

Bogumiła ORŁOWSKA

Instytut Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiałtków Rzadkich,
Politechnika Wrocławska

UDZIAŁ DROBNOUSTROJÓW HETEROTROFICZNYCH W ŁUGOWANIU METALI

Niezależnie od badań nad biologicznym ługowaniem metali z minerałów lub odpadów przemysłowych za pomocą bakterii autotroficznych, prowadzi się badania nad możliwością zastosowania do tego celu drobnoustrojów heterotroficznych. Stanowią one bowiem zdecydowaną większość mikroflory gleby i to zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym, a ich rola w transformacji związków metali w przyrodzie jest ogromna.

Procesy mikrobiologiczne zachodzące w biosferze mogą mieć charakter cykliczny i wówczas mówi się o krążeniu pierwiałtków w przyrodzie. Zapewnia to na ogół jednakowy ich poziom w środowisku. Istnieją też przemiany niecykliczne, wywołujące trwałe zmiany w rozmieszczeniu określonego pierwiałtka. Przykładem takiego zjawiska jest tworzenie się nowych złóż lub proces przeciwny, solubilizacja minerałów i przemieszczanie się pierwiałtków często w odległe miejsce [2].

Dla hydrometalurgii - a z tego punktu widzenia pragnę przedstawić zagadnienie transformacji metali - ważne jest ługowanie, czyli przechodzenie do roztworu jonów lub związków metali.

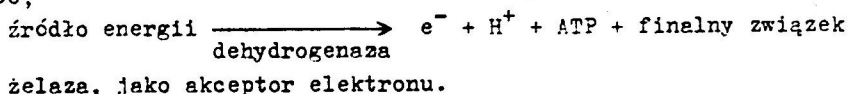
Poglądy na mechanizm ługowania

Na podstawie dostępnych danych [2, 4, 19] o solubilizacji minerałów, uważa się, że procesy ługowania mogą zachodzić w dwójaki sposób; bezpośredni i pośredni.

Ługowanie bezpośrednie

Ługowanie bezpośrednie przebiega na drodze enzymatycznej i związa-

ne jest z wytwarzaniem przez drobnoustroje enzymów redukujących związki metali i powodujących ich przechodzenie do roztworu. Takie procesy redukcji tlenku żelazowego i manganowego zachodzą w przyrodzie w warunkach beztlenowych, np. w glebie, w osadach dennych licznych ekosystemów wodnych. Zdolności redukujące w stosunku do Fe III i Mn IV wykryto u licznych bakterii glebowych, np. u rodzaju *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter aerogenes* a także u niektórych grzybów mikroskopowych [14]. Dowody na enzymatyczną redukcję tlenku żelazowego znaleźć można w pracach Ottowa oraz Ottowa i Kłopotka [13, 14, 15]. Autorzy ci sugerują, że jony żelazowe mogą służyć jako akceptor elektronu w warunkach niedostatku tlenu. Mechanizm enzymatycznej redukcji żelaza proponują opisać następująco;



Wykazano, że enzymem odpowiedzialnym za te procesy jest reduktaza azotanowa, gdyż tylko drobnoustroje wytwarzające ten enzym zdolne są do redukcji żelaza III. Udowodniono ponadto, że redukcję żelaza (III) można zahamować przez dodanie do podłoża konkurencyjnie działających azotanów lub przez dodanie inhibitora enzymatycznego, np. azydku sodu.

Ługowanie pośrednie

Ługowanie pośrednie zachodzi pod wpływem produktów metabolizmu drobnoustrojów. Można tu wyróżnić 4 podstawowe typy reakcji, prowadzące do solubilizacji a między innymi minerałów. Są to alkalizacja środowiska, jego zakwaszenia, redukcja pośrednia oraz powstawanie rozpuszczalnych kompleksów. Należy zaznaczyć, że reakcje te często zazębiają się i uzupełniają wzajemnie a końcowy efekt ługowania bywa kombinacją kilku tych podstawowych reakcji.

W środowisku zawierającym substancję organiczną, jak np. mocznik czy białka bakterie produkują amoniak lub węglany, powodujące alkalizację otoczenia. Stwarza to warunki do ługowania alkalicznego, znanego i stosowanego również w hydrometalurgii.

Inne mikroorganizmy natomiast tworzą metabolity w postaci kwasów organicznych (cytrynowy, szczawiowy, glukonowy i inne) i mineralnych (H_2CO_3 czy HNO_3). Oddziaływanie tych kwasów na minerały nie musi być związane ze zjawiskiem kompleksowania, ale jest rozpuszczaniem połączeń mineralnych w środowisku kwaśnym prowadzącym do form metalu mniej lub bardziej zhydrolizowanych.

Produktem metabolizmu drobnoustrojów są też związki bezpośrednio

redukujące (np. H_2S , H_2O_2 w środowisku kwaśnym) zdolne do przeprowadzania minerałów w postać rozpuszczalną.

Ważnym czynnikiem w transformacji biologicznej połączeń mineralnych jest synteza substancji o działaniu kompleksującym, które wydzielane są do otoczenia. Wśród metabolitów zdolnych do kompleksowania jonów metali wymienienia się; 1. węglowodory, 2. węglowodany, 3. alkohole, kwasy organiczne, tłuszcze, woski, 4. aminokwasy, białka, 5. porfiryny, witaminy, pigmenty. Związki te występują wszędzie tam, gdzie są drobnoustroje. Oczywiście ich ilość i jakość zależą od aktywności i rodzaju mikroflory w warunkach rozpatrywanego środowiska. Substancje organiczne wiążą metale przez grupy funkcyjne jak $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$ i inne. W wielu związkach organicznych metal może być przyłączony bezpośrednio do atomu węgla lub innego atomu - tworząc połączenia metaloorganiczne. Metal bywa też chelatowany tzn. kompleksowany w sposób kleszczowy przez ligand dysponujący kilkoma centrami elektronodonorowymi, zdolnymi do obsadzenia dwóch lub więcej miejsc koordynacji wokół centralnego atomu metalu. Kompleksy takie są, jak wiadomo, bardzo trwałe. Efekt chelatacji może być bardzo silny w przypadku niektórych kwasów organicznych.

Przykłady bioekstrakcji metali

Miedź

Jednym z powodów zainteresowania się możliwością ługowania miedzi przez drobnoustroje heterotroficzne jest fakt, że nie wszystkie rudy nadają się do ługowania za pomocą *Thiobacillus ferrooxidans*, bakterii wzbijnie kwasolubnych.

Pierwsze obserwacje o wpływie drobnoustrojów na roztwarzanie miedzi poczynił Kendrick [7]. Wykazał on w próbkach gleby zawierającej liczne szczepy grzybów mikroskopowych większą ilość miedzi, niż w glebie ubogiej w drobnoustroje. Najobficiej był tam reprezentowany gatunek *Penicillium ochrochloron*. Roztworzenie miedzi autor wiąże z kompleksotwórczym działaniem metabolitów grzybowych i substancji humusowych.

Poszukując sposobów bioekstrakcji neutralnych i alkalicznych rud miedzi, Wenberg i współpr. [24] podjęli próby ich ługowania przez drobnoustroje heterotroficzne. Po przeprowadzeniu selekcji mikroorganizmów, wyizolowanych ze środowiska rud miedziowych, do badań wytypowano szczep *Penicillium* sp. Na najbardziej odpowiednim podłożu zawierającym azotan sodu i sacharozę, w ciągu 3 dni wyekstrahowano $3,3 \text{ g/dm}^3$ miedzi; lepsze wyniki ($7,5 \text{ g/dm}^3$) uzyskano ługując rudy i koncentrat miedziowy roztworami pochodzonymi, bowiem wysokie stężenie miedzi nie hamowało wzro-

stu grzyba. Wydajność żugowania, co wydaje się oczywiste, zależało również od wielkości ziarna i ilości miedzi w surowcu. Autorzy uważają, że produkty metabolizmu drobnoustrojów są odpowiedzialne za przechodzenie miedzi do roztworu i to zarówno z siarczków, jak i z minerałów zawierających komponenty zasadowe.

Szczepy *Aspergillus niger* wyizolowane z rudy a wytwarzające kwas cytrynowy oraz małe ilości kwasu szczawiowego i glukonowego, a także bakterie rodzaju *Lactobacillus* sp., zastosował Kiel [8] do żugowania miedzi z ubogich rud węglanowych i krzemianowych. Na podłożu z sacharozą szczepy *A. niger* w ciągu 14 dni przeprowadzały do roztworu około 1,0 g/dm³ miedzi, co stanowiło 80 %-tą wydajność. Podobne efekty żugowania (83 %) tych samych rud, uzyskał autor prowadząc żugowanie w warunkach beztlenowych przez szczep *Lactobacillus* sp., na podłożu sporządzonym z serwatki. W tym przypadku czynnikiem żugującym był kwas mlekowy.

Próby żugowania rud węglanowych, z zastosowaniem roztworów pochodzących z *A. niger*, kwasu siarkowego i hodowli *T. ferrooxidans*, przeprowadzono w Bułgarii [6]. Szczep *A. niger* wytwarzał kwas cytrynowy, szczawiowy i glukonowy. Kombinacja tych trzech czynników umożliwiła zwiększenie wydajności o 10 %, przy równoczesnym zredukowaniu zużycia kwasu siarkowego o 40 %, co, zdaniem autora, można rozpatrywać w aspekcie przemysłowego zastosowania.

Le Roux i współpr. [11] żugowali koncentraty miedziowo-niklowe za pomocą bakterii heterotroficznych, porównując uzyskane wyniki z żugowaniem przez *T. ferrooxidans* i z żugowaniem kwasem siarkowym. Użyte bakterie były mieszaniną szczepów wyizolowanych z gleby, rosnących na podłożu z wyciągiem słodowym i na bulionie bakteriologicznym. Charakterystyczne, że żugowaniu biologicznemu łatwiej podlegał nikiel niż miedź. Po 5-ciokrotnym pasażu, że więc po adaptacji szczepów do nowego środowiska o wysokim stężeniu niklu i miedzi, wyekstrahowane ilości tych pierwiastków wynosiły odpowiednio 81-98 % (ponad 2 g/dm³) i 25-45 %. Żugowanie kwaśne za pomocą H₂SO₄ i żugowanie hodowlą *T. ferrooxidans* wykazało podobnie wysoką wydajność w odniesieniu do niklu, gdy tymczasem w przypadku miedzi wyniki były niższe (16-25 %).

Mangan

Drobnoustroje heterotroficzne próbowano też wykorzystać do bioekstrakcji manganu. Perkins i Novielli [18] żugowali mangan z rud niskoprocentowych i odpadów, stosując do tego celu wyselekcjonowany szczep *Bacillus* sp. Najlepsze wyniki w odzysku manganu otrzymano na podłożach bogatych w węglowodany (sacharoza, melasa), nieco gorsze na podłożu zawierającym białko z odpadów przemysłu mięsnego. Po 60 dniach wyługowano

ponad 90 % manganu i to zarówno w skali laboratoryjnej, jak i wielkolaboratoryjnej, w reaktorach o pojemności 9 m³.

Możliwość ługowania manganu przez mikroflorę heterotroficzną, wykazali też Babenko i współpr. (3). W swych pracach stosowali ubogie rudy manganu oraz szlamy i odpady. Najbardziej efektywny okazał się szczep *Achromobacter delicatus* 182. Późniejsze badania (23) dowiodły, że roztwieranie manganu polega na redukcji Mn IV do Mn II, którego sole są łatwo rozpuszczalne. Redukcję w tym procesie przeprowadza nadtlenek wodoru, powstający w łańcuchu oddechowym, który w środowisku kwaśnym jest silnym reduktorem. Równocześnie katalaza, enzym rozkładający nadtlenek wodoru, traci swą aktywność w środowisku kwaśnym.

O udanych próbach ługowania ubogich rud manganu donieśli badacze hinduscy [1]. Najaktywniej, z 90 % wydajnością przeprowadzały mangan do roztworu szczepy; *Arthrobacter* (40 dni), *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. (90 dni). Do hodowli stosowano jedynie ekstrakt z gleby (soil extract - manganese medium). Uwzględniając niski koszt pożywki oraz ciepły - sezonowo - klimat Indii autorzy udowodnili, że sposób ten może być z powodzeniem stosowany w skali przemysłowej.

Złoto

Parés [16] wykazała, że niektóre popularne bakterie glebowe, rodzaju *Bacillus*, hodowane na różnych podłożach mogą ługować eluwalne złoto z piasków i żwirów, choć otrzymane ilości były niewielkie (1-1,5 mg/dm³). Z późniejszych badań tej autorki [17] dowiadujemy się, że mechanizm solubilizacji złota polegał na tworzeniu się jego kompleksu z glicyną, obecną w płynach hodowlanych.

Do problemu solubilizacji złota powrócili też badacze radzieccy (9). Ługując kruszywo kwarcowe o zawartości 3,2 g złota na tonę i piasek o zawartości 10,5 g złota w tonie, za pomocą bakterii *Bacillus mesentericus niger* 120, odzyskali 50-80 % tego pierwiastka w ciągu 5 - 10 dni. Należy odnotować też pomyślne ługowanie złota z koncentratu poflotacyjnego (3 g/tonę), za pomocą alkalicznych hydrolizatów drożdży spożywczych [12]. W zależności od rozdrobnienia surowca, przy optymalnym stosunku faz stałej do ciekłej jak 1:8, uzyskano 40-80 % wydajności. Wydajność tę można było zwiększyć przez dodanie do roztworu ługującego cyjanku sodu.

Potwierdzając kompleksujący mechanizm ługowania złota wykazano [10], że intensywność tego procesu zależy od składu i koncentracji aminokwasów i białka w płynnych hodowlach. Największą aktywność w kompleksowaniu złota wykazały następujące aminokwasy; histydyna, asparagina, seryna, kwas asparaginowy alanina i glicyna. Dowiedziono też, że w kompleksowa-

niu złota z aminokwasami uczestniczą grupy aminowe. Z białkiem natomiast złoto tworzy kompleks na zasadzie bardziej złożonego mechanizmu. Połączenie złota z tymi związkami może przebiegać również przez azot grup aminowych (Au-N).

Tytan, uran, potas.

Silverman i Munoz [21] wskazali na możliwość ługowania tytanu z różnych skał przez grzyb *Penicillium simplicissimum*. Szczególnie podatny na działanie tego drobnoustroju był granit, z którego udało się uzyskać ponad 80 % zawartego w nim tytanu. W roztworach ługujących stwierdzono ponadto obecność glinu, żelaza i manganu. Autorzy sugerują, że na bogatym w substancje azotowe podłożu, wymieniony drobnoustroj produkuje bliżej nieokreślone kwasy organiczne - odpowiedzialne za efekty ekstrakcji.

Mikrobiologiczne ługowanie uranu przy zastosowaniu bakterii autotroficznych *T. ferrooxidans* stosuje się z powodzeniem od lat, natomiast o próbach wykorzystania do tego celu bakterii heterotroficznych donoszą Berthelin i współpr. [5]. W ługowaniu brały udział takie drobnoustroje, jak *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Gaffkya* sp., *Peptococcus* sp. Największe stężenie uranu w płynie hodowlanym wynosiło 110 mg/dm³. W hodowlach mieszanej flory bakteryjnej obserwowano lepszy efekt ługowania niż w czystych hodowlach poszczególnych szczepów. Warunki tlenowe bardziej sprzyjały roztwarzaniu uranu niż warunki beztlenowe. Czynnikiem ługującym wg autorów są metabolity o niskim ciężarze atomowym, jak np. kwas szczawiowy, a także związki o ciężarze cząsteczkowym ponad 3000, których nie zidentyfikowano.

Doświadczenia Rossi'ego [20] miały na celu ługowanie potasu z leucytu przez bakterie *Thiobacillus* i przez heterotrofy; *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Scopulariopsis brevicaule*. Efekty ługowania były niskie, w płynnych hodowlach wykryto zaledwie około 100 mg/dm³ potasu, po 50 dniach ługowania.

Podsumowanie

Przedstawiony przegląd piśmiennictwa świadczy o tym, jak wiele problemów, dotyczących zastosowania heterotrofów w procesie bioekstrakcji wymaga rozwiązania. Dotychczasowe doniesienia wskazują jedynie na możliwość ich wykorzystania w hydrometalurgii, bez konkretnych propozycji utylitarnych. Jedynie badacze hinduscy są przygotowani na przemysłowe ługowanie ubogich rud manganowych. Wiąże się to z wykorzystaniem

taniego podłoża hodowlanego (wyciąg z gleby) dla mało wybrednych bakterii rodzaju *Arthrobacter*. Sprzyjający jest też klimat Indii, gdzie sezonowo temperatura wzrasta nawet do 40°. Niemniej problem jest ważny i to zarówno z punktu widzenia odzysku cennych metali, jak i ze względu na ochronę środowiska naturalnego. Metale ciężkie, znajdujące się w odpadach przemysłowych po przeróbce pirometalurgicznej, stanowią nierzadko zagrożenie nie tylko dla najbliższego otoczenia, ale, jak wiadomo, dostają się do gleby, do wody i są przenoszone na większe odległości.

Stosowanie drobnoustrojów heterotroficznych w ługowaniu na skalę przemysłową wymaga niewątpliwie innych rozwiązań technologicznych, niż w przypadku autotrofów rodzaju *Thiobacillus*.

W procesie ługowania biologicznego za pomocą heterotrofów najistotniejszą sprawą jest dobór odpowiednich szczepów bakteryjnych. Proces wysokiej aktywności w produkcji pożądaných metabolitów, szczepy takie powinny charakteryzować się odpornością na wysokie stężenie metali.

Wydaje się, że można to uzyskać nie tylko na drodze mutagenesy, selekcji czy adaptacji, ale także za pomocą metod inżynierii genetycznej.

Dla wzrostu i syntezy metabolitów drobnoustrojom heterotroficznym niezbędna jest substancja organiczna. Stosownie do tego celu substratów handlowych z góry musi być skazane na niepowodzenie, ze względów ekonomicznych. Druga więc nie mniej ważną sprawą jest opracowanie podłoży hodowlanych tak, by koszt ich był jak najniższy. W tym celu do sporządzenia podłoży należało by stosować produkty uboczne innych gałęzi przemysłu, jak np. spożywczego, rolnego, czy celulozowego.

W piśmiennictwie dotyczącym tematu ługowania przez heterotrofy zwraca uwagę fakt stosowania do ługowania płynów pohodowlanych. Sposób ten wprawdzie wymagałby dodatkowych urządzeń - reaktorów fermentacyjnych - ale miałyby też pewne zalety a mianowicie;

- łatwiejsze sterowanie produkcją żądanych metabolitów (regulacja temperatury, pH) a także możliwość wyeliminowania toksycznego wpływu metali na rozwój drobnoustrojów,
- prowadzenie procesu ługowania w optymalnych warunkach np. przez podwyższenie temperatury, bez obawy o zniszczenie hodowli drobnoustrojów,
- wielokrotne użycie roztworów ługujących, aż do stanu nasycenia przy niskiej zawartości metalu w surowcu,
- w przypadku pracy z monokulturą - specjalnie do tego celu wyselekcjonowaną - przygotowanie roztworów ługujących reaktorów pozwala uniknąć kontaminacji, która mogłaby zakłócić prawidłową syntezę metabolitów.

Problem ten nie istnieje w odniesieniu do bakterii autotroficznych, ze względu na wybitnie selektywne środowisko, w którym one bytują.

- niewykluczone, że przy odpowiednim doborze szczepów i warunków wzrostu dałoby się przeprowadzić, bardzo niekiedy przydatne, ługowanie

selektywne.

W podsumowaniu należy jeszcze raz podkreślić, że ługowanie metali z zastosowaniem mikroorganizmów heterotroficznych daje niekiedy bardzo dobre rezultaty i to zarówno w skali laboratoryjnej, jak i półtechnicznej. W innych jednakże przypadkach autorzy wskazują na szereg niedogodności i wysoki na ogół koszt omawianych procesów. Zatem o szerszym zastosowaniu proponowanych technologii zadecydują uwarunkowania ekonomiczne.

LITERATURA

- [1] Agate A.D., Deshpande H.A., Confer. Bacterial Leaching, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979, 243.
- [2] Alexander M., Ekologie Mikroorganizmów, PWN, Warszawa 1975.
- [3] Babenko Y.S., Grigorev P.P., Tyrygina G.I., Arkipov A.S., Prihodko A.H., Otkryt. Izobrat. Prom. Towar. Znaki, 53, (1976) 87.
- [4] Berthelin J., Sci. Sol-Bulletin, A.F.E.S., 1, (1977) 13.
- [5] Berthelin J., Belguy G., Magne R., Confer. Bacterial Leaching, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1977, 251.
- [6] Groudev S.N., Dokl. Bołg. Akad. Nauk. 32, (1979) 943.
- [7] Kendrick W.B., Can. J. Microbiol. 8, (1962) 639.
- [8] Kiel H., Confer. Bacterial Leaching, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1977, 261.
- [9] Korobuškina E.D., Černiak A.C., Mineev G.G., Mikrobiologija XLIII (1974), 46.
- [10] Korobuškina E.D., Mineev G.G., Praded G.P., Mikrobiologija, 3, (1976), 535.
- [11] Le Roux N.W., Warkesley D.S., Perry W.F., Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiol. Phenomena, Acad. Press, New York, 1978, 167.
- [12] Mineev G.G., Syrtlanova T.S., Skobeev J.K., Cvet. Metal. 6, (1977), 23.
- [13] Ottow J.C. G., Z. Allg. Mikrob., 8, (1968), 441.
- [14] Ottow J.C.G., Naturwissenschaften, 56, (1969), 371.
- [15] Ottow J.C.G., von Klopotek A., Appl. Microb., 18, (1969), 41. ✓
- [16] Parés Y., Annal. Inst. Pasteur, 107, (1964), 573.
- [17] Parés Y., Rev. Industr. Minerale, 50, (1969), 402.
- [18] Perkins E.C., Novielli F., R.J. Bull. Rept of Inv., 6102, (1962), 1.
- [19] Rose A.W., Hawkes H.E., Webb J.S., Geochem. in Microbiol. Exploration, Acad. Press, London, 1979.
- [20] Rossi G., Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and

- Related Microbiological Phenomena, Acad. Press, New York, 1978 , 297.
- [21] Silverman M.P. Ehrlich H.L., Adv. Appl. Microbiol. 6, (1964), 153.
 - [22] Silverman M.P., Munoz E.F., Appl. Microbiol., 22, (1971), 923.
 - [23] Tyrygina G.J., Proskurina R.D., Prikl. Biochem. i Mikrob. XIV, (1978), 643.
 - [24] Wenberg W., Erbish F.H., Volin M.E., Trans. Soc. Mining Eng. AIME 250, (1971), 207.

PARTICIPATION OF HETEROTROPHIC MICROORGANISMS IN LEACHING OF METALS

Recent advances relating to biological leaching by heterotrophic microorganisms are presented. The mechanisms of leaching as well as the possibility and advantages of using those organisms in practice are discussed.