



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

251622

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 Q 1/02

(22) Přihlášeno 16 04 84
(21) PV 2851-84

(40) Zveřejněno 18 12 86

(45) Vydáno 15 04 88

(75)
Autor vynálezu

MANDL MARTIN ing., DOČEKALOVÁ HANA RNDr., BRNO

(54) Způsob specifického stanovení železnatých nebo/a železitých iontů

Je popsán způsob specifického a citlivého stanovení železnatých nebo/a železitých iontů, využívající u železitých bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans* a *Leptospirillum ferrooxidans* Michaelisovské závislosti rychlosti spotřeby kyslíku na koncentraci železnatých iontů. Použitím metody standardního přídavku železnatých iontů se stanovení stává vysoce specifickým a umožňuje stanovit řádově 10^{-6} mol Fe^{2+} v 1 litru. Železité ionty se stanoví analogicky po jejich redukci na ionty železnaté.

Vynález se týká způsobu specifického stanovení železnatých nebo/a železitých iontů, umožňujícího stanovit řádově 10^{-6} molů železa v 1 litru roztoku ze závislosti rychlosti biologické spotřeby kyslíku na koncentraci železnatých iontů za použití železitých bakterií, jako bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans* nebo *Leptospirillum ferrooxidans*.

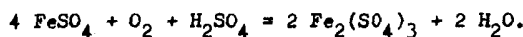
Ke stanovení celkového množství železa bez rozlišení jeho formy v roztoku, popřípadě železnatých a železitých iontů vedle sebe, je z odborné literatury známo a v praxi využíváno více principiálně odlišných postupů.

Odměrná nebo vážková analýza není příliš citlivá a je zatížena interferencemi. Velmi citlivé jsou některé instrumentální metody, jejichž specifická však může být snížena interferujícími příměsí ve vzorku. Často je možné tyto interference vyloučit více či méně složitými postupy, není-li ale předem známé kvalitativní složení příměsí ve vzorku, může být úspěšnost eliminace dosti složitá až nemožná.

Je známo velmi citlivé a specifické mikrobiologické stanovení železa, které však nerozliší jeho oxidační stupeň, stanovení trvá několik dnů a může být znemožněno nejrazněji toxickými látkami (Koch, O. G. - Koch-Dedic, G. A.: Handbuch der Spurenanalyse, Teil 2, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1974, s. 1501).

K odstranění shora zmíněných nedostatků směřuje způsob specifického stanovení železnatých nebo/a železitých iontů po jejich redukci na ionty železnaté ze závislosti rychlosti biologické spotřeby kyslíku na koncentraci železnatých iontů za použití železitých bakterií, jako bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans* nebo *Leptospirillum ferrooxidans*, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se koncentrace železnatých iontů stanoví metodou standardního přidavku železnatých iontů do média s bakteriemi a analyzovaným vzorkem. Stanovení se provádí bez ohledu na přítomnost příměsí v analyzovaném vzorku, stanovení je rychlé a svou citlivostí se vyrovná některým instrumentálním metodám.

Vynález je založen na známé skutečnosti, že železité bakterie oxidují dvojmocné železo podle reakce



V dalším textu popisované stanovení železnatých iontů platí tedy ve shora uvedeném smyslu rovněž pro ionty železité po jejich redukci na ionty železnaté.

Fe^{2+} - metabolismus je u všech tří shora jmenovitě uvedených železitých bakterií shodný, takže příprava kultury i analytické provedení jsou stejné.

Závislost rychlosti spotřeby kyslíku na koncentraci železnatých iontů se u železitých bakterií řídí kinetikou Michaelise a Mentenové. Metoda standardního přidavku železnatých iontů se použije pro odstranění rušivých vlivů složkami analyzovaného vzorku.

Pro medium obsahující bakterie a vzorek s neznámou koncentrací železnatých iontů a pro stejné medium se standardním přidavkem železnatých iontů platí rovnice:

$$\frac{1}{V_1} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{c_x}$$

$$\frac{1}{V_2} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{c_x + c_s}$$

kde

c_x = koncentrace železnatých iontů v mediu, obsahujícím bakterie a analyzovaný roztok,

c_s = přidaná známá koncentrace železnatých iontů v mediu s bakteriemi a analyzovaným roztokem; celková koncentrace železnatých iontů v mediu je pak $c_x + c_s$,

K_m = Michaelisova konstanta pro železnaté ionty

V_1 = rychlost spotřeby kyslíku v mediu s koncentrací železnatých iontů = c_x ,

V_2 = rychlost spotřeby kyslíku v mediu s koncentrací železnatých iontů = $c_x + c_s$

V_m = maximální rychlost spotřeby kyslíku v mediu s bakteriemi a analyzovaným roztokem (koncentrace $Fe^{2+} \gg K_m$).

Maximální rychlost spotřeby kyslíku V_m se zjistí experimentálně jako rychlost spotřeby kyslíku při nasycení bakterií železnatými ionty v mediu s bakteriemi a analyzovaným roztokem. Pro dvě rovnice o dvou neznámých pak platí:

$$c_x = \frac{c_s \cdot V_1 (V_m - V_2)}{V_m (V_2 - V_1)}$$

Inhibici rychlosti respirace způsobují některé látky, viz Torma, E. A.: The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes, v: Advances in biochemical engineering, 6, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1977, s. 2 - 37.

Tyto interference stanovení železnatých iontů se odstraní, jak již bylo uvedeno, metodou standardního přídavku železnatých iontů. Pouze v přítomnosti kyanidu nebo azidu dojde k hlubší inhibici respirace a stanovitelnost železnatých iontů je pak závislá na poměru koncentrací železnatých, kyanidových resp. azidových iontů.

Podmínkou stanovení železnatých iontů je tedy měřitelná rychlost spotřeby kyslíku. Při bakteriální oxidaci železnatých iontů nevznikají žádné metabolity schopné konkurenční oxidace. Baktérie kultivované na železnatých iontech nemohou bez předchozí adaptace oxidovat jiné organické či anorganické látky. Stanovení železnatých iontů je tak vysoce specifické, což je významnou předností vynálezu.

Kromě vysoké specifčnosti umožňuje způsob stanovení podle vynálezu stanovit koncentrace železnatých iontů řádově 10^{-6} mol/l, přičemž citlivost metody se může měnit hustotou buněk při stanovení Fe^{2+} . Řádově 10^{-6} mol/l Fe^{2+} lze stanovit za předpokladu ještě dobře měřitelné rychlosti spotřeby kyslíku $0,31 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, reálné Michaelisovské konstantě pro Fe^{2+} 1 mmol/l a maximální rychlosti spotřeby kyslíku $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a více.

P ř í k l a d 1

Bakteriální kultura *Thiobacillus ferrooxidans* se pro použití ke stanovení podle vynálezu připraví známým způsobem (Silverman, M. P. - Lundgren, D. C., J. Bacteriol., 77, 1959, s. 642 - 647). Na membránovém filtru o velikosti pórů $0,4 \mu\text{m}$ se bakterie promyjí kyselinou sírovou o hodnotě pH 2, nekonzentrují a suspendují v kyselině sírové o pH 2 na hustotu bakterií $10^8/\text{ml}$. Na hodnotu pH 2 se upraví kyselinou sírovou také analyzovaný roztok a roztok standardního přídavku Fe^{2+} .

Vzorek důlní vody, přefiltrovaný přes membránový filtr $0,4 \mu\text{m}$, se naředí kyselinou sírovou o pH 2 a přidá se do média s bakteriemi v takovém poměru, aby rychlost spotřeby

kyslíku změřená kyslíkovou elektrodou v tomto médiu byla malá v dobře měřitelném rozmezí 0,31 až 2 $\mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ - naměřeno 1,2 $\mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Do média s bakteriemi a analyzovaným roztokem se přidá definované množství železnatých iontů ve formě standardizovaného roztoku síranu železnatého, odpovídající přidané známé koncentraci železnatých iontů v médiu - $c_s = 0,8 \text{ mmol/l}$ - přidáno 0,1 ml 0,24 molárního síranu železnatého na 30 ml média.

Opět se změří rychlost spotřeby kyslíku - naměřeno 49 $\mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Potom se do média s bakteriemi a analyzovaným roztokem přidá síran železnatý o výsledné celkové přidané koncentraci železnatých iontů - v daném případě 0,16 mol/l a změří se maximální rychlost spotřeby kyslíku - naměřeno 110 $\mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Z výsledků měření se vypočítá koncentrace železnatých iontů ve zředěném analyzovaném roztoku - vypočteno 0,011 mmol/l. Po přepočtu na ředění činí koncentrace železnatých iontů 1,1 mmol/l. V průběhu všech tří měření rychlostí spotřeby kyslíku je v médiu stejné množství bakterií a analyzovaného roztoku.

Pro stanovení železitých iontů se v okyseleném analyzovaném vzorku redukuje trojmocné železo na dvojmocné známým způsobem v Jonesově reduktoru průchodem vzorku přes sloupec granulovaného zinku (Tomíček, O.: Kvantitativní analýsa, SZN Praha, 1958). Po redukcii se stanoví koncentrace železnatých iontů analogicky - stanoveno 0,282 mol/l. Koncentrace železitých iontů ve vzorku se zjistí rozdílem z výsledku obou stanovení - v daném případě 0,28 mol/l.

Filtrace analyzovaného vzorku není nutná, nevyskytují-li se ve vzorku aktivní železité bakterie (pH větší než 4). Médium s analyzovaným roztokem a bakteriemi se upraví ředěním tak, aby rychlost spotřeby kyslíku v médiu bez přítomnosti železnatých iontů byla malá, ale dobře měřitelná (0,31 až 2 $\mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Množství prvního standardního přídatku Fe^{2+} se volí tak, aby odpovídalo oblasti s poloviční maximální rychlostí spotřeby kyslíku v médiu po tomto přídatku. V této oblasti je možné přidat i více standardních přídatků Fe^{2+} pro posouzení přesnosti stanovení. Pro měření maximální rychlosti spotřeby kyslíku se přidá Fe^{2+} na výslednou celkově přidanou koncentraci Fe^{2+} v rozmezí 0,09 až 0,16 mol/l. Je-li změřená rychlost spotřeby kyslíku skutečně maximální, pak další malý přírůstek Fe^{2+} už její hodnotu nezvýší.

Příklad 2

Příprava kultury i vzorku je shodná s postupy v příkladě 1, stanovení je však provedeno s další Fe^{2+} oxidující bakterií *Ferrobacillus ferrooxidans*. Pro srovnání všech stanovení byl v příkladě 2 použit stejný analyzovaný vzorek jako v příkladě 1. Naměřené hodnoty pro výpočet koncentrace Fe^{2+} podle vzorce jsou:

$$V_1 = 1,5 \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}; \quad V_2 = 52 \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1};$$

$$V_m = 115 \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}; \quad c_s = 0,8 \text{ mmol/l}.$$

V měřeném roztoku byla koncentrace Fe^{2+} 0,013 mmol/l, po přepočtu na ředění 1,3 mmol/l. Po redukcii byla koncentrace Fe^{2+} 0,284 mol/l, koncentrace Fe^{3+} ve vzorku byla 0,283 mol/l.

Příklad 3

Příprava kultury i vzorku je shodná s postupy uvedenými v příkladě 1. Vzorek je opět tentýž, stanovení je však provedeno s kulturou *Leptospirillum ferrooxidans*. Naměřené hodnoty pro výpočet koncentrace Fe^{2+} :

$$V_1 = 1,7 \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}; \quad V_2 = 46 \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1};$$

$$V_m = 113 \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}; \quad c_s = 0,8 \text{ mmol/l.}$$

Koncentrace Fe^{2+} v měřeném roztoku byla 0,018 mmol/l, po přepočtu na ředění 1,8 mmol/l. Po redukci byla koncentrace Fe^{2+} 0,281 mol/l, koncentrace Fe^{3+} ve vzorku byla 0,279 mol/l.

Všechny vzorky byly zpracovány v šesti paralelních stanoveních. Rozdíly ve výsledcích stanovení Fe^{2+} a Fe^{3+} ve všech třech příkladech provedení byly statisticky nevýznamné. Vynálezu může být využito při stanovení nízkých koncentrací železa v dvojmočné formě vedle sebe, přičemž stanovení naruší množství organických a anorganických příměsí. Vždy, když se získá měřitelná rychlost spotřeby kyslíku, znamená to vysokou specifickou stanovení.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob specifického stanovení železnatých nebo/a železitých iontů po jejich redukci na ionty železnaté ze závislosti rychlosti biologické spotřeby kyslíku na koncentraci železnatých iontů za použití železitých bakterií, jako bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans* nebo *Leptospirillum ferrooxidans*, vyznačující se tím, že se koncentrace železnatých iontů stanoví metodou standardního přídatku železnatých iontů do média s bakteriemi a analyzovaným vzorkem.