

ОСОБЛИВОСТІ СПІВОВАРИСТВА ХЕМОЛІТОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ ВІДХОДІВ ВУГЛЕЗБАГАЧЕННЯ

І.А. БЛАЙДА

Біотехнологічний науково-навчальний центр
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Відвали вуглевидобування і вуглезбагачення є з одного боку екологічно небезпечною, з іншого боку – промислово важливою з точки зору вмісту рідкісних металів сировиною. Біотехнологічні методи найбільш обґрунтовані для її переробки з метою вилучення цінних компонентів і зниження токсичності. Реалізація мікробних біотехнологій повинна базуватись на комплексних дослідженнях біологічних і фізико-хімічних властивостей вихідних твердих субстратів, консорціуму мікроорганізмів, які в них присутні, з подальшим виділенням, відбором та селекцією найбільш перспективних високо активних штамів для створення ефективного бактеріального препарату. З аборигенного співтовариства породних відвалів вуглезбагачення в чисті культури виділені три домінуючі штами мезофільних і помірно термофільних ацидофільних хемолітотрофних бактерій. Вивчення їх основних біологічних властивостей дозволило припустити приналежність ізольованих штамів до представників роду Acidithiobacillus, зокрема Acidithiobacillus ferrooxidans, а також роду Sulfolobus. Порівняння окиснювальної активності виділених штамів і аборигенного співтовариства по відношенню до вилучення з субстрату відвалів рідкісних і важких металів свідчить на користь консорціуму – результат синтрофних відношень мікроорганізмів у співтоваристві. Це слід враховувати при створенні оптимального для даного техногенного субстрату ефективного бактеріального препарату.

Ключові слова: породні відвали, аборигенне співтовариство, ацидофільні хемолітотрофні бактерії, штами, активність вилуговування, джерела енергії, германій, іони важких металів.

Відвали вуглевидобування і вуглезбагачення представлені в нашій країні більш ніж 1100 териконами, в яких сконцентровано більше 160 млн тонн з одного боку екологічно небезпечної, з іншого – промислово значимої сировини [1, 2]. Для її переробки з метою вилучення цінних компонентів і зниження токсичності найбільш виправдані біотехнологічні методи, які дозволяють переробляти бідну нерентабельну сировину з мінімальними ресурсними витратами і навантаженням на довкілля [3–5]. Реалізація мікробних біотехнологій повинна базуватись на комплексних дослідженнях біологічних і фізико–хімічних властивостей вихідних твердих субстратів, консорціуму мікроорганізмів, які в них присутні, з подальшим виділенням, відбором та селекцією найбільш перспективних високо активних штамів для створення ефективного бактеріального препарату. Нами встановлено, що в процесі утворення відвалів вуглезбагачення, їх складування і зберігання під впливом певних техногенних і природних факторів формується високоефективне і особливе за своїм складом аборигенне співтовариство, представлене переважно гетеротрофними і ацидофільними хемолітотрофними бактеріями. Найбільшою активністю по відношенню до вилуговування з вихідних техногенних субстратів металів як рідкісних, так і важких володіють представники родів *Acidithiobacillus* та *Sulfobacillus*. Метою роботи стало виділення з аборигенного співтовариства відвалів вуглезбагачення домінуючих чистих культур мікроорганізмів, встановлення їх фізіолого–біохімічних та технологічних властивостей, порівняння ефективності вилуговування відвалів при використанні чистих культур і співтовариства.

Об'єкти і методи досліджень. Об'єктом дослідження були породні відвали, що утворюються в результаті збагачення вугілля шахт Львівсько–Волинського вугільного басейну гравітаційними і флотаційними методами на

Центральній збагачувальній фабриці (ЦЗФ) «Червоноградська» ВАТ «Львівська вугільна компанія», склад яких представлено в табл. 1.

Таблиця 1

Вміст металів у відвалах вуглезбагачення ЦЗФ

Елемент	Промислові концентрації, мг/кг	Виявлені концентрації, мг/кг
Мідь	45,0–60,0	62,2
Цинк	65,0–70,0	112,5
Марганець	850 – 10 ³	317,7
Свинець	18,0–22,0	42,2
Нікель	80,0–120,0	134,2
Кадмій	45,0–55,0	2,8
Залізо	(1,5–2,0)·10 ³	44,57·10 ³
Галій	10,0–15,0	12,1
Германій	5,0–7,0	26,0
Олово	90,0–120,0	351,0
Хром	190,0–210,0	99,1
Ванадій	140,0–160,0	150,0
Кобальт	37,0–42,0	116,1
Алюміній	(2,5–5,0)·10 ³	13,9·10 ³
Кремній	–	159,0·10 ³
Цирконій	160,0–220,0	173,0
Ніобій	19,0–22,0	14,0
Лантан	25,0–29,0	48,0
Церій	25,0	69,0
Рубідій	90,0	141,0
Стронцій	80,0	211,0
Барій	250,0–400,0	519,0
Титан	4,0·10 ³	4,2·10 ³
Кальцій	–	17,2·10 ³

Отримання чистих культур ацидофільних хемолітотрофних бактерій здійснювали методом накопичувальних культур з використанням стандартних поживних середовищ, ґрунтуючись на відомих літературних даних і результатах власних досліджень про наявність в мінеральних субстратах геогенного і техногенного походження мезофільних і помірно термофільних хемолітотрофних бактерій, а також сульфобацил [4, 6–9]. Склад поживних середовищ наведено у табл. 2. Як джерело енергії до мінерального фону

поживних середовищ додавали елементарну сірку, її неорганічні (тіосульфат $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) і органічні (тіосечовина $\text{CS}(\text{NH}_2)_2$) сполуки, двовалентне залізо [7, 10–12]. Для отримання накопичувальних культур в колби ємністю $50,0 \text{ см}^3$ поміщали $2,0 \text{ г}$ субстрату породних відвалів і $20,0 \text{ см}^3$ поживного середовища, що забезпечувало співвідношення твердої і рідкої фаз 1:10. Отримання накопичувальних культур мезофільних ацидофільних хемолітотрофних бактерій здійснювали при температурі $30,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$, помірно термофільних і сульфобацілл при $45,0 \pm 20 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 5–7 діб. Розвиток мікроорганізмів оцінювали за зміною значень рН культуральної рідини, появи легкої каламуті та плівки на поверхні середовища.

Таблиця 2

Рецептури поживних середовищ, які використовували для одержання накопичувальних культур

Сполуки	Середовища (рН 1,7)	
	9К для представників роду <i>Acidithiobacillus</i> , г/дм ³	Модифікована 9К* для представників роду <i>Sulfobacillus</i> , г/дм ³
$\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$	3,0	0,45
KCl	0,1	0,05
K_2HPO_4	0,5	–
KH_2PO_4	–	0,05
MgSO_4	0,5	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01	0,014
Na_2SO_4	–	0,15
Дріжджовий екстракт	–	0,20
	Джерело енергії	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	5,0	–
S^0	2,0	–
$\text{CS}(\text{NH}_2)_2$	4,8	–
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44,5	30,0

Збагачену бактеріальними клітинами культуральну рідину висівали на агаризовані середовища аналогічного складу з тіосульфатом, тіосечовиною або двовалентним залізом. Накопичувальну культуру сульфобацілл перед пересівом попередньо піддавали термообробці при $80,0 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 10 хвилин.

Пересівами на рідкі та агаризовані середовища первинні ізоляти були очищені до мікроскопічно й колоніально однорідного стану. Чисті культури на поверхні селективних агаризованих середовищ формували доступні для вивчення колонії. Висновок про отримання чистої культури робили після забарвлення і мікроскопіювання. У мікроскопічно і морфологічно чистих культурах визначали забарвлення по Граму, діапазон і оптимальні значення температури і рН, здатність до автотрофного і міксотрофного зростання, окислення різноманітних сполук сірки і двовалентного заліза, відношення до органічних речовин, здатність вилуговувати метали з мінеральної сировини.

Морфологію клітин і сформованих ними колоній вивчали за допомогою світлового та електронного мікроскопів. Приріст біомаси визначали на спектрофотометрі КФК-2 при довжині хвилі 540 нм. Концентрацію тіосульфату і наявність проміжних продуктів його окислення проводили стандартним йодометричним методом [14]. Вміст металів в розчинах визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-1 і С-115ПК Selmi [15].

Результати та їх обговорення. Оскільки одна і та ж культура може рости на середовищах, які відрізняються за компонентним і концентраційним складом, при первинному виділенні мікроорганізмів з використанням різних середовищ, можна говорити тільки про групу бактерій, а не про конкретний їх вид [9–11]. В умовах наших експериментів розвиток накопичувальної культури мезофільних, помірно-термофільних тіонових бактерій і сульфобактерій супроводжувався збільшенням значень рН (при вихідному значенні рН=1,7) до 3,0 – 4,5, а також зміною зовнішнього вигляду культуральної рідини (рис. 1).

Виділеним домінуючим штамам було надано штамові номери в залежності від умов отримання: мезофільні – МФLv37, помірно термофільні – УТФLv35, для сульфобацил – SBLv39. Біологічні властивості ізольованих штамів наведені в табл. 3.

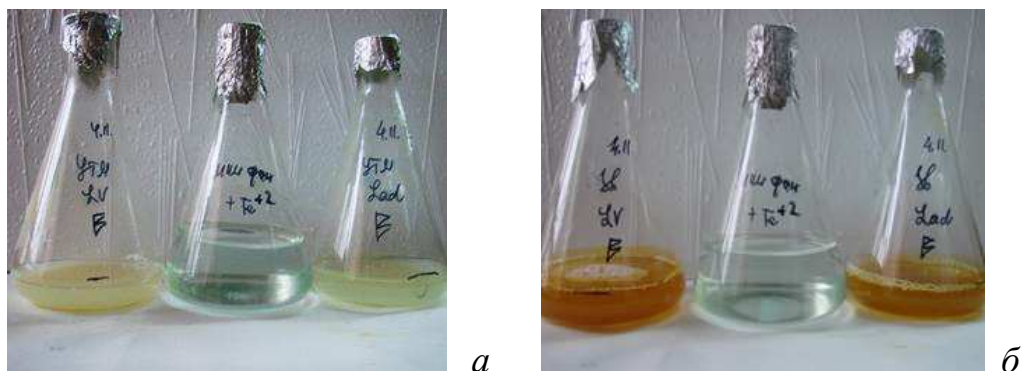


Рис. 1. Зовнішній вигляд накопичувальної культури помірно термофільних бактерій (а) і сульфобацил (б) на фоні контролю (всередині)

Таблиця 3

Біологічні властивості штамів бактерій, які ізолювано з породних відвалів

Біологічні особливості		Ізолювані штами		
		МФLv 37	УТФLv 35	SBLv39
Морфологія, форма клітин		Дрібні тонкі	Дрібні тонкі	Дрібні округлі, коковидні палички
Забарвлення за Грамом		Грамнегативні	Грампозитивні	Грампозитивні
Спороутворення		Спори не утворюють	Спори утворюють	Спори утворюють
Морфологія, форма колоній		Краплеподібні округлі випуклі зернисті жовтого кольору	Краплеподібні округлі випуклі зернисті жовтого кольору	Краплеподібні округлі випуклі зернисті лимонного кольору
Значення рН	Діапазон	2,0 – 5,0	2,0 – 5,0	2,0 – 5,0
	Оптимальні значення	≤2,0	≤2,0	3,0
Значення температури, °С	Діапазон	4,0 – 42,0	4,0 – 60,0	4,0 – 60,0
	Оптимальні значення	35,0±2,0	50,0±2,0	50,0±2,0
Джерела енергії	S ⁰	+	+	+
	Na ₂ S ₂ O ₃	+	+	+
	CS(NH ₂) ₂	+	+	+
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	+	+	+
Наявність (ступінь, %) окиснення Na ₂ S ₂ O ₃		+	83,0	+
Ріст у присутності 0,02 % органічних речовин		+	+	+
Ріст у присутності цукрів	Глюкоза	+	+	+
	Сахароза	+	+	+
	Меласа	+	+	+
Ріст у присутності 0,02 % дріжджового екстракту		+	+	+
Вилучення металів із породних відвалів		+	+	+

Отримані результати вивчення основних біологічних властивостей дозволило віднести штами МФLv37 і УТФLv35 до представників роду *Acidithiobacillus*. Здатність штаму МФLv37 окиснювати двовалентне залізо, крім інших джерел енергії, дозволило припустити його приналежність до представників *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Помірно термофільний штам SBLv39, виділення і вивчення якого здійснювали на середовищі 9К* і при температурі 50,0 °С, попередньо можна віднести до представників роду *Sulfobacillus* [15]. Остаточний висновок про таксономічне положення вивчених культур бактерій можливо зробити після проведення досліджень з використанням молекулярно–генетичних методів.

Подальшою метою було вивчення здатності ізольованих і відібраних аборигенних штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій до вилуговування металів у порівнянні з вилуговуючою активністю аборигенного співтовариства. Ефективність вилуговування визначали за ступенем вилучення (%) рідкісних (германію, галію) та важких (свинцю, кадмію, нікелю, міді, цинку, марганцю) металів з субстрату в розчин, що представлено на рис. 2.

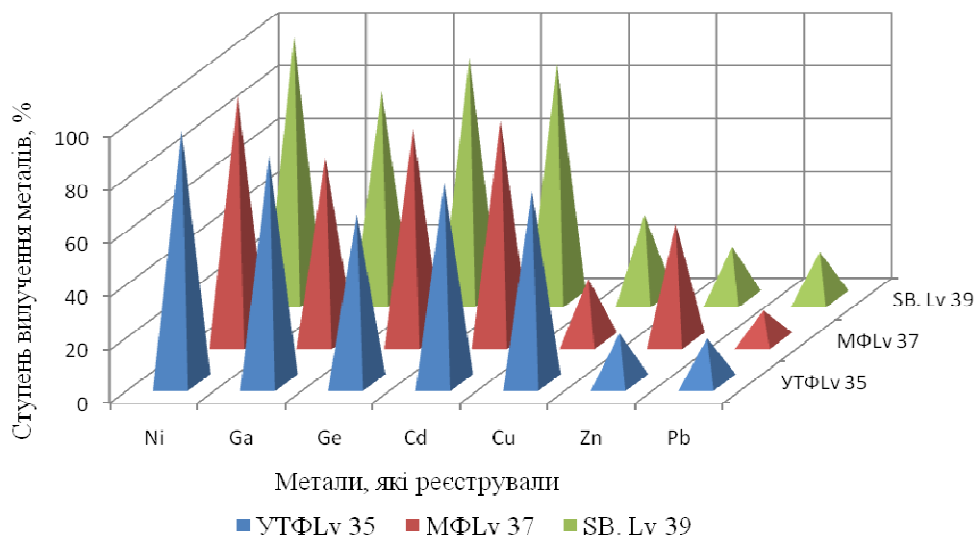


Рис. 2. Ступінь вилучення металів з породних відвалів при біовилуговуванні ізольованими штамми

Отримані данні свідчать про порівняно високу окиснювальну активність ізолюваних штамів по відношенню до вилучення нікелю (82,5 – 96,0 % вилучення), галію (58,2 – 66,5 %), германію (45,0 – 68,9 %), кадмію (54,1 – 82,0 %), меншою мірою – до міді, цинку, свинцю незалежно від типу штаму.

В табл. 4 наведені дані вилучення металів з того ж субстрату породного відвалу, але аборигенними співтовариствами мезофільних і помірно термофільних ацидофільних хемолітотрофних бактерій. Ці результати свідчать на користь того, що в асоціації культури більш ефективні, ніж в ізолюваному стані.

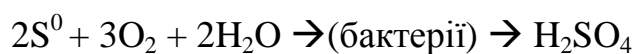
Таблиця 4

Ступінь (%) вилучення металів з породних відвалів аборигенним співтовариством хемолітотрофних бактерій

Метали	Мезофільне співтовариство ацидофільних хемолітотрофних бактерій			Помірно термофільне співтовариство ацидофільних хемолітотрофних бактерій	
	Джерело енергії				
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ S ₂ O ₃	S ⁰	Na ₂ S ₂ O ₃	FeSO ₄ ·7H ₂ O
Ge	99,9	97,5	89,3	85,6	99,9
Ga	99,9	83,5	67,5	91,3	99,7
Ni	99,9	85,3	73,7	99,3	99,9
Cd	99,9	99,7	95,3	99,9	99,9
Cu	16,5	13,5	11,9	67,7	97,3
Zn	86,9	67,5	53,7	85,8	37,8
Mn	99,8	87,9	77,5	99,9	97,8
Pb	67,1	57,3	49,5	73,1	89,3

Це пов'язано з поширеними серед мікроорганізмів синтрофними відносинами, тобто діяльністю при руйнуванні субстратів одних видів бактерій, без якої неможлива або сповільнюється діяльність іншої групи бактерій. Це може бути і обмін субстратом, і видалення із середовища токсичних продуктів, і двонаправлене перенесення сірки у процесі забезпечення життєдіяльності мікроорганізмів. Так, автори [6] припускають, що бактерії *Acidithiobacillus thiooxidans*, які часто присутні разом з *Acidithiobacillus ferrooxidans*, за рахунок більш швидкого окиснення сірки при непрямому механізмі біовилуговування,

створюють сприятливі умови для зростання залізоокиснюючих бактерій. Таким чином, цикл окиснення субстратів



здійснюється набагато швидше і ефективніше.

Отримані результати необхідні для розробки високо ефективного стійкого оптимального для даного виду субстрату бактеріального препарату, здатного вилуговувати як цінні рідкісні, так і важкі токсичні метали з високими показниками. Однак, для цього треба в автотрофних і міксотрофних умовах вивчити ростові властивості штамів–продуцентів, у результаті накопичення біомаси яких буде отримано бактеріальний препарат, а також провести оптимізацію компонентного і концентраційного складу поживного середовища, здатного забезпечити максимальну швидкість росту штамів–продуцентів.

Висловлюю подяку співробітникам Біотехнологічного науково–навчального центру Одеського національного університету імені І.І.Мечникова – к.б.н. Васильєвій Т.В., Слюсаренко Л.І., Хитрич В.Ф. за допомогу в проведенні мікробіологічних та фізико–хімічних робіт; д.б.н. професору Іваниці В.А. за загальне керівництво і консультації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Юдович Ю. Я. Элементы–примеси в ископаемых углях / Юдович Ю. Я., Кетрис М. П., Меред А. В. – Л.: Химия, 1985. – 238 с.
2. Зубова Л. Г. Терриконики угольных шахт – источники сырья для металлургии / Зубова Л. Г. // Уголь Украины. – 2000. – №6. – С. 32–33.

3. Толстов Е. А. Возможности применения биогeотехнологии при выщелачивании бедных и упорных руд / Толстов Е. А., Латышев В. Е., Лильбок Л. А. // Горный журнал. – 2003. – №8. – С. 63–65.
4. Васильева Т. В. Металлы из промышленных отходов / Васильева Т. В., Блайда И. А., Иваница В. А. // Энергосбережение. – 2011. – № 5. – С. 31–33.
5. Brierley J. A. Expanding role microbiology in metallurgical processes / Brierley J. A. // Mining Engineering. – 2000. – №52 (11). – P. 49–53.
6. Кузякина Т. И. Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд / Кузякина Т. И., Хайнасова Т. С., Левенец О. О. // Вестник наук о Земле. – 2008. – Т. 60, Вып. 12. – С. 76–85.
7. Блайда И. А. Извлечение редких и цветных металлов сообществом микроорганизмов из золы от сжигания Павлоградского угля / [Блайда И. А., Васильева Т. В., Слюсаренко Л. И. та ін.] // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – №3. – С. 91–100.
8. Канаева З. К. Микробиоценозы хемолитотрофных растворов подземного выщелачивания уранового месторождения «Карамурун» / Канаева З. К., Канаев А. Т. // Биологические науки. – 2012. – № 5. – С. 153–157.
9. Разнообразие сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов в природных и техногенных экосистемах / [Кондратьева Т. Ф., Пивоварова Т. А., Цаплина И. А. та ін.]. // Микробиология. – 2012. – Т.81, № 1. – С. 3–27.
10. Каравайко Г. И. Практическое руководство по биогeотехнологии металлов / Г. И. Каравайко. – М.: АН СССР, 1989. – 371 с.
11. Методы общей бактериологии / Методы общей бактериологии; Т. 2. – М.: Мир, 1984. – 265 с.
12. Состав и выщелачивающая активность микробиоценоза техногенных отходов энергетики [Электронный ресурс] / [Блайда И. А., Васильева Т. В., Слюсаренко Л. И. та ін.]. // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013.– № 1.– Режим доступу: <http://jrnl.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/4592>
13. Черняк С. М. Методы гидрохимического анализа объектов морской среды / Черняк С. М., Колобова Т. П., Першина И. В. // Методические основы

комплексного экологического мониторинга океана. – М.: Гидрометеиздат, 1988. – С. 23–25.

14. Хавезов И. Атомно-абсорбционный анализ / И. Хавезов, Д. Цалев – Л.: Химия, 1983. – 144 с.

15. Kelly D. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Hallothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. / Kelly D. P., Wood A. P. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – V. 50. – P. 512–516.

ОСОБЕННОСТИ СООБЩЕСТВА ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ОТХОДОВ УГЛЕБОГАЩЕНИЯ

И.А. БЛАЙДА

Биотехнологический научно-учебный центр

Одесского национального университета имени И.И. Мечникова

Отвалы угледобычи и углеобогащения являются с одной стороны экологически опасным, с другой стороны – промышленно значимым с точки зрения содержания редких металлов сырьем. Биотехнологические методы наиболее обоснованы для его переработки с целью извлечения ценных компонентов и снижения токсичности. Реализация микробных биотехнологий должна базироваться на комплексных исследованиях биологических и физико-химических свойств исходных твердых субстратов, консорциума микроорганизмов, которые в них присутствуют, с последующим выделением, отбором и селекцией наиболее перспективных высоко активных штаммов для создания эффективного бактериального препарата. Из аборигенного сообщества микроорганизмов породных отвалов углеобогащения в чистые культуры выделены три доминирующих штамма мезофильных и умеренно термофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий. Изучение их основных биологических свойств позволило предположить принадлежность

изолированных штаммов к представителям рода Acidithiobacillus, в частности Acidithiobacillus ferrooxidans, а также роду Sulfobacillus. Сравнение окислительной активности выделенных штаммов и аборигенного сообщества по отношению к извлечению из субстрата отходов редких и тяжелых металлов свидетельствует в пользу консорциума как результат синтрофных отношений микроорганизмов в сообществе. Это нужно учитывать при создании оптимального для данного техногенного субстрата эффективного бактериального препарата.

Ключевые слова: *породные отвалы, аборигенное сообщество, ацидофильные хемолитотрофные бактерии, штаммы, активность выщелачивания, источники энергии, германий, ионы тяжелых металлов.*

PECULIARITIES OF COMMUNITY CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA COAL TAILING

I.A. BLAYDA

Biotechnological centre of I.I. Mechnikov Odessa National University

Coal mining and coal preparation dumps are on the one hand as environmentally hazardous, on the other hand – commercial significance, in terms of content of rare metals raw materials. Biotechnological methods are most justified for its processing to recover valuable components and reduce toxicity. Implementation of microbial biotechnology should be based on comprehensive studies of biological and physico-chemical properties of the initial solid substrates, a consortium of microorganisms, which are present, followed by selection, screening and selection of the most promising high active strains to create effective bacterial drug. From the aboriginal community coal tailing in pure cultures were isolated three strains dominating mesophilic and moderately thermophilic acidophilic hemolitotrophic bacteria. The study of basic biological properties suggesting isolated strains

belonging to the genus Acidithiobacillus, including Acidithiobacillus ferrooxidans, and genus Sulfolobus. Comparison of the oxidative activity of isolated strains and aboriginal communities in relation to withdrawal from the substrate of rare and heavy metals is in favor of the consortium as a result of syntrophic relationships of microorganisms in the community. This must be taken into account when creating the optimal effective bacterial drug for the man-made substrate.

Keywords: *coal tailing, the aboriginal bacterial community, chemolithotrophic acidophilic bacteria, strains, leaching activity, energy sources, germanium, ions of heavy metals.*