

**ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍՍՍԵԻՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ**

**ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ ՍԱՄԿԵԼ ԽԱԶԻԿԻ**

**«ՔԵՍՈԼԻԹՈՏՐՈՑ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼԵՐԻ, ՆՐԱՆՑ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒ ԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԵՎ ԻՍՈՔԻԼԻԻԶԱՑՎԱԾ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱԼԵՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ ՍԵՏԱՂՆԵՐԻ ՏԱՐՐԱԼ ՈՒՃՄԱՆ ԳՈՐԾԵԼՆԹԱՑԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒ ԹՅՈՒՆԸ»**

**Գ.00.14 - «ԿԵՆՍԱՐԵԻՆՈԼՈԳԻԱ» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայ ցման ատենախոսությամբ**

**ՍԵՂՄԱԳԻՐ**

**Երևան – 2016**

---

**НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО**

**СТЕПАНЯН САМВЕЛ ХАЧИКОВИЧ**

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ МЕТАЛЛОВ С ПОМОЩЬЮ  
ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ИХ АССОЦИАЦИЙ И  
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КУЛЬТУР**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 03.00.14 - «Биотехнология»**

**Ереван – 2016**

Ատենախոսությունը թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ Կ.գ.դ. Ն.Ս. Վարդանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ք.գ.դ. Ա.Ե.  
Աղաջանյան

Կ.գ.թ. Հ.Հ. Փանոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) Համալսարան

Ատենախոսությունը պաշտպանությունը կայանալու է 2016 թ. հունիսի 29 - ին, ժամը 15<sup>00</sup> - ին, ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՅ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654180:

Ատենախոսությունը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայ կենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ - ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2016 թ. մայիսի 27 - ին:

Մասնագիտական խորհրդի  
գիտական քարտուղար, Կ.գ.թ. Գ.Ե. Ավետիսովա

---

Тема диссертации утверждена в НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель: д.б.н. Н.С. Варданян

Официальные оппоненты: д.х.н. А.Е. Агаджанян  
к.б.н. О.А. Паносян

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский) Университет

Защита диссертации состоится 29 июня 2016 г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410) 654180.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 27 мая 2016 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н. Г.Е. Аветисова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Биогидрометаллургия является современной стабильно развивающейся альтернативной технологией переработки минерального сырья. В основе биогидрометаллургии лежит применение микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности для извлечения металлов из концентратов, руд и отвалов. Возрастающий интерес к биогидрометаллургии, в частности, биовыщелачиванию (БВ) обусловлен их экономическим, техническим и что особенно важно, экологическим преимуществами по сравнению с традиционным обжигом и автоклавным окислением при высоких давлениях и температурах (Brierley, 2000; Rawlings, 2002; Rawlings et al., 2003). Особую важность приобретает биовыщелачивание некондиционных руд и отвалов в связи с проблемой исчерпания богатых сырьевых ресурсов. Метод БВ для получения меди, урана, никеля, золота и других металлов широко используется во многих странах мира (Aswegen, 2007; Aswegen et al., 1992; Brombacher et al., 1997; Brierley, Brierley, 2001; Acevedo, 2002; Olson et al., 2003; Rawlings, 2002; Rawlings, et al., 2003).

Технология кучного выщелачивания меди главным образом основана на извлечении меди из вторичного минерала - халькозина ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) (Olson et al., 2003). Коммерческое применение выщелачивания первичного минерала меди - халькопирита часто ограничивается из-за низкой скорости процесса, вызванной пассивацией поверхности минерала продуктами его окисления (Fu et al., 2008; Johnson, 2014; Watling, 2006). В настоящее время ведутся исследования для преодоления пассивирующего эффекта (Third et al., 2002; Gericke et al., 2010). С этой точки зрения разработка новых подходов и методов с целью интенсификации процессов кучного и чанового выщелачивания халькопирита, весьма актуальна.

Разработаны разные химические и физические методы для извлечения золота в зависимости от типа руд. Однако ввиду минимального экологического воздействия на окружающую среду и ряда других преимуществ для удаления железа и мышьяка из золотоносных руд успешно применяется чановое биоокисление (БО).

Интенсивность процесса БВ и БО сульфидных минералов зависит от температуры, pH, окислительно - восстановительного потенциала, а также природы используемых микроорганизмов. Среди указанных факторов наиболее важным являются микроорганизмы. БВ металлов осуществляется хемолитотрофными бактериями (ХБ) разных систематических групп. Важным этапом в получении высокоактивных культур ХБ является их адаптация к высоким плотностям пульпы и концентрациям ионов металлов (Akcil et al., 2007; Bryan et al., 2011; Cameron et al., 2010; Haghshenas et al., 2009; D'Hugues et al., 2009; Johnson et al., 2008; Mejia et al., 2009; Okibe, Johnson, 2004; Zhou et al., 2009).

Ряд исследований показывает, что смешанные культуры и консорциумы микроорганизмов более эффективны и устойчивы в окислении сульфидных минералов, чем чистые культуры (Baker, Banfield, 2003; Falco et al., 2003; Fu et al., 2008; Johnson, 2001; Wang et al., 2014). С этой точки зрения разработка и оптимизация микробных консорциумов для использования в коммерческих системах выщелачивания остается важной проблемой.

В Армении имеются огромные массы медьсодержащих некондиционных руд и отвалов, упорных золотоносных руд, а также хвостов обогатительных фабрик, эффективная переработка которых возможна только с применением метода БВ. Проблема имеет также экологический аспект, поскольку применение более природоохраняющей

технологии может способствовать улучшению общего экологического состояния в республике.

**Цель и задачи.** Основной целью работы было изучение процессов извлечения ценных металлов из сульфидных минералов, руд и хвостов с применением активных штаммов ХБ, их консорциумов и иммобилизованных клеток.

Для достижения основной цели были поставлены следующие задачи:

- выделение и скрининг ХБ, обладающих высокой активностью в окислении сульфидных минералов и руд для использования в биогидрометаллургии;
- исследовать влияние физико-химических и других факторов на процессы выщелачивания сульфидных минералов и руд;
- разработать ассоциации выделенных ХБ для повышения эффективности выщелачивания пирита и халькопирита;
- изучить перспективы применения разработанных ассоциаций бактерий для БВ металлов из руд и хвостов;
- в лабораторных условиях изучить возможности применения иммобилизованных клеток бактерий с целью интенсификации процессов БВ и биоокисления.

**Научная новизна:** На основании выделенных в лаборатории наиболее активных штаммов *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *L.ferriphilum* CC и *At.albetensis* SO-2 разработаны ассоциации бактерий, которые по эффективности БВ пирита, халькопирита и Тандзутской золотоносной руды значительно превосходят соответствующие чистые культуры. Впервые показана важная роль сероокисляющей бактерии *At.albetensis* SO-2 в интенсификации БВ халькопирита в ассоциации с железоокисляющими бактериями. Впервые в состав консорциумов включены ацидофильные гетеротрофные бактерии, что позволило значительно повысить активность автотрофных консорциумов в окислении пирита и халькопирита.

Установлены оптимальные параметры БВ халькопирита и Тандзутской золотоносной руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и его ассоциациями с другими ХБ.

Впервые исследованы возможности биовыщелачивания Дрмбонских хвостов. Показано, что применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с природным консорциумом выщелачивающих бактерий приводит к значительной интенсификации извлечения ценных металлов из хвостов.

Показано, что предобработка пирита и халькопирита трехвалентным железом, полученным иммобилизованной на шунгите и угле культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, значительно повышает степень экстракции меди и железа ассоциацией *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железоокисляющими бактериями.

**Практическая значимость:** Изученный штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn благодаря высокой активности окисления пирита, халькопирита, сульфидных руд и концентратов является перспективным для применения в процессах БВ цветных металлов и БО золотоносных руд и хвостов. Штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn депонирован в Центре депонирования микроорганизмов НПЦ «Армбиотехнология» под номером MDC 7055.

Разработанный экспериментальным путем консорциум *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железоокисляющими и гетеротрофными бактериями, позволяет осуществить выщелачивание халькопирита и Тандзутской упорной золотоносной руды значительно эффективнее, чем ассоциации автотрофных бактерий. Указанные консорциумы могут успешно применяться в биогидрометаллургии для интенсификации процессов получения цветных и драгоценных металлов из руд, концентратов и хвостов.

Предложенный метод биовыщелачивания сульфидных минералов с интегрированной предобработкой биогенным железом позволяет значительно ускорить процесс извлечения меди и железа из руд, концентратов и хвостов.

**Связь с научными темами, планами и программами.** Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы базового финансирования НППЦ «Армбиотехнология» в период с 2013 по 2015гг. Ряд работ проводился по гранту MES-BMBF – 2012 STC Project «Isolation and characterization of novel metal leaching microorganisms and perspectives of intensification of biohydrometallurgical processes».

**Личный вклад автора.** Автором осуществлены обобщение и анализ литературных данных, реализация поставленных задач. Автор активно участвовал в обобщении и интерпретации полученных результатов, оформлении научных статей и диссертации.

**Апробация работы.** Основные результаты работ были доложены на: заседаниях ученого совета «Армбиотехнология», Международном научном семинаре «Тенденции в микробиологии и микробной биотехнологии», Ереван, Армения, 5 - 8 октября, 2014; Международной конференции молодых ученых «Инновационные подходы в области науки», Цахкадзор, Армения, 5-7 декабря, 2014; III Международной конференции молодых ученых «Dialogues on Science», Yerevan, Armenia, 23 - 26 июня, 2015; XII Международной конференции минералогической ассоциации Польши «Contemporary challenges in the mineralogical sciences», Сандомирж, Польша, 8-11 октября, 2015.

**Публикации.** Материалы диссертации опубликованы в 6 печатных работах, включая 3 статьи и 3 тезиса.

**Место выполнения работы.** Основная часть работы выполнена в лаборатории геомикробиологии Института микробиологии НППЦ «Армбиотехнология». Органические кислоты в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ на базе «Стандарт диалог» ООО.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 5 глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 102 страницах, содержит 22 таблицы, 42 рисунка. Цитированная литература включает 181 работы на русском и английском языках.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В главе 1 анализируется разнообразие ХБ в коммерческих процессах биовыщелачивания. Рассматриваются современные представления о механизмах окисления сульфидных минералов. Критически оценивается роль отдельных групп бактерий и их ассоциаций в процессах выщелачивания металлов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Выделение хемолитотрофных бактерий.** Для выделения железо- и сероокисляющих бактерий использовали среду Сильвермана, Люндгрена (9К) (Биогеотехнология металлов), для железоокисляющих бактерий - среду Макинтоша (Makintosh, 1978). Вышеуказанные среды инокулировали пробам отвалов и рудничных вод и инкубировали при 28 - 30°С для выделения мезофильных бактерий и 37 - 50° С для термотолерантных и умеренно термофильных бактерий в течение 7 - 10 суток. Для

получения чистых культур накопительные культуры ХБ высевали на плотные среды Маннинга (Биогеотехнология металлов, 1989) и FeTSB<sub>0</sub> (Johnson et al., 2005), содержащие 0,6% агарозы (agarose Type I: Low EEO, Sigma). Полученные желто-коричневые колонии перенесли в вышеуказанные жидкие среды. Процедуру повторяли 2 - 3 раза до получения чистых культур бактерий.

**Морфологические и цитологические исследования.** Для окраски клеток по Граму применяли метод Хукера (Герхардт и др., 1983). Морфологию клеток изучали с помощью светового микроскопа ООРТИКА В – 190ТВ.

**Идентификация выделенных бактерий.** Идентификация выделенных бактерий осуществлялась на основании морфо-физиологических свойств согласно определителю Берги [Определитель бактерий Берджи, 1997] и соответствующим оригинальным работам [Каравайко и др., 2006; Маркосян, 1972, Clark, Norris, 1996; Coram, Rawlings, 2002; Hallberg et al., 2010; Johnson et al., 2009; Kelly, Wood, 2000].

**Биохимические методы исследования.** Органические кислоты в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ. Метод основан на применении обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Массовая концентрация (массовая доля) органических кислот в пробе определялась спектрофотометрическим или диодноматричным детектором при длине волны 210 нм.

**Биовыщелачивание пирита, халькопирита, руд и хвостов.** Бактериальному выщелачиванию подвергали пирит (FeS<sub>2</sub>), содержащий Fe - 43,8%, S - 49% и халькопирит (CuFeS<sub>2</sub>), содержащий Cu - 30,2%, Fe - 29,7% и S - 38% Шамлугского месторождения Армении, а также руды Тандзутского золото-полиметаллического, Дрмбонского медного золотоносного месторождений, Дрмбонские хвосты и медный концентрат Зангезурского медно-молибденового комбината (ЗММК).

Для биовыщелачивания минералов, руд и концентратов использовали отмытые клетки выделенных нами ранее бактерий *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *L.ferriphilum* CC, (Vardanyan et al., 2015), *At.albertensis* SO-2 (Vardanyan, Vardanyan, 2014). Штаммы выращивали на среде Макинтоша или 9К с элементной серой. Клетки собирали центрифугированием при 6000 g, промывали и ресуспендировали в среде Макинтоша без Fe(II). Для выщелачивания хвостов использовали *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, а также рудничную воду (Дрмбон). Перед использованием рН рудничной воды устанавливали 2.0 с помощью 10 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Измельченные до - 63, - + 45 мкм минералы, концентраты и руды в количестве от 2 до 10 г помещали в 250 мл колбы, смачивали водой и стерилизовали при 0,5 атм 20 мин. После стерилизации в колбы добавляли по 50 мл среды Макинтоша без железа, pH 1.7 - 1.8 и бактериальную суспензию (10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup> кл/мл).

Опыты проводили в периодическом режиме культивирования на качалке (180 - 240 об/мин) при 30 - 37°C в зависимости от используемых бактерий. Периодически брали пробы для физико-химических и микробиологических анализов.

Плотность пульпы (ПП) рассчитывали как соотношение массы минерала к объему выщелачивающего раствора. Об интенсивности выщелачивания пирита, халькопирита, руд, концентратов и хвостов судили по количеству металлов, перешедших в раствор, а также по снижению pH раствора и повышению окислительно-восстановительного потенциала (ОВП).

**Химическое выщелачивание пирита и халькопирита.** Для химического выщелачивания пирита и халькопирита использовали раствор соли трехвалентного железа - Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> и биогенное Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, полученное путем окисления двухвалентного

железа иммобилизованными клетками бактерий. Концентрация ионов  $Fe^{3+}$  в растворе составляла 5 г/л. Выщелачивание осуществляли в колбах на качалке при  $35^{\circ}C$  в течение 7 часов. Об интенсивности химического выщелачивания судили по накоплению в среде ионов  $Fe^{2+}$  и убыли  $Fe^{3+}$ .

**Иммобилизация бактерий.** Для иммобилизации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn использовали шунгит и активированный уголь. Иммобилизацию осуществляли путем непосредственного контакта культуры в среде с  $Fe(SO_4)$  с носителями. Процесс иммобилизации осуществляли в течение 2-3 недель с периодической заменой окисленной среды свежей средой до достижения максимальной скорости окисления.

**Микробиологические исследования.** Титр бактерий определяли прямым подсчетом под микроскопом ОПТСА В-190 используя камеру Тома (Toma chamber). Количественный учет жизнеспособных клеток проводили методом предельных десятикратных разведений. Наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблицам Мак-Креди [Герхард и др., 1983].

#### **Физико-химические методы исследования.**

Количество окисного ( $Fe(III)$ ) и закисного железа ( $Fe(II)$ ) определяли комплексометрическим методом с помощью ЭДТА, закисное железо ( $Fe(II)$ ) - бихроматным методом (Резников и др., 1970). Концентрацию меди и общего железа определяли с помощью атомо-абсорбционного спектрофотометра ААС 1N.

pH и ОВП измеряли pH-метр-милливольтметром "pH-121". При определении ОВП вносили поправку на хлорсеребряный электрод для приведения отсчета к нормальному водородному электроду. При  $18^{\circ}C$  она равна 249 мВ.

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные экспериментов обработаны статистически.

## **ГЛАВА 3 ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛЕЗО- И СЕРООКИСЛЯЮЩИХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ**

### **3. 1. Выделение железо- и сероокисляющих хемолитотрофных бактерий**

Методом накопительных культур с применением селективных сред и двухслойного агара из природных биотопов полиметаллических (Ахтала, Тандзут), медного золотоносного (Дрмбон) месторождений изолированы и изучены пять оригинальных штаммов ХБ. Выделенные штаммы - строгие автотрофы, способны окислять двухвалентное железо  $Fe(II)$ , элементную серу и сульфидные минералы. *Leptospirillum* sp. СС окисляет только двухвалентное железо и не способен окислять серу. Оптимальная температура роста для штаммов 15, Tz и Dr -  $30^{\circ}C$ , для *Acidithiobacillus* sp. 13Zn -  $35^{\circ}C$  и для *Leptospirillum* sp. СС -  $37^{\circ}C$ .

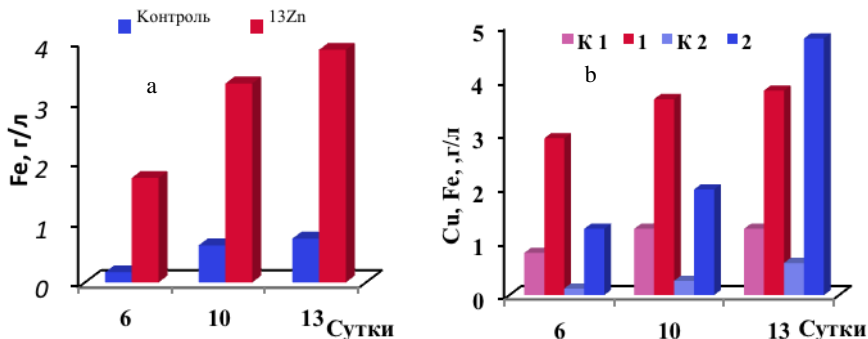
### **3. 2. Активность выделенных бактерий в окислении сульфидных руд и минералов**

**Окисление пирита.** Предварительный скрининг выделенных штаммов проводили по интенсивности окисления пирита ( $FeS_2$ ) и халькопирита ( $CuFeS_2$ ). С этой целью использовали минералы Шамлугского месторождения Армении. Сравнительные

исследования штаммов *Acidithiobacillus* sp. A-15, *Acidithiobacillus* sp. T-3, *Acidithiobacillus* sp. D-5 и ранее выделенного *Acidithiobacillus* sp. 13Zn показали, что наивысшую активность в окислении пирита проявляет *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Активность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении пирита превосходила таковой у *Acidithiobacillus* sp. T-3, *Acidithiobacillus* sp. D-5 и *Acidithiobacillus* sp. A-15 примерно в 2, 4 и 10 раз, соответственно.

**Окисление халькопирита.** Исследования показали, что *Acidithiobacillus* sp. 13Zn способен также окислять халькопирит ( $\text{CuFeS}_2$ ). При этом активность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении халькопирита сравнивалась с активностью железоокисляющей бактерии *L.ferriphilum* sp. CC и сероокисляющей *At.caldus*. Установлено, что по скорости выщелачивания меди и железа из халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn значительно превосходит *Leptospirillum* sp. CC и *At.caldus*.

**Выщелачивание руд и концентратов.** *Acidithiobacillus* sp.13Zn ускоряет выщелачивание Дрмбонской руды приблизительно в 5 раз по сравнению с неинокулированным контролем (рис.1а). Результаты выщелачивания медного концентрата штаммом *Acidithiobacillus* sp. 13Zn представлены на рисунке 1б. Согласно приведенным данным экстракция меди и железа из медного концентрата *Acidithiobacillus* sp. 13Zn увеличивается примерно в 7 - 8 и 3 раза соответственно по сравнению с неинокулированным контролем (рис.1б). В целом степень экстракции меди и железа при выщелачивании медного концентрата *Acidithiobacillus* sp. 13Zn за 13 суток составляла 21,7 и 15,8%.



**Рис. 1. Выщелачивание Дрмбонской руды (а) и медного концентрата (б) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (ПП 10%, pH 2.0, t-37°C); K1, K2 - контроль без бактерий**

Исходя из приведенных данных, можно заключить, что штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn может служить эффективным кандидатом для разработки и реализации высокоэффективного процесса биоокисления и биовыщелачивания медной золотоносной руды, а также медного концентрата.

Учитывая вышесказанное, для проведения дальнейших исследований был выбран штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. *Acidithiobacillus* sp. 13Zn - строгий автотроф, способен получать энергию за счет окисления двухвалентного железа, восстановленных соединений серы и сульфидных минералов. Оптимальная температура роста *Acidithiobacillus* sp. 13Zn - 35°C. Рост штамма возможен в пределах pH 1.4 - 2.6 с

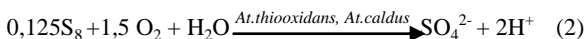


оптимальным значением pH 2.0. На основании проведенного ранее филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК был идентифицирован как новый, отличный от *At.ferrooxidans* вид рода *Acidithiobacillus* (Vardanyan et al., 2015).

## ГЛАВА 4. ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ СУЛЬФИДНЫХ МИНЕРАЛОВ И РУД *ACIDITHIOBACILLUS SP. 13Zn*

### 4.1. Выщелачивание халькопирита

**Влияние pH.** Влияние кислотности на биовыщелачивание халькопирита *Acidithiobacillus sp. 13Zn* изучалось в пределах pH от 1.4 до 2.2. В начале эксперимента наблюдалось повышение pH выщелачивающего раствора, что связано с потреблением кислоты при атаке халькопирита протонами (уравн.1):



Начиная с 4 - 5 суток pH раствора начал снижаться в результате окисления выделенной при растворении халькопирита серы *Acidithiobacillus sp. 13Zn* (уравн. 9). Со снижением pH выщелачивающего раствора увеличивалась экстракция меди из халькопирита. Оптимальное значение исходного pH для роста бактерии и биовыщелачивания меди и железа составляло pH 2.0.

**Влияние концентрации халькопирита.** Проведенные исследования показали, что выщелачивание меди и железа возрастает с увеличением концентрации халькопирита от 2 до 10%. Однако при 15% халькопирита количество меди и железа, выщелоченных *Acidithiobacillus sp.13Zn* уменьшается. Максимальная экстракция меди и железа наблюдается при содержании в среде 10% халькопирита (рис. 2).

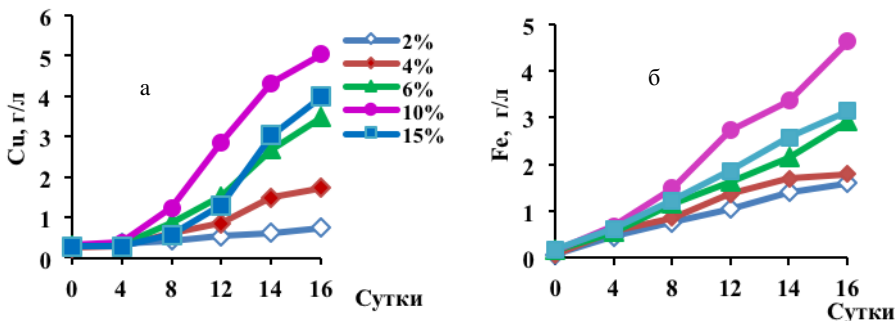
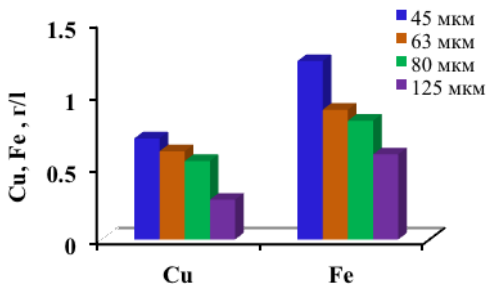


Рис. 2. Влияние концентрации халькопирита на выщелачивание меди (а) и железа (б) *Acidithiobacillus sp. 13Zn* (pH 1.7, t - 35°C)

Предполагается, что увеличение плотности пульпы вызывает высокое парциальное давление, лимитирует транспорт кислорода и углекислого газа, что

приводит к ингибированию роста бактерий [Hawkes et al., 2006; Zhou, et al., 2009; Wang et al., 2014].

**Влияние размеров частиц.** Изучено также влияние размеров частиц на выщелачивание халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (рис. 3). Как показано на рисунке 3, скорость выщелачивания меди и железа *Acidithiobacillus* sp. 13Zn возрастает с уменьшением размера частиц от -125 до +45 мкм. Максимальное количество выщелоченных *Acidithiobacillus* 13Zn меди (0.7 г/л) и общего железа (1.23 г/л) достигало при размере частиц + 45 мкм (рис. 4).



**Рис. 3. Влияние размеров частиц на биовыщелачивание меди и железа из  $\text{CuFeS}_2$  *Acidithiobacillus* sp.13Zn (ПП - 4%, pH 1.8, t - 35°C, 180 об/ мин, 16 суток)**

Это можно объяснить тем, что с уменьшением размера частиц, увеличивается их поверхность, что в свою очередь приводит к возрастанию растворения металлов. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, приведенными в литературе относительно *At.ferrooxidans* [Abhilash et al., 2012].

#### **4.2. Выщелачивание Тандзутской упорной золотосодержащей руды**

Тандзутская руда характеризуется высоким содержанием железа, серы и отсутствием мышьяка. Содержание золота в руде составляет от 1.0 до 2.0 г/т. Примерно 98% общего содержания в руде железа и серы находятся в сульфидной форме. Для окисления Тандзутской руды использовали выделенные нами железобактерии *Acidithiobacillus* sp. A-15, *Acidithiobacillus* sp. T-3 и *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Наибольшую активность в окислении Тандзутской руды проявляла культура *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Установлено, что оптимальной плотностью пульпы для выщелачивания Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn является 10%. Оптимальное значение pH для роста *Acidithiobacillus* sp. 13Zn выщелачивания руды составляло pH 1,8.

**Влияние трехвалентного железа.** Изучение влияния трехвалентного железа показало, что наибольшее количество железа (24.9%) выщелачивалось при исходной концентрации трехвалентного железа в среде 1.29 г/л (табл.1). При этой концентрации наблюдалось максимальное значение ОВП и наиболее интенсивное образование кислоты, в результате чего pH раствора снижался до 0.85.

**Влияние концентрации посевного материала.** При концентрации посевного 20 и 40% (от объема пульпы) за 18 суток выщелачивалось примерно одинаковое количество железа (6.5 – 7.0%). При проведении выщелачивания руды только культуральной

жидкостью с бактериями (100 % посевного материала) эффективность выщелачивания железа возрастала примерно в 10 раз и составляла 26.9 % за 18 сут.

Таблица 1

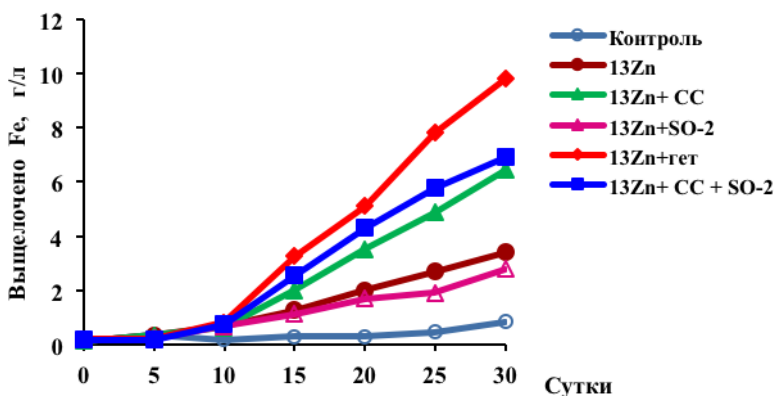
**Влияние ионов Fe<sup>3+</sup> на выщелачивание железа при окислении Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (продолжительность - 17 суток, ПП -10 %, t - 37° С)**

Исходные концентрации Fe (III), г/л	Выщелочено Fe, г/л	Извлечение Fe, %	pH, исх/конеч	Eh, мВ исх/конеч
0.476	3.696	11.5	1.95/1.15	650/740
0.952	5.796	18.1	1.95/1.1	660/780
1.288	7.980	24.9	1.95/0.85	660/855
1.4	6.888	21.5	1.9/0.95	655/790
1.932	6.384	19.95	1.95/0.85	660/755

Таким образом, максимальное количество выщелоченного железа наблюдалось при осуществлении процесса выщелачивания только культуральной жидкостью *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в логарифмической фазе роста на среде с железом.

#### 4.3. Выщелачивание пирита, халькопирита, Тандзутской руды и хвостов с использованием конструированных ассоциаций бактерий

**Выщелачивание пирита.** Разработка и создание высокоактивных устойчивых микробных консорциумов для использования в коммерческих системах выщелачивания цветных и драгоценных металлов остается важной проблемой. Проведенные ранее исследования показали, что *Acidithiobacillus* sp. 13Zn по активности окисления пирита значительно превосходит *L.ferriphilum* CC (Vardanyan et al., 2015). Показано также, что окисление пирита *Leptospirillum* spp. бактериями сопровождается аккумуляцией серы на поверхности минерала, что в свою очередь препятствует дальнейшему окислению пирита [Vardanyan, Акоруян, 2003].



**Рис. 4. Окисление пирита чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с железooksисляющей и сероокисляющей бактериями *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 (FeS<sub>2</sub> - 4%, pH 1.8, t - 30°C)**

Данные, приведенные на рисунке 4 показывают, что эффективность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении пирита увеличивается в 1.8 раза при совместном культивировании с *L.ferriphilum* CC. *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание пирита. Ассоциация, конструированная на основе *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *At.albertensis* и *L.ferriphilum* CC позволяла в 2 раза увеличить количество выщелоченного из пирита общего железа. Тем не менее, наивысшей активности в окислении пирита показала ассоциация *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с гетеротрофными бактериями (рис. 4).

**Таблица 2**

**Выщелачивание железа из FeS<sub>2</sub> чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с другими железо- и сероокисляющими бактериями**

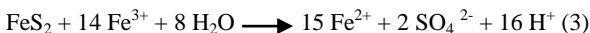
Бактерии и их ассоциации	Выщелочено железа за 30 дней			Извлечение, %	pH, нач/конеч.	Конеч. ОВП, мВ
	г/л					
	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Fe общее			
Контроль	0	840	840	4.8	1.7/1.6	600
<i>Acidithiobacillus</i> sp.13Zn	1624	1792	3416	19.5	1.7/1.22	635
13Zn+ <i>L.ferriphilum</i> CC	5824	616	6440	36.8	1.7/1.25	775
13Zn+ <i>At.albertensis</i> SO-2	784	1456	2240	12.8	1.7/1.3	625
13Zn+ гетеротрофы	9296	504	9800	56.0	1.7/1.18	715
13Zn + <i>L.ferriphilum</i> CC + <i>At. Albertensis</i> SO-2	6832	112	6944	39.7	1.7/1.1	850

Следует отметить, что при использовании чистой культуры *Acidithiobacillus* 13Zn выщелоченное железо было представлено в виде трехвалентного и двухвалентного железа примерно в равных количествах. В соответствии с этим ОВП выщелачивающего раствора незначительно отличался от такового неинокулированного контроля (табл. 2). Низкий ОВП наблюдался и при использовании ассоциации *Acidithiobacillus* 13Zn с *At.albertensis* SO-2 (625 мВ). При использовании ассоциаций *Acidithiobacillus* 13Zn с *L.ferriphilum* CC благодаря высокой железooksисляющей активности *L.ferriphilum* CC, выщелоченное железо находилось исключительно в виде трехвалентного железа, что обеспечило наивысшее значение ОВП и, следовательно высокое окислительное свойство выщелачивающего раствора. Несмотря на то, что при использовании *Acidithiobacillus* 13Zn с гетеротрофными бактериями наблюдалось наивысшее количество выщелоченного железа, однако ОВП раствора был значительно ниже – 715 мВ (табл. 2). Таким образом, ОВП, следовательно и окислительные свойства выщелачивающего раствора зависят от железooksисляющей активности используемой бактерии или их ассоциаций.

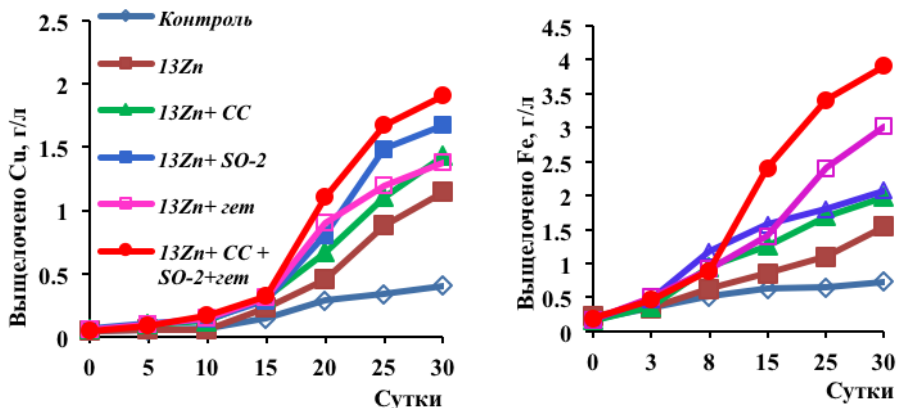
Степень извлечения железа ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn и гетеротрофных бактерий достигала 56%, тогда как в случае монокультуры *Acidithiobacillus* 13Zn этот показатель не превышал 20%.

Пирит относится к минералам, не растворимым в кислоте и, следовательно, согласно механизму окисления сульфидных минералов растворяться только под действием трехвалентного железа. Таким образом, присутствие *L.ferriphilum* CC в

ассоциации приводит к интенсивному окислению ионов Fe (II) и регенерации трехвалентного железа (Fe (III)), что в свою очередь ускоряет окисление пирита согласно уравнению (уравн.3):



**Выщелачивание халькопирита.** Проводили сравнительное исследование выщелачивания халькопирита чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 при 30°C.



**Рис. 5. Выщелачивание меди из халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциацией с другими серо- и железоокисляющими бактериями (FeS<sub>2</sub> - 4%, pH 1.8, 30°C, 240 об/мин)**

Данные, приведенные на рисунке 5, показывают, что ассоциации выделенного *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с железоокисляющим *L.ferriphilum* CC и сероокисляющим *At.albertensis* окисляют халькопирит значительно активнее, чем чистая культура *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Так, в присутствии *At.albertensis* SO-2 и *L.ferriphilum* CC в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn выщелачивание железа из халькопирита увеличивается примерно в 1,3 – 1,2 раз, соответственно. При этом экстракция меди из халькопирита возрастает в 1,6 и 1,5 раза соответственно (рис. 5). Примечательно, что в выщелачивании меди и железа из халькопирита более эффективной (1,7 - 2 раза) оказалась ассоциация *Acidithiobacillus* 13Zn и гетеротрофных бактерий. Однако наивысшую эффективность в выщелачивании халькопирита показала ассоциация, состоящая из *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, железоокисляющей бактерии *L.ferriphilum* CC, сероокисляющей бактерии *At.albertensis* SO-2 и гетеротрофных бактерий (рис. 5). Так, за 30 дней выщелачивания халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn, *L.ferriphilum* CC, *At.albertensis* SO-2 и гетеротрофных бактерий экстракция меди достигала 15%, экстракция железа- 33% (табл. 3).

Данные, приведенные в таблице 3, показывают, что выщелачивание халькопирита коррелируется с pH и ОВП раствора. При использовании *Acidithiobacillus* 13Zn конечный

pH составлял 1.7, а ОВП – 600 мВ, тогда как в варианте *Acidithiobacillus* 13Zn с *At.albertensis* SO-2 значение pH было сравнительно ниже (1.6), а ОВП - значительно выше (720 мВ). Наименьшее значение pH и наивысшее значение ОВП наблюдались при использовании консорциума, состоящего из *Acidithiobacillus* 13Zn, *At.albertensis* SO-2, *L.ferriphilum* CC и гетеротрофных бактерий.

**Таблица 3**

**Выщелачивание железа и меди из халькопирита *Acidithiobacillus* 13Zn и ассоциацией с железо-, сероокисляющими и гетеротрофными бактериями**

Бактерии и ассоциации	Выщелочено, железо за 30 дней				Выщелочено меди		Конечный	
	г/л			%	г/л	%	pH	ОВП, мВ
	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Fe общ	Fe общ				
Контроль	0	0.67	0.67	5.6	0.52	4.1	1.8	520
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	1.09	0.45	1.54	12.8	0.88	6.9	1.7	600
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + <i>L.ferriphilum</i> CC	2.63	0.11	2.63	22.1	1.54	12.1	1.75	680
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + <i>At.albertensis</i>	2.02	0.62	2.74	23.0	1.67	13.4	1.6	720
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + гетеротрофы	0.34	3.02	3.36	28.2	1.37	10.7	1.6	615
<i>Acidithiobacillus</i> sp.13Zn + <i>L.ferriphilum</i> CC + <i>At.albertensis</i> SO-2 + гетер.	3.96	0	3.96	33.3	1.91	14.9	1.5	810

Халькопирит относится к растворимым в кислоте сульфидным минералам и следовательно подвергается атакам как со стороны трехвалентного железа (Fe<sup>3+</sup>), так и протонов (H<sup>+</sup>) (урав.4) (Watling, 2006; Schippers, Sand, 1999).



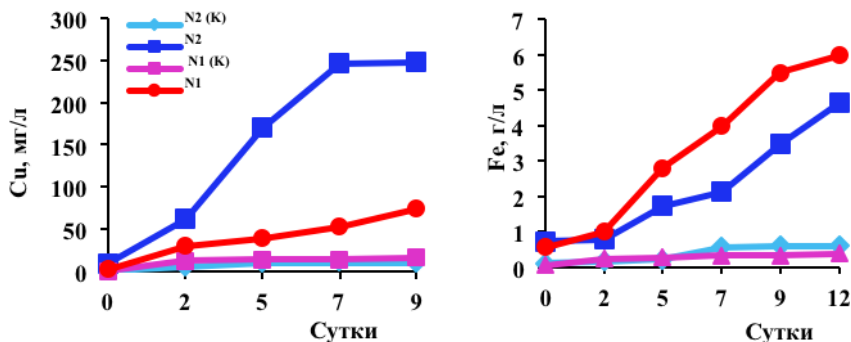
Ионы трехвалентного железа окисляют халькопирит с высвобождением меди и железа, а также элементной серы в раствор. Роль *L.ferriphilum* CC сводится к регенерации окислителя – Fe (III). То есть железooksисляющие бактерии ускоряют выщелачивание халькопирита с помощью продуцируемого ими трехвалентного железа. *At.albertensis* в смешанной культуре окисляет сульфидную серу до серной кислоты и тем самым предотвращает образование ярозита (KFe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>) и гидрофобного слоя серы на поверхности халькопирита, снимает эффект пассивации минерала и способствует интенсивному окислению халькопирита.

Ацидофильные гетротрофы могут утилизировать органические вещества, содержащиеся в эксудате или в лизате клеток и таким образом уменьшать токсичный эффект органических веществ для автотрофных бактерий *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* CC. Кроме того возможно, что гетеротрофы поставляют CO<sub>2</sub> для автотрофов. В процессе дыхания они выделяют CO<sub>2</sub>, который стимулирует рост автотрофных бактерий. Анализ культуральной жидкости *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* CC после удаления клеток с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показал наличие винной, яблочной, уксусной и лимонной кислот.

Таким образом, синергические взаимодействия между различными видами ацидофильных автотрофных и миксотрофных или гетеротрофных бактерий в ассоциации увеличивают экстракцию металлов [Johnson, 1998; Bacelar-Nicolau, Johnson, 1999; Akcil et al., 2007; Wang et al., 2014].

**Выщелачивание Тандзутской руды и Дрмбонских хвостов.** Применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в ассоциации с *L.ferriphilum* СС приводило к увеличению скорости окисления и степени выщелачивания Тандзутской руды до 96,4 %. Сероокисляющая *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание Тандзутской руды.

Динамика выщелачивания проб Дрмбонских хвостов N1 и N2 с использованием питательной среды 9К и *Acidithiobacillus* sp.13Zn приведена на рисунке 6. Как показывают представленные данные, применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn позволило увеличить выщелачивание железа в 15 - 16 и 5 - 7 раз из проб N1 и N2, соответственно, по сравнению с химическим контролем (рис. 6). Извлечение меди при этом возрастало в 4 - 5 и 17 - 23 раз из проб N1 и N2, соответственно (рис. 6). В результате извлечение железа из пробы N1 за 12 суток составляло 11.5 – 12% и 10%, соответственно, при 15 и 20% плотности пульпы. При этом извлечение меди из пробы N1 составляло 33.3 % и 34 - 40%.



**Рис. 6. Динамика выщелачивания меди и железа из проб хвостов N1 и N2 культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (Среда 9К, ПП -10%, pH 2,0, t -35°C, 180 об/мин) N1 (К) и N2 (К)- контроль без бактерий**

Результаты выщелачивания проб хвостов с использованием рудничной воды показали, что количество извлеченных железа и меди с помощью рудничной воды, соответственно, в 2- 2.5 и 1.5 раза уступает таковому на эксперименте с использованием *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Это можно объяснить низким титром выщелачивающих бактерий в рудничной воде ( $10^4$  кл/мл) из-за недостаточного количества в ней элементов, необходимых для роста бактерий.

Таким образом, можно заключить, что испытанные пробы Дрмбонских хвостов являются удобными объектами для биовыщелачивания. При этом биовыщелачивание можно осуществить природным консорциумом выщелачивающих бактерий рудничной воды. Для интенсификации процесса биовыщелачивания хвостов можно применять

культуру *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с природным консорциумом выщелачивающих бактерий.

#### 4.4. Устойчивость бактерий к металлам

Влияние меди и цинка на окисление Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и *L.ferriphilum* CC изучалось в пределах концентраций от 10 до 250 мМ. Показано, что окисление Fe (II) *L.ferriphilum* CC в присутствии 10 мМ меди и цинка ингибируется на 50%, тогда как ингибирование окисления Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn составляет всего 45% при содержании в среде 100 мМ меди. Никакого ингибирования окисления Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn при содержании в среде Zn (II) вплоть до 150мМ не наблюдалось. При выращивании *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и *L.ferriphilum* в условиях с постепенно увеличивающимися концентрациями меди, можно получить адаптированные к 150 и 75 мМ меди культуры, соответственно.

### ГЛАВА 5. БАКТЕРИАЛЬНО - ХИМИЧЕСКОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ПИРИТА И ХАЛЬКОПИРИТА

**Химическое выщелачивание пирита и халькопирита.** Для химического выщелачивания пирита использовали раствор соли  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$  и биогенное  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , полученное иммобилизованными на активированном угле культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Начальная концентрация  $\text{Fe}^{3+}$  составляла 5 г/л. Процесс химического выщелачивания осуществляли в режиме перемешивания при плотностях пульпы 5 и 10 % при 40°C. Об интенсивности процесса судили по убыли ионов  $\text{Fe}^{3+}$  или по образованию  $\text{Fe}^{2+}$  в растворе.

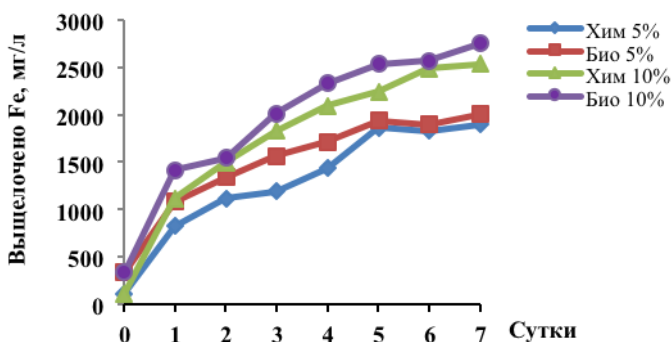


Рис. 7. Экстракции железа при химическом выщелачивании пирита (рН 1.8, t - 40°C)

Как видно из рисунка 7, количество выщелоченного из пирита железа при использовании биогенного трехвалентного железа больше, чем в случае химического



раствора. Так, степень извлечения железа составляла 8.7 и 5.8% при выщелачивании химическим и 9.3 и 6.3% биогенным растворами  $Fe_2(SO_4)_3$  при 5 и 10% плотности пульпы, соответственно.

Следует отметить, что наибольшая скорость выщелачивания железа при химическом окислении пирита наблюдалась в начале эксперимента в первый час – 2.4 - 2.5 г/л ч и постепенно снижалась до 0.2 - 0.3 г/л ч несмотря на наличие в среде достаточного количества неореагированного  $Fe^{3+}$ . Наблюдалась также прямая зависимость скорости извлечения железа от плотности пульпы. Так, максимальная скорость выщелачивания железа при 10% плотности пульпы составляла 2.52 г/л ч и в 1.6 раз превышала таковую, наблюдаемую при 5% ПП (1.4 г/л ч).

Согласно приведенным данным при выщелачивании халькопирита раствором  $Fe^{3+}$  бактериального происхождения в среду переходит в 3- 3.5 раза больше меди, чем при использовании химического раствора при плотности пульпы 5% (табл. 4).

**Таблица 4**

**Выщелачивание меди и железа при химическом окислении халькопирита**

ПП, %	$Fe^{3+}$	Выщелочено Fe				Выщелочено Cu			
		нач		4ч		Нач		4ч	
		г/л	%	г/л	%	г/л	%	мг/л	%
5	Хим.	112	0.8	780	5.3	108	0.75	210	1.4
5	Био.	768	5.1	1232	8.3	545	3.6	650	4.3
10	Хим.	202	0.7	628	2.1	407	1.3	560	1.8
10	Био.	784	2.6	1434	4.8	457	1.5	607	2.0

Количество экстрагированного железа при выщелачивании халькопирита раствором  $Fe$  (III) бактериального происхождения в 2 раза больше, чем при использовании химического раствора  $Fe$  (III). Такая же закономерность наблюдается при плотности пульпы 10%, однако количество выщелоченной меди сравнительно ниже. В результате за 7 часов из халькопирита выщелачивается 6.3 и 2.5% меди при использовании  $Fe^{3+}$  бактериального происхождения и 1.7 и 2.3 при использовании химического раствора  $Fe^{3+}$ , соответственно, при 5 и 10% плотности пульпы (табл. 4).

**Биовыщелачивание пирита и халькопирита после обработки биогенным  $Fe$  (III).**

Проведено сравнительное исследование выщелачивания пирита и халькопирита без предварительной обработки и после обработки раствором  $Fe^{3+}$ , полученного иммобилизованными клетками *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Как видно из приведенных данных, количество выщелоченного железа из обработанного биогенным  $Fe^{3+}$  пирита примерно в 1.3 раза больше, чем из необработанного минерала. Степень извлечения общего железа использованной ассоциацией бактерий составляла 38.9 и 31.9 % из обработанного и необработанного пирита, соответственно (табл. 5). В целом после химического выщелачивания и последующего бактериального выщелачивания извлекается приблизительно 50% железа из пирита.

Как видно из приведенных данных, в отличие от необработанного, обработанный халькопирит выщелачивается более интенсивно. Так, за 25 суток из обработанного биогенным железом халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 выщелачивается примерно в 1.5 раза больше меди (1.56 г/л), чем из необработанного минерала (1.01 г/л) (табл.5). В этот же период количество выщелоченного железа составляло 5.77 г/л и 2.97 г/л из обработанного и необработанного халькопирита, соответственно. В результате после предварительной обработки за 25 суток ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 из обработанного халькопирита извлекается 10.4% меди и 38.9% железа, тогда как из необработанного минерала эти значения составляют 6.3% и 31.9%, соответственно. Об интенсивности выщелачивания халькопирита свидетельствуют также изменения значения pH и ОВП выщелачивающей среды. Чем интенсивнее выщелачивается минерал, тем ниже конечные значения pH и выше ОВП раствора (табл.5).

**Таблица 5**

**Извлечение меди и железа из необработанного и обработанного биогенным железом пирита и халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 (25 суток)**

Минерал	Выщелочено Cu, г/л	Извлечено Cu, %	Выщелочено Fe, г/л	Извлечено Fe, %	Конечный	
					pH	ОВП, мВ
FeS <sub>2</sub> , необработанный	-	-	7.0	31.9	1.6	780
FeS <sub>2</sub> , обработанный биогенным Fe(III)	-	-	8.74	39.9	1.35	830
CuFeS <sub>2</sub> , необработанный	1.01	6.7	2.97	19.9	1.8	450
CuFeS <sub>2</sub> , обработанный биогенным Fe(III)	1.56	10.4	5.78	38.9	1.6	625

Таким образом, можно заключить, что предварительная обработка пирита и халькопирита раствором Fe<sup>3+</sup>, полученным с помощью иммобилизованных клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn позволяет в среднем в 1.5 - 2 раза увеличить экстракцию железа из пирита, меди и железа из халькопирита.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Согласно этим данным, предварительное химическое выщелачивание арсенопиритного и пиритного концентратов при повышенной температуре (50 - 80°C) увеличивает скорость и глубину последующего биоокисления сульфидных минералов умеренно термофильными бактериями [Фомченко, Бирюков, 2009; Муравьев и др., 2009].

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что наивысшую эффективность в выщелачивании сульфидных минералов и руд проявляет термотолерантный штамм железо- и сероокисляющих бактерий *Acidithiobacillus* 13Zn.

2. Установлено, что максимальная экстракция меди и общего железа при биовыщелачивании халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn наблюдается при плотности пульпы 10%, размеров частиц + 45 мкм и pH 2.0. При выращивании в условиях с

постепенно увеличивающимися концентрациями меди можно получить адаптированные к 150 и 75 мМ меди культуры бактерий.

3. Разработанные ассоциации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с сероокисляющей *At.albertensis* SO-2 или железooksисляющей *L.ferriphilum* CC позволяют значительно увеличить экстракцию меди из халькопирита. Наивысшую эффективность в выщелачивании меди показала ассоциация, состоящая из указанных автотрофных и гетеротрофных бактерий. Наивысшее количество извлеченного железа наблюдалось при выщелачивании пирита ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn с гетеротрофными бактериями.

4. Применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в ассоциации с *L.ferriphilum* CC приводило к увеличению степени выщелачивания железа из Тандзутской руды до 96,4%. *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание Тандзутской руды.

5. Установлено, что экстракция меди и железа при химическом выщелачивании халькопирита биогенным Fe (III), полученным с помощью иммобилизованных клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, соответственно в 3 и 2 раза больше, чем при использовании раствора Fe (III).

6. Предобработка пирита и халькопирита раствором Fe (III), полученным с помощью иммобилизованных клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, позволяет в среднем в 1,5-2,0 раза увеличить экстракцию железа из пирита меди и железа из халькопирита.

7. Конструированные ассоциации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железooksисляющими и гетеротрофными бактериями могут служить эффективными кандидатами для разработки высокоэффективного процесса БВ и биоокисления пиритсодержащих золотоносных руд, хвостов, а также медного концентрата.

#### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Stepanyan S. Kh.**, Vardanyan A. K, Vardanyan, N. S. Biooxidation of pyrite, sulfide ore and copper concentrate by new isolated sulfur and/or iron oxidizing bacteria // Biolog. Journal of Armenia, **2016**, Vol. 68, N1, p. 6 – 10.
2. **Stepanyan S. Kh.** Peculiarities of pyrite and chalcopyrite bioleaching by new isolated *Acidithiobacillus* sp. strain 13Zn // Biolog. Journal of Armenia, **2016**, Vol. 68, Special issue, p. 77 – 82.
3. **Stepanyan S.Kh.**, Vardanyan N. Biooxidation of chalcopyrite by new isolated *Acidithiobacillus* sp. 13Zn with mixed cultures// Abstract and field trip guide, XXII<sup>nd</sup> Meeting of the Petrology group of the Mineralogical Society of Poland, Contemporary Challenges in the mineralogical sciences, Mineralogia – Special papers Sandomierz, Poland, October 8 – 11, **2015**, Vol. 44, p. 97 – 98.
4. Vardanyan A., **Stepanyan S.**, Vardanyan N., Markosyan L., Sand W., Vera M., Zhang R. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching system// Minerals Engineering, **2015**, Vol. 81, p. 167 – 172.
5. **Stepanyan S.**, Vardanyan N. Biooxidation of pyrite by sulfur and/or iron oxidizing bacteria and their communities// Book of Abstracts, International Scientific Workshop “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, Yerevan, Armenia, **2014**, 5 – 8 October, p. 92.
6. **Stepanyan S.Kh.**, Vardanyan N. S. Peculiarities of bioleaching of pyrite and chalcopyrite by new isolated *Acidithiobacillus* sp. strain 13Zn// 3<sup>rd</sup> International

## Ստեփանյ ան Սամվել

### ՔԵՄՈՒԼԻՌՈՏՐՈՖ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼԵՐԻ, ՆՐԱՆՑ ՀԱՄԱԿԵՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԵՎ ԻՍՊԻԼԻԻԶՄՅԱԿ ԿՈՒԼՏՐՈՒՐԱԼԵՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ՏԱՐՐԱԼ ՈՒՇՄԱՆ ԳՈՐԾԸՆԹԱՑԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱԽԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

#### ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

**Բանալի բառեր.** Երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաներ, մանրէների կոնսորցիումներ, պիրիտի և խալկոպիրիտի տարրալուծում, կայունություն մետաղների նկատմամբ, մետաղների կորզում հանքաքարից և պոչանքներից

Հայաստանի Ախթալայի բազմամետաղային, Տանձուտի ոսկի-բազմամետաղային, ինչպես նաև Ալավերդու և Դրմբոնի պղնձային հանքավայրերից մեկուսացվել է ագիդոֆիլ քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների հինգ շտամ: Նախնական սկրինինգը ցույց է տվել, որ պիրիտի ( $\text{FeS}_2$ ) և խալկոպիրիտի ( $\text{CuFeS}_2$ ) օքսիդացման առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ը: Շտամը 5 և 8 անգամ խթանել է նաև Դրմբոնի հանքաքարի և պղնձի խտանյութի տարրալուծումը: *Acidithiobacillus* sp. 13Zn շտամը ավանդադրվել է մանրէների ավանդադրման կենտրոնում և ստացվել է MDC 7055 համարը:

Բացահայտվել են *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի միջոցով խալկոպիրիտի և Տանձուտի հանքաքարի կենսատարրալուծման օպտիմալ ֆիզիկաքիմիական և տեխնիկական պայմանները:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ *Acidithiobacillus* sp. 13Zn և *L.ferriphilum* CC համակեցություն կիրառումը թույլ է տալիս պիրիտի տարրալուծումը ավելացնել 1,8 անգամ՝ երկաթի կորզումը հասցնելով 36.8%: *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի և ծծումբ օքսիդացնող *At.albertensis* SO-2-ի համակեցությունը էական ազդեցություն է չի թողել պիրիտի օքսիդացման վրա: Սակայն պիրիտի օքսիդացման առավելագույն ակտիվությունը դիտվել է *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի և հետերոտրոֆ բակտերիաների համակեցության դեպքում (39.8%): Խալկոպիրիտի դեպքում *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի համակեցությունները *L.ferriphilum* CC-ի և *At.albertensis* SO-2-ի հետ ցուցաբերել են միներալի տարրալուծման միանման արդյունավետություն, ինչը կարելի է բացատրել նրանով, որ խալկոպիրիտը թթվալույծ միներալ է և ենթակա է գրոհման ինչպես եռարժեք երկաթի ( $\text{Fe}^{3+}$ ), այնպես էլ շրածնի պրոտոնների կողմից: Ենթադրվում է, որ նշված համակեցություններում *L.ferriphilum* CC-ն արագացնում է պիրիտի և խալկոպիրիտի տարրալուծումը՝ ռեգեներացնելով օքսիդիչը՝  $\text{Fe}^{3+}$ -ը, իսկ *At.albertensis* SO-2-ը խթանում է ծծմբի օքսիդացումը և ծծմբական թթվի առաջացումը՝ կանխելով միներալի մակերեսին ծծմբի հիդրոֆոբ շերտի և յարոզիտի ( $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ) առաջացումը,

ինչև իր հերթին հանգեցնում է խալկոպիրիտի ինտենսիվ օքսիդացմանը: ՉատկանշակաՆ է, որ խալկոպիրիտի տարրալուծման գործում առավելագույն ակտիվությունն է ցուցաբերել ավտոտրոֆ և հետերոտրոֆ բակտերիաների համակցությունը: Ենթադրվում է, որ հետերոտրոֆներն իրագրում են կուլտուրալ հեղուկում հայտնաբերված օրգանական նյութերը՝ նվազեցնելով նրանց տոքսիկ ազդեցությունը ավտոտրոֆ բակտերիաների վրա: Չնարավոր է նաև, որ նրանց կողմից շնչառության պրոցեսում արտազատված CO<sub>2</sub>-ը, խթանում է ավտոտրոֆ բակտերիաների աճը:

Ցույց է տվել, որ Դրմբոնի պղնձաքարը կարելի է օգտագործել կենսատարրալուծման եղանակով արժեքավոր մետաղները կորզելու համար: Ընդ որում, կենսատարրալուծումը կարելի է իրականացնել բակտերիաների բնական կոնսորցիումի կիրառմամբ՝ հորատանցքի ջրով: Սակայն գործընթացի ինտենսիվացման համար նպատակահարմար է բնական կոնսորցիումի հետ համատեղ օգտագործել *Acidithiobacillus* sp. 13Zn շտամը:

Պարզվել է, որ *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ը ավելի կայուն է պղնձի նկատմամբ, քան *L.ferriphilum* CC-ը: Ծտամների աճեցումը պղնձի աստիճանաբար մեծացող կոնցենտրացիաների պայմաններում թույլ է տվել ստանալ *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի և *L.ferriphilum* CC-ի 150 և 75 մՄ պղնձի նկատմամբ կայուն կուլտուրաներ:

Պարզվել է, որ կենսածին երկաթը (Fe<sup>3+</sup>) զգալիորեն ավելի արդյունավետ է պիրիտի և խալկոպիրիտի տարրալուծման գործում, քան երկաթի լուծույթը: Կենսածին երկաթով խալկոպիրիտի մշակման արդյունքում միջավայր է անցնում համապատասխանաբար 3 - 3.5 և 2 անգամ ավելի պղինձ և երկաթ:

Չատառվել է, որ պիրիտի և խալկոպիրիտի նախաշակումը *Acidithiobacillus* sp. 13Zn-ի իմոբիլիզացված բջիջների միջոցով ստացված կենսածին երկաթով թույլ է տալիս վերը նշված համակցության միջոցով միներալների հետագա կենսատարրալուծման ընթացքում կորզել 1.5 - 2.0 անգամ ավելի երկաթ և պղինձ:

**Stepanyan Samvel**

## **STUDY OF METALS LEACHING PROCESS BY CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA, THEIR COMMUNITIES AND IMMOBILIZED CULTURES**

### **SUMMARY**

**Key words:** iron and sulfur oxidizing bacteria, consortium of bacteria, bioleaching of pyrite and chalcopyrite, metal tolerance, extraction of metals from ores and tailings

Five strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria from Akhtala polymetallic, Tandzut gold-polymetallic, Alaverdi and Drmbon copper ores of Armenia were isolated. The initial

screening has revealed that *Acidithiobacillus* sp. 13Zn shows the highest oxidation activity of pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) and chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ). This strain has also stimulated the leaching of Drmbon ore and copper concentrate 5 and 8 times, respectively. The strain was deposited at the Microbial Depository Center under the number MDC 7055.

Optimal physico-chemical and technical conditions for bioleaching of chalcopyrite and Tandez ore by *Acidithiobacillus* sp. 13Zn were determined.

The studies have shown that the application of association of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn and *L.ferriphilum* CC allows to increase 1.8 times the leaching of pyrite bringing the extraction of iron to 36.8%. Association of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn and sulfur oxidizing *At.albertensis* SO-2 has no significant impact on the oxidation of pyrite. However, the highest activity of pyrite oxidation has been observed in case of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn and heterotrophic bacteria consortium (39.8 %). In case of chalcopyrite associations of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn and *L.ferriphilum* CC or *At.albertensis* SO-2 have shown the similar efficiency of mineral leaching, which can be explained by the fact that chalcopyrite is an acid-soluble mineral and is subject to attack by both ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) and hydrogen protons. In the mentioned associations *L.ferriphilum* CC accelerates the leaching of pyrite and chalcopyrite regenerating oxidizer -  $\text{Fe}^{3+}$  and *At.albertensis* stimulates the oxidation of sulfur preventing the formation of hydrophobic sulfur layer and jarosite ( $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ) on the surface of mineral, which in its turn contributes to the oxidation intensity of chalcopyrite. It is worth mentioning that the consortium of autotrophic and heterotrophic bacteria has shown the highest activity in the leaching of chalcopyrite. It is assumed that heterotrophs can digest organic substances observed in the culture liquid decreasing their toxic impact on autotrophic bacteria. Besides, it is possible that heterotrophic bacteria excrete  $\text{CO}_2$  during respiration, which stimulates the growth of autotrophic bacteria.

The studies have shown that Drmbon tailings can be used for the extraction of valuable metals by bioleaching. Moreover, bioleaching can be carried out using natural bacterial consortium of drainage water. However, to intensify bioleaching of tailings the use of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn strain combined with natural consortium is suggested.

It has been revealed that *Acidithiobacillus* sp. 13Zn is considerably more tolerant to copper than *L.ferriphilum* CC. The growth of strains under conditions of gradually increasing concentrations of copper allows to obtain cultures of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn and *L.ferriphilum* CC tolerant to 150 and 75 mM copper.

It has been shown that biogenic iron (Fe (III)) is considerably more efficient in the leaching of pyrite and chalcopyrite than iron solution. Thus the extraction of copper and iron from chalcopyrite treated by biogenic iron is 3.0-3.5 and 2 times more than in case of iron solution.

It has been revealed that pretreatment of pyrite and chalcopyrite by biogenic iron obtained by immobilized cells of *Acidithiobacillus* sp. 13Zn resulted in 1.5-2.0 times more extraction of copper and iron during their bioleaching with the above mentioned association of bacteria.