



# Przygotowywanie magnetycznych minerałów żelaza przy użyciu bakterii redukujących siarczany

## Preparation of Magnetic Iron Minerals Using Sulphate-Reducing Bacteria

*Alena LUPTÁKOVÁ*<sup>1)</sup>, *Jana JENČÁROVÁ*<sup>2)</sup>, *Petr JANDAČKA*<sup>3)</sup>,  
*Miloslav LUPTÁK*<sup>4)</sup>, *Dalibor MATÝSEK*<sup>5)</sup>, *Pavla DERNEROVÁ FOITOVÁ*<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> Ing., PhD; Department of Mineral Biotechnology, Institute of Geotechnics of Slovak Academy of Sciences, Watsonova 45, 043 53 Kosice, Slovak Republic, e-mail.: [luptakal@saske.sk](mailto:luptakal@saske.sk), tel.: (+421) 55 792 2622

<sup>2)</sup> Ing., PhD; Department of Mineral Biotechnology, Institute of Geotechnics of Slovak Academy of Sciences, Watsonova 45, 043 53 Kosice, Slovak Republic, e-mail.: [jencarova@saske.sk](mailto:jencarova@saske.sk), tel.: (+421) 55 792 2610

<sup>3)</sup> Mgr., PhD; Institute of Physics and Nanotechnology Centre, VŠB-Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic, e-mail.: [petr.jandacka@vsb.cz](mailto:petr.jandacka@vsb.cz), tel.: (+420) 59 732 3100

<sup>4)</sup> Ing., PhD; Technical University in Kosice, Faculty of Metallurgy, Vysokoskolska 4, 042 01 Kosice, Slovak Republic, e-mail.: [milo.luptak@tuke.sk](mailto:milo.luptak@tuke.sk), tel.: (+421) 55 602 2620

<sup>5)</sup> Dr. Ing.; Institute of Clean Technologies for Mining and Utilization of Raw Materials for Energy Use, Institute of Geological Engineering, VŠB-Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic, e-mail.: [dalibor.matysek@vsb.cz](mailto:dalibor.matysek@vsb.cz), tel.: (+420) 59 732 4540

<sup>6)</sup> Ing.; Institute of Mining Engineering and Safety, VŠB-Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic, e-mail.: [pavla.dernerova.st@vsb.cz](mailto:pavla.dernerova.st@vsb.cz), tel.: (+420) 59 732 1274

### Streszczenie

Zastosowanie metabolizmu bakterii redukujących siarczany jest jedną z metod przygotowania siarczków. Jest to metoda biologiczno-chemiczna bazująca na zdolności bakterii do redukcji siarczanów do siarkowodoru, który łączy się z kationami żelaza (II) tworząc nierozpuszczalne osady – siarczki żelaza. W pewnych warunkach wzrostu bakteriogeniczne siarczki żelaza mogą posiadać cechy magnetyczne. Celem pracy jest zbadanie właściwości magnetycznych i składu bakteriogenicznych siarczków żelaza zsyntezowanych w kulturach bakterii redukujących siarczany w warunkach laboratoryjnych.

Słowa kluczowe: biomineralizacja, bakteriogeniczne siarczki żelaza, bakterie redukujące siarczany

### Wprowadzenie

Biogeniczne powstawanie minerałów metali spowodowane znaczną aktywnością mikroorganizmów zwróciło uwagę mikrobiologów, geologów i biofizyków. Jedną z metod formowania się minerału zawierającego żelazo jest zewnątrzkomórkowe osadzanie, indukowane przez zróżnicowane bakterie redukujące siarczany (Posfai i Dunin-Borkowski, 2006). Bakterie redukujące siarczany (SRB) są heterotrofami beztlenowymi, które wykorzystują szeroką gamę substratów organicznych i siarczanów jako akceptorów elektronowych, a następnie redukują do siarkowodoru podczas redukcji bakteryjnej siarczanowej (Odom i Singleton, 1993). Siarkowódór otrzymany z redukcji siarczanowej odgrywa ważną rolę w unieruchomieniu siarczków metali w osadach, ale również stosowany

### Summary

Using the sulphate-reducing bacteria metabolism is one of the methods of iron sulphides preparation. It is a biologic-chemical method based on the ability of these bacteria to reduce sulphates to hydrogen sulphide, which binds with ferrous cations to form insoluble precipitates – iron sulphides. Under certain bacterial growth conditions biogenic iron sulphides can be magnetic. The target of this work was to study the magnetic properties and composition of biogenic iron sulphides synthesized in cultures of sulphate-reducing bacteria under specific laboratory conditions and modified growth media.

Keywords: biomineralization, biogenic iron sulphides, sulphate-reducing bacteria

### Introduction

Biogenic formation of iron minerals due to the vital activity of microorganisms has recently attracted ever-increasing attention of microbiologists, geologists, and biophysicists. One of the possible methods of iron-containing mineral formation is their extracellular precipitation induced by dissimilatory sulphate-reducing bacteria (Posfai and Dunin-Borkowski, 2006). Sulphate-reducing bacteria (SRB) are anaerobic heterotrophs that utilize a range of organic substrates and sulphates as terminal electron acceptors that are reduced to hydrogen sulphide during bacterial sulphate reduction (Odom and Singleton, 1993). The hydrogen sulphide produced from sulphate reduction plays a major role in metal sulphides immobilization in sediments but has also been applied to bioreme-

jest w bioremediacji metali w wodach i odciekach po ługowaniu (Skousen i inni, 1998). W środowisku bogatym w żelazo SRB tworzy siarczek żelaza, który jest związkami o różnorodnym składzie i zachowuje się raczej jak faza, niż związek stechiometryczny –  $Fe_{1-x}S$ . Siarczki biogeniczne mogą zawierać mackinawit, piryt, markazyt, greigit i pirotyt wraz z produktem będącym zależnym od chemii roztworu (Benning i inni, 2000). W określonych warunkach wzrostu bakteryjnego, związki  $Fe_{1-x}S$  mogą powstawać w formie biogenicznych siarczków żelaza. Magnetyczny  $Fe_{1-x}S$  tworzy zewnętrzny rodzaj płaszczka na bakterii, który jest dobrym adsorbentem biorąc pod uwagę stosunek jego dużego pola powierzchni do objętości. Zdolność adsorpcyjna bakteryjnie powstałego  $Fe_xS_y$  została dogłębnie zbadana jako alternatywa dla odzyskiwania metali ciężkich ze środowisk wodnych (Watson i Elwood, 1994). Struktura systemu  $Fe_{1-x}S$  jest złożona, a w bogatych w siarkę miejscach mogą występować związki  $Fe_{1-x}S$ , natomiast defekty kationowe dostarczają aktywnych centrów adsorpcji. Takie czynniki strukturalne  $Fe_{1-x}S$  znajdują swoje odzwierciedlenie we właściwościach magnetycznych siarczków żelaza, które są nieco zróżnicowane, jeśli bazuje się ściśle na stosunku Fe/S (Power i Fine, 1976). Podatność magnetyczna bakteryjnie produkowanego siarczku żelaza zależy od wartościowości żelaza (Marius i inni, 2005). Potencjał redoks, który kontroluje stan oksydacji Fe, jest ważny dla produkcji  $Fe_{1-x}S$ . Wartość pH decyduje o stężeniu jonów siarczku w roztworze ( $S^{2-}$ ), inne aniony i kationy również mogą wpływać na właściwości magnetyczne materiału produkowanego przez mikroorganizmy, a mała zmiana w składzie może mieć duży wpływ na podatność magnetyczną  $Fe_{1-x}S$  (Watson i inni, 1999). Wartościowość żelaza determinuje podatność magnetyczną powstałego  $Fe_{1-x}S$ . Wzrost zawartości żelaza (II) wchodzącego w skład układu żelazo (II) – żelazo (III) powoduje wzrost podatności magnetycznej produkowanego siarczku żelaza (Marius i inni, 2005).

W artykule prezentujemy wstępne wyniki badań dotyczących magnetycznych właściwości i składu biogenicznych siarczków żelaza zsyntezowanych w środowisku kultur bakterii redukujących siarczany, przygotowanych w różnorodnych warunkach laboratoryjnych i pod wpływem zmodyfikowanego czynnika wzrostu.

## Metody i materiały

### Mikroorganizmy

Kultury bakterii redukujących siarczany (SRB, gatunek *Desulfovibrio*) wyizolowane z mineralnej wody pitnej (źródło Gajdovka, okolice północnych Kosic, Słowacja) zostały użyte w eksperymentach. SRB (Wykres 1) wybrano z kultur mieszanych wyhodowanych w rurkach agarowych, które zawierały

diation of metals in waters and leachates (Skousen et al. 1998). In an iron rich environment the SRB form an iron sulphide that is known to be a compound of variable composition that behaves rather like a phase than as a stoichiometric compound –  $Fe_{1-x}S$ . Biogenic sulphides can include mackinawite, pyrite, marcasite, greigite and pyrrhotite, with the product being dependant on solution chemistry (Benning et al., 2000). Under certain bacterial growth  $Fe_{1-x}S$  conditions SRB can be produced as magnetic biogenic iron sulphides. The magnetic  $Fe_{1-x}S$  forms extracellular coating on the bacteria, which is a good adsorbent due to its exceptionally large surface area to volume ratio. The adsorption capacity of bacterially produced  $Fe_xS_y$  has been extensively researched as an alternative for heavy metal recovery from aquatic environs (Watson and Ellwood, 1994). The structure of the  $Fe_{1-x}S$  system is complex and on the S-rich side a wide range of compositions of the form  $Fe_{1-x}S$  can exist and the cationic defects can provide active adsorption sites. These structural factors in  $Fe_{1-x}S$  are clearly reflected in the magnetic properties of iron sulphides that are quite variable depending on the exact nature of the Fe/S ratio (Power and Fine, 1976). The magnetic susceptibility of bacterially produced iron sulphide depends on the influence of iron valence (Marius et al., 2005). The redox potential, which controls the oxidation state of Fe, is critical for the production of the  $Fe_{1-x}S$ . The pH which controls the concentration of sulphide ions in solution ( $S^{2-}$ ) and other anions and cations can also affect magnetic properties of the material produced by the microorganisms and a small change in the composition can have a very large effect on magnetic susceptibility of the  $Fe_{1-x}S$  material (Watson et al., 1999). The iron valence does influence the magnetic susceptibility of the produced  $Fe_{1-x}S$ . The increase of ferrous content of a ferrous – ferric sulphate rich medium increases the magnetic susceptibility of the produced iron sulphide (Marius et al., 2005).

In this article we present our initial study results of magnetic properties and compositions of biogenic iron sulphides synthesized in cultures of sulphate-reducing bacteria prepared under various laboratory conditions and modified growth media.

## Materials and methods

### Microorganisms

The cultures of SRB (genera *Desulfovibrio*) that were isolated from the potable mineral water (Gajdovka spring, the Kosice-north locality, Slovakia) were used for the experiments. The SRB (Figure 1) were selected from mixed cultures grown in agar tubes that contained modified Postgate's

zmodyfikowane czynniki C Postgate'a (Postgate, 1984; Luptakova i inni, 2002). Izolację bakterii przeprowadzono dzięki zmienionej metodzie rozcieńczenia (Odom i Singleton, 1993; Ronald, 1995). Obecność SRB monitorowano przez obserwację mikroskopową (1 gram preparatu został zabarwiony, następnie zanurzony w oleju i ostatecznie powiększony 1200 razy) przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 400.

#### **Modyfikacja czynnika wzrostu w celu przygotowania siarczków biogenicznych**

Biogeniczne siarczki żelaza zostały przygotowane dzięki bakteriom redukującym siarczany w czynniku kultywacyjnym – Postgate C. W celu przygotowania różnych biogenicznych próbek siarczku czynniki te zostały zmodyfikowane (patrz Tabela 1). Zmiana ta dotyczyła dodatku jonów Fe w formie  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  lub  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , a dodatek mleczanu sodu zwiększa dawkę. Stężenie jonów  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i mleczanu zostało określone na podstawie wyników z poprzednich eksperymentów (Jencarova, 2011). Produkcję przygotowano w bioreaktorze na dwa sposoby w warunkach beztlenowych w  $30^\circ\text{C}$ . Pierwszy tryb był statyczny – „partia” była kultywowana przez okres 4 tygodni bez dodatku świeżego składnika pokarmowego (próbki A i B). W przypadku drugiego trybu, czynniki były wprowadzane do reaktora co 7 dni w sposób półciągły (próbki C i D). Po kultywacji osady zostały prze-filtrowane przez filtr membranowy o średnicy porów  $0,85 \mu\text{m}$ , następnie wysuszone i przechowywane w warunkach beztlenowych. Wysuszone próbki użyto w dalszych analizach i eksperymentach.

Przeprowadzono kontrolę abiotyczną w tych samych warunkach, lecz bez udziału bakterii redukujących siarczany (SRB, próbki E i F). Faza stała z kontroli abiotycznej została przefiltrowana przez filtr membranowy

medium C (Postgate, 1984; Luptakova et al., 2002). The bacteria isolation was performed by the modified dilution method (Odom and Singleton, 1993; Ronald, 1995). The presence of SRB was monitored by microscopic observation (a gram of the microscopical preparations was stained, then immersed in oil, then magnified 1200X) using the light microscope Nikon Eclipse 400.

#### **Modification of growth media for biogenic sulphides preparation**

Biogenic iron sulphides were prepared by SRB in cultivation medium – Postgate C. In order to prepare different biogenic sulphide samples the medium was modified (see Table 1). The modification consist of an addition of Fe ions in form of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  and addition of sodium lactate double dose. The concentration of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and lactate was determined according to previous experiments (Jenčárová, 2011). The production was performed in a bioreactor in two modes under anaerobic conditions at  $30^\circ\text{C}$ . The first mode was static – the “batch” was cultivated for 4 weeks without addition of fresh nutrient medium (samples A and B). During the second mode – “semi-continuous” the medium was supplied to the reactor every 7 days (samples C and D). After cultivation precipitates were filtered through  $0.85 \mu\text{m}$  membrane filter, dried and stored in anaerobic conditions. Dry samples were used for further analyses and experiments.

Abiotic control was performed in the same conditions but without SRB (samples E and F). Solid phase from abiotic control was filtered through  $0.85 \mu\text{m}$  membrane filter, dried and stored in an-

Tabela 1  
Badania próbek

Table 1  
Samples studies

Próba Name	Bakteria Bacteria	Czynnik modyfikacji Medium modification	Sposób kultywacji Cultivation mode
Próbka A Sample A	SRB	dodatek $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ addition	Partia Batch
Próbka B Sample B	SRB	dodatek $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ addition	Partia Batch
Próbka C Sample C	SRB	dodatek $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ addition	Półciągły Semi-continuous
Próbka D Sample D	SRB	dodatek $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ addition	Półciągły Semi-continuous
Próbka E Sample E	bez SRB without SRB	dodatek $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ addition	Partia Batch
Próbka F Sample F	bez SRB without SRB	dodatek $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ addition	Partia Batch

o średnicy porów 0,85  $\mu\text{m}$ , osuszona oraz przechowywana w warunkach beztlenowych (Jencarova i Luptakova, 2011).

### Mikroskopia elektronowa, analiza promieni X i pomiary magnetyczne

Obserwacja SEM i analizy przeprowadzono dzięki mikroskopowi Quanta 650 FEG wyposażonego w detektory EDX, WDA, EBSD i CL.

Aby oszacować skład mineralny próbki użyto metody rentgenografii proszkowej na urządzeniu Bruker-AXS D8 Advance i dołączonego do niego programu Bruker (Warunki pomiarowe: goniometr  $2\theta/\theta$ , promieniowanie  $\text{CoK}\alpha/\text{Fe}$ , detektor czułości LynxEye). Do analizy półilościowej fazy użyto oprogramowania Topas 4.2. Zawartość substancji amorficznych nie została określona ze względu na małe ilości próbek. Wyniki są zatem związane z ilością przedstawionych krystalicznych części stałych.

Pomiary właściwości magnetycznych przygotowanych próbek (w formie wysuszonego proszku) zostały przeprowadzone przy użyciu sprzętu Vibrating Sample Magnetometer (VSM) EV9 Microsense. Próbkę poddano pomiarom w szklanych rurkach o pojemności  $7,351 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^3$ . Całość eksperymentu odbyła się w stałej temperaturze laboratoryjnej równej  $25^\circ\text{C}$ .

### Wyniki i dyskusja

#### Wytwarzanie produktów biomineralizacji

W próbkach (A, B, C, D) zaobserwowano powstawanie czarnego osadu, wyczuwalny był silny zapach  $\text{H}_2\text{S}$ , a po 7–10 dniach od rozpoczęcia procesu zanotowano obecność komórek SRB (Rys 1). Takich obserwacji nie odkryto w przypadku kontroli abiotycznej (próbki E i F) aż do końca trwania całego eksperymentu.

aerobic conditions, too (Jenčárová and Luptáková, 2011).

### Electron microscopy, X-ray analyses and magnetic measurements

SEM observations and analyses were done using the microscope Quanta 650 FEG equipped with EDX, WDA, EBSD and CL detectors.

To evaluate sample mineral composition we used X-ray powder diffraction measurement on Bruker-AXS D8 Advance device and related Bruker software (Conditions for measurements:  $2\theta/\theta$  goniometer, radiation  $\text{CoK}\alpha/\text{Fe}$ , position sensitive detector LynxEye). The Topas, version 4.2 software was used for the semi-quantitative phase analysis. The content of amorphous substances was not determined, due to small amounts of samples. The results are therefore related to the amounts of presented crystalline solids.

Measurements of magnetic properties of prepared samples (in the form of dry powder) were performed using the Vibrating Sample Magnetometer (VSM) EV9 Microsense. Samples were measured in glass tubes with volumes  $7.351 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^3$ . The measurements were done in constant laboratory temperature of  $25^\circ\text{C}$ .

### Results and discussion

#### Production of biomineralization products

In samples (A, B, C, D) we observed creation of black precipitate, detected classical strong  $\text{H}_2\text{S}$  smell, and observed SRB cells presence (Figure 1) after 7–10 days from the beginning of the process. These manifestations were not detected with the abiotic control (samples E and F) until the end of the experiment.



Rys. 1  
Mikrofotografia bakterii redukujących siarczyn SBR (gatunek *Desulfovibrio*) wyizolowane ze źródła „Gajdovka” (powiększenie – 1200X, mikroskop optyczny)

Fig. 1  
The microphotograph of SRB (genera *Desulfovibrio*) isolated from the spring “Gajdovka” (magnification – 1200X, light microscope)

### **Obserwacja mikroskopowa produktów biomineralizacji**

Obserwacja SEM pozwoliła odkryć cząsteczki o wymiarach od kilkudziesięciu mikrometrów do bardzo małych rzędu kilkuset nanometrów – patrz Wykres 2a i 2b. Dzięki analizie promieni X bardzo prawdopodobny jest fakt, że największe cząsteczki są cząsteczkami siarki, a małe są zespołami minerałów siarczku żelaza (komputerowe oszacowanie rozmiarów krystalitu).

### **Rentgenografia proszkowa**

Wyniki analizy promieni X pokazują jakie rodzaje minerałów powstały dzięki metodzie biogenicznej indukowanej przez bakterie (patrz Wykres 3a, b i c). Dwa główne związki, greigit  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  i makinawit  $\text{FeS}$  (Roberts i inni, 2011; Dekkers i inni, 2000), odnaleziono w próbkach biogenicznych (A, B, C, D). Niebiogeniczne próbki (E, F) nie zawierały tych minerałów, ale w ich składzie odnaleziono paramagnetyczny wiwianit  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$  (patrz Wykres 3a). Warunkiem produkcji  $\text{Fe}_{1-x}\text{S}$  jest zatem obecność bakterii. Najwyższy zaobserwowany stosunek  $(\text{Fe}_{1-x}\text{S})/\text{S}$  zaobserwowano w przypadku próbki C (Wykres 3b i 3c), najniższy stosunek w przypadku próbki D (Wykres 3c).

Linie dyfrakcyjne siarczków żelaza wykazują znaczące rozszerzanie się w porównaniu do linii reprezentujących siarkę czy wiwianit. Szerokość linii dyfrakcyjnych jest głównie warunkowana przez rozmiar niezaburzonych cząsteczek o perfekcyjnie krystalicznej strukturze. To dowodzi, że siarczki żelaza powstałe jako produkty biomineralizacji w próbkach posiadają bardzo

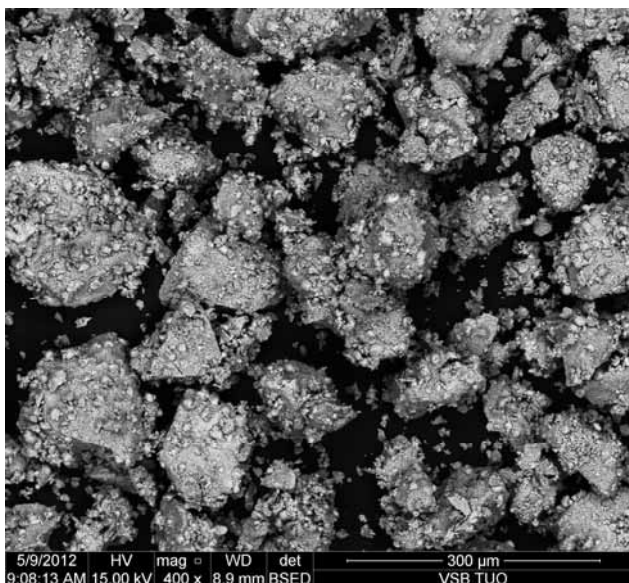
### **Microscopy observations of biomineralization products**

SEM observation revealed particle sizes in the range of ten micrometers to very small particles (estimated size hundreds of nanometers) – see Figures 2a and 2b. Very probably, the biggest particles are particles of sulfur and the small particles are aggregates of biogenic Fe sulphide minerals, as noted by the subsequent X-ray analysis (software estimation of crystallite sizes).

### **X-ray powder diffraction**

Results of X-ray analysis show which kinds of minerals were created by biogenic method induced by bacteria (see Figures 3a, b, and c). Two main compounds, greigite  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  and mackinawite  $\text{FeS}$  (Roberts et al., 2011; Dekkers et al., 2000), were found in biogenic samples (A, B, C, D). Non-biogenic samples (E, F) do not contain these minerals, but contain paramagnetic vivianite  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$  (see Figure 3a). So, manufacturing of  $\text{Fe}_{1-x}\text{S}$  minerals is conditional on bacteria presence. The highest total ratio of  $(\text{Fe}_{1-x}\text{S})/\text{S}$  was observed in the case of sample C (Figure 3b and 3c), the lowest ratio in the case of sample D (Figure 3c).

Diffraction lines of Fe sulphides show significant widening in comparison with the lines of sulfur or vivianite. The width of diffraction lines is mainly determined by the size of undisturbed particles with perfect crystal structure (size coherently diffracted domain, crystallites). It follows that iron sulphides, originated as biomineralization products in samples,



Rys. 2  
Produkty biomineralizacji

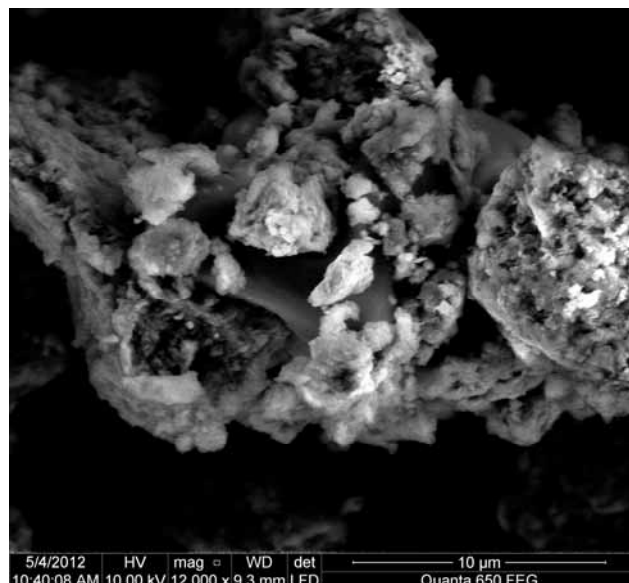
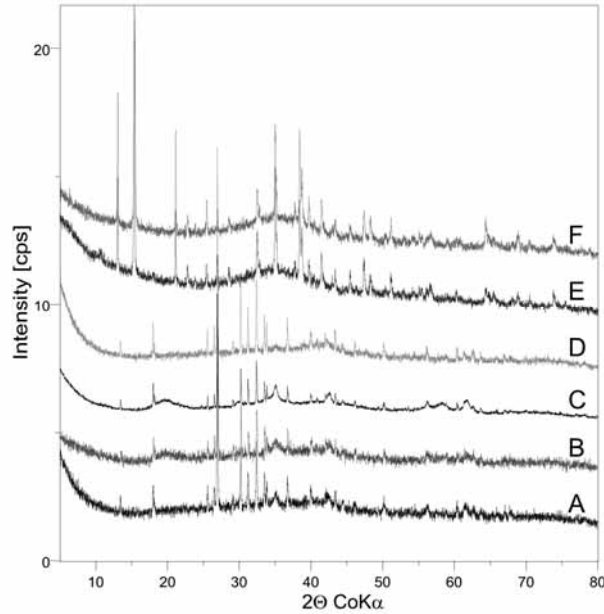


Fig. 2  
Biomineralization products

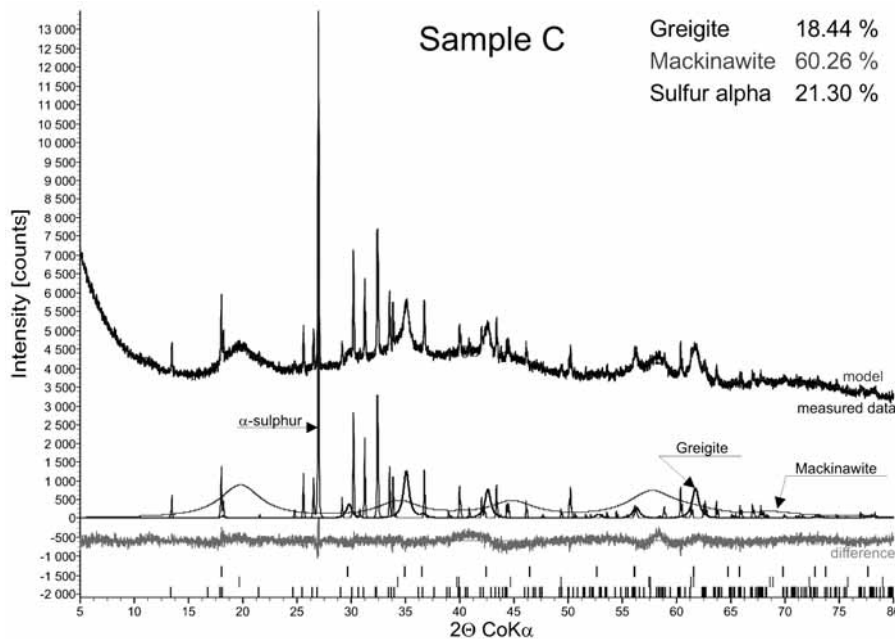
niską krystaliczność. Rozmiary krystalitów uzyskane przez analizę programem Topaz mieszczą się w zakresie 2–5 nm w przypadku makinawitu, oraz od 11 do 45 nm dla greigitu. Prawdopodobne jest, że greigit jest produktem rekrytalizacji makinawitu (Bourdoiseau i inni, 2010; Lennie i inni, 1997).

have very low crystallinity. Crystallite size estimates, obtained by the Topaz program analysis, are only in the range of 2-5 nm for mackinawite, and in the range of 11 to 45 nm for greigite. It is likely that greigite is the product of mackinawite re-crystallization (Bourdoiseau et al., 2010; Lennie et al., 1997).



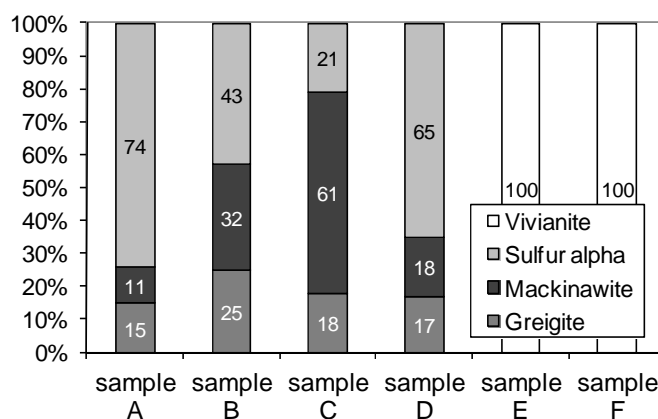
Rys. 3a  
Porównanie linii dyfrakcji w próbkach

Fig. 3a  
Comparison of diffraction patterns of samples



Rys 3b  
Interpretacja i rozkład linii dyfrakcyjnych w próbce C dla poszczególnych składników. Widać wyraźnie, że linie siarki, greigitu i makinawitu są liczne i zmienne

Fig. 3b  
Diffraction pattern of sample C with interpretation and decomposition into individual components. It is clearly visible that lines width for sulfur, greigite and mackinawite are much and variably widened



Rys. 3c  
Wyniki półilościowej analizy dyfrakcji proszkowej obrazujące skład masy mineralnej suchych próbek związane jako suma składników nie-amorficznych

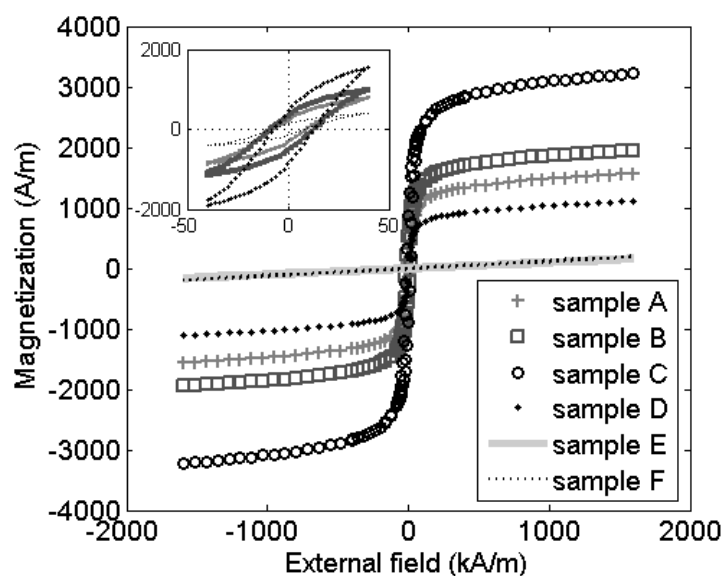
Fig. 3c  
Results of semi-quantitative powder diffraction analysis displayed as mineral mass composition of dry samples, related to the sum of non-amorphous compounds

### Pomiary magnetyczne

Wyniki uzyskane w analizie rentgenowskiej korelują z pomiarami magnetycznymi (patrz Wykres 4). Próbka C posiada najwyższy sygnał magnetyczny. Magnetyzacja nasycenia zależy (rzędowo) od stosunku  $(Fe_{1-x}S)/S$  (próbki A i D powinny być w odwrotnej kolejności, co mogło być indukowane przez większą ilość ferromagnetycznego greigitu w próbce D niż w próbce A). Podwykres pokazuje poziom namagnesowania szczytkowego – oszacowane wielkości są rzędu kilkusetnych A/m. Te histerezy potwierdzają obecność materiału ferromagnetycznego.

### Magnetic measurements

Results of X-ray analyses correlate with magnetic measurements (see Figure 4). The sample C has the highest magnetic signal. Saturation magnetization correlates (in row) to ratio  $(Fe_{1-x}S)/S$  (samples A and D should be in reverse order, which may have been induced by higher amount of ferrimagnetic greigite in sample D rather than A). The sub-plot displays the remanent magnetization level – estimated values are hundreds of A/m. These hystereses confirm the presence of ferrimagnetic material.



Rys. 4  
Namagnesowanie  $M$  w zależności od zewnętrznej siły pola magnetycznego  $H$  (natężenie pola magnetycznego) w badanych próbkach (symbole oznaczają punkty pomiarowe)

Fig. 4  
The magnetization  $M$  versus external magnetic field strength  $H$  (magnetic field intensity) of studied samples (symbols denote measurement points)

## Podsumowanie

Początkowe rezultaty badań właściwości magnetycznych i składu mineralnego biogenicznych siarczków żelaza przeprowadzonych w środowisku kultur bakterii redukujących siarczany wyizolowanych z pitnej wody mineralnej w warunkach laboratoryjnych potwierdzają, że bakterie te są zdolne do produkcji siarczków żelaza o właściwościach magnetycznych. Rentgenografia proszkowa ujawniła znaczącą reprezentację minerałów w postaci greigitu i mackinawitu. Niebiogeniczne próbki zawierały jedynie paramagnetyczny wiwianit. Próbki z kontroli abiotycznej nie wykazują magnetycznych właściwości, którym towarzyszyłyby histerezy na krzywej magnetyzacji. Najsilniejszy sygnał magnetyczny wykazała próbka o największej zawartości siarczków żelaza równej 79% (próbka C) przygotowana w postaci dodatku  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  do zasadniczego czynnika przy użyciu półciągłego trybu kultury. Największa ilość greigitu (25%) została zaobserwowana w próbce B przygotowanej jako dodatek  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  do zasadniczego czynnika korzystającego z trybu kultury o specjalnym reżimie.

Celem przyszłych eksperymentów będzie skupienie się na separacji silnych i słabych cząsteczek magnetycznych. Kolejna kultywacja SRB w obecności silnych cząsteczek magnetycznych może dostarczyć produktów biomineralizacji z odpowiednimi właściwościami magnetycznymi do zastosowania ich w obszarze sorpcji metali ze środowisk wodnych.

## Podziękowania

Praca ta została wsparta przez Słowacką Agencję Badań i Rozwoju w umowie Nr SRDA-0252; Agencja Grantów Naukowych No. 2/0166/11 oraz Program Badań i Rozwoju; Centrum Doskonalenia dla Zintegrowanych Badań Geosfery Ziemskiej (ITMS: 26220120064), który jest współfinansowany przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego. Autorzy czescy dziękują Wydziałowi Górnictwa i Geologii Uniwersytetu Technicznego-VSB w Ostrawie za jego wsparcie podczas prac nad projektem Students Grant Competition Nr SP2012/107, oraz nad projektem „Wdrażanie czystych technologii w górnictwie i wykorzystanie materiałów surowych w celach energetycznych”, reg. Nr CZ.1.05/2.1.00/03.0082 wspierane przez Program Badań i Rozwoju dla Innowacji finansowany przez Fundusz Strukturalny Unii Europejskiej oraz przez budżet państwowy Republiki Czeskiej.

## Conclusion

Initial results of study of magnetic properties and mineral composition of biogenic iron sulphides prepared by bacterial cultures of sulphate-reducing bacteria, isolated from the potable mineral water under laboratory conditions, confirm that these bacteria are able to produce iron sulphides with magnetic properties. Powder X-ray analysis revealed significant representation of ferrimagnetic mineral greigite and mackinawite. Non-biogenic samples have contained only paramagnetic vivianite. Samples of abiotic controls do not show magnetic properties accompanied by hysteresis on magnetization curve. The strongest magnetic signal has been displayed by the sample with the largest amount of iron sulphides, 79% (sample C), prepared as the  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  addition to the basic medium using semi-continuous cultivation mode. The largest amount of greigite (25%) was observed in the sample B prepared as the  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  addition to the basic medium using the batch regime of cultivation mode.

The future experiments will be focused on the separation of strong and light magnetic particles. Subsequent cultivation of SRB with the strong magnetic particles presence would provide biomineralization products with suitable magnetic properties for applications in the field of metals sorption from aquatic environments.

## Acknowledgements

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. SRDA-0252-10; the Scientific Grant Agency No. 2/0166/11 and by the Operational Program Research and Development through the project: Centre of Excellence for Integrated Research of the Earth's Geosphere (ITMS: 26220120064), which is co-financed through the European Regional Development Fund. Czech authors thank the Faculty of Mining and Geology of the VŠB-Technical University of Ostrava for their support through the project of Students Grant Competition no. SP2012/107, and the project “Instituting clean technologies for mining and utilization of raw materials for energy use”, reg. no. CZ.1.05/2.1.00/03.0082 supported by the Research and Development for Innovations Operational Program financed by the Structural Funds of Europe Union, and by the state budget of the Czech Republic.



## Literatura – References

1. Benning L.G. et al.: Reaction pathways in the Fe-S system below 100°C. In: *Chemical Geology*, 167 (1), 2000, 25-51.
2. Bourdoiseau J.A, Jeannin M., Rémazeilles C., Sabot R., Refait P.: The transformation of mackinawite into greigite studied by Raman spectroscopy. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 42, 2011, 496-504.
3. Dekkers M.J., Passier H.F., Schoonen M.A.A.: Magnetic properties of hydrothermally synthesized greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) - II. High- and low-temperature characteristics. In: *Geophys. J. Int.* 141, 2000, 809-819.
4. Jenčárová J., Luptáková, A.: The effect of preparation of biogenic sorbent on zinc sorption. In: *Acta Montanistica Slovaca*, 2011, vol. 16, no. 2, p. 154-158. ISSN 1335-1788.
5. Jenčárová J.: *Príprava a aplikácia sorbentov ťažkých kovov pre čistenie priemyselných odpadových vôd*, PhD thesis, Institute of Geotechnic, Slovak Academy of Sciences, 2011.
6. Lennie A.R., Redfern S.A.T, Champness P.E., Stoddart C.P., Schofield P.F., Vaughan D.J.: Transformation of mackinawite to greigite: An in situ X-ray powder diffraction and transmission electron microscope study. In: *American Mineralogist* 82, 1997, 302-309.
7. Luptakova A., Kusnierova M., Fecko, P.: *Mineral biotechnology II. – Sulfuretum in nature and industry*. VSB -TU Ostrava, Ostrava, Czech Republic, 2002, ISBN 80-248-0114-0. (in Slovak).
8. Marius M.S., James P.A.B., Bahaj, A.S., Smallman D.J.: Influence of iron valency on the magnetic susceptibility of a microbially produced iron sulphide. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Volume 17, 2005, Issue 1, pp. 65-69.
9. Odom J.M., Rivers Singleton J.R.: *The Sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. New York: Springer-Verlag, New York, 1993, p. 249. ISBN 387978658.
10. Pósfai M., Dunin-Borkowski R.F.: Sulfides in biosystems. In: *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, 61, 2006, pp. 679-714.
11. Postgate J.R.: *The Sulphate Reducing Bacteria*, 2nd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1984, UK.
12. Power L.F., Fine H.A.: The iron-sulfur system. Part 1. The structures and physical properties of the compounds of the low-temperature phase fields. In: *Minerals Science and Engineering*, 8 (2), 1976, pp. 106-128.
13. Roberts A.P., Ghang L., Rován C.J., Horng C.S., Florindo F.: Magnetic properties of sedimentary greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>): an update. *Reviews of Geophysics* 49, RG1002, 2011, 1-49.
14. Ronald M.A.: *Principles of Microbiology, Year Book*, Mosby, New York, 1995.
15. Skousen J., Rose A., Geidel G., Foreman J., Evans R., Hellier W.: *A Handbook of Technologies for Avoidance and Reclamation of Acid Mine Drainage*, West Virginia University, Morgantown, Wv: NMLRC, 1998.
16. Watson J.H.P., Cressey B.A., Roberts A.P., Ellwood D.C., Charnock J.M., Soper A.K.: Structural and magnetic studies on heavy-metal-adsorbing iron sulphide nanoparticles produced by sulphate-reducing bacteria. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 214 (1), 2000, pp. 13-30.
17. Watson J.H.P., Ellwood D.C.: Biomagnetic separation and extraction process for heavy metals from solution. In: *Minerals Engineering*, 7 (8), 1994, pp. 1017-1028.