

DRAGIŠA S. SAVIĆ¹
MIODRAG L. LAZIĆ¹
VLADA V. VELJKOVIĆ¹
MIROSLAV M. VRVIĆ²

¹Tehnološki fakultet, Univerzitet
u Nišu, Leskovac, Srbija

²Hemijski fakultet, Univerzitet u
Beogradu, Beograd

NAUČNI RAD

549.324.31 + 542.943 + 579.8

OKSIDACIJA PIRITA POMOĆU BAKTERIJE *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*

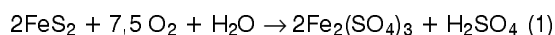
U radu je prikazan kinetički model oksidacije pirita (FeS_2) u suspenziji pomoću bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans* u erlenmajerima uz mućkanje. Koncentracije ćelija bakterija adsorbovanih na čestice pirita i slobodno suspendovanih ćelija u lužnom rastvoru su u ravnoteži saglasno Langmuir-ovoj adsorpcionoj izotermi. Specifična brzina rasta adsorbovanih ćelija ($\mu_A = 1,6 d^{-1}$) je određena iz promene koncentracije gvožđa u lužnom rastvoru. Model pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima promene koncentracije izluženog gvožđa i slobodne biomase u toku biooksidacije pirita u suspenziji.

Terminom bakterijsko luženje (bioluženje) označava se ekstrakcija ili rastvaranje metala pomoću mikroorganizama iz minerala ili sporednih proizvoda dobijenih konvencionalnom preradom ruda. U najvećem broju slučajeva, glavni izvori komercijalnih metala su rude u kojima se metal pojavljuje u obliku sulfida. Luženje metala iz sulfidnih supstrata se sastoji u biooksidaciji sulfida metala u odgovarajuće vodorastvorne sulfate iz kojih se, zatim, metal može jednostavnije izdvojiti [1].

Metali iz nerastvornog minerala, odnosno rude, mogu da se prevedu u rastvorni oblik direktno – uključanjem u metabolizam mikroorganizma ili indirektno – dejstvom proizvoda metabolizma. Među mnogobrojnim prokariotima s sposobnošću oksidacije sulfida metala, dominantnu ulogu imaju bakterije iz roda *Acidithiobacillus*, a među njima vrsta *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ranije zvana *Thiobacillus ferrooxidans*) [2]. Posledica specifične hemijske i biohemijske aktivnosti tionskih bakterija je bakterijsko luženje sulfidnih minerala.

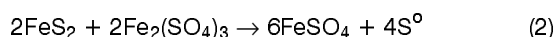
Mehanizam bakterijske oksidacije je prvo proučen u slučaju pirita, što je razumljivo zbog njegove relativno velike zastupljenosti u prirodi kao i zbog činjenice da su sulfidi gvožđa (pirit, FeS_2 ; markasit, FeS_2 ; pirhotit, $Fe_{1-x}S$ i troilit, FeS) stalni pratilci sulfida drugih metala. Prisustvo pirita u mineralima i njegova primarna oksidacija tionskim bakterijama je preduslov za bioluženje.

Proučavanja *A. ferrooxidans* pokazala su da u kontaktu sa površinom sulfidnih minerala, ova bakterija direktno rastvara kristale sulfida po mehanizmu koji se najjednostavnije opisuje sledećom jednačinom [3]:

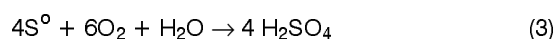


Nastali gvožđe(III)-sulfat, kao jako oksidaciono sredstvo, može da rastvara različite metale oksidacijom njihovih sulfida u odsustvu kiseonika i živih ćelija. Gvo-

žđe(III)-joni, posebno ili zajedno sa bakterijama, značajni su za indirektnu oksidaciju sulfidnih minerala:



Elementarni sumpor koji nastaje oksidacijom pirita gvožđe(II)-jonima, oksidiše se do sumpome kiseline dejstvom bakterijskih ćelija:



Odnos uticaja direktnog i indirektnog mehanizma na proces bioluženja je predmet intezivnog proučavanja [4–7]. Isto tako, predloženo je nekoliko modela biooksidacije sulfidnih minerala [8–13], koji uključuju ponašanje slobodno suspendovanih i adsorbovanih bakterija, kao i njihov odnos prema rastvaranju mineralnih čestica, tj. rast adsorbovanih i suspendovanih ćelija, oksidacija gvožđe(II)-jona, interakcija između gvožđe(III) jona i minerala i promene u veličini čestica minerala.

Matematičko opisivanje procesa bioluženja metala iz sulfidnih supstrata je otežano zbog fenomena prenosa mase između faza (vazduh, tečna faza i čestice supstrata). Koncentracija izluženog metala pri bioluženju u suspenziji sa vremenom ima oblik sigmoidne krive [14]. Površina čestica supstrata je limitirajući faktor za bioluženje metala jer je neophodan kontakt ćelija bakterija *A. ferrooxidans* i čvrstog supstrata.

Pri bioluženju u suspenziji sulfidnih supstrata pomoću bakterije *A. ferrooxidans*, koncentracije ćelija adsorbovanih na čestice pirita ($X_A - mg_{s,b}/dm^3$) i slobodno suspendovanih ćelija u lužnom rastvoru ($X_L - mg_{s,b}/dm^3$) su u ravnoteži saglasno Langmuir-ovoj adsorpcionoj izotermi [12, 13]:

$$X_A = \frac{K_A X_{Am} X_L}{1 + K_A X_L} \quad (4)$$

gde je: X_{Am} – maksimalni adsorpcioni kapacitet ($mg_{s,b}/g_{FeS_2}$), K_A – konstanta adsorpcije ($dm^3/mg_{s,b}$). Adsorpcija ćelija za površinu čvrstog supstrata je relativno brz proces u odnosu na trajanje bioluženja [13].

Promene koncentracije ukupnog gvožđa u lužnom rastvoru ($Fe_T, g/dm^3$) i ukupne biomase ($X_T, mg_{s,b}/dm^3$)

Adresa autora: D. Savić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, Leskovac, Srbija;

E-mail: savi@ni.ac.yu

Rad primljen: Septembar 16, 2004

Rad prihvaćen: Novembar 23, 2004

u toku biooksidacije pirita u suspenziji mogu se opisati sledećim diferencijalnim jednačinama [13]:

$$\frac{dFe_T}{dt} = \frac{f}{Y_{X/S}^A + fY_{X/S}^L} \cdot \frac{dX_T}{dt} \quad (5)$$

$$\frac{dX_T}{dt} = \mu_A X_A (1 - \alpha)^{2/3} \Theta \left(1 + f \frac{Y_{X/S}^L}{Y_{X/S}^A} \right) \quad (6)$$

gde je: f – maseni udeo gvožđa u piritu (G_{Fe}/G_{FeS_2}), $Y_{X/S}^A$ i $Y_{X/S}^L$ koeficijenti prinosa adsorbovane i slobodno suspendovane biomase u odnosu na izluženo gvožđe ($mg_{s.b.}/g_{Fe}$), a μ_A – specifična brzina rasta adsorbovane biomase (d^{-1}). Smanjenje površine čestica usled bakterijskog dejstva koriguje se množenjem sa $(1 - \alpha)^{2/3}$, pri čemu α predstavlja odnos ukupno izluženog i početnog sadržaja gvožđa u piritu (Fe_T/Fe_0). Rast biomase zavisi i od pristupačne, slobodne površine čestica pirita:

$$\Theta = \frac{X_{Am} - X_A}{X_{Am}}$$

Promena koncentracije biomase u lužnom rastvoru saglasna je brzini luženja gvožđa [14], odnosno:

$$X_L = \frac{OUR_L}{q_{O_2}} = \frac{1}{q_{O_2}} Y_{O/S}^L \frac{dFe_T}{dt} \quad (7)$$

gde je: q_{O_2} – specifična brzina potrošnje kiseonika bakterija ($31,68 mg_{O_2}/mg_{s.b.}/d$ [15]) i $Y_{O/S}^L$ – koeficijent potrošnje kiseonika u lužnom rastvoru u odnosu na izluženo gvožđe.

Koeficijent prinosa adsorbovane biomase u odnosu na izluženo gvožđe ($Y_{X/S}^A = 1,85 mg_{s.b.}/g_{Fe}$) izračunava se linearizacijom sledeće jednačine [13]:

$$Y_{X/S}^A = \frac{(X_T - X_{T_0}) V - \alpha W_0 f Y_{X/S}^L}{\alpha W_0} \quad (8)$$

gde je W_0 – početna masa čestica pirita (3 g) i V – zapremina suspenzije ($0,3 dm^3$). Aktuelna i početna koncentracija ukupne biomase (X_T , X_{T_0}) predstavlja zbir slobodno suspendovane (izračunate preko brzine potrošnje kiseonika) i adsorbovane biomase koja se izračunava pomoću sledeće jednačine:

$$X_A = \frac{K_A X_{Am} X_L W_0}{1 + K_A X_L V} (1 - \alpha)^{2/3} \quad (9)$$

Cilj ovog rada je razvoj matematičkog modela koji opisuje luženje pirita pomoću bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans* u erlenmajerima uz mućkanje, kao i procena uticaja slobodno suspendovanih i adsorbovanih ćelija na bioproces.

EKSPERIMENTALNI DEO

Mikroorganizam i uslovi kultivacije

Eksperimenti su izvedeni sa bakterijom B5 iz zbirke mikroorganizama Centra za hemiju, IHTM, Beograd. Bakterijska oksidacija pirita proučavana je u erlenmajeri-

ma (odnos radne i zapremine erlenmajera $300/500 cm^3$) uz mućkanje (prečnik rotacije 2 cm, brzina rotacije $3,33 s^{-1}$). U eksperimentu je korišćen inokulum iz srednje eksponencijalne faze (14 dana star) u količini od 10% (v/v) od radne zapremine bioreaktora. Radna temperatura u svim ispitivanjima je održavana na $28^\circ C$.

U radu je korišćen koncentrat pirita koji sadrži 35,12 % gvožđa (maseni udeo gvožđa u piritu $f = 0,35 G_{Fe}/G_{FeS_2}$), a 99,20 % čestica pirita je manje od 0,208 mm. Koncentrat pirita se sterilise 24 časa na $80^\circ C$. Za proces bioluženja gvožđa, sterilni prah koncentrata pirita se dodaje ($10 g/dm^3$) u aseptičnim uslovima u tečnu podlogu OK sledećeg sastava (g/dm^3): $(NH_4)_2SO_4 - 3$; $K_2HPO_4 - 0,5$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0,5$; $KCl - 0,1$ i $Ca(NO_3)_2 - 0,01$.

Određivanje koncentracije ukupnog gvožđa

Ukupno rastvorno gvožđe je određivano plamenom atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom (PYE UNICAM AAS – Phillips).

Određivanje brzine potrošnje kiseonika

Brzina potrošnje kiseonika u lužnom rastvoru određivana je iz nagiba pravolinijskog dela zavisnosti normalizovane koncentracije kiseonika od vremena. Relativna koncentracija kiseonika u podlozi merena je kiseoničnom elektrodom (HANNA HI 8043).

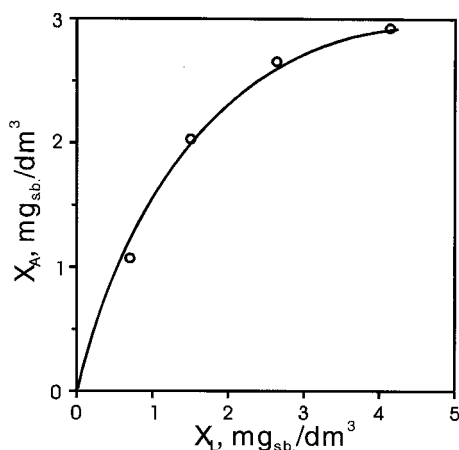
Određivanje odnosa adsorbovne i slobodno suspendovane biomase

Za određivanje odnosa adsorbovne i slobodno suspendovane biomase ćelija izdvojen je lužni rastvor iz biooksidacije pirita u barbotажnoj koloni (posle 30 dana) sa poznatom koncentracijom biomase (određena metodom sušenja – [15]). Različitim odnosima lužnog rastvora i podloge OK dodavan je pirit (1 % w/v). Nakon mućkanja (3 h, prečnik rotacije 2 cm, brzina rotacije $3,33 s^{-1}$), suspenzijama je određivana brzina potrošnje kiseonika u lužnom rastvoru. Razlika koncentracija biomase izračunatih iz brzina potrošnje kiseonika (preko specifične brzine potrošnje kiseonika [16]) pre i posle mućkanja sa piritom, odgovara koncentraciji biomase koja je adherovana na čestice pirita. Pretpostavljeno je da se posle mućkanja od 3 sata postigne ravnoteža između adherovane i biomase u lužnom rastvoru, kao i da je broj ćelija adherovanih na zid erlenmajera zanemarljiv [13].

REZULTATI I DISKUSIJA

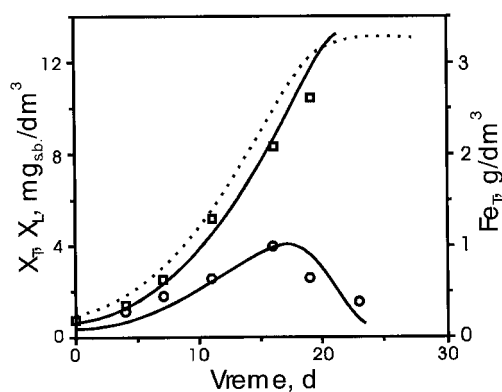
Zavisnost adsorbovane i slobodno suspendovane biomase u toku biooksidacije pirita u erlenmajerima uz mućkanje opisana je Langmuirovom adsorpcionom ravnotežnom izotermom (slika 1). Vrednosti maksimalnog adsorpcionog kapaciteta ($X_{Am} = 0,416 mg_{s.b.}/g_{FeS_2}$) i konstante adsorpcije ($K_A = 0,513 dm^3/mg_{s.b.}$) izračunate su posle linearizacije jednačine 4.

Na osnovu jednačina 5 i 7, izračunate su vrednosti koncentracije ukupno rastvorenog gvožđa i koncentracije biomase u lužnom rastvoru, koje pokazuju dobro slaganje sa eksperimentalnim vrednostima dobijenim u



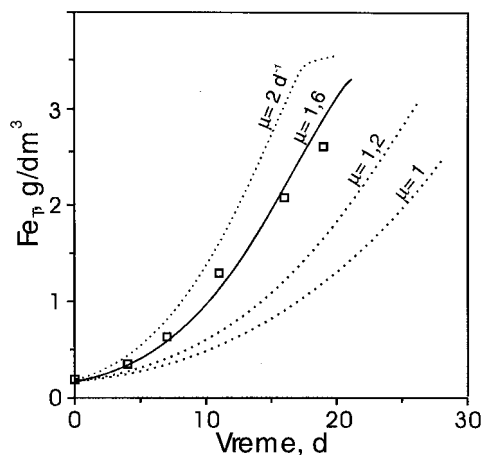
Slika 1. Langmuir-ova adsorpciona ravnotežna izoterma bakterije *A. ferrooxidans*
Figure 1. Langmuir adsorption isotherm for the bacterium *A. ferrooxidans*

toku biooksidacije pirita u suspenziji u erlenmajeru uz mućkanje (slika 2). Konstante modela $Y_{X/S}^L$ i $Y_{X/S}^A$ izračunate su iz eksperimentalnih podataka. Pri izračunavanju koeficijenta prinosa slobodne biomase u odnosu na izluženo gvožđe $Y_{X/S}^L = 0,46 \text{ mg}_{s.b.}/\text{g}_{Fe}$ korišćena je vrednost slobodno suspendovane biomase izračunate na osnovu brzine potrošnje kiseonika (jed. 7). Koeficijent prinosa adsorbovane biomase u odnosu na izluženo gvožđe izračunat je linearizacijom jednačine 8 i iznosi $Y_{X/S}^A = 1,85 \text{ mg}_{s.b.}/\text{g}_{Fe}$. Aktualna i početna koncentracija ukupne biomase (X_T , X_{T0}) izračunata je pomoću jednačina 7 i 9.



Slika 2. Model biooksidacije pirita u erlenmajeru ($V_L/V_F = 300/500$) uz mućkanje ($v=3,33 \text{ s}^{-1}$, $r=2 \text{ cm}$)
Eksperimentalne vrednosti: ukupno rastvoreno gvožđe: \square ; koncentracija biomase u lužnom rastvoru: \circ . Model – pune linije. Isprekidana linija – koncentracija ukupne biomase izračunate prema modelu

Figure 2. Model of pyrite biooxidation in Erlenmeyer flasks ($V_L/V_F=300/500$) shaken on a rotational shaker (frequency: 3.33 s^{-1} , and orbit diameter: 2 cm) Experiment: total dissolved iron: \square ; and biomass concentration in the culture medium: \circ . Model: full lines; and total biomass concentration calculated using the model equation: dotted line.



Slika 3. Eksperimentalne (\square) i izračunate (linije) vrednosti koncentracije ukupnog gvožđa prema modelu za različite vrednosti specifične brzine mikrobnog rasta u erlenmajeru ($V_L/V_F=300/500$) uz mućkanje ($v=3,33 \text{ s}^{-1}$, $r=2 \text{ cm}$).
Figure 3. Comparison of the experimental (\square) and calculated (lines) values of the total iron concentration for different specific microbial growth rates for pyrite biooxidation in Erlenmeyer flasks ($V_L/V_F=300/500$) shaken on a rotational shaker (frequency: 3.33 s^{-1} , and orbit diameter: 2 cm).

Na osnovu jednačine 7, tj. sinhronizovanosti između promene koncentracije biomase i brzini luženja gvožđa, specifična brzina rasta adsorbovanih ćelija ($\mu_A = 1,6 \text{ d}^{-1}$) određena je "fitovanjem" modela sa eksperimentalnim podacima promene koncentracije gvožđa u lužnom rastvoru (slika 3). Koeficijent potrošnje kiseonika u lužnom rastvoru u odnosu na izluženo gvožđe ($Y_{O_2/S}^L$) za prikazan slučaj iznosi $507 \text{ mgO}_2/\text{g}_{Fe}$ (izračunato prema [14]).

ZAKLJUČCI

Prema pretpostavljenom modelu, ukupna koncentracija biomase u toku procesa (izračunate pomoću jed. 6) iznosi $13,1 \text{ mg}_{s.b.}/\text{dm}^3$ (slika 2). To znači da je broj ćelija vezanih za čestice pirita u svakom trenutku bioprocesa nekoliko puta veći u odnosu na broj ćelija u lužnom rastvoru (slika 3). Ovakav rezultat je usaglasnosti sa literaturnim podacima [3, 6, 7], prema kojim je neophodno vezivanje ćelija za površinu čestice sulfida da bi došlo do rastvaranja metala. Tada dolazi do generisanja gvožđe(III)-jona, oksiduju sulfide po indirektnom mehanizmu (jed. 2). Gotovo celokupna količina gvožđa u lužnom rastvoru je u obliku gvožđe(II)-jona [14] jer slobodno suspendovane ćelije bakterija brzo oksiduju gvožđe(II)-sulfat nastao indirektnom oksidacijom sulfida, omogućujući tako indirektnu oksidaciju sulfida [3].

Koeficijent prinosa biomase po molu pirita ($0,3 \text{ g}_{s.b.}/\text{mol}_{FeS_2}$) je oko dva puta veći od koeficijenta prinosa biomase po molu gvožđe(II)-jona ($0,16 \text{ g}_{s.b.}/\text{mol}_{FeS_2}$) (izračunati na osnovu ukupne biomase i izluženog gvožđa) zbog učešća sulfidnog dela pirita u metabolizmu bakterije. Na osnovu većeg broja dostupnih elektrona ($15 e^-$) u odnosu na gvožđe(II)-jone ($1 e^-$) realno je oče-

kivati daleko veći koeficijent prinosa biomase. Isto tako, stepen iskorišćenja energije iz pirita (2%, izračunat iz odnosa stvarnog i teorijskog koeficijenta prinosa biomase) je nekoliko puta manji od stepena iskorišćenja energije gvožđe(II)-jona (10–15% – izračunato iz [16]). Takav rezultat upućuje na zaključak da je dominantan indirektni mehanizam oksidacije pirita pomoću gvožđe(III)-jona, koje generišu bakterije *A. ferrooxidans*. Identičan zaključak su objavili Basaran i Touvinen [17] iako je, prema njihovim istraživanjima, koeficijent biomase po molu pirita (1,98 g_{s.b.}/mol_{FeS₂}) i stepen iskorišćenja supstrata (10–12%) nekoliko puta veći od rezultata ovog rada, a što se može objasniti genetičkim razlikama korišćenih sojeva bakterija *A. ferrooxidans*. Prema nekim istraživanjima [3, 7], pretpostavlja se da, nakon vezivanja bakterija za površinu čestica sulfida, mehanizam bioluženja sulfida se nastavlja samo po indirektnom mehanizmu.

SPISAK SIMBOLA

f (g _{Fe} /g _{FeS₂})	– maseni udeo gvožđa u piritu
Fe_0 (g/dm ³)	– koncentracija početnog sadržaja gvožđa u piritu
Fe_T (g/dm ³)	– koncentracija ukupnog gvožđa u lužnom rastvoru
K_A (dm ³ /mg _{s.b.})	– konstanta adsorpcije
q_{O_2} (mg _{O₂} /mg _{s.b.} /d)	– specifična brzina potrošnje kiseonika bakterija
V (dm ³)	– zapremina suspenzije
W_0 (g)	– početna masa čestica pirita
X_A mg _{s.b.} /dm ³	– koncentracija ćelija adsorbovanih na čestice pirita
X_{Am} mg _{s.b.} /g _{FeS₂}	– maksimalni adsorpcioni kapacitet
X_L (mg _{s.b.} /dm ³)	– koncentracija slobodno suspendovanih ćelija u lužnom rastvoru
X_T (mg _{s.b.} /dm ³)	– koncentracija ukupne biomase
X_{T0} (mg _{s.b.} /dm ³)	– početna koncentracija ukupne biomase
$Y_{X/S}^d$ (mg _{s.b.} /g _{Fe})	– koeficijent prinosa adsorbovane biomase u odnosu na izluženo gvožđe
$Y_{X/S}^l$ (mg _{s.b.} /g _{Fe})	– koeficijent prinosa slobodno suspendovane biomase u odnosu na izluženo gvožđe
$Y_{O_2/S}^l$ (mg _{s.b.} /g _{Fe})	– koeficijent potrošnje kiseonika u lužnom rastvoru u odnosu na izluženo gvožđe

SUMMARY

PYRITE OXIDATION BY *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* BACTERIA

(Scientific paper)

Dragiša S. Savić¹, Miodrag L. Lazić¹, Vlada V. Veljković¹, Miroslav M. Vrvic²

¹Faculty of Technology, Bulevar oslobođenja 124, Leskovac, Serbia

²Faculty of Chemistry, Akademski trg 16, Belgrade, Serbia

The kinetic model of pyrite particle dissolution by the action of bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* in a shaken Erlenmeyer flask was presented. The model agreed well with the experimental data for the extracted iron and the number of cells in the liquid phase. The specific growth rate of the adsorbed cells was evaluated ($\mu_A = 1,6 \text{ d}^{-1}$) by fitting the experimental data to the model curve. Also, the relevance of the two proposed mechanisms for the bacterial dissolution of sulphide (direct and indirect) was discussed, indicating that the indirect one was dominant. The adsorption process of *A. ferrooxidans* to the pyrite surface was well correlated by a Langmuir type isotherm.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans* • Pyrite biooxidation • Mathematical model •
Ključne reči: *Acidithiobacillus ferrooxidans* • Oksidacija pirita • Matematički model •

α (–)	– odnos ukupno izluženog i početnog sadržaja gvožđa u piritu.
μ_A (d ⁻¹)	– specifična brzina rasta adsorbovane biomase
Θ (–)	– slobodna površina čestica pirita

LITERATURA

- [1] Pooley, F.D., 1987, Mineral leaching with bacteria, in Environmental biotechnology (C.F. Foster, D.A.J. Wase, eds.), Ellis Horwood, Chichester, pp. 114–134.
- [2] Jonson, D.B., K.B. Hallberg, Research Microbiol. **154** (2003) 466
- [3] Sand, W., T. Gehrke, R. Hallmann, A. Schippers, Min. Pro. Ext. Met. Rev. **19** (1998) 97.
- [4] Boon, M., K. Luyben, J.J. Heijnen, Hydrometallurgy, **48** (1988) 1
- [5] Schippers, P. Jozsa, A., W. Sand, App. Environ. Microbiol., **62** (1996) 3424.
- [6] Schippers, A., W. Sand, App. Environ. Microbiol., **65** (1999) 319.
- [7] Sand, W., T. Gehrke, R. Hallmann, A. Schippers, App. Microbiol. Biotechnol., **43** (1995) 961.
- [8] Asai, S., Y. Konishi, K. Yoshida, Chem Eng. Sci., **47** (1992) 133
- [9] Crundwell, F.K., Biotechnol Bioeng. **71** (2000–2001) 255
- [10] Konishi, Y., Y. Tasaka, S. Asai, Biotechnol Bioeng. **44** (1994) 667
- [11] Nagpal, S., D. Dahlstrom, T. Olman, Biotechnol Bioeng. **43** (1993) 357
- [12] Chang, Y.C., A.S. Mayerson, Biotechnol. Bioeng., **24** (1982) 889
- [13] Konishi, Y., S. Asai, H. Katoh, Bioprocess Bioeng. **5** (1990) 231
- [14] Savić, D., V.B. Veljković, M.L. Lazić, in Biohidrometallurgy and the environment toward the mining of the 21 st century (R. Ramis, A. Balester, eds.), Elsevier, Amsterdam, 1999, pp 624
- [15] Veljković, V., D. Savić, M. Lazić, M. Vrvic, in Biohidrometallurgy and the environment toward the mining of the 21 st century (R. Ramis, A. Balester, eds.), Elsevier, Amsterdam, 1999, pp 617
- [16] Savić, D., V. Veljković, M. Lazić, Contribution to the quantification of the Acidithiobacillus ferrooxidans biomass concentration from the oxygen uptake rate, 15th International Biohydrometallurgy Symposium, Athens, september 14/19 2003, Symposium proceedings of full text: 118.pdf
- [17] Basaran, A.H., O.H. Tuovinen, Coal Prep. **5** (1987) 39