

УДК 579.852.083.18

## СЕЛЕКЦИЯ СООБЩЕСТВА АЦИДОХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВЫСОКОЙ СКОРОСТЬЮ БИООКИСЛЕНИЯ ФЛОТОКОНЦЕНТРАТА ПИРРОТИНСОДЕРЖАЩЕЙ СУЛЬФИДНОЙ РУДЫ

© 2013 г. Т. Ф. Кондратьева\*, Т. А. Пивоварова\*, А. Г. Булаев\*, П. В. Мошанецкий\*,  
И. А. Цаплина\*, Н. В. Григорьева\*, А. Е. Журавлёва\*, В. С. Меламуд\*, А. В. Белый\*\*

\*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117312

\*\*ЗАО “Полюс”, Красноярский край, 663280

e-mail: kondr@inmi.ru

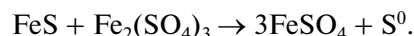
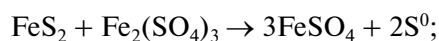
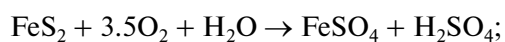
Поступила в редакцию 12.02.2013 г.

Селекционировано сообщество микроорганизмов с высокой скоростью окисления флотоконцентрата пирротинсодержащей сульфидной руды, в составе которого в качестве доминирующих культур были идентифицированы *Acidithiobacillus caldus* ОП-1 и *Ferroplasma acidiphilum* ОП-2. Отмечено также присутствие культур *Acidithiobacillus ferrooxidans* ОП-3, *Leptospirillum ferriphilum* ОП-4 и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ОП-5. Результаты анализа твердых остатков процесса показали большую степень окисления элементарной серы и извлечения золота (90.5%) при поддержании исходного значения pH в реакторе I на уровне 1.8–2.0, чем на уровне 1.6–1.8 (86.3%).

DOI: 10.7868/S055510991305005X

Биоокисление флотоконцентратов золотомышьяковых сульфидных руд сообществами ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов является важнейшей стадией в биогидрометаллургических технологиях извлечения золота. Понимание закономерностей их формирования, знание оптимальных условий для роста и энергетического метаболизма важно не только для пополнения знаний об этой уникальной физиологической группе микроорганизмов, но и для интенсификации и повышения эффективности бактериально-химических процессов.

Главным недостатком современных биогидрометаллургических технологий извлечения золота из флотоконцентратов золотомышьяковых руд является недоокисление сульфидных минералов и элементарной серы, что приводит к потерям золота и высоким расходам цианида натрия при извлечении Au. Накопление в твердой фазе в процессе биоокисления большого количества S<sup>0</sup> связано с высоким содержанием пирита или пирротина в ряде флотоконцентратов упорных золотомышьяковых сульфидных руд. Оба минерала окисляются трехвалентным железом — продуктом биоокисления микроорганизмами двухвалентного железа — с образованием элементарной серы:



Кислоторастворимые сульфидные минералы, такие, как пирротин, окисляются по полисульфидному механизму, кислотонерастворимый пирит окисляется по тиосульфатному пути [1, 2].

Сравнительный анализ видового и штаммового разнообразия сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из природных экосистем, и их мониторинг в реакторах биогидрометаллургических технологий позволяет выявить основные факторы среды, влияющие на эволюционные процессы в генетически гетерогенных природных популяциях микроорганизмов и формирующие разные микробные сообщества. Это минералогический и элементный состав субстрата окисления, температура, значение pH, наличие органических веществ [3].

Ранее из пробы флотоконцентрата упорной золотомышьяковой сульфидной руды с высоким содержанием пирротина было выделено аборигенное сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов и создано экспериментальное сообщество микроорганизмов [4]. В его состав наряду с микроорганизмами аборигенного сообщества были включены штаммы микроорганизмов: *Sulfobacillus olympiadicus* OL-6; *S. thermosulfidooxidans* HT-3, OL-7, Ser, P, M; *Leptospirillum ferriphilum*, выделенные из золотомышьяковых руд Попутнинского и Олимпиадинского месторождений; *Ferroplasma acidiphilum* Kuch, выделенный из концентрата ру-

ды Кючусского месторождения; *Acidithiobacillus thiooxidans* N (Армения); *A. caldus*, выделенный из накопительной культуры при 35°C из пробы пиритно-арсенопиритного золотомышьякового концентрата, а также сообщество микроорганизмов, выделенное из руды Попутнинского месторождения.

Была изучена скорость окисления двумя сообществами микроорганизмов разных форм серы (элементарной серы, тиосульфата и тетрагидротелурата) в качестве единственных источников энергии, образующихся в процессе окисления пирита и пирротина [4]. Несмотря на более высокую скорость окисления форм серы в качестве единственных источников энергии экспериментальным сообществом микроорганизмов, аборигенное сообщество с большей скоростью окисляло формы серы в флотоконцентрате пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды.

В режиме периодического культивирования была проведена работа по оптимизации условий роста и биоокисления флотоконцентрата золотомышьяковой сульфидной руды с высоким содержанием пирротина сообществом микроорганизмов, включающим как представителей аборигенной микрофлоры, так и экспериментально созданного сообщества [5]. Было показано, что оптимальными условиями являются: ведение процесса при поддержании pH на уровне 1.6–1.7 при 34–35°C в присутствии в среде 0.02% дрожжевого экстракта.

Актуальной проблемой совершенствования биогидрометаллургической технологии извлечения золота из флотоконцентратов упорных сульфидных руд является повышение скорости окисления элементарной серы.

Цель работы – селекция сообщества ацидохемолитотрофных микроорганизмов с высокой скоростью окисления сульфидных минералов и элементарной серы, образующейся в процессе окисления пирротинсодержащего флотоконцентрата в режиме полунепрерывного культивирования в лабораторных реакторах в разных диапазонах pH.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Объектами исследования служили: флотоконцентрат упорной золотомышьяковой сульфидной руды с высоким содержанием пирротина (30–35%), в состав которого входило (%): Fe<sub>общ.</sub> – 25.4, Fe<sub>сульф.</sub> – 20.37, As<sub>общ.</sub> – 8.45, As<sub>сульф.</sub> – 6.69, S<sub>общ.</sub> – 18.33, S<sub>сульф.</sub> – 17.84, S<sup>0</sup> – 0.8, и сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, селекционированное в процессе оптимизации условий роста и окисления флотоконцентрата в периодическом режиме культивирования [5]. В составе сообщества присутствовали культуры, выделенные из пробы флотоконцентрата, и штаммы культур ацидо-

фильных хемолитотрофных микроорганизмов из музея лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ РАН.

**Условия экспериментов в лабораторных реакторах.** Процесс полунепрерывного культивирования сообщества микроорганизмов проводили в линии из трех лабораторных реакторов объемом 2.5 л с 600 мл пульпы с 16.6%-ной плотностью флотоконцентрата при 34°C и скорости вращения вала турбинной мешалки 500 об./мин. В качестве жидкой фазы был использован солевой состав среды 9K [6] без внесения соли железа. Термостатирование осуществляли при помощи U-образного теплообменника, соединенного с термостатом Elmi TW2.02 (Латвия). Интенсивность подачи воздуха составляла 5 : 1 об./об. среды в 1 мин. Дважды в сут проводили массообмен по 75 и 125 мл пульпы. Весь объем пульпы замещался за 9 сут при скорости протока 0.0046 ч<sup>-1</sup>.

**Аналитические методы.** Величины pH и Eh измеряли с помощью pH-метра-милливольтметра pH-150МА (Беларусь); значения Eh выражали относительно нормального водородного электрода. Концентрацию ионов Fe<sup>3+</sup> и Fe<sup>2+</sup> в жидкой фазе пульпы определяли методом комплексометрического титрования [7], суммарную концентрацию ионов As<sup>3+</sup> и As<sup>5+</sup> – методом йодометрического титрования [8]. Численность клеток микроорганизмов определяли прямым подсчетом в микроскопе CX-41 (“Olympus”, Япония) с фазовым контрастом. Содержание сульфидных элементов в продуктах переработки золотосодержащих концентратов (твердые остатки) определяли после отмывки твердой фазы 5%-ным раствором HCl в течение 24 ч при 30°C флуоресцентным рентгенометрическим методом [9]. Содержание золота в твердых остатках определяли пробирным анализом. Степень извлечения золота – сорбционным цианированием осадков. Цианирование проводили в следующих условиях: плотность пульпы – 30%, pH 10.2–10.5, 1.0 г/л цианида натрия (70% времени), продувание воздухом 25 л/ч, 8% сорбента (carbon Norit 3515), 20°C в течение 48 ч. Уровень адсорбции золота на сорбенте 99–100%.

**Методы изучения видового состава сообщества микроорганизмов.** Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили согласно методу [10].

Концентрация полученного препарата ДНК составляла 30–50 мкг/мл. РНК в полученном препарате присутствовала в следовых количествах (менее 1%, согласно данным электрофоретического анализа) [10].

Для проведения полимеразной цепной реакции, клонирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК и дальнейшего секвенирования клональных вставок бактериального происхождения были использованы универсальные праймеры [11].

**Таблица 1.** Окисление флотоконцентрата отселекционированным сообществом микроорганизмов при исходном рН 1.6–1.8

Сутки (время)	Реактор	рН	Eh, мВ	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup> , г/л	Общий As, г/л	Число кл./мл × 10 <sup>9</sup>
1 (8.00)	I	1.60	622	6.72/13.13	2.24	1.68
	II	1.55	642	14.98/10.9	6.36	1.90
	III	1.48	660	17.75/9.8	9.80	1.60
1 (17.00)	I	1.64	620	5.18/14.56	2.90	1.37
	II	1.49	647	14.0/8.9	6.0	1.80
	III	1.40	662	18.06/9.8	7.70	1.77
2 (8.00)	I	1.64	612	4.6/11.55	2.24	1.56
	II	1.54	649	17.36/12.8	6.96	1.60
	III	1.46	661	17.9/10.64	9.26	1.20
2 (17.00)	I	1.77	606	3.36/13.02	2.30	1.52
	II	1.46	650	16.24/13.1	5.61	2.18
	III	1.35	663	18.26/12.3	7.48	1.20
3 (8.00)	I	1.80	605	4.06/9.1	3.46	1.90
	II	1.41	639	8.0/8.7	5.61	2.0
	III	1.21	667	16.1/10.0	8.41	1.30

Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования архейного компонента использовали оригинальную праймерную систему [12].

Объем амплификационной смеси в обоих случаях составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1 × буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (“Диалат ЛТД”, Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР при проведении ПЦР на ДНК-амплификаторе Gradient MasterCycler (“Eppendorf”, Германия) был следующим: первый цикл – 94°C, 9 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 2 мин; последующие 30 циклов: 94°C, 1 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 2 мин; завершающий цикл: – 72°C, 7 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение продуктов ПЦР из легкоплавкой агарозы и их очистку проводили с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя. Продукты амплификации клонировали с использованием набора реактивов pGEM-T System (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование проводили по методу Сэнгера с соавт. [13] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (“Applied Biosystems, Inc.”, США) на

автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (“Applied Biosystems, Inc.”) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали как внешние, так и внутренние праймеры, и чтение проводили в двух направлениях.

Первичный анализ сходства полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с помощью сервера BLASTa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Последовательности выравнивали с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTALW [14]. Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Физико-химические параметры жидкой фазы пульпы в процессе биоокисления флотоконцентрата сообществом микроорганизмов при исходном значении рН 1.6–1.8.** Опыты проводили при исходном значении рН 1.6–1.8. В табл. 1 включены данные за 3 сут после полного замещения объема пульпы, в течение которых отбирали пробы на цианирование. В таблице приводятся данные, соответствующие физико-химическим параметрам за 9 и 15 ч окисления, т.е. до введения новой порции пульпы.

Как видно из данных табл. 1, при исследуемых условиях процесса установились стабильные физи-

**Таблица 2.** Окисление флотоконцентрата отселекционированным сообществом микроорганизмов при исходном рН 1.8–2.0

Сутки (время)	Реактор	рН	Eh, мВ	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup> , г/л	Общий As, г/л	Число кл./мл × 10 <sup>9</sup>
1 (8.00)	I	1.85	605	4.06/11.72	2.89	1.40
	II	1.55	642	11.2/10.92	6.10	1.80
	III	1.48	660	17.75/9.80	8.10	1.0
1 (17.00)	I	1.94	595	3.18/11.56	2.99	1.44
	II	1.49	647	11.34/8.90	5.98	1.80
	III	1.40	662	18.06/9.80	7.10	1.0
2 (8.00)	I	1.99	609	3.36/11.76	2.99	1.44
	II	1.54	649	17.36/12.8	5.96	1.80
	III	1.46	661	17.9/10.64	8.97	1.0
2 (17.00)	I	1.91	599	3.66/10.23	2.05	1.52
	II	1.68	631	13.3/11.48	5.61	2.18
	III	1.35	663	20.49/9.94	5.60	1.20
3 (8.00)	I	1.92	615	3.92/11.48	3.90	1.60
	II	1.41	639	11.64/9.52	5.99	2.10
	III	1.21	667	16.1/10.0	7.80	1.30

ко-химические параметры. Значения рН снижались от реактора I к реактору III от 0.12 до 0.24 ед. на 1 сут эксперимента, от 0.18 до 0.42 ед. — на 2 сут и на 0.59 ед. — на 3 сут. Самое высокое подкисление среды было отмечено на 3 сут. Значение Eh за время наблюдений повышалось от реактора I к реактору III на 38, 42, 49, 57 и 62 мВ, однако было относительно низким для активного процесса окисления сульфидных минералов: в реакторе III — 660–667 мВ. Это объяснялось присутствием в жидкой фазе пульпы двухвалентного железа, выщелоченного из сульфидных минералов. До конца процесса двухвалентное железо в данных условиях эксперимента окислено не было. Максимальное содержание общего железа в жидкой фазе пульпы (30.56 г/л) отмечено на 2 сут наблюдений. На 3 сут во всех реакторах показано снижение содержания общего железа за счет осаждения трехвалентного. Содержание общего мышьяка, выщелоченного из арсенопирита, возрастало от реактора I к реактору III, достигая максимального значения 9.8 г/л. Численность клеток в реакторе II несколько увеличивалась по сравнению с реактором I, достигая максимального значения  $2.18 \times 10^9$  кл./мл. В реакторе III численность клеток уменьшалась в результате снижения рН и увеличения концентрации мышьяка в жидкой фазе пульпы.

**Физико-химические параметры жидкой фазы пульпы в процессе биоокисления флотоконцентрата сообществом микроорганизмов при исходном значении рН 1.8–2.0.** Был изучен процесс бактериально-химического окисления флотоконцентрата

при исходном значении рН 1.8–2.0. Результаты исследований представлены в табл. 2, в которую включены данные за 3 сут после полного замещения объема пульпы, в течение которых отбирали пробы на цианирование, также приводятся данные, соответствующие физико-химическим параметрам за 9 и 15 ч окисления, т.е. до введения новой порции пульпы.

Как видно из данных табл. 2, при исследуемых условиях процесса установились стабильные физико-химические параметры. Значения рН снижались от реактора I к реактору III от 0.37 до 0.54 ед. на 1 сут эксперимента, от 0.53 до 0.56 ед. — на 2 сут и на 0.71 ед. — на 3 сут. Самое интенсивное подкисление среды было отмечено в течение 3 сут. Значение Eh за время наблюдений повышалось от реактора I к реактору III, в среднем, на 58 мВ, однако было относительно низким для активного процесса окисления сульфидных минералов: в реакторе III — 660–667 мВ. До конца процесса двухвалентное железо в данных условиях эксперимента окислено не было. Максимальное содержание общего железа в жидкой фазе пульпы (30.43 г/л) отмечено на 2 сут наблюдений. На 3 сут во всех реакторах показано снижение содержания общего железа за счет осаждения трехвалентного. Содержание общего мышьяка, выщелоченного из арсенопирита, возрастало от реактора I к реактору III, достигая максимального значения 8.97 г/л. Численность клеток в реакторе II, так же, как и в процессе при исходном значении рН 1.6–1.8, несколько увеличивалась по сравнению с реактором I, достигая такой

**Таблица 3.** Содержание сульфидных элементов в исходном флотоконцентрате и в биокеках после окисления при разных значениях pH

Субстрат	Содержание, %							
	Fe <sub>сульф.</sub>	As <sub>сульф.</sub>	Sb <sub>общ.</sub>	Sb <sub>сульф.</sub>	S <sub>общ.</sub>	S <sup>0</sup>	S <sub>сульфатн.</sub>	S <sub>сульф.</sub>
Исходный концентрат	20.37	6.69	3.69	—	18.33	0.8	0	17.84
Биокек после окисления при pH <sub>исх.</sub>								
1.6–1.8	8.6	1.81	3.25	0.35	14.76	1.46	3.49	9.81
1.8–2.0	6.45	1.30	3.41	0.54	14.67	1.29	4.17	9.21

же максимальной численности  $2.18 \times 10^9$  кл./мл, и снижалась в реакторе III.

**Сравнительный анализ физико-химических параметров пульпы в процессе окисления флотоконцентрата сообществом микроорганизмов при разных исходных значениях pH в первом реакторе.** При значении pH в реакторе I в диапазоне 1.8–2.0 (второй вариант) его величина снижалась в реакторе III по ходу процесса в среднем на 0.54 ед., тогда как при значении pH в реакторе I в диапазоне 1.6–1.8 (первый вариант) – на 0.31 единицы. Это свидетельствовало о более активном окислении элементной серы в варианте при более высоком значении исходного pH. В первом варианте (pH 1.6–1.8) содержание общего железа в реакторе III составило в среднем 28.12 г/л, во втором варианте (pH 1.8–2.0) – 28.10 г/л. При более высоком значении pH шло более активное осаждение солей трехвалентного железа, поэтому можно предположить, что из сульфидных минералов в этих условиях процесса было выщелочено больше железа. В первом варианте в жидкой фазе реактора III содержалось 8.41 г/л общего мышьяка, тогда как во втором варианте – 7.80 г/л, что также, возможно, связано с большей скоростью соосаждения железа с мышьяком при более высоких исходных значениях pH в реакторах I.

В табл. 3 и 4 приведены результаты анализа твердых остатков (биокеки) после биоокисления флотоконцентрата при разных исходных значениях pH. В процессе окисления флотоконцентрата в реакторе I в диапазоне pH 1.8–2.0 в биокеке отмечено меньшее содержание Fe<sub>сульф.</sub>, As<sub>сульф.</sub> и S<sup>0</sup>, чем при pH в диапазоне 1.6–1.8 (табл. 3). При этом было окислено (%): Fe<sub>сульф.</sub> – 76.1, As<sub>сульф.</sub> – 85.3, S<sub>сульф.</sub> – 61.0 и Fe<sub>сульф.</sub> – 72.7, As<sub>сульф.</sub> – 82.5, S<sub>сульф.</sub> – 64.4 соответственно (табл. 4).

Селекционированное сообщество микроорганизмов в процессе роста и окисления энергетического субстрата в режиме полунепрерывного культивирования с большей скоростью окисляло элементную серу (содержание в твердой фазе реактора III 1.46% при pH процесса 1.6–1.8 и 1.29% при pH

процесса 1.8–2.0), чем аборигенное и экспериментальное сообщества (содержание элементной серы – 2.21 и 1.97% соответственно) [5].

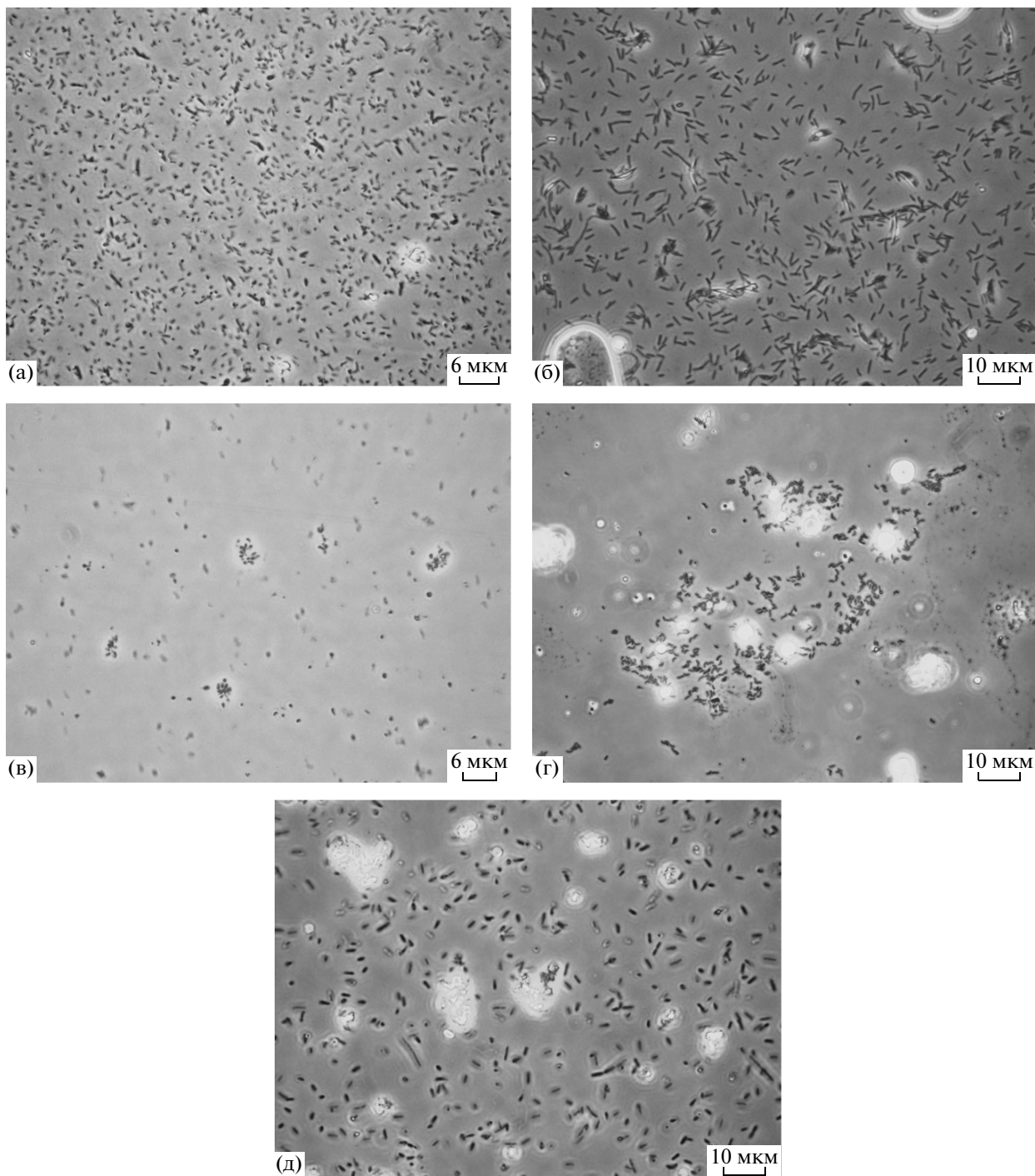
В обоих вариантах отмечено активное окисление сульфидных минералов, содержащих сурьму, причем в первом варианте, при pH 1.6–1.8, минералы сурьмы окислялись активнее, чем во втором варианте, при pH 1.8–2.0: содержание Sb<sub>сульф.</sub> в биокеке реакторов III – 0.35 и 0.54% соответственно.

Пробирным анализом в исходном флотоконцентрате было определено 75 г/т золота. В результате цианирования из исходного флотоконцентрата было извлечено 62.0% свободного золота. В процессе биоокисления флотоконцентрата при pH<sub>исх.</sub> 1.6–1.8 было дополнительно извлечено 24.3% золота. В процессе биоокисления флотоконцентрата при pH<sub>исх.</sub> 1.8–2.0 было дополнительно извлечено 28.5% золота. Селекционированное сообщество с большей скоростью окисляло сульфидные минералы, содержащие золото, при исходном значении pH жидкой фазы пульпы 1.8–2.0, чем при pH 1.6–1.8 при прочих равных условиях.

**Анализ видового состава селекционированного сообщества микроорганизмов.** В жидкой фазе пульпы реакторов III в процессе окисления фло-

**Таблица 4.** Степень окисления сульфидных минералов и извлечение золота из биокеков после окисления флотоконцентрата при разных значениях pH

Субстрат	Степень окисления, %			Извлечение, %
	Fe <sub>сульф.</sub>	As <sub>сульф.</sub>	S <sub>сульф.</sub>	
Исходный концентрат	—	—	—	62.0
Биокек после окисления при pH <sub>исх.</sub>				
1.6–1.8	72.69	82.50	64.43	86.3
1.8–2.0	76.08	85.32	61.0	90.5



Общий вид клеток сообщества ацидохемолитотрофных микроорганизмов из жидкой фазы пульпы реактора III, сконцентрированной в 5 раз (а); культура *Acidithiobacillus caldus* ОП-1 (б); культура *Ferroplasma acidiphilum* ОП-2 (в); культура *Leptospirillum ferriphilum* ОП-4 (г); культура *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ОП-5 (д).

токонцентрата при разных исходных значениях рН отмечены клетки микроорганизмов с морфотипами *Acidithiobacillus* spp., *Leptospirillum* spp., *Sulfobacillus* spp. и *Ferroplasma* spp. (рисунок а). Преобладали палочки с средним размером клеток ( $0.3 \times 1.6$ ) мкм; встречались более крупные

палочки со средним размером ( $0.5 \times 2.4$ ) мкм, а также округлые клетки архей и изогнутые клетки лептоспирилл.

С использованием метода выделения чистых культур микроорганизмов многократными рассевами жидкой фазы пульпы в десятикратных пре-

дельных разведениях была выделена доминирующая бактерия, обозначенная “Б”, и доминирующий археон, обозначенный “А”, и изучены их молекулярно-биологические характеристики.

Была определена практически полная последовательность (1438 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК у доминирующей в сообществе бактерии “Б”. Проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank. Из полученных данных следовало, что филогенетически наиболее близкими к исследованной бактерии “Б” были виды *Acidithiobacillus caldus* штамм DX-2 (DQ470072), *A. caldus* штамм SM-1 (CP002573), *A. caldus* штамм N39-30-02 (EU499920) и *Thiobacillus caldus* (AF137369). Уровень сходства последовательностей бактерии “Б” с штаммом *A. caldus* DX-2 составил 100%, с штаммом *A. caldus* SM-1 и штаммом *A. caldus* N39-30-02 – 99.9%, с штаммом бактерий *T. caldus* – 99.6%. Уровень сходства с типовым штаммом *A. caldus* ATCC 51756 (Z29975) – 99.7%. По существующим в настоящее время представлениям [15] обнаруженный уровень сходства последовательностей гена 16S рРНК позволил отнести бактериальную культуру “Б” к виду *A. caldus* ОП-1 (рисунок б).

Была определена практически полная последовательность (1416 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК у доминирующего в сообществе археона “А”. Проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank. Из полученных данных следовало, что филогенетически наиболее близкими к археону “А” были виды архей *F. acidiphilum* штамм Y (NR\_028183) и *F. acidiphilum* штамм DR1 (AY222042). Уровень сходства нуклеотидной последовательности гена археона “А” и штамма *F. acidiphilum* DR1 составил 99.7%; уровень сходства с типовым штаммом *F. acidiphilum* Y – 99.5%. Обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рРНК позволил отнести культуру археона “А” к виду *F. acidiphilum* ОП-2 (рисунок в).

Согласно данным, полученным молекулярно-биологическими методами, в исходном сообществе идентифицированы только 2 доминирующих в процессе окисления флотоконцентрата микроорганизма: штамм бактерии *A. caldus*, который составил 90% от общего числа микроорганизмов, и археон *F. acidiphilum*.

Однако известно, что *A. caldus* не окисляет восстановленные формы железа, поэтому исходное сообщество микроорганизмов было проанализировано на соотношение железо- и сероокислителей культуральным методом посева жидкой фазы пульпы в предельных десятикратных разведениях

на элективные среды: Сильвермана и Лундгрена с двухвалентным железом в качестве источника энергии и на среду Алена и Брока с элементной серой [16].

Посевы проводили до десятого разведения и помещали в термостат на 35°C на 14 сут. Затем рост культур контролировали под световым микроскопом с фазово-контрастным устройством, начиная с пятого разведения. Это позволило выявить *Leptospirillum* sp. во всех реакторах в количестве 10<sup>5</sup> кл./мл. Даже в последних разведениях, где есть рост бактерий, наблюдали неоднородность морфотипов микроорганизмов в сообществе: кроме *A. caldus* на среде с элементной серой и *A. ferrooxidans* на среде с железом, были обнаружены более крупные по размеру клетки сульфобацилл и архей. В исследуемом сообществе во всех реакторах преобладали *A. caldus*. Самое высокое их содержание приходилось на реактор II и составляло 77% от общего числа клеток. Число клеток *A. caldus* снижалось к реактору III до 45.24%. Численность клеток *A. ferrooxidans* была невелика и составляла 6.49% в реакторе I и снижалась к реактору III до 3.84%. В реакторе III, где накапливались продукты метаболизма и лизиса клеток, увеличивалась численность архей рода *Ferroplasma* (27.61%) и бактерий рода *Sulfobacillus* (23.31%), нуждающихся в небольших количествах органических веществ.

*A. ferrooxidans* ОП-3, *L. ferriphilum* ОП-4 (рисунок г) и *S. thermosulfidooxidans* ОП-5 (рисунок д) были выделены в чистую культуру, и их таксономический статус подтвержден результатами анализа 16S рРНК. Уровень сходства нуклеотидной последовательности штамма *A. ferrooxidans* ОП-3 с типовым штаммом *A. ferrooxidans* AT33020<sup>T</sup> составил 99.9%, нуклеотидной последовательности штамма *S. thermosulfidooxidans* ОП-5 с штаммом *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269<sup>T</sup> – 99.8%, нуклеотидной последовательности *L. ferriphilum* ОП-4 с штаммом *L. ferriphilum* ВУ – 98.9%.

Таким образом, в составе селекционированного сообщества микроорганизмов с высокой скоростью окисления сульфидных форм железа и мышьяка, а также элементной серы, образующейся в процессе окисления сульфидных минералов флотоконцентрата с высоким содержанием пирротина, входили в качестве доминирующих культур *A. caldus* ОП-1 и *F. acidiphilum* ОП-2. Отмечено присутствие в составе сообщества также культур *A. ferrooxidans* ОП-3, *L. ferriphilum* ОП-4 и *S. thermosulfidooxidans* ОП-5.

Работа выполнена при поддержке ЗАО “Полюс” и гранта РФФИ № 13-08-00046.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shippers A., Sand W.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 1. P. 319–321.
2. *Hansford G.S., Vargas T.* // Hydrometallurgy. 2001. V. 59. № 2–3. P. 135–145.
3. *Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Фомченко Н.В., Журавлёва А.Е., Муравьев М.И., Меламуд В.С., Булаев А.Г.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 1. С. 3–28.
4. *Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Рошупко П.В., Белый А.В., Кондратьева Т.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 6. С. 640–645.
5. *Цаплина И.А., Журавлёва А.Е., Григорьева Н.В., Белый А.В., Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Меламуд В.С., Кондратьева Т.Ф.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 314–324.
6. *Silverman M.P., Lungren D.C.* // J. Bacteriol. 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
7. *Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю.* Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. С. 140–143.
8. *Суворовская И.А., Титов В.И., Бродская В.М., Васильев П.И., Липици Б.М., Элентур М.П.* // Технический анализ в цветной металлургии. М.: Металлургиздат, 1957. С. 182–184.
9. *Филиппова Н.А.* Фазовый анализ руд и продуктов их переработки. М.: Химия, 1975. 279 с.
10. *Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 500–508.
11. *Lane D.J.* // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
12. *Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 283–286.
13. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
14. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
15. *Stackebrandt E., Ebers J.* // Microbiology Today. 2006. P. 152–155.
16. Биогeотехнология металлов. Практ. рук. / Ред. Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Груднев, З.А. Авакян. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. С. 64–71.

## Selection of a Community of Acidochemolithotrophic Microorganisms with a High Oxidation Rate of Pyrrhotite-Containing Sulphide Ore Flotation Concentrate

T. F. Kondrat'eva<sup>a</sup>, T. A. Pivovarova<sup>a</sup>, A. G. Bulaev<sup>a</sup>, P. V. Moshchanetskii<sup>a</sup>, I. A. Tsaplina<sup>a</sup>, N. V. Grigor'eva<sup>a</sup>, A. E. Zhuravleva<sup>a</sup>, V. S. Melamud<sup>a</sup>, and A. V. Belyi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Vinogradskii Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>b</sup> ZAO Polyus, Krasnoyarsk krai

e-mail: kondr@inmi.ru

Received February 12, 2012

**Abstract**—A community of acidochemolithotrophic microorganisms with a high oxidation rate of pyrrhotite-containing sulphide ore flotation concentrate was selected. The *Acidithiobacillus caldus* OP-1 and *Ferropasma acidiphilum* OP-2 cultures were identified to be dominating members. The presence of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* OP-3, *Leptospirillum ferriphilum* OP-4, and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* OP-5 cultures in the community's composition was also mentioned. The analysis results of solid residues of the process showed a greater elemental sulfur oxidation level and gold recovery when the initial pH value in tank I was maintained at a level of 1.8–2.0 (90.5%) rather than 1.6–1.8 (86.3%).