Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii, 27 (1993) 205-218

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

STRATEGIE PRZEŻYCIA NIEKTÓRYCH BAKTERII I ICH PRZYDATNOŚĆ W BIOHYDROMETALURGII

W artykule omówiono strategie przeżycia w niekorzystnych warunkach środowiska niektórych bakterii przydatnych w biohydrometalurgii w kontekście możliwości praktycznego wykorzystania różnych zdolności mikroorganizmów. Analizie poddano głównie zdolności adaptacji bakterii do różnych substratów energetycznych, do kwaśnego środowiska oraz do zawartości w nim wysokich stężeń jonów metali.

1. WPROWADZENIE

W przemysłowych procesach bakteryjnego ługowania metali z minerałów siarczkowych stosowane są głównie aktywne szczepy gatunku *Thiobacillus ferrooxidans*. Szczególne znaczenie ma przy tym ich zdolność utleniania jonów żelazawych oraz siarki i jej związków nieorganicznych, a także wyjątkowa kwasolubność oraz zdolność adaptacji do wysokich stężeń metali. Poszukiwanie nowych drobnoustrojów przydatnych w procesach biometalurgicznych jest jednym z głównych kierunków badań rozwijanych w zakresie biogeotechnologii metali (Huber et al. 1986, Karawajko et al. 1989, Lundgren i Malouf 1983, Pivovarova i Golovacheva 1985), z czego wynika zainteresowanie badaczy praktycznie każdym gatunkiem mikroorganizmów posiadającym właściwości fizjologiczne wskazujące na możliwość ich wykorzystania w biotechnice. Coraz więcej uwagi poświęca się termofilnym bakteriom z rodzajów *Sulfobacillus, Sulfolobus, Acidianus* i *Leptospirillum*, które są zdolne do utleniania głównie siarki i minerałów siarczkowych przy temperaturach w zakresie 30-90 ^{o}C. Wiele gatunków należących do tych rodzajów może utleniać także jony żelazawe dla uzyskania energii w warunkach wzrostu chemoautotroficznego (Karawajko et al. 1989, Pivovarova i Golovacheva 1985). Podobne cechy stwierdzono u miksotroficznych bakterii wyizolowanych w Katedrze Biochemii i Biofizyki z dołowych wód kopalnianych (Cwalina et al. 1987). Mikroorganizmy te wzrastały w podłożach mineralnych zawierających jony żelazawe i/lub siarkę oraz jej związki nieorganiczne, a także w podłożach zawierających niektóre związki

*Śląska Akademia Medyczna, Katedra Biochemii i Biofizyki, 41-200 Sosnowiec
**Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Instytut Chemii, 45-365 Opole

organiczne i jony żelazawe przy dużej rozpiętości pH (od 2,3 do 7,0). Sugerowało to możliwość prowadzenia procesów ługowania właśnie w takich warunkach,a nie tylko w środowisku kwaśnym, preferowanym przez większość gatunków bakterii stosowanych w biohydrometalurgii. Omawiane szczepy określono jako *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1). Ich przynależność taksonomiczna nie jest jednak pewna, gdyż nie odpowiadają one ściśle żadnemu z opisanych gatunków bakterii siarkowych czy też żelazowych (Buchanan i Gibbons 1974; Standard Methods, 1955; Svorcova 1975).Rezultaty badania tych szczepów, jak również wyniki prac prowadzonych z wykorzystaniem bakterii rodzaju *Thiobacillus*, głównie gatunków *T.ferrooxidans* i *T.thiooxidans* oraz dostępne dane literaturowe stały się bodźcem do podjęcia tematu prezentowanego w niniejszym opracowaniu.

Głównym celem artykułu było zwrócenie uwagi Czytelnika na różnorodność strategii przeżycia bakterii w niekorzystnych warunkach środowiska w kontekście możliwości wykorzystania niektórych zdolności mikroorganizmów w biohydrometalurgii.

2. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

W badaniach stosowano autotroficzne, Gram-ujemne bakterie siarkowe *T. ferrooxidans* (szczepy: F26-77, F20-77, F23-77, F22-77 i F16-76) oraz miksotroficzne, Gram-dodatnie bakterie (utleniające siarkę i jony żelazawe) określone jako *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) (Cwalina et al. 1987, Cwalina i Farbiszewska 1989, Cwalina i Zawada 1988). Hodowle bakterii prowadzono w podłożach płynnych: 9 K Silvermana i Lundgrena (1959; pH 2,5) dla *T.ferrooxidans*; Waksmana i Joffe (1922; pH 4,0) lub Winogradzkiego (wg Standard Methods...,1955; pH 6,0) dla szczepów miksotroficznych. Bakterie inkubowano w cieplarkach w odpowiednich temperaturach: 30 ^{o}C dla *T.ferrooxidans* i *Siderocapsa* sp. oraz 50 ^{o}C dla *Sulfobacillus* sp.,w kolbach Erlenmeyera poj. 250 cm^3, zawierających 100 cm^3 odpowiedniej pożywki. Wzrost bakterii oceniano przez bezpośrednie liczenie w komorze Bürkera (Petrycka i Mrozowska 1974). Wpływ jonów metali (Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}) na zdolność namnażania się bakterii miksotroficznych badano w mediach hodowlanych zawierających wybrany jon w stężeniach: 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 lub 45 mM. Stężenie jonów metali ciężkich (Cd^{2+}, Pb^{2+}) podczas badania ich wpływu na aktywność enzymów szlaku siarkowego (oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy) wynosiło odpowiednio 20 lub 5 mM. W badaniach aktywności szczepów podczas ługowania minerałów siarczkowych stosowano zmodyfikowany roztwór 9K bez jonów Fe^{2+} (substratu energetycznego dla bakterii). Zastąpiono je naturalnymi siarczkami: pirytem FeS_2 (41,7% Fe, 49,2% S, 1,8% Ni), kowelinem CuS (62,5% Cu, 33,1% S, 2,1%

Fe), chalkopirytem $CuFeS_2$ (25,6% Cu, 27,4% Fe, 33,5% S, 10,3% SiO_2) lub sfalerytem ZnS (60,7% Zn, 34,4% S, 3,8% Fe) o rozdrobnieniu <0,3 mm, wprowadzonymi do układu ługującego w ilości: 5g minerału na 100 cm^3 roztworu (gęstość pulpy wynosiła 5% wag./obj.).

Podłoża hodowlane oraz roztwory ługujące sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121 °C i ciśnieniu 150 kPa w czasie 20 min. Minerały siarczkowe sterylizowano w suszarce w temperaturze 100 °C, w czasie 1 h. Procedurę tę powtarzano trzykrotnie w odstępach 24-godzinnych. Roztwory nietrwałe (np. zawierające jony Fe^{2+} lub $S_2O_3^{2-}$) sterylizowano przy użyciu filtrów bakteriologicznych G5 lub Seitza.

Badania enzymatyczne prowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodyką (Cwalina et al.1988, Cwalina et al.1990b). Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z 6 (dla *T.ferrooxidans*) lub 14 (*Siderocapsa* sp. i *Sulfobacillus* sp.) oznaczeń równoległych z zaznaczonym przedziałem ufności, obliczonym na podstawie rozpiętości (Eckschlager 1974).

Stężenia jonów tiosiarczanowych oznaczano metodą miareczkowania jodometrycznego (Williams 1985), stężenie jonów żelazawych Fe^{2+} metodą manganometryczną (Minczewski i Marczenko, 1976), natomiast stężenie jonów metali w roztworach - metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej, spekrtofotometrem typ AAS-3 firmy Carl Zeiss - Jena.

3. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Dobór bakterii odpowiednich do ługowania poszczególnych surowców jest uzależniony głównie od charakteru materiału ługowanego. Istotna jest przy tym zdolność adaptacji mikroorganizmów do ekstremalnych czynników otoczenia, a szczególnie do jego znacznego zakwaszenia oraz zawartości w nim wysokich stężeń jonów metali, także ciężkich. Bakterie *Thiobacillus ferrooxidans* są w tych procesach szczególnie przydatne. Trzeba jednak pamiętać, że zdolności adaptacyjne i aktywność metaboliczna (wyrażona między innymi czasem generacji i szybkością utleniania jonów żelazawych) dzikich szczepów tego gatunku różnią się istotnie. Wyizolowane przez nas szczepy (tab. 1. wg Cwaliny i Dzierżewicz, 1991) różniły się istotnie szybkością utleniania jonów Fe^{2+} w pożywce, natomiast ich czasy generacji (18,6-19,6 h) i właściwe szybkości wzrostu (0,035-0,037) były zbliżone. Po adaptacji do podłoża 9K, zawierającego 9g Fe^{2+} w 1 dm^3, stwierdzono znacznie większe zróżnicowanie czasu generacji badanych szczepów: od 8,3 h dla F26-77, przez 9,1 h dla F20-77 i F23-77, aż do 15,1 h dla F22-77 oraz 16,4 h dla F16-76.Różnice w szybkości utleniania jonów żelazawych uległy także zwiększeniu, choć w mniejszym stopniu.

Tabela 1. Kinetyczne parametry aktywności komórkowej dzikich szczepów bakterii *T. ferrooxidans* (30 °C, pH 2,5)

Kinetic parameters of cell activity of wild strains of *T.ferrooxidans* bacteria (30 °C, pH 2.5)

Szczep *T.ferro-oxidans*	Czas generacji (t_g), h		Właściwa szybkość wzrostu (μ), h^{-1}		Maks. szybkość utleniania Fe^{3+} (V), ($mg/dm^3 \cdot h$)	
Adaptacja	przed	po	przed	po	przed	po
F26-77	19,0	8,3	0,036	0,084	112,5	137,5
F20-77	18,6	9,1	0,037	0,076	112,5	133,3
F23-77	19,6	9,1	0,035	0,076	65,6	70,8
F16-76	19,0	16,4	0,036	0,042	48,8	62,5
F22-77	19,6	15,1	0.035	0,046	41,3	58,3

"przed" i "po" - przed i po adaptacji

Tabela 2. Wpływ długotrwałej hodowli w pożywce z jonami Fe^{3+} oraz adaptacji do pirytu FeS_2 na aktywność enzymów szlaku siarkowego u bakterii *T.ferrooxidans* F26-77

Effect of prolonged culture in the nutrient medium with Fe^{2+} ions and effect of adaptation to pyrite FeS_2 on the activity of enzymes of the sulphur pathway in T.ferrooxidans F26-77 bacteria

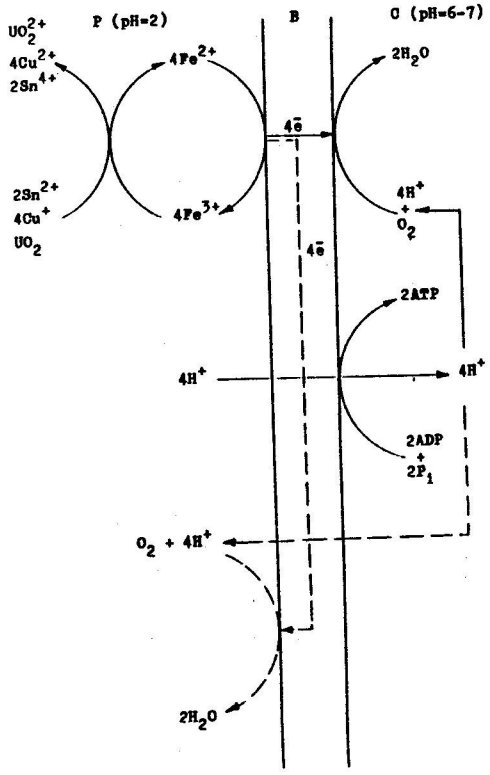
Hodowla *T.ferrooxidans* F26-77	Enzym	Aktywność właściwa [nmol/min·mg białka]
W obecności jonów Fe^{3+} przez 5 lat (30°C; pH 2,5)	SO	133,2 ± 11,5
	TO	1,63 ± 0,14
	R	208,6 ± 5,1
Jak wyżej, przez 10 lat	SO	142,6 ± 17,3
	TO	1,68 ± 0,19
	R	209,8 ± 7,1
Jak wyżej plus adaptacja i wzrost w obecności FeS_2	SO	283,5 ± 13,8
	TO	7,35 ± 0,82
	R	333,8 ± 9,8

SO - oksydaza siarczynowa
TO - oksydaza tiosiarczanowa
R - rodanaza

W prowadzonych przez nas badaniach nad przebiegiem procesów ługowania metali z różnorodnych materiałów najczęściej stosowano najaktywniejszy szczep F26-77. Jego aktywność metaboliczną, a przez to przydatność do ługowania minerałów siarczkowych, oceniano między innymi na podstawie badań aktywności właściwej podstawowych enzymów uczestniczących w metabolizmie nieorganicznych związków siarki (oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy) (Cwalina et al. 1988, Cwalina et al. 1990a; Cwalina et al. 1990b; Cwalina i Dzierżewicz 1991). Dane przedstawione w tabeli 2 (wg Cwaliny i Dzierżewicz,1991) wykazują, że aktywności badanych enzymów nie ulegały istotnym zmianom nawet podczas kilkuletniej inkubacji w podłożu 9K, wyraźnie natomiast rosły u bakterii adaptowanych do pirytu i namnażanych w bezżelazowym podłożu 9K zawierającym FeS_2 jako substrat energetyczny. Aktywność oksydazy siarczynowej wzrosła o około 30%, rodanazy o 60%, a oksydazy tiosiarczanowej o 300%. Wyniki te oraz dane zawarte w innych pracach (Cwalina et al. 1988; Cwalina et al. 1990a; Cwalina et al. 1990b; Cwalina i Dzierżewicz 1991; Groudev 1985; Silver 1978; Suzuki et al. 1990) wskazują na indukcję aktywności enzymów szlaku siarkowego w przypadku obecności w środowisku substratów siarkowych. Utlenianie siarki elementarnej i jej związków nieorganicznych jest korzystniejsze z energetycznego punktu widzenia od utleniania jonów żelazawych, gdyż znaczna część energii wyzwalanej podczas utleniania Fe^{2+} jest wydatkowana na wewnątrzkomórkową regulację pH (Ingledew 1982; Lundgren et al. 1972). Wyniki naszych badań oraz dane literaturowe (Cwalina i Dzierżewicz 1991; Groudev 1985; Silver 1978; Suzuki et al. 1990) sugerują występowanie w przyrodzie wielu naturalnych mutantów *T.ferrooxidans*. Niektóre spośród nich, bytując w niekorzystnych warunkach, wytworzyły systemy obronne umożliwiające im przetrwanie. Kultury te nie zachowały jednak zdolności szybkiej reakcji na pozytywne (w naszym rozumieniu) zmiany w otoczeniu, pozostając mikroorganizmami o mniejszej aktywności metabolicznej. Manifestuje się to szczególnie wyraźnie ich "niechęcią" do intensywnego namnażania się. Takie zmniejszenie ogólnej aktywności biologicznej może wynikać ze spowolnienia wszystkich procesów metabolicznych w komórce na skutek permanentnego niedostatku substratów energetycznych i odżywczych. Mało aktywne bakterie żyją jednak i powoli się rozmnażają, zachowując zasób energii umożliwiający im przeprowadzanie tych procesów. Może więc w przypadku hipotetycznej sytuacji katastrofalnego zmniejszenia się ilości odpowiednich substratów w środowisku naturalnym właśnie te bakterie miałyby szansę przeżycia, a obserwowany efekt zachowania zmniejszonej aktywności biologicznej jest rezultatem postulowanego przez Kołątaja (1988) "magazynowania adaptacji na cięższe czasy"?

Jak już wcześniej wspomniano, szczepy gatunku *T.ferrooxidans* mają nie tylko zdolność utleniania jonów Fe^{2+}, siarki i jej związków nieorganicznych, ale także zdolność tolerancji niskiego pH (ok. 1,0 i poniżej) oraz wysokich stężeń jonów metali. Wykazano, że dzikie szczepy tolerują stężenia 0,1-0,2 M jonów Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} (Brierley 1978; Lundgren i Silver 1980; Tuovinen et al. 1971), podczas gdy dla większości innych organizmów granica oporności na jony metali wynosi 10^{-4} M (Orłowska i Gołąb 1990). Zastosowanie odpowiednich procedur adaptacyjnych pozwala na zachowanie dużej aktywności bakterii podczas procesów ługowania nawet wtedy, gdy stężenia jonów metali są znacznie wyższe, np. cynku do 1,8 M (120 g/dm^3), niklu 1,2 M (72 g/dm^3), miedzi 0,9 M (55 g/dm^3), kobaltu 0,5 M (30 g/dm^3), żelaza 2,8 M (160 g/dm^3) (Cwalina i Farbiszewska 1989; Cwalina et al. 1990; Cwalina et al. 1990a; Cwalina et al. 1990b; Cwalina et al. 1992; Karawajko et al. 1989; Torma 1980).

Mechanizmy wyjątkowej oporności *T.ferrooxidans* na jony metali nie są w pełni poznane. Wiadomo, że zdolności adaptacyjne określonego szczepu są znacznie zróżnicowane w zależności od rodzaju podłoża hodowlanego, a ściślej mówiąc - od substratu energetycznego wprowadzonego do pożywki. Tuovinen et al. (1971) wykazali, że tolerancja na jony metali u omawianych bakterii jest znacznie większa w roztworach zawierających jony Fe^{2+} niż w środowisku jonów $S_2O_3^{2-}$. Sugeruje to, że obecność jonów Fe^{2+} może być konieczna do tworzenia systemu oporności na metale. Przypuszcza się też, że tolerancję *T.ferrooxidans* na wysokie stężenia jonów metali można wiązać z preferowaniem przez te mikroorganizmy środowiska silnie kwaśnego, w którym znaczna koncentracja jonów H^+ utrudnia jonom metali dostęp do powierzchni komórek bakterii. Koncepcja ta nie wydaje się jednak w pełni uzasadniona, gdyż wiele innych rodzajów i gatunków kwasolubnych bakterii nie wykazuje oporności na jony metali. Wyjątkowe możliwości adaptacyjne *T.ferrooxidans* są najprawdopodobniej wynikiem spontanicznych mutacji, jakim bakterie te podlegały, przystosowując się do różnych czynników środowiska. Spowodowało to, że poszczególne szczepy syntetyzują szereg jedynych w swoim rodzaju enzymów uczestniczących w utlenianiu lub redukcji jonów metali (DiSpirito i Tuovinen 1982; Lewis i Miller 1977; Sugio et al. 1990; Sugio et al. 1992). Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie prawdopodobny przebieg regulacji pH w komórkach *T.ferrooxidans* w powiązaniu z utlenianiem jonów metali (Cobley i Cox 1983; Ingledew 1982). Schemat uwzględnia utlenianie jonów żelazawych przy udziale dwóch mechanizmów: opartego na wytwarzaniu gradientu protonowego w zespole ścianowo-błonowym bakterii zgodnie z chemiosmotyczną hipotezą Mitchella (Cobley i Cox 1983; Ingledew 1982; Stryer 1986; linia ciągła) oraz na pompowaniu protonów H^+ przez oksydazę cytochromową



Rys. 1. Prawdopodobny przebieg regulacji pH w komórkach *T. ferrooxidans* w powiązaniu z utlenianiem jonów metali (wg: Ingledew, 1982; Cobley i Cox, 1983); P - przestrzeń periplazmatyczna; B - błona cytoplazmatyczna; C - cytoplazma. Pozostałe oznaczenia jak w tekście

Fig. 1. Possible course of pH regulation in *T.ferrooxidans* cells in connection with oxidation of metal ions (according to: Ingledew, 1982; Cobley and Cox, 1983); P - periplasmic space; B - cytoplasmic membrane; C - cytoplasm. Other abbreviations: see text

(Ingledew 1982; linia przerywana). O ile umiejscowienie procesu utleniania jonów Fe^{2+} na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej jest najbardziej prawdopodobne, to lokalizacja reakcji redukcji tlenu jest problematyczna. Skojarzenie tej reakcji z wytworzeniem gradientu protonowego sugeruje, że powinna ona zachodzić na wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej (linia ciągła). Enzym ATP-aza umożliwia wejście protonów wodorowych H^+ do wnętrza komórki z równoczesnym wytworzeniem wysokoenergetycznego ATP (adenozynotrójfosforanu) z ADP (adenozynodwufosforanu) i fosforanu nieorganicznego P_i. Wytworzona siła napędowa jest utrzymywana dzięki wiązaniu jonów H^+ w cytoplazmie podczas redukcji tlenu sprzężonej z transportem elektronu od utlenianego jonu Fe^{2+}. Przyjęcie mechanizmu uwzględniającego pompowanie protonów wodorowych (podczas transportu elektronów przez błonę cytoplazmatyczną) przez kompleks oksydazy cytochromowej sugeruje, że reakcja redukcji tlenu powinna zachodzić na zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej (linia przerywana). Jednoznaczne rozwiązanie problemu lokalizacji łańcucha transportu elektronów u *T.ferrooxidans* wymaga jednak dalszych badań.

Tabela 3. Wpływ jonów cynku Zn^{2+} na zdolność namnażania się bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1)

Effect of Zn^{2+} ions on multiplication ability of *Siderocapsa* sp. 26-1(1) and *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) bacteria

Stężenie Zn^{2+} [mM]	Siderocapsa sp. 26-1(1)		Sulfobacillus sp. 26-9(1)	
	t_g	lag	t_g	lag
2	14,4	1,0	14,6	0,0
5	14,4	1,0	14,5	0,0
10	14,6	1,0	14,8	0,0
15	15,8	1,5	17,2	0,5
20	28,3	2,5	25,1	1,5
25	38,1	3,5	31,5	2,5
30	41,2	4,0	36,7	3,0
35	brak wzrostu		41,6	4,0
40	brak wzrcstu		44,3	4,5
45	brak wzrostu		brak wzrostu	
Temperatura	30°C		50°C	
pH	6,0		6,0	

gdzie: t_g - czas generacji [h]
lag - długość lag-fazy [dni]

Tabela 4. Maksymalne stężenia metali tolerowane przez szczepy bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1)

Maximum metal concentrations tolerated by bacterial strains of *Siderocapsa* sp. 26-1(1) and *Sulfobacillus* sp. 26-9(1)

Bakterie	Stężenie w roztworze	Jony metali					
		Zn^{2+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}	Ni^{2+}
26-1(1) 30°C pH 6,0	g/dm^3	2,0	1,2	1,9	2,2	1,0	1,8
	mM	30	20	30	20	5	30
26-9(1) 50°C pH 6,0	g/dm^3	2,6	1,8	2,5	3,4	2,0	2,3
	mM	40	30	40	30	10	40

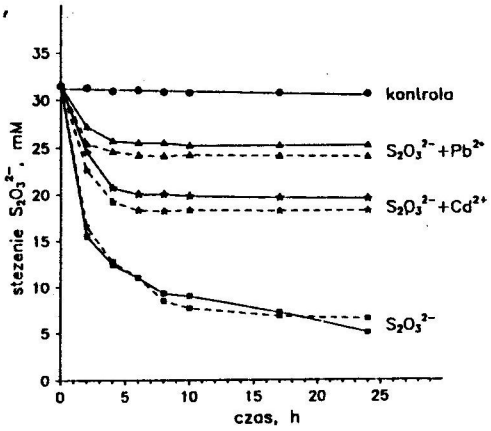
Przedstawione rozważania nie dotyczą innych rodzajów i gatunków bakterii ocenianych jako potencjalnie przydatne w procesach biometalurgicznych. Zwłaszcza odniesienie ich do bakterii Gram-dodatnich byłoby błędne, gdyż mikroorganizmy te różnią się istotnie od Gram-ujemnych bakterii *T.ferrooxidans*, głównie budową ściany komórkowej. Może to być zasadniczą przyczyną znacznie mniejszych zdolności adaptacyjnych bakterii, a niejednokrotnie nawet ich braku, co obserwowano podczas badań prowadzonych z wykorzystaniem miksotroficznych szczepów *Siderocapsa* sp. 26-1(1) oraz *Sulfobacillus* sp. 26-9(1). W tab. 3 przedstawiono przykładowe zmiany czasu generacji i długości fazy przygotowawczej (lag-fazy) badanych bakterii pod wpływem jonów cynku. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że w warunkach optymalnych czas generacji obu szczepów był taki sam i wynosił 14,5 h. Bakterie *Siderocapsa* sp. wykazywały jednak dłuższy okres lag-fazy (1 dzień) w porównaniu do *Sulfobacillus* sp., które namnażały się intensywnie od początku inkubacji w świeżym podłożu hodowlanym.

Ponieważ jony innych metali (kobaltu, miedzi, kadmu, niklu i ołowiu) powodowały podobne zmiany aktywności metabolicznej badanych bakterii (Cwalina et al. 1987), ograniczono się do przedstawienia pełnych danych w odniesieniu do jednego metalu, to jest cynku. W tab. 4 zamieszczono maksymalne stężenia metali w roztworze (wyrażone w g/dm^3 oraz w mM) tolerowane przez testowane mikroorgznizmy. W dalszych badaniach (tab.5 wg Cwaliny et al. 1987) wykazano, że oba szczepy tolerowały wyższe stężenia jonów metali (choć nie tak wysokie jak *T.ferrooxidans*), jeżeli metale były uwalniane do środowiska z minerałów siarczkowych podczas ich ługowania. Stwierdzono, że badane jony metali

Tabela 5. Stężenia metali w roztworach po 30 dniach ługowania minerałów siarczkowych (temp. 30°C) w obecności bakterii *T.ferrooxidans* F26-77 (przy pH 2,5) oraz *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) (przy pH 4,0); układ kontrolny: pH 2,5
Concentrations of metals in solutions after 30 day leaching of sulphide minerals (temp. 30°C) with bacteria *T.ferrooxidans* F26-77 (pH 2,5), and *Siderocapsa* sp. 26-1(1) and *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) (pH 4.0); control system: pH 2.5

Wyługowany metal	Stężenie metalu [g/dm^3]			
	Cu	Cu	Fe	Zn
Minerał siarczkowy	CuS	$CuFeS_2$	FeS_2	ZnS
T.ferrooxidans F26-77	22,6	11,0	9,3	25,0
Siderocapsa sp. 26-1(1)	13,5	8,5	8,3	18,5
Sulfobacillus sp. 26-9(1)	13,2	8,7	7,6	18,7
Układ kontrolny, bez bakterii	12,5	3,0	1,0	5,5

nie wpływały na kinetykę wzrostu bakterii w zakresie stężeń nie przekraczających 10 mM. Wyjątek stanowiły jony ołowiu, hamujące wzrost testowanych drobnoustrojów już przy stężeniu 2 mM. W obecności pozostałych analizowanych jonów metali zahamowanie wzrostu szczepów odpowiednio *Siderocapsa* sp. i *Sulfobacillus* sp. następowało przy stężeniach: 35 mM i 45 mM jonów cynku, miedzi i niklu oraz 25 mM i 35 mM jonów kobaltu i kadmu. Przy stężeniach zbliżonych do stężeń letalnych średni czas generacji wydłużał się do około 41 h dla szczepu *Siderocapsa* sp. oraz 45 h dla szczepu *Sulfobacillus* sp. Znacznemu wydłużeniu ulegała również lag-faza (do 4,5 dnia). Przyhamowanie wzrostu bakterii następowało przy określonych stężeniach jonów metali niezależnie od tego, czy bakterie były pasażowane do środowiska tych jonów bezpośrednio z pożywki, czy też były przeszczepiane kolejno do podłoży zawierających sukcesywnie rosnące stężenia metali. Tak więc badane szczepy nie były zdolne do adaptacji do wyższych stężeń jonów metali w roztworze, jeśli te metale występowały w nim od początku w formie jonowej. Stwierdzono także inhibujący wpływ jonów metali ciężkich (Cd^{2+} i Pb^{2+}) na szybkość procesu utleniania jonów $S_2O_3^{2-}$ (rys. 2). Efektowi temu nie towarzyszyło



Rys. 2. Dynamika utleniania jonów tiosiarczanowych (30°C;pH 4,0): kontrola - układ kontrolny, bez bakterii i jonów metali; ($S_2O_3^{2-}$),($S_2O_3^{2-}$ + Pb^{2+}), ($S_2O_3^{2-}$+ Cd^{2+}) - układy odpowiednio w nieobecności oraz w obecności jonów ołowiu lub kadmu; (———) - *Siderocapsa* sp. 26-1(1); (- - -) - *Sulfobacillus* sp. 26-9(1)

Fig. 2. Dynamics of thiosulphate oxidation (30°C; pH 4,0): kontrola - control system, without bacteria and metal ions; ($S_2O_3^{2-}$), ($S_2O_3^{2-}$ + + Pb^{2+}), ($S_2O_3^{2-}$+ Cd^{2+}) - systems respectively in the absence and in the presence of lead or cadmium; (———) - *Siderocapsa* sp. 26-1(1); (- - -) - *Sulfobacillus* sp. 26-9(1)

jednak zmniejszenie aktywności enzymów siarkowych u testowanych szczepów (tab.6). Sugeruje to, że jony kadmu i ołowiu nie powodowały zatrucia enzymów, lecz stanowiły blokadę uniemożliwiającą wniknięcie substratów siarkowych do wnętrza komórek. Można przypuszczać, że procesy utleniania nieorganicznych związków siarki są źródłem energii dla tych szczepów, podobnie jak u autotroficznych bakterii siarkowych rodzaju *Thiobacillus*, w szczególności u *T.ferrooxidans*. Uzyskane dane (Cwalina et al.1987) wskazują jednak na odmienny typ metabolizmu siarki u badanych

Tabela 6. Aktywność enzymów szlaku siarkowego u bakterii *Siderocapsa* sp. 26-1(1) i *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) podczas utleniania jonów tiosiarczanowych w obecności jonów kadmu i ołowiu

Activity of enzymes of the sulphur pathway in *Siderocapsa* sp. 26-1(1) and *Sulfobacillus* sp. 26-9(1) bacteria during thiosulphate oxidation in the presence of cadmium and lead ions

Środowisko (30°C; pH 4,0)	Szczep	Aktywność [nmol/min·mg białka]		
		oksydaza siarczynowa	oksydaza tiosiarczanowa	rodanaza
$S_2O_3^{2-}$	26-1(1)	382 ± 32	4,2 ± 0,3	145 ± 14
	26-9(1)	325 ± 30	3,5 ± 0,3	129 ± 11
$S_2O_3^{2-}$ + Cd^{2+} (20 mM)	26-1(1)	372 ± 30	4,0 ± 0,4	140 ± 14
	26-9(1)	310 ± 23	3,5 ± 0,3	132 ± 12
$S_2O_3^{2-}$ + Pb^{2+} (5 mM)	26-1(1)	380 ± 35	4,0 ± 0,4	148 ± 15
	26-9(1)	318 ± 31	3,5 ± 0,3	122 ± 12

bakterii. Wyjaśnienia wymaga także znacznie większa oporność na jony metali bakterii uczestniczących w ługowaniu minerałów siarczkowych w porównaniu do bakterii wprowadzonych do roztworów "syntetycznych", czyli pożywek płynnych zawierających te jony.

Mimo znacznego podobieństwa właściwości fizjologicznych różnych bakterii utleniających jony żelazawe oraz siarkę i jej związki nieorganiczne do gatunku *T.ferrooxidans*, trudno przesądzać o ich przydatności w procesach biometalurgicznych.

WNIOSKI

Na podstwaie przedstawionych wyników badań można sformułować następujące wnioski:

1. Ustalono, że zróżnicowanie aktywności komórkowej dzikich szczepów bakterii *T.ferrooxidans* dotyczy w większym stopniu szybkości utleniania przez nie jonów żelazawych Fe^{2+} niż właściwej szybkości wzrostu.

2. Procesy adaptacyjne mogą prowadzić do wzrostu aktywności metabolicznej dzikich szczepów bakterii *T.ferrooxidans*, co wyraża się między innymi skróceniem czasu generacji i wzrostem maksymalnej szybkości utleniania jonów Fe^{2+} oraz aktywności właściwej enzymów siarkowych: oksydazy siarczynowej, oksydazy tiosiarczanowej i rodanazy.

3. Aktywację metabolizmu siarki u bakterii *T.ferrooxidans* można osiągnąć przez ich hodowlę w obecności siarki i jej związków nieorganicznych (zwłaszcza minerałów siarczkowych) jako substratów energetycznych.

4. Stwierdzono, że enzymy szlaku siarkowego u *T.ferrooxidans* F26-77 są enzymami konstytucyjnymi. Nie ulegały one inaktywacji nawet podczas kilkuletniej hodowli bakterii w podłożu z jonami Fe^{2+} jako substratem energetycznym.

5. W przeciwieństwie do gatunku *T.ferrooxidans*, szczepy miksotroficznych bakterii (wykazujących zdolność utleniania nieorganicznych związków siarki i jonów Fe^{2+}), które opisano jako *Siderocapsa* sp. 26-1(1) oraz *Sulfobacillus* sp. 26-9(1), nie mają zdolności adaptacji do wzrastających stężeń jonów metali w roztworze.

6. Podczas procesów ługowania naturalnych minerałów siarczkowych (pirytu, kowelinu, chalkopirytu i sfalerytu) badane szczepy bakterii miksotroficznych tolerowały znaczne wyższe stężenia wyługowanych metali (Fe, Cu oraz Zn) niż te, które określono jako letalne na podstawie badań w płynach "syntetycznych" - pożywkach zawierających jony tych metali.

7. Procesy utleniania jonów Fe^{2+} oraz siarki i jej związków nieorganicznych mogą być źródłem energii dla badanych bakterii miksotroficznych.

8. Jony metali ciężkich (Cd^{2+} i Pb^{2+}) mogą blokować wnikanie substratów siarkowych do wnętrza komórek badanych bakterii miksotroficznych.

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną

LITERATURA

Brierley C.L., (1978), *Bacterial leaching*, CRC Crit. Rev. Microbiol. 6, s. 207-262.

Buchanan R., Gibbons E., (eds) (1974), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8-th edn, Baltimore, Williams and Wilkins Co.

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., Farbiszewska T., (1989), *Mechanizmy bakteryjnego ługowania metali z pirytów węglowych*, Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii 21, s. 201-210.

Cwalina B., Zawada Z., (1988), *Bioekstrakcja metali z pirytów węglowych w obecności mikroflory autochtonicznej materiału ługowanego*, Prz.Gór. 44, s. 10-15.

Cwalina B., Farbiszewska T., Dzierżewicz Z., (1990), *Bioekstrakcja metali z pirytów węglowych w ubogich roztworach ługujących*, Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii 22, s. 153-160.

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., Węglarz L., Dzierżewicz Z., Wilczok T., (1990a), *Activity of sulphite oxidase, thiosulphate oxidase and rhodanese in Thiobacillus ferrooxidans during sphalerite leaching*, Acta Microbiologica Polonica 39, s. 99-103.
Cwalina B., Wilczok T., Węglarz L., Dzierżewicz Z., (1990b), *Activity of sulphite oxidase, thiosulphate oxidase and rhodanese in Thiobacillus ferrooxidans during covellite and chalcopyrite leaching*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, s. 279-281.
Cwalina B., Wilczok T., Dzierżewicz Z., Zawada Z., Porębska 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.
Dispirito A.A., Tuovinen O.H., (1982), *Kinetics of uranous ion and ferrous ion oxidation by Thiobacillus ferrooxidans*, Arch. Microbiol. 133, s. 33-37.
Eckschlager K., 1974, *Błędy w analizie chemicznej*, Warszawa, PWN.
Groudev S.N., 1985, *Differences between strains of Thiobacillus ferrooxidans with respect to their ability to oxidize sulphide minerals*, [w:] Karavaiko G.I., Groudev S.N. (eds) *Biogeotechnology of metals*, Moscow UNEP.
Huber G., Huber H., Stetter K.O. 1986, *Isolation and characterization of new metal - mobilizing bacteria*, Biotechnology and Bioengineering Symp. o. 16, s. 239-251.
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.
Kołątaj A., (1988), *Magazynowanie adaptacji na cięższe czasy*, Kieleckie Studia Biologiczne 5, s. 221-247.
Lewis A.J., Miller J.D.A., (1977), *Stannous and cuprous ion oxidation by Thiobacillus ferrooxidans*, Can. J. Microbiol. 23, s. 319-324.
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.
Lundgren D.G., Vestal J.R., Tabita F.R., (1972), *The microbiology of mine drainage pollution*, [w:] Mitchel R. (ed) *Water Pollution Microbiology*, New York, Wiley Interscience.
Minczewski J., Marczenko Z., (1976), *Chemia analityczna. T. II. Analiza ilościowa*, Warszawa, PWN.
Orłowska B., Gołąb Z., (1990), *Thiobacillus ferrooxidans - jako czynnik biologicznego ługowania metali*, Post. Mikrobiol. 29, s. 185-207.
Petrycka M., Mrozowska J., (1974), *Ćwiczenia z mikrobiologii sanitarnej*, Politechnika Śl., Gliwice.
Pivovarova T.A., Golovacheva R.S., (1985), *Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry*, [w:] Karavaiko.
G.I, Groudev S.N. (eds) *Biogeotechnology of Metals*, Moscow, UNEP.
Silver M., (1978), *Metabolic mechanisms of iron-oxidizing Thiobacilli*, [w:] Murr L., Torma A., Brierlev J. (eds) *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*, New York, Acad. Press.
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), American Public Health Association, Inc., New York.
Stryer L., (1986), *Biochemia*, Warszawa, PWN.
Sugio T., Hirayama K., Inagaki K., Tanaka H., Tano T., (1992) *Molybdenum oxidation by Thiobacillus ferrooxidans*, Appl. Environ. Microbiol.58, s. 1768-1771.
Sugio T., Tsujita Y., Inagaki K., Tano T., (1990), *Reduction of cupric ions with elemental sulfur by Thiobacillus ferrooxidans*, Appl. Environ. Microbiol. 56, s. 693-696.
Suzuki I., Takeuchi T.L., Yuthasastrakosol T.D., Oh J.K., (1990), *Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric iron reduction activities of Thiobacillus ferrooxidans are affected by growth on ferrous iron, sulfur or a sulfide ore*, Appl. Environ. Microbiol. 56, s. 1620-1626.
Svorcova L., (1975), *Iron bacteria of the genus Siderocapsa in mineral waters*, Z. Allg. Mikrobiol. 16, s. 553-557.
Torma A., (1980), *Importance of Thiobacillus ferrooxidans in hydrometallurgy*, [w:] Proc. Int. Conf. Use of "Microorganisms in Hydrometallurgy", Hung. Acad. Sci., Local Comm., Pecs (Hungary) s. 27-34
Tuovinen O.H., Niemela S.I., Gyllenberg H.G., (1971), *Tolerance of Thiobacillus ferrooxidans to some metals*, Antonie van Leeuwenhoek. 37, s. 489-496.
Waksman S.A., Joffe J.S., (1922), *Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. Thiobacillus thiooxidans, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil*, J. Bacteriol. 7, s. 239-256
Williams W.J., (1985), *Oznaczanie anionów*, Warszawa, PWN.

Cwalina B., Dzierżewicz Z., Farbiszewska T., Bułaś L., (1993), Strategies of survival of some bacteria and their usefulness in biohydrometallurgy, *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 27, 205-218 (Polish text)

Strategies of survival of some bacteria useful in biohydrometallurgy in unfavourable conditions of environment have been described in the context of their practical utilization. Especially the adaptability of bacteria to various energetic substrates, acid environment and high concentration of metal ions was analysed.