

ЛИТЕРАТУРА

1. Балоян С.А. В сб. науч. тр. Арм. отд. ВБО "Флора, растительность и растительные ресурсы Армянской ССР", 10, 106-133, 1987.
2. Балоян С.А. Биолог. журн. Армении, 42, 3, 203-207, 1989.
3. Тахтаджян А.Л. Флористические области Земли. Л., 1978.
4. Теоретические и методические проблемы сравнительной флористики. Л., 1987.

Поступила 24.X. 1990

Биолог. журн. Армении, 1 (52), 1999

УДК 579.846

ОКИСЛЕНИЕ ХАЛЬКОПИРИТА ШТАММАМИ
ТЕРМОАЦИДОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ВИДА *SULFOBACILLUS*
THERMOSULFIDOOXIDANS

Н.С. ВАРДАНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378513, г. Абовян

Изучена активность штаммов термоацидофильных бактерий 69 и 86, выделенных нами из сульфидных месторождений Армении, в окислении халькопирита. Установлено, что по количеству выщелоченной меди и железа эти бактерии превосходят типовые штаммы бактерий вида *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Окисление халькопирита изученными штаммами можно описать уравнением Михаэлиса-Ментен. Определение кинетических параметров показало, что наименьшим значением K_m , следовательно наибольшим сродством к халькопириту, обладает шт.86. Установлено, что ионы Fe^{3+} в концентрации 1,0-1,9% стимулируют бактериальное окисление халькопирита в 1,3-1,4 и 1,9 раз соответственно.

Ուսումնասիրվել է Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերից մեր կողմից մեկուսացված բերմոացիդոֆիլ բակտերիաների կուլտուրաների 69 և 86 համարների շտամների ակտիվությունը խալկոպիրիտի օքսիդացման պրոցեսում: Պարզվել է, որ այս շտամները պղնձը և երկաթի տարալուծման ինտենսիվությամբ գերազանցում են *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* տեսակի տիպային շտամներին: Ուսումնասիրված շտամների կողմից խալկոպիրիտի օքսիդացման պրոցեսը կարելի է նկարագրել Միխաելիս-Մենտենի հավասարումով: Պրոցեսի կինետիկական պարամետրերի որոշումը ցույց է տվել, որ K_m -ի նվազագույն արժեքը, այսինքն խալկոպիրիտի նկատմամբ ամենամեծ խնամակցությամբ օժտված է 86 շտամը: Պարզվել է, որ Fe^{3+} իոնները միջավայրում 1,0 - 1,9% պարունակության դեպքում խթանում են խալկոպիրիտի բակտերիալ օքսիդացումը համապատասխանաբար 1,3-1,4 և 1,9 անգամ:

The activity of str. 69 and str. 86 of thermoacidophilic bacteria isolated from sulfide dumps of Armenia in oxidation of chalcopyrite has been studied. The strains investigated exceed the type strains of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* in leaching of copper and iron. The oxidation of chalcopyrite by these strains can be described by Michaelis-Menten equation. According to kinetic parameters the str. 86 possesses the least value of K_m , which means the highest affinity to chalcopyrite. The Fe^{3+} ions in concentration of 1.0-1.9% stimulate the bacterial oxidation of chalcopyrite in 1.3-1.4 and 1.9 times respectively.

Сульфобациллы - халькопирит - бактериальное выщелачивание

В сульфидных месторождениях Армении наряду с *Thiobacillus ferrooxidans* и другими тионовыми бактериями широко представлены также термофильные бактерии рода *Sulfobacillus* [2]. В настоящее время выделены и описаны пять представителей этого рода. Это типовые штаммы *S.thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 [4], *S.thermosulfidooxidans subsp. thermotolerans* [7], *S.thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* [3], *S. disulfidooxidans* [13] и *S. acidophilus* [16]. На основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК установлено филогенетическое положение *Sulfobacillus*. Предполагается, что сульфобациллы представляют самостоятельную эволюционную ветвь в подразделении грамположительных бактерий [11].

Сульфобациллы относятся к группе термофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий, способных использовать элементную серу и ионы двухвалентного железа в качестве единственного источника энергии [8, 9]. Эти бактерии способны также окислять сульфиды металлов [1, 12]. Однако роль сульфобацилл в выщелачивании металлов, в частности меди, изучена недостаточно.

Целью наших исследований явились изучение и скрининг выделенных нами штаммов вида *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* в окислении халькопирита, а также влияние условий внешней среды на бактериальное выщелачивание меди.

Материал и методика. Объектом исследования служили типовые штаммы *S.thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269, *S.thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* штаммы 41, 86 и 69 термоацидофильных сероокисляющих бактерий, выделенных нами ранее из Армянского, Шамлугского и Ахтальского месторождений Армении [2].

Бактерии выращивали на среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5; NaCl - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KH_2PO_4 - 0,2; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0,01. В качестве источника энергии использовали двухвалентное железо в виде $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве 10г/л. рН среды 1,8 устанавливали с помощью 10N H_2SO_4 . К среде добавляли также дрожжевой экстракт в концентрации 0,01%.

Бактериальному выщелачиванию подвергали халькопирит Шамлугского месторождения крупностью измельчения - 100/+70 мкм, содержащий: Cu - 30,2%; Fe - 29,7%; S - 38,0%.

Навески измельченного халькопирита помещали в колбы емкостью 250 мл, смачивали дистиллированной водой и стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин. Затем колбы заполняли 50 мл вышеуказанной среды без железа и вносили суспензию отмытых клеток.

Для выщелачивания использовали отмытые клетки указанных штаммов. Штаммы бактерий выращивали на вышеуказанной среде, содержащей Fe^{2+} в качестве источника энергии. В логарифмической фазе роста клетки собирали центрифугированием при 10000 г в течение 10 мин. Затем их дважды отмывали подкисленной до рН 2,0 средой без Fe^{2+} . Далее навеску сырой биомассы ресуспендировали в той же среде и вносили в колбы до конечной концентрации 0,20-0,26 мг/мл влажных клеток.

Выщелачивание осуществляли в периодическом режиме культивирования на качалке (180об/мин) при 50°. Концентрацию субстрата рассчитывали как процентное отношение количества халькопирита к объему питательной среды.

Об интенсивности окисления халькопирита судили по количеству перешедших в среду ионов железа и меди. Ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексонометрически трилоном Б [10]. Количество меди и общего железа определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС 1N.

Удельную скорость выщелачивания металлов рассчитывали как количество перешедших в среду ионов меди и железа за единицу времени на единицу биомассы.

Константу Михаэлиса K_m и максимальную скорость окисления халькопирита определяли по Лайнуиверу - Бэрку [5].

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные обрабатывали статистически [6].

Результаты и обсуждение. Влияние pH. Окисление халькопирита шт. 86 изучали в диапазоне pH 1,0-3,0. Активность бактерий в окислении халькопирита определяли в начале экспоненциальной фазы, пока

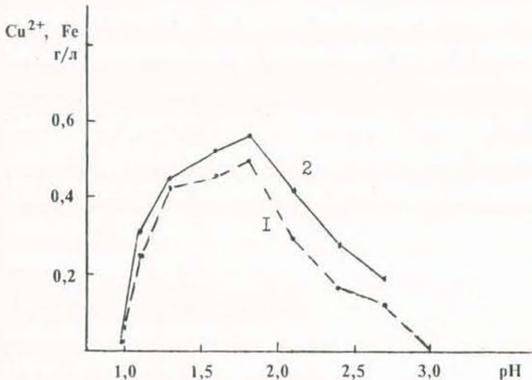


Рис. 1. Влияние pH на выщелачивание меди (1) и железа (2) при окислении халькопирита шт. 86 (концентрация $CuFeS_2$ - 2%, продолжительность опыта - 4 дня).

существенных изменений в реакции среды, сопровождающих окисление сульфидной серы, не происходило. Приведенные на рис.1 данные показывают, что наибольшее количество меди и железа выщелачивается при pH 1,8. Активное окисление халькопирита наблюдается и при значениях pH 1,3-1,6. При значениях реакции среды выше 1,8 активность окисления халькопирита снижается, и процесс прекращается при pH 3,0. Нижний предел составлял pH 1,0 (рис.1).

Влияние концентрации субстрата. Исследования показали, что с увеличением концентрации халькопирита увеличивается количество выщелоченных меди и железа. В табл.1 приведены данные по активности исследуемых штаммов в окислении халькопирита при его разных

Таблица 1. Выщелачивание меди и железа при окислении халькопирита ($CuFeS_2$) разными штаммами термоацидофильной бактерии *S.thermosulfidooxidans* (pH 1,8; 50°, продолжительность опыта - 3 дня)

Штаммы	Концентрация $CuFeS_2$, %	Выщелочено, мг/мл мг биомассы	
		Fe, общее	Cu^{2+}
<i>S.thermosulfidooxidans</i> ВКМ В-1269	1	1,44	1,2
	2	2,48	2,7
	3	3,6	5,1
<i>S.thermosulfidooxidans</i> subsp. <i>asporogenes</i> шт. 41	1	1,08	1,1
	2	2,7	2,7
	3	3,7	4,5
<i>S.thermosulfidooxidans</i> шт. 86	1	6,2	4,8
	2	15,4	10,0
	3	18,1	14,6
<i>S.thermosulfidooxidans</i> шт. 69	1	1,75	2,3
	2	4,37	4,9
	3	6,0	9,1

концентрациях.

Как показывают данные таблицы, типовой штамм ВКМ В-1269 и его аспорогенный подвид шт. 41 проявляют почти одинаковую активность при всех испытанных концентрациях халькопирита. Однако активность шт.69 и шт.86 в окислении халькопирита значительно выше. Так, шт. 69 превосходит типовые штаммы в 1,8-1,9 раз по количеству выщелоченной меди и в 1,2-1,7 раз по выщелоченному железу. У шт. 86 эти значения составляют 4,4-6,3 и 3,2-4,2 раз соответственно для меди и железа. Таким образом, наибольшей удельной активностью в окислении халькопирита среди исследуемых штаммов обладает шт. 86.

Изучение зависимости скорости выщелачивания металлов от концентрации субстрата при бактериальном окислении халькопирита показало, что она характеризуется типичной кривой насыщения (рис. 2). Следовательно, по аналогии с кинетикой ферментативных реакций бактериальное окисление халькопирита можно описывать уравнением Михаэлиса-Ментен. Построив графики зависимости удельной скорости окисления халькопирита от его концентрации в обратных координатах, определяли значения K_{III} и V_{max} для

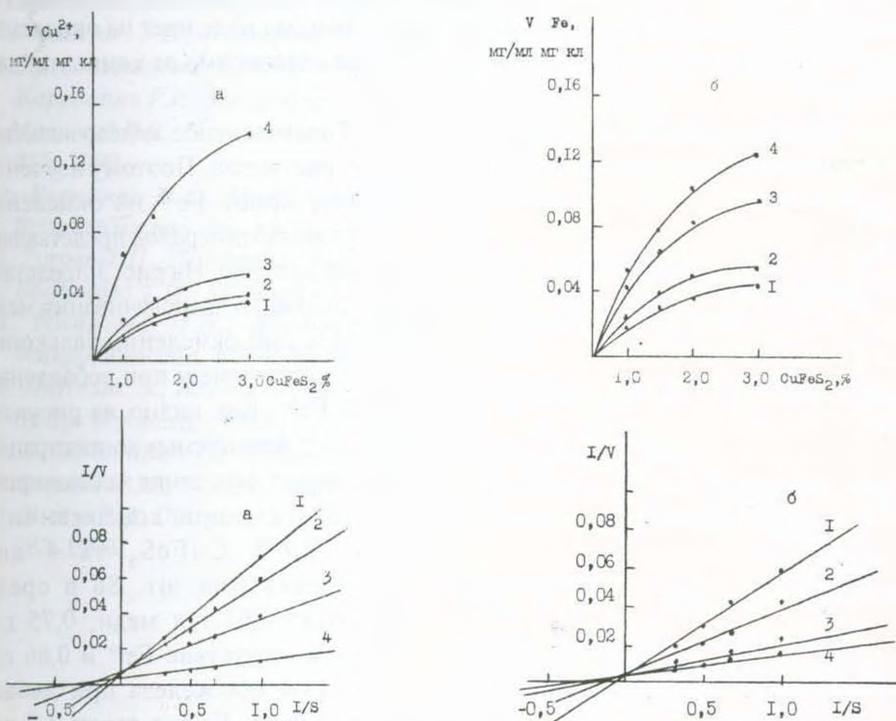


Рис. 2. Зависимость скорости выщелачивания меди (а) и железа (б) от концентрации $CuFeS_2$ при его окислении: 1 - *S.thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269, 2 - *S.thermosulfidooxidans* шт. 41, 3 - *S.thermosulfidooxidans* шт.69, 4 - *S.thermosulfidooxidans* шт. 86.

отдельных штаммов бактерий (рис. 2 г, д).

Как показывают данные табл. 2, наименьшим значением K_{III} , следовательно, и наибольшим сродством к субстрату - 1,3 % $CuFeS_2$ - обладает шт.86. Значения максимальной удельной скорости окисления халькопирита,

определенные по выщелоченной меди и железа отдельно, незначительно отличаются у исследуемых штаммов. Тем не менее более высокая удельная скорость выщелачивания меди и железа, 250мг/мл час мг биомассы, наблюдается при окислении халькопирита шт.86.

Таблица 2. Значения K_m и V_{max} для отдельных штаммов термоацидофильных бактерий при окислении $CuFeS_2$ (рН 1,8; $CuFeS_2$ - 2%)

Штаммы	K_m , %		V_{max} , мг/мл час мг биомассы	
	Fe	Cu^{2+}	Fe	Cu^{2+}
<i>S.thermosulfidooxidans</i> ВКМ В-1269	11,8	10,0	200,0	166,7
<i>S.thermosulfidooxidans</i> шт.41	8,0	8,0	166,7	166,7
<i>S.thermosulfidooxidans</i> шт.69	3,6	4,0	200,0	142,8
<i>S.thermosulfidooxidans</i> шт.86	1,3	1,3	250,0	250,0

Влияние концентрации клеток на окисление халькопирита. Изучали также влияние другого важного параметра процесса - концентрации бактериальных клеток - на активность окисления халькопирита. Исследования показали, что концентрация бактериальных клеток 0,04-0,96мг/мл не влияет на окисление халькопирита и выщелачивание меди и железа независимо от концентрации субстрата.

Влияние ионов Fe^{3+} на окисление $CuFeS_2$. Трехвалентное железо является постоянным компонентом выщелачивающих растворов. Поэтому изучение

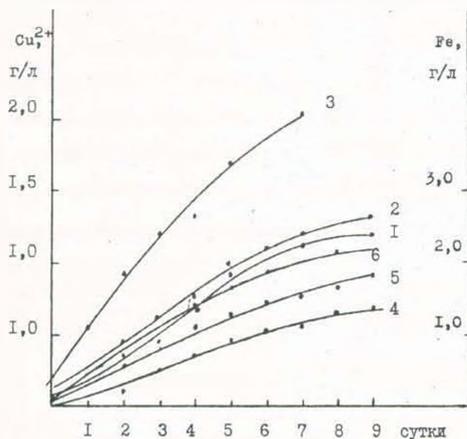


Рис. 3. Выщелачивание меди (1, 2, 3) и железа (4, 5, 6) при окислении $CuFeS_2$ (2%) шт. 86 в отсутствие Fe^{3+} (1, 4) при добавлении 1,0 г/л Fe^{3+} (2, 5) и в присутствии 1,9 г/л Fe^{3+} (3, 6).

влияния ионов Fe^{3+} на окисление сульфидных минералов представляет особый интерес. На рис. 3 представлена динамика выщелачивания меди и железа при окислении халькопирита в отсутствие и при добавлении ионов Fe^{3+} . Как видно из рисунка, ионы Fe^{3+} испытуемых концентраций стимулирует окисление халькопирита шт. 86. Так, при содержании в среде 2,0% $CuFeS_2$ за 4 дня выщелачивания шт. 86 в среду переходят 0,67 г/л меди, 0,75 г/л железа в отсутствие Fe^{3+} и 0,86 г/л меди, 1,04 г/л железа при добавлении 1,0 г/л Fe^{3+} , а также 1,3 г/л

меди, 1,45 г/л железа в присутствии 1,9 г/л Fe^{3+} . То есть ионы Fe^{3+} в концентрации 1,0 и 1,9 г/л стимулирует окисление халькопирита шт.86 соответственно в 1,3-1,4 и 1,9 раз. Стимулирующее влияние Fe^{3+} можно объяснить непосредственным участием этих ионов в окислении минералов, известное как не прямое действие в бактериальном выщелачивании:



Подобным образом ионы Fe^{3+} влияют на окисление пирита у *T. ferrooxidans* [14, 15].

Таким образом, наибольшей активностью среди изученных штаммов в окислении халькопирита обладает шт. 86. Штамм характеризуется также высокими значениями кинетических параметров процесса окисления халькопирита. Добавление трехвалентного железа в выщелачивающий раствор может привести к интенсификации бактериального окисления сульфида меди.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варданян Н.С. Биолог. журн. Армении, 48, 1, 8-12, 1995.
2. Варданян Н.С. Биолог. журн. Армении, 49, 1-2, 43-46, 1996.
3. Варданян Н.С., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Лысенко А.М., Каравайко Г.И. Микробиология, 57, 2, 268-274, 1988.
4. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. Микробиология, 47, 5, 815-822, 1978.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. 1, М., 1982.
6. Ждан-Пушкина С.М., Мовчан Н.А., Щелкунова С.А. Задания к практическим занятиям по микробиологии Л., 1974.
7. Коваленко Э.В., Малахова П.Т. Микробиология, 52, 6, 962-966, 1983.
8. Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 67, 2, 156-164, 1998.
9. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А. Прикл. биохим. и микробиол., 34, 3, 309-315, 1998.
10. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., 1970.
11. Турова Т.П., Полтораус А.Б., Лебедева Е.С., Булыгина Е.С., Цаплина И.А., Богданова Т.И., Каравайко Г.И. Микробиология, 63, 3, 366-374, 1995.
12. Цаплина И.А., Богданова Т.И., Саякин Д.Д., Каравайко Г.И. Микробиология, 60, 6, 34-40, 1991.
13. Dufresne S., Blais J.F., Roy C., Guay R. Proc. Inter. Biohydrometallurgy Symp. Wyoming, USA, 2, 267, 1993.
14. Keller L., Murr L.F. Biotechnol. Bioeng., 24, 83-96, 1982.
15. Lizama H.M., Suzuki I. Appl. Environ. Microbiol., 55, 11, 2918-2923, 1989.
16. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S. Microbiology, 142, 4, 775-783, 1996.

Поступила 20.VIII.1998