

УДК 622.032

¹А.Т.Канаев*, ²З.К.Канаева, ¹Н.М.Мухабетов,
¹С.С.Ералиев, ²А. Сағымбаева

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный технический университет имени К.И. Сатпаева, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: ashim1959@mail.ru

Изучение сообществ микроорганизмов урановых месторождений

В работе рассматриваются вопросы изучения микробного ценоза урановых месторождений «Канжуган» и «Уванас», которые находятся Сузакском районе Южно-Казахстанской области. В результате исследований были выделены представители хемолитотрофных бактерий *A.ferrooxidans* и *A.thiooxidans*. Присутствие этих бактерий в сернокислотном выщелачивающем растворе обозначает, что процесс окисления ураносодержащих руд происходит с участием этих культур.

Ключевые слова: микроорганизм, микробоценоз, хемолитоавтотрофные бактерий

Ә.Т. Қанаев, З.Қ. Қанаева, Н.М. Мұхабетов,
С.С. Ералиев, А. Сағымбаева

Уран кен орындары микроорганизм бірлестіктерін зерттеу

Бұл жұмыста «Канжуган» және «Уванас» уран кен орындарында кездесетін микроорганизмдердің бірлестіктері зерттелген. Бұл кен орындар Оңтүстік Қазақстан обласының Созақ ауданында орналасқан. Зерттеу барысында хемолитотрофты бактериялар өкілі *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* түрлері бөлініп алынды. Бұл бактериялар өкілінің күкірт қышқылы шаймалаушы ерітіндіде кездесуі уранды руданың тотығуында микроорганизмдер қатысатындығын дәлелдейді.

Түйін сөздер: микроорганизмдер, микробоценоз, хемолитотрофты бактериялар.

A. T. Kanaev, Z. K. Kanaeva, N. M. Muhabetov,
S. S. Yeraliyev, A. Sagymbaeva

Study of microbial communities of uranium deposits

The paper considers problems in studies of microbial cenosis uranium deposits of “Kanžugan” and “Uvanas” which is the suzak district of the South Kazakhstan region. The results of the research were made the representatives of hemolitolitofnyh bacteria *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*. The presence of these bacteria in the acid leaching solution indicates that the oxidation process of uranium-bearing ore is between these cultures.

Key words: microorganism, microbocenosis, hemolitaotrophic bacteria

Сокращение мировых запасов кондиционных урановых руд и увеличение объемов руд со сложными структурами требуют изыскания альтернативных технологических решений по их использованию. В настоящее время все шире внедряются прогрессивные технологии получения металлов руд.

В настоящее время глубоко изучено воздействие тионовых бактерий на сульфидные руды и установлено, что эти бактерии резко ускоряют

процессы выщелачивания сульфидных минералов благодаря способностям интенсификации окислительных процессов [1]. Вместе с тем, микробоценозы урановых месторождений Казахстана в современных условиях изучен недостаточно.

Цель исследования – выделение, частота встречаемости и изучение деятельности хемолитотрофных бактерий уранового месторождения Казахстана.

Материал и методы исследования

Изучение качественного и количественного состава микрофлоры месторождения проводили путем посева соответствующих проб руды или растворов на питательные среды. Пробы воды и руды отбирали стерильно, в соответствии с имеющимися руководствами [2]; pH и температуру измеряли во время отбора проб. Микробиологические посева и анализы отдельных компонентов осуществляли в лабораторных условиях. Количественный учет жизнеспособных клеток проводили методом предельных десятикратных разведений.

Для выделения, учета и изучения микроорганизмов и железоокислительной способности Fe^{2+} и Fe^{3+} в среде определяли по методике [3].

В работе для определения анаэробного сульфатредуцирующего микроорганизма использовали метод Постгейта и Кембелла. Для денитрифицирующих микробов использовали среду Гильтея [4].

pH и окислительно-восстановительный потенциал среды измеряли на pH-метре ЭВ-74 и температуру измеряли во время отбора проб.

Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения микробоценозов в качестве объекта исследования выбрали урановые месторождения «Канжуган», «Уванас» которые относятся к ТОО Таукентскому горно-химическому предприятию, расположенного на территории Сузакского района Южно-Казахстанской области в пос. Таукент в 230 км к северу от областного центра г. Шымкента. Добыча урана осуществляется на этих месторождениях методом подземного скважинного выщелачивания (ПСВ).

На руднике «Канжуган» благоприятные природные условия для добычи урана. Ураносодержащая руда находится на глубине 400–500 метров. Сверху слой глины и суглинков — породы очень мягкой для бурения и в то же время являющейся идеальным природным герметиком.

Нами было изучено микробоценозов месторождения «Канжуган». Для изучения микробоценозов было проведено микробиологические обследования производственных растворов ПР (производственный раствор), ВР (выщелачивающий раствор), ЦНС (центральная насосная станция) и отстойника №6 месторождения Канжуган для обнаружения и выделения хемолитоавтотрофных бактерий четырех физиологических

групп, которые по теоретическим предположениям могли способствовать подземному бактериальному выщелачиванию урана. Эти бактерий *A.ferrooxidans*, *A.thiooxidans*, сульфатредуцирующие и денитрифицирующие.

При подходе к изучению микрофлоры урановых месторождений Южного Казахстана мы руководствовались двумя положениями:

- 1) изучить условия развития клеток бактерий в подземных продуктивных растворах;
- 2) выявить и учесть бактерий, которые «отобраны средой».

Поэтому, степень активности микробов в экосистеме определяли учетом их численности и химическими анализами проб. Также были выполнены опыты с культурами *A.ferrooxidans* и *A.thiooxidans*, которая играла существенную роль в окислении урана.

Результаты физико-химические обследования месторождения «Канжуган» приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что температура растворов месторождения «Канжуган» приблизительно одинакова ($18^{\circ}C$), pH растворов имеют кислую реакцию среды (pH 2,0–2,2). Одним из важных факторов является окислительно-восстановительный потенциал (ОВП). Величина ОВП в условиях раствора уранового рудника составляла $+405 + 518$ мВ. Эти границы благоприятны для развития *A.ferrooxidans*.

Минимальное значение содержания общего железа в растворе центральной насосной станции составляет -550 мг/л. Максимальное значение достигает до 920 мг/л в отстойнике № 6. В основном концентрация железа представлена 70–80% в закисной форме. Только в растворах отстойника № 6 почти все железо находится в окисной форме (Fe^{3+}). Уран присутствует во всех пробах, но в ПР значение урана больше, так как является продуктивным раствором. В результате микробиологического обследования технологических растворов месторождения Канжуган методом предельных десятикратных разведений нами было выявлены *A.ferrooxidans* и *A.thiooxidans* в небольшом количестве (табл. 2).

Как видно из табл. 2, тионовые бактерий встречаются во всех вариантах исследованных нами растворах. Их количество варьирует в пределах от 10^1 до 10^3 кл/мл. Минимальное количество *A.ferrooxidans* во всех отобранных пробах раствора составляет 10^2 кл/мл, кроме проб

отобранных из ВР, что достигает до 10^3 кл/мл. В растворах ПР и ЦНС количество *A. thiooxidans* составляет всего 10^1 кл/мл, в растворе из отстойника № 6 их количество достигает до 10^2 кл/мл. Максимальное количество *A. thiooxidans* (10^3 кл/мл) встречается в растворе из ВР.

Тогда как, представители сульфатредуцирующих и денитрифицирующих бактерий отсутствовали во всех вариантах обследованных нами пробах производственных растворов ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 месторождения Канжуган. Представители сульфатредуцирующих и денитрифицирующих бактерий не способны расти в кислой среде. Поэтому в обследованных точках они закономерно не были обнаружены.

Таким образом, нужно отметить, что производственных растворах ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 месторождения Канжуган из представителей хемолитоавтотрофных бактерий *A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans* встречается в умеренном (10^1 кл/мл) и достаточном (10^3 кл/мл) количестве, что объясняется благоприятными условиями для поддержания жизнедеятельности этих бактерий – оптимальное рН, ОВП и температура. Представители сульфатредуцирующих и денитрифицирующих бактерий отсутствовали во всех вариантах обследованных нами пробах.

В дальнейшем культуру *A. ferrooxidans*, выделенную из различных точек месторождения «Канжуган» проверили на активность окисления Fe^{2+} . Опыт проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. На 200 мл среду 9К Сильвермана и Люндгрена добавляли в качестве инокулята производственных растворов ПР, ВР, ЦНС и отстойника № 6 в количестве 40 мл. Аэрацию проводили на качалке при 180 об./мин, при температуре 30 °С. Общая длительность опыта составлял 22 суток (рис. 1). Поскольку аборигенная культура *A. ferrooxidans* менее активная, динамику окисления железа определяли один раз в два дня.

Как видно из рис. 1, культурой *A. ferrooxidans* выделенный из выщелачивающего раствора и раствора центральной насосной станции было осуществлено максимальное окисление закисного железа (8,5 г/л) в течение 22 суток. *A. ferrooxidans*, выделенный из продуктивного раствора за аналогичное промежуток времени окисляет всего 4,0 г/л Fe^{2+} . Промежуточное положение по способности окислять закисного же-

леза (6,5 г/л) занимает культура *A. ferrooxidans*, выделенное из раствора отстойника №6.

Таким образом, *A. ferrooxidans*, выделенные из раствора центральной насосной станции и выщелачивающего раствора в лабораторных условиях проявляют наибольшую активность.

Способность *A. thiooxidans* окислять сульфиды нашла практическое применение для бактериального выщелачивания бедных руд. В настоящее время этот процесс используется в основном для обогащения урановых руд с настолько низким содержанием урана, что их неэкономично обрабатывать обычным способом. Учитывая тот факт, что *A. thiooxidans* интенсивно окисляет серу до серной кислоты, нами были изучены окислительная активность культуры *A. thiooxidans* (табл.3).

Как видно из табл. 3, во всех вариантах опыта через 22 суток наблюдается снижение рН раствора, то есть идет процесс образования серной кислоты в исследуемом растворе. Процесс интенсивного подкисления среды наблюдается в выщелачивающем растворе, затем замечается в растворах отобранные из отстойника № 6, производственного раствора и раствора из центральной насосной станции. Максимальное снижение рН среды наблюдается в вариантах опыта с выщелачивающим раствором и раствором отобранные из отстойника № 6. При визуальном наблюдении было заметно, что цвет этих сред интенсивно помутнены, а также к концу опыта показатели рН среды значительно снижены и увеличены окислительно-восстановительный потенциал. А также результаты микроскопирования подтверждает, что в средах наблюдается значительное накопление количество клеток *A. thiooxidans*.

Таким образом, подкисление среды проходит по последовательности: выщелачивающий раствор → раствор отстойника № 6 → раствор из центральной насосной станции → производственный раствор. Этот факт также подтверждает снижение показателей окислительно-восстановительного потенциала среды.

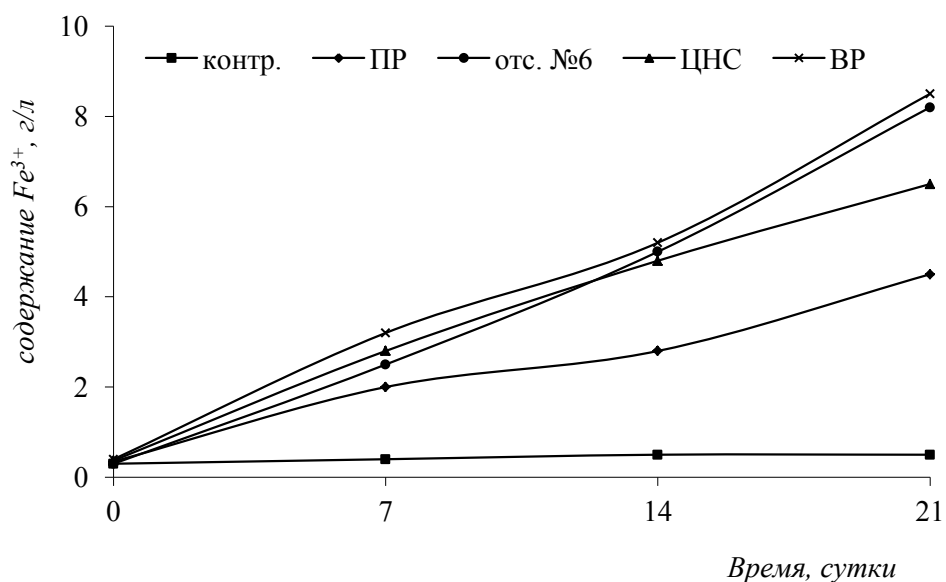
Нами были изучены микробиоценозы хемолитотрофных бактерий растворов подземного выщелачивания уранового месторождения «Уванас» и «Мынкудук». Объектом исследования являлся продуктивный и выщелачивающий растворы месторождения «Уванас», которое относится к рудоуправлению «Степное» ПВ-17.

Таблица 1 - Физико-химическая характеристика растворов месторождения «Канжуган»

Место отбора проб	рН	ОВП, мВ	U, мг/л	Железо, мг/л		
				Fe ³⁺	Fe ²⁺	Fe _{общ.}
ПР	2,06	420	65,5	160	500	660
ВР	2,05	410	3,1	100	550	650
ЦНС	2,23	405	63,0	80	470	550
Отстойник № 6	2,03	518	54,4	880	30	920

Таблица 2 - Количество хемолитотрофов в растворах месторождения «Канжуган»

Место отбора проб	Количество клеток в 1 мл раствора			
	<i>A.ferrooxida</i> <i>ns</i>	<i>A.thiooxidan</i> <i>s</i>	Сульфатредуцирующие	Денитрифицирующие
ПР	10 ²	10 ¹	не обнаружено	не обнаружено
ВР	10 ³	10 ³	не обнаружено	не обнаружено
ЦНС	10 ²	10 ¹	не обнаружено	не обнаружено
Отстойник № 6	10 ²	10 ²	не обнаружено	не обнаружено

**Рисунок 1** - Динамика образования Fe³⁺ при окислении Fe²⁺ культурой *A. ferrooxidans* в производственном растворе ПР, ВР, ЦНС, отс. № 6 месторождения «Канжуган»**Таблица 3** - Изменение рН и ОВП при окислении урана накопительной культурой *A.thiooxidans* в среде Ваксмана

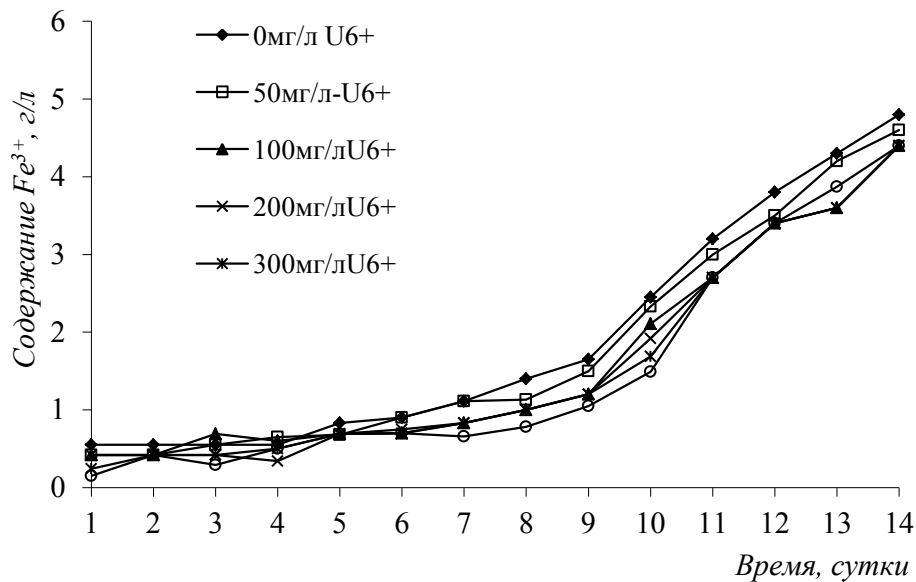
Место отбора проб воды	<i>A. thiooxidans</i> , кл/мл	Продолжительность 22 сутки			
		рН начальный	рН конечный	ОВП начальный	ОВП конечный
ПР	10 ⁷	4,0	3,5	282	310
ВР	10 ⁷	4,0	2,9	303	345
ЦНС	10 ⁷	4,0	3,3	232	278
Отстойник № 6	10 ⁷	4,0	3,2	280	317

Таблица 4 - Результаты физико-химического и микробиологического обследования технологических растворов ПВ-17 месторождения «Уванас»

Место отбора	Температура, °С	рН	ОБП, мВ	H ₂ S O ₄ , мг/л	Железо, мг/л			U, мг/л	SO ₄ ²⁻ , мг/л	NO ₃ ⁻ , мг/л	Количество кл. в 1 мл			
					Fe ³⁺	Fe ²⁺	Fe _{общ}				T. ferrooxidans	T. thiooxidans	Сульфатредуцирующие	Денитрифицирующие
ПР	8	2,05	433	1,17	230	560	790	45,0	9920	640	10 ²	0	0	0
ВР	9	1,95	436	2,05	170	520	690	2,0	870	10840	10 ³	10 ²	0	0

Таблица 5 - Физико-химический и микробиологический состав растворов из наблюдательных скважин месторождения «Уванас»

Номера скважин	Fe ³⁺ , г/л	Fe ²⁺ , г/л	рН	ОБП, мВ	U, мг/л	A. ferrooxidans, кл/мл
48	0,12	0,6	2,36	405	0,006	10 ⁶
87	0,06	0,23	2,85	397	0,014	10 ⁵
108	0,02	0,63	3,07	333	0,085	10 ⁷
161	0,05	0,77	2,87	358	0,065	10 ⁴
297	-	-	4,13	326	0,004	10 ⁵
306	-	-	4,35	312	0,006	10 ³
429	0,27	0,27	2,11	466	0,008	10 ⁶

**Рисунок 2** – Влияние различных концентраций U⁶⁺ на окислительную деятельность A. ferrooxidans, выделенных из технического раствора Степного РУ (ПВ-17, ВР) месторождения «Уванас»

Пробы растворов отбирали в мае месяце. В настоящее время отрабатываемые урановые месторождения «Уванас» и «Мынкудук» относятся к ТОО «Степное».

Температура раствора на момент отбора проб из исследуемых точек колебалась от +18 до +19°C, pH растворов составляли 1,95-2,05, показатели окислительно-восстановительного потенциала колебался в пределах от +433 до +436. Содержание серной кислоты в растворе составляло 1,17-2,05 мг/л, общее содержание железа в выщелачивающем растворе 690 мг/л, в производственном растворе 790 мг/л. Содержание урана в производственном растворе достигает до 45,0 мг/л, тогда как в выщелачивающем растворе доходит до 2,0 мг/л. Количество сульфатных форм в производственном растворе доходит до 9920 мг/л, SO_4^{2-} мг/л и 640 нитратных NO_3^- , мг/л. В выщелачивающем растворе содержание сульфатов составляет всего 870 SO_4^{2-} мг/л, тогда как количество нитратов достигает до NO_3^- 10840 мг/л (табл. 4).

Нами были изучены микробценозы хемолитотрофных бактерий технологических растворов ПВ -17 месторождения «Уванас». Как видно из табл. 4, данные о развитии *A.ferrooxidans*, особенно в выщелачивающем растворе составляет 10^3 кл/мл и количество *A.thiooxidans* доходит 10^2 кл/мл. В производственном растворе количество клеток бактерий *A.ferrooxidans* встречается до 10^2 кл/мл, тогда как *A.thiooxidans* отсутствовал. Сульфатредуцирующие и денитрифицирующие бактерии не обнаружены, видимо, вследствие кислой pH среды.

В среде Ваксмана при росте *A.thiooxidans* наблюдалось заметное помутнение среды и снижение pH. Незначительная разница в количестве железобактерий с преобладанием в ВР объясняется тем, что именно здесь начинается увеличение биомассы этих бактерий и осуществляется непосредственная работа по окислению железа.

В табл. 5 и на рис. 2 приводятся результаты бактериального окисления железа в растворах ПР и ВР на участке ПВ-17. Нижеприведенные данные наглядно показывают значительную роль *A.ferrooxidans* в процессе окисления железа.

Был исследован ряд растворов из наблюдательных скважин на отработанных участках месторождения «Уванас» на наличие искомым микроорганизмов. Были приготовлены накопительные культуры *A.ferrooxidans*, культивируемые на среде 9К. Результаты химических и микробиологических анализов показали наличие во всех пробах бактерий *A.ferrooxidans*.

В технических растворах ПСВ-17 выявлены лишь два вида из четырех исследуемых форм бактерий - *A.ferrooxidans* и *A.thiooxidans*, в связи с тем, что pH-кислотность раствора является высокой.

В следующем варианте опыта нами было изучено влияние различных концентраций U^{6+} на окислительную деятельность *A.ferrooxidans*, выделенных из технического раствора Степного РУ (месторождения «Уванас», ПСВ-17, ВР).

В накопительной культуре с *A.ferrooxidans* наблюдалось интенсивное окисление Fe^{2+} в Fe^{3+} . Через 14 дней встряхивания на качалке, при температуре 30°C, среда приняла интенсивно-красный цвет. Добавление к среде концентрации урана от 0 до 400 мг/л U^{6+} особо не повлияло на скорость окисления железа (рис. 2). На 14 сутки окисленное количество железа составляет всего 4,5 г/л. Таким образом, в данном опыте концентрации от 50 до 400 мг/л урана в испытуемом растворе отрицательно не действует на скорость окисления железа.

Выводы

Таким образом, в результате микробиологического обследования целого ряда технологических растворов из различных точек урановой провинции было установлено:

- подтверждается наличие железобактерий хемолитотрофных бактерий *Acidothiobacillus ferrooxidans*, которые встречаются в большинстве отобранных проб и имеют большое значение для применения процесса регенерации раствора окислителя.

- в технических растворах наблюдается присутствие *Acidothiobacillus thiooxidans*, которые принимают активное участие в процессе выщелачивания урана. Как известно, *A.thiooxidans* обладают способностью окислять соединения серы с образованием серной кислоты.

Литература

- 1 Канаев А.Т. Интенсификация процесса извлечения урана биотехнологическим способом из бедных руд. –Алматы. – 2010. – 143 с.
- 2 Канаев А.Т. «Методы биотехнологии» для специальности 050701 – «Биотехнология». Методические указания к лабораторным занятиям-Алматы: 2010. – С.51
- 3 Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 140 с.
- 4 Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд // Москва, 1972. – С. 248.

Reference

- 1 Kanaev A.T. Intensifikatsiya protsessa izvlecheniya urana biotehnologicheskim sposobom iz bednyih rud. –Almaty. – 2010. – 143 s.
- 2 Kanaev A.T. «Metodyi biogeotehnologii» dlya spetsialnosti 050701 – «Biotehnologiya». Metodicheskie ukazaniya k laboratornyim zanyatiyam-Almaty: 2010. – S.51
- 3 Reznikov A.A., Mulikovskaya E.P., Sokolov I.Yu. Metodyi analiza prirodnyih vod. M.: Nedra, 1970. 140 s.
- 4 Karavayko G.I., Kuznetsov S.I., Golomzik A.I. Rol mikroorganizmov v vyischelachivanii metallov iz rud // Moskva, 1972. – S. 248.