

УДК 579.66

БИОТЕХНОЛОГИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ МЕТАЛЛОВ ИЗ СУЛЬФИДНЫХ РУД

© 2008 Т.И. Кузякина, Т.С. Хайнасова, О.О. Левенец

*Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН,
Петропавловск-Камчатский, 683002; e-mail: khainasova@yandex.ru*

В течение последних лет бактериально-химическое выщелачивание сульфидов металлов получило широкое развитие. Извлечение ценных компонентов из минералов с помощью микроорганизмов служит на сегодняшний день признанным биотехнологическим способом переработки сульфидных руд. Эта технология является экономически выгодной и экологически безопасной. В данной статье освещается механизм бактериально-химического окисления сульфидных руд, приведены характеристики и роль основных микроорганизмов в процессах биовыщелачивания. В настоящее время широкое применение получили хемолитотрофные ацидофильные микроорганизмы *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*. С развитием метода чанового выщелачивания все больший интерес привлекают умеренно термофильные и термофильные бактерии и археи, которые при высоких температурах обеспечивают более высокую скорость окисления сульфидов.

Ключевые слова: бактериально-химическое выщелачивание, хемолитотрофные микроорганизмы, сульфидные руды.

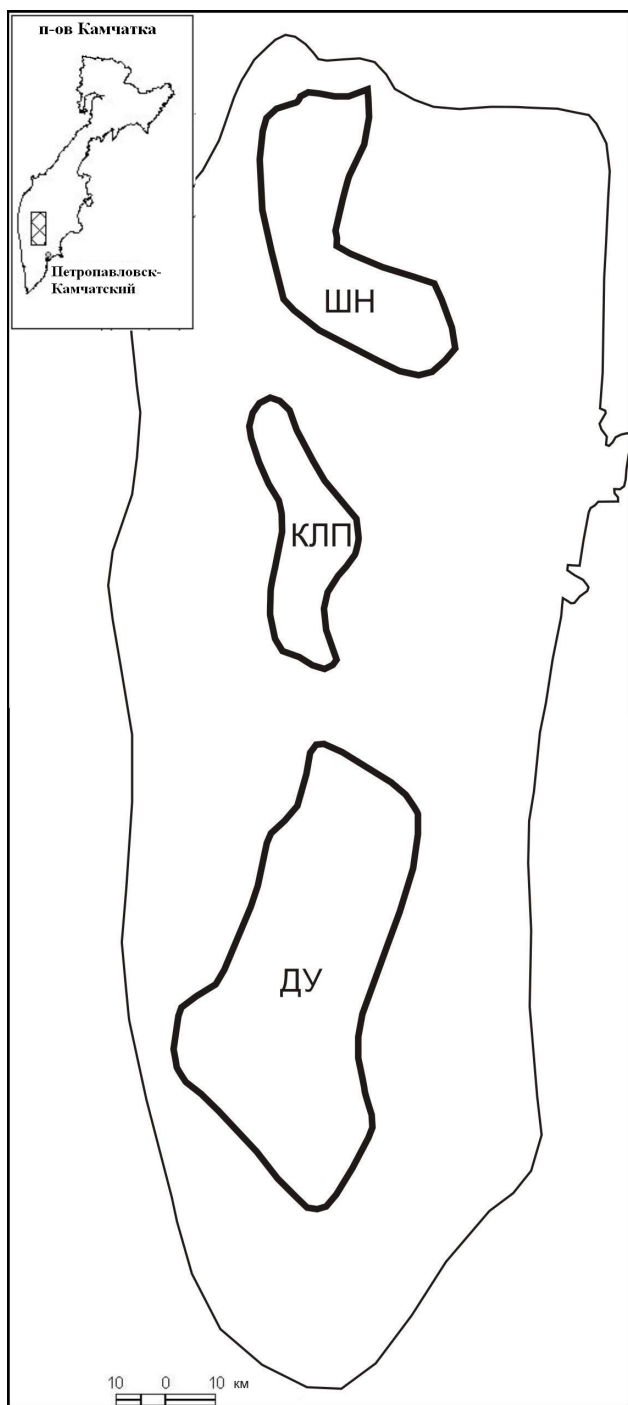
Возрастающая стоимость извлечения и переработки металлов из руд, наряду с истощением запасов высококачественного минерального сырья и усилением природоохранных мер, способствовали развитию новых технологий в горнодобывающей промышленности. Микробное выщелачивание было признано привлекательной альтернативой традиционным физическим и химическим методам обогащения руд благодаря сокращению потребления энергии, транспортных затрат и менее пагубному воздействию на окружающую среду (Нап, 1998).

За последние десятилетия промышленное применение железо- и сероокисляющих микроорганизмов с целью извлечения ценных компонентов из руд достигло широких масштабов в разных странах. В настоящее время различными компаниями стран Северной и Южной Америк, Африки, Австралии используются бактериально-химические технологии добычи меди, кобальта, никеля, золота, цинка, урана (Bosecker, 1997; Norris et al., 2000; Rawlings, 2005).

Стратегическим фактором экономического роста России признается структурная перестройка на перспективу наукоемких технологий, в том числе и в области рационального (ресурсосберегающего) природопользования. Особый вклад в поднятие экономики страны призвано

внести развитие минерального комплекса Дальнего Востока, в частности Камчатского края. Камчатский регион располагает достаточно высоким минерально-сырьевым потенциалом, способным стать базой для развития горнодобывающей промышленности на полуострове. Благоприятной является внутривосточная и экспортная конъюнктура на никель и кобальт. На территории России Камчатка является третьей по значимости никель-кобальтовой провинцией, причем, первые две – Кольский полуостров и Норильский район – уже подходят к черте истощения запасов руд этого типа (Алискеров, Яроцкий, 2003).

В Камчатскую никеленосную провинцию входят рудные районы: Шанучский (Шанучское рудное поле), Дукукский (в т.ч. Квинум-Кувалорогская рудная зона), Колпаковский (рисунок). В данный момент осуществляется разработка кобальт-медно-никелевого месторождения Шануч. Перспективной для дальнейшей разработки является и Квинум-Кувалорогская рудная зона (Трухин и др., 2008). Однако разработка этих месторождений традиционными способами представляет опасность с экологической точки зрения вследствие непосредственной близости к ним нерестовых рек. Применение инновационных, малоотходных биогеотехно-



Карта-схема расположения прогнозируемых рудных районов Камчатской никеленой провинции (составлена Герасимовой Е.В. по (Трухин и др., 2008)). Рудные районы: ШН – Шанучский, КЛП – Колпаковский, ДУ – Дукукский.

логических методов представляется наиболее рациональным путем развития горнодобывающей промышленности Камчатского края.

Биогеотехнология подразумевает использование хемолитотрофных микроорганизмов, источником энергии для которых служат неорганические соединения (в том числе, сульфидные минералы). Отечественными и зарубежными

микробиологами выявлено множество потенциально полезных бактерий и архей, способствующих окислению сульфидных минералов, однако характеристика большинства наиболее активных штаммов остается неполной. Развитие и оптимизация технологий биовыщелачивания требует понимания механизмов и кинетики микробного взаимодействия с сульфидными рудами (Bosecker, 1997; Rawlings, 2005).

Многие из описанных к настоящему времени микроорганизмов, применяемых в биогеотехнологии, были обнаружены как в природных, так и в промышленных условиях, например, вблизи серных геотермальных источников и в рудничных водах. Гетерогенные условия таких районов с перепадами температур и кислотности поддерживают широкое разнообразие ацидофильной микрофлоры. Детальное понимание и исследование физиологии и биоэнергетики отдельных микроорганизмов являются решающими для внедрения и успешного развития биотехнологии на Камчатке.

МЕХАНИЗМ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

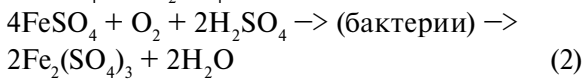
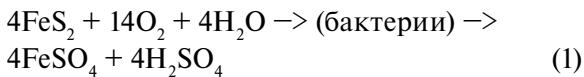
Обычно использование микроорганизмов при извлечении металлов преследует одну из двух целей: превращение (или окисление) нерастворимых сульфидов металлов в растворимые сульфаты или создание условий для лучшего взаимодействия химических веществ с поверхностью минерала и растворения необходимого металла. Примером первого процесса является превращение таких нерастворимых соединений меди, как ковеллин (CuS) или халькозин (Cu_2S), в растворимые сульфаты. Примером второго процесса служит извлечение железа, мышьяка и серы из золотоносного арсенипирита (FeAsS), вследствие чего оставшееся в минерале золото легче выделяется при помощи цианирования. Оба этих процесса являются окислительными. Если добываемый металл переводится в раствор, речь идет о **биовыщелачивании**. Когда же металл остается в руде – о **биоокислении**. Тем не менее, термин «биовыщелачивание» часто используется в обоих случаях.

Биологическое выщелачивание может быть применено к рудам, содержащим железо или восстановленные формы серы (Rawlings, 2005).

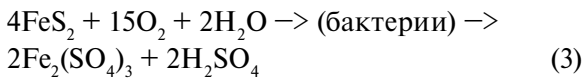
Роль, которую играют микроорганизмы в биовыщелачивании, до сих пор остается не выясненной до конца. По данным (Rodriguez et al., 2003), Сильверман и Эрлих в 1964 г. сделали первую попытку объяснить механизм биовыщелачивания, предложив два возможных пути: прямой и непрямой.

Прямое бактериальное выщелачивание происходит при физическом контакте бактериаль-

ных клеток с поверхностью минерала в несколько стадий, катализируемых ферментами:



В сумме:



По данным (Bosecker, 1997), исследования Торма показали, что при прямом взаимодействии *Acidithiobacillus ferrooxidans* могут быть окислены следующие не содержащие железа сульфиды металлов: ковеллин (CuS), халькозин (Cu₂S), сфалерит (ZnS), галенит (PbS), молибденит (MoS₂), стибнит (Sb₂S₃), кобальтин (CoS), миллерит (NiS).

Таким образом, прямое бактериальное выщелачивание может быть описано следующей реакцией:



где MeS – сульфид металла.

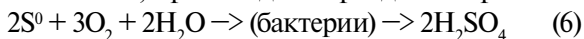
Очевидно, что бактерии должны находиться в тесном контакте с поверхностью минерала. Механизм бактериального прикрепления и инициации растворения металлов пока не полностью понятен. Предположительно, бактерии прикрепляются не ко всей поверхности минерала, а предпочитают специфические участки дефектов кристаллической решетки.

При *непрямом биовыщелачивании* бактерии генерируют «окислитель», который химически окисляет сульфидный минерал. В кислых растворах таким окислителем служит Fe³⁺, и растворение металла может быть описано следующей реакцией:



Для поддержания достаточного количества железа в растворе химическое окисление сульфидов металлов должно проводиться в кислых условиях при pH < 5.0. Двухвалентное железо, выделяющееся в данной реакции, может быть заново окислено до трехвалентного железоокисляющими бактериями (*At. ferrooxidans* или *L. ferrooxidans*). При *непрямом выщелачивании* бактерии не нуждаются в контакте с поверхностью руды. Они выполняют только каталитическую функцию, ускоряя окисление Fe²⁺ до Fe³⁺. При pH 2.0-3.0 бактериальное окисление Fe²⁺ примерно в 10⁵-10⁶ раз быстрее, чем химическое окисление.

Выделяющаяся в процессе сера может быть окислена до серной кислоты бактериями *At. ferrooxidans*. Но окисление серы бактериями *At. thiooxidans*, которые часто встречаются вместе с *At. ferrooxidans*, происходит гораздо быстрее:



Роль *At. thiooxidans*, вероятно, состоит в создании благоприятных условий для роста железоокисляющих бактерий, таких как *At. ferrooxidans* или *L. ferrooxidans*.

Хорошо известный пример процесса *непрямого выщелачивания* – выделение урана из руд, когда нерастворимый четырехвалентный уран окисляется до водорастворимого шестивалентного:

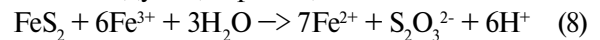


Окислитель четырехвалентного урана может производиться бактериями *At. ferrooxidans* посредством окисления пирита, который часто присутствует в урановых рудах. Кроме *непрямого выщелачивания урана At. ferrooxidans*, вероятно, способна окислять U^{IV} до U^{VI} ферментативно и использовать часть энергии этой реакции для ассимиляции CO₂.

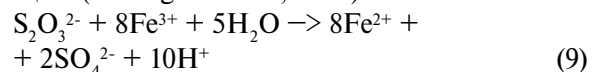
Таким образом, биовыщелачивание основывается на взаимодействии биологических и химических окислительных процессов (Bosecker, 1997).

Несмотря на большое количество исследований особенностей прикрепления микроорганизмов к поверхности пирита и прямого микробиологического окисления на ранних стадиях выщелачивания, существуют сомнения в оценке «степени важности» прямого механизма биовыщелачивания. В последнее время некоторые исследователи отвергают существование прямого биовыщелачивания и признают *непрямое окисление* единственным механизмом данного процесса (Heijnen, Boon, 1998).

Результаты исследований натолкнули ученых на создание новой гипотезы. *Непрямой механизм* через тиосульфат, предложенный Шипперсом и Сэндом (Schippers, Sand, 1999), является одной из последних попыток объяснить механизм биовыщелачивания. Согласно данной гипотезе, как только клетка микроорганизма прикрепляется к поверхности не растворимого в кислоте сульфида металла (пирита FeS₂, молибденита MoS₂, тангстенита WS₂), ион трехвалентного железа (Fe³⁺), содержащийся во внеклеточном экзополимерном слое, начинает *непрямую атаку (действие)* на сульфид металла согласно следующей реакции:

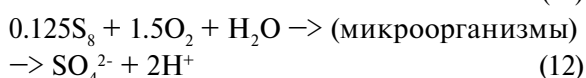
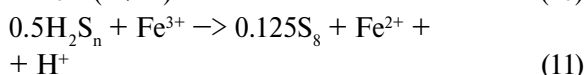
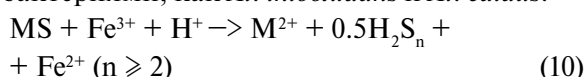


Тиосульфат является начальным промежуточным продуктом, который далее превращается в последующие промежуточные продукты (тетратионат, тритионат) с формированием сульфата в качестве конечного продукта общей реакции (Rodriguez et al., 2003):

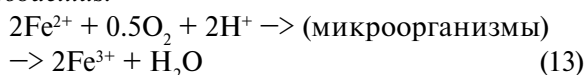


Полисульфидный механизм характерен для

сульфидов, растворимых в кислотах (электронная структура которых позволяет им вступать в реакцию как с Fe^{3+} , так и с кислотами), таких как сфалерит (ZnS), халькопирит ($CuFeS_2$) или галенит (PbS). В данном случае растворение сульфида происходит вследствие комбинированного действия Fe^{3+} и протонов. Основным промежуточным продуктом становится элементарная сера, которая относительно стабильна, но может окисляться до сульфата такими сероокисляющими бактериями, как *At. thiooxidans* и *At. caldus*:



Образуемое Fe^{2+} может быть вновь преобразовано в Fe^{3+} благодаря активности таких железоокисляющих бактерий, как *At. ferrooxidans* или представителей родов *Leptospirillum* и *Sulfobacillus*:



Таким образом, роль микроорганизмов заключается в образовании серной кислоты и Fe^{3+} (Rawlings, 2005).

Открытие внеклеточных полимерных соединений (ВПС), выделяемых микроорганизмами, прикрепляющимися к поверхности минерала, также способствовало выяснению механизма микробного воздействия и поддержке новой гипотезы Сэнда с соавторами (Sand et al., 2001). Некоторые исследования показывают, что формирование экзополимерного материала является важным условием прикрепления клеток к минералу и последующего его растворения. Железо, содержащееся в ВПС, придает клетке положительный заряд, обеспечивая электростатическое притяжение между микробной клеткой и отрицательно заряженной поверхностью пирита. Более того, Fe^{3+} участвует в первой стадии разрушения пирита, что обуславливает необходимость присутствия определенного количества Fe^{3+} в культуральной среде в начале процесса биовыщелачивания (≥ 0.2 г/л).

Таким образом, ВПС могут считаться местом начала процесса выщелачивания, где Fe^{3+} , концентрированный во внеклеточном материале микробной клетки, реагирует с сульфидом металла.

Трибутч предположил, что существует 3 «стратегии» биовыщелачивания:

1) *непрямое биовыщелачивание*: микроорганизмы не прикрепляются к поверхности минерала, и их действие ограничено возобновлением выщелачивающего агента – Fe^{3+} ;

2) *контактное биовыщелачивание*: микроорганизмы прикрепляются к поверхности минерала, способствуя его электрохимическому растворению с помощью Fe^{3+} , содержащегося в ВПС; экзополимеры производятся клеткой для прикрепления ее к твердой поверхности минерала;

3) *кооперативное биовыщелачивание*: микроорганизмы, прикрепленные к минеральной поверхности, кооперируют со свободными клетками из раствора; прикрепленные бактерии высвобождают окисляемые металлы, которые служат источником энергии для микроорганизмов в растворе (Tributsch, 2001).

На основе результатов своих экспериментов и исследований других ученых испанские микробиологи (Rodriguez et al., 2003) пришли к выводу, что биовыщелачивание пирита является двухступенчатым процессом. На первой стадии окисление происходит с помощью микроорганизмов, прикрепившихся к твердой поверхности минерала, посредством контактного механизма. На второй стадии основным фактором растворения пирита является не прямой механизм с помощью Fe^{3+} , регенерируемого микроорганизмами в растворе. Следовательно, изначальное прикрепление микроорганизмов к поверхности сульфида играет важную роль в достижении высокой скорости растворения минерала на второй стадии, то есть биовыщелачивание включает два сосуществующих механизма (непрямой и контактный), и эффективность каждого из них зависит от степени прикрепления клеток и концентрации железоокисляющих бактерий в среде (в растворе).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ СУЛЬФИДНЫХ РУД

Мезофильные, умеренно термофильные и термофильные ацидофильные железо- и сероокисляющие бактерии и археи осуществляют процесс бактериального выщелачивания сульфидов металлов – биологического превращения нерастворимых соединений металлов в растворимые формы. Данные микроорганизмы участвуют в окислении сульфидов до ионов металлов и сульфата (Schippers, 2007).

1. Мезофильные и умеренно термофильные ацидофильные эубактерии

1.1. Грамотрицательные эубактерии

Тионовые бактерии

Основные процессы, связанные с окислением серы, осуществляют тионовые бактерии. Тионовые бактерии – это наиболее важная в

геохимическом отношении группа, хорошо изученная физиологически и биохимически (Заварзин, 1972; Каравайко и др., 1972). Все тионовые бактерии способны использовать энергию окисления восстановленных соединений серы в серную кислоту для ассимиляции углерода, построения клеточного тела и осуществления всех остальных функций. Некоторые из тионовых бактерий могут использовать для своей жизнедеятельности, кроме окисления серы, окисление других соединений, например, органических веществ или закисного железа. Данная способность широко используется в промышленном выщелачивании металлов из руд мезофильными микроорганизмами.

Некоторые тионовые бактерии (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* — ацидофильные мезофильные бактерии) уже долгое время активно применяются в практике бактериального выщелачивания металлов из сульфидных руд, и они считаются наиболее эффективными в этом процессе (Bosecker, 1997; Norris et al., 2000; Rawlings, 2005; Sand et al., 2001).

Acidithiobacillus thiooxidans — хемолитотрофная ацидофильная аэробная бактерия, которая окисляет элементную серу и сульфиды до серной кислоты. *At. thiooxidans* играет значительную роль в биовыщелачивании металлов из сульфидных руд (Liu et al., 2003).

Микроорганизм имеет форму палочки размером $(0.5-0.8) \times (1.0-2.0)$ мкм, с одним полярным спиралевидным жгутиком. Подвижность клеток наблюдается в молодых культурах. Размножение происходит делением пополам, причем чаще всего клетки после деления расходятся, хотя иногда наблюдается образование цепочек. Окисление серы хорошо идет при усиленной аэрации среды (Заварзин, 1972).

At. thiooxidans растет облигатно автотрофно с различными соединениями серы, например, элементной серой, тиосульфатом, тетраионатом (Schippers, 2007). *At. thiooxidans* способна развиваться в сильно кислой среде вплоть до pH 0.6. В нейтральной среде микроорганизм не развивается, т.к. является ацидофильной, а не ацидотолерантной формой (Заварзин, 1972). *At. thiooxidans* при кислой реакции среды хорошо использует различные по физическому составу формы серы.

Рост *At. thiooxidans* наблюдается на следующих сульфидах металлов: ковеллит, галенит, сфалерит, вурцит (Schippers, 2007).

Acidithiobacillus ferrooxidans занимает исключительное положение среди тионовых бактерий, так как помимо способности к автотрофному росту за счет окисления соединений серы она может использовать энергию окисления закисного железа в окисное.

Микроорганизм имеет вид коротких палочек, расположенных иногда парами, большей частью поодиночке, размером $0.4 \times (0.8-1)$ мкм. Окрашивается по Граму отрицательно, не образует спор. Имеет один полярный жгутик. Размножение происходит поперечным делением. Окисленное железо не образует каких-либо оформленных структур в клетках. Г.А. Заварзиным было подробно исследовано тонкое строение *At. ferrooxidans* и не было обнаружено существенных отличий в общей морфологии от типичных грамотрицательных бактерий, таких как *Pseudomonas* (Заварзин, 1972).

At. ferrooxidans считается строгим автотрофом. Углеродное питание *At. ferrooxidans* обеспечивается углекислотой (Заварзин, 1972). Роулингс упоминает о росте микроорганизма на муравьиной кислоте, что указывает на неабсолютность автотрофного питания (Rawlings, 2002). В качестве источника азота обычно используется аммоний. Организм нуждается в значительном количестве фосфата, и увеличение скорости окисления железа находится в прямой зависимости от количества добавленного фосфата, причем железо образует с фосфатом обнаруживаемый полярографический комплекс (Заварзин, 1972).

Оптimum развития при pH около 2.5 (Каравайко и др., 1972), pH 1.7 и 3.5 (Заварзин, 1972); при pH выше 4.5 бактерии не развиваются, тем не менее, *At. ferrooxidans* обнаруживается в рудах с нейтральной реакцией, где происходит микроразнональное окисление сульфидных минералов (Каравайко и др., 1972).

В отличие от других тионовых бактерий, *At. ferrooxidans* способна воздействовать на широкий набор сульфидных минералов. Установлено окисление следующих соединений: пирит, марказит, полидимит, реальгар, халькопирит, молибденит, кобальтин, ковеллин, марматит, виоларит, тетраэдрит, геокранит, миллерит, арсенопирит, пирротин, антимонит, аурипигмент, борнит, сфалерит, пентландит, халькозин, галенит, бравоит, энаргит (Schippers, 2007).

Система переноса электрона у *At. ferrooxidans* представлена полным набором цитохромов (c, b, a). Содержание цитохромов у *At. ferrooxidans* необычайно высоко (Заварзин, 1972).

Acidithiobacillus caldus. Наряду с *At. ferrooxidans* и *At. thiooxidans*, играющих важную роль в окислении сульфидов металлов, в кислых условиях выделяют еще один не менее важный микроорганизм — *Acidithiobacillus caldus*. Это умеренно термофильная сероокисляющая бактерия, активно развивающаяся при температурах 40–50°C, не способная окислять железо (II), относительно близкая к мезофилу *At. thiooxidans*. *At. caldus* — такой же аэроб, грамотрицательный и хемолитоавтотрофный микроорганизм, который

использует энергию от окисления восстановленных соединений серы (Semenza et al., 2002). Может также расти миксотрофно на средах с экстрактом дрожжей или глюкозой (Schippers, 2007). Известно, что при некоторых условиях *At. caldus* может доминировать в промышленных биовыщелачивающих и биоокисляющих процессах, и что ее роль более важна, чем считалось ранее (Semenza et al., 2002).

Железобактерии

Г.А. Заварзиным было дано подробное описание данной группы хемолитотрофных микроорганизмов (Заварзин, 1972). Основными представителями железобактерий с энергетическим метаболизмом хемолитотрофного типа являются виды *Leptospirillum*. Большинство изученных штаммов *Leptospirillum* принадлежат к облигатным хемолитоавтотрофам, использующим энергию окисления железа для ассимиляции CO_2 , служащего основным или единственным источником углерода.

Род *Leptospirillum* включает железоокисляющие бактерии — *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum thermoferrooxidans* и *Leptospirillum ferriphilum* — которые играют важную роль в биовыщелачивании и биоокислении. Лептоспириллы доминируют в условиях с высоким содержанием железа, что делает данные микроорганизмы перспективными для использования в процессах биоокисления в промышленных масштабах (Hippe, 2000).

Leptospirillum ferrooxidans — клетки маленькие, в виде изогнутых палочек $(0.3-0.6) \times (1.0-3.3)$ мкм. Наблюдается своеобразный циклический рост с формированием псевдококков, вибрионов и спирилл. Данный грамотрицательный микроорганизм не образует спор. Движение осуществляется посредством единственного жгутика. Растет в кислых условиях на минеральной среде, содержащей Fe^{2+} . Не использует серу и органические вещества как источники энергии для роста (Robbins, 2000). Была показана способность *L. ferrooxidans* к фиксации азота (Norris et al., 2000). Мезофильный аэроб, растущий с оптимумом pH 2.5–3.0.

Leptospirillum thermoferrooxidans — хемолитоавтотрофная бактерия, вибриоидной или спиральной формы, источником энергии (донором электронов) которой служит Fe^{2+} , сульфидные минералы. Электронный акцептор неизвестен. Фиксирует CO_2 в качестве источника углерода. Растет в кислых условиях с оптимальной температурой 45–50°C (Robbins, 2000).

Leptospirillum ferriphilum — маленькие искривленные палочки или спириллы, 0.3–0.6 мкм в ширину и 0.9–3.5 мкм в длину. Молодые клетки вибриоидной формы, но в культурах старше 4 дней — спирально закручены в 2–5 оборотов.

Клетки грамотрицательные, спорообразующие, подвижные, имеют один полярный жгутик. Растут аэробно и хемолитотрофно с Fe^{2+} или пиритом, но в качестве источника энергии не используют серу. Оптимум pH 1.4–1.8 и температуры 30–70°C, некоторые штаммы способны расти при 45°C (Coram, Rawlings, 2002). Микроорганизм часто доминирует в тонковых биовыщелачивающих процессах при 35–50°C. Способен окислять Fe^{2+} с высокой скоростью при pH < 1.0. Не имеет оперона азотфиксации *nif*, в отличие от *L. ferrooxidans* (Schippers, 2007).

1.2. Грамположительные зубактерии

Грамположительные бактерии, окисляющие сульфиды металлов, принадлежат к родам *Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus* и еще не описанному роду «*Cadibacillus*». Физиологически эти бактерии являются разносторонними, способными расти литотрофно с ионами железа (II) и/или соединениями серы и/или органотрофно с различными органическими веществами. Рост может быть автотрофным, гетеротрофным (например, на экстракте дрожжей) или миксотрофным (CO_2 + дрожжевой экстракт). Могут формировать эндоспоры. Мезофильные и умеренно термофильные виды были выделены из сульфидных руд и термальных источников, многие из них подробно еще не описаны (Schippers, 2007).

Alicyclobacillus disulfidooxidans (тип штамма SD-11 = ATCC 51911 = DSM12064) — аэробная спорообразующая палочкообразная бактерия. Была первоначально описана как *Sulfobacillus disulfidooxidans* (Dufresne et al., 1996) и недавно переклассифицирована (Karavaiko et al., 2005). Была выделена из обогащенных осадков сточных вод. Клетки палочкообразные, неподвижные. Экстракт дрожжей является необходимым фактором роста для окисления элементной серы (Schippers, 2007).

Род *Sulfobacillus* принадлежит к семейству *Alicyclobacillaceae* и включает группу хемолитотрофных аэробных умеренно термофильных и термотолерантных спорообразующих грамположительных ацидофильных микроорганизмов следующих видов: *S. acidophilus*, «*S. ambivalens*», «*S. montserratensis*», «*S. sibiricus*», *S. thermosulfidooxidans*, «*Sulfobacillus yellowstonensis*», *S. thermotolerans*. Они способны к автотрофному росту с использованием Fe^{2+} и различных восстановленных соединений серы в качестве источников энергии и CO_2 как единственного источника углерода, когда последний находится в избытке. В миксотрофных условиях, когда источниками углерода являются CO_2 и некоторые органические вещества, а источниками энергии — элементная сера, восстановленные соединения серы (тетратионат, тиосульфат и др.), Fe^{2+} , сульфидные минералы и те же органические соединения, субстратное

окисление и скорость развития максимальны (Zhuravleva et al., 2007).

Sulfobacillus acidophilus – хемолитотрофная грамположительная палочкообразная умеренно термофильная бактерия. Была описана Норрисом и его коллегами. Растет автотрофно и миксотрофно на двухвалентном железе, элементной сере в присутствии экстракта дрожжей и гетеротрофно на экстракте дрожжей. Содержание Г+Ц составляет 55-57% (Norris et al., 1996; Robbins, 2000).

«*Sulfobacillus ambivalens*» (штамм RIV14) – мезофильная, подвижная палочкообразная бактерия, толерантная к 500 мМ Fe²⁺, >100 мМ Fe³⁺, 100 мМ Cu²⁺, 300 мМ Zn²⁺ и 0.2 мМ MoO₄²⁻ и экстремально низким значениям pH (1.0). Рост на железе (II) и соединениях серы увеличивается в присутствии экстракта дрожжей (Schippers, 2007).

«*Sulfobacillus montserratensis*» (штамм L 15) – мезофильная, подвижная палочкообразная бактерия, толерантная к 500 мМ Fe²⁺, 100 мМ Fe³⁺, 100 мМ Cu²⁺, >300 мМ Zn²⁺ и 0.2 мМ MoO₄²⁻ и экстремально низким значениям pH (1.0). Рост на ионах железа (II) и соединениях серы увеличивается в присутствии экстракта дрожжей (Schippers, 2007).

«*Sulfobacillus sibiricus*» (штамм N1) – палочкообразная аэробная умеренно термофильная бактерия. Была выделена из золотомышьякового концентрата Нежданнинского рудного отложения Восточной Сибири и описана В.С. Меламудом с коллегами (Melamud et al., 2003). Окисляет сульфиды металлов, ионы двухвалентного железа и серу в присутствии экстракта дрожжей (Schippers, 2007). Глюкоза, углекислота и экстракт дрожжей являются источниками энергии. Глюкоза ассимилируется через фруктозо-бифосфатный и пентозо-фосфатный пути. Фиксация CO₂ осуществляется через цикл Кальвина (Zakharchuk et al., 2003).

Sulfobacillus thermosulfidooxidans – хемолитотрофная ацидофильная факультативно автотрофная спорообразующая грамположительная бактерия. По данным (Dufresne et al., 1996), она была выделена Головачевой и Каравайко в 1978 г. из дамп в России и стала первым видом рода *Sulfobacillus*. Некоторые штаммы растут в виде коринеформ. Микроорганизм характеризуется ограниченной подвижностью (Schippers, 2007). В качестве источников энергии использует реакции окисления Fe²⁺, S⁰, FeS₂, сульфидных минералов. *S. thermosulfidooxidans* развивается при pH 1.9-3.0, оптимальные значения pH находятся в пределах 1.9-1.4. Температурный диапазон развития 28-60°C, (оптимум 50°C) (Robbins, 2000).

«*Sulfobacillus yellowstonensis*» (штамм YTF1)

– умеренно термофильный факультативный анаэробный (восстанавливающий железо (III)) палочкообразный неподвижный микроорганизм, был выделен из Йеллоустоунского Национального Парка, США (Schippers, 2007).

Sulfobacillus thermotolerans (Krl^T = VKM B-2339^T = DSM 17362^T) – термотолерантная аэробная ацидофильная грамположительная бактерия. Была выделена Богдановой и ее коллегами из пульпы золотосодержащего сульфидного концентрата при 40°C (Bogdanova et al., 2006). Наблюдается миксотрофный рост с окислением элементной серы, двухвалентного железа, сульфидных минералов и тетрагидрата в присутствии 0-0.2% экстракта дрожжей или других органических соединений. Автотрофность и органотрофность микроорганизма наблюдается только в нескольких пассажах. *S. thermotolerans* – термотолерантный микроорганизм, растущий при 20-60°C, температурный оптимум – 40°C. Значения pH находятся в диапазоне 1.2-2.4, оптимум – 2.0 (Karavaiko et al., 2005).

2. Мезофильные и умеренно термофильные ацидофильные археи

Отдельного внимания требует перспективное для использования в практике биовыщелачивания семейство *Ferroplasmaceae*, представители которого составляют обычно значительную долю в естественных местообитаниях. *Ferroplasma* spp., которые входят в состав этого семейства, принадлежат к порядку *Thermoplasmatales* – ацидофильным археям, которые обладают одной периферической мембраной. *Ferroplasma* spp. разделяет некоторые метаболические и экофизиологические свойства с представителями архей порядка *Sulfolobales* и классическими мезофильными бактериями *Acidithiobacillus* spp. и *Leptospirillum* spp., но лучше адаптированы к окружающей среде, характеризующейся низким уровнем pH и высокими концентрациями Fe²⁺ и других металлов. Данные микроорганизмы способны использовать металлы из сульфидных минералов (пирит, арсенопирит, медьсодержащие сульфиды) и более устойчивы к кислоте, нежели железо- и сероокисляющие бактерии (в частности, тионовые бактерии), подверженные сходным эколого-физиологическим условиям.

Отличительной чертой *Ferroplasma* spp. является наличие железосодержащих металлопротеинов, которые обеспечивают поддержание трехмерной структуры у этих микроорганизмов (Ferrer et al., 2007). Различные штаммы *Ferroplasma* имеют четкий температурный оптимум для роста в пределах 37-50°C, то есть они представлены мезофильными и умеренно термофильными микроорганизмами.

Ferroplasma acidiphilum – мезофильный ацидофильный железокисляющий, не имею-

ший клеточной стенки архей. Морфология и ультраструктура *F. acidiphilum* является сходной с таковой у представителей порядка *Thermoplasmatales*: форма клеток *F. acidiphilum* (Y^T, Y-2) плеоморфная, размер 0.3-3 мкм (0.2-5 мкм для *Thermoplasma* spp.). Этот микроорганизм стал основой для выделения новой ветви архей в порядке *Thermoplasmatales*. Мезофильный рост и строго хемолитоавтотрофный метаболизм отличает этот организм от других членов *Thermoplasmatales* (Golyshina, Timmis, 2005).

Т.А. Пивоварова с коллегами описали два штамма *Ferroplasma acidiphilum* – Y^T, Y-2 (Pivovarova et al., 2004). Y^T был впервые выделен Голишиной (Golyshina et al., 2000) из плотных пульп в процессе окисления золотосодержащих арсенопиритных и пиритных концентратов Бакырчикского месторождения (Казахстан), Y-2 – из Олимпиадинского месторождения (Красноярский край, Россия).

Штамм Y^T – это строго хемолитотрофный аэробный микроорганизм, представленный грамтрицательными неправильными кокками, изменяющими свою форму от сферической до филаментной. Он образует двойные и тройные формы. *Ferroplasma acidiphilum* (Y^T) – это мезофильный ацидофил, который в качестве источника углерода использует неорганические соединения. Окисляет Fe²⁺ из FeSO₄ и пирит (Fe₂S), окисляет Mn²⁺ из MnSO₄. У него отсутствуют клеточная стенка и S-слои. Значения pH, при которых возможен рост, находятся в пределах 1.3-2.2, оптимум pH – 1.7. Температурный диапазон, в котором встречается микроорганизм, находится в пределах 20-45°C, оптимальная температура – 35°C.

«*Ferroplasma acidarmanus*» (fer1). Данный микроорганизм филогенетически похож на *F. acidiphilum*, но физиологически отличается от последнего вида. Оба они требуют для собственного роста присутствия экстракта дрожжей, но fer1 использует дрожжи как единственный источник энергии, в отличие от *F. acidiphilum*. *F. acidarmanus* fer1 способен расти при значениях pH от 0 до 2.5, оптимум pH – 1.2 (Pennisi, 2000). *F. acidiphilum* живет все же в более ограниченных диапазонах pH (1.3-2.2, оптимум 1.7). Оптимальная температура 40°C.

Ferroplasma cupricumulans (BH2) – новый представитель *Ferroplasma* sp., который был недавно выделен из сульфидных минералов. Морфологически штамм BH2 представляет собой плеоморфные кокки, способные хемомиксотрофно расти на сульфате Fe²⁺ и экстракте дрожжей. В отсутствие дрожжей рост не наблюдается. Данный микроорганизм сходен с *F. acidiphilum* только на 95%. Диапазон температур, при которых штамм существует, находится в

пределах 22-63°C (оптимум 53.6°C). Оптимальные значения pH 1.0-1.2, наименьшее значение pH (при котором микроорганизм встречается) 0.4 (Hawkes et al., 2006).

В последнее время в рудной промышленности в процессах биологического извлечения металлов (медь, кобальт, цинк, золото и т.д.) наряду с мезофильными и умеренно термофильными микроорганизмами с успехом используются экстремофильные термоацидофилы. Некоторые термоацидофильные археи – представители родов *Sulfolobus*, *Acidianus* и *Metallosphaera* – эффективнее окисляют сульфидные минералы при высоких температурах, чем мезофильные микроорганизмы.

Потенциальное преимущество использования термоацидофилов в биовыщелачивании по сравнению с мезофильными *Thiobacillus*-подобными видами выражается в следующем: 1) действие системы при высоких температурах (70-90°C) повышает скорость химического окисления минералов посредством образуемого микробами Fe³⁺; 2) процесс может протекать при высоких концентрациях клеток и без использования дорогих охлаждающих систем (Gericke et al., 2001).

В современной металлургии существует ряд трудностей: переход к эксплуатации более бедных месторождений, утилизация отходов, переработка горных пород с низким содержанием ценных элементов; возросли требования к технологическим процессам в связи с ужесточением контроля над охраной окружающей среды (Каравайко и др., 1989). Одним из эффективных подходов для решения такого рода проблем является бактериально-химическое выщелачивание ценных металлов в реакторных установках.

В Камчатском крае на базе Научно-исследовательского геотехнологического центра ДВО РАН начаты работы по развитию технологии бактериально-химического окисления сульфидных руд. Осуществляется выделение аборигенных сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов из месторождения Шануч. Исследуется их окислительная активность и оценивается перспективность использования в биовыщелачивании сульфидных кобальт-медно-никелевых руд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Восстановление ценных компонентов с помощью микроорганизмов является на сегодняшний день признанным биотехнологическим способом переработки сульфидных руд, с помощью которого добывают, в основном, медь, кобальт, никель, цинк, уран.

В технологии биовыщелачивания нашли

применение железо- и сероокисляющие микроорганизмы. На данный момент наиболее хорошо изучены мезофильные хемолитотрофные ацидофильные тионовые бактерии (*At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*) и железобактерии (*L. ferrooxidans*). С развитием чанового биовыщелачивания все больший интерес привлекают умеренно термофильные и термофильные бактерии и археи, которые при высоких температурах обеспечивают более высокую скорость окисления сульфидов.

Роль микроорганизмов в процессах биовыщелачивания заключается в окислении Fe^{2+} до Fe^{3+} (мощного окислителя сульфидов металлов), окислении элементарной серы и восстановленных соединений серы, образовании серной кислоты, поддержании кислой реакции среды. Окисление соединений серы микроорганизмами высвобождает протоны водорода, которые также способствуют выделению металлов из кислоторастворимых сульфидов. Не растворимые в кислотах сульфиды подвергаются окислительному действию только ионов Fe^{3+} .

Тиобациллы представляют потенциал для детоксикации сточных вод, почв и осадков, контаминированных тяжелыми металлами, и могут способствовать решению некоторых экологических проблем.

Биовыщелачивание является перспективной технологией переработки сульфидных руд. Затраты на данную технологию ниже, чем на обычные пирометаллургические и гидрометаллургические операции. Обрабатывающие установки могут быть построены в непосредственной близости к рудным залежам, что сократит транспортные расходы. Таким образом, данная технология является экономически выгодной и экологически безопасной, что делает ее привлекательной альтернативой традиционным физическим и химическим методам металлургии. Особую актуальность технология биовыщелачивания представляет для Камчатского края, основные залежи сульфидных медно-никелевых руд которого пока не разработаны. Одним из препятствующих факторов разработки камчатских месторождений является ограничение со стороны природоохранительных организаций на использование технологий, способствующих загрязнению окружающей среды (открытая добыча в карьерах, сброс рудничных вод при подземной отработке месторождений и вод обогатительных фабрик, применение химических реактивов, хранение хвостов и отходов, пирометаллургия). Начатая в Научно-исследовательском геотехнологическом центре ДВО РАН работа по выделению и изучению аборигенных хемолитотрофных микроорганизмов направлена на преодоление данных препятствий путем разработки и последующего внедрения биотехнологических методов извле-

чения металлов из сульфидных руд.

Авторы выражают глубокую признательность и благодарность канд. г.-м. н. Алискерову А.А., канд. г.-м. н. Селянгиному О.Б. и Кунгуровой В.Е. за ценные замечания, а также Герасимовой Е.В. и Рогатых С.В. за помощь в составлении рисунка.

Список литературы

- Алискеров А.А., Яроцкий Г.П.* Введение в проблему горнопромышленного освоения Камчатки. Петропавловск-Камчатский: Издательство Камчатского Государственного педагогического университета, 2003. 265 с.
- Заварзин Г.А.* Литотрофные микроорганизмы. М.: Наука, 1972. 254 с.
- Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 1972. 248 с.
- Каравайко Г.И., Росси Дж., Агаме А. и др.* Биотехнология металлов. Практическое руководство. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. 375 с.
- Трухин Ю.П., Степанов В.А., Сидоров М.Д.* Камчатская никеленосная провинция // Доклады Академии наук. 2008. Т. 418. № 6. С. 802-805.
- Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrat'eva T.F. et al.* *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium // International journal systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56. P. 1039-1042.
- Bosecker K.* Bioleaching: metal solubilization by microorganisms // FEMS Microbiol. Rev. 1997. V. 20. P. 591-604.
- Coram N.J., Rawlings D.E.* Molecular relationship between two groups of the genus groups of the genus *Leptospirillum* and the findings that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C // Appl. and Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 2. P. 838-845.
- Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M., Guay R.* *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium // International journal of systematic bacteriology. 1996. V. 46. № 4. P. 1056-1064.
- Ferrer M., Golyshina O.V., Beloqui A. et al.* The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein-dominated // Nature. 2007. V. 445. P. 91-94.
- Gericke M., Pinches A., van Rooyen J.V.* Bioleaching of a chalcopyrite concentrate using an extremely thermophilic culture // International Journal of Mineral Processing. 2001. V. 62. № 1. P. 243-255.
- Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I. et al.* *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an

- acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam.nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000. V. 50. P. 997-1006.
- Golyshina O., Timmis K.N. Ferroplasma and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. № 9. P. 1277-1288.
- Han C.J. Physiological studies of extremely thermoacidophilic microorganisms under normal and stressed conditions // Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy. North Carolina State University. 1998. 220 p.
- Hawkes R.B., Franzman P.D., O'hara G., Plumb J.J. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap // Extremophiles. 2006. V. 10. P. 525-530.
- Heijnen J.J., Boon M. Chemical oxidation kinetics of pyrite in bioleaching processes // Hydrometallurgy. 1998. V. 48. № 1. P. 27-41.
- Hippe H. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000. V. 50. P. 501-503.
- Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P. et al. Reclassification of '*Sulfobacillus thermo-sulfidooxidans* subsp. *Thermotolerans*' strain K1 as *Alycyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alycyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alycyclobacillus* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005. № 55. P. 941-947.
- Liu H.-L., Chen Y.-W., Lan Y.-W., Cheng Y.-C. SEM and AFM images of pyrite surfaces after bioleaching by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 62. P. 414-420.
- Melamud V.S., Pivovarova T.A., Tourova T.R. et al. *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov., a new moderately thermophilic bacterium // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. № 5. P. 605-612.
- Norris P.R., Burton N.P., Foulis N.A.M. Acidophiles in bioreactor mineral processing // Extremophiles. 2000. V. 4. P. 71-76.
- Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhous S. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. And other moderately thermophilic mineral-sulfide-oxidizing bacteria // Microbiology. 1996. V. 142. № 4. P. 775-783.
- Pennisi E. Extreme home for simple organisms // Science Now. 2000. P. 1-2.
- Pivovarova T.A., Kondrat'eva T.F., Batrakov S.G. et al. Phenotypic Features of *Ferroplasma acidiphilum* Strains Y^T and Y-2 // Microbiology. 2004. V. 71. № 6. P. 698-706.
- Rawlings D.E. Heavy metal mining using microbes // Annu. Rev. Microbiol. 2002. № 56. P. 65-91.
- Rawlings D.E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates // Microbial Cell Factories. 2005. V. 4. № 13. DOI: 10.1186/1475-2859-4-13.
- Robbins E.I. Bacteria and Archaea in acidic environments and a key to morphological identification // Hydrobiologia. 2000. V. 433. P. 61-89.
- Rodriguez Y., Ballester A., Blazquez M.L. et al. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature // Hydrometallurgy. 2003. V. 71. P. 37-46.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P.-G., Schippers A. (Bio) chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching // Hydrometallurgy. 2001. V. 59. P. 159-175.
- Schippers A. Chapter 1. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. // Microbial Processing of Metal Sulfides. Springer Netherlands. 2007. P. 3-33.
- Schippers A., Sand W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur // Applied and Environmental Microbiology. 1999. V. 65. № 1. P. 319-321.
- Semenza M., Viera M., Curutchet G., Donati E. The role of *Acidithiobacillus caldus* in the bioleaching of metal sulfides // Latin American Applied Research. 2002. V. 32. P. 303-306.
- Tributsch H. Direct vs indirect bioleaching // Hydrometallurgy. 2001. V. 59. P. 177-185.
- Zakharchuk L.M., Egorova M.A., Tsaplina I.A. et al. Activity of the enzymes of carbon metabolism in *Sulfobacillus sibiricus* under various conditions of cultivation. Microbiology. 2003. V. 72. № 5. P. 553-557.
- Zhuravleva A.E., Tsaplina I.A., Ismailiv A.D. et al. Metabolism peculiarities of bacteria of the genus *Sulfobacillus* // Advanced materials research. 2007. V. 20-21. P. 469-472.

BIOTECHNOLOGY OF EXTRACTION OF METALS FROM SULFIDIC ORES

T.I. Kuzyakina, T.S. Khainasova, O.O. Levenets

*Research Geotechnological Centre, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia*

Recovery of valuable components using microorganisms serves a recognized biotechnological method of treatment of sulfidic ores. This technology is economically favorable and ecologically safe. Perspectives of technology of bioleaching are described. The systematics of microorganisms used in bioleaching and their role in this process are shown. Today the main microorganisms used in bioleaching are chemolithotrophic acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*. Due to the development of stirred-tank bioleaching more attention is paid on moderately thermophilic and thermophilic bacteria and archaea, which provide higher speed of oxidation of sulfides at high temperatures.