

УДК 581.52;550.72

ПРОВЕДЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ**¹Канаев А.Т., ²Семенченко Г.В., ³Канаева З.К., ¹Маденова П.С.**¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, e-mail: kanaeva1992@mail.ru;²Институт микробиологии и вирусологии Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы;³Казахский национальный технический университет им. К.И. Сатпаева, Алматы

Из образцов шахтных вод и пород рудного тела с повышенным количеством тионовых бактерий были получены накопительные культуры, из которых выделены чистые культуры тионовых бактерий. Изучены их физиологические свойства, важные с точки зрения биотехнологии – определены оптимальная и предельная температура роста. Предварительная идентификация выделенных бактерий по способности окислять закисное железо и соединения серы, а также аэробному автотрофному метаболизму позволила отнести их к виду *Acidithiobacillus ferrooxidans*. При обеспечении условием культура окисляла за сутки практически все железо, содержащееся в среде с повышением значений окислительно-восстановительного потенциала до 700-760 мВ. Результаты, полученные в данной работе, позволяют сделать вывод о приспособленности вида *A. ferrooxidans* к широкому диапазону условий.

Ключевые слова: биовыщелачивание сульфидных руд, ацидофильные микроорганизмы, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

CARRYING OUT PRIMARY IDENTIFICATION OF THE ALLOCATED STRAINS OF HEMOLITOTROFN Y BACTERIA**¹Kanayev A.T., ²Semenchenko G.V., ³Kanayeva Z.K., ¹Madenova P.C.**¹Kazakh National University after named al-Farabi, Almaty;²Institute of microbiology and virology Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty;³Kazakh National Technical University after named K. Satpayev, Almaty

Samples from mine waters and rocks of the ore thing with an increased number thiobacteria were obtained enrichment cultures from which pure cultures isolated thiobacteria. Been studied their physiological properties that are important from the point of view of biotechnology – and to determine the optimal temperature limit growth. Preliminary identification of the isolated bacteria are able to oxidize ferrous iron and sulfur compounds, as well as aerobic autotrophic metabolism allowed to carry them to the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. While ensuring a culture of oxidized per day almost all the iron contained in a medium with a higher redox potential to 700-760 mV. The results obtained in this study suggest to wide range of conditions adaptation species of *A. ferrooxidans*.

Keywords: bioleaching of sulphide ores, acidophilic microorganisms, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Биовыщелачивание является одной из передовых технологий переработки золотосодержащих руд, к преимуществам которой можно отнести малоотходность и экологическую чистоту, поскольку газ и пыль в атмосферу не выделяются [1]. Технология биовыщелачивания проста в применении и высокоэффективна, особенно для переработки руд с низким содержанием драгоценных металлов. Она позволяет экономить материалы и энергию и в будущем может заменить такие способы переработки минерального сырья, как обжиг, автоклавное выщелачивание, металлургическая плавка, которые загрязняют окружающую среду ядовитыми газами и токсичными химикатами. В практике биовыщелачивания используют различные микроорганизмы в зависимости от поставленных целей. Наибольшей популярностью пользуются ацидофильные тионовые бактерии из рода *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Материалы и методы исследования

Изучение количественного и качественного состава микрофлоры месторождения Бакырчик проводили по общепринятым методикам. Пробы рудных вод при обследовании отбирались стерильно, в соответствии с имеющимися руководствами. Подсчет количества микроорганизмов проводили методом предельных разведений испытуемых вод или болтушек на элективных средах в двух-трехкратных повторностях.

Получение накопительной культуры для выделения культуры в колбы Эрленмейра на 100мл вносили 30мл стерильной среды Сильвермана и Лундгрена 9К и пробы рудничной воды или руды из месторождений сульфидных руд, затем инкубируют при 30°C до появления роста. О развитии бактерии судили по появлению бурой окраски среды, вызванной образованием соединения трехвалентного железа.

Для выделения культуры *A. ferrooxidans* в колбу Эрленмейера емкостью 250 мл вносили среду Сильвермана и Лундгрена 9К в объеме 150 мл. Затем добавляли пробы руды из месторождений сульфидных руд, инкубировали при 30°C до появления роста для выделения штаммов бактерии, активных в окислении сульфидных минералов и устойчивых к ионам тяжелых металлов, использовали также сульфидные минералы.

Для количественного учета *A.ferrooxidans*, содержащихся в 1 г использовали метод кратных разведений. При исследовании рудного субстрата навеску измельчали в гомогенизаторе и растирали в ступке и готовили исходную взвесь в разведении 1:10. Из полученной взвеси или исходного жидкого материала готовили ряд последующих разведений с таким расчетом чтобы при посеве двух последних разведений на чашке Петри агаре выросло от 50 до 300 колоний.

Определение Fe^{+2} и Fe^{+3} проводилось объемным трилонометрическим методом в пробах, основанным на образовании комплекса трехвалентного железа с сульфосалициловой кислотой, который окрашивается в малиновый цвет. Содержание железа в растворах варьировало в диапазоне 0,1-10 г/дм³.

Учет *Th.thiooxidans* вели по появлению не исчезающей мути и оседанию серы, по образованию пленки серы, подкислению среды и другим специфическим признакам на среде Ваксамана (г/л): $(NH_4)_2SO_4-3,0$; $KH_2PO_4-3,0$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O-0,5$; $CaCl_2 \cdot 6H_2O-0,25$; $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O-3,0$; серный цвет (S^0) – 10; $H_2O-1,0$ л, pH 4,0.

Для количественного учета аммонификаторов использовали пептонную воду (г/дм³ водопроводной воды): пептон – 10; NaCl – 0,5.

Для подсчета азотфиксирующих бактерий производили высев 0,25 г пробу руды на среду Эшби. О наличии азотобактерий в исследуемом материале судили по образованию характерных колоний вокруг песчинок. Производили подсчет количества колоний на чашке в пересчете на 1 г руды. Сапрофитные бактерии учитывали на мясепептонном агаре.

Результаты исследования и их обсуждение

Первичная идентификация была осуществлена на основании определителя Берги, в котором тионовые бактерии относятся к организмам, метаболизирующим серу и ее соединения и отнесены к родам с неясным систематическим положением, представленным 6 родами и 17 видами [2].

При идентификации оценивали такие признаки как используемый источник энергии, наличие капель серы в клетке или среде, форма клетки, наличие жгутиков. Выделенные бактерии были представлены палочковидными клетками, размножались путем поперечного деления, двигались при помощи единственного полярного жгутика. Окраска клеток по Грамму у всех выделенных штаммов была отрицательной. Бактерии энергично окисляли соединения закисного железа в условиях экстремально кислых значений pH (1,5). Учитывая их распространение в пробах руды месторождения с содержанием пирита (FeS_2), источником энергии для этих бактерий также служили сульфиды. Диагностические признаки приведены в таблице 1.

Рост культур на лабораторных средах отмечен в поверхностных горизонтах культуральной среды, на основании чего был сделан

вывод об облигатно автотрофном типе метаболизма. В процессе длительного культивирования выделенных бактерий происходила иммобилизация клеток на стенках сосудов, в результате чего их активность по окислению двухвалентного железа возрастала. Отмечено накопление серы в нижних горизонтах культуральной жидкости в виде светло-желтых отложений. Встречались в шахтных водах и рудном теле месторождения Бакырчик в пробах со слабокислой реакцией среды. В процессе пересевов на среду Сильвермана и Лундгрена 9К бактерии быстро адаптировались к лабораторному составу среды. на твердых средах с закисным железом вырастали мелкие колонии с ровными краями, с коричневыми вкраплениями гидрата окиси железа в центре. Колонии легко снимались с агара, однако плохо поддавались пересевам на твердые среды, поэтому все культуры поддерживали на жидкой среде Сильвермана и Лундгрена 9К. Поскольку источником углерода является CO_2 , то для поддержания культур необходимым условием являлось насыщение среды воздухом, а не чистым кислородом. При обеспечении перечисленных условий культура окисляла за сутки практически все железо, содержащееся в среде с повышением значений окислительно-восстановительного потенциала до 700-760 мВ.

По совокупности перечисленных признаков все шесть культур бактерий были отнесены к виду *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Отсутствие видового разнообразия выделенных штаммов можно объяснить сравнительно небольшим набором диагностических признаков, рекомендованных в определителе. В последние годы список видов тионовых бактерий значительно пополнился в результате использования молекулярно-генетической идентификации бактерий на основании анализа нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена. Сообщается о новых видах *Leptospirillum ferriphilum*, выделенных из дренажных вод, а также о важной роли *Ferroplasma* spp. при кучном выщелачивании упорных руд [3,5]. Интерес представляют термофильные ацидофилы *Acidianus brierleyi* (archaeron), выщелачивающие медь из энаргита (Cu_2AsS_4) [4]. В связи с этим после детального изучения свойств выделенных штаммов и подтверждения их положительно-го влияния на выщелачивание благородных металлов из упорной руды месторождения Бакырчик будет проведена молекулярно-генетическая идентификация бактерий.

Идентификационные признаки выделенных ацидофильных бактерий

Штаммы	Идентификационные признаки									
	Автотрофность	Окисление соединений 2-валентного железа или серы	Отношение к кислороду	Фиксация CO ₂	Форма и размеры клетки, мкм	Наличие жгутиков	Подвижность	Наличие капелек серы в клетке	Оптимальная температура °С	Оптимальный pH
1	+	+	Облигатный аэроб	+	Палочки (0,5-0,8) x (0,9-1,4)	+	+	-	28-30	1,5-2,0
8	+	+	Облигатный аэроб	+	Палочки (0,5 x (0,9-1,4)	+	+	-	28-30	1,5-2,0
12	+	+	Облигатный аэроб	+	Палочки (0,5 x (0,9-1,4)	+	+	-	28-30	1,5-2,0
13	+	+	Облигатный аэроб	+	Палочки (0,5 x (0,9-1,4)	+	+	-	28-30	1,5-2,0
14	+	+	Облигатный аэроб	+	Палочки (0,5 x (0,9-1,4)	+	+	-	28-30	1,5-2,0
16	+	+	Облигатный аэроб	+	Палочки (0,5 x (0,9-1,4)	+	+	-	28-30	1,5-2,0

Заключение

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

Из образцов шахтных вод и пород рудного тела с повышенным количеством тионовых бактерий были получены накопительные культуры, из которых выделено 6 чистых культур тионовых бактерий. Предварительная идентификация выделенных бактерий по способности окислять закисное железо и соединения серы, а также аэробному автотрофному метаболизму позволила отнести их к виду *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Применение бактериального метода выщелачивания цветных металлов из забалансовых руд. – М.: Наука, 1968. – 100 с.

2. Bergey's manual of determinative bacteriology. Eighth Edition. John G. Holt Editor. The William and Wilrins Company. Baltimore.

3. Yi Liu, Huaqun Yin, Qiaoyi Tan, Yili Liang, Xueduan Liu / Isolation and identification of four strains of *Leptospirillum ferriphilum* from four acid mine drainage sites and their roles in bioleaching of pyrite / Biohydrometallurgy: Biotech key to unlock mineral resources value: Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgical Symposium. Central South University Press, Changsha, China. 2011. Vol. 2. P. 651–655.

4. Keiko Sasaki, Koichiro Takatsugi, Tsuyoshi Hirajima Bioleaching of Cu from enargite using *Acidianus brierleyi* with concomitant passivation of As / Biohydrometallurgy: Biotech key to unlock mineral resources value: Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgical Symposium. Central South University Press, Changsha, China. 2011. Vol. 2. P. 123–125.

5. Harrison Susan T.L., Becker Megan, van Hille Robert P. In situ investigation and visualization of microbial attachment and colonization in a heap bioleach environment: The novel biofilm reactor // Miner. Eng. 2010. Vol. 23, №6. P. 486–491.