

Beata CWALINA*, Lucyna BUŁAŚ*
Zofia DZIERŻEWICZ*, Teresa FARBISZEWSKA**

ŁUGOWANIE METALI Z MINERAŁÓW SIARCZKOWYCH PRZEZ MIKSOTROFICZNE BAKTERIE UTLENIAJĄCE SIARKĘ I ŻELAZO

Badano proces ługowania metali z naturalnych minerałów siarczkowych oraz odpadów siarczkonosnych przy udziale miksotroficznych bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1), utleniających jony żelazawe oraz siarkę i jej związki nieorganiczne. Bioekstrakcja metali przebiegała z jednakową szybkością w obecności obu szczepów. Podczas ługowania minerałów siarczkowych badane bakterie wykazywały dużą aktywność właściwą enzymów: oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy. Enzymy te ulegały inaktywacji podczas wzrostu mikroorganizmów w układach zawierających piryty węglowe.

1. WPROWADZENIE

Znaczna część zredukowanych związków siarki nieorganicznej ulega w środowisku naturalnym procesom utleniania zachodzącym z udziałem bakterii. Niektóre gatunki, na przykład *Thiobacillus ferrooxidans*, mogą czerpać energię potrzebną komórkom do spełnienia różnorodnych funkcji życiowych z utleniania zarówno jonów żelazawych, jak i siarki oraz jej związków mineralnych (Cobley i Cox 1983, Cwalina i Dzierżewicz 1991, Ingledew 1982, Silver 1978). Ta cecha *T. ferrooxidans*, a także ich acidofilność oraz wyjątkowa zdolność adaptacji do wysokich stężeń jonów metali w roztworze, zdecydowała o powszechnym wykorzystaniu tych mikroorganizmów w procesach bioekstrakcji metali z różnorodnych materiałów (Brierley 1978, Karawajko i in. 1989, Lundgren i Malouf 1983, Lundgren i Silver 1980).

Zdolność wykorzystywania jonów żelazawych oraz siarki i jej związków nieorganicznych jako źródła elektronów dla przeprowadzanych reakcji biochemicznych stwierdzono także u miksotroficznych bakterii, wyizolowanych w Katedrze Biochemii i Biofizyki Śląskiej A.M. z dołowych wód kopalnianych (Cwalina i in. 1987, 1993). Wyosobnione szczepy określono jako *Siderocapsa* sp. 26-1(1) oraz *Sulfobacillus* sp. 26-9(11). Bakterie te nie wykazywały zdolności adaptacji do wzrastających stężeń jonów metali zawartych w pożywkach płynnych (płynach „syntetycznych”), ale tolerowały znaczne koncentracje metali uwalnianych do roztworu podczas ługowania minerałów

* Śląska Akademia Medyczna, Katedra Biochemii i Biofizyki, 41-200 Sosnowiec.

** Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Instytut Chemii, 45-365 Opole.

siarczkowych (Cwalina i in. 1993). Uzyskane dane sugerowały możliwość zastosowania omawianych bakterii w procesach bioekstrakcji metali z surowców siarczkonosnych.

Celem niniejszej pracy była analiza przebiegu ługowania miedzi i cynku z minerałów siarczkowych (kowelinu CuS , chalkopirytu CuFeS_2 i sfalerytu ZnS) oraz ekstrakcji wybranych metali z pirytów węglowych (odpadów siarczkonosnych) przy udziale testowanych szczepów bakterii miksotroficznych, a także ocena ich aktywności metabolicznej (na podstawie badania aktywności właściwej enzymów szlaku siarkowego) podczas tych procesów.

2. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

W badaniach stosowano miksotroficzne, Gram-dodatnie bakterie utleniające jony żelazawe oraz siarkę i jej związki nieorganiczne, określono jako *Siderocapsa* sp. 26-9(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) (Cwalina i in. 1987, 1993). Hodowle bakterii prowadzono w kolbach Erlenmeyera o poj. 250 cm³, zawierających 100 cm³ pożywki płynnej Winogradzkiego (wg Standard Methods... 1955; pH 6,0). Kultury inkubowano w ciepłarniach w temperaturze 30 °C dla *Siderocapsa* sp. oraz 50 °C dla *Sulfobacillus* sp. Wzrost bakterii oceniano przez bezpośrednie liczenie w komorze Bürkera (Petrycka i Mrozowska 1974).

Przebieg bioekstrakcji miedzi oraz cynku z naturalnych minerałów siarczkowych: kowelinu CuS (62,5% Cu, 33,1% S, 2,1% Fe), chalkopirytu CuFeS_2 (25,6% Cu, 27,4% Fe, 33,5% S, 10,3% SiO_2) i sfalerytu ZnS (60,7% Zn, 34,4% S, 3,8% Fe), a także bioekstrakcji wybranych metali z pirytów węglowych (zawierających m.in. 13,7% Fe, 0,2% Zn, 5,5% Al, 0,03% Ni, 0,006% Co, 27,1% S) badano w warunkach procesu stacjonarnego, w temperaturze 20 ± 2 °C (piryty węglowe ługowano także przy 30 °C). Materiały o rozdrobnieniu < 0,3 mm wprowadzano do układów ługujących w ilości 500 g na 10 dm³ roztworu (gęstość pulpy: 5% wag./obj.). Jako płyn ługujący stosowano zmodyfikowaną pożywkę 9K wg Silvermana i Lundgrena (1959) bez jonów Fe^{2+} (substratu energetycznego dla bakterii), które zastępowano ługowanymi siarczkami. Odczyn układów ługujących doprowadzano do pH 2,8 przy użyciu 0,5 M roztworu kwasu siarkowego. Układy szczepiono aktywnymi kulturami badanych bakterii dla uzyskania ich początkowej koncentracji rzędu 10^6 komórek w 1 cm³ płynu. Czas trwania doświadczeń wynosił 5, 10, 15, 20, 25 oraz 30 dni. Równocześnie prowadzono badania w układach kontrolnych, z tymolem jako substancją bakteriostatyczną.

Podłoża hodowlane oraz roztwory ługujące sterylizowano w autoklawie przy temperaturze 121°C i ciśnieniu 150 kPa, w czasie 20 min. Materiały ługowane sterylizowano w suszarce (100 °C) w czasie 1 h. Procedurę tę powtarzano trzykrotnie w odstępach 24-godzinnych.

Całkowite stężenia metali uwolnionych do płynów ługujących podczas analizowanych procesów oznaczano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z zastosowaniem spektrofotometru absorpcji atomowej typ AAS-3 firmy Carl Zeiss-Jena.

Aktywności enzymów metabolizujących nieorganiczne związki siarki (oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy) u bakterii uczestniczących w

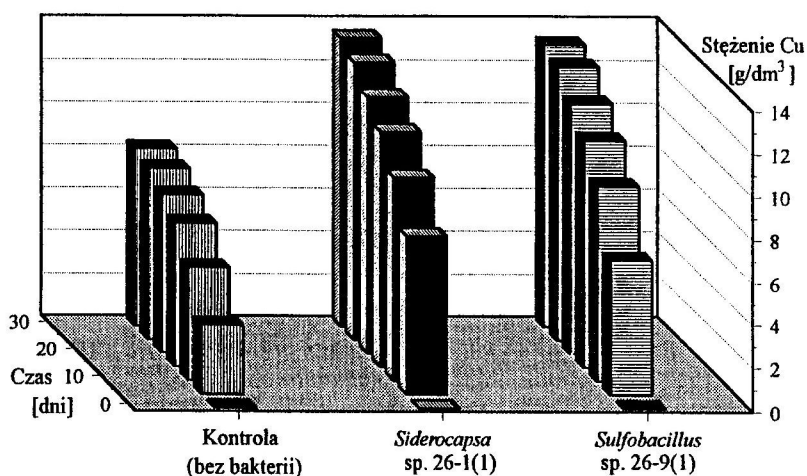
ługowaniu metali z wybranych materiałów oznaczano zgodnie z metodyką opisaną wcześniej (Cwalina i in. 1988).

3. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

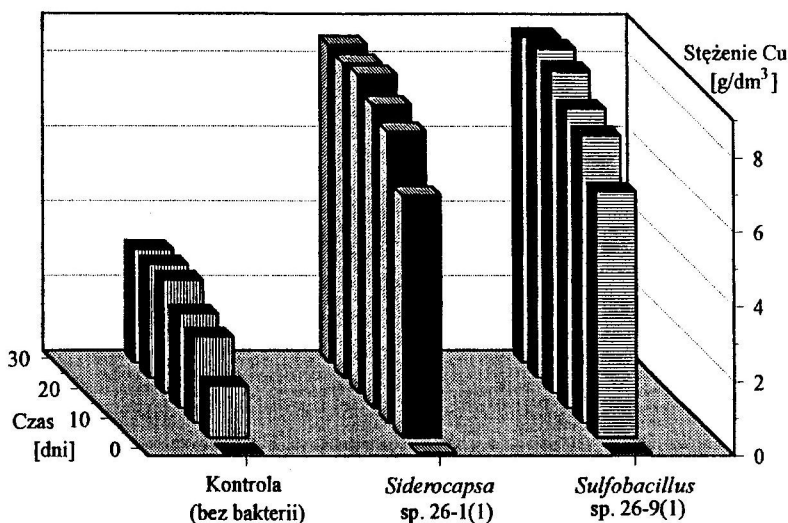
W przeciwieństwie do szczepów bakterii z gatunku *T. ferrooxidans* wykazujących zdolność adaptacji do wzrastających stężeń jonów metali wprowadzanych do pożywki, u testowanych bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) oraz *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) nie stwierdzono takich możliwości. Obecność jonów metali w środowisku prowadziła do supresji wzrostu bakterii (Cwalina i in. 1993). Wykazano, że jony metali nie powodowały jednak inaktywacji enzymów szlaku siarkowego (oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy), a jedynie stanowiły blokadę uniemożliwiającą wniknięcie substratów siarkowych do wnętrza komórek obu testowanych szczepów. Próba pobudzenia oporności na jony miedzi (II) i cynku (II) u wymienionych bakterii mikсотroficznych wykazała, że procesy adaptacji umożliwiały uzyskanie tej cechy tylko wówczas, gdy mikroorganizmy wzrastały w podłożu zawierającym siarczki metali (CuS , CuFeS_2 , ZnS), z których jony metali były sukcesywnie uwalniane do roztworu ługującego w wyniku ich bioekstrakcji. W tych warunkach bakterie tolerowały stężenia jonów miedzi oraz cynku dochodzące do 13 g/dm^3 oraz 19 g/dm^3 (Cwalina i in. 1993). Stężenia te były 6–9-krotnie wyższe od tolerowanych przez badane drobnoustroje, gdy do pożywki wprowadzało się metale od razu w formie jonowej. Postanowiono więc sprawdzić, w jakim tempie przebiega bioekstrakcja metali z minerałów siarczkowych oraz wybranych odpadów siarczkonosnych (pirytów węglowych) oraz jak zmienia się aktywność metaboliczna bakterii podczas tych procesów.

Na rysunkach 1–4 przedstawiono wyniki badania dynamiki ługowania miedzi z kowelinu CuS (rys. 1.) i chalkopiryту CuFeS_2 (rys. 2.), cynku ze sfaleryту ZnS (rys. 3.) oraz żelaza z piritów węglowych (rys. 4.).

Uzyskane dane wykazały, że największy wzrost stężenia metali uwalnianych do roztworu podczas analizowanych procesów ługowania następował w czasie pierwszych pięciu dni trwania tych procesów, co obserwowano zarówno w układach zawierających testowane bakterie, jak i w sterylnych układach kontrolnych. W kolejnych dniach szybkości bioekstrakcji metali malały, przy czym w układach z kowelinem (rys. 1.) oraz sfalerytem (rys. 3.) nie stwierdzono zupełnego zahamowania przebiegu procesu aż do 30. dnia jego trwania. W środowisku chalkopiryту efekt ten obserwowano od 20. dnia ługowania (rys. 2.), w środowisku piritów węglowych natomiast już od 15. dnia (rys. 4.). Dynamika zmian stężenia metali wylugowanych z wybranych materiałów w obecności testowanych bakterii mikсотroficznych wykazała, że procesy prowadzone z udziałem szczepów *Siderocapsa* sp. 26-1(1) oraz *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) przebiegały z identycznymi szybkościami, a ich efektywność była około 1,5–5 razy większa w porównaniu z procesami prowadzonymi w sterylnych układach kontrolnych (rys. 1–4). Koncentracja miedzi w roztworach uzyskanych po 30 dniach bakteryjnego ługowania kowelinu (rys. 1.) i chalkopiryту (rys. 2.) osiągnęła poziom odpowiednio około 13 g/dm^3 oraz $8,5 \text{ g/dm}^3$. Stężenie cynku wylugowanego ze sfaleryту w takich

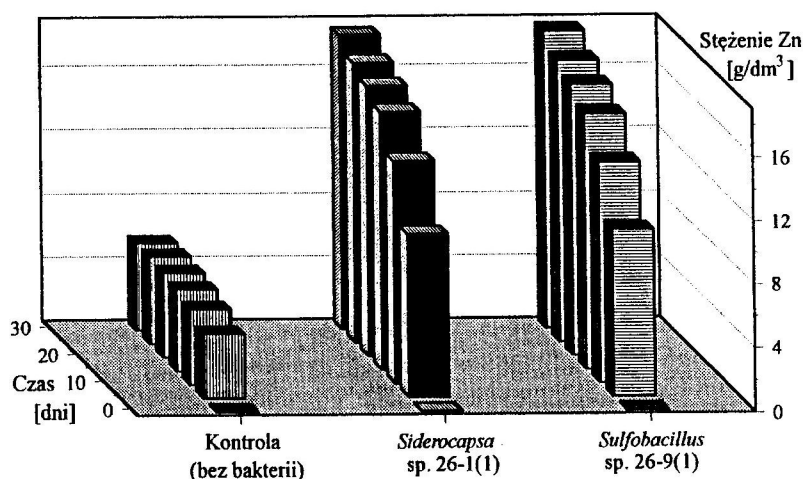


Rys. 1. Dynamika ługowania miedzi z kowelinu CuS
Fig. 1. Dynamics of copper leaching from covellite CuS

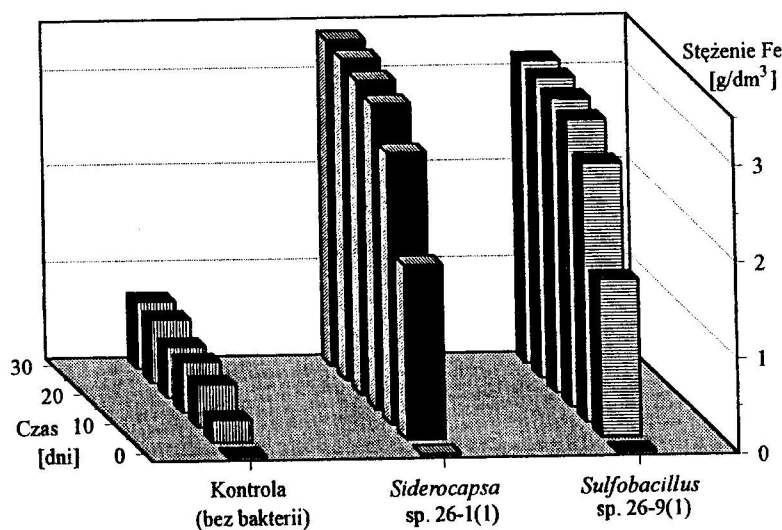


Rys. 2. Dynamika ługowania miedzi z chalkopiryty CuFeS₂
Fig. 2. Dynamics of copper leaching from chalcopyrite CuFeS₂

samych warunkach dochodziło do 18,5 g/dm³ (rys. 3.). Stężenie żelaza w płynach po bakteryjnym ługowaniu pirytów węglowych mieściło się w zakresie 3,1–3,4 g/dm³ (rys. 4.). Wydajności bioekstrakcji metali z naturalnych minerałów siarczkowych wahały się w granicach od około 40% dla kowelinu, przez 60% dla sfalerytu do 70% dla chalkopiryty (tab. 1.). Stwierdzono także znaczne zróżnicowanie efektywności ługowania



Rys. 3. Dynamika ługowania cynku ze sfalerytu ZnS
Fig. 3. Dynamics of zinc leaching from sphalerite ZnS



Rys. 4. Dynamika ługowania żelaza z pirytów węglowych
Fig. 4. Dynamics of iron leaching from coal pyrites

wybranych metali (Fe, Zn, Al, Ni, Co) z pirytów węglowych: w zakresie od 7,5% dla kobaltu do 56% dla żelaza (tab. 2.). Wyniki badań, w których użyto tych odpadów jako materiału ługowanego, sugerują możliwość intensyfikacji uwalniania z nich metali dzięki podwyższeniu temperatury. W przyjętych warunkach ługowania wzrost temperatury o 10 °C (do 30 °C) powodował 6–20-krotne zwiększenie wydajności procesu (tab. 2.).

Tabela 1. Efektywność ługowania metali z minerałów siarczkowych
w obecności badanych szczepów bakterii mikсотroficznych
Effectivity of metals leaching from sulphide minerals
in the presence of tested mixotrophic bacterial strains

Bakterie	Wylugowanie metalu, %		
	Cu/CuS	Cu/CuFeS ₂	Zn/ZnS
<i>Siderocapsa</i> sp. 26-1(1)	43,2	66,4	61,0
<i>Sulfobacillus</i> sp. 26-9(1)	42,2	67,9	61,6
Układ kontrolny, bez bakterii	27,6	23,4	18,1

CuS – kowelin; CuFeS₂ – chalkopiryt; ZnS – sfaleryt

Tabela 2. Bioekstrakcja metali z pirytów węglowych
w obecności wybranych szczepów bakterii mikсотroficznych
Bioextraction of metals from coal pyrites in the presence
of selected mixotrophic bacterial strains

Szczep bakterii	Temperatura °C	Wylugowanie metalu, %				
		Fe	Zn	Al	Ni	Co
<i>Siderocapsa</i> sp. 26-1(1)	20	50,1	8,7	15,1	25,1	8,4
	30	56,1	9,5	16,4	26,6	9,5
<i>Sulfobacillus</i> sp. 26-9(1)	20	48,0	9,1	12,5	10,6	7,5
	30	55,8	10,2	14,1	11,8	9,1
Układ kontrolny bez bakterii	20	8,7	3,1	5,3	1,3	0
	30	8,9	3,3	5,7	1,8	0

Tabela 3. Aktywność enzymów siarkowych u mikсотroficznych bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) podczas ługowania siarczkowych minerałów miedzi i cynku
Sulphur enzymes activity in mixotrophic bacteria *Siderocapsa* sp. 26-1(1) and *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) during leaching of copper and zinc sulphide minerals

Minerał siarczkowy	Szczep bakterii	Aktywność właściwa, nMol/min/mg białka		
		oksydaza siarczynowa	oksydaza tiosiarczynowa	rodanaza
Kowelin CuS	26-1(1)	377 ±30	4,0 ±0,3	143 ±14
	26-9(1)	313 ±30	3,5 ±0,3	130 ±12
Chalkopiryt CuFeS ₂	26-1(1)	384 ±33	4,2 ±0,4	142 ±13
	26-9(1)	320 ±25	3,5 ±0,4	135 ±14
Sfaleryt ZnS	26-1(1)	380 ±32	4,0 ±0,4	140 ±14
	26-9(1)	310 ±24	3,5 ±0,3	128 ±12
Piryty węglowe	26-1(1)	345 ±30	1,6 ±0,2	126 ±12
	26-9(1)	282 ±23	1,2 ±0,1	114 ±10

W tabeli 3. przedstawiono wyniki badań aktywności właściwej enzymów: oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy, uczestniczących w metabolizmie nieorganicznych substratów siarkowych u testowanych bakterii podczas procesów ługowania wybranych materiałów siarczkonośnych. Stwierdzono, że badane szczepy nie

wykazywały spadku aktywności właściwej enzymów siarkowych pomimo obecności wysokich stężeń jonów miedzi lub cynku w roztworach po ługowaniu minerałów siarczkowych. Inaktywację tych enzymów obserwowano natomiast u bakterii podczas ługowania pirytów węglowych. Efekt ten potwierdza wyjątkową toksyczność składników kumulujących się w płynie ługującym w rezultacie roztwarzania badanych odpadów (Cwalina i in. 1987, 1992).

4. WNIOSKI

1. Miksotroficzne szczepy bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) oraz *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) powodowały około 1,5–5-krotne zwiększenie efektywności ługowania metali z wybranych materiałów siarczonośnych w porównaniu z procesami prowadzonymi w sterylnych układach kontrolnych.

2. Szybkości procesów bioekstrakcji metali w obecności testowanych szczepów były takie same.

3. Szczepy *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 29-9(1) wykazywały dużą aktywność właściwą enzymów: oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy, uczestniczących w metabolizmie nieorganicznych substratów siarkowych u testowanych bakterii.

4. Badane szczepy nie wykazywały zmniejszenia aktywności właściwej enzymów szlaku siarkowego pomimo obecności wysokich stężeń jonów miedzi lub cynku w roztworach po ługowaniu minerałów siarczkowych.

5. U bakterii uczestniczących w procesie ługowania pirytów węglowych stwierdzono inaktywację enzymów szlaku siarkowego.

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną

LITERATURA

- BRIERLEY C.L. (1978), *Bacterial leaching*, CRC Crit. Rev. Microbiol. 6, s. 207–262.
- COBLEY J.C., COX J.C. (1983), *Energy conservation in acidophilic bacteria*, Microbiol. Rev. 47, s. 579–595.
- CWALINA B., DZIERŻEWICZ Z. (1991), *Adaptation dependent metabolic activity of bacteria Thiobacillus ferrooxidans*, Acta Biologica Cracoviensia 33, s. 1–11.
- CWALINA B., DZIERŻEWICZ Z., FARBISZEWSKA T., BUŁAŚ L. (1993), *Strategie przeżycia niektórych bakterii i ich przydatność w biohydrometalurgii*, Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii 27, s. 205–218.
- CWALINA B., FARBISZEWSKA T., DZIERŻEWICZ Z. (1992), *The influence of bacteria and particle size of coal pyrites on the yield of metals bioextraction*, Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii 25, s. 83–90.
- CWALINA B., WĘGLARZ L., DZIERŻEWICZ Z., WILCZOK T. (1988), *Dependence of effectiveness of leaching of metallic sulphides on enzymes involved in inorganic sulphur metabolism in Thiobacillus ferrooxidans*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, s. 100–102.

- CWALINA B., WILCZOK T., DZIERŻEWICZ Z., ZAWADA Z., POREBSKA M. (1987), *Wykorzystanie miksotroficznych bakterii żelazowych oraz ich populacji mieszanych z bakteriami rodzaju Thiobacillus w procesach biologicznego utleniania nieorganicznych związków siarki*, II etap CPBP 04.02., temat 2.7. (Sprawozdanie), Sosnowiec.
- INGLEDEW W.J. (1982), *Thiobacillus ferrooxidans. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph*, Biochim. Biophys. Acta 683, s. 89–117.
- KARAWAJKO G.I., AGATE A., GRUDEW S., AWAKJAN Z.A. (1989), (eds), *Biogeotechnologia metali, Praktyczny podręcznik* (ros.), Moskwa, UNEP.
- LUNDGREN D.G., MALOUF E.E. (1983), *Microbial extraction and concentration of metals*, Advances in Biotechnological Processes 1, s. 223–249.
- LUNDGREN D.G., SILVER M. (1980), *Ore leaching by bacteria*, Ann. Rev. Microbiol. 34, s. 263–283.
- PETRYCKA M., MROZOWSKA J. (1974), *Ćwiczenia z mikrobiologii sanitarnej*, Gliwice, Politechnika Śląska.
- SILVER M. (1978), *Metabolic mechanisms of iron-oxidizing Thiobacilli*, w: Murr L., Torma A., Brierty J. (eds), *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*, Acad. Press., New York.
- 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, s. 642–647.
- Standard Methods for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes. Nuisance Bacteria. Iron Bacteria. Sulfur Bacteria*, (1955), New York, American Public Health Association, Inc.

Cwalina B., Bulaś L., Dzierżewicz Z., Farbiszevska T., (1994), Leaching of metals from sulphide minerals by mixotrophic sulphur- and iron-oxidizing bacteria, *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 28, 145–152 (Polish text)

The leaching of metals from natural sulphide minerals as well as from pyriteferous wastes by mixotrophic bacteria *Siderocapsa* sp. 26-1(1) and *Sulfobacillus* sp. 26-9(1), was investigated. These bacteria can oxidize ferrous ion, sulphur and inorganic sulphur compounds. The rates of metals bioextraction were identical in the presence of both examined strains. The high specific activities of enzymes: sulphite oxidase, thiosulphate oxidase and rhodanese, were demonstrated in bacteria during the leaching of sulphide minerals. Inactivation of these enzymes was observed during the growth of microorganisms in systems containing coal pyrites.