УДК 581.52;550.72

МИКРОБОЦЕНОЗЫ ЗОЛОТО-МЫШЬЯКОВИСТОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ БАКЫРЧИК И ИХ РОЛЬ В ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ

[1]Канаева З.К., [2]Канаев А.Т., [3]Семенченко Г.В.

[1]Казахский национальный технический университет им. К.И. Сатпаева, Алматы;
[2]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы;
[3]Институт микробиологии и вирусологии Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, e-mail: kanaeva1992@mail.ru

Способность ацидофильных микроорганизмов к окислению сульфидных минералов сейчас широко используется в биогидрометаллургических технологиях для получения из сульфидных руд цветных и благородных металлов. Объектами исследований являлись аборигенные штаммы хемолитотрофных микроорганизмов, распространенные в шахтных водах и рудном теле месторождения Бакырчик. В результате выполненных исследований изучены ареалы и численность хемолитотрофных микроорганизмов, осуществляющих круговорот азота, окисление сульфидных минералов в образцах шахтных вод и характерных породах рудного тела месторождения Бакырчик. Установлено, что численность аммонифицирующих бактерий в шахтных водах варьировала в пределах 10^1–10^4 кл./мл, A. ferrooxidans и Th. thiooxidans – 10–10^3 кл./мл, сапрофитных бактерий – 10^2–10^7 кл./мл. Ареалы распространения бактерий определялись pH воды.

Ключевые слова: хемолитотрофные микроорганизмы, накопительные культуры, выделение, сапрофитные бактерии

MICROBIOCENOSIS GOLD-ARSENIC BIRTHPLACE OF BAKYRCHIK AND THEIR ROLE IN THE REDOX PROCESSES

[1]Kanayeva Z.K., [2]Kanayev A.T., [3]Semenchenko G.V.

[1]Kazakh National Technical University after named K. Satpayev, Almaty;
[2]Kazakh National University after named al-Farabi, Almaty;
[3]Institute of microbiology and virology Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, e-mail: kanaeva1992@mail.ru

The ability of acidophilic microorganisms oxidation of sulphide minerals are now widely used in biohydrometallurgical technologies for sulfide ores of nonferrous and precious metals. Object of research is native strains of microorganisms Chemolithotrophic prevalent in mine waters and orebody deposit Bakyrchik. The result of the research studied habitats and abundance Chemolithotrophic microorganisms carrying the nitrogen cycle, the oxidation of sulfide minerals in mine water samples and characteristic rocks of the ore body deposit Bakyrchik. It has been established, that the number of bacteria in ammonifying mine waters ranged 10^1–10^4 кл./мл, A. ferrooxidans and Th. thiooxidans – 10–10^3 кл./мл, saprophytic bacteria – 10^2–10^7 кл./мл. Areas of distribution of bacteria were determined pH water.

Keywords: chemolithotrophic microorganisms accumulating culture, isolation, saprophytic bacteria

Второе место по величине запасов занимает месторождение Бакырчик, расположенное на северо-востоке Казахстана (приблизительно в 100 км от города Семипалатинска). Его запасы составляют 326 т при среднем содержании золота 6,9 г/т. Разработка месторождения затруднена из-за высокого содержание в руде углерода, а также токсичного мышьяка, что создает угрозу загрязнения окружающей среды. Эта проблема может быть решена путем увеличения капитальных расходов, которые, впрочем, будут оправданны, учитывая высокие цены на золото. Месторождение интересно для отработки с применением технологии бактериального выщелачивания флотоконцентратов.

Использование ацидофильных микроорганизмов в биогидрометаллургии делает изучение их биоразнообразия актуальным для микробиологии. В частности, изучение распространения в экосистемах месторождений сульфидных руд штаммов *A. Ferrooxidans и* их физиологических свойств на настоящий момент привлекает внимание исследователей различных стран [3, 6].

Материалы и методы исследования

Изучение количественного и качественного состава микрофлоры месторождения Бакырчик проводили по общепринятым методикам. Пробы рудных вод при обследованиях 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.

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.

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

Для выделения культуру *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 °С до появления роста. Для выделения штаммов бактерии, активных в окислении сульфидных минералов и устойчивых к ионам тяжелых металлов, использовали также сульфидные минералы.

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/дм^3 [2].

Учет *Th.thiooxidans* вели по появлению неисчезающей мути и оседанию серы, по образованию пленки серы, подкислению среды и другим специфическим признакам на среде Ваксмана (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^o) – 10,0; H_2O – 1,0 л; pH 4,0 [1].

Для количественного учета аммонификаторов использовали пептонную воду (г/дм^3 водопроводной воды): пептон – 10, NaCl – 0,5.

Для определения количества нитрификаторов I и II фазы была использована элективная минеральная среда Виноградского (г/л водопроводной воды): $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; $FeSO_4$ – 0,4; NaCl – 2,0, в избыточном количестве $CaCO_3$ [5,7].

Для учета денитрифицирующих бактерий применяли элективную среду Гильтая (г/л водопроводной воды): цитрат натрия или калия трехзамещенный – 5,0; KNO_3 – 2,0; аспарагин – 1,0; KH_2PO4 – 2,0; $MgSO_4$ – 2,0; $CaCl_2$ – 0,2; $FeCl_3$ – следы; агар – 18 % [4].

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 мясопептонном агаре.

Результаты исследования и их обсуждение

Распределение бактерий, участвующих в круговороте азота в шахтных водах и рудном теле золото-мышьяковистого месторождения Бакырчик

В шахтных водах выбранных горизонтов было исследовано распределение аммонифицирующих бактерий. Известно, аммонификаторы – это физиологическая группа бактерий**,** использующих белки и аминокислоты в качестве энергетических субстратов, что сопровождается выделением в среду аммиака. Среди аммонификаторов встречаются как спорообразующие формы *(Bacillus),* так и микроорганизмы, не образующие спор *(Pseudomonas, Micrococcus, Arthrobacter, Mycobacterium, Proteus).*

Данные физико-химических характеристик указывают, что на участках, достаточно широко представленных в районе Бакырчикского месторождения рудопроявлений и зон рассеянной золото-сульфидной минерализации, трещинные воды за счет растворения окисляющихся сульфидов обогащаются сульфатами, подвижными формами мышьяка, железа, марганца, а также незначительными количествами меди, свинца, цинка, кадмия и других микроэлементов. Минерализация трещинных вод может возрасти до 0,7–1 г/дм^3 с переходом типа воды до сульфатно – натриевого по ионному составу. В связи с малым количеством сульфидов в водовмещающих породах и ограниченностью участков развития зон рудной минерализации, в сравнении с общей площадью распространения водоносного горизонта, качество трещинных вод участка остается высоким.

Численность аммонифицирующих бактерий колебалась в пределах 10^1–10^4 кл./мл (рис. 1). Наименьшая численность бактерий была отмечена в шахтной воде горизонтов 50 и 290, где вода имеет слабокислую (pH 5,8) среду. На этом горизонте трещинные воды Бакырчикского рудника относятся к грунтовым водам зоны выщелачивания. Гидрохимические условия в водоносном горизонте определяются естественными природными факторами – содержанием водорастворимых солей в водовмещающих породах (химико-минералогическим составом), их проницаемостью и скоростью фильтрации подземных вод.

Ионно-солевой состав шахтных вод горизонтов 90, 330 формируется за счет процессов растворения и выщелачивания минеральной массы горных пород (продуктов гидролитического разложения силикатов, окисления сульфидов и углекислотного выветривания карбонатов). Вследствие интенсивного водообмена в водоносном горизонте формируются пресные маломинерализованные воды, гидрокарбонатные кальциево-натриевые по ионному составу, нейтральные или слабощелочные по величине pH с сухим остатком 0,2–0,4 г/дм^3. Количество клеток аммонифицирующих бактерий в такой водной среде доходит до 10^4 кл/мл. В воде остальных горизонтов количество аммонификаторов колебалось в пределах 10^2–10^3 кл./мл. В период обследования воды имели преимущественно нейтральную и слабощелочную реакцию (pH 7,5–8,2).

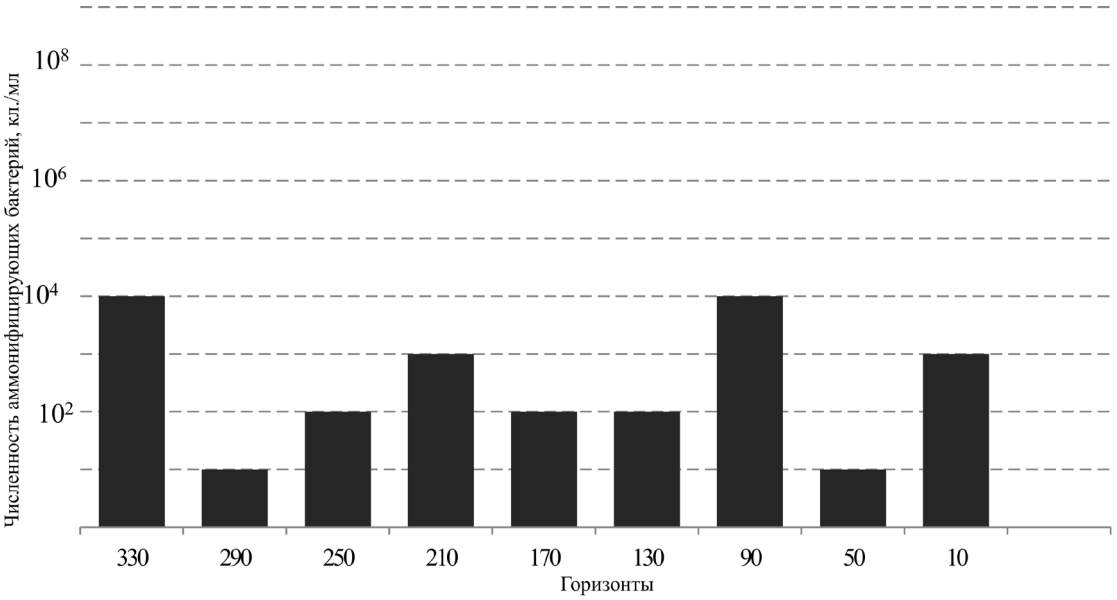

Рис. 1. Численность аммонифицирующих бактерий в шахтных водах

Таким образом, процесс *аммонификации в* шахтных водах горизонтов золото-мышьяковистого месторождения сопровождается подщелачиванием среды. В результате аминокислоты дезаминируются с образованием органических кислот (пирувата, ацетата и других интермедиатов ЦТК) и в таком виде входят в цикл Кребса для полного окисления и получения клеткой энергии.

Анализ физиологических групп бактерий участвующих в круговороте азота в различных типах пород, слагающих рудное тело, представлен на рис. 2. Учитывали аммонификаторы, нитрификаторы 1-й и 2-й фазы, денитрификаторы и азотфиксирующие микроорганизмы. В общем, численность представителей этих групп бактерий варьировала в пределах 10^2–10^7 КОЕ/г.

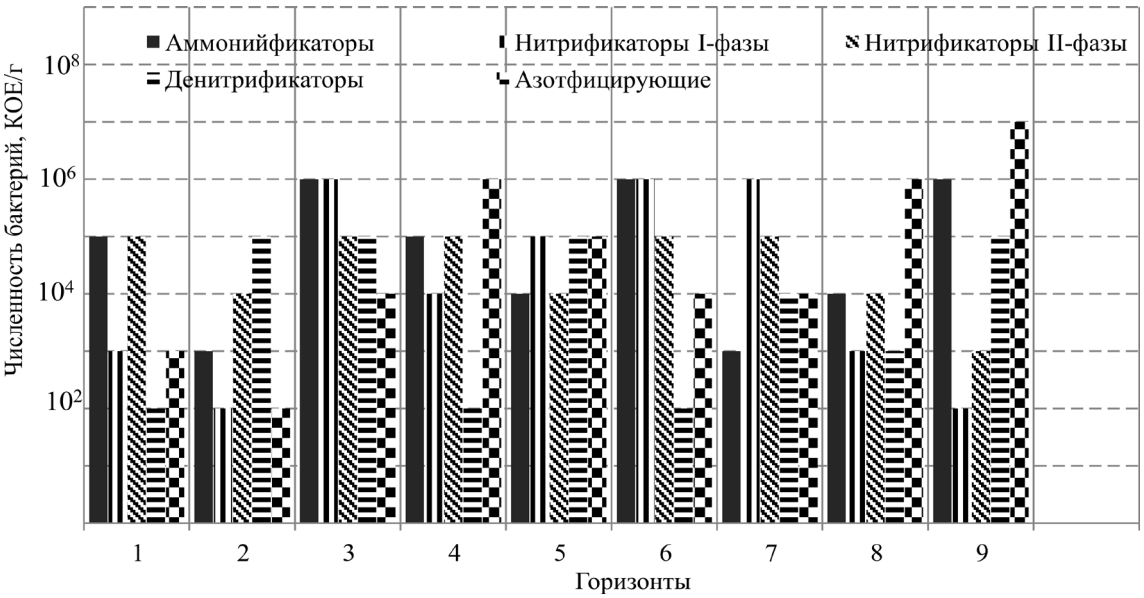

Рис. 2. Численность бактерий, участвующих в круговороте азота в рудном теле

Наибольшее количество аммонифицирующих бактерий было отмечено в пробах песчаника верхней алевролито-песчаниковой толщи (3), в кремнистых образованиях (6) и в углисто-глинистого аргиллита (9) и составляло 10^6 КОЕ/г. В терригенно-осадочных

породах (1) и рудах из горизонта кызыловской зоны смятия (4) количество аммонификаторов доходило до 10^5 КОЕ/г. В остальных исследуемых пробах их численность варьировала в интервале 10^3 и 10^4 КОЕ/г.

Как известно, нитрификаторы первой фазы осуществляют окисление аммония до азотистой кислоты ($NH_4^+ \rightarrow N0_2^-$), второй фазы – перевод азотистой кислоты в азотную ($N0_2^- \rightarrow N0_3^-$). Максимальное количество нитрификаторов I – фазы наблюдается в пробах № 3, 6, 7 – 10^6 КОЕ/г. В остальных пробах их количество варьировало в пределах 10^2–10^4 КОЕ/г. Максимальное количество нитрификаторов II фазы отмечалось в пробах № 1, 3, 4, 6, 7 в количестве 10^5 КОЕ/г. В остальных пробах составляет 10^3–10^4 КОЕ/г.

Учитывали также денитрифицирующие бактерии, восстанавливающие нитраты до молекулярного азота, в число которых входили как восстанавливающие нитраты до нитритов, так и доводящие восстановление до элементарного азота. Максимально количество денитрифицирующих бактерий было отмечено в пробах руды № 2, 3, 5, 9 и составляло 10^5 КОЕ/г. В остальных образцах их количество колебалось в пределах 10^2–10^4 КОЕ/г.

Численность азотфиксирующих бактерий, обладающих способностью усваивать молекулярный азот воздуха и переводить его в доступные для организма формы, варьировала в пределах 10^2–10^7 КОЕ/г. Наиболее представлена эта группа микроорганизмов была в образцах № 4, 8, 9 – 10^6–10^7 КОЕ/г). Наименьшее их количество отмечено в пробе № 2–10^2 КОЕ/г.

Таким образом, судя по полученным данным, наиболее интенсивно процессы круговорота азота осуществляются в пробах песчаника верхней алевролито-песчаниковой толщи (3), в кремнистых образованиях (6) и углисто-глинистого аргиллита и алевролита (9) с преобладанием процессов образования и утилизации аммиака до молекулярного азота. В последней пробе отмечена также активная азотфиксация. Обнаружение основных групп микроорганизмов практически во всех исследуемых образцах говорит об активном участии микроорганизмов в превращениях разнообразных органических веществ в шахтных водах и рудном теле Бакырчикского месторождения.

Выводы

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

1. Микробиологическое обследование касалось распределения и численности микроорганизмов, участвующих в круговороте азота, окисления железа и серы, а также обычных сапрофитных бактерий. Установлено, что численность аммонифицирующих бактерий в шахтных водах варьировала в пределах 10^1–10^4 кл./мл, *A. ferrooxidans* и *Th. thiooxidans* – 10–10^3 кл./мл, сапрофитных бактерий – 10^2–10^7 кл./мл. Ареалы распространения бактерий определялись pH воды. Тионовые бактерии были распространены в слабокислой воде (pH = 5,0), сапрофитные – в нейтральной и слабощелочной воде.

2. Численность аммонифицирующих бактерий в рудном теле варьировала в интервале 10^3–10^6 КОЕ/г, нитрификаторов 1-й фазы – 10^2–10^6 КОЕ/г, нитрификаторов 2-й фазы – 10^3–10^5 КОЕ/г, денитрификаторов – 10^2–10^5 КОЕ/г, азотфиксирующих и сапрофитных бактерий – 10^2–10^7 КОЕ/г, *A. ferrooxidans* и *Th. thiooxidans* – 10–10^3 кл./г руды. Ареалы микроорганизмов, участвующих в круговороте азота определялись песчаниками верхней алевролито-песчаниковой толщи, кремнистыми образованиями и углисто-глинистым аргиллитом. Наибольшее количество *A. ferrooxidans* было приурочено к осадочным и углисто-глинистым породам. Вскрышная глинистая порода, серые песчаники, пепловые туфы и кремнистые образования содержали наибольшее количество *Th. Thiooxidans*. Образцы пород с находками тионовых бактерий имели слабокислую реакцию.

Список литературы

1. Биогидрометаллургическая переработка сульфидных руд // Цветные металлы. – 2004. –№ 8.

2. Живаева А.Б., Башлыкова Т.В. Бактериальное выщелачивание силикатных никелевых руд //Цветные металлы. –2007. – № 3.

3. Канаев А.Т., Канаева З.К. Биогеотехнология техногенных экосистем казахстана. – монография, LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH δ Co KG, – с. 347. – Germany, –2012.

4. Лодейщиков В.В. Переработка никельсодержащих руд методом кучного бактериального выщелачивания // М.: Золотодобыча. – 2009. – № 131. – С. 10–15.

5. Marsden J.O., Wilmot J.C., Smith R.J. Medium-temperature pressure leaching of copper concentrates – Part IV: Application at Morenci, Arizona // Journal of Minerals and Metallurgical processing. 2007. –Vol.14, № 4.

6. *Mohseni S., Marzban A.R., Sepehr S., Hosseinkhani S., Karkhaneh M., Azimi A.* Investigation of some heavy metals toxicity for indigenous Acidithiobacillusferrooxidans isolated from Sarcheshmeh copper mine // Jundishapur J Microbiol. – 2011. – V. 4. – P. 159–166.

7. Sadowski Z., Jazdyk E., Karas H. Bioleaching of copper ore flotation concentrates //Journal of Minerals Engineering Poland. 2002. – Vol. 16.