УДК 581.52;550.72

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ САПРОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ШАХТНЫХ ВОДАХ И РУДНОМ ТЕЛЕ ЗОЛОТО-МЫШЬЯКОВИСТОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ БАКЫРЧИК

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

1 «Казахский национальный университет им.аль-Фараби, kanaeva1992@mail.ru
2 «Казахский национальный технический университет им.К.И.Сатпаева»,
3 «Институт микробиологии и вирусологии» Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, пр. аль-Фараби, 71

Объектами исследований являлись аборигенные штаммы хемолитотрофных микроорганизмов, распространенные в шахтных водах и рудном теле месторождения Бакырчик. Целью данного исследования являлось выделение наиболее активных аборигенных штаммов хемолитотрофных бактерий из участков кучного выщелачивания золота месторождения «Бакырчик». Тионовые бактерии были распространены в слабокислой воде (pH= 5,0), сапрофитные – в нейтральной и слабощелочной воде. 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. Из образцов шахтных вод и пород рудного тела с повышенным количеством тионовых бактерий были получены накопительные культуры, из которых выделены чистые культуры тионовых бактерий.

Ключевые слова: сапрофитные микроорганизмы, кучное выщелачивание, предварительная идентификация

DISTRIBUTION OF SAPROPHYTIC MICROORGANISMS IN MINE WATERS AND THE ORE THING ARSENIC-GOLD PLACE OF BIRTH BAKYRCHIK

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

1 Kazakh National University after named al-Farabi, kanaeva1992@mail.ru
2 Kazakh National Technical University after named K. Satpayev,
3 Institute of microbiology and virology Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, al-Farabi street 71

Objects of investigation are native strains of microorganisms Chemolithotrophic distributed mine waters and orethingplace of birth Bakyrchik. The purpose of this study was to determine the most active indigenous strains of bacteria Chemolithotrophic sites heap leach gold mine «Bakyrchik». Thiobacteria were common in the slightly acidic water (pH = 5,0), saprophytic - in neutral and slightly alkaline water. The highest number of A. ferrooxidanswas timed to the sedimentary and carbonaceous clay rocks. Clayey of overburden stripping rock, gray sandstone, tuff and siliceous ash formation contained the largest number Th. thiooxidans. Samples of rocks with the findings thiobacteria had slightly acid reaction. Samples from mine waters and rocks of the ore thing with an increased number thiobacteria were obtained enrichment cultures from which pure cultures isolated thiobacteria.

Key words: saprophytic microorganisms, heap leaching, preliminary identification

Введение

Республика Казахстан относится к одной из важнейших золотоносных провинций центрально-азиатского региона. По уровню запасов, их качеству основные золоторудные месторождения Казахстана сопоставимы с месторождениями зарубежных стран и в принципе могли бы обеспечить более высокий уровень производства золота в стране. Вместе с тем, при неблагоприятной мировой конъюнктуре золота, неизбежным становится предъявление более жестких требований к качественным и количественным параметрам отдельных месторождений и к минерально-сырьевой базе в целом.

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.

Получение накопительной культуры для выделения культуры в колбы Эрленмейра на 100мл вносили 30мл стерильной среды Сильвермана и Лундгрена 9К и пробы рудничной воды или руды из месторождений сульфидных руд, затем инкубируют при 30ºС 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 30ºС до появления роста. Для выделения штаммов бактерии, активных в окислении сульфидных минералов и устойчивых к ионам тяжелых металлов, использовали также сульфидные минералы.

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 полченной 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.

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 [3].

Учет *Th.thiooxidans* вели по появлению неисчезающей мути и оседанию серы, по образованию пленки серы, подкислению среды и другим специфическим признакам на среде Ваксамана (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°) – 10; 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 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

Известно, что некоторые виды сапрофитных бактерий, обитающих на месторождении, обладают способностью к автотрофному росту в связи с чем также относятся к хемолитотрофам.

Численность сапрофитной микрофлоры варьировала в пределах 10^2 - 10^7 кл./мл шахтной воды. В пробах руды и шахтных вод, где реакция среды колебалась в пределах от pH 5,0 до 5,5; численность сапрофитных бактерий не превышала 10^2 кл./мл воды.

Отмеченная закономерность позволяет предположить, что сапрофитные микроорганизмы, обнаруженные на месторождении, являются представителями обычной сапрофитной микрофлоры, оптимумом для развития которой является нейтральная и слабокислая реакция среды (рис. 1).

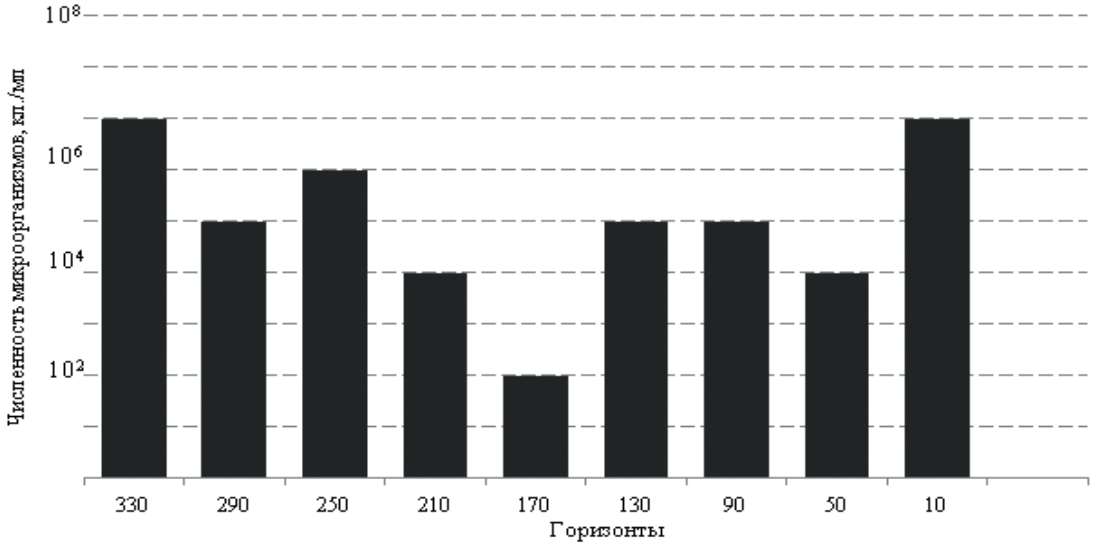

Рис. 1. Численность сапрофитных микроорганизмов в шахтных водах

Наблюдающаяся дифференциация распространения сапрофитов в зависимости от pH вод, по-видимому, отражает уменьшение общего их числа в зоне гипергенеза на месторождении. Непосредственно после вскрытия рудного тела, шахтные воды имеют преимущественно нейтральную реакцию, что благоприятствует развитию сапрофитных микроорганизмов, кислые рудничные воды в этот период встречаются лишь микрозонально и возможна широкая миграция в них различных микроорганизмов. Затем, по

мере развития окислительных процессов на месторождении, воды приобретают кислую реакцию, что приводит к сокращению численности сапрофитов, предпочитающих нейтральную среду.

Распределение сапрофитных бактерий в карьерном рудном теле представлено на рис. 2. Сапрофитные микроорганизмы встречались во всех породах рудного тела. Наибольшая численность микроорганизмов отмечена в кызыловской зоне смятия с песчано-сланцевыми отложениями бакырчикской свиты и в углисто-глинистом аргиллите и алевролите – 107 кл./г, наименьшая – в терригенно-осадочной породе каменноугольной системы и в линзовидном маломощном известняке и андезитовых порфиритах – 103 кл/г. В остальных породах их количество варьировало в пределах 105-106 кл./г. Следует отметить, что распределение сапрофитных микроорганизмов в шахтных водах и рудном теле несколько отличаются. Сланцевые и углистые породы руды в большей степени адсорбируют микроорганизмы, чем осадочные породы. Вероятно, в данном случае углеродсодержащие породы используются микроорганизмами как источник углерода. Возможно также присутствие питательных веществ из остатков растительности, накопившихся в углях и сланцах.

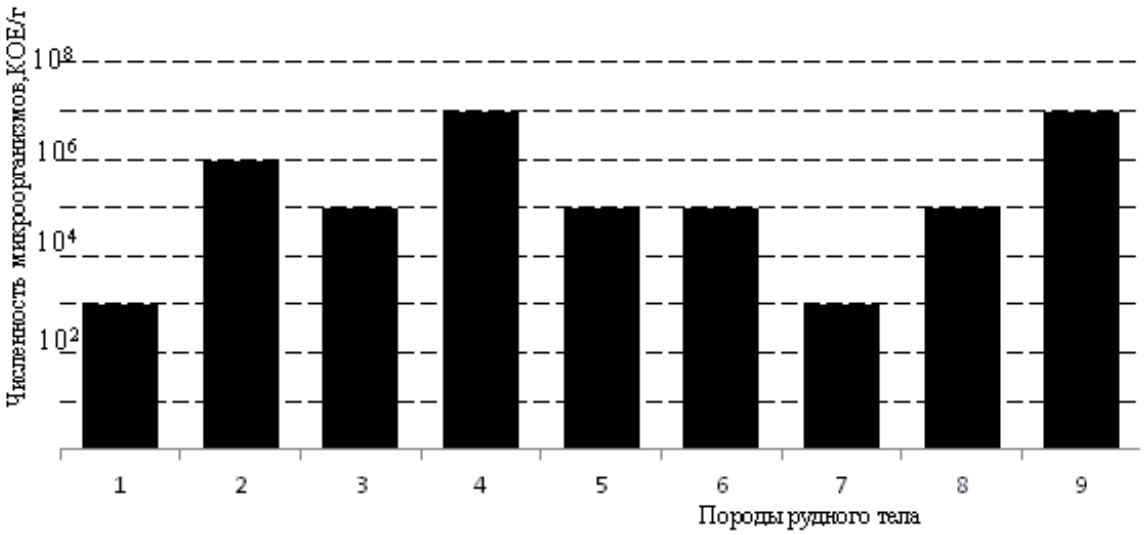

Рис. 2. Численность сапрофитных микроорганизмов в рудном теле

Таким образом, в распределении сапрофитов в руде более значительную роль играет наличие дополнительного источника питания, тогда как в шахтных водах – кислотность среды.

Выделение аборигенных штаммов хемолитотрофных бактерий

Среди автотрофных тионовых бактерий ведущая роль в окислении сульфидных руд принадлежит *A.ferrooxidans*. Эти микроорганизмы обладают способностью в кислых условиях окислять закисное железо в окисное, а также сульфиды в сульфаты и таким образом интенсифицировать скорость выщелачивания металлов из руд [4]. В благоприятных условиях скорость бактериального окисления железа в 200-500 тысяч раз выше, чем под действием кислот [9]. При окислении 1-атома двухвалентного железа прирост сухой биомассы клеток достигает 0,35 г [10].

Выделение новых микроорганизмов из рудничных месторождений и знание их физиологии позволит расширить применение микробиологических методов, выщелачивания и обогащения руд, которые приобретают все большее значение в связи с истощением запасов богатых руд [2, 5, 6, 7, 8].

С целью получения накопительных культур *A. ferrooxidans* использовали образцы руды и шахтной воды, в которых в результате микробиологического обследования была отмечена повышенная численность тионовых бактерий – это образцы

воды из горизонтов 10 и 330, а также рудный материал из карьера - кызыловская зона смятия с песчано-сланцевыми отложениями бакырчикской свиты и углисто-глинистый аргиллит и алевролит.

Для получения накопительной культуры *A.ferrooxidans* использовали элективную среду Сильвермана и Лундгрена 9К. Считается, что повышенная кислотность этой среды препятствует развитию обычной сапрофитной микрофлоры и создает условия для преимущественного развития автотрофных тионовых бактерий. В колбы Эрленмейера емкостью 250 мл со средой Сильвермана и Лундгрена 9К в объеме 150 мл добавляли пробы шахтной воды или руды. Для микробиологического обследования рудного тела в соответствии с данными по распределению руды и золота были отобраны пробы руды с различных горизонтов с разнообразным геолого-минералогическим составом. Колбы инкубировали в течение 7-10 суток при оптимальной температуре (28 - 30^{0}С). О развитии бактерий *A.ferrooxidans* судили по появлению бурой окраски среды, вызванной образованием соединений трехвалентного железа в растворе. Результаты этих экспериментов представлены в таблице 1. Как видно из результатов таблицы активность ацидофильных бактерий в накопительных культурах варьировала в пределах 1-5 баллов, зависела в основном от длительности наблюдения.

По интенсивности окрашивания среды и количеству ионов Fe3+ в среде отбирали наиболее активные штаммы, готовили ряд последующих разведений для определения титра культуры и дальнейшего изучения свойств культуры. На рисунке 3 показана чистая стерильная среда Сильвермана и Лундгрена 9К, подготовленная для определения титра бактерий в исследуемых пробах, а также в накопительных и чистых культурах. После нескольких пересевов из накопительных культур A. ferrooxidans в стерильную среду Сильвермана и Лундгрена 9К культуры были очищены и проверены на активность. Наиболее активно развивались культуры, выделенные из проб руды. Всего на идентификацию было отобрано 6 штаммов ацидофильных бактерий. За 10 суток культивирования их титр возрастал до 107 кл./мл.

Таблица 1

Активность накопительных культур ацидофильных бактерий

№ накопительной культуры	№ Пробы отбора	Активность окисления $FeSO_4$ (баллы) за период наблюдения (сутки)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	-	-	-	-	-	+5	+5	+5	+5	+5
2	1	-	-	-	-	-	-		+1	+1	+1
3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	3	-	-	-	-	-	-	-	+5	+5	+5
9	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	4	-	-	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
13	5	-	-	-	-	-	+5	+5	+5	+5	+5
14	5	-	-	-	-	-	+4	+4	+4	+5	+5
15	5	-	-	-	-	-					
16	6	-	-	+4	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
17	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	7	-	-	-	-	+1	+1	+1	+1	+1	+1
22	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Было отмечено, что в процессе пересевов активность окисления Fe2+ возрастает, так как происходит адаптация бактерий к искусственным средам.

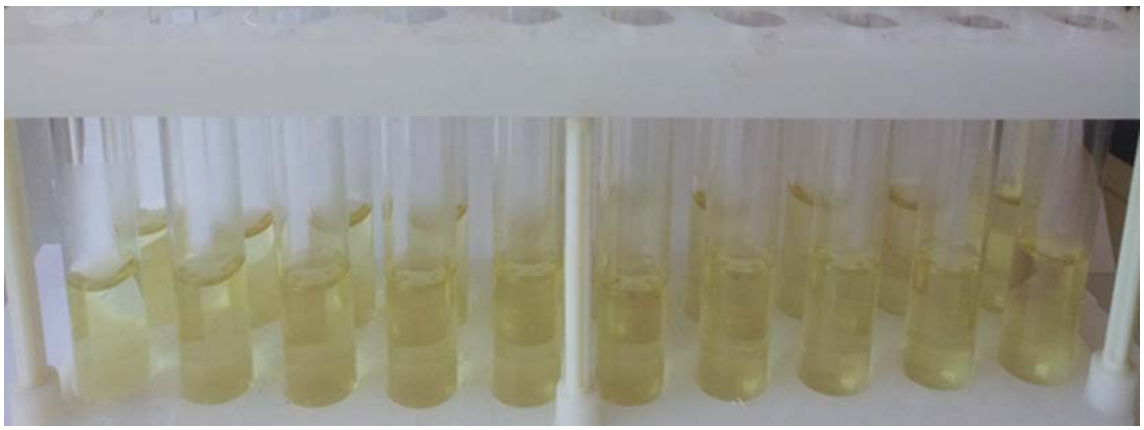

Рис. 3. Среда Сильвермана и Лундгрена 9К (исходная)

На рис. 4 отмечено изменение цвета среды – появление бурого окрашивания, которое свидетельствует о росте *A.ferrooxidans*. По последней пробирке, в которой произошло изменение цвета среды, определяется титр культуры.

Были предприняты попытки культивировать A. ferrooxidans на твердых средах. В первом посеве удалось получить мелкие коричневатые колонии, однако в последующих пересевах рост культуры отсутствовал. В связи с этим накопительные и чистые культуры A. ferrooxidans поддерживали на жидкой среде Сильвермана и Лундгрена 9К.

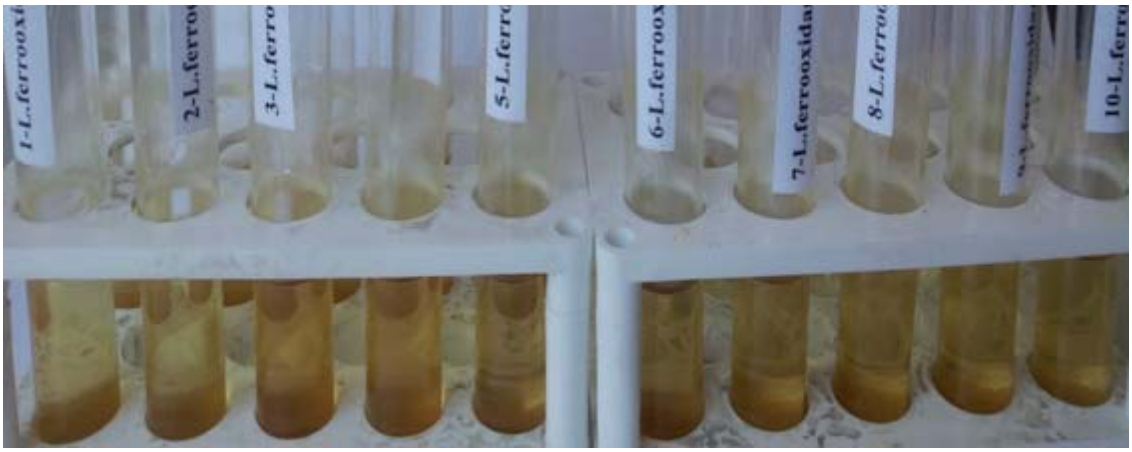

Рис. 4. A.ferrooxidans в среде Сильвермана и Лундгрена 9К после 10 суток культивирования

Заключение

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

– Распределение сапрофитных микроорганизмов в шахтных водах и рудном теле несколько отличаются. Сланцевые и углистые породы руды в большей степени адсорбируют микроорганизмы, чем осадочные породы. Тионовые бактерии были распространены в слабокислой воде (pH= 5,0), сапрофитные – в нейтральной и слабощелочной воде.

– Из образцов шахтных вод и пород рудного тела с повышенным количеством тионовых бактерий были получены накопительные культуры, из которых выделено 6 чистых культур тионовых бактерий.

Список литературы

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

2. Воронин Д.Ю. Исследование и разработка технологии бактериального выщелачивания медно-цинковых промпродуктов при обогащении упорных сульфидных руд: Автореф. дис. канд. техн. наук. М., 2000. 24 с.

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

4. Канаева З.К., Канаев А.Т. Микробиоценозы хемолитотрофных бактерий растворов подземного выщелачивания уранового месторождения «Уванас» и «Мынкудук», Журнал «Фундаментальные исследования», (Россия), Биологические науки. № 11 (1). 2012., С. 20-24.

5. Каравайко Г.И. Биогеотехнология металлов: Под ред. Нетрусова А.И. М.: Наука, 2004. С. 199-220.

6. Левенец О.О. Научно-техническое обоснование способов биовыщелачивания в мезофильных условиях сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения Шануч (Камчатка): Автореф. дис. канд. техн. наук. П-Камчатский. 2012. 24 с.

7. Мавжудова А.М., Черкасова Г.В, Борминский С.И. Биотехнология переработки техногенных образований ОАО «Алмалыкский ГМК» // Материалы семинара «Проблемы переработки минерального сырья Узбекистана». Ташкент. 2005. С. 3-5.

8. Холматов М.М., Калинин В.П. Проблемы переработки техногенных отходов // Горный вестник Узбекистана. 2003. № 4. С. 10-11.

9. Lacey D.T., Lawson F. Kinetics of liquidphase oxidation of acid ferrous by the bacterium Thiobacillus ferrooxidans// Biotecnol., Bioeng. 1970. V. 12. № 1. P. 29.

10. Tuovinen O.H., Kelly D.P. Biology of Th. ferrooxidans in relation to the microbiological leaching of sulfide ores //Z. Allg. Micribiol. 1972. V. 12. № 4. P. 311-396.