

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗВЛЕЧЕНИЮ МЕТАЛЛОВ ИЗ ПОЛИКОМПОНЕНТНЫХ РУД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНСОРЦИУМА ГЕТЕРОТРОФНЫХ И ЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сидорова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, Петрозаводский государственный университет - ПетрГУ, РФ, г. Петрозаводск

Локтева Алина Владимировна

студент, Петрозаводский государственный университет - ПетрГУ, РФ, г. Петрозаводск

New approaches to the extraction of metals from polycomponent ores using a consortium of heterotrophic and lithotrophic microorganisms

Natalia Sidorova

candidate of Biological Sciences, assistant professor in Petrozavodsk State University - PetrSU, Russia, Petrozavodsk

Alina Lokteva

student of Petrozavodsk State University - PetrSU, Russia, Petrozavodsk

Аннотация. Представлены результаты комплексного исследования бактерий группы *Pseudomonas* и *Acidithiobacillus*, выделенных из микрофлоры поликомпонентных руд. Способность микроорганизмов контролировать процесс экстракции металлов оценена по изменению редокс потенциала и рН среды. В качестве показателя метаболической активности бактерий использована динамика увеличения оптической плотности культурального раствора. За счет модификации условий культивирования получены доказательства перспективности использования выделенных

штаммов гетеро- и литотрофов для оптимизации процессов извлечения металлов из руды.

Abstract. The results of a complex study of the bacteria of the group *Pseudomonas* and *Acidithiobacillus* isolated from the microflora of polycomponent ores are presented. The ability of microorganisms to control the extraction of metals is assessed by the change in the redox potential and pH of the medium. As an indicator of the metabolic activity of bacteria, the dynamics of increasing the optical density of the culture solution was used. Due to the modification of cultivation conditions, evidence was obtained of the prospects of using isolated strains of hetero- and lithotrophs to optimize the processes of extracting metals from ore.

Ключевые слова: биовыщелачивание; металлы; руда; хемолитотрофы; *Acidithiobacillus*; *Pseudomonas*.

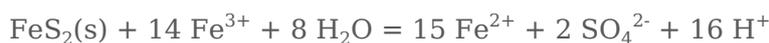
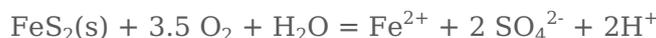
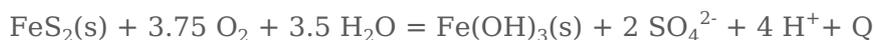
Keywords: bioleaching; metals; ore; chemolithotrophs; *Acidithiobacillus*; *Pseudomonas*.

Установлено, что ежегодные мировые запасы высококачественных руд снижаются из-за нарастающего спроса на металлы. Параллельно продолжает накапливаться руда низкого качества, представленная, в основном, отходами горнодобывающей промышленности. Извлечение металлов из такого низкосортного минерального сырья с использованием обычных химических технологий, как правило, сопровождается высокими энергетическими и финансовыми затратами при низком уровне рентабельности производства [6, с. 607-615]. Применение альтернативных биотехнологических подходов в решении данной проблемы позволит не только с экономической выгодой извлекать металлы из низкосортного сырья, но и, что особенно важно, решить комплексную проблему загрязнения антропогенных территорий горнодобывающих предприятий [1, с. 25].

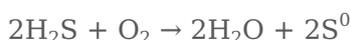
Основным инструментом технологии «*biomining*» является использование способности некоторых групп гетеротрофных и литотрофных микроорганизмов, принадлежащих к различным таксонам, контролировать природные процессы экстракции металлов из руды, участвовать в формировании осадочных пород [8, с. 127]. Экспериментально доказано, что среди гетеротрофных бактерий наиболее эффективными в процессах растворения металлов считаются представители рода *Bacillus*. Так, *Bacillus mucilaginosus* и *Bacillus polymyxa* участвуют в микробном выщелачивании кремнезема из боксита, состоящего из гидратов оксида алюминия, оксидов железа и кремния, используемого для получения глинозема и глинозёмосодержащих огнеупоров. Среди низших грибов, известно использование метаболической активности *Asperillus niger* для оптимизации процесса растворения алюминия из алюмосиликатов. Все гетеротрофы активно используют органические соединения в качестве источника углерода, что определяет состав и комбинацию субстратов для их культивирования в лабораторных и промышленных условиях. Для *Bacillus sp.* разработана среда, содержащая 0,5 % (мас./об.) сахарозы, набор солей, дрожжевой экстракт в качестве источника азота и CaCO₃. В целях оптимизации условий культивирования гетеротрофных микроорганизмов в среде должна постоянно поддерживаться рН близкая к нейтральной и мезофильная температура. Только при соблюдении всех требований к процессу гетротрофного выщелачивания металлов, экстракция будет происходить или за счет ферментативного восстановления, или за счет синтеза органических кислот в виде цитрата (для *Bacillus megaterium*), цитрата и глюконата (для *Pseudomonas putida*), цитрата, глюконата, оксалата, малата, тартрата и сукцината (для *Aspergillus niger*) [9, с. 405]. Необходимо отметить, что несмотря на ряд физиологических и биохимических отличий, обнаруженных, как внутри, так и между видами, все перечисленные группы микроорганизмов являются высоко адаптированными к широкому диапазону концентраций металлов в среде и могут быть использованы для целей биогидрометаллургии [9, с. 453].

Литотрофные микроорганизмы используют неорганические вещества в качестве окисляемых

субстратов - молекулярный водород (водородные бактерии), оксид углерода (карбоксидобактерии), восстановленные соединения серы (тионовые бактерии) или соединения азота (нитрифицирующие бактерии). Железоокисляющие микроорганизмы *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Gallionella ferruginea*, *Leptothrix ochracea* и др. способны окислять Fe^{2+} до Fe^{3+} в серии последовательных реакций [4, с.21]:



Сероокисляющие микроорганизмы *Beggiatoa ssp*, *Thiodendron latens*, некоторые виды *Pseudomonas* и др. восстанавливают серу до S^0 [12, с. 66-72]:



В анаэробных условиях терминальным акцептором водорода может быть нитрат, нитрит и оксиды азота (денитрифицирующие бактерии), сера и (или) сульфат (сульфатредуцирующие бактерии), углекислота (метаногены, ацетогены) и некоторые другие соединения.

В настоящее время, проводятся всесторонние исследования, связанные с жизнедеятельностью хемолитотрофов, устойчивостью к средовым факторам, способностью к адгезии. Продолжается поиск новых видов и штаммов литотрофов, обитающих в составе микрофлоры руды, кислых вод, шахтных залежей и т. д. На базе Майхигарианского Института технологии и науки (MITS) выполнено исследование зависимости типа питания *Acidithiobacillus ferrooxidans* от субстрата [5, с. 73]. Предполагалось, что при смене субстрата *A. ferrooxidans* способны проявлять свойства, как миксотрофов, так и гетеротрофов. Это предположение доказано в экспериментах с использованием комбинаций ряда субстратов для приготовления питательных сред: тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_3$) и экстракта дрожжей, глюкозы и экстракта дрожжей, глюкозы и $Na_2S_2O_3$. При анализе зависимости изменения уровня pH и скорости бактериального роста от времени культивирования установлено, что *Acidithiobacillus ferrooxidans* способны приспосабливаться к различным питательным субстратам за счет перехода на хемолитотрофный, миксотрофный и гетеротрофный тип питания [5, с. 85].

С помощью секвенирования ДНК доказано видовое разнообразие *Leptospirillum sp.*, находящихся в одном выщелачивающем растворе и идентичных по комплексу морфологических признаков и типу питания [10, с. 838-845]. Получены данные об особенностях механизмов адгезии *Leptospirillum sp.* на поверхность пирита [11, с. 22-25]. Экспериментально доказано, что данный вид микроорганизмов не способен адгезироваться на пиритах при отсутствии консорциума с *A. albertensis*. Объяснялось это тем, что сера покрывает поверхность пирита и блокирует доступ *Leptospirillum sp.* к его поверхности. *A. albertensis* относится к сероокисляющим бактериям, которые за счет своей метаболической активности очищают поверхность пирита и, тем самым, делают его доступным для адгезии *Leptospirillum sp.*

В результате анализа литературных данных можно констатировать, что для усовершенствования технологии извлечения металлов из поликомпонентных руд с помощью гетеротрофных и литотрофных микроорганизмов недостаточным является изучение свойств известных видов микроорганизмов. Необходимым становится выделение новых видов (штаммов), создание консорциумов хемолитотрофных микроорганизмов, способных

контролировать направление технологического процесса, связанного с накоплением достаточной концентрации целевого продукта в виде конкретного металла [7, с.192-194].

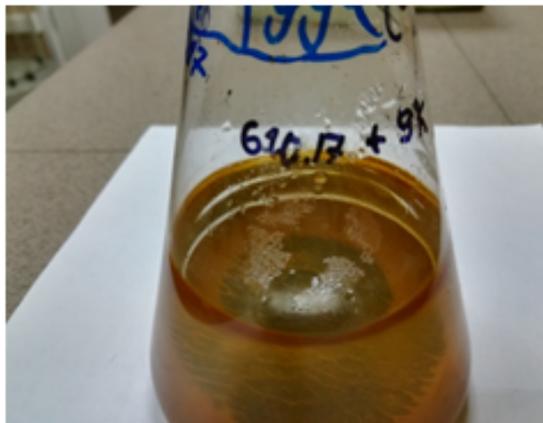
На базе курса микробиологии Петрозаводского государственного университета выполнены исследования по изучению свойств альтернативных штаммов (видов) хемолитотрофов, оптимизации условий культивирования, созданию новых консорциумов для целей биогидро-металлургии. Для этого использованы штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Pseudomonas sp.* из Коллекции микробных культур курса микробиологии ПетрГУ. *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Pseudomonas sp.* выделены в чистую культуру из поликомпонентных руд Карелии. Схема лабораторного эксперимента включала получение рабочего раствора металла при помощи эффективных микроорганизмов, выщелачивание руды раствором, бактериальное доокисление осадка руды. На протяжении 30 суток эксперимента отслеживали интенсивность роста бактерий по изменению оптической плотности культурального раствора - E, редокс потенциал среды - Eh, кислотность - pH, что соответствует стандартному регламенту анализа основных параметров технологического процесса извлечения металлов из руды. Модификация питательных сред проводилась в соответствии с пищевыми потребностями выделенных групп микроорганизмов. В качестве базовых сред использована среда Сильвермана - Лундгрена (9К) для *Acidithiobacillus ferrooxidans* [13, с. 642-647] и среда Кинг В для культивирования *Pseudomonas sp.* [3, с. 106; 2, с. 93]. В качестве источника азота использовали соединения органической и неорганической природы, источника углерода (для *Pseudomonas*) - сахара и многоатомные спирты.

Исходные значения основных параметров эксперимента по выявлению оптимальной концентрации компонентов питательной среды КингВ для *Pseudomonas* составили: pH - 6,71, Eh - 24,1, E - 0,1. При изучении динамики численности *Pseudomonas* в зависимости от разных источников а и углерода установлено, что все штаммы псевдомонад активно размножались в присутствии глюкозы и пептона, как доминирующих источников углерода и азота. В присутствии глюкозы оптическая плотность культуральной смеси с *Pseudomonas sp.* достигала 0,980, а в присутствии пептона - 0,406. Существенно повлияло на увеличение оптической плотности *Pseudomonas sp.* добавление в питательные среды пирролидина, именно его присутствие вызывало увеличение значений E до 1,027 во всех вариантах опыта. В присутствии дрожжевого экстракта численность клеток псевдомонад резко снижалась, вплоть до полного ингибирования роста культуры в стабильных условиях термостатирования.

По выявлению оптимальной концентрации компонентов питательной среды 9К для *Acidithiobacillus ferrooxidans* первоначальные параметры среды составили: pH - 3,71, Eh - 64,9, E - 0,1. При культивировании *Acidithiobacillus ferrooxidans* на субстратах с различными комбинациями источников сульфатов, фосфатов и соединений Ca, максимальная оптическая плотность 1,024 установлена на средах с высоким содержанием $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ до 44 г/л. Минимальная оптическая плотность 0,610 обнаружена при культивировании на среде с K_2HPO_4 - Сильвермана - Лундгрена (9К). Увеличение концентрации $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ в питательной среде вызывало постоянную стимуляцию роста численности клеток. При замене $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ на $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ численность *Acidithiobacillus ferrooxidans* во всех вариантах эксперимента снижалась до $1104 \pm 1,20$ КОЕ/мл.

В течении 30 суток эксперимента в руде, инокулированной штаммами *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Pseudomonas sp.* кислотность среды уже к 1 суткам эксперимента составила 5,69, к 10 суткам снизилась до 5,08, к 20 - до 3,16, а к концу эксперимента - до 2,57. При этом, за 30 суток эксперимента, количество железа в растворе увеличилось от 1,84 до 34,23 %. Примечательно, что уже в первые сутки эксперимента в растворах, инокулированных штаммами *Acidithiobacillus* и *Pseudomonas* стали появляться первые признаки интенсивного окисления: на поверхности среды появилась пленка, пристеночный и придонный культуральный рост характерного цвета восстановленного железа (рис. 1 а.). К 10 суткам опыта культуральный раствор стал мутным и приобрел выраженный коричнево-бурый цвет. В пробирочном варианте опыта, где руда и среда 9К заражались отдельными штаммами ацидофильных бактерий, на данном этапе эксперимента в пробирках образовывались пузырьки газа и хлопья восстановленного железа (рис. 1 б.). Все использованные в эксперименте штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* к концу эксперимента вызывали сильное помутнение среды, почти в каждом варианте наблюдались специфические культуральные изменения: появление стойкой био пленки, хлопьевидного осадка и наличие пристеночного

роста в виде бурого налета (рис. 1 в.). При культивировании ряда штаммов *Acidithiobacillus* на плотных средах, к 30 суткам эксперименты на поверхности среды были зарегистрированы конгломераты восстановленного железа бурого цвета (рис. 1 д.). При микроскопическом анализе опытного культурального раствора были обнаружены одиночные палочки грамотрицательного типа (рис. 1 г.). Кроме того, численность бактерий в течении эксперимента постоянно увеличивалась от $3 \cdot 10^4$ КОЕ/мл после 1 суток опыта до $18 \cdot 10^7$ КОЕ/мл - к завершению исследований.



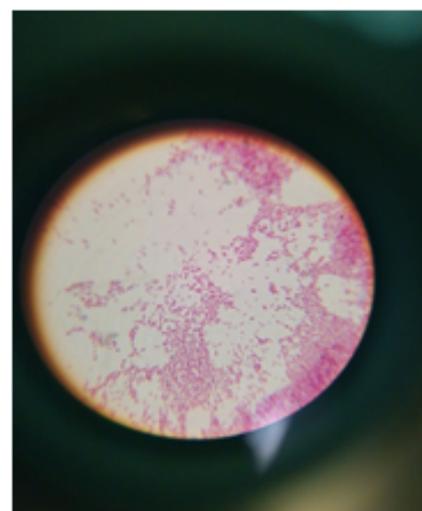
а.



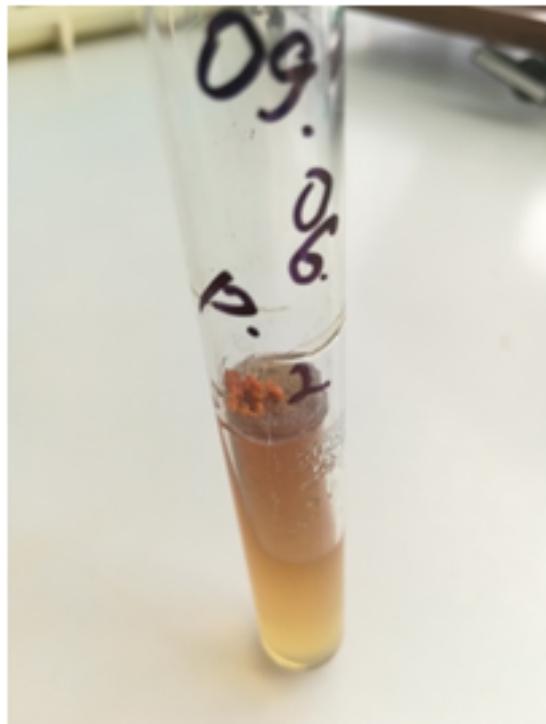
б.



в.



г.



Д.

Рисунок 1. Этапы эксперимента по испытанию культуральной смеси на основе консорциума гетеротрофных и литотрофных микроорганизмов

Таким образом, по результатам выполненных исследований получены новые данные об особенностях биотехнологии извлечения металлов из поликомпонентных руд. Анализ экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что модификация компонентов питательной среды и условий культивирования для выделенных штаммов родов *Acidithiobacillus* и *Pseudomonas* позволяет существенно оптимизировать процессы извлечения металлов из низкосортной руды.

Список литературы:

1. Волова Т.Г. Биотехнология, Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999.
2. Сиволодский Е.П. Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флюоресцеина бактериями рода *Pseudomonas*. Клиническая лабораторная диагностика, 2012. № 10.
3. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода, Киев: Наукова думка, 1990.
4. Ageeva, S.N., Kondrateva, T.F., Karavaiko, G.I., Phenotypic characteristics of Thiobacillus ferrooxidans strains. Mikrobiologiya, 2001. Vol. 70.
5. Amiya Kumar Patel. Isolation and Characterization of Thiobacillus ferrooxidans from Coal Acid Mine Drainage. International Journal of Applied Agricultural Research, 2010. Vol. 5(1).
6. Krebs W. Microbial recovery of metal from solids. FEMS Microbiology Reviews, 1997. № 12.
7. Microbial Leaching of Metals / Helmut Brandl, - Zürich, Switzerland, 2007.
8. Mishra U.K., Parikh P., Wu Y.F. An overview of device operation and applications. Proceedings of

the IEEE, 2002. Vol. 90. № 6.

9. Muhammad S.K., Igrar A.K., Debmalya B. Applied molecular biotechnology, 2016.

10. Nicolette J. Coram, Douglas E. Rawlings. Molecular Relationship between Two Groups of the Genus *Leptospirillum* and the Finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. Dominates South African Commercial Biooxidation Tanks That Operate at 40°C. Applied and environmental microbiology, 2002. № 2.

11. Vardanyan A.K., Vardanyan N.S., Markosyan L.M. Peculiarities of Adhesion and Bioleaching of Pyrite by New Isolated *Leptospirillum*. Universal Journal of Microbiology Research, 2013. Vol. 1(2).

12. Schmidt T.M., Arieli B., Cohen Y., Padan E., Strohl W.R. Sulfur Metabolism in *Beggiatoa alba*. Journal of bacteriology, 1987. № 12.

13. Silverman M.P., Lundgren D.G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. Bacteriol, 1959. Vol. 77.