

УДК 606:662.7:504

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВИЛУЧЕННЯ РІДКІСНИХ ТА ВАЖКИХ МЕТАЛІВ З ВІДХОДІВ ІЗОЛЬОВАНИМИ, КОЛЕКЦІЙНИМ ТА ТИПОВИМ ШТАМАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Т. В. ВАСИЛЬЄВА

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

*Найбільш активною групою мікроорганізмів у аборигенному консорціумі субстратів породних відвалів вуглезбагачення та золи-виносу від спалювання вугілля є група ацидофільних хемолітотрофних мікроорганізмів – представників родів *Acidithiobacillus* і *Sulfobacillus*. Порівнювали окислювальну активність нових ізольованих з вказаних субстратів штамів МФL_{v6} і МФL_{ad5} з високо активними колекційним (*A. ferrooxidans* ВКМ468) и типовим (*A. ferrooxidans* ATCC 23270) штамми з точки зору вилучення рідкісних і важких металів з техногенних відходів, а також встановили резистентність МФL_{v6} і МФL_{ad5} до важких металів, які входять до складу цих відходів. Встановлена більш висока окислювальна активність та стійкість до іонів важких металів нових штамів мікроорганізмів у порівнянні з типовим та колекційним штамми роду *A. ferrooxidans*. Встановлено мінімальні інгібуючі концентрації важких і токсичних металів та визначено ряд металів з негативного впливу на ріст ізольованих культур. Показано, що мінімальні концентрації металів, за яких відбувається ріст штамів мікроорганізмів, в декілька разів перевищує їх встановлений вміст у техногенних відходах. Проведені дослідження свідчать про необхідність проведення спрямованої селекції штамів мікроорганізмів, стійких до токсичних сполук і спроможних окислювати різні мінеральні субстрати, а також їх адаптації до нових субстратів для вилучення рідкісних і важких металів.*

Ключові слова: породні відвали, зола-винос, ацидофільні хемолітотрофні бактерії, ізолювані штами, активність вилуговування, резистентність, германій, іони важких металів.

У попередніх дослідженнях було встановлено, що найбільш активною групою мікроорганізмів у аборигеному консорціумі субстратів породних відвалів вуглезбагачення та золи-виносу від спалювання вугілля є група ацидофільних хемолітотрофних мікроорганізмів, як мало численних мезофільних, так і найбільш численних помірно термофільних – представників родів *Acidithiobacillus* і *Sulfobacillus* [1–3]. Вивчення властивостей найбільш активних виділених з аборигенної асоціації субстратів чистих культур мікроорганізмів дозволило віднести їх до представників *Acidithiobacillus ferrooxidans* і присвоїти їм штамові номери МФLv6 і МФLad5 з урахуванням їх місця існування – породні відвали збагачення вугілля Львівсько-Волинського вугільного басейну і зола-винос від спалювання вугілля на Ладизинській ТЕС відповідно. Відомо [4], що відмінності між штамми у активності окислення субстратів обумовлені середовищем і умовами формування мікробіоценозу, з якого виділено штам. Так, штам *A. ferrooxidans*, виділений з субстрату складного мінералогічного складу, характеризується більш високою швидкістю росту і ступенем окислення різних типів піриту, ніж штам *A. ferrooxidans*, виділений з відвалу біднішою за складом руди [4]. Тому, пошук нових високо активних штамів, стійких, здатних до адаптації і росту, є актуальним завданням для розвитку біотехнологій.

Метою роботи було порівняння окислювальної активності ізолюваних штамів МФLv6 і МФLad5 з високо активними колекційним (*A. ferrooxidans* ВКМ468) и типовим (*A. ferrooxidans* АТСС 23270) штамми з точки зору вилучення рідкісних і важких металів з субстратів техногенних відходів, а також встановлення їх резистентності до важких металів, які входять до складу техногенних відходів.

Об'єкти і методи досліджень.

Ізольовані *Acidithiobacillus ferrooxidans* МФLv6 і МФLad5, колекційний *Acidithiobacillus ferrooxidans* ВКМ468 і типовий *Acidithiobacillus ferrooxidans* АТСС 23270 штами зберігаються у музеї кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, який є філією Національної колекції мікроорганізмів. Штами *A. ferrooxidans* АТСС 23270 і *A. ferrooxidans* ВКМ468 використовують у біогідрометалургійних процесах для бактеріального вилуговування металів з сульфідних руд [5]. Крім того, *A. ferrooxidans* АТСС 23270 здатен солюбілізувати сірку з поверхні вугілля [6].

Нові штами *A. ferrooxidans* МФLv6 і МФLad5 характеризуються наступними ознаками. Грамнегативні палички розміром 0,2–0,4 мкм, рухливі. Штами є облігатними анаеробами, хемолітоавтотрофами, суворо ацидофільними, мезофіли (оптимальна температура для росту $35,0 \pm 2,0$ °С). Культивуються на середовищах із залізом, сіркою, тіосульфатом, тіосечовиною у якості єдиного джерела енергії, здатні до зростання у міксотрофних умовах.

Штами зберігаються на агаризованому поживному середовищі в холодильнику з пересівом на свіже середовище через 1–2 місяці. Для культивування штамів з метою накопичення біомаси і для вилуговування іонів металів з субстратів застосовували поживне середовище 9К, г/дм³: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ – 3,0; КСl – 0,1; MgSO_4 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,01 з концентрацією $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у якості єдиного джерела енергії 12,0 г/дм³ для максимального накопичення біомаси штамів і 44,5 г/дм³ для найбільш ефективного вилуговування металів з досліджуваних субстратів.

Об'єктами досліджень були субстрат породних відвалів, які утворюються в результаті збагачення вугілля шахт Львівсько-Волинського вугільного басейну гравітаційними і флотаційними методами на Центральній збагачувальній фабриці (ЦЗФ) «Червоноградська» ПАТ «Львівська вугільна компанія» і субстрат золи-виносу від спалювання суміші вітчизняного викопного вугілля на ДТЕК Ладижинська ТЕС.

Субстрат породних відвалів має наступні характеристики. Це достатньо викристалізована з переважною більшістю достатньо крупних (5–7 мм) часток глиниста порода аргіліту, каолініту, кварцового мінералу типу пісковіку, піриту, з вмістом вугілля (до 17,0 %), сірки (до 1,5 %) та органічної маси (до 2,0 %). Хімічний склад (%): Fe – 4,46; Al – 1,39; Si – 15,90 ; Ti – 0,42; Ca – 1,72; Cu – $6,22 \cdot 10^{-3}$; Zn – $1,13 \cdot 10^{-2}$; Mn – $3,18 \cdot 10^{-2}$; Pb – $0,42 \cdot 10^{-2}$; Ni – $1,34 \cdot 10^{-2}$; Cd – $2,82 \cdot 10^{-4}$; Sn – $3,52 \cdot 10^{-2}$; Cr – $0,99 \cdot 10^{-2}$; V – $1,50 \cdot 10^{-2}$; Co – $1,16 \cdot 10^{-2}$; Sr – $2,11 \cdot 10^{-2}$; Ba – $5,19 \cdot 10^{-2}$; Zr – $1,73 \cdot 10^{-2}$; Rb – $1,41 \cdot 10^{-2}$; Nb – $1,40 \cdot 10^{-3}$; La – $4,80 \cdot 10^{-3}$; Ce – $6,90 \cdot 10^{-3}$; Ga – $1,21 \cdot 10^{-3}$; Ge – $2,60 \cdot 10^{-3}$. Термін зберігання у відвалах 1 рік. Кількість аборигенних ацидофільних хемолітотрофних бактерій складала: мезофільних $(6,4 \pm 0,6) \times 10^4$ і помірно термофільних $(7,4 \pm 0,3) \times 10^8$ кл/мл [3].

Субстрат золи-виносу має наступні характеристики. Це аморфний погано викристалізований пилоподібний продукт з переважною більшістю кварцу, карбонатної і силікатної фаз, оксидів заліза і алюмінію. Хімічний склад (%): Fe – 5,93; Al – 3,89; Si – 12,10; Ti – 4,16; Ca – 0,20; Cu – $6,82 \cdot 10^{-3}$; Zn – $3,27 \cdot 10^{-2}$; Mn – $5,73 \cdot 10^{-2}$; Pb – $1,09 \cdot 10^{-2}$; Ni – $1,77 \cdot 10^{-2}$; Cd – $5,31 \cdot 10^{-4}$; Sn – $2,07 \cdot 10^{-2}$; Cr – $2,18 \cdot 10^{-2}$; V – $2,15 \cdot 10^{-2}$; Co – $3,05 \cdot 10^{-2}$; Sr – $6,56 \cdot 10^{-2}$; Ba – $6,34 \cdot 10^{-2}$; Zr – $2,37 \cdot 10^{-2}$; Rb – $1,16 \cdot 10^{-2}$; Nb – $1,90 \cdot 10^{-3}$; La – $4,20 \cdot 10^{-3}$; Ce – $7,40 \cdot 10^{-3}$; Ga – $1,02 \cdot 10^{-3}$; Ge – $2,80 \cdot 10^{-3}$; S – 1,24; C (недожег) – 9,98. Термін зберігання у відвалах 1 рік. Кількість аборигенних ацидофільних хемолітотрофних бактерій складала: мезофільних $(5,9 \pm 0,6) \times 10^4$ і помірно термофільних $(6,4 \pm 0,5) \times 10^7$ кл/мл [3].

Експерименти по вилуговуванню проводили на моделі чанового біовилуговування за температури $30,0 \pm 2,0$ °C, $\text{pH} \leq 2,0$, співвідношенні твердої і рідкої фаз Т:Р = 1:10 протягом 7 днів. Вихідний титр для усіх досліджуваних штамів був однаковий і становив $(4,1 \pm 0,3) \times 10^3$, паралельно ставили контрольний дослід без внесення бактерій. Аналіз розчинів на вміст металів здійснювали із застосуванням атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна).

Результати та їх обговорення. Результати вилуговування металів з породних відвалів ЦЗФ і золи-виносу ізольованими, колекційним та типовим штамами наведено відповідно на рис. 1, 2. Як свідчать дані, що отримані, *A. ferrooxidans* МФLv6, який було вилучено з породних відвалів, переводив метали із твердої фази до розчинів у 3,0–6,0 разів активніше, ніж колекційний і типовий штами. Тільки показник вилучення кадмію за допомогою *A. ferrooxidans* ATCC 23270 та *A. ferrooxidans* ВКМ468 складав 79,6 та 83,6 % і був близьким до ступеню вилучення кадмію ізольованим штамом *A. ferrooxidans* МФLv6 – 98,0 %. Схожі дані було отримано при проведенні бактеріального вилуговування металів із золи-виносу Ладижинської ТЕС (рис. 2). Тільки ступінь вилучення цинку і свинцю із золи-виносу ізольованим, колекційним та типовим штамами практично не відрізнялися. В цілому, порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить, що незалежно від штаму, вихід металів із породних відвалів був вищим, ніж із золи-виносу.

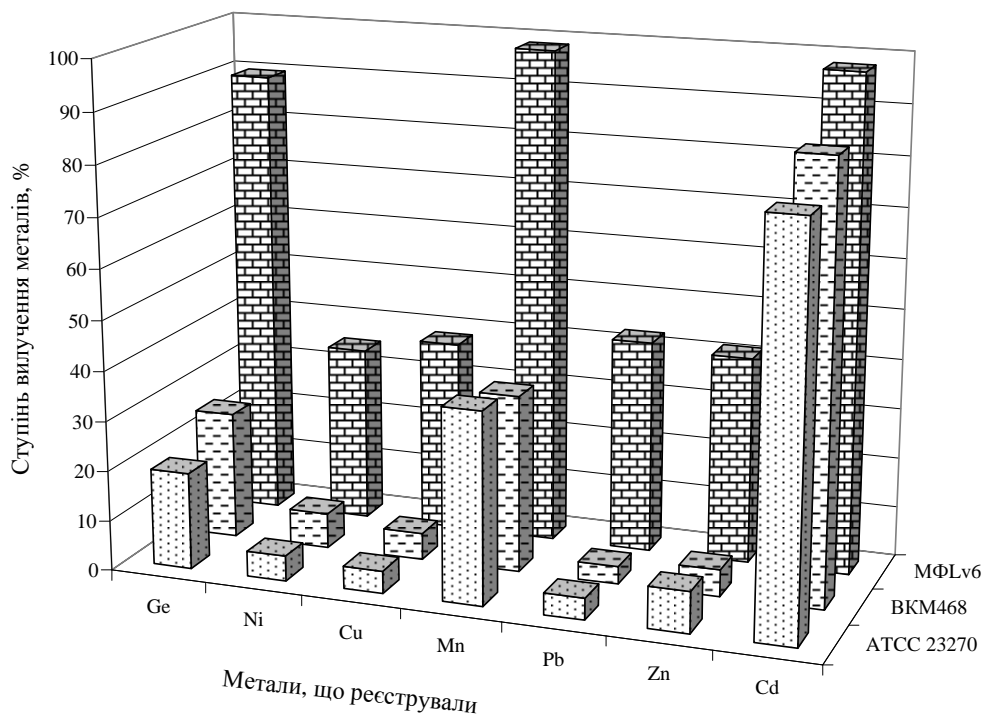


Рис. 1 - Ступінь вилучення металів із породних відвалів ізольованим, колекційним та типовим штамами ацидофільних хемолітотрофних бактерій

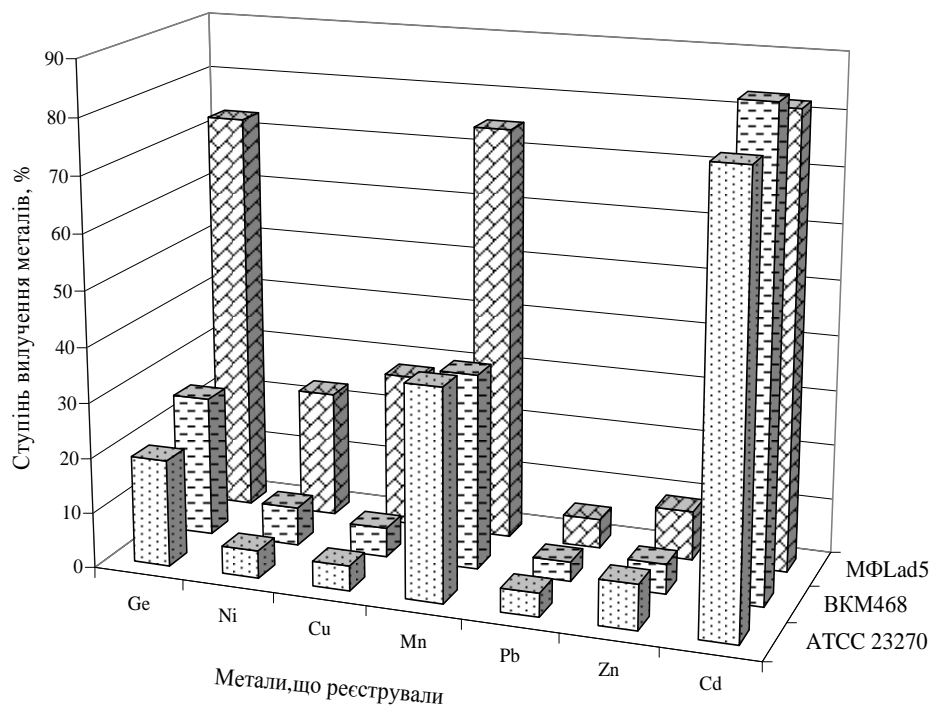


Рис. 2 - Ступінь вилучення металів із золи-виносу ізольованим, колекційним та типовим штамами ацидофільних хемолітотрофних бактерій

На наступному етапі було вивчена резистентність *A. ferrooxidans* МФLv6 і *A. ferrooxidans* МФLad5 до важких металів, які входять до складу техногенних відходів. Це є важливою еколого-фізіологічною властивістю мікроорганізмів різних таксономічних груп, завдяки чому відбувається поява стійких форм мікроорганізмів в об'єктах довкілля з підвищеним вмістом важких металів.

Визначення мінімальних концентрацій іонів міді, заліза, цинку, свинцю, кадмію, марганцю і германію, за яких ще відбувається ріст клітин *A. ferrooxidans* МФLv6 і *A. ferrooxidans* МФLad5, вивчали у процесі їх культивування на агаризованому середовищі 9К з залізом при додаванні сульфатів цих металів у постійно зростаючих концентраціях. Визначали мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК), за якої ще реєстрували ріст культур, що досліджували. Термін культивування – 7 діб, температура – $30,0 \pm 2,0$ °C, pH=3,0. Результати наведені у таблиці. Для порівняння були узяті типовий *A. ferrooxidans* АТСС 23270 і колекційний *A. ferrooxidans* ВКМ468 штамами. Наведені дані свідчать про високий рівень резистентності штамів, що

ізолювано з техногенних відходів підприємств вугільної та енергетичної промисловості до важких металів. При цьому мінімальні концентрації металів, при яких ще відбувається ріст штамів, в декілька разів перевищували їх встановлений вміст в техногенних відходах. Обидва штами однаково реагували на вплив марганцю, цинку, міді та германію. Найбільш чутливими штами *A. ferrooxidans* МФLv6 і *A. ferrooxidans* МФLad5 виявилися до кадмію; найбільш стійкими – до заліза. По негативному впливу на ріст обох штамів метали складають наступний ряд:



Таблиця 1

Мінімальні інгібуючі концентрації (МІК, мг/дм³) металів для штамів

A. ferrooxidans МФLv6 і *A. ferrooxidans* МФLad5

Елемент	МІК, мг/дм ³				Виявлені концентрації в твердих субстратах, мг/кг	
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> МФLv6	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> МФLad5	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ВКМ468	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> АТСС 23270	Породний відвал	Зола-винос
	Мідь	1200,0	1500,0	7,0		
Цинк	4500,0	4500,0	5,0	5,0	112,52	327,33
Марганець	1500,0	1650,0	7,0	5,0	317,72	572,60
Свинець	600,0	850,0	2,0	1,0	42,20	108,74
Кадмій	25,0	25,0	2,0	2,0	2,82	5,31
Залізо	150,0·10 ³	150,0·10 ³	10,0·10 ³	10,0·10 ³	44,57·10 ³	59,31·10 ³
Германій	150,0	150,0	12,0	15,0	26,00	28,00

При порівнянні стійкості нових штамів з типовим та колекційним встановлено, що останні були більш чутливими до металів, що входять до складу техногенних відходів.

Отримані дані про високий рівень резистентності ізолюваних штамів МФLv6 і МФLad5 до важких металів співпадають з нечисленними літературними даними. Такий високий рівень стійкості тіонових бактерій до металів пов'язаний з тим, що генетичною основою резистентності слугує наявність у бактерій позахромосомних факторів стійкості - плазмід та транспозонів [7], а також з різними чинниками: поганою проникністю клітинної

стілки для іонів важких металів, утворенням великої кількості слизу, що зв'язує і інактивує метали та ін. [8].

Отримані результати підтверджують значну різноманітність властивостей окремих штамів хемолітотрофних ацидофільних тіонових бактерій, що ізолювані із різної мінеральної сировини. Підтверджено, що основними факторами, які впливають на різноманіття штамів *A. ferrooxidans*, є те, що вони мешкають у різних екологічних нішах, у субстратах різного походження і фізико-хімічного складу. Проведені дослідження свідчать про необхідність проведення робіт за спрямованої селекції для отримання штамів, стійких до токсичних сполук і спроможних окислювати різні мінеральні субстрати, а також підтверджують висновки про необхідність адаптації культур, що будуть використовуватися для вилуговування металів, до нових конкретних субстратів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Состав и выщелачивающая активность микробиоценоза техногенных отходов энергетики [Електронний ресурс] / [Блайда И. А., Васильева Т. В., Слюсаренко Л. И. та ін.] // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013. – № 1. – Режим доступу до журналу:

<http://jrn1.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/4592>

2. Блайда И. А. Особенности сплывовариства хемолитотрофных бактерий відходів вуглезбагачення [Електронний ресурс] / И. А. Блайда // Проблеми екологічної біотехнології. – 2014. – № 1. – Режим доступу до журналу:

<http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/6658>

3. Васильева Т. В. Різноманітність сплывовариств мікроорганізмів у техногенних екосистемах паливно-енергетичного комплексу України [Електронний ресурс] / Т. В. Васильева // Проблеми екологічної біотехнології. – 2014. – № 1. – Режим доступу до журналу:

<http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/6660>

4. Зависимость фенотипических характеристик штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans* от физических, химических и электрофизических свойств пиритов /

[Тупикина О. В., Кондратьева Т. Ф., Саморукова В. Д. та ін.] // Микробиология. – 2005. – Т. 74 (5). – С. 596–603.

5. Tuovinen O. H. Bioleaching and mineral biotechnology / Tuovinen O. H., Fry I. J. // Current Opinion in Biotechnology. – 1993. – Vol. 4. – P.344–355.

6. Microbial desulfurization of coal with *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria / [Juszczak A., Domka F., Kozlowski M., Wachowska H.] // Fuel. – 1994. – Vol. 74 (5). – P.725–728.

7. Хмелев И. А. Плазмиды и эволюция микроорганизмов / И. А. Хмелев // Успехи современной биологии, 1985. – Т. 99. – Вып. 3. – С. 323–337.

8. Ferrous Iron-Dependent Volatilization of Mercury by the Plasma Membrane of *Thiobacillus ferrooxidans* / [Iwahori K., Takeuchi F., Kamimura K., Sugio T.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66 (9). – P. 3823–3827.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗВЛЕЧЕНИЯ РЕДКИХ И ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ ИЗ ОТХОДОВ ИЗОЛИРОВАННЫМИ, КОЛЛЕКЦИОННЫМ И
ТИПОВЫМ ШТАММАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Т.В. ВАСИЛЬЕВА

Биотехнологический научно-учебный центр

Одесского национального университета имени И.И. Мечникова

*Наиболее активной группой микроорганизмов в аборигенном консорциуме субстратов породных отвалов углеобогащения и золы-виноса от сжигания угля является группа ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов – представителей родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus*. Проведено сравнение окислительной активности новых изолированных из этих субстратов штаммов МФLv6 и МФLad5 с высоко активными коллекционным (*A. ferrooxidans* ВКМ468) и типовым (*A. ferrooxidans* ATCC 23270) штаммами с точки зрения извлечения редких и тяжелых металлов из техногенных отходов, а также установлена резистентность МФLv6 и МФLad5 к тяжелым металлам, которые входят в состав этих отходов. Установлена более*

высокая окислительная активность и устойчивость к ионам тяжелых металлов новых штаммов по сравнению с типовым и коллекционным штаммами рода *A. ferrooxidans*. Установлены минимальные ингибирующие концентрации тяжелых и токсичных металлов и составлен ряд металлов по негативному влиянию на рост изолированных культур. Показано, что минимальные концентрации металлов, при которых еще происходит рост штаммов, в несколько раз превышает их установленное содержание в техногенных отходах. Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости направленной селекции культур, устойчивых к токсичным соединениям и способных окислять различные минеральные субстраты, а также их адаптации к новым субстратам для извлечения редких и тяжелых металлов.

Ключевые слова: породные отвалы, зола-вынос, ацидофильные хемолитотрофные бактерии, изолированные штаммы, активность выщелачивания, резистентность, германий, ионы тяжелых металлов.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF RARE AND HEAVY METALS
RECOVERY FROM WASTE BY ISOLATED, COLLECTION AND TYPES
OF MICROBIAL STRAINS**

T.V. VASYLEVA

Biotechnological centre of I.I. Mechnikov Odessa National University

*A group chemolithotrophic acidophilus microorganisms – representatives of the genera *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* are the most active group of microorganisms in aboriginal consortium substrates coal tailing and fly ash from burning coal. A comparison of the oxidative activity of new isolated strains MFLv6 and MFLad5 with highly active collection (*A. ferrooxidans* UCM468) and typical (*A. ferrooxidans* ATCC 23270) strains in terms of the extraction of rare and heavy metals from man-made waste are made, MFLv6 and MFLad5 resistance to heavy metals, which are part of these wastes, are made. Higher oxidative activity and*

resistance to heavy metal ions of new strains compared with typical and collection strains A. ferrooxidans installed. Minimum inhibitory concentrations of heavy and toxic metals installed and a series of metal on the negative impact on the growth of isolated strains are made. It is shown that the minimum concentration of metals in which growth occurs even strains, several times higher than their fixed content of man-made waste. Studies indicate the need for targeted selection of strains that are resistant to the toxic compounds and can oxidize various mineral substrates, as well as their adaptation to the new substrate for the extraction of rare and heavy metals.

Keywords: *coal tailing, fly ash, chemolithotrophic acidophilic microorganisms, isolated strains, bioleaching activity, resistance, germanium, gallium, ions of heavy metals.*