

Влияние концентрации ионов двухвалентного железа на активность железooksисляющих микроорганизмов

А. Г. Булаев^{1,2*}, Е. А. Мельникова^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Россия, 119234 г. Москва, Ленинские горы, 1, 12.

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН
Россия, 119071 г. Москва, Ленинский проспект, 33, 2.

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина
Россия, 109472 г. Москва, улица Академика Скрябина, 23.

*Email: bulaev.inmi@yandex.ru

Был исследован эффект концентрации ионов двухвалентного железа на активность ацидофильных железooksисляющих микроорганизмов. Было показано, что высокие концентрации ионов железа ингибировали все исследованные штаммы, однако наиболее резистентные из них способны практически полностью окислять до 500 мМ двухвалентного железа в среде. Полученные результаты имеют значение для развития биогидрометаллургических технологий, основанных на процессе высокотемпературного выщелачивания трехвалентного железа, так как позволяют оценить пределы устойчивости железooksисляющих микроорганизмов различных групп к ионам Fe²⁺.

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы, биогидрометаллургия, железooksисляющие микроорганизмы.

В настоящее время биогидрометаллургические технологии широко применяются для переработки сульфидных руд и концентратов [1]. Биогидрометаллургия позволяет перерабатывать сырье, переработка которого с помощью других технологий связана с экологическими или экономическими рисками. Усилия исследователей направлены на модернизацию существующих технологий и создание новых технологических схем, позволяющих вовлекать в переработку новые типы сырья [1]. Одной из перспективных технологических схем является так называемое двухстадийное биовыщелачивание [2], которое включает два этапа: окислительное выщелачивание различного сырья сернокислыми растворами трехвалентного железа (сильного окислителя) при высокой температуре (70–90°C) и биоокисление образовавшегося двухвалентного железа микроорганизмами (регенерация окислителя), которое позволяет повторно использовать растворы железа для выщелачивания. Показано, что такая технология может быть использована для выщелачивания цветных металлов из медеплавильных шлаков [2–4], отходов утилизации электроники [5] и сульфидных концентратов [6, 7]. Однако существует ряд нерешенных проблем, которые затрудняют ее применение на практике. Основной проблемой является недостаточная скорость регенерация окислителя. Было

показано, что наиболее эффективно выщелачивание трехвалентным железом при температурах 40–80°C [2–7]. При этом большая часть исследований закономерностей биоокисления железа выполнена при температурах 25–37°C [8, 9]. Данных о возможности проведения процессов регенерации железа при температурах выше 40°C в литературе мало. Также большая часть исследований окисления двухвалентного железа микроорганизмами проводится с использованием растворов с невысокими концентрациями железа и не может дать реального представления о динамике окисления железа в продуктивных растворах. Таким образом, необходимым является проведение исследований окисления железа умеренными термофилами, так как регенерация окислителя именно при высоких температурах является наиболее целесообразной, и в растворах с высокими концентрациями Fe^{2+} .

Целью данной работы было исследование процесса окисления двухвалентного железа в средах с различными концентрациями Fe^{2+} умеренно-термофильными микроорганизмами.

Объектами исследования были умеренно-термофильные штаммы *S. thermosulfidooxidans* SH 10–1, *S. thermotolerans* Kr1^T (DSM 17362^T), *A. aeolicum* V1^T (DSM-18409^T), *A. cupricumulans* BH2^T (DSM- 16651^T), а также мезофильный штамм *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFBK. Для экспериментов была использована жидкая питательная среда, содержащая минеральные соли (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.2, KCl – 0.1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, K_2HPO_4 – 0.2, а также 0.02% (м/об.) дрожжевого экстракта (ДЭ), так как исследуемые умеренно-термофильные штаммы нуждаются в органическом источнике углерода. Для экспериментов с *A. ferrooxidans* TFBK использовали среду без добавления ДЭ. Эксперименты проводили при температурах и pH, близких к оптимальным для исследуемых штаммов: 50°C – для *A. cupricumulans* BH2^T и *S. thermosulfidooxidans* SH 10–1, 40°C – для *A. aeolicum* V1^T и *S. thermotolerans* Kr1^T, 30°C – для *A. ferrooxidans* TFBK и значениях pH около 1 – для *A. cupricumulans* BH2^T, 1.5–1.6 – для штаммов *A. aeolicum* V1^T, *S. thermosulfidooxidans* SH 10–1, *S. thermotolerans* Kr1^T и *A. ferrooxidans* TFBK. В среду вносили 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 мМ двухвалентного железа в виде $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Штаммы культивировали на ротационном шейкере (100 об/мин.) в колбах Эрленмейера со 100 мл среды, продолжительность экспериментов составляла 10 сут. Начальная численность клеток составила примерно 10^7 кл/мл. При проведении экспериментов с помощью трилонометрического титрования определяли концентрации ионов трех- и двухвалентного железа [10]. Количественный учет микроорганизмов проводили методом прямого подсчета клеток с использованием светового микроскопа Ampival “Carl Zeiss” (ФРГ) с фазово-контрастной приставкой.

Результаты экспериментов представлены в таблице 1 и на рис. 1. Как следует из представленных данных, высокие концентрации двухвалентного железа в среде в той или иной степени ингибировали его окисление и рост всех штаммов. При этом между штаммами наблюдались различия в устойчивости к высоким концентрациям железа.

Таблица 1. Максимальная численность клеток штаммов при росте на средах с различным содержанием ионов Fe^{2+} , кл/мл $\times 10^7$ ($\pm \text{SD}$)

Штамм	Начальная концентрация ионов Fe^{2+} в среде, мМ						
	0	50	100	250	500	750	1000
<i>S. thermosulfidooxidans</i> SH 10–1	0.9 \pm 0.5	6.9 \pm 3.5	3.1 \pm 0.9	1.5 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.7	0.2 \pm 0.1
<i>S. thermotolerans</i> Kr1 ^T	5.8 \pm 1.1	5.2 \pm 0.6	5.8 \pm 1.7	3.1 \pm 0.2	3.7 \pm 1.1	1.9 \pm 0.7	0.8 \pm 0.4
<i>A. aeolicum</i> V1 ^T	9.3 \pm 6.0	9.7 \pm 9.3	44.8 \pm 16.1	37.2 \pm 7.5	17.2 \pm 11	6.6 \pm 1.9	3.3 \pm 1.1
<i>A. cupricumulans</i> BH2 ^T	2.4 \pm 1.5	2.6 \pm 0.7	3.2 \pm 0.9	4.9 \pm 0.7	5.7 \pm 0.5	6.2 \pm 2.1	4.1 \pm 2.0
<i>A. ferrooxidans</i> TFBK	н.о.	0.9 \pm 0.3	1.5 \pm 0.5	19.2 \pm 10.1	17.5 \pm 1.3	2.1 \pm 2.5	0.8 \pm 0.2

Штамм *S. thermosulfidooxidans* SH 10–1 за 5 сут полностью окислил железо в среде с 250 мМ Fe^{2+} , а в среде с 500 мМ двухвалентного железа оставалось на 10 сут около 100 мМ ионов Fe^{2+} . Штамм *S. thermotolerans* Kr1^T за 1 сут полностью окислил железо в среде с 100 мМ Fe^{2+} , однако на 10 сут в среде с 250 мМ Fe^{2+} остаточная концентрация Fe^{2+} на 10 сут составила около 35 мМ. Штамм *A. aeolicum* V1^T за 3 сут полностью окислил железо в среде с 250 мМ Fe^{2+} , а в среде с 500 мМ Fe^{2+} на 10 сут оставалось не более 30 мМ двухвалентного железа. Штамм *A. cupricumulans* BH2^T за 5 сут полностью окислил железо в среде с 250 мМ Fe^{2+} в среде, а в среде с Fe^{2+} 500 мМ на 10 сутки оставалось около 120 мМ Fe^{2+} . *A. ferrooxidans* TFBK за 5 сут полностью окислил 500 мМ двухвалентного железа. Численность клеток штамма *S. thermosulfidooxidans* SH 10–1 была максимальной на среде с 50 мМ двухвалентного железа, но не росла в среде без двухвалентного железа и в средах с концентрацией Fe^{2+} 250 мМ. Штамм *S. thermotolerans* Kr1^T активно рос как в среде без ионов Fe^{2+} , так и в средах с концентрациями ионов до 500 мМ Fe^{2+} . Штамм *A. aeolicum* V1^T рос во всех средах, но численность была максимальной в присутствии 100 и 250 мМ Fe^{2+} . Штамм *A. cupricumulans* BH2^T также рос на всех средах, однако стоит отметить, что численность клеток возрастала только в первые 2 сут, а потом начала снижаться в средах с концентрациями двухвалентного железа выше 100 мМ. После 2 сут начинался лизис клеток штамма и его численность снижалась ниже 1×10^7 кл/мл. Прирост численности клеток штамма *A. ferrooxidans* TFBK зависел от концентрации двухвалентного железа в среде, которое являлось для данного микроорганизма единственным энергетическим субстратом, и был максимальным в среде с 500 мМ Fe^{2+} . Таким образом, наиболее устойчивыми к высоким концентрациям ионов железа в среде были штаммы *A. aeolicum* V1^T и *A. ferrooxidans* TFBK. В среде с концентра-

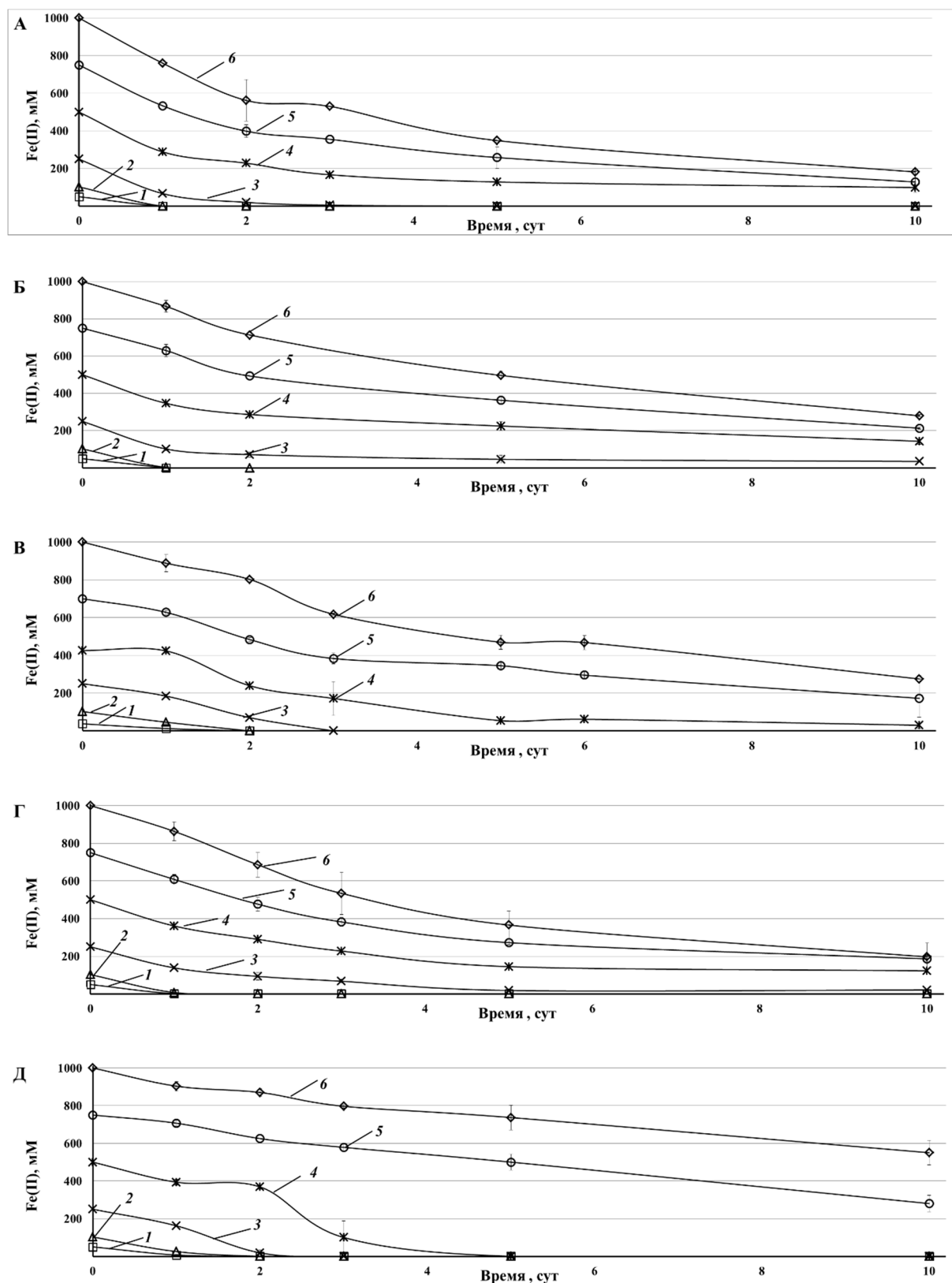


Рис. 1. Изменение концентрации ионов Fe^{2+} в процессе окисления двухвалентного железа штаммами микроорганизмов: *S. thermosulfidooxidans* SH 10–1 (а), *S. thermotolerans* Kr1^T (б), *A. aeolicum* V1^T (в), *A. cupricumulans* BH2^T (г), *A. ferrooxidans* TFBK (д); среда с начальной концентрацией Fe^{2+} 50 (1), 100 (2), 250 (3), 500 (4), 750 (5) и 1000 (6) mM.

цией 500 мМ штамм TFBK полностью окислял Fe^{2+} , а V1^T окислил более 90% Fe^{2+} за 5 сут. Скорости окисления железа в средах с 750 и 1000 мМ Fe^{2+} всеми штаммами кроме *A. ferrooxidans* TFBK была выше в начале эксперимента и постепенно снижались, что могло объясняться накоплением в среде ионов Fe^{3+} (Рис. 1). В нашей предыдущей работе [11] было показано, что штамм *A. aeolicum* V1^T отличался наибольшей устойчивостью к ионам Fe^{3+} среди штаммов архей р. *Acidiplasma* и бактерий р. *Sulfobacillus*.

Результаты представленной работы могут быть использованы при проведении испытаний по двустадийному биоокислению различного сырья и позволяют утверждать, что для успешного проведения регенерации окислителя необходимо контролировать концентрацию двухвалентного железа в продуктивных растворах, так как высокие его концентрации ингибируют биоокисление. В то же время, скрининг наиболее устойчивых штаммов позволяет регенерировать окислитель в растворах с достаточно высокими концентрациями Fe^{2+} .

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта N 16-34-60053 мол_а_дк.

Литература

1. Johnson D. B. Biomining-biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // Curr Opin Biotechnol. 2014. Vol. 30. Pp. 24–31.
2. Romero R., Mazuelos A., Palencia I., Carranza F. Copper recovery from chalcopyrite concentrates by BRISA process // Hydrometallurgy. 2003. Vol. 70. Pp. 205–215.
3. Bulaev A. G., Muravyov M. I., Pivovarova T. A., Fomchenko N. V., Kondrat'eva T. F. The treatment of mining and metallurgical wastes containing nonferrous and precious metals // Advanced Materials Research. 2013. Vol. 825. Pp. 301–304.
4. Muravyov M. I., Bulaev A. G., Kondrat'eva T. F. Complex treatment of mining and metallurgical wastes for recovery of base metals // Minerals Engineering. 2014. Vol. 64. Pp. 63–66.
5. Bryan C. G., Watkin E. L., McCredde T. J., Wong Z. R., Harrison S. T. L., Kaksonen A. H. The use of pyrite as a source of lixiviant in the bioleaching of electronic waste // Hydrometallurgy. 2015. Vol. 152. Pp. 33–43.
6. Muravyov M. I., Bulaev A. G. Two-step oxidation of a refractory gold-bearing sulfidic concentrate and the effect of organic nutrients on its biooxidation // Minerals Engineering. 2013. Vol. 45. Pp. 108–114.
7. Скорняков А. Н., Петухова Н. И., Мефтахов Р. Ф., Зорин В. В. Исследование стадии химического окисления двухстадийной технологии бактериальнохимического выщелачивания пирита и медного концентрата // Башкирский химический журнал. 2010. Т. 17. №5. С. 57–59.
8. Nurmi P. et al. Process for biological oxidation and control of dissolved iron in bioleach liquors // Process Biochemistry. 2009. Vol. 44. Pp. 1315–1322.

9. Chowdhury F., T. V. Ojumu T. V. Investigation of ferrous-iron biooxidation kinetics by *Leptospirillum ferriphilum* in a novel packed-column bioreactor: Effects of temperature and jarosite accumulation // Hydrometallurgy. 2014. Vol. 141. Pp. 36–42
10. Schwarzenbach G., Flaschka H. Complexometric Titrations. London: Methuen, 1969. P. 490.
11. Bulaev A. G. Effect of ferric sulfate on activity of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing microorganisms // Microbiology. 2017. Vol. 86. No. 4. Pp. 469–475.

Статья рекомендована к печати Биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (докт. биол. наук, проф., зам. декана по научной работе А. М. Рубцов)

The effect of ferrous iron ion concentration on activity of iron-oxidizing microorganisms

A. G. Bulaev^{1,2*}, E. A. Mel'nikova^{2,3}

¹*Lomonosov Moscow State University
1–12 Leninskiye gory, 119234 Moscow, Russia.*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology
of the Russian Academy of Sciences
33–2 Leninsky Avenue, 119071 Moscow, Russia.*

³*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology n.a. K. I. Skryabin
23 Akademika Skryabin Street, 109472 Moscow, Russia.*

**Email: bulaev.inmi@yandex.ru*

Effect of ferrous iron concentration on activity of acidophilic iron-oxidizing microorganisms was studied. It was shown that high concentration of iron ions inhibited all studied strains, but the most resistant ones were almost completely oxidized up to 500 mM of ferrous iron in the medium. The results obtained are important for the development of biohydrometallurgical technologies based on high temperature ferric leaching since they allow to evaluate the resistance of iron-oxidizing microorganisms belonging to different groups to Fe^{2+} ions.

Keywords: acidophilic microorganisms, biohydrometallurgy, iron-oxidizing microorganisms.