

Н.К. Жаппар^{1,2}, В.М. Шайхутдинов¹, Е.Н. Канафин¹, О.А. Тен¹,
Д.С. Балпанов¹, Р.Ш. Еркасов², А.А. Бакибаев³, М.Ю. Ишмуратова⁴

¹Филиал РГП «Национальный центр биотехнологии», Степногорск, Казахстан;

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан;

³Томский государственный университет, Россия;

⁴Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова, Казахстан
(E-mail: nariman_zhappar@mail.ru)

Изучение эффективности окисления двухвалентного железа в проточном биореакторе иммобилизованными бактериями

В данной статье описывается подбор оптимального твердого носителя для иммобилизации хемолитотрофных бактерий для разработки проточного биореактора. В результате иммобилизации бактериальных клеток время окисления свежей питательной среды было сокращено с 6 до 4 суток при использовании шлака, до 3 суток — керамзита и до 2 суток — пенополиуретана. Изучена эффективность окисления двухвалентного железа в проточном биореакторе иммобилизованными бактериями при различных концентрациях серной кислоты. Во всех биореакторах при коэффициенте разбавления в диапазоне от 0,051 до 0,14 ч⁻¹ производительность трехвалентного железа и степень окисления двухвалентного железа были сравнительно высокими. Наибольшая производительность трехвалентного железа была достигнута при pH 1,6, которая составила 1,16 г·л⁻¹·ч⁻¹, что в 23,2 раза выше, чем в суспензионной культуре. Также проведены модельные испытания в перколяционных колоннах для сравнения динамики извлечения меди при традиционной серноокислотной технологии и бактериальной технологии. Испытания по выщелачиванию меди были проведены в колоннах высотой 2 м и диаметром 0,2 м на руде с крупностью 10 мм. В результате проведения модельных испытаний в течение 155 суток выход меди при бактериальном выщелачивании оказался на 34,8 % больше, чем при серноокислотном выщелачивании.

Ключевые слова: биореактор, двухвалентное железо, трехвалентное железо, бактерии, *Acidithiobacillus*, иммобилизация, твердый носитель, бактериальное извлечение, медь.

Введение

Постоянно истощающиеся запасы рентабельных месторождений вызывают необходимость разработки новых высокоэффективных и экономически привлекательных методов извлечения металлов из бедных месторождений [1].

В последнее время для руд с низким содержанием ценного металла активно развивается метод подземного выщелачивания меди. Тем не менее, в связи с сокращением запасов окисленных медных руд, возникает необходимость в переработке упорных руд. Однако такие руды общепринятыми методами плохо поддаются выщелачиванию. В этом аспекте большую помощь оказывает биогеотехнология, которая основана на природной способности хемолитотрофных бактерий (*Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* и др.) разрушать упорные сульфидные минералы и высвободить ценные металлы [2, 3].

В настоящее время промышленное применение хемолитотрофных бактерий, с целью извлечения ценных компонентов из руд, достигло широких масштабов во многих странах [3, 4].

Материалы и методы исследований

Объектом исследования являются процессы выщелачивания сульфидных руд и хемолитотрофные бактерии, окисляющие соединения серы и железа: *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*.

В работе были использованы следующие питательные среды:

Среда Ваксмана, г/л: сера (серный цвет) — 10,0; (NH₄)₂SO₄ — 0,3; KH₂PO₄ — 3,0; CaCl₂·6H₂O — 0,25; MgSO₄·7H₂O — 0,5; FeSO₄·7H₂O — 0,01; вода дистиллированная — 1000 мл.

Среда Сильвермана и Люндгрена 9К [5]: 1-й раствор: в 700 мл дистиллированной воды растворяют (г): (NH₄)₂SO₄ — 3,0; K₂HPO₄ — 0,5; KCl — 0,1; MgSO₄·7H₂O — 0,5; Ca(NO₃)₂·4H₂O — 0,01.

2-й раствор: в 300 мл дистиллированной воды добавляют 1 мл 10 н. серной кислоты и растворяют 44,2 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{pH} \approx 1,5-2,5$).

Величину pH и окислительно-восстановительный потенциал (Eh) исследуемых растворов определяли с помощью профессионального многоканального pH-метра Mettler Toledo SevenMulti.

Концентрацию серной кислоты в растворах определяли титрованием 10 мл образца 0,05 н. раствором NaOH, в качестве индикатора использовали фенолфталеин [6].

Концентрацию ионов Fe^{3+} и Fe^{2+} в жидкой фазе определяли спектрофотометрическим методом на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК-2 [7].

Содержание металлов в растворах и твердых образцах определяли методом атомной абсорбции на спектрометре «Квант-2АТ» и атомно-эмиссионной спектроскопии — на спектрометре iCAP 7200 ICP-OES Analyzer, Thermo Scientific [7].

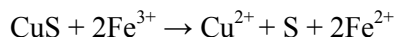
Результаты исследований

Для большей части Казахстана характерны резко континентальные климатические условия, низкие температуры. В связи с этим для разработки технологии биовыщелачивания меди являются актуальными выделение и применение хемолитотрофных психротолерантных и мезофильных бактерий, которые приспособлены к низким температурным условиям. По этой причине мы сосредоточили свое внимание на выделении аборигенных психротолерантных и мезофильных бактерий. Для этого из руд Северо-Казахстанской области нами были выделены бактерии с серо- и железоокисляющей активностью. По культурально-морфологическим и физиологическим свойствам выделенные моноизоляты были идентифицированы как *Acidithiobacillus ferrivorans* Kок и *Acidithiobacillus ferrivorans* КР, *Acidithiobacillus ferrooxidans* КокМ, *Acidithiobacillus thiooxidans* КС и *Acidithiobacillus thiooxidans* BS2 [8].

Оптимизированы условия культивирования выделенных серо- и железоокисляющих штаммов. Проведена направленная селекция штаммов на предмет устойчивости к повышенному содержанию серной кислоты. В результате устойчивость штаммов *At. ferrivorans* КР и *At. ferrivorans* Кок была увеличена с 2 г/л до 10 г/л, *At. ferrooxidans* КокМ — до 12 г/л. Данные концентрации серной кислоты соответствуют технологическим требованиям подземного выщелачивания.

На основе штаммов *Acidithiobacillus ferrivorans* Кок и *Acidithiobacillus ferrivorans* КР, *Acidithiobacillus ferrooxidans* КокМ, *Acidithiobacillus thiooxidans* КС и *Acidithiobacillus thiooxidans* BS2 был составлен консорциум для извлечения меди. Данный консорциум депонирован в Депозитарии ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности» под номером В-758.

При подземном выщелачивании продуктивные растворы многократно рециркулируют с целью достижения оптимальной концентрации меди для последующего электролиза. Химический анализ продуктивных растворов при бактериальном выщелачивании показал наличие ионов железа преимущественно в двухвалентной форме. Данный факт доказывает косвенный механизм окисления сульфидных руд. Косвенное выщелачивание происходит за счет окисления сульфида ионами Fe^{3+} , образовавшимися при бактериальном окислении ионов Fe^{2+} . Следовательно, сульфид меди окисляется ионами Fe^{3+} [9]:



В связи с этим для оптимизации технологического процесса необходима разработка регенерирующего реактора, который будет обеспечивать окисление двухвалентного железа в трехвалентную форму. Использование материалов с высокой удельной поверхностью позволяет существенно увеличить количество биомассы в реакторе за счет прикрепления микроорганизмов к поверхности носителя. Таким образом, окислительная активность проточного биореактора увеличивается за счёт снижения вымывания микроорганизмов.

С целью повышения активности бактериального консорциума регенерирующего железа проводились эксперименты по подбору твердого носителя. В качестве материалов исследовали шлак, керамзит и пенополиуретан. Для проведения ступенчатой иммобилизации клеток на твердом носителе консорциум штаммов культивировали в периодическом режиме на среде 9К с содержанием железа 3,5 г/л, pH 1,9–2,0. При переходе двухвалентного железа в окисленное состояние на 95 % осуществляли смену культуральной жидкости и вносили в биореактор новую среду. Процедуру повторяли несколько раз. Результаты экспериментов представлены на рисунке 1.

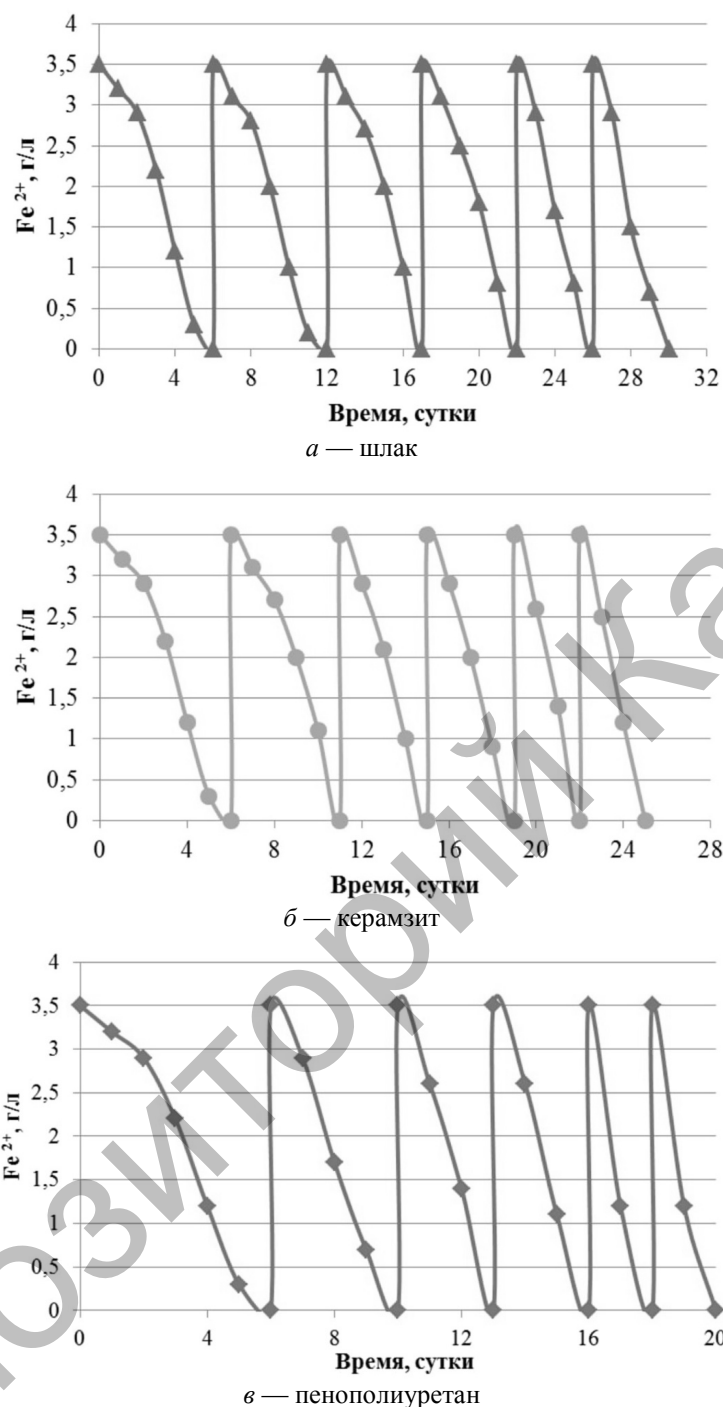


Рисунок 1. Динамика окисления Fe^{2+} при последовательном многоступенчатом культивировании консорциума микроорганизмов, иммобилизованного на инертных носителях

На рисунке 1 отчётливо видно сокращение времени окисления Fe^{2+} при каждой последующей смене среды. В результате иммобилизации бактериальных клеток время окисления свежей питательной среды было сокращено при использовании: шлака — с 6 до 4 суток, керамзита — до 3 суток и пенополиуретана — до 2 суток. Наиболее эффективным носителем является полиуретановая пена, время окисления Fe^{2+} сократилось в 3 раза (рис. 1в). Таким образом, применение пенополиуретана существенно повысило удельную окислительную активность биореактора и открывает большие возможности для применения хемолитотрофных микроорганизмов в технологии подземного извлечения меди.

Следующим этапом важно было оценить степень регенерации трехвалентного железа при различных концентрациях серной кислоты, так как с увеличением концентрации кислоты происходит

ингибирование жизнедеятельности бактерии. После ступенчатой иммобилизации консорциума микроорганизмов на полиуретановой пене биореактор запустили в непрерывный проточный режим с коэффициентом разбавления $0,051 \text{ ч}^{-1}$. Эксперимент проводили при температуре $12 \text{ }^\circ\text{C}$, концентрации железа $4,2 \text{ г/л}$ и при различных рН среды: 1,4; 1,5 и 1,6. Каждые сутки измеряли соотношение форм железа в культуральной жидкости биореактора. При постоянном окислении двухвалентного железа в протоке увеличивали коэффициент разбавления на $0,017 \text{ ч}^{-1}$. На рисунке 2 представлена производительность трехвалентного железа и степень окисления двухвалентного железа в иммобилизованных биореакторах при различных рН среды.

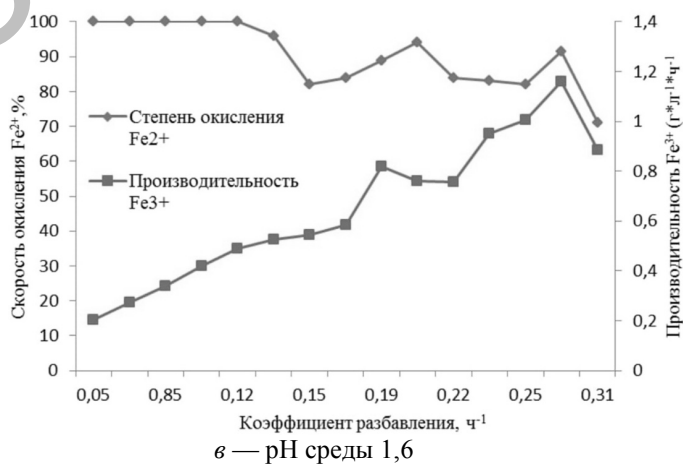
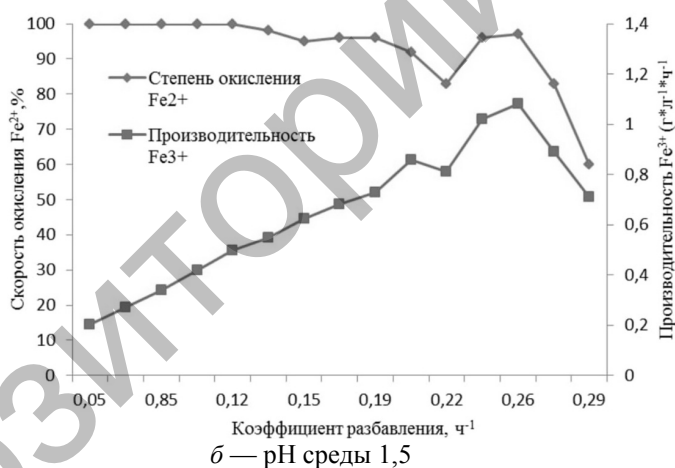
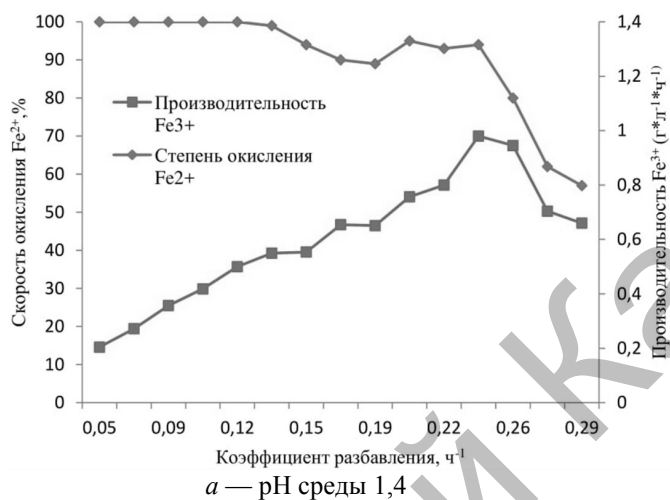


Рисунок 2. Производительность трехвалентного железа и степень окисления двухвалентного железа в проточном биореакторе, иммобилизованном бактериями, при различных концентрациях серной кислоты

Во всех биореакторах при коэффициенте разбавления в диапазоне от 0,051 до 0,14 ч⁻¹ производительность трехвалентного железа и степень окисления двухвалентного железа являются сравнительно высокими. При коэффициенте разбавления 0,25 ч⁻¹ в биореакторе с pH 1,4 степень окисления двухвалентного железа составила 94 %, а производительность Fe³⁺ показала максимальное значение 0,98 г·л⁻¹·ч⁻¹, что в 20 раз выше, чем в суспензионной культуре. При дальнейшем увеличении коэффициента разбавления степень окисления Fe²⁺ и производительность Fe³⁺ уменьшались. При коэффициенте разбавления 0,26 ч⁻¹ и 0,28 ч⁻¹ в биореакторе с pH 1,5 и 1,6 степень окисления двухвалентного железа составила соответственно 97 % и 91,5 %, а производительность Fe³⁺ показала максимальное значение — 1,08 г·л⁻¹·ч⁻¹ и 1,16 г·л⁻¹·ч⁻¹ соответственно.

Таким образом, наибольшая производительность трехвалентного железа была достигнута при pH 1,6, которая составила 1,16 г·л⁻¹·ч⁻¹, что в 23,2 раза выше, чем в суспензионной культуре. Также при данном pH коэффициент разбавления является максимальным — 0,28 ч⁻¹.

После были проведены модельные испытания для сравнения динамики извлечения меди при традиционной сернокислотной технологии и бактериальной технологии. Испытания по выщелачиванию меди проводили в колоннах высотой 2 м и диаметром 0,2 м на руде с крупностью 10 мм. На колонну, орошаемую по традиционной сернокислотной технологии, подавали раствор серной кислоты с pH 1,6. Колонну бактериального выщелачивания орошали из биореактора бактериальным раствором, содержащим консорциум микроорганизмов, pH среды 1,6 и Eh >550 мВ. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.

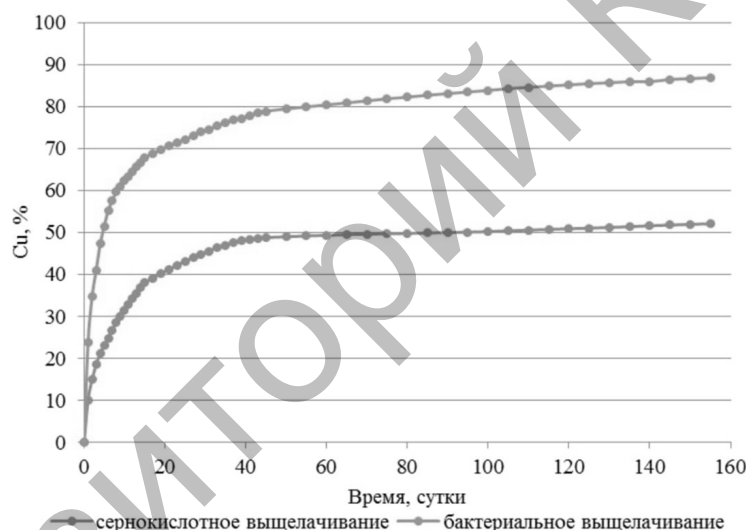


Рисунок 3. Динамика выщелачивания меди из рудного материала в колоннах

Результаты испытаний в колоннах в течение 155 суток показали большее извлечение меди при бактериальном выщелачивании — 86,9 %, чем при сернокислотном — 52,1 %.

Список литературы

- 1 Johnson D.B. Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials / D.B. Johnson // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2014. — Vol. 30. — P. 24–31.
- 2 Jerez C.A. Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals / C.A. Jerez // *Comprehensive Biotechnology.* — 2011. — Vol. 3. — P. 717–729.
- 3 Watling H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review / H.R. Watling // *Hydrometallurgy.* — 2006. — Vol. 84. — P. 81–108.
- 4 Watling H.R. Bioleaching of a low-grade copper ore, linking leach chemistry and microbiology / H.R. Watling, D.M. Collinson, J. Li, L.A. Mutch, F.A. Perrot, S.M. Rea, F. Reith, E.L.J. Watkin // *Miner. Eng.* — 2014. — Vol. 56. — P. 35–44.
- 5 Silverman M.P. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields / M.P. Silverman, D.G. Lundgren // *J. Bacteriol.* — 1959. — Vol. 77. — P. 642–647.
- 6 Золотов Ю.А. Основы аналитической химии / Ю.А. Золотов. — М.: Высш. шк., 2004. — 503 с.

7 Mendham J. Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis / J. Mendham, R.C. Denney, J.D. Barnes, M.J. Thomas. — K. Prentice Hall, 2000. — 836 p.

8 Жаппар Н.К. Выделение железоз- и сероокисляющих бактерий, перспективных при подземном выщелачивании меди / Н.К. Жаппар, В.М. Шайхутдинов, Е.Ж. Жакупов, О.А. Тен, Д.С. Балпанов // Наука и инновации — 2015: материалы XI Международ. науч.-практ. конф. — Пшемисль, Польша, 7–15 окт. 2015. — С. 47–55.

9 Cvetkovski V. Mesophilic leaching of copper sulphide sludge / V. Cvetkovski, V. Conic, M. Vukovic, M. Cvetkovska // J. Serbian Chem. Soc. — 2009. — Vol. 74. — P. 213–221.

Н.К. Жаппар, В.М. Шайхутдинов, Е.Н. Канафин, О.А. Тен,
Д.С. Балпанов, Р.Ш. Еркасов, А.А. Бакибаев, М.Ю. Ишмуратова

Бактериялармен иммобилденген ағынды биореакторда эквивалентті темірдің тотығу тиімділігін зерттеу

Мақалада ағынды биореакторды әзірлеу үшін қажет микроағзаларды иммобилизациялауға оңтайлы қатты тасымалдаушы іріктеп алу үрдісі сипатталды. Микроағзаларға қатты тасымалдаушының материалдары ретінде қож, керамзит және пенополиуретан зерттелді. Бактериялық жасушалар иммобилизациясы нәтижесінде жаңа қоректік ортаның тотығу уақыты қожды қолданғанда 6-дан 4 тәулікке, керамзитті қолданғанда 3 тәулікке дейін, ал пенополиуретанді қолданғанда 2 тәулікке дейін қысқартылды. Бактериялармен иммобилденген ағынды биореакторда эквивалентті темір тотығу нәтижелілігі күкірт қышқылының түрлі концентрацияларында зерделенді. Сұйылту коэффициенті 0,051 және 0,14 сағ⁻¹ диапазонында үшвалентті темірдің өнімділігі және эквивалентті темірдің тотығу деңгейі барлық биореакторларда біршама жоғары деңгейде болды. Үшвалентті темірдің ең көп өнімділігі рН 1,6 кезінде байқалып, 1,16 г·л⁻¹·сағ⁻¹ құрады, бұл суспензиялы өсімдіге қарағанда 23,2 есе жоғары болып табылады. Сонымен қатар күкірт қышқылды технология мен бактериялық технологияның мысты шаймалау динамикаларын салыстырмалы зерттеуін жүргізу үшін перколяциялық бағаналарда модельді тәжірибелер жүргізілді. Мысты шаймалау сынақтары биіктігі 2 м, диаметрі 0,2 м бағаналарда, ірілігі 10 мм-ден аспайтын кен материалымен іске асырылды. 155 тәулік бойы жалғасқан тәжірибелі-өнеркәсіптік сынаудың нәтижесінде бактериялық шаймалауда мыстың шығуы күкірт қышқылды шаймалауға қарағанда 34,8 % -ға көп болып шықты.

Кілт сөздер: биореактор, эквивалентті темір, үшвалентті темір, бактериялар, *Acidithiobacillus*, иммобилизация, қатты тасымалдаушы, бактериялық шаймалау, мыс.

N.K. Zhappar, V.M. Shaikhutdinov, Y.N. Kanafin, O.A. Ten,
D.S. Balpanov, R.Sh. Erkasov, A.A. Bakibaev, M. Yu. Ishmuratova

Study of the ferrous iron oxidation efficiency in an immobilized bacteria flow bioreactor

This paper describes the selection of an optimal solid carrier for the immobilization of chemolithotrophic bacteria for the development of a flow bioreactor. As a result of immobilization of bacterial cells, the oxidation time of fresh nutrient medium was reduced from 6 to 4 days by using slag, up to 3 days in case of expanded clay and up to 2 days when polyurethane foam was used. The efficiency of bacterial oxidation of ferrous iron in a flow bioreactor at different concentrations of sulfuric acid was studied. The productivity of ferric iron and the degree of ferrous iron oxidation were relatively high in all bioreactors with a dilution ratio in the range from 0.051 to 0.14 h⁻¹. The highest productivity of ferric iron was achieved at pH 1.6, which was 1.16 g·l⁻¹·h⁻¹, which is 23.2 times higher than in the suspension culture. Moreover, model tests in percolation columns have been performed to compare the dynamics of copper recovery with traditional sulfuric acid technology and bacterial technology. Copper leaching tests were carried out on columns 2 m in height and 0.2 m in diameter. The particle size of the used ore was less than 10 mm. As a result of model tests for 155 days, the copper recovery during bacterial leaching was 34.8 % higher than in sulfuric acid leaching.

Keywords: bioreactor, ferrous iron, ferric iron, bacteria, *Acidithiobacillus*, immobilization, solid support, bacterial recovery, copper.

References

1 Johnson, D.B. (2014). Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 30, 24–31.

- 2 Jerez, C.A. (2011). Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. *Comprehensive Biotechnology*, 3, 717–729.
- 3 Watling, H.R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides. A review. *Hydrometallurgy*, 84, 81–108.
- 4 Watling, H.R., Collinson, D.M., Li, J., Mutch, L.A., Perrot, F.A., & Rea, S.M. et al. (2014). Bioleaching of a low-grade copper ore, linking leach chemistry and microbiology. *Miner. Eng.*, 56, 35–44.
- 5 Silverman, M.P., & Lundgren, D.G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.*, 77, 642–647.
- 6 Zolotov, Yu.A. (2004). *Osnovy analiticheskoi khimii [Fundamentals of Analytical Chemistry]*. Moscow: Vysshiaia shkola [in Russian].
- 7 Mendham, J., Denney, R.C., Barnes, J.D., & Thomas, M.J. *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*. K. Prentice Hall, 2000.
- 8 Zhappar, N.K., Shaikhutdinov, V.M., Zhakupov, E.Zh., Ten, O.A., & Balpanov, D.S. (2015). Vydelenie zhelezo- i serookislaiushchikh bakterii, perspektivnykh pri podzemnom vyshchelachivanii medi [Isolation of iron and sulfur-oxidizing bacteria promising for underground leaching of copper]. Proceedings from Science and Innovations — 2015: *XI Mezhdunarodnaia nauchno-prakticheskaiia konferentsiia — XI International scientific-practical conference*. (October, 7–15). (pp. 47–55). Pshemysl, Polsha [in Russian].
- 9 Cvetkovski, V., Conic, V., Vukovic, M., & Cvetkovska, M. (2009). Mesophilic leaching of copper sulphide sludge. *J. Serbian Chem. Soc.*, 74, 213–221.