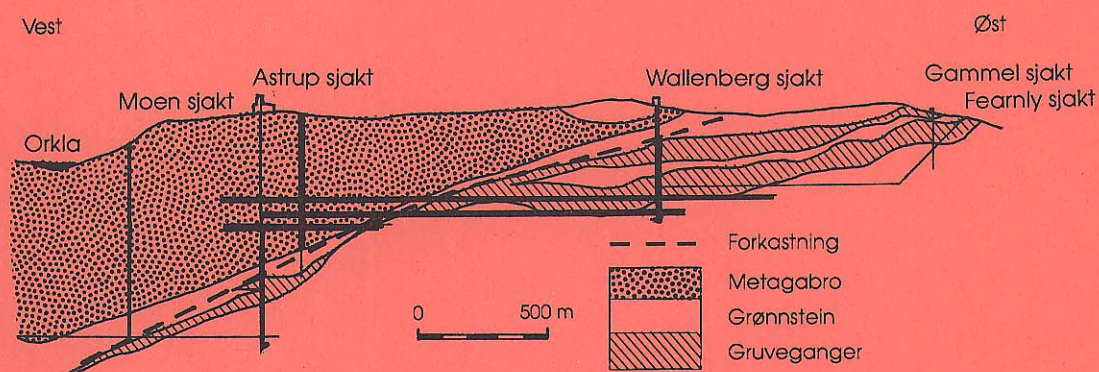


O-89199

Biologisk fiksering av metaller i avrenning fra kisgruver



NIVA – RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning



NIVA

Hovedkontor

Postboks 333
0314 Oslo 3
Telefon (02) 23 52 80

Sørlandsavdelingen

Grooseveien 36
4890 Grimstad
Telefon (041) 43 033

Østlandsavdelingen

Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (065) 76 752

Vestlandsavdelingen

Brevikven 2
5035 Bergen - Sandviken
Telefon (05) 25 97 00

Prosjektnr.:

0-89199

Undernummer:

E-89540

Løpenummer:

2542

Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel:

BIOLOGISK FIKSERING AV METALLER I
AVRENNING FRA KISGRUVER

Dato:

06.02.1991

Prosjektnummer:

0-89199

Forfatter (e):

Morten Laake

Faggruppe:

Miljøteknologi
og bioteknologi

Geografisk område:

Norge

Antall sider (inkl. bilag):

22

Oppdragsgiver:

Bergforskningen, Naturvernkomiteén
Bergverkenes Landssammenslutning (BVLI)

Oppdragsg. ref. (evt. NTFN-nr.):

Ekstrakt:

Avrenning av surt gruvevann med høyt innhold av tungmetaller gir opphav til alvorlige metallbelastninger til vassdrag. Forprosjektet har påvist at biogen dannelse av sulfid i Løkken gruver kan medføre felling og redusert avrenning. Sulfatreduserende bakterier er aktive i prosessen, som foreslås utviklet til en metode for rensing og gjenvinning av tungmetaller. Avfall fra f.eks. meierier kan trolig utnyttes til å drive prosessen. Rapporten legger opp til et 3-årig utviklingsprosjekt med støtte fra BVLI og andre.

4 emneord, norske:

1. tungmetaller
2. gruveavrenning
3. sulfatreduksjon
4. miljøbioteknologi

4 emneord, engelske:

1. heavy metals
2. mining effluents
3. sulphate reduction
4. environmental biotechnology

Prosjektleder:

Morten Laake

For administrasjonen:

Rainer G. Lichtenthaler

ISBN 82-577-1858-0

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

O - 89199

E - 89540

BIOLOGISK FIKSERING AV METALLER I AVRENNING FRA KISGRUVER
FORPROSJEKTRAPPORT

Oslo, 6. februar 1991.

Prosjektleder: Morten Laake

*Medarbeidere : Åse Bakketun
Bjørn Christensen
S. Torsten Källqvist
Kari Nygaard
Rolf T. Arnesen
Eigil R. Iversen*

FORORD

Initiativet til dette prosjektet ble tatt av Rolf T. Arnesen på bakgrunn av kjemiske overvåkningsdata fra Løkken gruver gjennom de siste 3-4 årene. Han så klart hvilke muligheter som ligger i å stimulere biogen dannelse av sulfid i vannfylte gruver når det gjelder å begrense metallavrenningen til vassdrag. I norsk og internasjonal sammenheng er dette et nytt konsept som allerede har vakt betydelig interesse hos våre fagkolleger.

Kari Nygaard bidro til opplegget av et forprosjekt og innarbeidelse av metodikk i startfasen, mens Eigil R. Iversen har bistått med kjemiske data og gjennomføringen av feltundersøkelsene. Åse Bakketun har utført det mikrobiologiske arbeid på prosjektet inntil Bjørn Christensen overtok som stipendiat på senhøsten 1990. S. Torsten Källqvist har ledet prosjektet administrativt overfor Nordisk Industrifond, som bidrar økonomisk, og rapporterer til paraplyprogrammet Bioteknologi og Miljø. Samtlige takkes for godt samarbeid.

Prosjektet skal videreføres med støtte fra Nordisk Industrifond, men dette forutsetter fortsatt industristøtte fra norsk side. I denne sammenheng er vi glade for den interesse som er tilkjennegitt fra Norsk Hydro A.S. og Orkla-Borregaard A.S., samt fra utviklingsselskapet Innlandsvekst A.S., Tynset. Vi håper også på BVLIs fortsatte økonomiske støtte. Nyutvikling av miljøbioteknologiske prosesser er krevende, både hva kunnskaper og ressurser angår, men vi tror på ideen som et levedyktig og miljøriktig alternativ til andre løsninger. Derfor vil også NIVA med egne midler fortsatt satse betydelig på prosjektet.

Det er etablert et meget godt faglig samarbeid med Universitetet i Bergen ved prof. Torleif Lien, som leder en forskningsgruppe på sulfatreduserende bakterier. Bjørn Christensen tok sin eksamen innen området og fortsetter med et dr.scient.-opplegg på prosjektet med Lien og Laake som veiledere. Utover dette vil NIVAs medarbeidere fortsatt delta aktivt, og gjennom våre industripartnere vil annen kompetanse hos disse og ved NTH bli trukket med i arbeidet. Tverrfaglighet med bidrag fra teknologi, kjemi og mikrobiologi er en forutsetning for at et vellykket sluttprodukt kan presenteres i 1993.

Oslo 6. februar 1991

Morten Laake

INNHOLDSFORTEGNELSESide:

FORORD	2
1. SAMMENDRAG	4
2. UNDERSØKELSER AV VANN FRA LØKKEN VERK	5
2.1 Total antall bakterier	5
2.2 Anrikningskulturer for sulfatreduserende bakterier	5
2.3 H ₂ S-test med Cord-Ruwish-metode	6
2.4 H ₂ S-produksjon fra radioaktiv sulfat-S ₃₅	7
2.5 Ny prøveserie fra Løkken Verk	9
2.6 Kjemiske analysedata fra Løkken Verk	9
3. VURDERING AV RESULTATENE OG KONKLUSJONER	12
4. OPPLÈGG AV VIDERE UNDERSØKELSER	13
4.1 Feltundersøkelser	13
4.2 Laboratorieforsøk	14
4.3 Prosessutvikling	14
4.4 Budsjett	14
4.5 Prosjektgruppe	15
4.6 Plan for dr.scient.-oppgaven	15
BILAG 1. Biological fixation of metals in mine drainage and ore wastes	18
BILAG 2. Vekstmedium for sulfatreduserende bakterier (SRB)	20
BILAG 3. Analyse av sulfatreduserende bakterier	22
BILAG 4. Modified radiorespirometric assay for determination of sulfate reduction rate in cell suspensions	23
TABELLER	
Tabell 1. Totalantall bakterier i vann fra Løkken gruver	5
Tabell 2. Sulfidutvikling	7
Tabell 3. Vekst av bakterier	8
Tabell 4. Kjemisk/fysisk analysedata	11
Tabell 5. Budsjett for prosjektet "Biologisk fiksering av metaller i avrenning fra kisgruver", 1990-93	15
Tabell 6. Tidsplan for dr.scient.-prosjektet	17
FIGURER	
Figur 1. Vekstforsøk med en anaerob sulfatreduserende bakterie	10

1. SAMMENDRAG

Avrenning av surt gruvevann med høyt innhold av tungmetaller fra nedlagte kis-gruver er et alvorlig miljøproblem i flere vassdrag i Norge. NIVA har i lengre tid overvåket vannkvaliteten i en rekke av vassdragene som er belastet med slik forurensning.

Wallenberg-sjakta ved Løkken gruver i Orkdal ble nedlagt i 1984, og er nå i ferd med å fylles opp med vann. Det vil enda ta et par år før gruva er full slik at avrenning av gruvevann til omgivelsene starter. Gruva er godt egnet som modellsystem for å undersøke mikrobielle og kjemiske prosesser i andre tilsvarende anlegg. Da analysene av vannet i denne sjakta startet i 1986, ble det påvist ekstremt høye verdier av sulfat og oppløste tungmetall-ioner. pH var lav og lå i området 2,5-3,5. Dette tyder på at biologisk katalyserte oksydasjonsprosesser har foregått. Bakteriene av slekten Thiobacillus kan antas å være ansvarlige for prosessene.

Seinere har det blitt registrert en betydelig bedring av kvaliteten på gruvevannet i deler av sjakta. Sulfatinnholdet har gått noe ned, innholdet av tungmetall-ioner er tildels sterkt redusert og pH har steget. En slik forbedring av vannkvaliteten kan lettest forklares ved at det har foregått en biologisk reduksjon av sulfat til sulfid ved sulfatreduserende bakterier (SRB). Sulfidet har så dannet tungt løselige metallsulfider med de tilstedeværende metall-ionene.

Forprosjektet tok sikte på å undersøke om denne prosessen finner sted i systemet. Det er isolert to sulfatreduserende bakteriesterammer fra vannmassene i sjakta der forholdene er anoksiske. Hvorvidt dette er stammer som er i stand til å vokse ved lav pH og høye tungmetall-konsentrasjoner, og som er kvantitativt viktig som sulfidprodusent i systemet, er foreløpig ikke klarlagt. Tidligere kjente isolater av SRB krever nøytrale pH-verdier. Det er målt omdanning av radioaktivt merket sulfat til sulfid i prøver fra vannmassene i gruva.

Det må antas at tilgangen på egnede organiske substrater er en viktig begrensende faktor på bakterieveksten i gruvevannet. Mulige karbon- og energikilder kan stamme fra gammelt treverk i gruvegangene, rester av oljeprodukter eller annet avfall som er gjenglemt eller dumpet i gruva og organisk materiale som tilføres med overflatevann som renner ned i sjakta. En annen mulighet er at svoveloksyderende, kjemoautotrofe bakterier av typen Thiobacillus produserer biomasse som indirekte kan utnyttes av SRB, og en tredje at det siver metangass inn i gruva fra gassførende bergarter.

Dersom sulfatreduksjon virkelig foregår i gruvevannet må det antas at prosessen kan stimuleres kraftig ved tilsetning av organisk materiale. Målsetningen med prosjektet i fortsettelsen er derfor å klarlegge det mikrobiologiske grunnlaget for å utvikle en renseprosess for avrenningsvann fra kisgruver og avgangsdeponier basert på felling av tungmetaller med biogent dannet sulfid.

2. UNDERSØKELSER AV VANN FRA LØKKEN GRUVER

Forprosjektet ble startet i oktober 1989 med prøvetaking i Wallenberg-sjakta i Løkken. Prøvene ble hentet sterilt anaerobt, og under in situ trykk i 100 ml stålsylinder og lagret på kjølerom inntil analyse på NIVA. Den første prøveserien ble benyttet til utprøving og tilpassing av metodikk (Bilag 2-5). Nye prøveserier ble hentet 06.03.90 og bragt til Institutt for Mikrobiologi og Plantefysiologi, Universitetet i Bergen. Totalantall bakterier ble bestemt og anriking av sulfatreduserende bakterier ble foretatt av NIVA. Arbeidet er siden fortsatt som et felles stipendiatprosjekt. Resultatene er nærmere beskrevet i det følgende:

2.1. Total antall bakterier

Totalantallet av bakterier i vannprøvene ble bestemt ved en direkte tellingsmetode som består i farging og telling i fluorescensmikroskop med DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol). En passende vannmengde filtreres, og bakteriene farges og telles på filteret.

I dette tilfellet ga vannet i kontakt med luft brunlige utfellinger av metalloksyder, vesentlig jernoksyd, som gjorde det vanskelig å filtrere et stort nok volum til å få et signifikant antall bakterier på filteret. Det ble filtrert 10 ml etter tilsetning av 1ml formalin i 1 N HCl for å redusere utfellingen. Resultatet er gjengitt i Tabell 1:

Dyp (m)	Prøvestasjon	Bakterier pr. ml	95% sannsynlighetsområde
430 m	Lø 430	0.90×10^4	$\pm 0.14 \times 10^4$
490 m	Lø 490	0.46×10^4	$\pm 0.24 \times 10^4$

Tabell 1: Totalantall bakterier i vann fra Løkken gruver.

2.2. Anrikningskulturer for sulfatreduserende bakterier

Anrikninger ble satt opp 7.3.90 på Widdels ferskvanns basalmedium

(=WF) tilsatt 3 forskjellige karbonkilder (Widdel 1983):

10 mM laktat
 10 mM pyruvat
 20 mM acetat/H₂

Etter 19 dager var det tydelig vekst fra 490 m (Lø 490) i WF/pyruvat (ca. 5×10^7 bakt. pr. ml). De andre mediene ga ingen eller minimal vekst. Prøven fra 430 m (Lø 430) ga liten eller ingen vekst på alle medier. Det er derfor Lø 490 som er grunnlaget for de kulturer som det arbeides videre med. Ved mikroskopering sås lange, litt krumme staver (Vibrio-type) som av og til henger sammen to og to eller flere. Fra Lø 490 pyruvatkulturen ble det 29.3 overført 10 % inokulum til:

WF med 10 mM pyruvat
 WF " 10 mM laktat
 WF " 20 mM acetat
 WF " 2 mM acetat/H₂

Første overføring (= 1. passasje) til ferskt medium ga vekst på pyruvat og laktat. Det ble gjort 3 nye passasjer til disse 2 mediene med 1-3 ukers mellomrom for å framskaffe renkulturer for karakterisering og framstilling av antistoff.

Etter 4. passasje ble det laget en fortynningsrekke på WF med hhv. pyruvat og laktat tilsatt agar i rør anaerobt for å få enkeltkolonier. Fra de rør hvor det framkom enkeltkolonier ble det så isolert ca. 10 kolonier fra WF/pyruvat og ca 10 kolonier fra WF/laktat. Av utseende var koloniform og celler identiske, og det antas derfor at det er tale om ett isolat (Lø-490). Det holdes i live ved jevnlig overføringer og dessuten ved dypfrysing ved - 80° C.

2.3. H₂S-test med Cord-Ruwish-metode

Det ble gjort test på produksjon av H₂S fra anrikningskulturene for å sjekke om de bakteriene som vokste var sulfateduserende. En kjent mengde av prøven settes til et standardvolum av CuSO₄. Er H₂S til stede, dannes så CuS som er brunsvart. Fargestyrken er proporsjonal med mengden H₂S som er dannet og leses av i et spektrofotometer mot en standardkurve. Mengden H₂S var så vidt over bakgrunnsverdien i mediet i de kulturene som hadde liten eller ingen vekst. Der hvor det var god vekst, var det også H₂S-produksjon. De målingene som ble gjort er satt opp nedenfor i Tabell 2:

Karbonkilde:	Pyruvat	Laktat	Acetat 20mM	2mM Acetat/H ₂
Medium u/bakterier	1.47	*	*	*
1.passasje (26 døgn)				
1.parallell	2.74	2.42	2.61	2.23
2.parallell	7.82			
2.passasje (40 døgn)	0.60	3.75	*	*
3.passasje (32 døgn)	5.28	7.18	*	*
4.passasje (18 døgn)	0.83	2.42	*	*

Tabell 2: Sulfidutvikling (mM H₂S) under isolering av SRB stammer - målt etter angitt inkuberingstid (døgn) (=ikke testet).*

2.4. H₂S produksjon fra radioaktiv sulfat-S₃₅

En kjent mengde radioaktivt sulfat (S₃₅-SO₄ = varm) settes til testrørene samtidig som bakteriene/prøver settes til (Bilag 3). Ved sulfatrespirasjon blir både radioaktivt og ikke radioaktivt sulfat redusert til H₂S i et bestemt forhold. (Forholdet mellom redusert S₃₂ og S₃₅ tas hensyn til ved utregning.) Det dannede H₂S reagerer med ZnAc-løsning trukket opp i et filter festet i korken over testløsningen. Det dannes så ZnS-S₃₅ som måles kvantitativt med scintillasjonsteller. Gjenværende radioaktiv sulfat i kulturen måles også.

H₂S produksjonen ble i dette tilfelle ikke målt over tid, men ble sammenlignet med en kontroll uten bakterier som da representerer en nullverdi, dvs. ingen H₂S produksjon.

Siden prøvevannet fra Løkken inneholdt mye SO₄, ble det laget to serier, en med og en uten kald sulfat i mediet. Det ble også laget to serier prøvetilsetninger, en hvor 10 ml prøvevann ble satt til mediet direkte, og en hvor 10 ml vann ble filtrert og filteret overført til mediet. Filtringen ble gjort i anaerob hanskeboks. Noe sulfat antas å ville følge med på filtrene da konsentrasjonen av sulfat var svært høy i gruvevannet. Mengden produsert H₂S fra radioaktiv sulfat ble beregnet som følger:

$$\text{Produsert H}_2\text{S} = \frac{\text{dpm(S}_{35}\text{) sulfid på filter} * (\text{SO}_4)(\text{nmol}) * 1.06}{\text{dpm(S}_{35}\text{) sulfat på rør} * \text{tid (timer)}} \quad \frac{\text{nmol}}{\text{time}}$$

Forsøksoppsett og resultat er gjengitt i Tabell 3. Etter ca. 20 dager var det god synlig vekst og uke 14 ble aktiviteten målt. Forskjellene mellom kontrollen og prøver med bakterievekst viste tydelig sulfatreduksjon i prøver tilsatt pyruvat. Med tilsetning av SO_4 ga kontrollen ca 10 nmol $\text{H}_2\text{S}/\text{t}$ mot 1000 nmol $\text{H}_2\text{S}/\text{t}$ i prøver med vekst.

I prøver uten bakterievekst (dvs. $<10^4$ – 10^5 celler pr. ml) lå aktiviteten på samme nivå som kontrollen. Ved å redusere mengden kald sulfat fra prøven ved overføring av filter ble følsomheten vesentlig forbedret.

Prøvetype	Medium:	WF + SO_4		WF - SO_4	
		pyruvat	acetat	pyruvat	acetat
Vannprøve	Bakterier pr.ml.	9×10^7	-	$<10^6$	5×10^6
	Produsert H_2S nM/t (dpm)	1059 (52809 dpm)	*	*	9 (826 dpm)
Filter- prøve	Bakterier pr.ml.	-	-	4.5×10^7	ca. 10^6
	Produsert H_2S nM/t (dpm)	10 (633 dpm)	*	2.63 (1147715 dpm)	*
Kontroll	Produsert H_2S nM/t (dpm)	13 (802 dpm)	*	*	0.0002 (1157 dpm)

Tabell 3: Vekst av bakterier, målt radioaktivitet som H_2S og beregnet anrikninger fra vannprøver, Løkken gruver.

- ingen synlig vekst

* måling ikke utført.

2.5. Ny prøveserie fra Løkken Verk.

Stipendiatprosjektet i samarbeid med Universitetet i Bergen ble oppstartet 20.09.90 med finansiering fra Nordisk Industrifond. Resultatene fra dette er ennå svært foreløpige og vil bare bli kort omtalt her.

En ny prøveserie fra Wallenberg sjakt ble tatt november 1990. Det ble nå benyttet vanlig Ruttner vannhenter for å sikre en gradvis dekomprimering av bakteriecellene, som er problematisk å få til med trykkampullene som ble benyttet tidligere. Det arbeides imidlertid med å løse dette teknisk.

En ny SRB-stamme av Vibrio-type ble isolert etter samme prosedyre som tidligere (Lø 480), og som er vesensforskjellig fra Lø 490. Begge er testet for vekst på alle substrater som er kjent for å kunne utnyttes av SRB. Begge akkumulerer acetat i mediet.

Mot Lø 490 er det fremstilt et kanin-antiserum for immunologisk påvisning i gruvevann. Det ble oppnådd et meget høyt antistoff-titer (60.000) og nok serum til senere arbeid. Foreløpige vekstforsøk i vann fra Løkken (Figur 1) viser at isolatet vokser godt i prøver fra høyt oppe i gruva (200-340 m dyp), hvor metallnivåene er moderate og pH 5-6. Dette tyder på at veksthemming fra tungmetaller er en viktig begrensende faktor (Fig.1).

2.6. Kjemiske analysedata fra Løkken Verk.

Wallenberg-sjakta ved Løkken Verk i Orkdal ble nedlagt i 1984 og er nå i ferd med å fylles opp med vann. Det vil enda ta etpar år før gruva er full og avrenning av gruvevann til omgivelsene starter. NIVA startet kjemiske analyser av gruvevannet i 1986, og det ble da påvist ekstremt høye verdier av sulfat og tungmetall-ioner i bunnen av sjakta. pH-verdiene lå i området 2,5 - 3,5. Dette viser at biologisk katalyserte oksydasjonsprosesser har foregått. Bakterier av slektene Thiobacillus og Ferrobacillus antas å være ansvarlige for prosessene. Et sammendrag av kjemiske data er gjengitt i tabell 4.

Seinere har det blitt registrert en bedring av kvaliteten på gruvevannet i deler av sjakta. Sulfatinnholdet har gått ned, innholdet av tungmetaller er sterkt redusert og pH har steget. En slik forbedring av vannkvaliteten kan lettest forklares ved at det har foregått dissimilatorisk reduksjon av sulfat til sulfid, og at sulfiden har reagert med tilstedeværende metallioner og dannet tungt løselige metall-sulfider. Det er lite sannsynlig at andre mekanismer kan forklare fenomenet.

VEKSTFORSØK MED STAMME LØ-490
i ufortynnet gruvevann

Dager	DYP, M:	<u>Bakterier pr. ml x 10⁷</u>					
		200	300	340	380	430	490
0		1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
5		2.5	1.3	1.8	1.4	2.7	1.9
7		8.9	3.1	1.7	1.3	1.8	1.7
12		10.0	6.0	6.9	1.5	1.6	1.4

Vekstforsøk med stamme LØ-490
i gruvevann (ufortynnet)

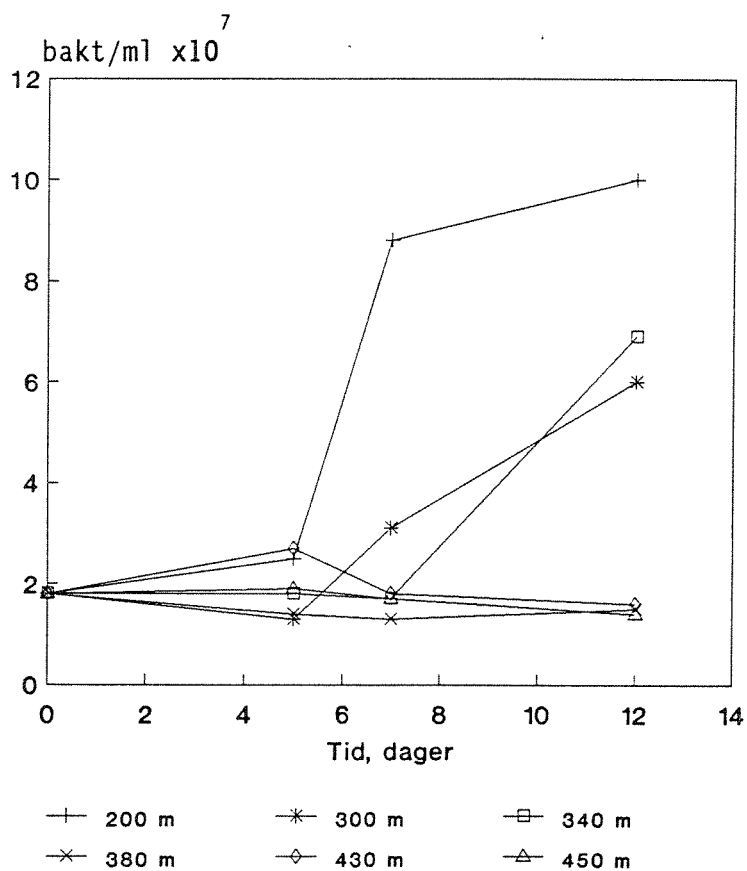


Fig. 1: Vekstforsøk med en anaerob, sulfatreduserende bakterie (LØ-490) isolert fra Wallenberg sjakt, Løkken.

Dato	Prøve- nivå M	Vannst- nivå M	pH	Kond ms/m	S04 mg/l	Fe-tot mg/l	Fe-2+ mg/l	Cu mg/l	Zn mg/l	Cd g/l
860917	390	336	2.8	1790	23400	5750	700	120	1240	1980
	490		3.96	3490	74200	25700	1000	0.7	4130	105
861104	333	331	5.85	69.1	340	1.63	1.15	0.31	1.54	4.4
	381		2.54	1376	15000	2580	3000	157	504	1540
	440		3.32	3180	52500	16900	18750	47.2	2900	7200
870617	311	310	5.89	64.5	318	0.86	0.23	0.64	2.87	10
	320		5.77	65.7	304	0.98	0.23	0.49	2.6	10
870708	328	308	5.1	70.6	336	1.07	0.19	0.28	1.71	4.1
	358		3.78	915	8850	1280	1400	36.5	303	880
	390		3.72	2800	45200	14000	16600	18.8	2370	3050
	440		3.41	3040	52100	20000	17000	30.1	2650	6290
871111	490	299.8	3.92	3640	71700	26200	26000	1.49	3730	45
	302		5.45	478	3080	121	0.5	15.2	41.2	230
	320		4.99	602	4920	315	<0.01	9.1	95	230
880510	360	286.6	4.19	830	8000	950	0.65	25.9	287	760
	288.6		6.57	69.9	302	3.4	0.84	0.21	0.73	2.9
	292		6.59	69.9	290	3.34	0.85	0.22	0.74	2.9
	300		5.95	681	4620	114	110	0.62	35.1	50
880929	315	271	5.86	681	5000	148	145	0.31	28.8	42
	273		6.12	61.5	400	1.57		0.56	2.41	6
	285		6.19	62	388	1.67		0.55	2.46	6
	300		6.08	80	494	8.35		0.78	3.79	8
	340		5.7	455	5325	240		3.5	91	160
	380		4.93	490	6560	608		5.98	188	380
890308	430	236.4	4.39	1140	20600	6650		0.83	1240	160
	238.4		6.09	71.3	336	1.15		0.16	2.22	6
	300		5.59	696.8	5550	456		5.79	112	230
	340		5.49	736.2	6150	437		6.62	152	290
	380		5.39	743.3	7000	473		15.7	184	430
	430		4.03	2803	47600	15900		0.21	2540	110
891212	480	204.5	4.2	3527	66000	21800		0.38	3400	220
	207		6.3	78	408	1.19		0.22	1.04	3.3
	265		6.21	78.1	400	0.93		0.16	0.97	3
	300		6.15	78.7	393	1.08		0.2	1.01	3.2
	340		4.91	668	7000	640		22.4	153	430
	380		6.14	78	415	1.15		0.17	0.98	3
	430		4.4	2070	35000	11000		0.42	1760	30
	490		4.11	2480	44200	13800		0.36	2390	3

Tabell 4. Kjemisk/fysisk analysedata for Wallenberg-sjakt - Løkken Gruver.

3. VURDERING AV RESULTATENE OG KONKLUSJONER

Som resultat av forprosjektet er det isolert to sulfatreduserende bakteriestammer (Lø-480 og Lø-490) fra anoksisk vann i bunnen av Wallenberg-sjakta. Hvorvidt dette er stammer som er i stand til å vokse ved lave pH-verdier og høye tungmetallkonsentrasjoner, og som er kvantitativt viktig som sulfidprodusent i systemet, er foreløpig ikke klarlagt. Det er målt omsetning av radioaktivt merket SO_4 til H_2S og forekomst av sulfatreduserende bakterier i vann fra gruva. Dette bekrefter at biogen dannelse av sulfid finner sted.

Sulfatreduksjon under de forhold som eksisterer i gruvevann er tidligere ikke beskrevet. Det er derfor nødvendig å opparbeide en grunnleggende forståelse av de faktorer som påvirker prosessen. Det blir særlig viktig å klarlegge substratspekter, pH-toleranse og mekanismer for tungmetall-resistens hos bakteriene.

I grove trekk bør følgende arbeidsoppgaver inngå i det fortsatte arbeidet med prosjektet i 1991:

1. *Undersøkelser med sikte på å måle omfanget av sulfatreduksjonen som finner sted i gruvevannet (anriking og kvantifisering av SRB, måling av sulfatreduskjon in situ, tilbakepoding av isolerte stammer i vekstmedium som tilsvare de naturlige forholdene i gruvevannet).*
2. *Karakterisering av isolater, særlig med hensyn til substratspekter, pH-toleranse og eventuell resistens mot tungmetaller.*
3. *Framstilling og karakterisering av antisera mot isolatene, som kan brukes til rask påvisning av SRB i vannprøver vha immunologiske metoder (immunofluorescens, ELISA).*
4. *Kjemostraforsøk med sikte på å finne fram til stammer eller eventuelt naturlige konsortier som er egnet til bruk for biogen felling av tungmetaller og bestemme deres optimale vekstvilkår.*

Dersom resultatene av disse undersøkelsene er lovende bør det gjøres forsøk i teknisk skala i 1992-93 med sikte på praktisk anvendelse av SRB for felling av tungmetaller og dermed bedring av vannkvaliteten. Man kan tenke seg to mulige prinsipper for slik anvendelse:

1. *Prosessen kan stimuleres direkte i vannfylte gruver ved å optimalisere vekstvilkårene for SRB, f.eks. ved tilsetning av egnet vekstsubstrat.*

2. *Prosessen kan utnyttes i et renseanlegg som mottar avrenning fra gruver- og avgangsdeponier.*

Begge prinsippene forutsetter at man kan tilby bakteriene gunstige vekstvilkår, hvilket igjen er betinget av at man har en god forståelse for de faktorene som påvirker veksten, som grunnlag for tekniske løsninger.

4. OPPLÉGG AV VIDERE UNDERSØKELSER

4.1. Feltundersøkelser

Påvise/bekreft at sulfatreduksjon finner sted naturlig i Wallenberg-sjakt på Løkken og undersøke omfanget av prosessen. Utvide prøvetakingen med flere vannfylte gruver (Stord, Karmøy, Folldal og Skorovass).

- A. *Anrike stammer av SRB og isolere renkulturer.*
- B. *Kvantifisere SRB i gruvevannet vha MPN-metoden og Immunofluorescens-telling (Coons & Capland, 1950).*
- C. *Teoretisk beregne omfang av sulfatreduksjon utfra den observerte nedgangen i tungmetallkonsentrasjonen.*
- D. *Måle aktivitet ved hjelp av radiorespirometri (Rosser & Hamilton, 1983).*
- E. *Undersøke om egne isolater og typestammer av SRB kan vokse i gruvevann tilsatt ulike substrater.*
- F. *Undersøke andre tilgjengelige kisgruver med hensyn til naturlig sulfatreduksjon. Aktuelle lokaliteter kan være Vigsnes Kopperverk, Stordø Kopperverk, Skorovatn Gruver og Folldal Verk.*

4.2. Laboratorieforsøk

Karakterisere SRB-stammer fysiologisk og økologisk.

- A. *Bestemme substratspekter, pH-toleranse, resistensegenskaper osv.*
- B. *Relatere SRB-stammenes egenskaper til fysiske og kjemiske forhold i gruvevannet for å finne ut hvilke faktorer som evt. begrenser eller inhiberer vekst.*
- C. *Utføre kjemostatforsøk for å undersøke konkurranseforhold mellom ulike SRB-stammer ved vekstbetingelser som tilsvarer forholdene i gruvevann.*

4.3. Prosessutvikling

Undersøke mulighetene for å optimalisere prosessen for rensing av gruveavrenning.

- A. *Velge ut SRB-stammer med gunstige egenskaper.*
- B. *Optimalisere stammer, f.eks. med hensyn til tungmetallresistens.*
- C. *Velge ut organiske avfallsprodukter som kan utgjøre karbonkilde for vekst av SRB i gruvevann.*
- D. *Gjennomføre praktiske forsøk i pilot-skala og teknisk skala.*

4.4. Budsjett

Videreføring av prosjektet er sikret gjennom en 4-årig bevilgning fra Nordisk Industrifond, men som forutsetter 50% med finansiering fra industrien. (Bilag 1). Prosjektet inngår i paraplyprogrammet "Bioteknologi og Miljø" og er årlig gjenstand for evaluering av en gruppe internasjonalt anerkjente forskere. I dette inngår også utvikling av prosessanlegg for ionebytting og absorpsjon i biomasse i samarbeid med Innlandsvekst A/S, Tynset. Følgende budsjett er lagt opp for hele perioden (Tabell 5):

BUDSJETT (1.000 NOK)	1990	1991	1992	1993
Nasjonal finansiering :				
NIVA egenfinansiering :	200	100	0	0
NTNF (avslag i 1990) :	200	600	600	600
Industrifinansiering:				
*BVLI :	160	135		
Innlandsvekst AS :	100	200		
Orkla-Borregaard A/S :		100		
Foreløpig ikke klarlagt:			745	935
Nordisk Industrifond :	260	435	745	935
SUM pr. år:	920	1.570	2.090	2.470

Tabell 5: Budsjett for prosjektet "Biologisk fiksering av metaller i avrenning fra kisgruver", 1990-93.

**BVLI - Bergverkenes Landssammenslutnings Industrigruppe, Naturvernkomitéen.*

4.5. Prosjektgruppe

Den vesentlige del av prosjektets del 1 og 2 vil bli utført som en dr.scient.-oppgave. Cand.scient. Bjørn Christensen er engasjert pr. 15. sept. 1990, og det er avtalt samarbeid om veiledningen med Universitetet i Bergen ved prof. Torleif Lien.

Ved NIVA vil dessuten cand.mag. Åse Bakketun arbeide tilnærmet full tid på prosjektet. Som veileder for dr.scient.-oppgaven fungerer forskningsleder Morten Laake. Prosjektleder for totalprosjektet og ansvarlig overfor Nordisk Industrifond er forskningsleder Torsten Källqvist.

4.6. Plan for dr.scient.-oppgaven

Det henvises til tabell 6. Dr.scient.-oppgaven ventes avsluttet i desember 1993. Pilotforsøk i kjemostat startes ved NIVA i 1991, mens forsøk i teknisk skala planlegges utført i 1992-93.

Litteratur:

Coons, A., Capland, M.H. (1950): Localization of antigen in tissue cells. Improvements in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med. 91:1.

- Hamilton, W.A. (1983): Simple assay for determination of (^{35}S) sulphate reduction activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1956-1959 (1983).
- Widdel, F. (1983): Methods for enrichment and pure culture isolation of filamentous gliding sulphatereducing bacteria. *Arch.Microbiol.* 134: 282-285.
- Battersby, N.S. (1988): Sulphate-Reducing Bacteria. In: B. Austin (ed.); *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Wiley & Sons Ltd., London, pp. 269-299.

TABELL 6. Tidsplan for dr.scient.- prosjektet.

	1990	1991	1992	1993
Jan.	-Forprosjekt -Prøvetaking	-prøvetaking fra andre lokaliteter -anrike og isolere renkulturer -karakterisere antiserum (kryssreaksj.)	-fortsette karakterisering og kjemostatforsøk	-fortsette modifisering av stammer, samt utprøving og optimalisering av prosess
April	-Analyser og effektivitetsbestemmelser	-starte karakterisering av renkulturer		
Juli			-velge ut egnede stammer el. konsortier for utprøving i pilotprosess -starte evt. modifisering av stammer	-avslutte eksp. arbeid, starte skrivefase for dr.scient-oppgaven
Okt.	-prøvetaking- Løkken -starte anrikn. og kvantifisering, -starte kjemostatforsøk -beregne omfang av sulfatreduk.	-starte kjemostatforsøk -framdr.rapp.	-starte utprøving og optimalisering av pilotprosess -framdr.rapp.	-sluttrapport (dr.scient-avhandling)
Des.	-starte framstilling av antiserum mot Lø-490.			

**BIOTECHNOLOGY FOR DETOXIFICATION AND REGENERATION
OF WASTES AND WASTE WATERS OF INDUSTRIAL ORIGIN**

Proposal for part-project in programme area:

1. Detoxification of waste water and wastes
2. Regeneration of nutrient and energy resources

Name and Adress of Organization:

Norwegian Institute for Water Research, P.O. Box 69, Korsvoll,
N-0808 OSLO 8

Telephone: 47 - 2 - 23 52 80 Telefax: 47 - 2 39 41 89

Person Responsible: Torsten Källqvist

Collaborating principally with:

Ole Rasmussen Gensplejningsgruppen, Lyngby
Charlotte Rye, I. Krüger A/S, Copenhagen
E. Börje Lindström, Umeå Universitet
Bergverkenes Landsammenslutnings Industrigruppe

Title of part-project: Biological fixation of metals in mine drainage
and ore wastes.

Aim of part-project: To develop biotechnology for fixation,
precipitation and possibly separation of metals leaking from metal
ores and old mines, through cultivation or addition of metal fixing
bacteria, algae and fungi or their products.

Abstract:

Dissolution of toxic metals from old mines and ore wastes has for centuries polluted the Nordic watersheds, resulting in severe damages to freshwater fisheries and ecosystem processes. In situ methods for fixation and/or separation of metals will be studied along three lines of development:

Addition of metal tolerant and accumulating bacteria together with organic substrates for precipitation of metals in deep, water-filled mine shafts. Species of Pseudomonas, Zoogloea and anaerobic sulphate reducing bacteria (Desulfovibrio a.o.)

Treatment of mine water by fixed bed biofilters pre-adapted a) by natural selection and inoculation of bacteria and fungi, and b) in reactors designed for growing mats of algae or plants.

Fixation of metals in wasted ores by biological methods, i.e. addition of metal binding biopolymers or bacteria.

The project will primarily focus on basic studies of microorganisms which may bring about metal precipitation by sulphate reduction (pt. 1 above). Resistance to metals and growth requirements (e.g. pH value, temperature and organic substrate) will be studied. Secondly, practical methods for in situ treatment, based on direct or indirect fixation by microorganisms will be developed and tested in the field.

Källqvist, Biological fixation of metals in mine drainage and ore wastes

STAFFING LEVEL

a. funded elsewhere

b. funded by this project

Research workers

Technical staff

Students etc.

	1990		1991		1992		1993	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Research workers		0.4		1.1		1.1		1.1
Technical staff		0.5		0.9		1.2		1.7
Students etc.		1		1		1		1

(part-timers added in as the appropriate fraction of a year)

PART-PROJECT BUDGET

(do not correct for inflation)

Personnel

Research workers

Technical staff

Students, etc.

Consumables, incl.

computer software

Travel and field work

TOTAL, Currency NOK

	1990	1991	1992	1993
Research workers	300000	715000	715000	715000
Technical staff	240000	450000	675000	875000
Students, etc.	250000	250000	250000	250000
computer software	100000	125000	320000	360000
Travel and field work	30000	30000	130000	270000
TOTAL, Currency NOK	920000	1570000	2090000	2470000

Level of National Funding

Secured

Applied for

Level of Industrial funding

Secured

Applied for

OTHER FUNDING, TOTAL

Currency: NOK

	1990	1991	1992	1993
Secured	200000	100000	0	0
Applied for	200000	600000	600000	600000
Secured	260000	0	0	0
Applied for	0	435000	745000	935000
OTHER FUNDING, TOTAL	660000	1135000	1345000	1535000

NORDIC FUNDS

Applied for (NOK)

260000	435000	745000	935000
--------	--------	--------	--------

In addition we plan to apply for national funding for the following durable equipment and computer hardware in connection with the project:

Year	Equipment, source of funding	Value ca.
1990-91	Continuous cultivation equipment (internal funds and industry)	200000
1992-93	Construction of pilot plant on site (industry)	1000000

BILAG 2: VEKSTMEDIUM FOR SULFATREDUSERENDE BAKTERIER (SRB).Mediets sammensetning:

Natrium laktat	3,5 g
Gjærekstrakt*	1,0 g
Pepton	2,0 g
Magnesium sulfat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0 g
Natrium sulfat, Na_2SO_4	1,5 g
Kalsium klorid, $CaCl_2$	0,1 g
Dikaliumfosfat, K_2HPO_4	0,5 g
Ferro-ammonium sulfat, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	0,4 g
Natrium-ascorbat	0,1 g
Destillert vann	1 L

pH = 7,5 ± 0,3 etter sterilisering.

Litteratur: U.S.Stand. Meth. 15 utgave, side 783, nr. 44.

*Det står kjøttekstrakt i Stand. Meth., men gjærekstakt i original-litteratur.

Preparering:

Gjærekstrakt*	1,0 g
Pepton	2,0 g
Magnesium sulfat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0 g
Natrium sulfat, Na_2SO_4	1,5 g

Løs i 500 mL destillert vann.

Tilsett 2 mL stand. Ca-løsning.

Tilsett 7 g 50% Natriumlaktat-løsning *.

Juster volumet til 950 mL med destillert vann.

Reguler pH til 7,5 med 0,1 molar NaOH.

Juster volumet med dest. vann til 1000 mL.

*Hvis man ikke har Na-laktat: Vei ut 3,1 g 90%-ig melkesyre. Tilsett 100 mL dest. vann. Tilsett under pH-regulering, 27 -30 mL 1 N NaOH, til pH ca. 7,5 (finjuster om nødvendig med svakere syre eller lut). Tilsett dette til de 500 mL løsning nevnt ovenfor.

Prosedyre:

- A Autoklaver ved 121°C i 15 min., f.eks. i 200 mL porsjoner i skrukorkflasker. Brukes ferskt tillaget. Avkjøl så raskt som mulig, gjerne i kaldt vann.
- B Lag standard fosfatbuffer, 1 M/L, i blanding som gir $\text{pH} = 7,5 \pm 0,1$ i blandingen når 0,6 mL buffer settes til 200 mL destillert vann (se oppskrift under LØSNINGER). Fordel i små porsjoner, f.eks. 50 mL i skrukorkflasker. Autoklaver ved 121°C i 15 min. Lagres i kjølerom.
- C Lag en konsentrert løsning av nøytralisert ascorbinsyre: Løs 0,9 g ascorbinsyre i ca. 80 mL dest.vann. Under pH-regulering, tilsett ca. 5 mL 1 N NaOH til $\text{pH} = 7,5$. Juster volumet til 100 mL. Sterilfiltrer og fordel i sterile skrukorkflasker, fyll ikke mer enn til halvt volum. Lagres i dypfryser, frys inn med flasken på skrå. Gul løsning er ubrukbar.
- D Lag en konsentrert løsning av ferro-ammonium-sulfat: Løs 2 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ i 50 mL dest. vann. Sterilfiltrer et passende volum. Må lages ny hver gang.

Ferdiggjørelse av mediet:

Løsning	Pr. volum av løsning A, tilsett, mL:		
	200 mL	500 mL	1000 mL
B	0,6	1,5	3
C	2	5	10
D	2	5	10

Litteratur: U.S.Stand.Meth. 15 utgave, side 783, nr. 44.

BILAG 3: ANALYSE AV SULFATREDUSERENDE BAKTERIER.

Bruk MPN-fortynningsteknikk. Velg oppsett etter forventet bakteriekonsentrasjon, se NS 4790 Del 1.

Prøveporsjoner: 1 mL ufortynnet eller fortynnet prøve. Ved fortynning, tilsett fortynningsvannet 1 mL steril ascorbinsyreløsning (C) pr. 100 mL fortynningsbuffer. Prøveporsjoner > 1 mL filtreres gjennom membranfilter, og filteret rulles sammen på filteroppsatsen og legges ned i sterile skrukorkrør.

Analysebeholdere: Ca 20 mL skrukorkrør med stor åpning.

Fremgangsmåte: Pippeter ut prøveporsjonene i rørene, eller filtrer og putt filtrene ned i rørene. Fyll opp rørene med nytillaget medium, enten med pipette eller med utstyr for sterilfordeling av væske. Pass på at pipetten eller munnstykket på fordelingsrøret ikke kommer i kontakt med mediet som er i røret, fordi neste rør da kan bli forurenset. Skru korkene tett til.

Inkubering: Sett rørene til inkubering ved 20 °C*.

Positive rør blir svarte etter 4 - 21 døgn.

*I Stand. Meth. står det 20 -30 °C, velg temperatur som er relevant for prøvene.

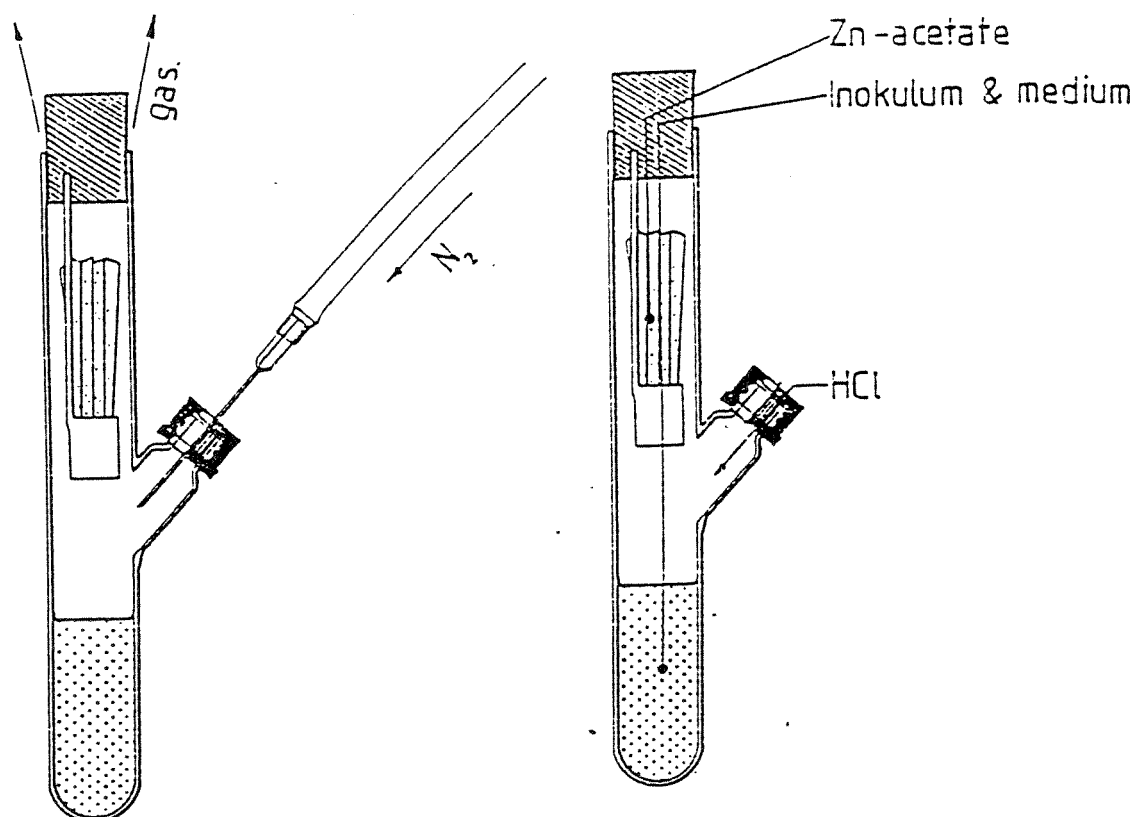
Litteratur: U.S. Stand. Meth., 15 utgave, side 918.

**BILAG 4. MODIFIED RADIORESPIROMETRIC ASSAY FOR DETERMINATION OF
SULFATE REDUCTION RATE IN CELL SUSPENSIONS**

1. Prepare the rest tubes by mounting a filter paper wick in the plastic rod cup assembly (Figure). Flush with Ar (or N₂) for at least 20 sec, inlet through the side arm and outlet through the top.
2. 30 ml of the cell suspension to be tested is kept in a 50 ml serum bottle. The isotope ³⁵S sulfate is added to a final activity of 1-2 μCi per ml.
3. While flushing, add 6 ml of the cell suspension through the top using a syringe with a long needle.
4. While flushing, inject slowly 0.45 ml of anaerobic 1 M Zinc acetate solution slowly into the plastic cup. Thereafter, incubate the test tubes in a water bath at 30⁰ C.
5. To the control test tubes, 0.5 ml of anaerobic 6 N HCl is injected through the side arm. Add carefully. Note the zero time. To test the total amount of activity in the cell suspension, dispense 0.1 ml aliquotes into each of 3 scintillation vials, using a 100 μl Hammilton syringe.

Incubate the control tubes for at least 2 hours in a water bath at 30⁰ C with shaking (100 osc/min). After 2 hours, transfer the plastic cup assembly and wick into a scintillation vial.

6. Incubate the test tubes for 6 hours in a water bath at 30⁰ C.
7. Add 0.5 ml of anaerobic 6 N HCl into the cell suspension, and incubate for at least 2 hours at 30⁰ C with shaking as for the control tubes.
8. After 2 hours, transfer the plastic cup assembly and the wick into a scintillation vial.



The rate of sulfate reduction ($\text{nmole} \times \text{t}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ sample) is calculated using the following equation:

$$\frac{{}^{35}\text{S-sulfide on the filter (dpm)} \times \text{cold sulfate (nmole)} \times 1.06}{\text{total amount of } {}^{35}\text{S-sulfate (dpm)} \times \text{time of incubation} \times \text{volume}}$$

The factor of $\times 1.06$ is to account for the biological discrimination between ${}^{32}\text{S}$ - and ${}^{35}\text{S}$ -sulfate.

The net rate of sulfate reduction is obtained by subtracting the reduction rate of the control from the rate of the sample.