



Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

ОСОБЕННОСТИ СООБЩЕСТВА ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ВЫЩЕЛАЧИВАНИИ МЕДНОГО КОНЦЕНТРАТА

С.З. НАГДАЛЯН, Е.М. КОЧАРЯН, Н.С. ВАРДАНЯН

Центр микробиологии и депонирования микроорганизмов НАН РА,
E-mail; nvard@sci.am

Проведено сравнительное исследование активности чистых культур и сообщества хемолитотрофных бактерий (ХБ) для выщелачивания медного концентрата. Установлена высокая эффективность сообщества ХБ, выделенного из полиметаллической руды Ахтала, в извлечении меди и железа из медного концентрата. Микробиологический анализ сообщества бактерий показал доминирование в нем сероокисляющих бактерий, а также наличие некультивируемых железоокисляющих бактерий. Выделена и изучена грамположительная сероокисляющая бактерия. Показано, что в монокультуре выделенная бактерия не способна к окислению сульфидов металлов. Однако в ассоциации с бактериями *Leptospirillum* spp. активно окисляет медный концентрат.

Сообщество бактерий – выщелачивание - медный концентрат

Ուսումնասիրվել է քեմոլիտոտրոֆ բակտերիաների (ԹԲ) համակեցության և մաքուր կուլտուրաների համեմատական ակտիվությունը պղնձի խտանյութի տարալվացման գործում: Հաստատվել է Ախթալայի բազմամետաղային հանքավայրից մեկուսացված ԹԲ համակեցության պղնձի խտանյութից երկաթի և պղնձի կորզման բարձր արդյունավետությունը: Բակտերիաների համակեցության մանրէաբանական անալիզը ցույց է տվել դրանում ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների գերակշռումը, ինչպես նաև աճեցման չենթարկվող երկաթ-օքսիդացնող բակտերիաների առկայությունը: Մեկուսացվել և ուսումնասիրվել է գրամ-դրական ծծումբ օքսիդացնող բակտերիա: Պարզվել է, որ մեկուսացված բակտերիան ընդունակ չէ օքսիդացնելու մետաղների սուլֆիդներ, սակայն *Leptospirillum* spp. բակտերիաների հետ համատեղ ակտիվորեն օքսիդացնում է պղնձի խտանյութը:

Բակտերիաների համակեցություն - տարալվացում - պղնձի խտանյութ

Comparative activities of pure cultures and consortium of chemolithotrophic bacteria (CB) for bioleaching of copper concentrate have been studied. High efficiency of bacterial consortium isolated from Akhtala multi-metallic ore in bioleaching of copper concentrate has been established. Microbiological analysis of consortium showed predominantly the presence of sulphur oxidizing bacteria as well as uncultivable iron oxidizing bacteria. A gram positive sulphur oxidizing bacteria has been isolated and studied. It has been shown that isolated bacteria represent no activity in metal sulphide oxidation. However, in association with bacteria *Leptospirillum* spp. they actively oxidize copper concentrate.

Consortium of bacteria - bioleaching - copper concentrate

Биовыщелачивание - это использование различных типов хемолитотрофных бактерий (ХБ) (мезофильных, умеренно термофильных и экстремально термофильных) для извлечения ценных металлов из сульфидных руд [9, 10, 16]. Долгое время считалось, что центральная роль в процессах биовыщелачивания в коммерческих установках, функционирующих при температурах, не превышающих 40°, принадлежит мезофильной бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* [13]. Однако исследования последних лет, основанные на использовании полимерной цепной реакции (ПЦР) для амплификации и характеристики 16S рРНК генов бактерии, подтвердили, что во многих установках биовыщелачивания пиритсодержащих руд доминируют умеренно термофильные бактерии и бактерии *Leptospirillum spp.* в комбинации с сероокисляющими бактериями *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidi-thiobacillus caldus* [11,14]. Имеются также данные, указывающие на участие гетеротрофных бактерий в ускорении окисления сульфидных минералов [8].

Что касается основного минерала меди - халькопирита, то его окисление наиболее активно протекает с участием термофильных бактерий и экстремально термофильных архебактерий [15].

Предполагается, что термофильные бактерии создают такие условия, при которых в среде поддерживается сравнительно низкий потенциал, способствующий преодолению эффекта «пассивации» халькопирита [12].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение эффективности выщелачивания медных концентратов при использовании чистых культур и сообщества ХБ.

Материал и методика. Объектом исследования служило сообщество хемолитотрофных бактерий, полученное при инкубировании проб полиметаллической руды Ахтала (Армения) на среде 9К с двухвалентным железом в качестве источника энергии, чистая культура сероокисляющей бактерии (SMP 1), доминирующей в сообществе, а также выделенные нами ранее лабораторные штаммы умеренно термофильной бактерии *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и бактерии *Leptospirillum spp.*

Чистая культура SMP-1 выделена из пульпы периодического выщелачивания медного концентрата с использованием сообщества бактерий из полиметаллической руды. Пробы пульпы на среде 9К, содержащей серу в качестве источника энергии, инкубировали при 30°. Чистые культуры бактерии получали высевом на плотную среду Маннинга с тетрагидратом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [1], содержащую 0,6% агарозы (Agarose, Type I, SIGMA). Чистоту выделенных штаммов проверяли посевами на среду с 0,02- 0,05%-ным дрожжевым экстрактом (Koch-light, Англия) в присутствии или отсутствии глюкозы. Используемые в исследованиях выделенные нами ранее ХБ *S. thermosulfidooxidans* шт.86 и бактерии *Leptospirillum spp.* [3] выращивали на среде Браерли с двухвалентным железом (2,0 г/л) в качестве источника энергии в присутствии и отсутствии дрожжевого экстракта соответственно.

Основные фенотипические особенности выделенной бактерии изучали при их выращивании в термостате при 37°. Опыты по выщелачиванию концентратов проводили в колбах в режиме встряхивания (180 об./мин) в условиях периодического культивирования бактерий.

Бактериальному выщелачиванию подвергали образцы медного концентрата Зангезурского медно-молибденового комбината (ЗММК). Химический анализ образцов концентрата, приведенный в табл. 1, был проведен общепринятыми в минералогии методами и любезно предоставлен нам ЗММК.

Таблица 1. Химический анализ образцов медных концентратов

Образцы	Содержание, в % (Ag, Au в г/т)												
	Si	Al	Mg	Ca	Fe	Mn	Co	Mo	Zn	Cu	Ag	Au	Cd
Обр. 1	0,32	0,18	0,1	-	26,0	0,02	$4 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	12,5	22,2	102	46,2	0,06
Обр. 2	1,3	0,42	1,3	0,12	24,0	0,014	$4 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	8,33	22,2	159	54,4	0,1

Образцы концентрата измельчали до частиц размером 0,080 мм. Навески измельченных образцов помещали в колбы Эрленмейера объемом 250 мл, смачивали дистиллированной водой и стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин. Затем колбы заполняли 50 мл питательной среды 9К без железа.

Интенсивность выщелачивания концентрата оценивали по количеству выщелоченных меди и железа, а также по снижению pH среды и увеличению титра использованных культур бактерий.

Количество Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексонометрическим методом с трилоном Б [6], медь - колориметрически [7] на спектрофотометре СФ-26 (Ленинградское опытно-механическое объединение (ЛОМО), Россия), а также на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС 1N (Carl Zeiss, Германия).

За ростом бактерий следили с использованием микроскопа МБИ-3 (ЛОМО, Россия) с фазово-контрастным устройством. Количество жизнеспособных клеток определяли методом предельных разведений, наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблицам Мак-Креди [1].

pH среды измеряли pH-метр-милливольтметром "pH-121" (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь).

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные обрабатывали статистически. [4].

Результаты и обсуждение. Образцы медного концентрата Кафанской обогатительной фабрики подвергли биовыщелачиванию с использованием сообщества бактерий, полученного из полиметаллической руды Ахтала, а также лабораторных штаммов чистых культур ХБ.

Исследования показали высокую степень извлечения меди из двух образцов концентрата при использовании сообщества бактерий по сравнению с лабораторным штаммом умеренно термофильной бактерии *S. thermosulfidooxidans* шт. 86. Так, за 9 дней культивирования сообществом бактерий при 30° из образца 1 было извлечено в 2 раза больше меди и железа, чем с участием умеренно термофильной бактерии *S. thermosulfidooxidans* шт. 86 при 45° (рис.1). В случае образца 2 высокая активность сообщества бактерий в выщелачивании железа проявилась лишь после 20 дней культивирования, что можно объяснить особенностью его химического состава, в частности высокой кислотоемкостью.

Полученные результаты подтверждают, что сообщество бактерий, сформировавшееся в пульпе при биоокислении медного концентрата и состоящее из бактерий, изначально более адаптированных к экстремальным условиям, в том числе высоким концентрациям различных металлов, может служить эффективным потенциальным кандидатом для осуществления биовыщелачивания медного концентрата.

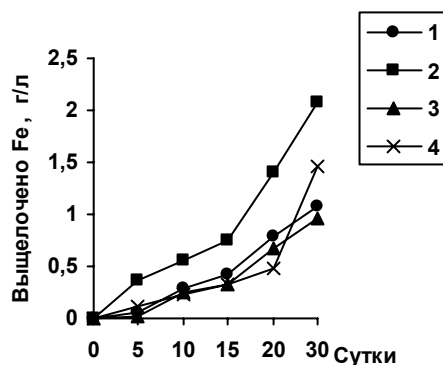


Рис. 1. Выщелачивание железа при окислении двух образцов медного концентрата *S. thermosulfidooxidans* шт. 86 (1, 3) и сообществом мезофильных ХБ (2, 4)

Микробиологический анализ сообщества бактерий, использованного для окисления образцов медного концентрата, показал доминирование в нем сероокисляющих бактерий, а также наличие некультивируемых железоокисляющих бактерий. Но ни одного из широко распространенных видов железоокисляющих бактерий, в том числе *A. ferrooxidans* и *S. thermosulfidooxidans*, не было обнаружено.

Из пульпы бактериального выщелачивания медного концентрата была изолирована в чистую культуру еще не описанная в литературе грамположительная сероокисляющая бактерия. На плотной среде с тетрационатом бактерия образует нерегулярные, похожие на снежинку колонии молочного цвета, покрытые толстым слоем слизи. В молодой культуре бактерии представляют собой палочки размером 0,8 x 1,5–2,0 мкм. По мере роста они превращаются в длинные нити, иногда переплетенные между собой (рис. 2).

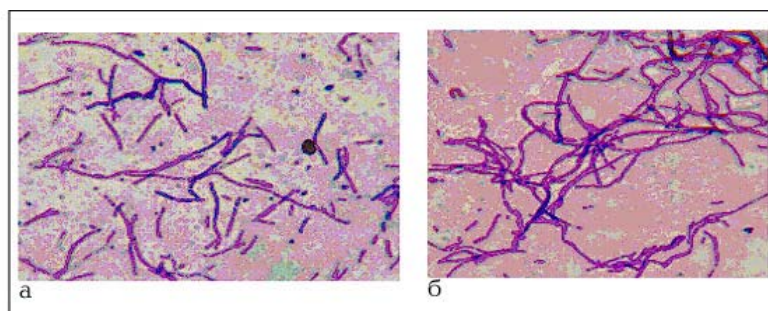


Рис. 2. Микрофотографии окрашенных клеток SMP-1 (а) и SMP-2 (б)

Оптимальная температура роста выделенной бактерии 30° . Оптимальное значение pH - 2,8-3,0.

В качестве источника энергии бактерии могут использовать тетрагидрат (Na₂S₄O₆·2H₂O), а также элементарную серу (S⁰), не способны окислять сульфиды металлов. Строгий автотроф, дрожжевой экстракт ингибирует рост бактерии и окисление элементарной серы (табл.2).

Таблица 2. Влияние дрожжевого экстракта на рост шт. SMP-1, образование S/SO₄ и pH среды (время культивирования 4 сут)

	Добавление дрожжевого экстракта, %			
	-	0,005	0,01	0,02
Количество бактерий, кл/мл	6,7х 10 ⁸	4,5х 10 ⁸	2,5х 10 ⁶	4,5х 10 ⁵
S/SO ₄ , г/л	580 ± 7,0	553 ± 5,6	437 ± 16,8	365 ± 14,0
pH, нач./конеч.	2,8 /1,7	2,8 /1,75	2,8 /1,95	2,8 /2,2

В чистой культуре бактерия не проявляет способности к выщелачиванию медного концентрата, однако в ассоциации с бактериями *Leptospirillum* spp. активно переводит медь в раствор (рис. 3).

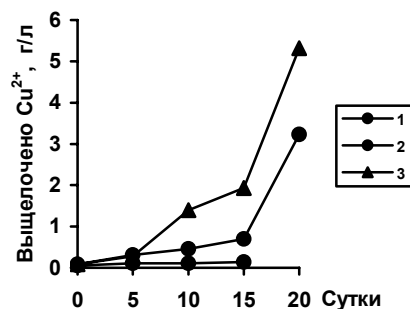


Рис. 3. Окисление медного концентрата с использованием сероокисляющей бактерии SMP.-1 (1), бактерий *Leptospirillum* sp. шт.64 (2) и их ассоциаций (3)

Таким образом, в процессе выщелачивания медных концентратов под действием соответствующих физико-химических факторов (pH, высокая концентрация меди и железа) формируется высокоэффективное и особое по своему составу сообщество, состоящее преимущественно из сероокисляющих и некультивируемых железоокисляющих бактерий.

Выделена и изучена грамположительная сероокисляющая хемолитотрофная бактерия, которая по основным физиологическим признакам (источники энергии, ацидофилия, отношение к температуре, pH) проявляет близкое сходство с известной *A. thiooxidans*. Однако существенным отличием выделенной сероокисляющей бактерии от известной *A. thiooxidans* является форма и размеры клеток, и, что особенно важно, ультраструктурная организация клеточной стенки, поскольку в

отличие от *A. thiooxidans* клетки выделенной бактерии окрашиваются по Граму положительно. В этом отношении выделенная бактерия более близка к сульфобациллам [5], но отличается от последних четко выраженной автотрофией.

Предполагается, что некультивируемые железooksисляющие бактерии, входящие в состав сообщества, принадлежат к роду *Leptospirillum*.

Дальнейшие более детальные исследования, включая молекулярно-генетические, позволят идентифицировать выделенную бактерию, выявить ее основные цитолого-биохимические и кинетические характеристики, а также потенциал в выщелачивании меди и других металлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биогеотехнология металлов*. Практическое руководство. Под ред. Г.И.Каравайко, Дж. Росси, А.Агате, С. Грудева, З.А. Авакян, М., Центр Международных проектов ГКНТ, 1989.
2. *Вардanian Н.С.* Биотехнология, 6., 79 – 83, 2003.
3. *Вардanian Н.С., Акопян В.П.* Микробиология, 72, 4, 1- 5 , 2003.
4. *Ждан-Пушкина С.М., Мовчан Н.А., Щелкунова С.А.* Задания к практическим занятиям по микробиологии. - Л.: 1974.
5. *Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф.* Микробиология, 75, 5, 593-629, 2006.
6. *Резников А.А. Муликовская Е.П., Соколов И.Ю.* Методы анализа природных вод, М., Недра, 140с, 1970.
7. *Файнберг С.Ю.* Анализ руд цветных металлов, М., с.374 , 1953.
8. *Bacelar-Nicolau P., Johnson D.B.* L Appl. Environ. Microbiol., 65, 2, 585 – 590, 1999.
9. *Brierley J.A., Brierley C.L.* Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of 21st century, IBS 99. Amilis R., Ballester A. (eds) - Elsevier, Amsterdam, p. 81 – 89, 1999.
10. *Brierley J.A., Brierley C.L.* Hydrometallurgy, 59, 1233- 1239, 2001.
11. *Coram N. J., Rawlings D. E.* Appl. Environ. Microbiology., 68, 2, 838 – 845, 2002.
12. *Petersen J., Dixon D.G.* Hydrometallurgy, 83, 40-49, 2006.
13. *Plumb J. J., McSweeney N.J., Franzmann P.D.* Minerals Engineering, 21, P.91-93, 2008.
14. *Rawlings D.E., Tributsch H., Hansford G.S.* Microbiology, 145, 5 – 13, 1999.
15. *Rawlings D.E., Dew D., du Plessis C.* TRENDS Biotechnol., 21, 38-44, 2003.
16. *Romano P., Blazquez M.L., Alguacil F.J., Munos J.A., Ballester A., Gonzales F.* FEMS Microbiol. Lett., 196, 71-75, 2001.

Поступила 26.09.2008