

УДК 546.73:550.72:579.66

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФОВ, АДАПТИРОВАННЫХ К ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КОБАЛЬТА

Хомченкова А.С.

ФГБУН «Научно-исследовательский геотехнологический центр» Дальневосточного отделения  
Российской академии наук, Петропавловск-Камчатский, e-mail: bioleaching@yandex.ru

В последние двадцать лет проявляется всё больший интерес к исследованиям взаимодействий микроорганизмов с металлами. Существует множество вариантов металл-микробных отношений, но из-за их сложности многие из этих механизмов всё еще изучаются. Исследуя метаболические стратегии микробного противостояния токсическому воздействию металлов, человек может создать улучшенные штаммы микроорганизмов и использовать их в биотехнологии при добыче ценных компонентов из руд и отходов горной промышленности. В технологии бактериально-химического выщелачивания (БХВ) используют сообщества микроорганизмов, эволюционно приспособленных к присутствию металлов во внешней среде. Но концентрации металлов в пульпах выщелачивания способны угнетать метаболизм даже устойчивых штаммов, в связи с этим необходимо проводить адаптацию микробных сообществ, а также осуществлять подбор штаммов перед их использованием в промышленных условиях. Статья описывает опыт адаптации смешанной культуры ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (в её составе идентифицированы *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus spp.*), полученных из сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения Шануч (Камчатский край, Россия), к высоким концентрациям ионов кобальта (12, 14, 16, 18, 20 г/л) в питательной среде 9 К с железом; рост культуры сохранялся при всех вариантах концентраций кобальта, превышая показатели роста в контроле (в среде без ионов кобальта). Наблюдение за таким важным фактором жизнедеятельности микроорганизменного сообщества, как окислительная активность, провели для образца, адаптированного к 20 г/л ионов кобальта. Скорость окисления железа адаптированной культурой была приблизительно в два раза выше, чем контрольной.

**Ключевые слова:** хемолитотрофные микроорганизмы, кобальт, окисление железа, устойчивость, бактериально-химическое выщелачивание, сульфидные руды

## THE OXIDATION ACTIVITY OF ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHIC CULTURE, ADAPTED TO HIGH COBALT CONCENTRATION

Khomchenkova A.S.

Scientific Research Geotechnological Centre Far Eastern Branch of Russian Academy of Science,  
Petropavlovsk-Kamchatsky, e-mail: bioleaching@yandex.ru

In the past twenty years, there has been an increasing interest in research on the interactions of microorganisms with metals. There are many options for metal-microbial relationships, but because of their complexity, many of these mechanisms are still being studied. By studying the metabolic strategies of microbial resistance to the toxic effects of metals, a person can create improved strains of microorganisms and use them in biotechnology while extracting valuable components from ores and mining waste. In the technology of bacterial-chemical leaching (BCL), communities of microorganisms evolutionarily adapted to the presence of metals in the environment are used. In metal concentrations in leaching pulps are able to inhibit the metabolism of even resistant strains; therefore, it is necessary to adapt microbial communities, as well as to select strains before using them in industrial conditions. The article describes the experience of adaptation of a mixed culture of acidophilic chemolithotrophic microorganisms (in its composition *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus spp.*), obtained from the sulfide cobalt-copper-nickel ore of the Shanuch deposit (Kamchatka Krai, Russia) to high concentrations of cobalt ions (12, 14, 16, 18, 20 g/l) in the nutrient medium 9K with ferrous; the growth of the culture persisted in all cobalt concentrations, exceeding growth in the control (in a medium without cobalt ions). Observation of such an important factor in the vital activity of the microorganism community, as oxidative activity, was carried out for a sample adapted to 20 g/l of cobalt ions. The rate of iron oxidation by the adapted culture was approximately twice that of the control culture.

**Keywords:** chemolithotrophic microorganisms, cobalt, ferrous oxidation, resistance, bacterial-chemical leaching, sulphide ores

Помимо антропогенного внесения, металлы присутствуют в природных средах в постоянном фоновом количестве. Микроорганизмы различного обитания способны выживать в присутствии металлов, однако именно металл-толерантные микроорганизмы отличаются особой устойчивостью к токсическому воздействию металлов. Такие организмы хорошо приспособлены и к широкому диапазону температур, pH,

окислительно-восстановительному потенциалу участка, это связано с экстремальными условиями их естественных резервуаров: места залежей руд, гидротермальные источники, близость к действующим вулканам [1, 2].

Молекулярные механизмы, используемые микроорганизмами для выживания в богатых металлами средах, могут быть полезны человеку в различных областях

биотехнологии, таких как биоремедиация загрязненных почвы и воды, добыча и обогащение полезных ископаемых. Например, применение металл-толерантных микроорганизмов в бактериально-химическом выщелачивании (БХВ) позволяет извлекать ценные компоненты из низкосортных, бедных руд или отходов горной добычи [3, 4].

В пульпах чанового БХВ концентрации ионов металлов могут превышать природные (например, в рудных месторождениях), они способны как ингибировать активность микробной популяции, угнетая её метаболизм, так и способствовать выработке микроорганизмами устойчивости к повышенным уровням металлов. Используя генетическую и метаболическую основы природных механизмов резистентности к металлам, учёные могут получить улучшенные штаммы биотехнологически значимых микроорганизмов [1, 4].

Большая продолжительность процессов БХВ является существенным недостатком и ставит перед учёными вопрос об интенсификации этих процессов. К вариантам решения данной проблемы относят повышение биоактивности микроорганизмов. Селекция наиболее активных смешанных и чистых культур, адаптированных к условиям протекания БХВ, позволит повысить эффективность извлечения ценных компонентов из сырья [5].

Задачей описанного в статье эксперимента являлась адаптация сообщества аборигенных микроорганизмов сульфидной кобальт-медно-никелевой руды к высоким «промышленным» концентрациям ионов кобальта в питательной среде и наблюдение за окислительной активностью адаптированной культуры. Стояла цель выявить, обладают ли клетки исследуемой культуры микроорганизмов, полученной из рудного месторождения, природными механизмами резистентности к токсическому воздействию кобальта.

#### Материалы и методы исследования

Эксперимент был проведен с использованием смешанной культуры мезофильных ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (по данным ПЦР-диагностики НИГТЦ ДВО РАН в составе культуры идентифицированы *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus* spp.). Источником культуры служила окисленная сульфидная кобальт-медно-никелевая руда (месторождение Шануч, Камчатский край, Россия). Для данной руды характерно содержание 60–90% рудных минералов, где основной

минерал – пирротин (60–75%), менее выражены пентландит (20–25%), виоларит (до 10%), халькопирит (до 5%), пирит (3–5%); содержание Ni 3,9–4,2%, Co 0,1%, Cu 0,6–1,0% (по данным рентгенофлуоресцентного анализа ЗАО НПК «Геотехнология»).

Количественный учёт клеток проводили прямым подсчетом под микроскопом в 10 полях зрения (микроскоп «Микромед-3», увеличение 1000х). Количество клеток в 1 мл среды рассчитывали по формуле

$$X = N_m \cdot 7,56 \cdot 10^6, \quad (1)$$

где  $X$  – число клеток в 1 мл,  $N_m$  – среднее арифметическое число в  $m$  полях зрения,  $7,56 \cdot 10^6$  – коэффициент, рассчитанный с учетом объема анализируемой пробы (2 мкл), площади покровного стекла (576 мм<sup>2</sup>) и площади поля зрения (0,0132 мм<sup>2</sup>). В поле зрения микроскопа были видны морфологически однородные полупрозрачные одиночные подвижные палочки.

За окислительной активностью культуры наблюдали путём определения концентраций  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  в растворах питательной среды методом трилонометрического титрования трилоном Б. Методика определения  $Fe^{3+}$ : в коническую колбу объемом 100 мл приливали 30 мл индикаторного раствора (смесь 20% сульфосалициловой кислоты и 20% соляной кислоты в дистиллированной воде) и вносили 1 мл анализируемой среды; нагревали до 70 °С на плитке и титровали раствором трилона Б до перехода окраски из красно-фиолетовой в лимонно-желтую и от одной избыточной капли в бесцветную (1 капля = 0,015 мл). Концентрацию  $Fe^{3+}$  (г/л) вычисляли по формуле

$$C_{Fe^{3+}} = (V_{ТБ} \cdot (0,025 \cdot 55,84) \cdot 1000) : V_{пробы}, \quad (2)$$

где  $V_{ТБ}$  – мл израсходованного на титрование раствора трилона Б, 0,025 – молярность трилона Б, 55,84 – атомная масса Fe.

Методика определения  $Fe^{2+}$ : раствор, в котором оттитровано трехвалентное железо, вновь нагревали до 70 °С, добавляли 50 мг пероксодисульфата аммония (надсерноокислого аммония), кипятили в течение 1 мин. Раствор изменял окраску на красно-фиолетовую, после чего его вновь титровали раствором трилона Б до перехода окраски в лимонно-желтую и от одной избыточной капли в бесцветную.

Добавляли несколько кристаллов надсерноокислого аммония для проверки полноты окисления (стабильность окраски). Концентрацию  $Fe^{2+}$  вычисляли по той же формуле, что и концентрацию  $Fe^{3+}$ .

*Адаптация к высоким содержаниям ионов кобальта*

Высокие концентрации ионов кобальта были достигнуты добавлением  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в состав минеральной питательной среды 9К [6], содержащей  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Был получен ряд концентраций: 12, 14, 16, 18, 20 г/л Со.

В колбы Эрленмейера, где была питательная среда (с) с указанными выше концентрациями ионов кобальта, произвели посев культуры (к) ( $N_{\text{кл.}} = 1,2 \cdot 10^8$  кл/мл) в соотношении к:с = 1:10. В том же соотношении культура была внесена в контрольную колбу (К), где содержалась «чистая» среда 9К без ионов кобальта. рН всех сред до посева и культивирования – 1,6.

Посевы культивировали в термостате при 29°C в течение 5 суток, аэрацию среды осуществляли постоянным перемешиванием с помощью качалки ( $\approx 110$  об/мин). Затем в течение 10 суток культивировали статично (без перемешивания) при комнатной температуре.

*Окислительная активность культуры*

Окислительную активность исследуемой культуры микроорганизмов рассматривали для образца, адаптированного к 20 г/л ионов Со. На момент окончания адаптации и посева культуры в «чистую» питательную среду 9К, количество клеток в ней составляло  $5,6 \cdot 10^7$  кл/мл. Источник железа в среде –  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . В колбы Эрленмейера

произвели посев в соотношении к:с = 1:10, в трех повторениях (Со I, Со II, Со III).

Культивировали в течение 7 суток в термостате (29°C), аэрацию среды осуществляли перемешиванием на качалке ( $\approx 110$  об/мин) в 0–3 и 6–7 сутки эксперимента.

**Результаты исследования и их обсуждение**

*Адаптация к высоким содержаниям ионов кобальта*

Присутствие ионов кобальта в питательной среде 9К в каждой установленной концентрации (12, 14, 16, 18, 20 г/л) не оказало губительного воздействия на рост культуры микроорганизмов; сохранение жизнеспособности указывает на наличие в клетках природных механизмов резистентности к токсическому воздействию кобальта. С ростом культуры первоначальный рН среды повысился с 1,6 до 2,1–2,3 и оставался таким на протяжении всего периода адаптации.

По данным табл. 1 можно видеть, что ионы кобальта ингибировали рост культуры только в начале или первой половине периода адаптации (1 сутки для концентраций Со 12 и 14 г/л; 1–5 сутки для концентраций Со 16 и 18 г/л; 1–9 сутки для концентрации Со 20 г/л) в сравнении с контрольным ростом в чистой питательной среде. Затем численность клеток в адаптируемых образцах превосходила численность контроля.

**Таблица 1**

Численность клеток культуры в период адаптации к высоким концентрациям ионов кобальта в питательной среде

Концентрация ионов Со, г/л	Количество клеток, $\cdot 10^7$ кл/мл							
	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	9 сутки	11 сутки	13 сутки	15 сутки
К (0)	2,1	4,2	4,6	4,6	4,8	4,8	5,2	5,1
12	0,45	4,6	5,0	5,3	5,9	6,2	6,7	7,0
14	1,7	5,7	5,6	5,9	6,2	6,3	6,8	6,8
16	1,5	1,9	2,6	4,6	4,6	5,1	5,6	5,5
18	0,98	1,9	3,1	4,7	5,2	5,8	5,9	6,3
20	1,1	0,98	2,3	3,1	4,4	5,2	5,6	6,5

**Таблица 2**

Численность клеток адаптированной культуры в «чистой» питательной среде 9К

Сутки	Количество клеток, $\cdot 10^7$ кл/мл			
	К	Со I	Со II	Со III
1	0,68	0,60	0,30	0,30
2	0,50	0,50	0,83	0,50
3	0,84	2,19	1,82	1,63
6	1,74	3,34	1,52	2,12
7	4,02	3,41	2,58	1,90

Для дальнейшего хода исследования (наблюдения за окислительной активностью микроорганизмов) был выбран образец, адаптированный к 20 г/л ионов Со, как устойчивый к самой высокой заявленной концентрации.

*Окислительная активность культуры*

В «чистой» питательной среде 9К адаптированная культура показывала медленный рост по сравнению с контролем в первые и вторые сутки эксперимента, уже к третьим суткам рост превысил контрольные показатели. К окончанию эксперимента (7 сутки) численность клеток контрольной

культуры превосходила численность адаптированной (табл. 2, рис. 1). Показатель рН сохранялся в пределах 2,1–2,3.

Результаты измерений концентраций  $Fe^{3+}$  и  $Fe^{2+}$  представлены на рис. 2 и 3 соответственно; скорость окисления железа адаптированной культурой значительно превышала скорость окисления контрольной, вероятно, это связано с лучшим ростом клеток в первом случае. Однако для образца Со III характерно небольшое увеличение количества клеток в 3–7 сутки эксперимента, в то же время скорость окисления выше, чем у всех остальных образцов.

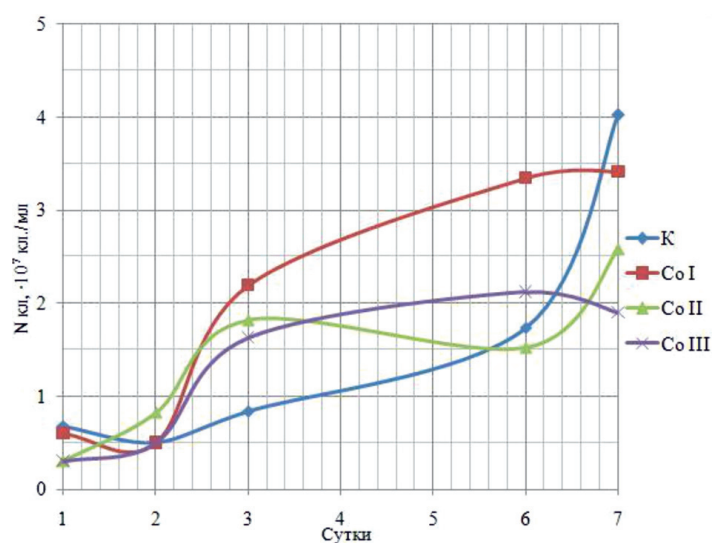


Рис. 1. Численность клеток адаптированной культуры в «чистой» питательной среде в сравнении с контролем

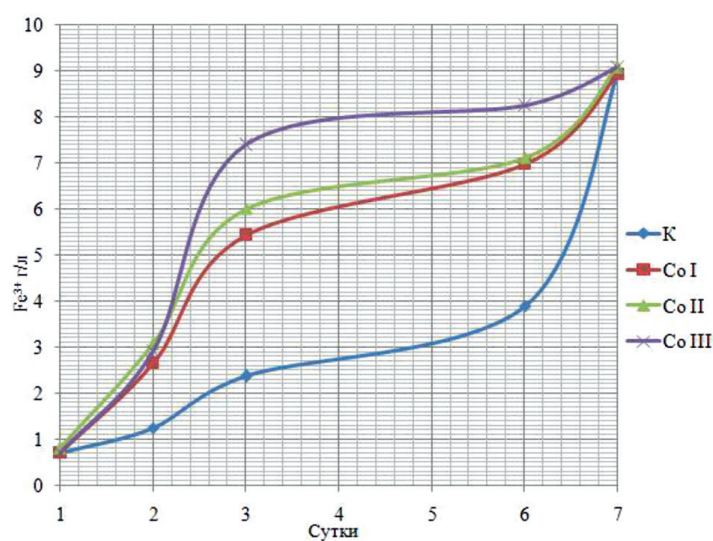


Рис. 2. Изменения концентрации  $Fe^{3+}$  (г/л) в питательной среде с адаптированной культурой в сравнении с контролем

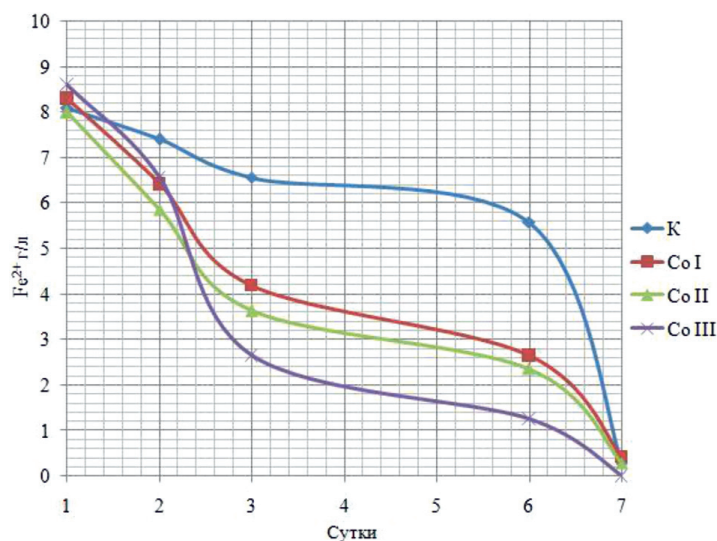


Рис. 3. Изменения концентрации  $Fe^{2+}$  (г/л) в питательной среде с адаптированной культурой в сравнении с контролем

Необходимо отметить: несмотря на разницу в скоростях окисления адаптированной и контрольной культурами, железо питательного раствора ( $Fe^{2+}$ ) было окислено (до  $Fe^{3+}$ ) полностью или почти полностью к седьмым суткам эксперимента (рис. 3).

### Заключение

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы:

- исследованная смешанная культура мезофильных ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (включающая *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus* spp.) оставалась жизнеспособной и сохраняла рост в среде с добавлением ионов кобальта в диапазоне концентраций 12–20 г/л, вероятно клетки данной культуры обладают природными механизмами резистентности к токсическому воздействию кобальта в высоких концентрациях;

- в период адаптации к присутствию ионов кобальта в питательной среде культурой не была утрачена или ослаблена способность к окислению железа, напротив, скорость окисления такой культурой была выше контрольной, не подвергавшейся воздействию высоких концентраций ионов кобальта;

- несмотря на меньшую численность клеток на протяжении почти всего эксперимента и более низкую скорость окисления в сравнении с адаптированной культурой, контрольная культура «завершила» окисление всего доступного железа питательного раствора к седьмым суткам эксперимента, одновременно с адаптированной культурой.

Необходимо продолжать исследования полезного биотехнологического потенциала адаптированной культуры, интересным представляется опыт использования данной культуры в качестве биологического компонента чанового БХВ, потенциально интенсифицирующего биовыщелачивание металлов.

### Список литературы / References

1. Das S., Dash H. R. Handbook of Metal-microbe Interactions and Bioremediation. CRC Press, 2017. 813 p.
2. Хомченкова А.С. Исследование влияния различных концентраций солей тяжелых металлов на рост культуры ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2016. № S31. С. 217–222.
3. Khomchenkova A.S. Study of effect of various concentration salts of heavy metals on growth acidophilic chemolithotrophic microorganisms crop // Mining informational and analytical bulletin. 2016. № S31. P. 217–222 (in Russian).
4. Abhilash, Pandey B.D., Natarajan K.A. Microbiology for minerals, metals, materials and the environment. CRC Press, 2015. 590 p.
5. Хомченкова А.С. Тяжелые металлы и выщелачивающие микроорганизмы (обзор) // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2017. № S12. С. 228–236. DOI: 10.25018/0236-1493-2017-12-32-228-236.
6. Khomchenkova A.S. The heavy metals and leaching microorganisms (a review) // Mining informational and analytical bulletin. 2017. № S32. P. 228–236 (in Russian).
7. Norris P.R., Burton N.P., Foulis N.A. Acidophiles in bioreactor mineral processing. Extremophiles. 2000. Vol. 4. № 2. P. 71–76.
8. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агате А. и др. Биотехнология металлов. Практическое руководство. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. 375 с.
9. Karavaiko G.I., Rossi J., Agate A. et al. Biogeotechnology of metals. M.: Centr mezhdunarodnikh proektov GKNT, 1989. 375 p. (in Russian).