nastavlja stvaranje jezgara i nakupljanje iona metala (SOUTHAM, 2000).

Intercelularna biološki inducirana mineralizacija čini nejasnu liniju granice između BCM i BIM. Neke bakterije sadrže bakterioferitine; željezne zalihe proteina koje sadrže dodekaedralnu ljusku koja se sastoji od podjedinica proteina koja prekriva šupljinu. U toj šupljini se može nakupiti željezni oksihidroksilni fosfati. Parovi podjedinica proteina, koji se javljaju između sulfat reducirajućih stanica bakterija, sadrže ferooksidaze koje kataliziraju oksidaciju željeza.

### 2.3. Proces bioremedijacije

Bioremedijacija je proces primjene živih ili mrtvih organizama za razgradnju ili transformaciju „opasnih“ anorganskih i organskih tvari (KONHAUSER, 2007). Nekoliko vrsta procesa bioremedijacije prikazani su na slici 5: Proces biotransformacije reducira visokovalentne metale na netopive metale niže valencije ili obrnutim procesom oksidacije povećava valenciju metala. Mikroorganizmi aktivnim metaboličkim procesom bioakumulacije apsorbiraju metale u stanicu koristeći energiju. Procesom biosorpcije mikroorganizmi pasivno apsorbiraju metale na površinu stanice.



Slika 5. Procesi bioremedijacije (prilagođeno iz LLOYD i MACASKIE, 2000)



## 2.4. Reaktivnost mineralne površine

Primarna teza o faktorima zaslužnim za topivost minerala odvija se između Coloumbovih sila i energije hidratacije iona na površini minerala (BANFIELD i HAMERS, 1997). Ukoliko je energija hidratacije mala, a Coloumbove sile jake, krutina je netopiva, dok je krutina topiva u suprotnom slučaju, što nam i dalje ne govori puno o brzini reakcije otapanja minerala. Prije disolucije molekula i atoma s mineralne površine slijedi niz reakcija (MORSE i ARVIDSON, 2002):

1) Transport reaktanata kroz otopinu do mineralne površine

2) Adsorpcija reaktanata na mineralnu površinu

Na mineralnoj površini

3) Migracija reaktanata na površinu na „aktivno“ mjesto

4) Kemijska reakcija između apsorbiranog reaktanta i minerala, koja može dodatno uključivati nekoliko međufaza u kojima dolazi do hidrolize

5) Migracija hidratiziranih iona dalje od mjesta reakcije i desorpcija u otopinu

6) Transport produkta od mineralne podloge u otopinu cijelostijenskog uzorka

Ukoliko se radi o disoluciji jako topivih minerala čime nastaje zasićena otopina uz površinu minerala, otapanje se regulira procesom raspršivanja iona u nezasićenu „okolnu“ otopinu. Karakteristika jako topivih minerala je glatka površina jer se reakcija odvija veoma brzo te se ne javljaju mjesta „nagrizanja“ na mineralnoj površini. Ukoliko se radi o slabo topivim mineralima ioni se odvajaju od površine relativno brzo što rezultira jednakom koncentracijom iona u otopini i na mineralnoj površini.

Varijable koje utječu na kinetiku disolucije su struktura kristalne rešetke (brzina otapanja ovisi o jačini metal-anion veza), defekti na površini minerala (atomi na površini imaju veću energiju na rubovima defekata kristalne površine zbog manje izloženosti otopini naspram onih čija je veza sa susjednim ionima slabija jer su izloženi otopini s tri strane), orijentacija površine minerala (veća energija atoma na površini minerala nego u kristalnoj strukturi, smanjenjem minerala, površinska reaktivnost raste) redukcija ili oksidacija (redoks reakcije otapanja su važne jer dolazi do izmjena elektrona što mijenja jakost kisik-metal veze) i apsorbirane molekule (apsorbiranjem određenog aniona ili kationa blokira se pristup otopini do reaktivnog mjesta te se stopa otapanja smanjuje).

### 2.4.1. Bakterijska kolonizacija površine

Bakterijska kolonizacija površine uključuje korake:

- a) Migracija bakterija na površinu
- b) Početna adhezija putem elektrostatičke interakcije
- c) Čvrsto vezivanje na površinu unutar biofilma

U podzemnim vodama, transport bakterija posljedica je hidrauličkog gradijenta podzemnih voda. U bezvodnoj zoni, na transport bakterija utječe zasićenje plinom. Neke bakterije u vodi imaju mogućnost transporta pomoću bičeva. Drugi oblici pokretljivosti su klizanje i ronjenje pri čemu je potrebna interakcija stanice s drugom stanicom (KONHAUSER, 2007) .

Reverzibilna adhezija tj. početna interakcija minerala i bakterije je sila velikog dometa koja privlači bakteriju na površinu minerala na udaljenosti od 5-10 nm bez fizičkog kontakta između stanice i minerala (MARSHALL i sur., 1971). Prevladavanjem sila odbijanja, bakterija se približava površini, a sile poput vodikovih veza određuju jačinu adhezije, odnosno prijanjanja bakterije na površinu.

Vezanje bakterija na mineralnu podlogu regulirano je površinskim nabojem stanice i površine koji se mogu promijeniti adsorpcijom organskih ili anorganskih spojeva. Adsorpcijom organske tvari na stanicu može dovesti do povećanja negativnog naboja površine (KONHAUSER, 2007).

### 2.4.2.. Model adsorpcije metala

Za reakciju adsorpcije metala na površinu stanice bakterije koristi se model adsorpcije metala:

$$(4) \quad M_B = K_d M_D$$

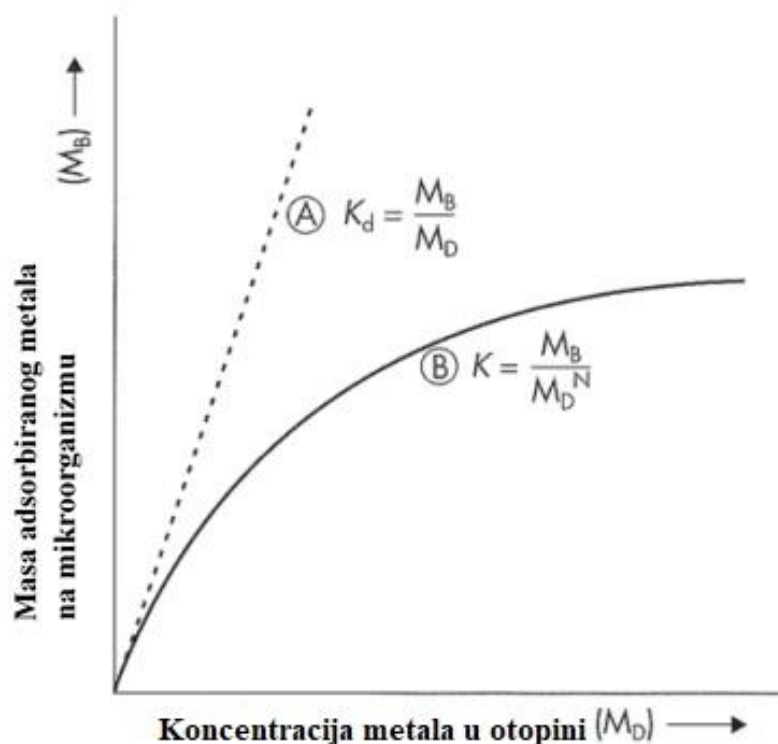
Gdje  $M_B$  označava masu adsorbiranog metala po jedinici mase suhe bakterije ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ),  $M_D$  koncentraciju otopljenog metala u ravnoteži s površinom stanice bakterije ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), a  $K_d$ , odnosno koeficijent distribucije predviđa količinu adsorbiranog metala na biomasu bez gornje granice adsorpcije. Navedena jednadžba može se prikazati grafom adsorpcijske izoterme, gdje postoji

linearna veza između koncentracije metala u otopini i količine adsorbiranog metala na mikroorganizmu.

Freundlich-ova izoterma opisuje adsorpciju koncentracije metala u većem rasponu:

$$(5) \quad M_B = K M_D^N$$

Ukoliko je parametar  $N = 1$  jednadžba postaje linearna adsorpcijska izoterma, ako je  $N > 1$ , tada se opseg adsorpcije povećava s povećanjem koncentracije metala, a ako je  $N < 1$ , adsorpcija se smanjuje s povećanjem koncentracije metala ( $N$  postaje nagib izoterme ukoliko se logaritmiraju navedena jednadžba, a grafikon se linearizira), (KONHAUSER, 2007), (Graf. 1).

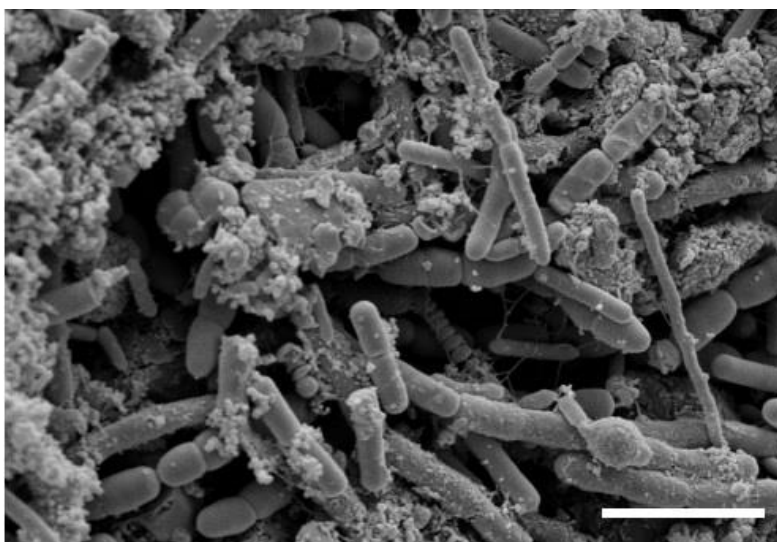


Graf. 1. Prikaz modela distribucije -  $K_d$  (A) i Freundlich-ove izoterme (B) (KONHAUSER, 2007).

Pri najnižim otopljenim koncentracijama događa se najveća adsorpcija metala što odgovara najstrmijem dijelu izoterme. Pri sve višim koncentracijama, sklonost kationskom vezanju postupno se smanjuje pošto su sva „mjest“ adsorpcije zauzeta te se linija izoterme poravnava.

## 2.5. Bakterijski biofilm

Bakterije pomoću biofilma koji se sastoji od visoko hidratiziranih izvanstaničnih polimera (EPS) zadržavaju vodu i time pojačavaju frakturu minerala i druge kemijske reakcije (Slika 6). Neke stanice mikroorganizama s uklonjenim slojem EPS-a nisu bile u mogućnosti kolonizirati mineralnu podlogu dok se sloj EPS-a nije obnovio. Formiranje biofilma započinje adsorpcijom proteina, kiselina i polisaharida te manjih molekula poput lipida. Zbog formiranja biofilma može doći do promjene površinskog naboja ili do adsorpcije iona iz otopine. Jednom kada stanica mikroorganizma dođe u kontakt s površinom minerala, ona se može ali i ne mora „zalijepiti“ za nju. „Učinkovitost lijepljenja“ je odnos broja stanica koje prijanjaju na površinu i broj transportiranih stanica na neku površinu. Neposredno nakon prijanjanja stanice na površinu, započinje proizvodnja EPS-a. EPS omogućava negativno nabijenim stanicama da se zalijepe neovisno o naboju površine (LITTLE i WAGNER, 1997).



Slika 6. Prikaz bakterijskog biofilma skenirajućim elektronskim mikroskopom (skala – 2  $\mu\text{m}$ ) (JI-DONG, 2005).

Povećanje tolerancije bakterija na visoku koncentraciju metala može dovesti do genetske mutacije bakterija odnosno do nekoliko „pogrešaka“ u DNA tijekom replikacije. Ukoliko se na populaciju bakterija primijeni promjena koja dovodi do mutacije, bakterije koje steknu povoljnu mutaciju dominirat će cijelom populacijom. Genetskom mutacijom *A.ferrooxidans* poboljšava procese izluživanja metala do deset puta.

## 2.6. Biorudarenje

Industrijsko bioizluživanje koristi se za ekstrakciju metala poput zlata, bakra i urana. Navedeni proces se još zove biorudarenje u čijem postupku se najčešće koriste bakterije roda *Acidithiobacillus*, *Acidithiobacillus thiooxidans* i *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Većina metoda bioizluživanja bakra ili zlata koristi postupak navodnjavanja koji uključuje ispiranje otopina kroz rudu naslaganu na hrpe. Trenutno, proces bioizluživanja/biorudarenja bakra čini 30% svjetske proizvodnje bakra. Acidofilne bakterije mogu mobilizirati metale iz otpadnih ruda i stvarati kiselu drenažu koja predstavlja ozbiljan problem za okoliš. Redukcija metala koja rezultira imobilizacijom primjenjuje se u proizvodnji novih biomaterijala i katalizatora kao i u bioremedijaciji. Mikroorganizmi mogu reducirati plemenite metale npr. topivo zlato Au (III) u netopivo Au (0) (GADD, 2010). Oplemenjivanjem supergenetskog zlata, mobilnost zlata pripisana je tiosulfatnim i kloridnim ionima dva liganda, sposobna formirati topivi zlatni kompleks, ovisno o geokemiji samog okoliša (BOYLE, 1979). Kemolitotrofne bakterije pridonose stalnom ciklusu procesa topljenja i ponovne reprecipitacije zlata. Učinci biokemijskog trošenja primarnih rudnih ležišta metalnih sulfida važni su jer mogu voditi do oplemenjivanja te nam pružaju dobar uvid u evoluciju rudnih ležišta kroz vrijeme. Iz ekonomske perspektive, oplemenjivanje i mobilnost metala na Zemljinoj površini usmjereni su na istraživanje pripovršinske zone trošenja i unaprijeđenu primjenu bioizluživanja u „siromašnim“ rudama i popratnih minerala od prerade.

Jedan od bitnih faktora je i pasivizacija. Naime, pri bioizluživanju minerala bakrenih sulfida stvara se gusti pasivizacijski film na površini minerala koji usporava prijenos metalnih iona, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i ostalih nutrijenata između minerala i izluživane otopine što može usporiti izluživanje bakra (CÓRDOBA i sur., 2009).

Prilikom industrijske eksploatacije rudnog ležišta utjecaj vlage i zraka uzrokovano rudarskim procesima dovodi do oksidacije rudnog minerala tj. rudnih metalnih sulfida koja je dodatno potpomognuta aktivnošću bakterija, a zatim površinske vode koje cirkuliraju kroz ležište otapaju i transportiraju oksidiranu rudu. Liksivijant može biti voda niskog pH, vodena ili kisela otopina koja sadrži Fe<sup>3+</sup> sulfid od prethodnog procesa bioizluživanja. (EHRlich i NEWMAN, 2009).

Bio/izluživanje bakra se može izvoditi pomoću više različitih vrsta izluživanja poput:

**1) Jalovišna izluživanja (eng. *dump leaching*)**

Izluživanje na već postojećem rudniku koji je prije smatran otpadnom rudom. Ovaj tip izluživanja ne koristi adekvatnu opremu za redukciju i oslanja se na miniranje.

**2) In situ izluživanje**

Izluživanje rude na mjestu bez odvajanja rude od rudnog tijela.

**3) Hrpsto izluživanje (eng. *heap leaching*)**

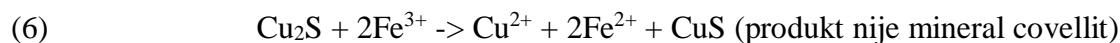
Zdrobljena ruda je stavljena na prethodno postavljenju podlogu, te se ruda slaže u slojevima.

**4) Izluživanje na stalnoj podlozi (eng. *permanent pad leaching*)**

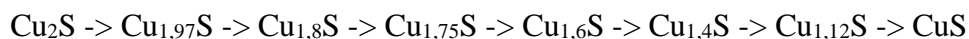
Postavljanje rude u slojevima na prethodno postavljenju podlogu bez micanja starog sloja rude (SCHNELL, 1997).

Bitno je napomenuti da je veoma važna razlika između jalovišnog i hrpastog izluživanja. Prilikom procesa hrpastog izluživanja ruda mora biti usitnjena, dok se ruda ne usitnjava i ostavlja se u „komadu“ pri jalovišnom izluživanju.

Najčešći sekundarni minerali bakra koji se razmatraju u jalovišnom bioizluživanju je halkozin ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) i covellit ( $\text{CuS}$ ). Prema Salivanu (1930) se smatralo da se halkozin otapa u dva koraka:



Objavljena je studiju izluživanja halkozina sa  $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})$ , te je otkrivena cijela serija nestehiometrijskih bakrenih sulfida. Iz ovog je vidljivo da je moguća cijela serija halkoznih mineralnih sekvenci:



halkozin    djurleit    digenit    anilit    gerit    spionkopit    jarovit    covellit

Na industrijski proces izluživanja bakra fizičke i kemijske varijable utječu na proces izluživanja. Neke od njih su: reaktivne površine, stupnja kiselosti, oksidansi, aglomeracija, vrijeme zrenja, propusnost, temperatura, nutrijenti, željezo i bakterijska inokulacija. Iako se na početku procesa izluživanja uzorak tretira određenom količinom kiseline, koja rezultira kemijskim luženjem bakra, također bi se trebao održavati povoljna pH vrijednost za rast bakterija. Poželjna pH vrijednost iznosi 1.8 - 2.2. Tipične kisele otopine variraju koncentracijama 6.0-8.0 g/L sumporne kiseline. Bakterije, korisne za bioizluživanje, zahtijevaju određenu količinu amonijeva nitrata i fosfata u obliku  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Doza tih nutrijenata bi trebala biti 10-20 mg/L  $\text{NH}_4^-$  i 30-40 mg/L  $\text{PO}_4^{3+}$  (SCHNELL, 1997). Mineralogija rude utječe na bakterijsku aktivnost, pa je potrebno izvršiti testiranje same rude i njenu kompatibilnost s bakterijama. Također je važna kvantiteta i mogućnost dovođenja sulfida bakterijama koje obavljaju proces izluživanja. Bakterijsko izluživanje bakra najčešće uzrokuje konverciju  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$ . Postoje razne diskusije na temu koliko je potrebno željeza za iskoristivo izluživanje bakra. Lagano je izračunati potrebnu količinu željeza za izluživanje određene količine bakra samo ako se pretpostavlja da  $\text{Fe}^{2+}$  samo jednom prijeđe u  $\text{Fe}^{3+}$ , te ako samo  $\text{Fe}^{3+}$  sulfati sudjeluju u izluživanju bakra. Činjenica koja komplicira ovaj izračun jest konverzija  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$  koja se može dogoditi više puta, ovisno o bakterijskoj aktivnosti i dostupnosti kisika. Također, ako je konverzija bakra direktan rezultat bakterijske aktivnosti ovaj izračun postaje nevažeci.

Rudnici koji se bave biorudarenjem jesu: San Manuel u Arizoni, Baya Ley i Quebrada Blanca u Čileu (slika 7).



Slika 7. Prikaz rudnika Quebrada Blanca u Čileu (URL 2)

### 2.6.1. Faktori koji utječu na proces bioizluživanja:

Učinkovitost bioizluživanja prvenstveno ovisi o učinkovitosti mikroorganizama, sastavu rude i optimalnim uvjetima za rast bakterija.

- **pH vrijednost**

pH vrijednost okoliša kontrolira distribuciju mikroorganizama te je nužan uvjet za rast bakterija i proces izluživanja. Za bakterijsku oksidaciju sulfida i željeza optimalan raspon pH je između 2 do 2,5. Ukoliko vrijednosti pH padnu ispod 2,0 doći će do inhibicije umnožavanja *T. ferrooxidans* koji se može prilagoditi uz dodavanje kiseline u medij (KLAUS i BOSECKER, 1997). U jalovišnom i hrpastom procesu izluživanja važno je pratiti promjene u različitim koncentracijama kiseline od vrha nakupine rude do samog dna. Zbog razlike u koncentraciji kiseline ovaj postupak je veoma kompleksan i kao takav utječe na konstrukciju masovnih rudnih slojeva. Adaptacija bakterija pripomaže situaciji, no ukoliko postoji dovoljna količina slobodnog kisika stvorit će se bakterijska fronta kroz slojeve poslagane rude.

- **Temperatura**

Temperatura je važan parametar za mikrobnu aktivnost. Povećanjem temperature ubrzava se i biokemijska reakcija. Bakterije *T. ferrooxidans* i *T. thiooxidans* „rastu“ najbolje pri temperaturi između 20 i 35 °C iako je evidentirana aktivnost i izvan navedenih mjera. Pri prekomjerno visokim temperaturama dolazi do promjene u konfiguraciji proteina i nukleinske kiseline. Bakterijska se aktivnost dvostruko umanjuje svakih 7 stupnjeva pada temperature (SCHNELL, 1997). Toplina unutar samih slojeva rude postavljenih za izluživanje u procesima rudarenja generalno je određena nekim faktorima: lokalna klima, razina evaporacije, temperatura reakcije, temperatura navodnjavanja i razina navodnjavanja. Te se varijable moraju definirati prije početka same operacije izluživanja.

- **Mineralna podloga**

Brzina izluživanja ovisi o ukupnoj površini podloge. Smanjenje veličine čestica povećava količinu aktivnih ploha što doprinosi poboljšanju eksolucije metala.



- **Nutrijenti i teški metali**

Mineralni nutrijenti se dobivaju iz okoliša i iz materijala koji se izlužuju. Mikroorganizmi posjeduju niz gena koji služe za aktiviranje određenih proteina dizajnirani za olakšavanje transporta metala u stanicu ili oslobađanja stanica od njih kroz njihov izljev, biometliciju, isparavanje ili imobilizaciju (NIES, 2000).

Za umnožavanje kemolitoautotrofnih bakterija potrebni su anorganski spojevi. Bakterije roda *Thiobacillus* ili tiobacili imaju veliku otpornost na teške metale. Izluživanje metalnih sulfida uzrokuje povećanje metalne koncentracije u procesima biorudarenja.

- **Kisik i ugljikov dioksid (O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>)**

Preduvjet za proces bioizluživanja je adekvatna koncentracija otopljenog kisika u vodi. U laboratorijskim uvjetima mogu se postići uvjeti dovoljne količine kisika, međutim u industrijskim uvjetima poput hrpastog lučenja određene količine kisika mogu uzrokovati probleme. CO<sub>2</sub> jedini je izvor ugljika pri procesu bioizluživanja u rudnicima. U teoriji rast bakterija u hrpastoj metodi izluživanja ima najveću iskoristivost u vršnih 1,5 m zbog ograničenja difuzije kisika kroz gornji sloj (SCHNELL, 1997). Da bi se poboljšala difuzija kisika kroz rudu uvedena je metoda cikličnog navodnjavanja, koja poboljšava unos kisika u dublje dijelove izluživanog dijela. U jalovišnim slojevima rude najbolji model upuhivanja zraka u rudu je od dna hrpe čime se poboljšava bakterijska aktivnost i skraćuje vrijeme ciklusa izluživanja.

## 2.7. Bakrena porfirna ležišta

Porfirna ležišta pripadaju magmatsko-hidrotermalnoj vrsti ležišta koja su vezana uz subdukcijske zone, aktivne kontinentalne rubove i otočne lukove (slika 8). To su velika ležišta koja mogu sadržavati manje količine Au, Ag i Mo. Razlikujemo više tipova porfirnog ležišta prema sastavu: volframsko-molibdenska, molibdensko-bakrena i bakreno-molibdenska. Odsutnost ili prisutnost rude ovisi o mogućnosti formiranja velikog hidrotermalnog sistema. Centralni dio intruzije je porfiran dok vanjski rub karakteriziraju srednje velika zrna. Bakrena ležišta nalazimo vezana uz I-tip granita te su ovakva ležišta vezana uz hidrotermalne procese na koje ukazuje precipitacija kvarcnih žila te hidrotermalne alteracije. Magmaška voda, koja ima bitnu ulogu u formiranju porfirnih ležišta, obogaćena je na mobilne elemente poput Na, Ca, K, Mg,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  te na cijeli niz aniona, uključujući bikarbonate i bisulfide. I-tip i S-tip magmatizam ima bitnu ulogu pri formiranju navedenog ležišta. Bakreno-molibdenska i molibdensko-bakrena ležišta nastaju iz oksidiranih magmi I-tipa, a volframsko-molibdenska iz reducirajućih magmi S-tipa.

Magmatsko-hidrotermalne fluide moguće je promatrati na dva načina: recentnim geotermalnim poljima ili aktivnim vulkanima. Do procesa miješanja meteorske vode i magmatskog fluida dolazi u aktivnom geotermalnom polju, gdje naglim smanjenjem temperature na površini polja može nastati silika sinter odnosno precipitacija minerala te se topivost  $SiO_2$  smanjuje.

Na aktivnom vulkanu dolazi do velikog broja alteracija i prodora magmatskih fluida na površinu. Pošto se često precipitira elementarni sumpor na površini vulkana može se zaključiti Eh i pH magmatskog fluida. Neki metali će prilikom ključanja ostati u taljevini, a neki poput Au i Cu preferirano odlaze u volatilnu fazu što je produkt nastanka Cu i Au ležišta u područjima subdukcijskog magmatizma. Ukoliko dođe do ključanja u sustavu te razdvajanja hiperslanih inkluzija i parom bogatih inkluzija, parom bogate inkluzije bit će obogaćene na Cu. Niskoslani fluidi bogati su na volatilnu fazu odnosno na  $CH_4$ ,  $H_2S$ ,  $H_2O$ . Bisulfidni kompleks ( $Cu(HS)_2$ ) je oblik  $H_2S$ -a (koji je volatilna komponenta) koji „bježi“ u volatilnu fazu i veže na sebe Cu. Porfirna ležišta bakra vežemo uz I. ključanje. I. ključanje se javlja na manjim dubinama zbog pada pritiska u magmatskoj komori dok II. ključanje nastaje na većim dubinama zbog kristalizacije bezvodnih minerala. Viskozne magme koje se lakše kreću prema površini pogoduju procesu I. ključanja (andezitne taljevine) i mineralizacije. I-tip taljevina koju nalazimo vezanu uz Cu i Mo ležišta

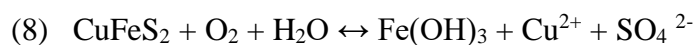
najčešće je vezana uz subdukcijske zone. Iako su oba elementa vezana uz I-tip magmatizma, postoji negativni trend između Mo i Cu. Pošto Cu ležišta nastaju na manjim pritiscima u plićim dijelovima za očekivati je proces I. ključanja te ukoliko dođe do pada pritiska Cu prelazi u oslobođene fluide koji putuju kroz okolne stijene što u konačnici dovodi do mineralizacije. Ukoliko dođe do kristalizacije, Cu ulazi u kristalnu strukturu minerala zbog većeg koeficijenta distribucije između Cu naspram Mo. Dakle, dolaskom do II. ključanja i kristalizacije bezvodnih minerala, u njihovu strukturu će ući i Cu. Time taljevina ostaje obogaćena Mo jer Mo neće ući u bezvodne minerale, međutim, oslobođenjem fluida iz taljevina, navedeni će fluid biti obogaćen Mo. Ukoliko dođe do preranog II. ključanja, neće doći do nastanka Cu ležišta. Porfirna ležišta vezemo uz andezit koji je nositelj mineralizacije te se ležište može podijeliti u nekoliko hidrotermalnih alteracijskih zona (SILLITOE, 1973):

- a) Kalijaska alteracija
  - K- feldspati, biotit, alteracija amfibola u hidrotermalni biotit, sericitizacija plagioklasa
- b) Filitna (sericitna) alteracija
  - Kvarc i sitnozrnati sericit, klorit, biotit, pojava sulfida
- c) Argilitna alteracija
  - Smektiti, kaolinit, ilit
- d) Napredna argilitna alteracija
  - Kvarc, alunit, kaolinit, pirofilit
- e) Propilitna alteracija
  - Klorit, sulfidi, kalcit, epidot ili zeoliti
- f) Natrijsko-kalcijska alteracija
  - Albit, magnetit, granati, pirokseni, aktinolit

Oblik cilindra i pločasta rudna tijela su najčešće forme rudnih ležišta. Mineralizacija teži izgradnji koncentričnih rudnih zona. Jezgra ležišta, vrlo siromašna rudnom, sadrži halkopirit, pirit i molibden. Zone upućuju na promjenu pH i temperature mineralizirajućih zona. Odsustvo mobilnih kationa K, Na, Mg i Ca u mineralima ukazuju na niski pH, odnosno, radi se o argilitnoj zoni ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$  itd). Pristnost klorita, epidota, dolomita i kalcita ukazuju na neutralni pH.

Minerali s OH skupinom indikatori su pada temperature, odnosno pri nižim temperaturama dolazi do bolje hidratiziranosti. Kvarc, andaluzit i alunit indikatori su niskih pH uvjeta. Zbog kiselosti magmatskih fluida (pH = 1-2) te njihovog kontakta s okolnim stijenama dolazi do procesa hidrotermalnih alteracija. Udaljavanjem magmatskog fluida od centra ležišta prema površini može doći do dodatnog izdvajanja parne faze iz tekućine koja je obogaćena na Cu. Pri temperaturama od 400°C plastičan sustav ne dopušta ulaz meteorske vode koja tek naknadno prodire u sustav sniženjem temperature na 300°C kada se magmatska aktivnost smanjuje. Meteorska voda oksidira i hladi cijeli sustav te dolazi do oksidacije pirita što izaziva smanjenje pH uvjeta i dovodi do formiranja napredne argilirne/argilirne alteracije. Izlaganjem porfirnog tijela atmosferskim uvjetima nastaje zona željeznog šešira u kojem dolazi do oksidacije sulfida.

Primjer halkopirita:

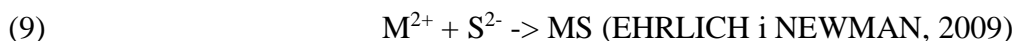


Slika 8. prikaz lokacija porfirnih Cu ležišta u području Čilea (SILLTOE, 2010)

## 2.8. Bioizluživanje sulfidnih minerala

Većina metalnih sulfida su magmatskog i hidrotermalnog postanka, dok biogeni postanak pripisujemo nekolicini sedimentnih ležišta. Neki mikroorganizmi imaju veliku ulogu u oksidaciji sulfidnih minerala (neovisno o genezi tih minerala). Sulfat reducirajuće bakterije imaju značajnu ulogu u formaciji određenih sulfidnih minerala, posebice pirita ( $\text{FeS}_2$ ), (EHLICH i NEWMAN, 2009). Sulfat reducirajuće bakterije su u međudjelovanju u anaerobnim uvjetima sa sulfatom. Ispuštaju ione sulfida te proizvode željezno sulfidne minerale u uvjetima s dovoljnom količinom željeza. Biomineralizacija sa sulfat reducirajućim bakterijama započinje imobilizacijom FeS na površinu stanice kroz interakciju  $\text{Fe}^{2+}$  s biogenim  $\text{H}_2\text{S}$  i naponom anionske površine stanice (FORTIN, 1994). Prisutnost metalnih sulfida u sedimentima od velike su važnosti; produkt su anaerobnog bakterijskog djelovanja na sulfate što možemo potkrijepiti jednim od načina geneze pirita ( $\text{FeS}_2$ ); bakterije stvaraju  $\text{H}_2\text{S}$  koji reagira s Fe. Sulfidna neželjezovita ležišta bigenog postanka su veoma rijetka. Metalni sulfidi (neovisno o načinu postanka – abiogenetsko ili giogenetsko podrijetlo) mogu biti u reakciji oksidacije bakterijama.

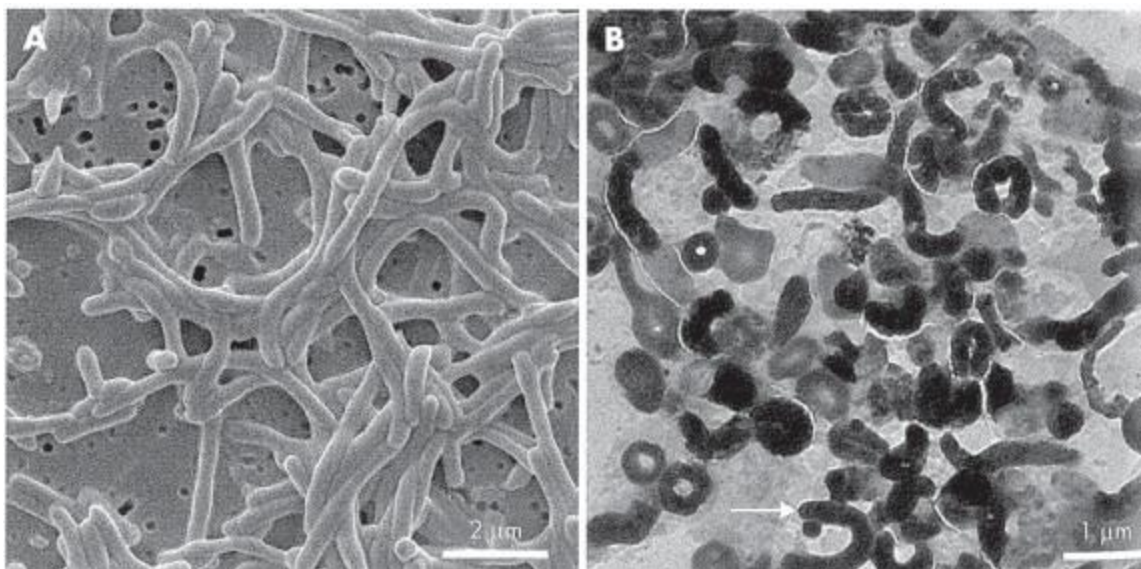
Metalni sulfidi u prirodi su produkt reakcije između metalnog iona i sulfidnog iona biogenog ili abiogenog podrijetla:



Metalni sulfidi se lako stvaraju na sobnoj temperaturi i tlaku zbog svoje relativne netopivosti. Mikroorganizmi mogu oksidirati metalni sulfid direktno ili indirektno. Ukoliko mikroorganizmi oksidiraju metalni sulfid na mineralnoj površini radi se o direktnoj interakciji, dok u indirektnoj reakciji mikroorganizmi stvaraju oksidans koji reagira s metalnim sulfidom, odnosno oksidiraju Fe (II) ione u ione Fe (III). Neki mikroorganizmi mogu mobilizirati metale u metalnim sulfidima indirektno stvarajući kisele ligande koji otapaju metale i stvaraju topive metalne komplekse. Elektroni koji se izvlače iz metalnog sulfida smanjuju količinu kisika pomoću redoks lanca koji se nalazi ispod vanjske membrane bakterije. Mezofilne bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, i arheje *Ferroplasma acidarmanus* i *F. acidiphilium*, termofilne bakterije *Alicyclobacillus tolerans* i *Acidimicrobium ferrooxidans* i ekstremne termofilne arheje *Sulfolobus spp.* i *Acidianus brierleyi* su atotrofne (osim *F. acidarmanus*) željezo-oksidirajuće bakterije koje najčešće nalazimo pri procesu oksidacije metalnih sulfida (EHLICH i NEWMAN,

2009), (slika 9). Većina autotrofnih bakterija žive pri pH uvjetima 1,5 -2,5. Bakterije i arheje također možemo podijeliti na temelju reakcije oksidacije, neki rodovi bakterija poput *L. ferrooxidans* oksidiraju  $Fe^{2+}$ , ali ne oksidiraju reducirani sumpor kao bakterija *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Bakterije generiraju liksivijant ( $Fe^{3+}$ ) pri niskim pH uvjetima koji oksidira sulfidnu rudu u procesu indirektno oksidacije metalnih sulfida. *A. ferrooxidans* i ostale željezo-oksidirajuće bakterije generiraju  $Fe^{3+}$  iz željeza indirektnom oksidacijom gdje se  $Fe^{3+}$  u kiselom mediju ponaša kao oksidans za metalne sulfide. Kako bi se  $Fe^{3+}$  zadržao u otopini, u laboratorijskih uvjetima pH otopine mora biti manji od 5. U prirodi, kiselina niske pH vrijednosti nastaje bakterijskom oksidacijom sumpora, oksidacijom  $Fe^{3+}$  ili oksidacijom pirita.



Slika 9. SEM fotografija *Acidithiobacillus ferrooxidans* na membranskom filtru (A), TEM fotografija biofilma *Leptospirillum ferrooxidans* (KONHAUSER, 2007)

Količina  $Fe^{2+}$  može utjecati na rast i razvoj bakterija. Velika količina  $Fe^{3+}$  (nakon oksidacije  $Fe^{2+}$ ) može dovesti do stvaranja jarosita što usporava procese izluživanja. Jarosit i sumporni film glavni su pasivizacijski filmovi u procesu bioizluživanja sulfida bakra. Slojevi jarosita i sumpornog filma mogu ometati prijenos  $O_2$ , metalnih iona, hranjivih sastojaka i  $CO_2$  između otopine za ispiranje i mineralne površine što može ometati daljnje izluživanje bakra.

Interakcije mineralne površine i mikroorganizama rezultiraju kemijskim promjenama na površini mikroorganizama:

- Površine mikroorganizama koji su uzgojeni u medijima s  $\text{Fe}^{2+}$  karakterizira promjena naboja naspram onih uzgojenih na čvrstom supstratu (pirit/sumpor). Promjena naboja na površini stranice mikroorganizama propisuje se većoj količini proteina u potonjem (SHARMA i sur., 2003).
- Prisutnost proteinskog dodatka na površini stanice potpomaže adheziji
- Organski spojevi koji sadrže sulfhidrilnu skupinu reagiranjem s sulfidnom površinom oslobađaju sumpor i željezo.

### 2.8.1. Mineral djurleit

U nekoliko studija, gdje je promatran Cu-S sistem, dokazano je da postoje dvije faze  $\text{Cu}_x\text{S}$  pri sobnoj temperaturi, gdje je  $x$  približno 2. Stehiometrijska faza  $\text{Cu}_2\text{S}$  poznata je pod nazivom halkozin (tablica 2). Halkozin je hipergen ili supergen rudni mineral bakra. Mineral djurleit otkriven je 1958. godine u rendgenskom istraživanju Cu-S kada se otkrilo postojanje faze gdje je  $x = 1,96$ . X u djurleitu „leži“ u rasponu od 1,934 i 1,965 ( $\pm 0,002$ ), (HOEARD i EVANS, 1979).

Tablica 2. Usporedba karakteristika minerala halkozina i djurleita

	<b>DJURLEIT (slika 10)</b>	<b>HALKOZIN(slika 11)</b>
Kemijska formula	$\text{Cu}_{31}\text{S}_{16}$	$\text{Cu}_2\text{S}$
Kristalni sustav	Monoklinski	Monoklinski
Kristalni razred	2/m	2/m
Prostorna grupa	$P2_1/n$	$P 2_1/c$
Dimenzije jedinične ćelije	a = 26,9 b = 15,75 c = 13,57 Z = 8 beta = 90,13°	a = 11,881 Å b = 27,323 Å c = 13,491 Å Z = 96 beta = 116,35°
Habitus	Masivan, prizmatički kristali	Masivan, kristali pseudoheksagonski
Boja	Crn do siv	Crnosiva do crna
Crt	Crn	Crn
Sjaj	Metaličan	Metaličan
Tvrdoća	2 1/2 - 3	2 1/2 - 3
Gustoća	5,749 (izračunata)	5,97 (izračunata)
Kalavost	/	{110}
Lom	Nepравilan	Školjkast



Slika 10. mineral djurleit (URL 3)

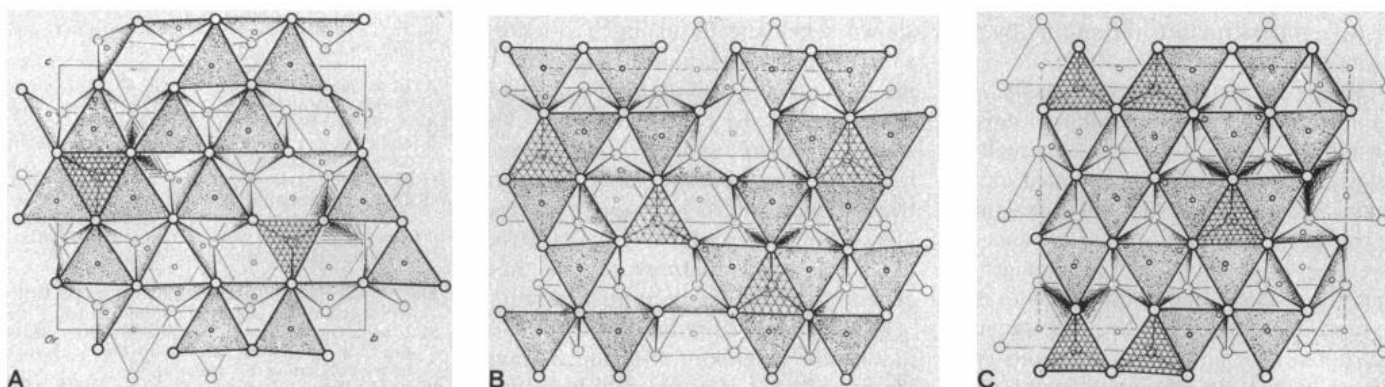


Slika 11. mineral halkozin (URL 4)

Niskotemperaturni halkozin i djurleit zagrijavanjem prelaze u visokotemperaturni neuređeni halkozin. Niskotemperaturni halkozin i djurleit se vrlo često zajedno nalaze u rudnim ležištima. Strukture djurleita i niskotemperaturnog halkozina temelje se na heksagonski gusto raspoređenim atomima sumpora s atomima bakra u međuprostoru. Pri temperaturi od oko 100°C položaj atoma



bakra (s velikom ionskom vodljivošću) u strukturi se poremeti te dolazi do formacije visokotemperaturnog halkozina. Tijekom procesa hlađenja, atomi bakra i sumpora tvore strukturu karakterističnu za niskotemperaturni halkozin i djurleit. Dimenzije ćelije halkozina i djurleita su utvrđene metodom najmanjih kvadrata rendgenskom analizom uzorka u prahu, rezultati su bili dovoljno jasni da se utvrdi monoklinska struktura. Djurleit je po pitanju kristalne strukture različit od halkozina, te se pretpostavlja rompska struktura. Naknadno je dokazano da je kristalna struktura djurleita ( $\text{Cu}_{1,938}\text{S}$ ) monoklinska. Navedenu strukturu čine gusti heksagonalni slojevi atoma sumpora u kojima atomi bakra popunjavaju pozicije u centrima heksagona. Naknadno je utvrđeno da 75% pozicija u strukturi djurleita popunjeno je atomima bakra, potpuno popunjena takva struktura karakteristična je za kovelit. Kristalnu strukturu djurleita nije bilo moguće odrediti dok nije nađen samostalni kristal u rudniku olova Ozark u SAD-u. Samostalni kristali djurleita formirani su pri temperaturi manjoj od  $95^\circ\text{C}$ , u protivnom (pri višoj temperaturi) kristali djurleita bi bili u formi sraslaca. Nakon rendgenske analize djurleita utvrđeno je 32 atoma sumpora u asimetričnoj ćeliji, ali samo 62 atoma bakra. Djurleit čine dva različita sloja sumpora i tri različita međusloja. Svaki atom bakra u niskotemperaturnom halkozinu i djurleitu vezan je s dva do osam susjednih atoma bakra u udaljenosti manjim od  $3 \text{ \AA}$ . (slika 12). Mehanizmi formiranja djurleita i niskotemperaturnog halkozina nisu u potpunosti razjašnjeni. Ova struktura nastaje pri kristalizaciji ispod  $100^\circ\text{C}$ , iako su raspored i popunjenost strukture su nekarakteristični za strukture sulfida. Zbog neuobičajeno kraće a osi u jediničnoj ćeliji dolaze do izražaja neke druga atomske privlačne veze (Cu – Cu) što dovodi do iskrivljavanja nestabilnih struktura.



Slika 12. Prikaz strukture djurleita duž osi a u tri dijela. Osjenčani trokuti prikazuju  $\text{CuS}$  skupine, dok su tetraedri prikazani kao trokutasto iscrtkani likovi (HOEARD i EVANS, 1979).

### 3. Materijali i metode istraživanja

Uzorci djurleita prikupljeni su u pofirnom ležištu u Antofagasti. U svrhu istraživanja odabrani su i analizirani uzorci djurleita s primjetno trošenom površinom minerala (DJ, T2 i P2). Pri tome uzorak DJ predstavlja cijelostijenski uzorak djurleita (eng. *bulk*), uzorak T2 predstavlja površinu minerala djurleita sa smeđasto-crvenkastom koricom, a P2 uzorak površine minerala djurleita bez smeđasto-crvenkaste korice.

#### 3.1. Detektiranje bakterija i Metoda bojenja po Gramu

Kako bi se determinirale acidofilne bakterije u uzorku minerala djurleita, 1.0-, 0.5-, i 0.1-g alikvota stavljeno je u epruvetu s *Leptospirillum* HH medijem (DSMZ medij 882) i inkubirani su u mraku 7 dana na temperaturi od 25°C (HRENOVIĆ i sur., 2014).

Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije raspoznaju se na temelju Metode bojenja po Gramu, odnosno dodavanja kristalvioleta, lugola, etanola i safranina. Dodavanjem kristalvioleta sve bakterije se oboje u ljubičastu boju, a dodavanjem lugola fiksira se boja. Ukoliko je mreža peptidoglikana „rijetka“ etanol ispire primarnu boju, što znači da će bakterije s većom količinom peptidoglikana (Gram - pozitivne) ostati obojene. Dodavanjem safranina Gram-negativne bakterije poprimaju crvenu ili ružičastu boju.

#### 3.2. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)

„X-ray diffraction“ ili rendgenska difrakcijska analiza osnovna je metoda u istraživanju minerala. Navedena analitička metoda primjenjuje se u identifikaciji faza kristalizirane tvari, istraživanju kristalne mineralne strukture, odnosno računanju parametara jediničnih ćelija i promatranje pojave novih faza što je posljedica raspada originalne kristalne strukture. Elektromagnetski valovi (rendgenske zrake) valnih duljina od 0.01 do 10 nm je istog reda veličine udaljenosti među atomima u kristalnoj strukturi. Do raspršenja primarnog snopa dolazi zbog interakcije elektronskog omotača atoma i rendgenskih zraka. Do pojave difrakcijskog maksimuma i interferencije dolazi zbog difrakcije rendgenskih zraka s određenih mrežnih ravnina. Braggovim zakonom opisuje se navedena pojava:

$$(10) \quad n \lambda = 2d \sin \theta$$

gdje je  $n$  cijeli broj i označava red difrakcije,  $\lambda$  valna duljina (primijenjenog) rendgenskog zračenja,  $d$  funkcija međumrežnog razmaka između mrežnih ravnina indeksa  $hkl$ , a  $\theta$  difraktirani i upadni kut pod kojim dolazi do difrakcije rendgenskog zračenja. Difraktogram, koji se dobije snimanjem uzorka pod različitim kutovima, uspoređuje se s difraktogramima standarda. Rendgensko zračenje nastaje grijanjem katode što je rezultat oslobađanja elektrona te njihovo udaranje velikom brzinom u metalnu anodu. Prije samog procesa, uzorak je potrebno samljeti u sitan prah. Analiza rendgenske difrakcije provedena je na difraktometru.

### 3.3. Analiza multielementnog sastava (ICP-MS)

Multielementna analiza uzoraka, uz prethodnu pripremu, provedena je u Laboratoriju za anorgansku geokemiju okoliša i kemodinamiku nanočestica, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković

#### Priprema uzoraka za multielementnu analizu

Prikupljeni uzorci djurleita pod oznakama DJ, T2 i P2 podvrgnuti su multielementnoj analizi. Prethodno tome svi su uzorci usitnjeni u ahatnom tarioniku te raščinjani u zatvorenom mikrovalnom sustavu prema niže opisanoj metodi.

Raščinjivanje uzoraka provedeno je u zatvorenom mikrovalnom sustavu Multiwave ECO (Anton Paar) u dva koraka. Prvotno je odvagano 0,05 g uzorka nakon čega je dodano 4 mL dušične kiseline (65%  $\text{HNO}_3$  pro analysi, Kemika, Zagreb, Croatia), 1 mL klorovodične kiseline (36,5%  $\text{HCl}$  pro analysi, Kemika, Zagreb, Croatia) i 1 mL fluorovodične kiseline (48%  $\text{HF}$  pro analysi, Kemika, Zagreb, Croatia). U drugom koraku uzorcima je dodano 6 mL borne kiseline ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Fluka, Steinheim, Switzerland). Pojediniosti o parametrima postupka digestije prikazani su u radu Fiket i sur. (2017). Prethodno analizi na HR-ICP-MS-u, uzorci su dodatno razrijeđeni 10 puta te je dodano 2% v/v  $\text{HNO}_3$  (65% *supra pur*, Fluka, Steinheim, Švicarska) i 1  $\mu\text{g/L}$  internog standarda (In).

## Multielementna analiza

Primjenom tehnike spektrometrije masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu masu (eng. *High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, HR-ICP-MS) određene su ukupne koncentracije elemenata u tragovima i elemenata rijetkih zemalja u uzorcima. Korišten je HR-ICP-MS instrument Element 2 (Thermo, Bremen, Njemačka), a detalji o instrumentalnim parametrima su navedeni u radu Fiket i sur. (2017.).

Serijski standardnih otopina, na temelju koje su određene koncentracije elemenata u tragovima u uzorcima, pripravljena je odgovarajućim razrjeđivanjem standardne multielementne otopine (Analytika, Prag, Češka) od  $100 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  koja sadrži sljedeće elemente: Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti, Tl, V i Zn uz dodatak pojedinačnih standardnih otopina Sn ( $1,000 \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ , Analytika, Prag, Češka), Sb ( $1,000 \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ , Analytika, Prag, Češka), U ( $1,000 \text{ g L}^{-1} \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ , Aldrich, Milwaukee, WI, SAD) i Ag ( $1,000 \text{ g L}^{-1} \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ , Fluka, Steinheim, Švicarska). Standardi za analizu elemenata rijetkih zemalja pripremljeni odgovarajućim razrjeđenjem multielementnog referentnog standarda (Analytika, Prague, Czech Republic) koji sadrži Ce, La, Nd i Pm ( $100 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) te Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sc, Sm, Tb, Tm, Y i Yb ( $20 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ).

U svim uzorcima izmjerene su koncentracije ukupno 48 elemenata (Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Ho, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Rb, S, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Sr, Tb, Ti, Tl, Tm, U, V, Y, Yb, Zn).

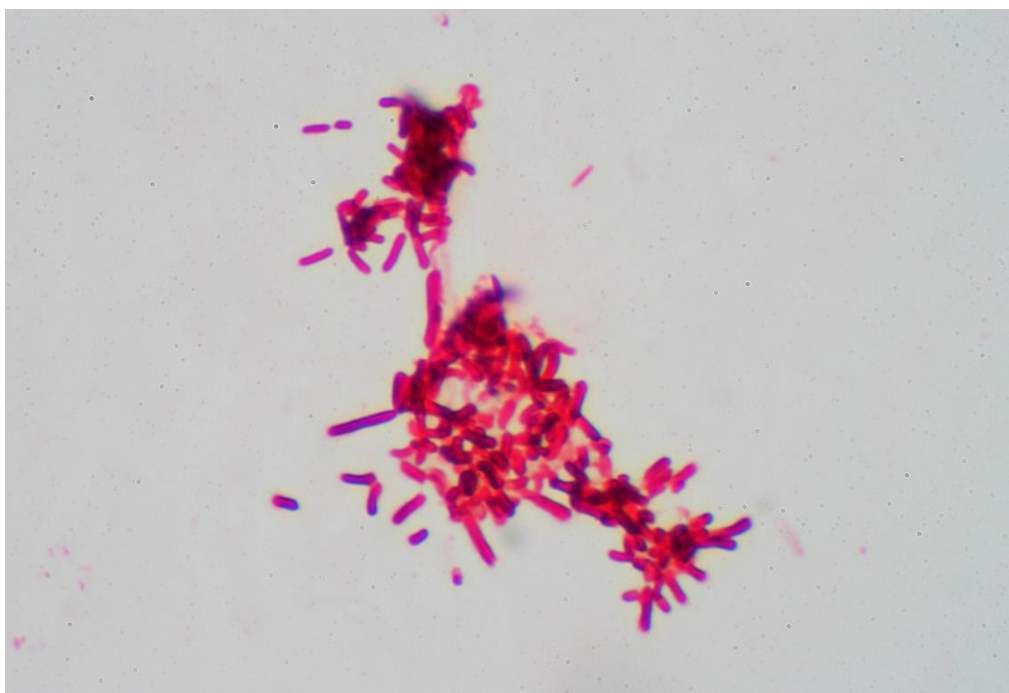
Kontrola kvalitete mjerenja provedena je istovremenim mjerenjem certificiranog referentnog materijala za tlo (Soil NCS DC 77302, poznat i kao GBW 07410; China National Analysis Centre for Iron and Steel, Peking, Kina).

#### 4. Rezultati

Uzorak djurleita dimenzije cca 5,5 cm javlja se kao anhedralan lomljeni dio većih uzoraka stijena ili minerala (slika 13 a i b). Sivocrne je boje s dijelom smeđaste korice na površini na kojoj je uočena prisutnost bakterije (slika 14).



Slika 13 a i b. Prikaz minerala djurleita sa smeđastom koricom (vlastita fotografija)

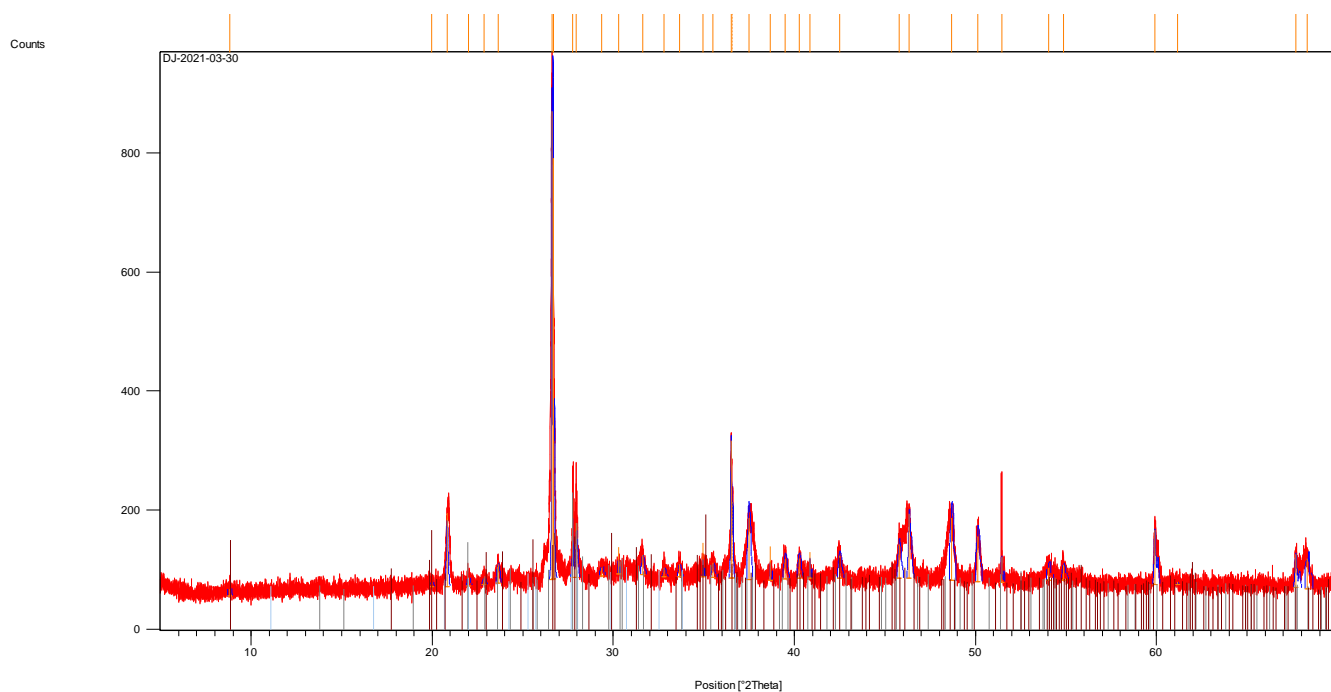


Slika 14. Mikroskopski prikaz stubičastih gram-negativnih bakterija s površine minerala djurleita nakon bojenja po gramu

#### 4.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Rendgenskom difrakcijom analizirani su uzorci djurleita iz porfirnog ležišta u Antofagasti te su dobiveni difrakcijski maksimumi. Korišteni su nazivi uzorka DJ, P2 i T2. Kratica DJ predstavlja cjelostjenski (*eng. bulk*) uzorak, P2 površinu uzorka bez nakupljenog smeđastog taloga gdje nije došlo do procesa izluživanja metala pomoću bakterija, a T2 površinu uzorka sa smeđasto-crvenkastim talogom gdje se uočava utjecaj bakterija na mineral.

##### 1. Uzorak DJ – cjelostjenski uzorak djurleita

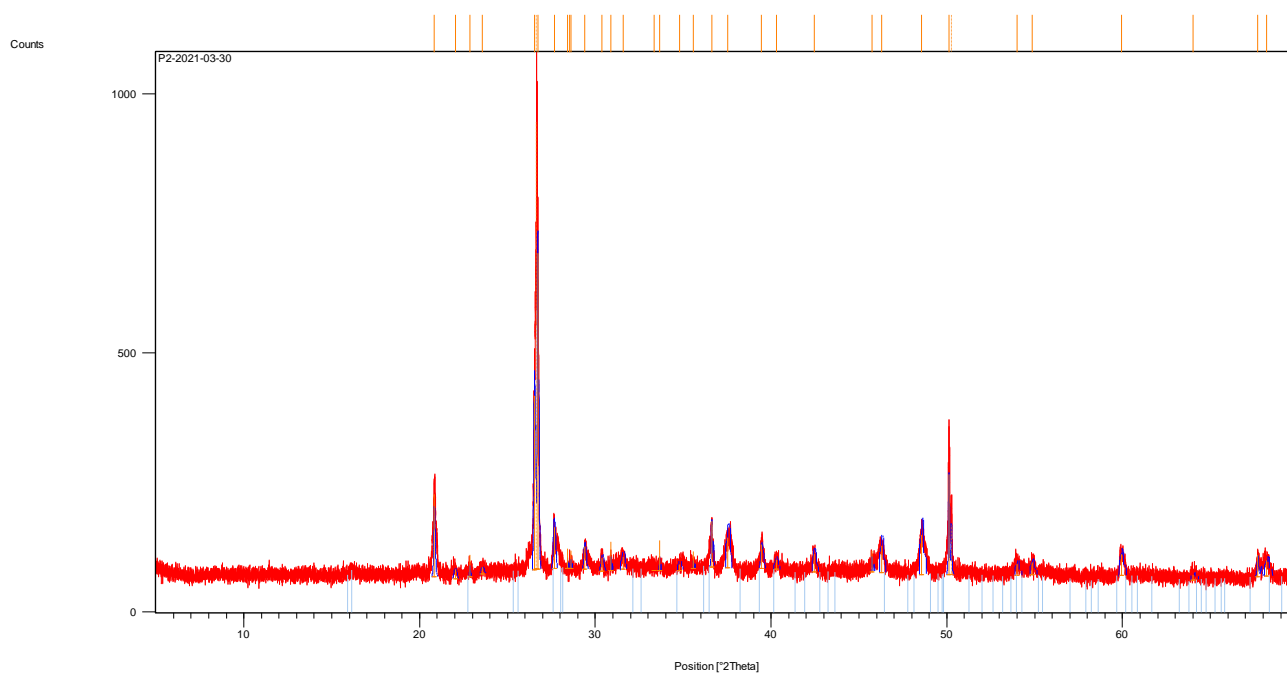


Slika 15. Difraktogram uzorka DJ – cjelostjenski uzorak djurleita

Tablica 3. Podaci o korištenim karticama (Powder diffraction file) za interpretaciju uzorka DJ – cjelostjenski uzorak djurleita (eng. *bulk*)

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
00-046-1045	Kvarc	SiO <sub>2</sub>
00-020-0365	Djurleit	Cu <sub>1,97</sub> S
00-033-0490	Halkozin	Cu <sub>2</sub> S
00-020-0548	Albit	(Na,Ca)(Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
01-086-1384	Muskovit	K <sub>0.932</sub> Al <sub>2</sub> (Al <sub>0.932</sub> Si <sub>3.068</sub> O <sub>10</sub> )((OH) <sub>1.744</sub> F <sub>0.256</sub> )

## 2. Uzorak P2 - površinu uzorka djurleita bez smeđaste korice

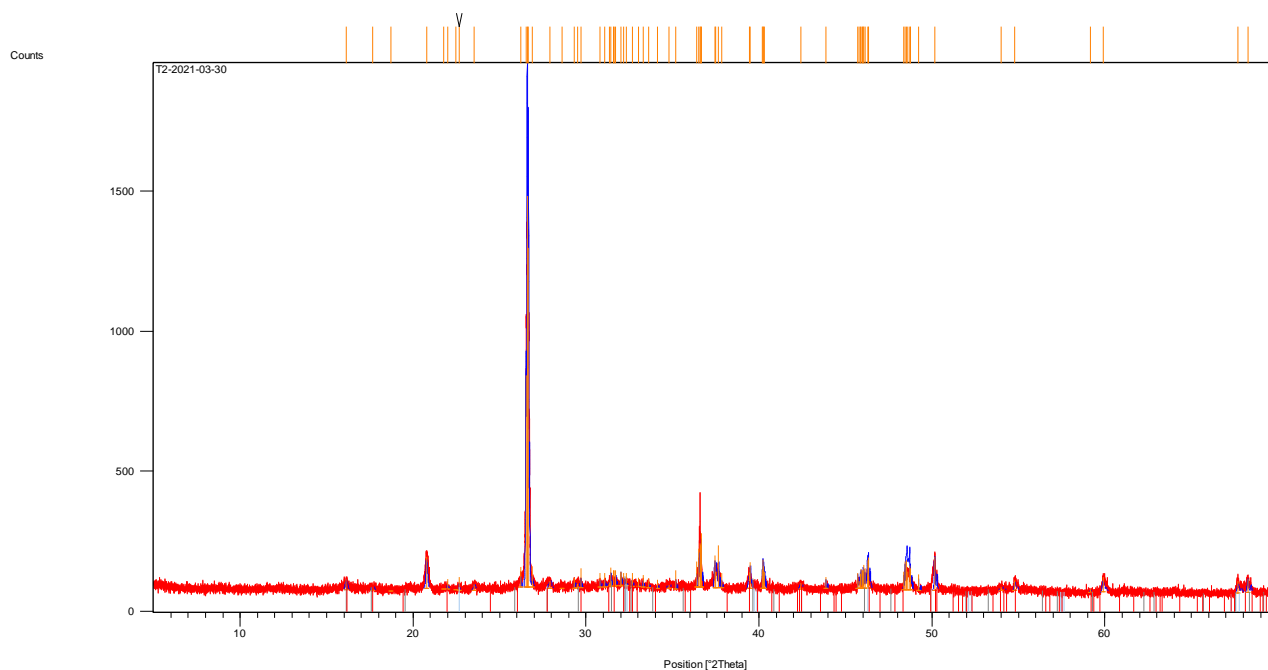


Slika 16. Difraktogram uzorka P2 – površina minerala djurleita bez smeđaste korice

Tablica 4. Podaci o korištenim karticama (Powder diffraction file) za interpretaciju uzorka P2 – površina minerala djurleita bez smeđaste korice

Broj kartice	Ime minerala	Kemijska formula
00-046-1045	Kvarc	SiO <sub>2</sub>
00-020-0365	Djurleit	Cu <sub>1,97</sub> S
01-086-1384	Muskovit	K <sub>0.932</sub> Al <sub>2</sub> (Al <sub>0.932</sub> Si <sub>3.068</sub> O <sub>10</sub> )((OH) <sub>1.744</sub> F <sub>0.256</sub> )
01-083-2215	Kalijski feldspati	K <sub>0.2</sub> Na <sub>0.8</sub> AlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>

### 3. Uzorak T2 - površinu minerala djurleita sa smeđasto-crvenkastom koricom



Slika 17. Difraktogram uzorka T2 - površina minerala djurleita sa smeđasto-crvenkastom koricom



Tablica 5. Podaci o korištenim karticama (Powder diffraction file) za interpretaciju uzorka T2 - površina minerala djurleita sa smeđasto-crvenkastom koricom

Broj kartice	Ime mineral	Kemijska formula
01-079-1906	Silicij oksid	SiO <sub>2</sub>
00-023-0959	Djurleit	Cu <sub>31</sub> S <sub>16</sub>
01-089-2670	Visokotemperaturni bakreni (II) sulfid	Cu <sub>2</sub> S
00-023-0948	Atakamit	Cu <sub>7</sub> <sup>+2</sup> Cl <sub>4</sub> (OH) <sub>10</sub> x H <sub>2</sub> O
00-002-1294	Halkozin	Cu <sub>2</sub> S
03-065-3817	Djurleit	Cu <sub>31</sub> S <sub>16</sub>
00-023-0961	Niskotemperaturni halkozin	Cu <sub>2</sub> S
01-074-1737	Halkopirit	Cu Fe S <sub>2</sub>
00-034-0660	Djurleit	Cu <sub>31</sub> S <sub>16</sub>
00-046-1436	Bernalit	Fe <sup>+3</sup> (OH) <sub>3</sub>
01-077-0116	Atakamit	CuCl <sub>2</sub> (Cu(OH) <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>

#### 4.2. Masena spektrometrija induktivno spregnutom plazmom

ICP-MS metodom napravljena je elementna analiza mikroelemenata i makroelemenata uzoraka djurleita s lokaliteta porfirnog ležišta u Antofagasti. Analizirano je 48 elemenata. Dobiveni rezultati multielementne analize uzorka djurleita prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Ukupne koncentracije elemenata u uzorcima izražene u mg/kg ili \*g/kg (djurliet - cjelostjenski uzorak djurleita (eng. *bulk*), T2 - uzorak površine minerala djurleita sa smeđasto-crvenkastom koricom, a P2- uzorak površine minerala djurleita bez smeđasto-crvenkaste korice).

Uzorak	Li	Be	Rb	Mo	Cd	Sn	Cs	Tl
DJ (djurelit)	31,0	0,62	32,6	1,08	3,70	1,13	3,56	0,28
T2	28,4	0,25	33,0	46,2	5,19	24,9	3,67	0,63
P2	30,1	0,38	32,9	83,6	7,87	35,7	3,68	0,64

	Pb	Bi	U	Na	Mg	Al	P	S
DJ	72,7	0,82	1,16	8713	2725	26780	262	60,5
T2	962	41,8	1,59	7911	2924	21597	351	51,6
P2	1159	50,7	1,59	8596	2938	22901	346	64,9

	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co
DJ	5477	3,18	1601	31,4	22,5	5474	5576	3,61
T2	8453	2,79	1479	42,4	2899	2531	16074	33,0
P2	8412	2,89	1384	56,2	5964	3522	27881	62,7

	Ni	Cu*	Zn	Sr	Y	Sb	Ba	La
DJ	10,9	265	250	248	9,35	0,44	836	15,7
T2	1449	264	1401	209	8,80	260	1061	13,6
P2	2967	308	574	235	8,16	263	1172	10,4

	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy
DJ	30,7	3,58	13,6	2,49	0,63	1,27	0,33	1,85
T2	28,3	3,46	13,1	2,46	0,57	1,19	0,31	1,74
P2	21,5	2,55	9,84	2,03	0,50	1,06	0,27	1,58

	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	K	As	Se
DJ	0,36	0,99	0,14	1,00	0,13	7258	4,96	< LOD
T2	0,34	0,97	0,13	0,92	0,13	7492	119	< LOD
P2	0,31	0,85	0,12	0,80	0,12	7405	128	0,19

LOD – granice detekcije (eng. *limits of detection*)

## 5. Rasprava

U uzorcima minerala djurleita nađeni su kvarc ( $\text{SiO}_2$ ), djurleit ( $\text{Cu}_{31}\text{S}_{16}$ ), visoko i niskotemperaturni halkozin ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), albit ( $\text{Na}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$ ), muskovit ( $\text{KAl}_2(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ ), kalijski feldspati ( $\text{KNaAlSi}_3\text{O}_8$ ), atakamit ( $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ ), halkopirit ( $\text{CuFeS}_2$ ) i bernalit ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ). XRD analizom zabilježena je prisutnost kvarca i djurleita na površini uzorka (P2), uključujući i smeđasto-crvenkastu koricu (T2), te u cjelostjenskom uzorku (DJ), (tablice 3,4 i 5). Razlog tomu je što je kvarc primarno nastao kao pratitelj orudnjenja, a kasnije nije doživio nikakve transformacije, vezan je uz hidrotermalne procese i I-tip magmatizma i javlja se kao zadnji produkt u frakcijskoj kristalizaciji porfirnog ležišta. Djurleit i niskotemperaturni halkozin su produkti cijedenja bakra i sumpora do vodnog lica, nastaju u zoni sekundarnog obogaćenja ispod željeznog šešira gdje  $\text{CuSO}_4$  u reduktivnim uvjetima prelazi u  $\text{S}^{2-}$  i formira navedene minerale pri temperaturama manjim od  $95^\circ\text{C}$ . Rezultate XRD cjelostjenskog uzorka djurleita (DJ) i površine uzorka bez smeđaste korice (P2) povezuje mineral muskovit nastao hidrotermalnom alteracijom iz albita ili kao produkt kristalizacije pegme u podmaklom procesu hlađenja. (tablica 3 i 4). Mineral albit, koji je zabilježen u bulk uzorku, nastaje kao produkt sekundarne aktivacije kalcija u hidrotermalnoj izmjeni andezita. Kalijski feldspati (tablica 4) posljedica su magmatske asimilacije.

Niska temperatura i pH sustava pogoduje rastu autotrofnih gram-negativnih acidofilnih bakterija koje mijenjaju oksidacijsko stanje sumpora i željeza (redukcija), (KONHAUSER, 2007). Željezo i drugi otopljeni elementi nastali su izlaganjem porfirnog tijela atmosferskim uvjetima odnosno nastankom željeznog šešira (dolazi do oksidacije sulfida) te bivaju procijedeni u niže slojeve ležišta.

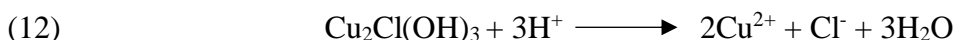


Bakterije procesom oksidacije mijenjaju oksidacijsko stanje sumpora u metalnom sulfidu prelaskom u elementarni sumpor  $\text{S}^0$  te željeza prelaskom  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ .

Mjesta djelovanja bakterija na površini sulfidnog minerala nisu slučajna već ovise o kristalnim ploham i kristalnim rešetkama. Bakterije imaju katalizacijsku ulogu u procesu enzimske oksidacije, odnosno prijenosu elektrona iz katodnih područja u kristalnoj rešetci pomoću posebnog transportnog sistema koji se sastoji od vanjske membrane, periplazme i citoplazmatske membrane

kod gram-negativnih bakterija (slika 14). Direktna i indirektna oksidacija se u porfirnom ležištu odvijaju istovremeno.

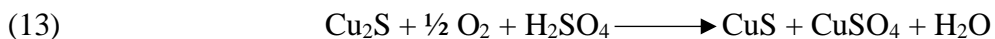
Osim željezo-oksidirajućih bakterija na površini uzorka, volatilne faze ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCl}$ ) pogoduju nastanku niza minerala poput atakamita i bernalitra (tablica 5). Otapanje površinskih halogenida i njihovo prenošenje površinskim vodama u dijelove ispod željeznog šešira obogaćuje sustav nizom aniona. Hidrotermalne otopine transportiraju  $\text{Cu}$  u formi kloridnih kompleksa ( $\text{CuCl}^{2-}$ ) što dovodi do formiranja minerala atakamita te dolazi do izluživanja bakterijama:



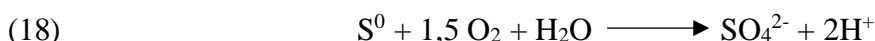
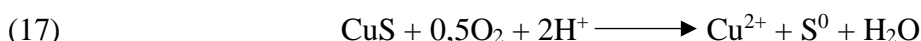
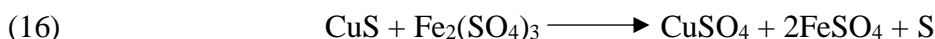
Pri odredbi brzine bakterijskog izluživanja osim minerala bakrenih sulfida važna je i povezanost s mineralom atakamitom koji smanjuje aktivnost bakterija. Klor inhibira bakterijske aktivnosti, odnosno smanjuje njihovo razmnožavanje.

Kako bi se pH sustava održao niskim, acidofilne bakterije reagiraju s mineralom halkozinom, djurleitom i halkopiritom (tablica 5).

Reakcija bioizluživanja halkozina može se prikazati kemijskom jednadžbom:



Pri djelovanju acidofilnih bakterija na halkozin one imaju ulogu katalizatora u procesu oksidacije halkozina u bakrene sulfate. Acidofilne bakterije koriste ili otopljeni kisik ili reakciju sa željezom koja također dovodi do oksidacije bakrenih sulfida. Nusprodukt ovih procesa je pojava samorodnog sumpora koji dodatno doprinosi snižavanju pH sustava. Slični kemijski procesi se odvijaju i na primjeru djurleita:

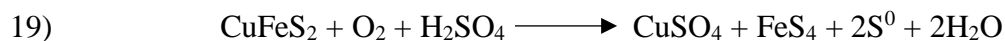


15) oksidacija djurleita u CuS pomoću kisika i/ili Fe<sup>3+</sup> iona

16, 17) oksidacija CuS pomoću pomoću željenih iona u CuSO<sub>4</sub> ili kisika u bakrene ione, i sumpora u elementarni sumpor

18) oksidacija S<sup>0</sup> u SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pomoću kisika uz prisustvo bakterija

Osim djurleita i halkozina acidofili također mogu utjecati na mineral halkopirit procesom bioizluživanja:



Gdje kao produkt izluživanja bakterijama nastaje elementarni sumpor, voda, bakreni sulfat i željezni sulfid.

ICP-MS metodom dobivena je elementna analiza mikroelemenata i makroelemenata (tablica 6). Elemente možemo podijeliti prema Goldschmidtovoj klasifikaciji elemenata. Litofilni elementi su: Li, Be, Rb, Cs, U, Na, Mg, Al, P, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Sr, Y, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu i K. Siderofilni elementi su: Mn, Fe, Co i Ni. Halkofilni elementi su: Mo, Cd, Sn, Tl, Pb, Bi, S, Cu, Zn, Sb, As i Se. Ovisno o mogućnosti ugrađivanja u kristalnu strukturu stjenotvornih minerala elemente možemo podijeliti na temelju kompatibilnosti. Kompatibilnoj skupini elementa pripadaju Mo, Bi, Na, Al, P, S, Ca, Sc, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sb i As. U nekompatibilnu skupinu elemenata pripadaju Li, Rb, Cd, Sn, Cs, Tl, Pb, U, V, Sr, Y, Ba, K, Se i elementi rijetkih zemalja (REE). Elemente također možemo podijeliti na temelju otpornosti na procese trošenja. Kemijski elementi koji su više mobilnog karaktera su: Li, Be, Rb, Cd, Sn, Cs, Tl, Pb, U, Na, Mg, P, S, Ca, Sc, V, Co, Cu, Sb, Ba, K, As i Se. Dok u skupinu nemobilnih elemenata pripadaju Mo, Bi, Al, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Sr, Y i REE.

Smeđasta korica i površina uzorka obogaćene su na Ba (cca 1100 mg/kg) s obzirom na cjelostjenski uzorak djurleita (DJ) (836 mg/kg). Koncentracija barija u uzorcima, koji zbog svoje bolje kompatibilnosti i ionskog radijusa odgovara približno 1 redu veličine više od rubidija. Koncentracija K pokazuje malu varijabilnost između uzoraka; u smeđastoj korici (T2) iznosi 7492 mg/kg, na površini minerala djurleita (P2) iznosi 7405 mg/kg, a u cjelostjenskom uzorku djurleita (DJ) vrijednosti koncentracije K iznose 7258 mg/kg. Koncentracija Na pokazuje nešto veću

varijabilnost između uzoraka; u smeđastoj korici iznosi (T2) 7911 mg/kg, na površini minerala (P2) 8596 mg/kg, a u cjelostjenskom uzorku djurleita (DJ) iznosi 8713 mg/kg. Koncentracija Ca u cjelostjenskom uzorku minerala djurleita (DJ) (5477 mg/kg) znatno je niža od one u preostala dva uzorka. Ca na površini uzorka (P2) iznosi 8412 mg/kg, a u smeđastoj korici uzorka (T2) iznosi 8453 mg/kg.

Element najveće koncentracije u uzorku je Cu. Koncentracije Cu variraju od cca 260 g/kg do cca 310 g/kg, najveća koncentracija Cu uočava se na površini uzorka djurleita (P2) (308 g/kg) potom u cjelostjenskom uzorku djurleita (DJ) (265000 mg/kg) i smeđastoj korici uzorka (T2) (263811 mg/kg). Velike količine Cu su očekivane s obzirom da se radi o bakrenom sulfidu.

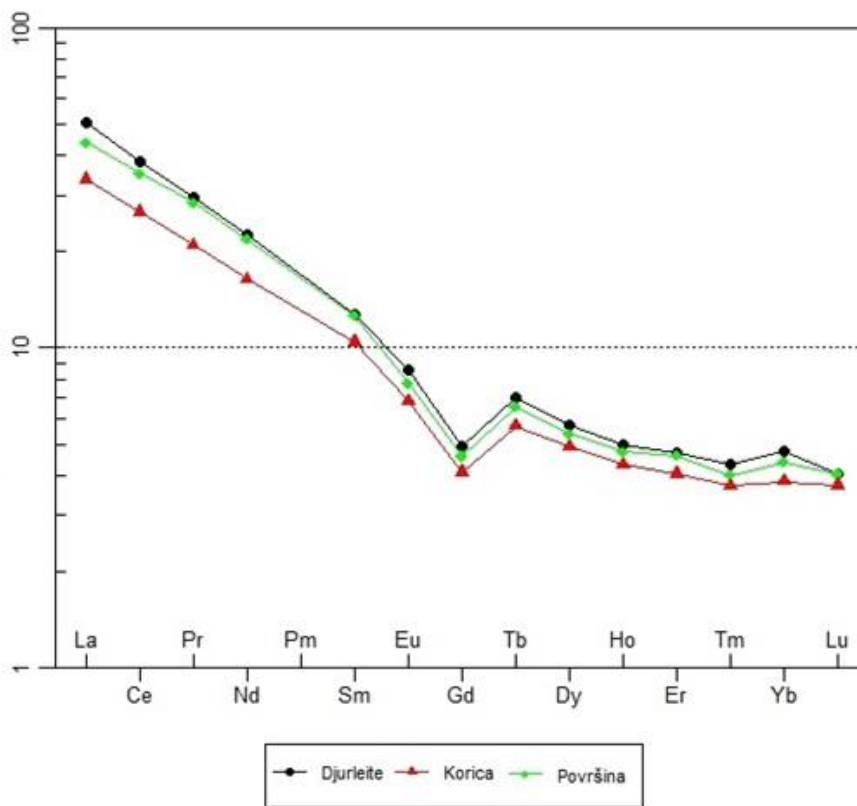
Veća koncentracija S uočava se u smeđastoj korici uzorka (T2) (64861 mg/kg) prema površini uzorka (P2) (51644 mg/kg) i cjelostjenskom uzorku djurleita (DJ) (60540 mg/kg). Izluživanje elementarnog S iz metalnih sulfida pomoću acifodilnih bakterija objašnjava veću koncentraciju S na smeđastoj korici (T2) u odnosu na cjelostjenski uzorak (DJ) i površinu uzorka (P2).

Znatno obogaćenje Fe uočeno je u smeđastoj korici uzorka (T2) (16074 mg/kg) i površini uzorka (P2) (27881 mg/kg), dok je u cjelostjenskom uzorku (DJ) koncentracija Fe znatno niža (5576 mg/kg). Dok se nešto veća koncentracija Al javlja u cjelostjenskom (DJ) uzorku djurleita (26780 mg/kg) u usporedbi s koricom uzorka (T2) (21597 mg/kg) i površinom uzorka (P2) (22901 mg/kg). Al, najzastupljeniji element u kori uz Si, i Fe mobilni su reaktivni kationi koji se lako hidrotermalno ispiru, a zatim se javljaju u velikim koncentracijama zbog hidrotermalnih alteracija porfirnog ležišta. Acidofilne bakterije procesom redukcije mijenjaju oksidacijsko stanje željeza i koriste ga pri metabolizmu i za dobivanje energije u obliku oksidiranog željeza što objašnjava manju koncentraciju željeza u korici uzorka u odnosu na površinu uzorka djurleita. Koncentracije Mg u sva tri uzorka su podjednake, cca 2900 mg/kg. Mg je mobilan kompatibilan element koji se javlja u procesima hidrotermalne alteracije.

Napravljena je normalizacija REE elemenata s obzirom na kondrit, OIB i EMORB zbog očekivanih značajnih razlika koje bi se mogle interpretirati životnim aktivnostima bakterija.

Normalizirane REE vrijednosti s obzirom na kondrit pokazuju obogaćenje na LREE (laki elementi rijetkih zemalja). LREE pokazuju obogaćenje za 1 red veličine naspram HREE (teški elementi rijetkih zemalja), (slika 18). Normalizirane vrijednosti pokazuju iste trendove za REE u sva tri

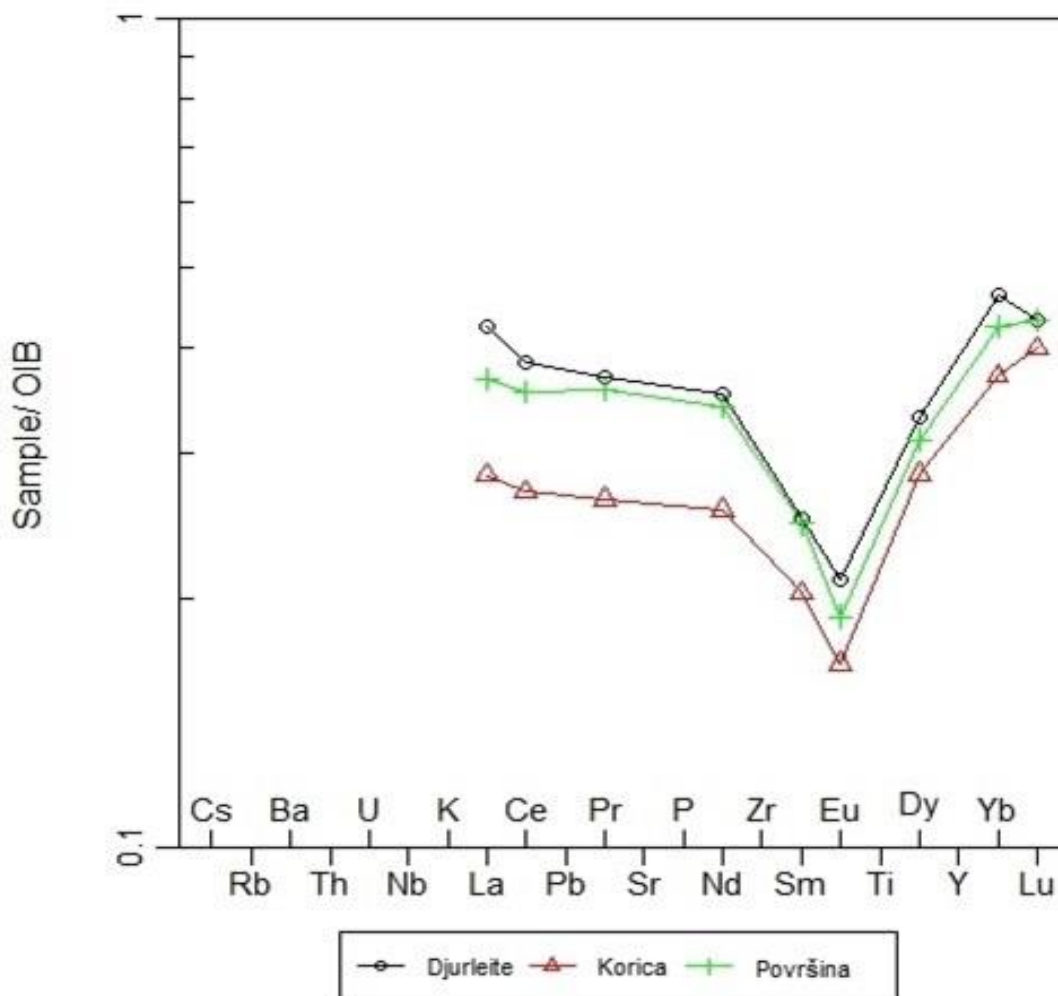
uzorka. Sva tri uzorka karakterizira negativna gadolinijeva anomalija. Uzorak cjelostjenskog sastava djurleita (DJ) pokazuje veće obogaćenje na REE elemente naspram smeđaste korice uzorka (T2) i površine uzorka (P2) na koju nisu djelovale bakterije što ukazuje na slabiju migrabilnost REE u ovom uzorku.



Slika 18: Spider plot dijagram REE-ova normaliziranih na kondrit

(kondrit – BOYNTON, 1984)

Normalizacijom REE u odnosu na OIB uočava se podzasićenje REE elemenata, posebice europija (slika 19). Korica uzorka djurleita (T2) sadrži manje REE prema cjelostjenskom uzorku (DJ) i površini uzorka djurleita (P2). Takvo ponašanje REE s obzirom na OIB standard trebalo bi ukazivat na miješanje magmi s kiselijom ili na plitki postanak magme. Manja razlika između sva tri uzorka se uočava na grafikonu gdje je prikazana europijeva anomalija. Eu popunjava kationsku poziciju u mineralu albitu te dolazi na mjesto Ca.

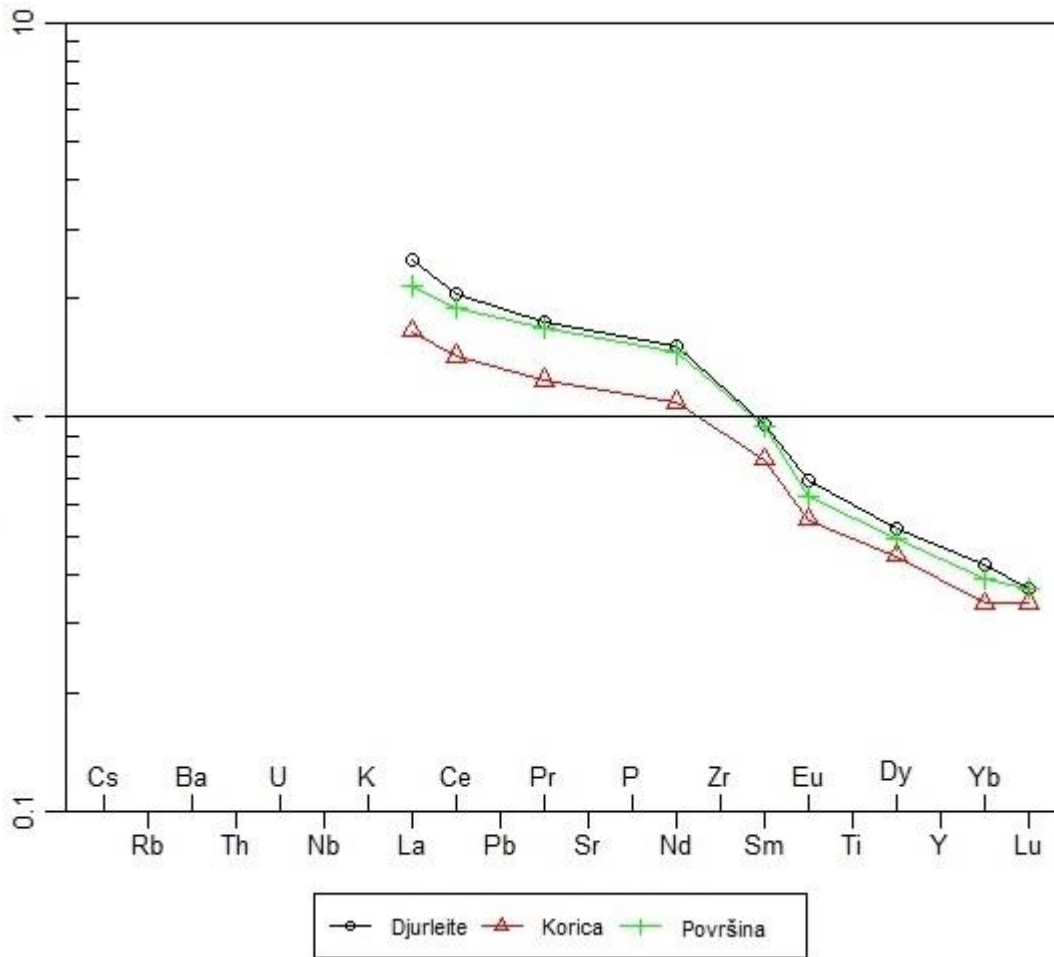


Slika 19: Spider plot dijagram REE-ova normaliziranih na OIB

(OIB - SUN i MCDONOUGH, 1989)

Normalizacijom REE elemenata na EMORB pokazuje obogaćenje na LREE (slika 20). EMORB grafikom potvrđuje tezu da je u porfirnom ležištu u Antofagasti došlo do miješanja magmi ili plićeg taljenja. Najmanja količina REE uočava se u korici uzorka (T2) kao i u sva tri dijagrama. Razlike između smeđaste korice uzorka (T2) i cjelostjenskog uzorka djurleita (DJ) izjednače se u svim trima dijagramima kod elementa Sm.





Slika 20: Spider plot dijagram REE-ova normaliziranih na EMORB

(EMORB - SUN i MCDONOUGH, 1989)

## **6. Zaključak**

Istražen je mineral djurleit s trošenom mineralnom površinom uvjetovanom bakterijama. Mineral je prikupljen iz porfirnog ležišta u Antofagasti. Mineralna analiza potvrdila je kvarc i djurleit kao dominantne mineralne faze u uzorcima.

Niski pH (cca 3) porfirnog ležišta pogoduje rastu acidofilnih bakterija koje kao izvor energije mogu koristiti i metalni (ovisno o oksidacijskom stanju) i sulfidni dio metalnog sulfida. Gram-negativne autotrofne acidofilne bakterije procesom oksidacije bakrenih sulfida u bakrene sulfate izlužuju bakar i samородni sumpor u slučaju minerala halkozina, djurleita i halkopirita. Osim mijenjanja oksidacijskog stanja sumpora, utječu i na oksidacijsko stanje željeza gdje  $\text{Fe}^{3+}$  prelazi u  $\text{Fe}^{2+}$ , kako bi se pH sustava održao niskim. Mineral atakamit ukazuje na prisutnost klora koji u nekim slučajevima inhibira daljnju bakterijsku aktivnost.

Rezultati ICP-MS analize pokazali su znatno povećanje koncentracije nekih elemenata u sekundarnim koricama trošenja primarnih sulfida. Najznačajnija povećanja opažena su kod elemenata: Mo, Sn, Pb, Bi, Cr, Fe, Co, Ni, Cu i Sb. Većina navedenih elemenata u porfirnoj sredini pokazuju halkofilan karakter. Do obogaćenja ostalih elemenata vjerojatno je došlo procesima bakterijskog djelovanja sličnim mehanizmima kakvi su zamijećeni i u ciklusu bakra. Najveća koncentracija sumpora uočena je na površini uzorka gdje su bakterije reagirale s mineralom i izluživale samородni sumpor.

Dijagrami normalizacije na kondrite, OIB i EMORB prikazuju najmanju količinu REE elemenata u smeđastoj korici uzorka naspram površine uzorka i bulk uzorka djurleita. Dijagrami normalizacije ukazuju na procese miješanja magmi ili plicjeg taljenja.

## 7. Literatura

Amundson, R., Richter, D. D., Humphreys, G. S., Jobbagy, E. G. & Gaillardet, J. (2007): Coupling between biota and Earth materials in the critical zone. *Elements* 3, 327–332

Atlas R.M. (1997): *Principles of Microbiology*. Boston, Dubuque, IA, Brown Publishers

Banfield, J. F., Hamers, R. J. (1997): Processes at minerals and surfaces with relevance to microorganisms and prebiotic synthesis, *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals*, vol. 35, Mineralogical Society of America, Washington, DC, 81-122

Bazylinski, D. A. (2001): Bacterial mineralization. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 441–448

Bermanec, V. (1999): Sistematska mineralogija – Mineralogija nesilikata, *Udžbenici Sveučiliša u Zagrebu*, 32-75

Beveridge, T. J. (1984): Mechanisms of the binding of metallic ions to bacterial walls and the possible impact on microbial ecology, *Current Perspectives in microbial Ecology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 601-607

Beveridge, T. J., Murray, R. G. E. (1976): Uptake and retention of metals by cell walls of *Vacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 141, 1502-1518

Bosecker, K., (1997): Bioleaching: metal solubilization by microorganisms, *FEMS Microbiology Reviews* 20, 591-604

Boult, S., Hand, V. L. & Vaughan, D. J. (2006): Microbial controls on metal mobility under the low nutrient fluxes found throughout the subsurface. *Sci Total Environ* 372, 299–305

Boyle, R.W. (1979): The geochemistry of gold and its deposits: Geological Survey of Canada Bulletin, v. 280, 1–54

Boynton, W. V. (1984): Geochemistry of Rare Earth Elements: Meteorite Studies, Henderson, P., Ed., Rare Earth Element Geochemistry, Elsevier, New York, 63-114

Brantley, S. L., Goldhaber, M. B. & Ragnarsdottir, K. V. (2007): Crossing disciplines and scales to understand the critical zone. *Elements* 3, 307–314

Brock, T.D., Madigan M. T. (1988): *Biology of Microorganisms*, 5th ed. Englewood Cliffs

Chorover, J., Kretzschmar, R., Garcia-Pichel, F. & Sparks, D. L. (2007): Soil biogeochemical processes within the critical zone. *Elements* 3, 321–326

Cockell, C. S. & Herrera, A. (2008): Why are some microorganisms boring? *Trends Microbiol* 16, 101–106

Corodoba, E. M., Munoz, J. A., Blazquez, M. L., Gonzalez, F., Ballester, A., (2009): Passivation of chalcopyrite during its chemical leaching with ferric ion at 68 °C, *Minerals Engineering* 22, 229-235

Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S. & Visscher, P. T. (2009): Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth Sci Rev* 96, 141–162

Ehrlich, H. L. (1996): How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chem Geol* 132, 5–9

Ehrlich, H.L., Newman, D. K. (2009): Geomicrobiology, 5th ed, Taylor And Francis Group, LLC

Fortin, D., Southam, G., Beveridge, T. J. (1994): An examination of iron sulfide, iron-nickel sulfide and nickel sulfide precipitation by a Desulfotomaculum species: and its nickel resistance mechanisms. FEMS Microbiol Ecol 14:121-132

Gadd, G. M. (2007): Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* 111, 3–49

Gadd, G. M. (2010): Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation, *Microbiology*, 609-633

Gadd, G. M. & Raven, J. A. (2010): Geomicrobiology of eukaryotic microorganisms. *Geomicrobiology Journal*, 491-519

Golubic, S., Radtke, G. & Le Campion-Alsumard, T. (2005): Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends Microbiol* 13, 229–235

Gu, J. D. (2005): Biofouling and prevention: corrosion, viodeterioration and biodegradation of materials, *Handbook of Environmental Degradation of Materials*, 179- 206

Hamilton, W. A. (2003): Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal–microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling* 19, 65–76

Hinkle, P. C., McCarty, R. E. (1978): How cell make ATP, *Scientific American*, 104-123

Hrenović, J., Durn, G., Goić-Barišić, I., Kovačić, A. (2014): Occurrence of an Environmental *Acinetobacter baumannii* Strain Similar to a Clinical Isolate in Paleosol from Croatia, *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2860-2866

Imshenetsky, A. A., Lysenko S. V., Kazatov G. A. (1978): Upper boundary of the biosphere, *Appl Environ Microbiol* 35, 1-5

Jannasch H. W. (1983): Microbial processes at deep sea hydrothermal vents, *Hydrothermal Processes at Sea Floor Spreading Centres*, 677-710

Konhauser, K. (2007): *Introduction to Geomicrobiology*, Blackwell Science Ltd

Kim, B. H. & Gadd, G. M. (2008): *Bacterial Physiology and Metabolism*. Cambridge: Cambridge University Press

Little, B. J., Wagner, P.A. (1997): Spatial relationships between bacteria and mineral surfaces, *Geomicrobiology. Interactions between microbes and minerals*, Washington, Dc, 35, Chapter 4, 123-159

Lloyd, J. R., Macaskie, L. E. (2000): Bioremediation of radionuclide- containing wastewaters, *Environmental Microbe-Metal Interactions*, ASM Press, Washington, Dc, 277-327

Lovley, D. R., Holmes, D. E., Nevin, K. P. (2004): Dissimilatory Fe(III) and Mn (IV) reduction, *Advances in Microbial Physiology* 49, 219-286

Lysenko, S. V.(1979): Microorganisms in the upper atmospheric layers, Mikrobiologiya 48, 871-877

Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R. (1971): Mechanism of the initial event in the sorption of marine bacteria to surface, Journal of General Microbiology 68, 227-348

Morse, J. W., Arvidson, R. S. (2002): The dissolution kinetics of major sedimentary carbonate minerals, Earth-Science Reviews 58, 51-84

Niels, D. H. (2000): Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia sp.*, CH34. Extremophiles, 77-82

Renshaw, J. C., Robson, G. D., Trinci, A. P. J., Wiebe, M. G., Livens, F. R., Collison, D. & Taylor, R. J. (2002): Fungal siderophores: structures, functions and applications, Mycol Res 106, 1123–1142

Schaechter, M., Ingraham J. L., Neidhardt F. C. (2006): Microbe, Washington, Dc: ASM Press

Schnell, H. A. (1997): Bioleaching of Copper, Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes, 21-43

Smits, M. (2006): Mineral tunnelling by fungi. In Fungi in Biogeochemical Cycles, 311–327 Edited by G. M. Gadd. Cambridge: Cambridge University Press.

Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriological Reviews*, 36, 407-477

Sharma, P. K., Das, A., Hunumantha Rao, K., Forssberg, K. S. E. (2003): Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions, *Hydrometallurgy* 71, 285-292

Sillitoe, R. H. (1973): The Tops and Bottoms of Porphyry Copper Deposits, *Economic Geology*, 68, 799-815

Sillitoe, R. H., (2010): Porphyry copper systems, *Economic Geology*, 105, 3–41

Southam, G. (2000): Bacterial surface-mediated mineral formation. In: *Environmental Microbe-Mineral Interactions*. Lovley DR (ed) ASM Press, Washington, DC, 257-276

Sparks, D. L. (2005): Toxic metals in the environment: the role of surfaces. *Elements* 1, 193–196

Sterflinger, K. (2000): Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol J* 17, 97– 124

Stone, A. T. (1997): Reactions of extracellular organic ligands with dissolved metal ions and mineral surfaces, *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals* 35, Mineralogical Society of America, Washington, Dc, 309-344

Sullivan, J.D., (1930): Chemistry of leaching chalcocite, U.S. Bureau of Mines



Sun, S. S., McDonough, W. F. (1989): Chemical and isotopic systematics of oceanic basalts: implications for mantle composition and processes, Geological Society, London, Special Publications 42, 313-345

Szewzky, U., Szewzky, R., Stenstrom T. A., (1994): Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden, Proc Natl Acad Sci USA 91, 1810-1813

Izvori slika:

URL 1 <https://www.slideshare.net/doollentze/opsta-bakteriologija-2012> 8.7.2021.

URL 2 <https://www.teck.com/operations/chile/operations/quebrada-blanca/> 8.7.2021.

URL 3 <https://www.mindat.org/min-962.html> slika halkozina 8.7.2021

URL 4 <https://www.irocks.com/minerals/specimen/46278> 8.7.2021