

BIOREMEDIATION POTENTIAL OF INORGANIC POLLUTANTS REMOVAL USING *ASPERGILLUS NIGER*

BIOREMEDIATION POTENTIAL OF INORGANIC POLLUTANTS REMOVAL USING *ASPERGILLUS NIGER*

**Katarína Peťková, Ľubomír Jurkovič, Alexandra Šimonovičová, Marianna Molnárová,
Zuzana Slobodníková**

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina,
842 15 Bratislava, e-mail: katkapetkova@gmail.com, jurkovic@fns.uniba.sk,
asimonovicova@fns.uniba.sk, molnarova@fns.uniba.sk, zuzana.slobodnikova@gmail.com

Abstract:

This work is focused on the study of leaching of potentially toxic elements by selected species of microscopic filamentous fungus *A. niger*, that was isolated from anthropogenic sediments with high contents of selected elements, especially arsenic. Isolated species was put on the samples from Zemianske Kostolany. The total contents of elements were: 93 - 634 ppm As, 9 - 16,7 ppm Pb, 16,5 - 38,2 ppm Cu, 45 - 182 ppm Zn. The main objective of the experiment was comparative evaluation of bioleaching of selected elements by different weights of substrate (1 g, 10 g, 100 g). By fungal bioleaching following average concentrations of As were released: 550 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 270,18 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 90,60 $\mu\text{g.l}^{-1}$ from 1 g, 10 g and 100 g of substrate, respectively. The results showed, that the optimal weight of soil substrates for maximum efficiency leaching of arsenic is 1 g, but maximum efficiency leaching of Pb, Zn and Cu is 10 g. The results indicated that solid weight 1 g and 10 g was found to be best to fungal activity and metal solubilization of the three solid weights tested (1 g, 10 g and 100 g) under the chosen experimental conditions.

Keywords: *Aspergillus niger*, bioleaching, heavy metals, soil contamination

Abstrakt:

Práca je zameraná na štúdium lúhovania potenciálne toxických prvkov vybraným druhom mikroskopickú vláknitej huby *A. niger*, ktorá bola izolovaná z antropogénnych sedimentov s vysokými obsahmi vybraných prvkov, hlavne arzenu. Izolovaný druh sa nasadil na vzorky pochádzajúce z modelovej lokality Zemianske Kostolany, v ktorých celkové obsahy prvkov sú: 93 - 634 mg.kg^{-1} As, 9 - 16,7 mg.kg^{-1} Pb, 16,5 - 38,2 mg.kg^{-1} Cu, 45 - 182 mg.kg^{-1} Zn. Cieľom experimentu bolo zhodnotiť mieru biolúhovania vybraných prvkov pri rôznych použitých navážkach (1 g, 10 g, 100 g). Biolúhovaním mikroskopickou hubou sa zo sledovaných prvkov uvoľnilo do média najviac arzenu, v priemere 550 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 1 g, 270,18 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 10 g, 90,60 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 100 g navážke. Pri Zn, Pb a Cu boli uvoľnené obsahy nižšie, v priemere 17,02 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 1 g, 43,07 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 10 g, 5,35 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 100 g navážke u Zn, 9,36 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 1 g, 14,97 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 10 g, 11,34 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 100 g navážke u Pb a 2,70 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 1 g, 7,07 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 10 g, 4,25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pri 100 g navážke u Cu. Z výsledkov vyplýva, že vzhľadom k celkovým obsahom sledovaných prvkov, najvyššia účinnosť lúhovania bola u arzenu dosiahnutá pri 1 g navážky substrátu, kým u Zn, Pb a Cu boli najvyššie obsahy uvoľnené pri navážke 10 g.

Kľúčové slová: *Aspergillus niger*, biolúhovanie, ťažké kovy, kontaminácia pôdy

Úvod

Kovy ako Pb, As, Sb, Cu, Zn, Cr a Hg sú do životného prostredia vnášané prostredníctvom rôznych zdrojov (banské odpady, popol zo spaľovania komunálnych odpadov, odkaliská) (Liu et al., 2005, Liu et al., 2007, Petrák et al., 2011, Peťková et al., 2011, Hiller et al., 2013). Mnohé ďalšie poľnohospodárske a priemyselné aktivity spôsobujú akumuláciu kovov a polokovov v pôdach a sedimentoch a predstavujú tak potenciálne riziko ich prenosu v rámci potravinového reťazca. Keďže väčšina kontaminovaných pôd pokrýva rozsiahle územie a vytvára tak nevhodné podmienky pre poľnohospodárske využitie, sanácia takýchto pôd je veľmi dôležitá. Množstvo prác poukazuje na využitie rôznych druhov baktérií (napr. *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp.) a húb (napr. *Aspergillus niger*) v dekontaminácii pôd a sedimentov znečistených organickými alebo anorganickými

polutantami pomocou procesu biolúhovania (Vojtková a Janáková, 2011, Janáková a Vojtková, 2012, Vojtková et al., 2012a,b). V porovnaní s bakteriálnym lúhovaním, má lúhovanie použitím húb niekoľko výhod: 1) schopnosť rásť pri vyššej hodnote pH, 2) všeobecne rýchlejší proces lúhovania s kratšou lag fázou, 3) schopnosť vylučovať metabolity (napr. organické kyseliny) za vzniku komplexov s iónmi kovov a tým znižujú toxicitu metabolitov pre biomasu (Burgstaller a Schinner, 1993). K mikroorganizmom s významnou schopnosťou produkovať organické kyseliny (napr. kyselina šťavelová, glukónová, citrónová, jablčná a vínna) patrí aj vláknitá huba *A. niger*, ktorá sa úspešne využíva pri biolúhovaní ťažkých kovov a polokovov (Burgstaller a Schinner, 1993, Mulligan et al., 2004, Xu a Ting, 2009, Anjum et al., 2010).

Cieľom práce bolo zhodnotiť mieru biolúhovania As, Pb, Zn a Cu v troch rôznych navážkach kontaminovaných substrátov a posúdiť potenciál *A. niger* v bioremediácii pôd modelovej lokality Zemianske Kostolany.

Metodika

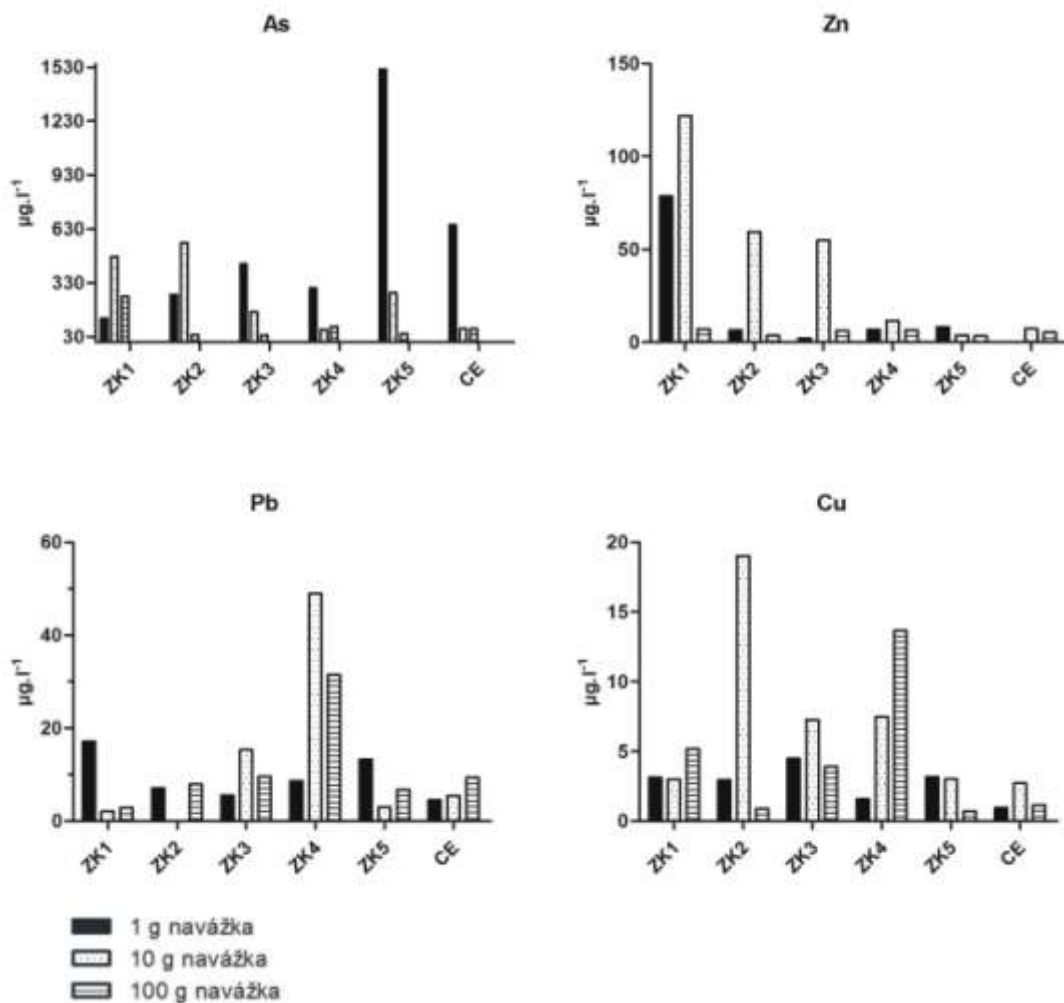
Na základe celkových chemických analýz boli pre účely štúdia vybrané štyri pôdne vzorky, ktoré predstavujú heterogénnu zmes pôdy a elektrárenského popola, ktorý sa do prostredia dostal po havárii pôvodného odkaliska v Zemianskych Kostolanoch. Pôdne vzorky obsahujúce popolový materiál boli odobraté z hĺbkových horizontov 0 - 15 cm a 15 - 30 cm, presitované cez sito s priemerom oka 2 mm a uskladnené v tme pri teplote 4 °C. Pre štúdium biolúhovania vybraných potenciálne toxických stopových prvkov sa zvolil druh *Aspergillus niger*, ktorý sa izoloval zo vzorky ZK5 (obr. 1). Do Erlenmayerových baniek sa navážili rôzne navážky (1 g, 10 g a 100 g) pôdnych substrátov pre porovnanie účinnosti lúhovania *A. niger*. Vzorky sa zaliali 95 ml tekutého SAB média a pridalo sa 5 ml suspenzie *A. niger*. Po 29 dňoch kultivácie sa mycélium odfiltrovalo a získaný výluh sa analyticky zmeral.



Obr. 1: Pohľad na *A. niger* naočkovaný v skúmavkách so živným médiom

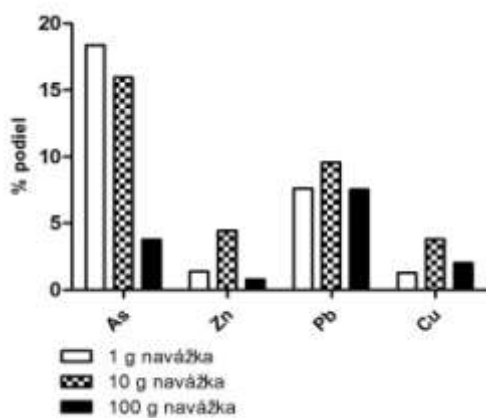
Výsledky a diskusia

Chemická analýza celkových obsahov prvkov v skúmaných vzorkách potvrdila, že najvýznamnejším kontaminantom je arzén, u ktorého bolo zistené prekročenie limitných hodnôt pre poľnohospodársku pôdu (Zákon č.220/2004 Z.z.) vo všetkých odberových miestach. Najvyšší obsah As bol zistený vo vzorke ZK5 (634 mg.kg^{-1}), ktorú tvorí prevažne popolový materiál odkaliska. Po 29 dňoch biolúhovania kontaminovaných substrátov hubou *A. niger* sa zo sledovaných prvkov uvoľnilo najviac arzénu (obr. 2), v priemere $550 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (55 mg.kg^{-1}) pri 1 g navážke, $270,18 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ ($27,02 \text{ mg.kg}^{-1}$) pri 10 g navážke a $90,60 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ ($9,06 \text{ mg.kg}^{-1}$) pri 100 g navážke. Najväčší percentuálny podiel As, vzhľadom k jeho celkovému obsahu, sa uvoľnil pri navážke 1 g (v priemere 18,37 %) (obr. 3). Pri hmotnosti substrátu 10 g sa uvoľnilo v priemere 15,96 % As a pri hmotnosti substrátu 100 g takmer 4 % As z celkového obsahu.



Obr. 2: Obsahy vybraných prvkov po 29 dňoch lúhovania hubou *A. niger*

U Zn, Pb a Cu boli uvoľnené obsahy oproti obsahom As nižšie (Obr. 2). Pri 1 g navážky substrátu sa v priemere uvoľnilo 17,02 µg.l⁻¹ Zn, 9,36 µg.l⁻¹ Pb a 2,70 µg.l⁻¹ Cu. Z 10 g navážky sa biolúhovaním získalo v priemere 43,07 µg.l⁻¹ Zn, 14,97 µg.l⁻¹ Pb a 7,07 µg.l⁻¹ Cu. Nižšie obsahy uvoľnených prvkov boli analyzované v navážke 100 g, v priemere 5,35 µg.l⁻¹ Zn, 11,34 µg.l⁻¹ Pb a 4,25 µg.l⁻¹ Cu.



Obr. 3: Priemerný podiel vylúhovaných prvkov vzhľadom k ich celkovým obsahom v použitých navážkach.

Druh *A. niger* sa vyznačuje mimoriadnou schopnosťou účinne odstraňovať potenciálne toxické prvky nielen prostredníctvom biolúhovania, ale aj bioakumuláciou alebo biovolatilizáciou. Biovolatilizácii arzénu sa venujú autori Čerňanský et al. (2007), Urík et al. (2007), Čerňanský et al. (2009). Experimenty realizované v laboratórnych podmienkach ukázali, že prostredníctvom biolúhovania sa uvoľnilo v priemere 17,04 % arzénu z jeho celkového obsahu a v mycéliách sa bioakumulovalo priemerne 13,72 % As (Peťková et al., 2013).

Záver

Skúmané antropogénne sedimenty predstavujú z dlhodobého hľadiska zdroj kontaminácie zložiek životného prostredia. Vzhľadom k celkovým obsahom sledovaných prvkov bola najvyššia účinnosť lúhovania u arzénu dosiahnutá pri 1 g navážky substrátu, kým u Zn, Pb a Cu boli najvyššie analyzované obsahy pri navážke 10 g. Postupnosť lúhovania prvkov pri 1 g a 10 g navážky vzhľadom k ich celkovým obsahom vo vzorkách bola: As > Pb > Zn > Cu, pri 100 g navážke bola postupnosť Pb > As > Cu > Zn. Získané výsledky z lúhovania s vybraným druhom *Aspergillus niger* sú podkladom pre využitie biolúhovania autochtónnymi pôdnymi mikroorganizmami ako jednej z možných metód bioremediácie kontaminovaných substrátov (pôd a sedimentov) v modelovej lokalite.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla s podporou grantových úloh VEGA No. 1/1034/11, VEGA 1/0156/11, APVV-0344-11 a Grantu UK/26/2013.

Literatúra:

Anjum F., Bhatti H.N., Asgher M., Shahid M. 2010. Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger*. Applied Clay Science 47, pp. 356-361.

Burgstaller W., Schinner F. 1993. Minireview: leaching of metals with fungi. Journal of Biotechnology 27, pp. 91-116.

Čerňanský S., Kolenčík M., Ševc J., Urík M., Hiller E. 2009. Fungal volatilization of trivalent and pentavalent arsenic under laboratory conditions. Bioresource Tehcnology 100, 2, pp. 1037-1040.

Čerňanský S., Urík M., Ševc J., Khun M. 2007. Biosorption and Biovolatilization of Arsenic by Heat-Resistant Fungi. Environmental Science and Pollution Research 14, Special Issue 1, pp. 31-35.

Hiller E., Petrák M., Tóth R., Lalinská-Voleková B., Jurkovič L., Kučerová G., Radková A., Šottník P., Vozár J. 2013. Geochemical and mineralogical characterization of a neutral, low-sulfide/high-carbonate tailings impoundment, Markušovce, eastern Slovakia. Environmental Science and Pollution Research, Accepted, Published online: 24 February 2013, p. 16, DOI: 10.1007/s11356-013-1581-5.

Janáková I., Vojtková H. 2012. Application of Flotation and Bioremediation to Eliminate Persistent Organic Pollutants in the Influent Stream of Cerny Prikop (Czech Republic). In Mendez-Vilas, A. (ed.) Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, London: World Scientific Publishing, pp. 28-32.

Liu F., Liu J., Yu Q., Jin Y., Nie Y. 2005. Leaching characteristics of heavy metals in municipal solid waste incinerator fly ash. Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 40, pp. 1975-85.

Liu Y.-G., Zhou M., Zeng G.-M., Li X., Xu W.-H., Fan T. 2007. Effect of solids concentration on removal of heavy metals from mine tailings via bioleaching. Journal of Hazardous Materials 141, pp. 202-208.

Mulligan C.N., Kamali M., Gibbs B.F. 2004. Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials 110, pp. 77-84.

Petřková K., Lalinská-Voleková B., Jurkovič L., Veselská V. 2011. Chemické a minerálne zloženie elektrárenských popolov (lokalita Zemianske Kostolany). *Mineralia Slovaca*, vol. 43/issue 4, pp. 377-386.

Petřková K., Jurkovič L., Šimonovičová A., Čerňanský S., 2013. Potential of *Aspergillus niger* in bioremediation of contaminated soils. 13th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2013 – vol. 1, Bulgaria: Albena, pp. 757-763.

Petrák M., Kučerová G., Tóth R., Lalinská-Voleková B., Šottník P., Jurkovič L., Hiller E., Vozár J. 2011. Mineralogical and geochemical evaluation of tailing impoundment material at Markušovce locality, Slovakia, *Mineralia Slovaca* 43, pp. 395-408.

Urík M., Čerňanský S., Ševc J., Šimonovičová A., Littera P. 2007. Biovolatilization of Arsenic by Different Fungal Strains. *Water, Air and Soil Pollution*. ISSN 0049-6979. Vol. 186, No. 1-4 2007, pp. 337-342.

Vojtková H., Janáková I. 2011. Möglichkeiten einer Bakteriellen Degradierung Ausgewählter Organischer Schadstoffe. In Nosek J. & Müller M. (ed.) *Rekultivierung – Probleme und Lösungen: Deponieworkshop Liberec-Zittau* 10. – 11. 11. 2011. Brno: Tribun, pp. 163-169.

Vojtková H., Janulková R., Švanová P. 2012a. Physiological aspects of metal tolerance in *Pseudomonas* bacteria isolated from polluted sites in Ostrava, Czech Republic. 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012: 17. – 23. 6. 2012. Bulgaria: Albena, vol. 4, pp. 177-183.

Vojtková H., Mašľaňová I., Sedláček I., Švanová P., Janulková R. 2012b. Removal of heavy metals from wastewater by a *Rhodococcus* sp. bacterial strain. 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012 – vol. 5: 17. – 23. 6. 2012. Bulgaria: Albena, pp. 685-691.

Xu T.-J., Ting Y.-P. 2009. Fungal bioleaching of incineration fly ash: Metal extraction and modeling growth kinetics. *Enzyme and Microbial Technology* 44, pp. 323-328.