

ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫЕ *LEPTOSPIRILLUM*-ПОДОБНЫЕ БАКТЕРИИ И ОЦЕНКА ИХ РОЛИ В ОКИСЛЕНИИ ПИРИТА

Н.С. ВАРДАНЯН, В.П. АКОПЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучены два штамма *Leptospirillum*-подобных бактерий, выделенные из отвалов Алавердского и Ахтальского месторождений Армении. Установлено, что оптимальная температура роста для обоих штаммов составляет 37°, верхний температурный предел - 40°. Оптимальные значения pH лежат в диапазоне pH 2,0-2,3. Выделенные штаммы являются строгими автотрофами. При окислении пирита в мезофильных условиях *Leptospirillum*-подобные бактерии проявляют идентичную с *Thiobacillus ferrooxidans* активность, а при 37° примерно в 2,0-2,7 раз превосходят умеренно термофильные бактерии. Применение изученных штаммов лептоспирилл в ассоциации с умеренно термофильными бактериями позволяет в 2,3-3,6 раза интенсифицировать выщелачивание пирита. Изученная ассоциация характеризуется высокой устойчивостью к низким значениям pH и повышенным концентрациям железа.

Ուսումնասիրվել են Հայաստանի Ալավերդու և Ախթալայի սուլֆիդային հանքավայրերից մեկուսացված *Leptospirillum*-ման երկու շտամներ: Շտամների աճման օպտիմալ ջերմաստիճանը կազմում է 37°-ը, վերին ջերմաստիճանային սահմանը 40°-ը: Միջավայրի pH-ի օպտիմալ արժեքները ընկած են pH 2,0-2,3 միջակայքում: Մեկուսացված շտամները խիստ ավտոտրոֆ են: Պիրիտի օքսիդացման պրոցեսում մեզոֆիլ պայմաններում լեպտոսպիրիլները ցուցաբերում են *Thiobacillus ferrooxidans*-ի հետ համեմատելի ակտիվություն, մինչդեռ 37°-ում 2,0-2,7 անգամ գերազանցում են չափավոր թերմոֆիլ բակտերիաներին: Լեպտոսպիրիլների ուսումնասիրված շտամների կիրառումը չափավոր թերմոֆիլ բակտերիաների հետ խառը կուլտուրայի ձևով թույլ է տալիս 2,3-3,6 անգամ ինտենսիվացնել պիրիտի օքսիդացումը: Ուսումնասիրված համակցությունը բնորոշվում է բարձր դիմացկունությամբ pH-ի ցածր արժեքների և երկաթի բարձր կոնցենտրացիաների նկատմամբ:

Two strains of *Leptospirillum*-like bacteria isolated from dumps of Alaverdi and Akhtala sulfide ore deposits in Armenia have been studied. Optimal temperature for growth of two strains is 37°, maximum temperature is 40°. Optimal pH values are found to be in range of pH 2,0-2,3. The strains isolated are strict autotrophs. Under mesophilic conditions the strains show with *Thiobacillus ferrooxidans* identical activity of pyrite leaching, whereas at 37° they exceed the moderate thermophilic bacteria about 2,0-2,7 times. Application of *Leptospirillum* - like bacteria associated with moderate thermophilic bacteria allows to intensify pyrite leaching to 2.3-3.6 times. This association is characterized by high tolerance to low pH and high concentration of iron.

Лептоспириллы - смешанные культуры - выщелачивание пирита

Хемолитотрофные бактерии *Leptospirillum ferrooxidans*, окисляющие двухвалентное железо, впервые выделены и описаны Маркосяном [4]. Позднее подобные виброидные микроорганизмы были обнаружены в урановых рудах, кислых дренажных водах медных руд и в кучах угля [13, 14, 16]. Из кислой гидротермы о-ва Кунашир выделена термофильная бактерия *L.thermoferrooxidans* с оптимальной температурой роста 45-50° [3]. В настоящее время этот род включает два вида: типовой вид *L.ferrooxidans* L15(T) (=DSM 2705 (T)) и вид *L.thermoferrooxidans* L-88(T) [12]. Чистые культуры *L.ferrooxidans* не способны окислять элементарную серу и ее восстановленные соединения, такие как тиосульфат и тетрагидрат [4, 10]. Однако несмотря на отсутствие сероокисляющей активности, *L.ferrooxidans* могут осуществить растворение пирита [12, 15]. Более того, считают, что пирит способствует росту лептоспирилл, и не случайно, что некоторые активные штаммы *Leptospirillum*-подобных бактерий выделены из биореакторов выщелачивания пирита и кобальто-железного пирита [7]. Ряд авторов отмечает, что на определенной стадии непрерывного выщелачивания пирита *L.ferrooxidans* превалирует над ростом *Thiobacillus ferrooxidans*, что объясняется их более высокой устойчивостью к ионам двухвалентного железа и низким значениям pH [7, 11]. Лептоспириллы считаются также перспективными для удаления пирита из угля [14]. По мнению авторов, *L.ferrooxidans* принимает не прямое участие в выщелачивании пирита путем продуцирования трехвалентного железа [8]. В монокультуре своей активностью лептоспириллы уступают *T.ferrooxidans*. Однако в ассоциации с *T. thiooxidans* лептоспириллы выщелачивают пирит так же активно, как *T.ferrooxidans* [2, 11, 14-16]. В отличие от мезофильных штаммов термофильная бактерия *L.thermoferrooxidans* не способна расти на пирите и халькопирите [3].

Нами из природных биотопов сульфидных руд Армении выделены два штамма *Leptospirillum* - подобных бактерий, способных окислять двухвалентное железо в диапазоне температур 30-40°.

Целью наших исследований являлось изучение особенностей роста выделенных штаммов термотолерантных лептоспирилл с оценкой их роли в выщелачивании пирита.

Материал и методика. Объектом исследования служили выделенные нами термотолерантные штаммы *Leptospirillum*-подобных бактерий 64 и 72, штаммы умеренно термофильных бактерий 69 и 86 и *T.ferrooxidans*, шт. 33, 63, 18. Инокуляционным материалом для получения накопительных культур *Leptospirillum* - подобных бактерий служили пробы отвалов руды Алавердского и Ахтальского месторождений Армении. Инкубирование проб проводили при 35°. Чистые культуры бактерий получали высевом на среду Браерли [1], содержащую 0,8% агарозы. Чистоту выделенных штаммов проверяли посевами в среду с 0,02-0,05%-ного дрожжевого экстракта в отсутствие или присутствии 0,1% глюкозы. Для выращивания *Leptospirillum*-подобных бактерий и умеренно термофильных бактерий использовали среду Браерли, для штаммов *T.ferrooxidans* - среду Летена [1]. В качестве источника энергии использовали двухвалентное железо в количестве 3 г/л. Бактериальному выщелачиванию подвергали пирит из Алавердского месторождения, измельченный до частиц размером 0,080 мм. Опыты по выщелачиванию проводили в колбах Эрленмейера в условиях периодического культивирования бактерий в режиме встряхивания (180 об./мин) при 30° или 37° в зависимости

от использованных штаммов. Физиологические особенности бактерий изучали в стационарных условиях. Биомассу бактерий определяли по белку методом Лоури [1]. Количество Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексонометрическим методом с трилоном-Б [6].

Значения кардинальных температур для роста выделенных штаммов *Leptospirillum*-подобных бактерий определяли на среде, содержащей двухвалентное железо в качестве источника энергии. Культивирование бактерий проводили в стационарных условиях при температурах от 25 до 50° с интервалом в 5°. О их росте судили по количеству окисленного Fe^{2+} .

Результаты и обсуждение. Нами установлено, что нижний температурный предел роста выделенных штаммов составляет 30°, а верхний температурный предел - 40°. Рост бактерий и окисление Fe^{2+} отсутствуют при 25°. Примечательно, что при 40° у шт.64 сохраняется высокая окислительная активность, тогда как у шт. 72 она резко падает. Рост выделенных штаммов прекращается при 45°. Оптимальная температура роста для обоих штаммов составляет 37° (рис.1).

Для выяснения оптимальных значений pH рост выделенных штаммов изучали в диапазоне pH 1,4-3,3. Изучение роста и окислительной активности бактерий проводили в первые сутки культивирования, пока существенных изменений в реакции среды не происходило. Установлено, что оптимальное значение pH среды для роста шт. 72 составляет 2,0, а для шт. 64 - 2,3, нижний предел равен 1,4 (рис.2).

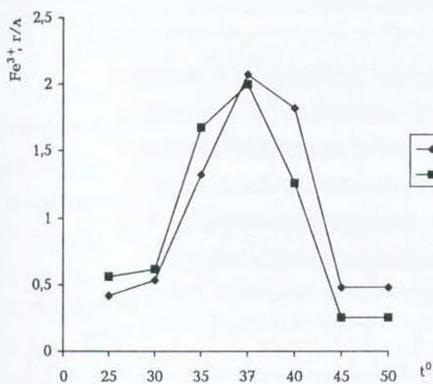


Рис. 1. Интенсивность окисления Fe^{2+} шт. 64 (1) и 72 (2) *Leptospirillum*-подобными бактериями при разных температурах.

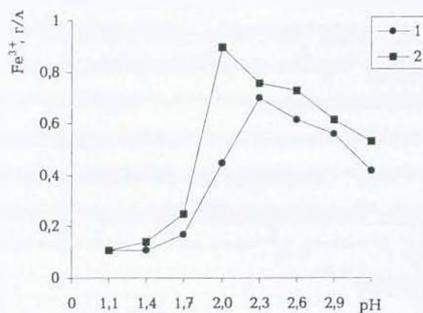


Рис. 2. Интенсивность окисления Fe^{2+} шт. 64 (1) и 72 (2) *Leptospirillum*-подобными бактериями при разных значениях pH.

Выделенные штаммы являются строгими автотрофами. Дрожжевой экстракт в концентрациях 0,01-0,02% не оказывал существенного подавляющего влияния на окислительную активность бактерий. Однако при содержании в среде более 0,05% дрожжевого экстракта наблюдалось угнетение окисления железа, а при 0,2% - его полное ингибирование (рис.3).

Окисление пирита. Исследовали способность *Leptospirillum*-подобных бактерий окислять пирит. При этом их активность сравнивали с активностью *T. ferrooxidans* шт. 33, 63 и 18. Полученные данные представлены на рис.4. Как видно из рисунка, за 10 дней культивирования шт.64 по количеству выщелаченного железа превосходит *T. ferrooxidans* шт. 33 и 63, однако уступает

T. ferrooxidans шт. 18 в 1,2 и 1,4 раза соответственно. Следует отметить, что при этом наблюдается корреляция между активностью штаммов и продолжительностью их лаг-фазы. Так, у шт. 64 *Leptospirillum*-подобных бактерий и *T. ferrooxidans* шт. 33 и 63 она составляет примерно четыре суток, тогда как у *T. ferrooxidans* шт. 18 через два дня после инокуляции начинается интенсивное выщелачивание пирита (рис.4).

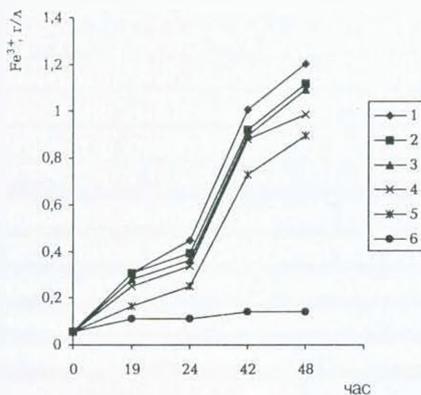


Рис. 3. Окисление Fe^{2+} *Leptospirillum*-подобными бактериями шт. 64 и 72 при содержании в среде дрожжевого экстракта в концентрации: 1 - 0,001; 2 - 0,02; 3 - 0,05; 4 - 0,1; 5 - 0,2; 6 - 0,5%.

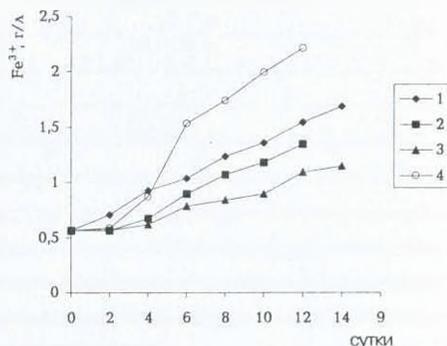


Рис. 4. Окисление пирита *Leptospirillum*-подобными бактериями шт. 64 (1) и *T. ferrooxidans*, шт. 33 (2), шт. 63 (3) и шт. 18 (4) при 30°.

Во второй серии опытов изучали интенсивность окисления пирита выделенными *Leptospirillum*-подобными бактериями в сравнении с умеренно термофильными штаммами, а также при их совместном культивировании (табл. 1).

Таблица 1. Окисление пирита штаммами *Leptospirillum*-подобных бактерий и умеренно термофильными бактериями при раздельном и совместном культивировании (FeS_2 - 2%, pH 2,0, время культивирования-10 дней, t - 37°)

Использованные штаммы	Добавление дрожжевого экстракта	Выщелачено Fe, г/л		Белок, мг/мл	Конечный pH
		Fe^{3+}	Fe^{2+}		
шт.64	-	4,760	0,028	0,076	1,25
шт.86	-	1,064	0,476	0,02	1,38
шт.86	+	1,764	0,308	0,042	1,33
шт.86 + шт.64	-	6,384	0,028	0,070	1,15
шт.72	-	2,604	0,056	0,040	1,12
шт.69	-	1,372	0,532	0,02	1,25
шт.69	+	2,196	0,168	0,025	1,2
шт.69 + шт.72	-	5,096	0,028	0,045	0,95

Исследование показало, что по эффективности окисления пирита шт. 64 в 4,5 и 2,7 раз превосходит шт. 86, растущего в автотрофных и

миксотрофных условиях в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта. Такая же картина наблюдается при сравнительном исследовании шт. 72 *Leptospirillum* - подобных бактерий и умеренно термофильного шт. 69. Так, количество выщелаченного железа при окислении пирита при 37° шт. 72 соответственно в 1,9 и 1,2 раза больше, чем при автотрофном и миксотрофном росте умеренно термофильного шт. 69.

Известно, что умеренно термофильные серо- и железоокисляющие бактерии являются миксотрофами, то есть проявляют хороший рост и окислительную активность только в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта, что очевидно и в нашем эксперименте со штаммами 69 и 86. Проведенные исследования показали, что эффективность умеренно термофильных бактерий значительно увеличивается при их совместном культивировании с *Leptospirillum* - подобными бактериями в автотрофных условиях. Так, ассоциацией шт.86 со шт. 64 за 10 дней культивирования в среду выделяется 6,4 г/л железа, то есть в 1,3 раза больше, чем при росте шт. 64 в монокультуре и в 6,0 и 3,6 раз больше, чем при росте шт. 86 в отсутствие и в присутствии дрожжевого экстракта соответственно.

Подобную эффективность проявляет также ассоциация термофильного шт. 69 со шт. 72 *Leptospirillum*-подобных бактерий. По количеству выделенного железа упомянутая ассоциация в 2,0 раза превосходит шт. 72 и в 3,7 и 2,3 раза активнее шт. 69, растущего в автотрофных и миксотрофных условиях.

Характерно, что при использовании *Leptospirillum*-подобных бактерий в монокультуре или в ассоциации с умеренно термофильными штаммами выщелаченное в среду железо представлено исключительно в трехвалентном состоянии, что свидетельствует о создавшемся сильном окислительном условии. При росте умеренно термофильных бактерий в автотрофных или миксотрофных условиях в среде доминирует трехвалентное железо, однако присутствует значительное количество (примерно 0,5 г/л) двухвалентного железа. То есть в этом случае среда характеризуется менее сильным окислительным свойством. Следует отметить также высокую устойчивость ассоциаций изученных бактерий к низким значениям pH. Они продолжают активно окислять пирит при pH 0,95.

В литературе имеются данные об успешном использовании *S.thermosulfidooxidans* в ассоциации с *T. ferrooxidans* в окислении пиритно-арсенопиритного концентрата с применением технологической схемы с переменным температурным режимом [5]. С другой стороны, совместное культивирование *S.thermosulfidooxidans* и *T.caldus* в автотрофных условиях позволяет достичь эффективности миксотрофно растущих сульфобацилл [11].

Изученная нами ассоциация умеренно термофильных серо- и железоокисляющих бактерий и *Leptospirillum*-подобных штаммов проявляет значительно высокую активность в окислении пирита и может быть успешно использована для интенсификации выщелачивания пирита и других пиритсодержащих руд и концентратов. Преимуществом указанной ассоциации является также возможность осуществления бактериального выщелачивания

металлов при сравнительно высоких температурах и без добавления каких-либо органических источников углерода. Исследованная ассоциация характеризуется также высокой устойчивостью к низким значениям рН и повышенным концентрациям железа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биогeотехнология металлов. Под ред. Каравайко Г.И., Грудева С.Н., М, Центр Международных проектов ГКНТ, 1985.
2. Варданян Н.С. Биол. журн. Армении, 48, 1, 8-12, 1995.
3. Головачева Р.С., Голышина О.В., Каравайко Г.И., Дорофеев А.Г., Пивоварова Т.А., Черных Н.А. Микробиология, 61, 6, 1056-1065, 1992.
4. Маркосян Г.Е. Биол. журн. Армении, 25, 2, 26, 1972.
5. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А., Кондратьева Т.Ф., Каравайко Г.И. Прикл. биохимия и микробиология, 33, 2, 182-189, 1999.
6. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод, М, 1970.
7. Battaglia F. et al. Antonie van Leuwenhook, 66, 295-302, 1996.
8. Brierley J.A., Brierley C.L. VNR Comp. Inc. NY. 253-262, 1985.
9. Dopson M., Lindstrom B.E. Appl. Environ. Microbiol., 65, 36-40, 1999.
10. Eccleston M., Kelly D.P., Wood A.P. Planetary Ecology. Eds. Caldwell D.E.
11. Helle U., Onken U. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 553-558, 1989.
12. Hippe H. System. Evol. Microbiology, 50, 501-503, 2000.
13. Johnson D.B. FEMS Microbiol. Ecology, 27, 307-317, 1998.
14. Merrettig U., Wlotzka P., Onken U. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 626-628, 1989.
15. Norris P.R. Recent Progress in Biohydrometallurgy, Eds. Rossi G., Torma A.E.- Cagliari, Italy, 83-96, 1983.
16. Sand W., Rohde K., Sobotke B., Zenneck C. Appl. Environ. Microbiol., 1, 85, 1992.

Поступила 06.III.2001