

УДК 574; 579.84

## ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБОЦЕНОЗОВ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ РАСТВОРОВ ПОДЗЕМНОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ УРАНА МЕСТОРОЖДЕНИЙ «КАНЖУГАН»

<sup>1</sup>Канаев А.Т., <sup>2</sup>Канаева З.К.

<sup>1</sup>Казахский национальный педагогический университет им. Абая Министерство образования и науки Республики Казахстан;

<sup>2</sup>Казахский национальный технический университет им. К.И. Сатпаева, Алматы, e-mail: ashim1959@mail.ru

Для изучения микробоценозов проведено микробиологические обследования производственных растворов ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 месторождения Канжуган для обнаружения и выделения хемолитоавтотрофных бактерий четырех физиологических групп, которые по теоретическим предположениям могли способствовать подземному бактериальному выщелачиванию урана. Эти бактерии *A.ferrooxidans*, *A.thiooxidans*, сульфатредуцирующие и денитрифицирующие. При подходе к изучению микрофлоры урановых месторождений Южного Казахстана руководствовались двумя положениями: 1) изучить условия развития микроорганизмов, а также 2) обнаружить и учесть микроорганизмы, которые «отобраны средой». Поэтому степень активности микробов в экосистеме определяли учетом их численности и химическими анализами проб. Также были выполнены опыты с культурами *A.ferrooxidans* и *A.thiooxidans*, которые играли существенную роль в окислении урана.

**Ключевые слова:** микроорганизм, микробоценоз, хемолитоавтотрофные бактерий

## STUDY OF MICROBIOCENOSIS OF CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA OF IN SITU LEACHING SOLUTIONS OF «KANZHUGAN» URANIUM DEPOSITS

<sup>1</sup>Kanayev A.T., <sup>2</sup>Kanayeva Z.K.

<sup>1</sup>Abai Kazakh National Pedagogical University (Abai KazNPU);

<sup>2</sup>K.I. Satpayev Kazakh National Technical University, Almaty, e-mail: ashim1959@mail.ru

For studying of microbiocenoses, microbiological investigations of industrial solutions PR, BP, CNS and settling reservoir № 6 of Kanzhugan deposits for detection and isolation of hemolitoautotrophic bacteria of four physiological groups, which under theoretical assumptions could promote underground bacterial leaching of uranium, was carried out. These sulfate-reducing and denitrifying bacteria *A.ferrooxidans* and *A.thiooxidans*. In the process of study of microflora of uranium deposits of Southern Kazakhstan were guided by two positions: 1) study conditions of development of microorganisms, and also 2) find out and consider microorganisms, which are «selected by the environment». Therefore, the degree of microbial activity in the ecosystem determined based on their number and chemical analyses of samples. Also, experiences with cultures *A.ferrooxidans* and *A.thiooxidans*, which played a significant role in uranium oxidation, have been performed.

**Keywords:** microorganism, microbiocenosis, hemolitoautotrophic bacteria

ОО Таукентское горно-химическое предприятие расположено на территории Сузакского района Южно-Казахстанской области в пос. Таукент, в 230 км к северу от г. Шымкента. Добыча урана осуществляется на месторождениях Канжуган и Южный Моинкум методом подземного скважинного выщелачивания (ПСВ). В состав «Таукентского горно-химического предприятия» (далее – ТГХП) вошли два рудника «Канжуган», а также химико-металлургический (аффинажный) завод.

На месторождениях «Канжуган» добыча ведётся наиболее прогрессивным методом подземного скважинного выщелачивания, который позволяет щадить окружающую среду.

### Материалы и методы исследований

Определение железоокислительной способности  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  в среде. В колбы Эрленмейра на 100 мл вносили 30 мл стерильной среды Сильвер-

мана и Лундгрена 9К следующего состава (г/л):  $(NH_4)_2SO_4 - 2,0$ ;  $K_2HPO_4 - 1,0$ ;  $MgSO_4 - 0,5$ ;  $NaCl - 0,2$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 5,0$ ; pH среды доводили до 2,0 с  $H_2SO_4$ . О развитии бактерий *A.ferrooxidans* судили по появлению бурой окраски среды, вызванной образованием трехвалентного железа в бактериальном растворе. Способность бактерий окислять  $Fe^{2+}$  определяли по изменению в среде количества  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$ . Количество  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  определяли комплексонометрическим методом [1], с использованием в качестве титранта ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль). Метод основан на реакции образования комплексных соединений ионов металлов с органическими соединениями.

**Методы выделения, учета и изучения микроорганизмов.** В работе использовались методы работы с анаэробными микроорганизмами по Постгейту и Кембеллу (Campbell, Postgate, 1965; Postgate, Campbell, 1966) [2]. Сульфатвосстанавливающие бактерии культивировали в пробирках, которые доверху заполняли средой Старки следующего состава (г/л): водопроводная вода – 650 мл; пептон – 2,0; дрожжевой экстракт 2,0;  $K_2HPO_4 - 0,3$ ;  $MgSO_4 - 0,3$ ;  $(NH_4)_2SO_4 - 1,0$ ;  $Fe(NH_4)_2SO_4 - 0,15$ ;  $Na_2S_3 - 0,6$ ; лактат кальция – 3,0; аскорбиновая кислота – 0,15; pH 7,6

и закрывали стерильными резиновыми пробками так, чтобы под пробкой не оставалось пузырьков воздуха.

*Физико-химические методы исследования.* Изучение качественного и количественного состава микрофлоры месторождения проводили путем высева соответствующих проб руды или растворов на питательные среды. Пробы воды и руды отбирали стерильно, в соответствии с имеющимися руководствами [3]; рН и температуру измеряли во время отбора проб. Микробиологические посе́вы и анализы отдельных компонентов осуществляли в лабораторных условиях. Количественный учет жизнеспособных клеток проводили методом предельных десятикратных разведений. рН и окислительно-восстановительный потенциал среды измеряли на рН-метре ЭВ-74.

### Результаты исследований и их обсуждение

Технологический цикл на рудниках выглядит следующим образом: по данным геологоразведки составляется схема вскрытия рудных залежей, т.е. выбирается схема расположения откачных, закачных и наблюдательных скважин. В случае сомнений в достоверности геологических данных дополнительно бурятся скважины эксплуатационной разведки, которые позволяют уточнить геологическую информацию. На руднике «Канжуган» применяется как рядная схема вскрытия, т.е. закачные и откачные скважины бурятся в параллельных друг другу рядах, так и гексагональная семиточечная схема вскрытия, т.е. закачные скважины располагаются по сторонам правильного шестиугольника, а в центре располагается откачная скважина. В продуктивном ураноносном горизонте в скважине устанавливается фильтр.

Затем производится так называемая обвязка блоков, т.е. к блоку подводятся магистральные трубопроводы, по которым подаются выщелачивающие растворы, серная кислота, сжатый воздух.

От магистральных трубопроводов устраиваются ответвления к каждой ячейке или ряду. На блок устанавливается технологический узел закисления (ТУЗ), с помощью которого в выщелачивающие растворы подмешивается строго заданное количество кислоты, рассчитанное геотехнологами. В узле также находятся расходомеры, измеряющие расход выщелачивающего раствора на каждую закачную скважину и пневмоклапаны управляющие подачей кислоты в скважины. В блоке соблюдается баланс по ячейкам или по блоку между дебетом откачных скважин и подачей растворов в закачные скважины.

Откачные скважины оборудуются погружными скважинными насосами и обвязываются трубопроводами продуктивных

растворов с узлами регулирования продуктивных растворов (УРПР). УРПР в свою очередь соединяются с магистральными трубопроводами продуктивных растворов. В УРПР установлены расходомеры, позволяющие контролировать приход растворов от каждой откачной скважины, чтобы можно было соблюдать баланс по блокам и ячейкам.

После обвязки полигона начинается этап закисления. В закачные скважины подаются растворы с повышенным, по сравнению с последующими этапами выщелачивания, содержанием кислоты. Постоянно проводится химический анализ продуктивных растворов. В процессе закисления урановые минералы в недрах переходят в растворимую форму и через 2–3 месяца в продуктивных растворах появляется уран. На этом этапе закисление прекращается, начинается этап активного выщелачивания. Количество подмешиваемой кислоты уменьшается, и растворы подаются на участок переработки продуктивных растворов (УППР).

Продуктивные растворы с полигона попадают вначале в пескоотстойник продуктивных растворов, где осветляются от песка и других мехзвесей. Пескоотстойник расположен рядом с центральной насосной станцией, насосами которой растворы подаются на сорбционные колонны. В колоннах находится ионнообменная смола. Когда растворы проходят сквозь слой ионообменной смолы, уран из растворов связывается смолой и растворы из колонны выходят без урана, сливаются в пескоотстойник выщелачивающих растворов, расположенный также рядом с центральной насосной станцией, и насосами станции подаются на полигон. Насыщенная ураном до определённой концентрации смола порциями перекачивается в колонны десорбции, где с помощью раствора аммиачной селитры уран вытесняется со смолы в так называемый товарный десорбат, т.е. высококонцентрированный раствор урановых солей.

После того, как со смолы будет вытеснен уран, она перекачивается в аппараты денитрации, в которых раствором серной кислоты нитраты вытесняются в оборотный нитратный раствор и смолу опять можно перегружать в сорбционные колонны.

Товарный десорбат на каскаде осаждения может быть переработан в ХКПУ или подан в аффинажный цех для переработки в закись-окись природного урана.

Химконцентрат урана, получаемый на УППР, является промежуточным продук-

том в цикле получения закиси-оксида урана. Он представляет собой сложную смесь кристаллов диураната аммония, аммоний-уранилтрикарбоната, монокарбоната и полиуранатов переменного состава. В зависимости от соотношения кристаллов и примесей химконцентрат имеет вид кристаллов от лимонно-желтого до коричневого цвета, размером 0,1–1,0 мм плотностью 1,9–2,2 г/см<sup>3</sup>.

ЖКПУ является сырьем для гидроталлургических заводов, на которых из него получают нужную в ядерной энергетике продукцию. На предприятии для захоронения низко радиоактивных отходов имеется могильник построенный согласно проекту, согласованному с Южно-Казахстанской областной СЭС и Министерством экологии и биоресурсов РК.

В Сузаке благоприятные природные условия для добычи урана. Ураносодержащая руда – на глубине 400–500 метров. Сверху слой глины и суглинков — породы очень мягкой для бурения и в то же время являющейся идеальным природным герметиком.

Выщелачивание металлов осуществляется специфической физиологической группой бактерий: мезоацидофильными, хемолитотрофными бактериями *A.ferrooxidans*, *A.thiooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans* [4]. Бактерии *A.ferrooxidans* окисляют восстановленные соединения серы до сульфатов, а ионы двухвалентного железа до ионов трехвалентного. Бактерии *A.thiooxidans* способны окислять только восстановленные соединения серы, а *L.ferrooxidans* – только ионы Fe(II). В процессах выщелачивания возможно и активное участие бактерий *p.Sulfolobus*. В природных условиях выщелачивание осуществляется ассоциациями разных микроорганизмов.

Микроорганизмы, окисляющие сульфиды металлов, растут при pH 1,0–3,5 (*A.thiooxidans* до pH 0,65). Для *A.ferrooxidans* оптимальный pH 2,0. Эти микроорганизмы наиболее устойчивы к высокой концентрации тяжелых металлов в растворе. *A.ferrooxidans* может переносить концентрации Fe<sup>2+</sup> – 40 г/л, Cu<sup>2+</sup> – 70 г/л, Zn<sup>2+</sup> – 119 г/л, Ni<sup>2+</sup> – 70 г/л.

Окисление микроорганизмами железа, находящегося в природных сульфидных минералах, – сложный процесс. Он состоит из следующих этапов: прикрепление бактерий к поверхности минерала, его деструкция, растворение серы, транспорт S<sup>0</sup>, Fe<sup>2+</sup> или ионов других металлов в клетку и их окисление.

Прямое выщелачивание осуществляется в результате электрохимической коррозии, зависит от состава и структуры минералов и активируется бактериями. Бактерии ускоряют электрохимический процесс окисления S<sup>0</sup> и Fe<sup>2+</sup>, снижая электродный потенциал сульфидов и повышая Eh среды. Окисление Fe<sup>2+</sup> в присутствии бактерий ускоряется до 500 тыс. раз, а сульфидных минералов – в сотни и тысячи раз.

Прикрепляясь к окисляемому субстрату, бактерии воздействуют на электродный потенциал на его поверхности. При этом электродный потенциал снижается, а окислительно-восстановительный потенциал среды возрастает, т.е. создаются окислительные условия. Сульфид выступает как анод. При отсутствии бактерий электродный потенциал минерала и окислительно-восстановительный потенциал среды близки, сульфид не окисляется. В смеси различных сульфидных минералов, образующих гальванические пары, бактерии прежде всего окисляют сульфидные минералы с более низким электродным потенциалом.

Для изучения микробоценозов нами было проведено микробиологические обследования производственных растворов ПР (производственный раствор), ВР (выщелачивающий раствор), ЦНС (центральная насосная станция) и отстойника № 6 месторождения Канжуган для обнаружения и выделения хемолитоавтотрофных бактерий четырех физиологических групп, которые по теоретическим предположениям могли способствовать подземному бактериальному выщелачиванию урана. Это бактерий *A.ferrooxidans*, *A.thiooxidans*, сульфатредуцирующие и денитрифицирующие.

При подходе к изучению микрофлоры урановых месторождений Южного Казахстана мы руководствовались двумя положениями:

- 1) изучить условия развития микроорганизмов;
- 2) обнаружить и учесть микроорганизмы, которые «отобраны средой».

Поэтому степень активности микробов в экосистеме определяли учетом их численности и химическими анализами проб. Также были выполнены опыты с культурами *A.ferrooxidans* и *A.thiooxidans*, которые играли существенную роль в окислении урана.

Результаты физико-химические обследования месторождения «Канжуган» приведены в табл. 1. Из данных табл. 1 видно, что температура растворов месторождения

«Канжуган» приблизительно одинакова (18°C), pH растворов имеют кислую реакцию среды (pH 2,0–2,2). Одним из важных факторов является окислительно-восста-

новительный потенциал (ОВП). Величина ОВП в условиях раствора уранового рудника была + 405 + 518 мВ. Эти границы благоприятны для развития *A.ferrooxidans*.

**Таблица 1**

Физико-химическая характеристика растворов месторождения «Канжуган»

Место отбора проб	pH	ОВП, мВ	U, мг/л	Железо, мг/л		
				Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sub>общ.</sub>
ПР	2,06	420	65,5	160	500	660
ВР	2,05	410	3,1	100	550	650
ЦНС	2,23	405	63,0	80	470	550
Отстойник № 6	2,03	518	54,4	880	30	920

Минимальное значение содержания общего железа в растворе центральной насосной станции составляет – 550 мг/л. Максимальное значение достигает до 920 мг/л в отстойнике № 6. В основном концентрация железа представлена 70–80% в закисной форме. Только в растворах отстойника № 6 почти все железо находится в окисной форме (Fe<sup>3+</sup>). Уран присутствует

во всех пробах, но в ПР значение урана больше, так как является продуктивным раствором. В результате микробиологического обследования технологических растворов месторождения Канжуган методом предельных десятикратных разведений нами было выявлены *A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans* в небольшом количестве (табл. 2).

**Таблица 2**

Количество хемолитотрофов в растворах месторождения «Канжуган»

Место отбора проб	Количество клеток в 1 мл раствора			
	<i>A.ferrooxidans</i>	<i>A.thiooxidans</i>	Сульфатредуцирующие	Денитрифицирующие
ПР	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	не обнаружено	не обнаружено
ВР	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	не обнаружено	не обнаружено
ЦНС	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	не обнаружено	не обнаружено
Отстойник № 6	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	не обнаружено	не обнаружено

Как видно из табл. 2, тионовые бактерий встречаются во всех вариантах исследуемой нами растворах. Их количество варьирует в пределах от 10<sup>1</sup> до 10<sup>3</sup> кл/мл. Минимальное количество *A. ferrooxidans* во всех отобранных пробах раствора составляет 10<sup>2</sup> кл/мл, кроме пробах отобранных из ВР, что достигает до 10<sup>3</sup> кл/мл. В растворах ПР и ЦНС количество *A. thiooxidans* составляет всего 10<sup>1</sup> кл/мл, в растворе из отстойника № 6 их количество достигает до 10<sup>2</sup> кл/мл. Максимальное количество *A. thiooxidans* (10<sup>3</sup> кл/мл) встречается в растворе из ВР.

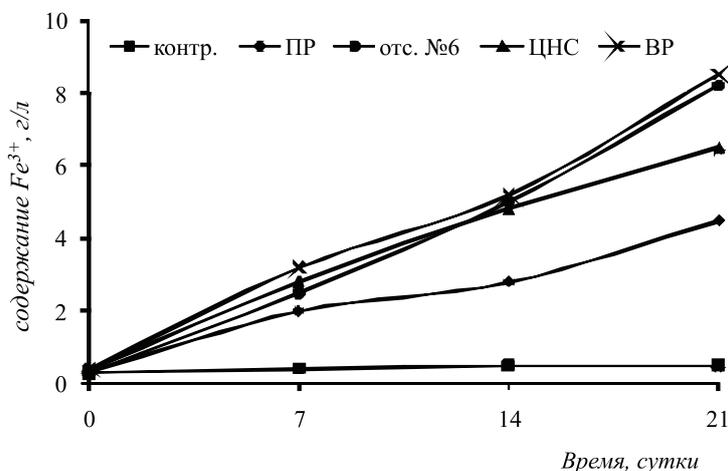
Тогда как, представители сульфатредуцирующих и денитрифицирующих бактерий отсутствовали во всех вариантах обследованных нами пробах производственных растворах ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 месторождения Канжуган. Представители сульфатредуцирующих и денитрифицирующих бактерий не способны расти в кислой среде. Поэтому в обследованных точках они закономерно небыли обнаружены.

Таким образом, нужно отметить, что производственных растворах ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 месторождения Канжуган из представителей хемолитоавтотрофных бактерий *A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans* встречается в умеренном (10<sup>1</sup> кл/мл) и достаточном (10<sup>3</sup> кл/мл) количестве, что объясняется благоприятными условиями для поддержания жизнедеятельности этих бактерий – оптимальное pH, ОВП и температур. Представители сульфатредуцирующих и денитрифицирующих бактерий отсутствовали во всех вариантах обследованных нами пробах. В дальнейшем культуру *A. ferrooxidans*, выделенную из различных точек месторождения «Канжуган» проверили на активность окисления Fe<sup>2+</sup>.

Опыт проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. На 200 мл среду 9К Сильвермана и Люндгрена добавляли в качестве инокулята производственных растворов ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 в количестве 40 мл. Аэрацию проводили на качалке при

180 об./мин, при температуре 30°C. Общая длительность опыта составлял 21 суток (рисунок). Поскольку аборигенная культу-

ра *A. ferrooxidans* менее активная, динамику окисления железа определяли в неделю один раз.



Динамика образования  $Fe^{3+}$  при окислений  $Fe^{2+}$  культурой *A. ferrooxidans* в производственном растворе ПР, ВР, ЦНС, отс. № 6 месторождения «Канжуган»

Как видно из рисунка, за 21 сутки максимальное окисление закисного железа (8,5 г/л) было осуществлено культурой выделенной из раствора отстойника № 6 и выщелачивающего раствора. *A. ferrooxidans*, выделенный из продуктивного раствора за аналогичное время окисляет всего 4,0 г/л  $Fe^{2+}$ . Промежуточное положение по способности окисления закисного железа (6,5 г/л) занимает культура *A. ferrooxidans*, выделенная из раствора ЦНС.

Таким образом, *A. ferrooxidans*, выделенные из раствора отстойника № 6 и ВР в лабораторных условиях проявляют наибольшую активность.

Способность *A. thiooxidans* окислять сульфиды нашла практическое применение для бактериального выщелачивания бедных руд. В настоящее время этот процесс используется в основном для обогащения урановых руд с настолько низким содержанием урана [5], что их неэкономично обрабатывать обычным способом. Учитывая тот факт, что *A. thiooxidans* интенсивно окисляет серу до серной кислоты, изучали окислительной активности культуры *A. thiooxidans*.

Источником энергии для *A. thiooxidans* служит процесс окисления молекулярной серы. Одна из основных способностей *A. thiooxidans* — это его способность развиваться при низкой кислотности окружающей среды. Культура *A. thiooxidans* широко

распространена в обследованных нами урановых месторождениях. На жидкой среде Ваксмана эта культура образует равномерную мусть, а рН среды снижается с 4,0 до 2,0 и ниже.

Постановка опыта аналогична как предыдущие опыты. В качестве среды для роста *A. thiooxidans* применяли ср. Ваксмана., исходная концентрация раствора составлял рН 4,0.

Как видно из табл. 3, во всех вариантах опыта через 21 суток наблюдается снижение рН раствора, то есть идет образование серной кислоты в среде. Интенсивное подкисление среды наблюдается с раствором ВР, затем заметно с раствором отстойника № 6, ПР, ЦНС. Максимальное изменение рН наблюдается в ВР и отстойнике № 6. Визуально, именно в этих колбах наблюдалось интенсивное помутнение, значительное снижение рН среды и рост ОВП. Микроскопирование выявило значительного накопления клеток *A. thiooxidans*.

Таким образом, *A. thiooxidans* интенсивно окисляет серу до серной кислоты и играет большую роль в окислении минеральной серы. Подкисление среды проходит по такой последовательности: ВР → отстойника № 6 → ЦНС → ПР. Этот факт также соответственно подтверждает изменение окислительно-восстановительного потенциала среды.

**Таблица 3**

Изменение pH и ОВП при окислении урана накопительной культурой *A.thiooxidans* в среде Ваксмана

Место отбора проб воды	A. thiooxidans, кл/мл	Продолжительность 21 сутки			
		pH начальный	pH конечный	ОВП начальный	ОВП конечный
ПР	107	4,0	3,5	282	310
ВР	107	4,0	2,9	303	345
ЦНС.	107	4,0	3,3	232	278
Отстойник № 6	107	4,0	3,2	280	317

**Список литературы**

1. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии // Химия. – 1989. –276 с.  
 2. Меджидов М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам. –М., 2003.

3. Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Экология водных микроорганизмов. – М., 1977. – 288 с.  
 4. Илялетдинов А.Н. Микробиологические превращения металлов. –Алма-Ата: Изд-во «Наука», 1984.  
 5. Канаев А.Т. Интенсификация процесса извлечения урана биотехнологическим способом из бедных руд. – Алматы, 2010. – 143 с.