

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ШЕЙКЕР-ИНКУБАТОРЕ АВТОХТОННОЙ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ С ОКИСЛЕННОЙ РУДЫ МЕСТОРОЖДЕНИЯ ШАНУЧ

С. О. Очеретяна

Научно-исследовательский геотехнологический центр Дальневосточного отделения Российской академии наук,
г. Петропавловск-Камчатский, Россия

Аннотация: Ацидофильные хемолитотрофные бактерии играют важную роль в бактериально-химических технологиях переработки сульфидных руд и концентратов медно-никелевых месторождений. Они окисляют сульфиды и способствуют выщелачиванию металлов из руд. В статье представлены данные о влиянии различных пропорций смешивания руды с инокулятом и бактериальной суспензией на рост численности автохтонной смешанной бактериальной культуры, выделенной из окисленной руды медно-никелевого месторождения Шануч. В результате ПЦР-диагностики было определено, что в пробе видами-доминантами являлись *Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans* и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Анализируется степень разбавления инокулята на рост численности автохтонной смешанной бактериальной культуры, выделенной из окисленной руды месторождения Шануч. Эксперименты проводились в двух вариантах загрузки: инокулят + руда и бактериальная суспензия + руда при разных соотношениях разведения твёрдого к жидкому: 1:5 и 1:8. Результаты показали, что увеличение степени разбавления (1:8) приводит к более значительному росту клеток на поздних стадиях эксперимента. Например, при варианте бактериальная суспензия + руда (1:8) количество клеток резко возросло до $133,4 \times 10^7$ кл/мл. В целом эксперименты подтверждают, что разбавление способствует росту численности бактерий на поздних этапах, что может иметь значение для оптимизации бактериально-химических технологий переработки сульфидных руд.

Ключевые слова: ацидофилы, хемолитотрофы, бактерии, месторождение Шануч, питательные среды, биомасса, планктонные формы, биовыщелачивание, бактериально-химическое выщелачивание, биогидрометаллургия

Для цитирования: Очеретяна С. О. Оптимизация питательной среды для культивирования в шейкер-инкубаторе автохтонной смешанной культуры, выделенной с окисленной руды месторождения Шануч. *Маркшейдерия и недропользование*. 2024. №5. С. 55-59. https://doi.org/10.56195/20793332_2024_5_55_59.

OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION IN A SHAKER INCUBATOR OF AN AUTOCHTHONOUS MIXED CULTURE ISOLATED FROM OXIDIZED ORE OF THE SHANUCH DEPOSIT

S. O. Ocheretyana

Research Geotechnological Center of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia

Abstract: The article presents the results of experiments investigating the proportions of mixing ore with bacterial solutions that can be useful in the extraction of metals in hydrometallurgy. The degree of inoculum dilution on the growth of the autochthonous mixed bacterial culture isolated from the oxidized ore of the Shanuch deposit is analyzed. The experiments were carried out in two loading options: inoculum + ore and bacterial suspension + ore and at different solid to liquid ratios of 1:5 and 1:8. The results showed that an increase in the dilution degree (1:8) leads to a more significant cell growth at the later stages of the experiment. For example, with the bacterial suspension + ore (1:8) option, the cell count increased sharply to 133.4×10^7 cells/ml. In general, the experiments confirm that dilution promotes the growth of bacteria at the later stages, which may be important for the optimization of bacterial-chemical technologies for processing sulfide ores.

Keywords: acidophiles, chemolithotrophs, bacteria, Shanuch deposit, nutrient media, biomass, planktonic forms, bioleaching, bacterial-chemical leaching, biohydrometallurgy

For citation: Ocheretyana S. O. Optimization of nutrient medium for cultivation in a shaker incubator of an autochthonous mixed culture isolated from oxidized ore of the Shanuch deposit. *Mine Surveying and Subsurface Use*. 2024;(5):55-59. (In Russ.). https://doi.org/10.56195/20793332_2024_5_55_59.

Введение

Ацидофильные хемолитотрофные бактерии играют важнейшую роль в гидрометаллургии, особенно в процессах биовыщелачивания сульфидных руд [1–6]. Эти микроорганизмы способны окислять сульфиды, такие как халькопирит и пирит, а также другие соединения серы, железа и металлов, создавая кислую среду, что способствует растворению металлов [6–8]. Среди ацидофильных бактерий, используемых в биовыщелачивании, особенно важны такие виды, как *Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *A. caldus*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и др.

Бактерии рода *Acidithiobacillus* особенно важны, так как они окисляют сульфидсодержащие руды и Fe^{2+} , а также соединения серы. Например, *A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans* — это грамотрицательные бактерии, оптимальные условия роста которых достигаются при pH 2,0–2,5 и температуре 30–35 °C. *A. thiooxidans* наиболее активен в окислении элементарной серы, в то время как *A. ferrooxidans* может расти на восстановленных неорганических соединениях серы, используя трехвалентное железо как акцептор электронов. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* является значимым микроорганизмом для биовыщелачивания при высоких температурах [9–17].

Состав питательной среды оказывает значительное влияние на активность и эффективность бактерий. Оптимальная питательная среда для каждого вида бактерий обеспечивает условия, необходимые для их роста и активности, что важно для успешного бактериально-химического выщелачивания сульфидных руд. Исследования, направленные на оптимизацию питательных сред для культивирования автохтонных микроорганизмов, играют ключевую роль в повышении эффективности этих процессов [18, 19].

В монографии Г. И. Каравайко и др. [20] подробно описаны методы выделения и культивирования железо-, серо- и сульфидоокисляющих бактерий, а также питательные среды, обеспечивающие необходимые биогенные элементы и источники энергии. Tan и Chen [21] изучали процессы адсорбции *Acidithiobacillus ferrooxidans* на поверхности различных минералов, используя раствор K_2SO_4 и среду Сильвермана и Льюндгрена 9К.

Другие ученые, такие как Yaghoobi Moghaddam [22] и Yang [23], сосредоточили исследования на моделировании и оптимизации параметров биовыщелачивания для увеличения извлечения меди из бедных руд, используя стандартную среду 9К с добавлением железа и серной пудры в качестве источника энергии.

Цель эксперимента: оптимизация питательной среды для культивирования в шейкер-инкубаторе автохтонных ацидофильных хемолитотрофных бактерий, выделенных с окисленной руды месторождения Шануч.

Материал и методы исследования

Бактериальная культура. Для исследования выбрана автохтонная смешанная культура ацидофильных хемолитотрофных бактерий из коллекции Научно-исследовательского геотехнологического центра ДВО РАН (НИГТЦ ДВО РАН), выделенная научными сотрудниками из окисленной руды штольни кобальт-медно-никелевого месторождения Шануч (Камчатский край, Россия). В результате ПЦР-диагностики было определено, что в пробе видами-доминантами являлись *Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans* и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, согласно паспорту культуры микроорганизмов НИГТЦ ДВО РАН.

Руда. Минеральным субстратом для эксперимента была руда, отобранная из отвалов месторождения Шануч. В ранее проведенных экспериментах научно-исследовательской лаборатории НИГТЦ ДВО РАН использовалась руда с этого месторождения. Известно, что для руды с месторождения Шануч характерны следующие доминирующие минералы: пирротин, пентландит, халькоперит и виоларит [24, 25].

Химические анализы, проведенные в химико-аналитической лаборатории НИГТЦ ДВО РАН, показали, что в руде содержались Ni — 3,83 г/кг, Cu — 0,55 г/кг и Co — 0,089 г/кг.

Перед началом эксперимента руду измельчили, размер мелкодисперсных частиц не превышал 100 мкм. После измельчения руда прошла термообработку в сушильном шкафу 1 час при 120 °C.

Условия эксперимента. Эксперименты по активации роста численности бактериальных клеток в автохтонной смешанной культуре проводили в шейкер-инкубаторе фирмы Biosan (модель ES-20/80), колбах Эрленмейера объемом 250 мл.

Параметры культивирования: перемешивание — 150 об/мин, T = 30 °C.

Во время экспериментов использовались два варианта загрузки:

- 1) инокулят (ин.) + руда в соотношениях 1:5 и 1:8,
- 2) бактериальная суспензия (баксуспензия) + руда в соотношениях 1:5 и 1:8. В состав бактериальной суспензии входили питательная среда и инокулят в соотношении 1:4.

Состав питательной среды 9К без железа, г/л: $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 3 \text{ г}, \text{KCl} - 0,1 \text{ г}, \text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O} - 0,65 \text{ г}, \text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,5 \text{ г}, \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O} - 0,0144)$.

Растворы фильтровали шприцевыми фильтрами 0,45 мкм (фирма Gelman Sciences), а затем автоклавировали при 1 атм. в течение 1 часа. Значение pH среды для культивирования бактерий составляло 2,02. Поддержание pH осуществляли подкислением H_2SO_4 .

Численность клеток в инокуляте — $4,6 \times 10^7$ кл/мл. Численность клеток при загрузке инокулят + руда: 1:5 — $2,1 \times 10^7$ кл/мл, 1:8 — $0,67 \times 10^7$ кл/мл; баксуспензия + руда в соотношении 1:5 — $0,6 \times 10^7$ кл/мл, 1:8 — $0,1 \times 10^7$ кл/мл. Учитывали только планктонные формы бактерий размером 0,6–5 мкм. Прямой счет клеток проводили с использованием камеры Горяева. При определении pH, Eh осуществлялось на pH-метре/иономере Mettler-Tolado Seven Compact S 220 (погрешность pH $\pm 0,002$, Eh $\pm 0,2$).

Пробы отбирали один раз в сутки на протяжении 15 суток. Эксперименты выполнены в трех повторениях, в результаты записано среднее значение.

Результаты и обсуждения

На рисунке представлены данные о количестве клеток ($\text{N}_{\text{кл}} \times 10^7$) в четырех различных экспериментальных условиях, где руда смешивалась с различными растворами в разных пропорциях. Эти данные позволяют провести сравнительный анализ роста клеток в зависимости от условий и пропорций смешивания.

При условии эксперимента ин. + руда и пропорции смешивания 1:5 при загрузке численность клеток составляет $2,1 \times 10^7$ кл/мл, что является высоким показателем по сравнению с другими вариантами. В течение первых нескольких суток эксперимента численность клеток снижается до $0,03 \times 10^7$ кл/мл и повышаться начинает с пятых суток, демонстрируя незначительное увеличение. Однако начиная с девятых

суток наблюдается резкое увеличение численности клеток, достигая 18×10^7 к концу эксперимента.

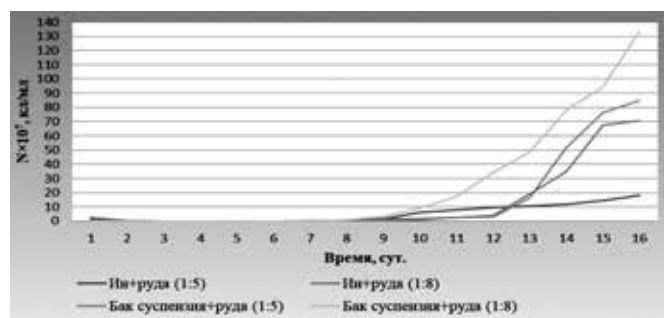


Рис. Динамика роста численности автохтонной смешанной культуры при разных вариантах загрузки

Fig. The growth dynamics comes from the autochthonous mixed culture under different loading options

При условиях эксперимента ин. + руда и пропорциях смешивания 1:8 при загрузке численность клеток составляет $0,67 \times 10^7$ кл/мл, что заметно ниже, чем в первой смеси (1:5). В первые сутки эксперимента также наблюдается снижение численности клеток, но начиная с восьми суток рост клеток становится более интенсивный. Особенно примечателен скачок с $34,9 \times 10^7$ до $67,3 \times 10^7$ кл/мл, а затем до $70,5 \times 10^7$ кл/мл на последних этапах эксперимента. Это указывает на то, что, несмотря на низкое начальное количество клеток, в условиях с более высокой степенью разбавления происходит значительный рост на поздних стадиях эксперимента.

При условиях эксперимента баксуспензия + руда и пропорциях смешивания (1:5) при загрузке численность клеток низкая и составляет $0,67 \times 10^7$ кл/мл. Тем не менее уже к десятым суткам наблюдается стабильный рост, достигая $2,5 \times 10^7$ кл/мл, и далее резко увеличивается до $16,1 \times 10^7$ кл/мл, а затем до $84,7 \times 10^7$ кл/мл.

При условиях эксперимента баксуспензия + руда и пропорциях смешивания (1:8) при загрузке численность клеток

также низкая и составляет $0,1 \times 10^7$ кл/мл. Однако начиная с десятых суток клеточный рост набирает темп, показывая резкие увеличения: с 17×10^7 до $34,5 \times 10^7$ кл/мл и затем до $133,4 \times 10^7$ кл/мл в конце эксперимента. Данный вариант демонстрирует, что даже при минимальном исходном количестве клеток увеличение степени разбавления приводит к значительному увеличению клеточной массы на более поздних этапах.

Выводы

1. В статье приведены результаты исследований оптимизации питательной среды для культивирования автохтонной смешанной культуры ацидофильных хемолитотрофных бактерий, выделенных из окисленной руды месторождения Шануч. В ней рассматривается влияние различных пропорций смешивания руды с инокулятом и бактериальной суспензией на рост численности этих микроорганизмов.

2. Анализ данных показывает, что степень разбавления оказывает значительное влияние на рост численности клеток. Варианты с большей степенью разбавления, такие как ин. + руда (1:8) и баксуспензия + руда (1:8), демонстрируют более значительный рост клеток на поздних стадиях эксперимента. Это указывает на то, что в условиях низкой численности клетки получают возможность активнее размножаться на поздних стадиях.

3. Для достижения максимального роста клеточной массы целесообразно использовать более разбавленные растворы, которые хотя и приводят к медленному старту, но обеспечивают более существенный прирост клеток на поздних этапах эксперимента.

4. Исследование пропорций смешивания руды с бактериальными растворами в гидрометаллургии полезно для оптимизации процессов извлечения металлов. Правильный подбор условий способствует максимальной эффективности биовыщелачивания, что повышает выход ценных металлов, таких как медь и золото. Использование оптимальных концентраций позволяет снизить затраты на реагенты и воду, а также минимизировать время выщелачивания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Иванов ВИ, Степанов БА. Применение микробиологических методов в обогащении и гидрометаллургии. М., 1960. 125 с. [Ivanov VI, Stepanov BA. Application of microbiological methods in enrichment and hydrometallurgy. Moscow, 1960 (In Russ.).]
- Соколова ГА, Каравайко ГИ. Физиология и геохимическая деятельность тионовых бактерий. М.: Наука. 1964. 336 с. [Sokolova GA, Karavaiko GI. Physiology and geochemical activity of thiobacteria. Moscow, 1964 (In Russ.).]
- Bobadilla-Fazzini R, Poblete-Castro I. Biofilm formation is crucial for efficient copper bioleaching from bornite under mesophilic conditions: unveiling the lifestyle and catalytic role of sulfur-oxidizing bacteria. *Extreme Microbiology*. 2021. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.761997/full>.
- Булаев АГ. Новые направления в развитии биогидрометаллургии. *Горный информационно-аналитический бюллетень*. 2021;(3-1):56–87. [Bulaev AG. New directions in the development of biohydrometallurgy. *Mining information and analytical bulletin*. 2021;(3-1):56-87 (In Russ.).] DOI: 10.25018/0236_1493_2021_31_0_56.
- Очеретяна СО. Выщелачивание меди из халькоперита в биогидрометаллургии: обзор. *Горный информационно-аналитический бюллетень*. 2022;12(10):256–265. [Ocheretyana SO. Copper leaching from chalcoperite in biohydrometallurgy: a review. *Mining information and analytical bulletin*. 2022;12(10):256-65 (In Russ.).]
- Hosseini SM, Vakilchah F, Baniasadi M, et al. Green recovery of cerium and strontium from gold mine tailings using an adapted acidophilic bacterium in one-step bioleaching approach. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2022;138:1-8. DOI: 10.1016/j.jtice.2022.104482.
- Dong Y, Zan J, Lin H. Bioleaching of heavy metals from metal tailings utilizing bacteria and fungi: Mechanisms, strengthen measures, and development prospect. *Journal of Environmental Management*. 2023;344:112514. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.118511.

8. Хайнасова ТС. Бактериально-химическое выщелачивание сульфидной кобальт-медно-никелевой руды в лабораторных условиях с использованием посевной. *Вестник Дальневосточного отделения РАН*. 2014;(4):101–107. [Khainasova TS. Bacterial-chemical leaching of sulfide cobalt-copper-nickel ore in laboratory conditions using seed culture. *Bulletin of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2014;(4):101–7 (In Russ.)].
9. Semerci N, Kunt B, Calli B. Phosphorus recovery from sewage sludge ash with bioleaching and electrodialysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2019;144:104739. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104739>.
10. Кондратьева ТФ, Булаев АГ, Муравьев МИ. Микроорганизмы в биоготехнологиях переработки сульфидных руд. М.: Наука. 2015. 212 с. [Kondratieva TF, Bulaev AG, Muravyov MI. Microorganisms in biogeotechnologies of sulfide ore processing. Moscow, 2015 (In Russ.)].
11. Hedrich S, Schippers A. Distribution of acidophilic microorganisms in natural and man-made acidic environments. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021;40:25–48. DOI: 10.21775/9781910190333.10.
12. Васильева ТВ, Блайда ИА, Иваница ВА. Основные группы микроорганизмов, участвующих в биогидрометаллургических процессах. *Проблемы экологической биотехнологии*. 2013;(1):233. [Vasilyeva TV, Blayda IA, Ivanitsa VA. The main groups of microorganisms involved in bio-hydrometallurgical processes. *Problems of ecological biotechnology*. 2013;(1):233 (In Russ.)].
13. Хомченкова АС. Тяжелые металлы и выщелачивание микроорганизмов (обзор). *Горный информационно-аналитический бюллетень (Специальный выпуск № 32 «Камчатка-5»)*. 2017;(12):228–336. [Khomchenkova AS. Heavy metals and leaching of microorganisms (review). *Mining information and analytical bulletin (Special issue № 32 «Kamchatka-5»)*. 2017;(12):228–336 (In Russ.)].
14. Хайнасова ТС. Экологические аспекты распространения ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, перспективных для биовыщелачивания. *Горный информационно-аналитический бюллетень (Специальный выпуск № 57 «Камчатка-7»)*. 2018;(12):198–207. [Khainasova TS. Ecological aspects of the spread of acidophilic chemolithotrophic microorganisms promising for bioleaching. *Mining information and analytical bulletin (Special issue No. 57 «Kamchatka-7»)*. 2018;(12):198–207 (In Russ.)].
15. Хайнасова ТС, Пашкевич РИ. Таксономический анализ культуры ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, принимающей участие в биовыщелачивании сульфидной руды месторождения Шануч. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019;(10):28–33. [Khainasova TS, Pashkevich RI. Taxonomic analysis of the culture of acidophilic chemolithotrophic microorganisms participating in the bioleaching of sulfide ore of the Shanuch deposit. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2019;(10):28–33 (In Russ.)].
16. Bosecker K Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 1997;20(3–4):591–604.
17. Xia J, Yang Y, He H, et al. Investigation of the sulfur speciation during chalcopyrite leaching by moderate the thermophile *Sulfobacillus thermosulfidooxydans*. *International Journal of Mineral Processing*. 2010;94:52–7. DOI: 10.1016/j.minpro.2009.11.005.
18. Очеретяна СО. Влияние pH и аэрации на смешанную культуру хемолитотрофных ацидофильных бактерий. *Горный информационно-аналитический бюллетень*. 2022;12(СВ 10):246–255. [Ocheretyana SO. Effect of pH and aeration on a mixed culture of chemolithotrophic acidophilic bacteria. *Mining information and analytical bulletin*. 2022;12(10):246–55 (In Russ.)]. DOI: 10.25018/0236_1493_2022_12_10_246.
19. Hubau A, Guezennec AG, Jouliau C, et al. Bioleaching to reprocess sulfidic polymetallic primary mining residues: Determination of metal leaching mechanisms. *Hydrometallurgy*. 2020;197:105484. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105484>.
20. Каравайко ГИ, Росси Дж, Агате А. Биоготехнология металлов. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. 375 с. [Karavaiko GI, Rossi J, Agate A, et al. Biogeotechnology of metals. Moscow, 1989 (In Russ.)].
21. Tan SN, Chen M. Early stage adsorption behaviour of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on minerals I: An experimental approach. *Hydrometallurgy*. 2012;119–120:87–94.
22. Yagohobi Moghaddam M, Ranjbar M, Manafi Z, et al. Modeling and optimizing bacterial leaching process parameters to increase copper extraction from a low-grade ore. *Minerals Engineering*. 2012;32:5–7. DOI: 10.1016/j.mineng.2012.03.008.
23. Yang Y, Diao M, Liu K, et al. Column bioleaching of low-grade copper ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures with a heterotrophic acidophile *Acidiphilium* sp. *Hydrometallurgy*. 2013;131–132:93–8. DOI: 10.1016/j.hydromet.2012.09.003.
24. Трухин ЮП, Степанов ВА, Сидоров МД, Кунгурова ВЕ. Шанучское медно-никелевое месторождение: геологогеофизическая модель, состав и геохимия руд. *Руды и металлы*. 2009;(5):75–81. [Trukhin YuP, Stepanov VA, Sidorov MD, et al. Shanuchskoye copper-nickel deposit: geological and geophysical model, composition and geochemistry of ores. *Ores and metals*. 2009;(5):75–81 (In Russ.)].
25. Трухин ЮП, Балыков АА, Вайнштейн МБ. Бактериально-химическое выщелачивание кобальт-медно-никелевых руд и технологическая схема переработки продуктивных растворов никеля и кобальта. *Горный информационно-аналитический бюллетень (Специальный выпуск «Камчатка-6»)*. 2017;35:5–21. [Trukhin YuP, Balykov AA, Weinstein MB. Bacterial-chemical leaching of cobalt-copper-nickel ores and a technological scheme for processing productive solutions of nickel and cobalt. *Mining information and analytical bulletin (Special issue №. 35 «Kamchatka-6»)*. 2017;35:5–21 (In Russ.)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ



Светлана Олеговна Очеретяна –
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник, Научно-исследовательский
геотехнологический центр Дальневосточного
отделения Российской академии наук,
г. Петропавловск-Камчатский,
<https://orcid.org/0009-0008-6221-8239>,
e-mail: blossom-so@yandex.ru

ABOUT THE AUTHOR

Svetlana O. Ocheretyana –
Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Research
Geotechnological Center Far Eastern Branch of the
Russian Academy of Sciences (NIGTC FEB RAS),
Petropavlovsk-Kamchatsky, Russian Federation,
<https://orcid.org/0009-0008-6221-8239>,
e-mail: blossom-so@yandex.ru