

VESNA T. CONIĆ¹
VLADIMIR B. CVETKOVSKI¹
EMINA D. POŽEGA¹
MILOVAN D. VUKOVIĆ²
MILENA V. CVETKOVSKA³

¹Institut za rudarstvo i metalurgiju, Bor

²Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet, Bor

³Hemski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

NAUČNI RAD

UDK 66.046.8:579.24:66.067.5:546.72-71

DOI: 10.2298/HEMIND0901047C

RAZVOJ MEZOFILNIH BAKTERIJA IZ PODZEMNE EKSPLOATACIJE RUDNIKA BAKRA BOR

Predmet rada je bio pokušaj autotrofne kultivacije mezofilnih bakterija iz kiselih rastvora podzemne eksloatacije rudnika bakra, Bor. Dva selektirana uzorka iz rudnog tela "Tilva Roš", bila su obogaćena 9K nutrient medijumom (Silverman and Lundgren, 1959). Prvi uzorak, TR k-16, uzet je iz neposredne eksploracije rudnog tela, a drugi, TR k-31, iz drenažnog kanala. Obogaćenje i inkubacija su urađeni u nesterilnim uslovima. Inkubacija obogaćenih kultura, 9K+TR k-16 i 9K+TR k-31, izvedena je na temperaturi od 28 °C u prisustvu vazduha sa dovoljnom količinom kiseonika i ugljen dioksida. Potpuna oksidacija fero jona ostvarena je u periodu od šest dana. Posle centrifugiranja uzorka obogaćenih kultura pri 3000 min⁻¹, optičkom mikroskopijom je detektovano prisustvo velikog broja bakterija.

Anaerobne mezofilne bakterije poznate su kao oksidansi sulfidnih minerala, S⁰ i Fe²⁺, pri pH 1,4–3,5 i temperaturi 5–35 °C [2,3]. One su od interesa u hidrometalurgiji obojenih metala naročito u oblasti luženja sulfidnih minerala bakra i plemenitih metala. Bakterije roda *Thiobacillus* i *Leptospirillum* lako se izoliraju iz rudničkih voda ili sulfidnih minerala. One se razmnožavaju u hranljivom rastvoru – nutrient medijumu (bujući) u prisustvu fero jona (Fe²⁺). Za vreme inkubacije polazni bistar rastvor postaje boje čilibara, zatim se menja u crveno braon usled obrazovanja feri jona (Fe³⁺).

Cilj rada je razmatranje mogućnosti korišćenja katitičkog dejstva mezofilnih bakterija u rudarstvu za potrebe agitacionog luženja i luženja na gomili u proizvodnji bakra i drugih metala [4]. Savremena istraživanja ogledaju se u istraživanju novih mikroorganizama koji će povećati efikasnost procesa bioluženja, postojanost pri visokim koncentracijama metalnih jona kao i postojanost na inhibitore koji su prisutni u rudnim resursima, uključujući sadržaj hlorida fluorida, nitrata, fosfata, arsenata i arsenita [5].

Istraživanja prikazana u ovom radu rađena su u Institutu za bakar, Bor, u okviru Šestog okvirnog programa Evropske Unije: Radikalne promene u industriji „Osnovnih materijala“ (isključujući čelik) u cilju čistije, sigurnije i efikasnije proizvodnje [6].

EKSPERIMENTALNI DEO

Dva uzorka jamskih rastvora, pribavljeni iz rudnog tela "Tilva Roš", obogaćeni su nutrijent medijumom 9K (g/dm³): 3,0 ((NH₄)₂SO₄), 0,10 (KCl), 0,50 (K₂HPO₄), 0,50 (MgSO₄·7H₂O), 0,010 (Ca(NO₃)₂·4H₂O), 9,0 (Fe²⁺), i podešena je pH vrednost na 1,81–1,94 pomoću 10 N H₂SO₄. Prvi uzorak, TR k-16, je dobijen iz rudnog

tela, a drugi, TR k-31, iz odvodnog kanala. Osnovne hemijske karakteristike uzorka prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Osnovne hemijske karakteristike rudarskih rastvora
Table 1. Chemical characteristic of mine water

Vrsta	Hemijski sastav, g/dm ³	
	Uzorak	TR k-31
Cu ²⁺	1.37	7.37
Fe ²⁺	2.27	2.2
Fe ³⁺	0.5	10.1
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	4.54	0.22
ΣFe	2.77	12.33
pH	2.19	1.93

Odmerena je i uparavana količina od 0,10 dm³ svakog uzorka. Svi ostaci posle uparavanja su analizirani na hemijske elemente (tabela 2).

Tabela 2. Hemski sadržaj suvih ostataka (g/dm³)
Table 2. Chemical contents of dry remainder (g/dm³)

Element	Talog	
	R-TR k-16	R-TR k-31
Cu	> 0,02	> 0,02
Fe	> 0,5	> 0,5
Al	> 0,5	> 0,5
Si	> 0,5	0,27
Ni	< 0,01	< 0,01
Zn	< 0,1	< 0,1
Pb	< 0,01	< 0,01
Co	0,0038	0,004
Sn	< 0,001	< 0,001
Ti	0,066	< 0,01
V	0,0095	0,013
Mn	0,066	0,061
Mg	0,76	0,97
Ca	0,24	0,21
As	U tragovima	U tragovima

Hemijske analize rastvora i suvih ostataka prikazane u tabelama 1 i 2 pokazuju:

Autor za prepisku: V. Conić, Institut za rudarstvo i metalurgiju u Boru, Zeleni bulevar 35, 19210 Bor.

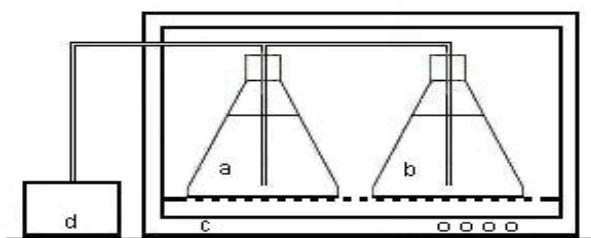
E-pošta: vconic@ibb-bor.co.yu, wmcovic@ptt.rs

Rad primljen: 9. septembar 2008.

Rad prihvaćen: 15. septembar 2008.

- veliku razliku Cu i Fe u uzorcima jamskih rastvora TR k-16 i TR k-31, i Si i Ti u suvim ostacima uzoraka R-TR k-16 i R-TR k-31;
- znatan sadržaj Al, Si, Mg, Ca i mali sadržaj ostatnih metala u suvim ostacima;
- niži sadržaj Cu u TR k-16 nego u TR k-31;
- niži sadržaj gvožđa i veći odnos između fero i feri jona u TR k-16 (svetlo-zeleni rastvor) nego u TR k-31 (mrki rastvor) kao rezultat duže aktivnosti bakterija na oksidaciji fero jona, na mestima uzimanja uzoraka;
- minimalna razlika pH vrednosti između jamskih rastvora.

Kulture, svaka zapremine 480 ml (sastava 380 ml nutrient medijuma 9K, i 100 ml TR k-16 i TR k-31 redom) bile su pripremljene u duplikatu u erlenmajerima zapremine 500 ml (slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz opreme za inkubaciju mezofilnih bakterija: a – kultura 9K+TR k-16; b – kultura 9K+TR k-31; c – peć sa termostatom; d – kompresor vazduha.

Fig. 1. Schematic view of equipment for incubation mesophilic bacteria: a – culture 9K+TR k-16; b – culture 9K+TR k-31; c – furnace; d – air compressor.

Reagensi korišćeni u ovom ispitivanju bili su p.a. kvaliteta. Fero joni su određivani titracijom sa rastvrom kalijum-dihromata ($K_2Cr_2O_7$). Sadržaj Fe i Cu u ispitivanom medijumu su analizirani atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom. Suvi ostaci su analizirani optičkom emisionom spektrografijom. Kiselost kultura je merena kombinovanom pH staklenom elektrodom. U ovom radu zapažena su neslaganja na početku i na kraju eksperimentalno dobijenih sadržaja gvožđa, tabela 3, naročito za uzorak 9K+TRk-16, u kojem je na početku eksperimenta izračunat ukupan sadržaj gvožđa iznosio 8,43, a na kraju 7,29 g/l, a koji nije uticao na rezultate eksperimenta.

REZULTATI I DISKUSIJA

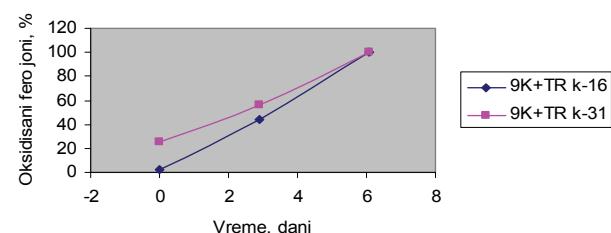
Tabela 3 pokazuje sadržaj bakra i promene fero, feri jona i sadržaj ukupnog gvožđa nakon 6 dana inkubacionog perioda. Slika 2 pokazuje procenat oksidacije fero jona tokom inkubacije.

Aktivnost bakterija dovela je do toga da je početni procenat oksidovanih fero jona (ili sadržaj feri jona) u sredini sa kulturom 9K+TR k-16 i 9K+TR k-31 iznosio 1,7 i 25,2 tež.%, redom. Stepen oksidacije fero jona u

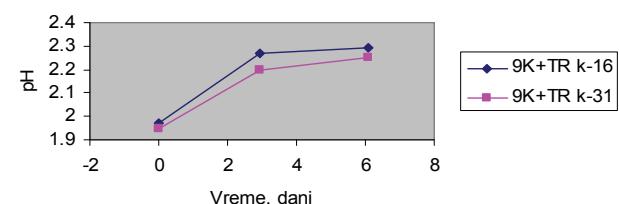
prvih 3 dana inkubacije iznosio je 14,8 i 10,7 tež.% Fe^{2+} /dan, sledećih 3 dana: 17,3 i 13,6 tež.% i tokom čitavog perioda od 6 dana: 16,1 i 12,1 tež.%. Oksidacija fero jona tokom celog inkubacionog perioda iznosila je 98,3 i 74,8 tež.%, redom, tj. 100 tež.% ukupno sa početnim procentom oksidovanih fero jona u svakoj kulturi. Istovremeno, sadržaj gvožđa se neznatno smanjio. Slika 3 pokazuje neznatan porast i promene pH vrednosti kultura za vreme inkubacionog perioda.

Tabela 3. Sadržaj bakra, fero i feri jona u kulturama (g/dm³)
Table 3. Content of copper, ferrous and ferric-ions in culture medium (g/dm³)

Dan	Uzorak	Element				ΣFe
		Cu	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}/Fe^{3+}	
0	9K+TRk-16	0.31	8.29	0.14	59.20	8.43
	9K+TRk-31	0.68	7.82	2.60	3.00	10.32
3	9K+TRk-16	–	4.58	3.68	1.24	8.26
	9K+TRk-31	–	3.71	4.78	0.78	8.49
6	9K+TRk-16	–	–	7.29	–	7.29
	9K+TRk-31	–	–	9.69	–	9.69



Slika 2. Oksidacija fero jona u zavisnosti od vremena.
Fig. 2. Oxidation of ferrous ions vs. time.



Slika 3. Kiselost kultura u zavisnosti od vremena.
Fig. 3. Acid culture vs. time.

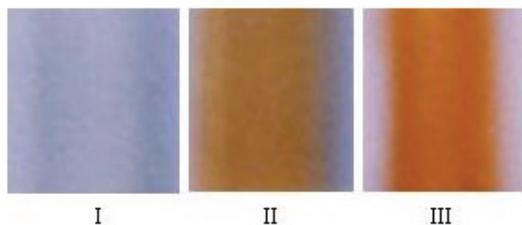
Opseg pH vrednosti korišćen u ovom ispitivanju imao je pozitivan efekat na razvoj mezofilnih bakterija.

Slika 4 pokazuje vizuelnu potvrdu katalitičke aktivnosti mezofilnih bakterija. Tokom inkubacije kulture su promenile boju od svetlo-zelene do crveno-braon usled oksidacije fero jona u feri jon.

Kulture su centrifugirane pri 3000 min^{-1} u vremenu od 5 min, sa ciljem da se optičkom mikroskopijom odredi postojanje mezofilnih bakterija.

Rudno telo "Tilva roš" nalazi se 300–500 m ispod zemljine površine. Glavni minerali sadržani u rudnom teku su halkopirit ($CuFeS_2$), kovelin (CuS), halkozin (Cu_2S), pirit (FeS_2) i drugi, sa prosečnim sadržajem bakra od

0,7%. Uzorci jamske vode izuzeti su sa nivoa k-16 i k-31, i njihovom prirodnom kiselošću od 2,19 i 1,93, redom. TR k-31 sadrži više bakra, gvožđa i feri jona nego TR k-16, usled dužeg perioda aktivnosti bakterija u rastvoru iz odvodnog kanala nego u rastvoru iz iskopine rudnog tela. Neznatno niža pH vrednost u TR k-31 uglavnom je posledica dužeg rastvaranja pirita.

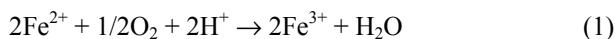


Slika 4. Promena boje kulture 9K+TR k-16; početni rastvor (I); rastvor posle 3 dana (II); rastvor posle 6 dana (III).

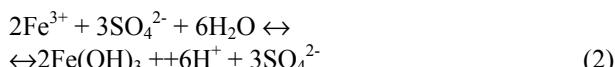
Fig. 4. Culture color change 9K+TR k-16; initial solvent (I); solvent after 3 days (II); solvent after 6 days (III).

Uprkos višem odnosu fero prema feri jonima u 9K+TR k-16 nego u 9K+TR k-31, oksidacija fero jona u obe kulture završena je posle 6,1 dana trajanja inkubacije. Brža oksidacija u 9K+TR k-16 mogla bi da bude rezultat višeg sadržaja fero jona koji je izvor veće raspoložive energije za rast (razvoj) bakterija nego u 9K+TR k-31.

Neznatni porast pH vrednosti u obe kulture za vreme inkubacionog perioda mogao bi se objasniti potrošnjom vodonikovih jona usled oksidacije fero jona prema reakciji (1), u procesu u kome je kiseonik poslednji pri-malac elektrona:



Smanjenje kiselosti u kulturama pomerilo je hidro-litičku reakciju (2) udesno prouzrokujući malo obaranje feri-hidroksida, tj. neznatno smanjenje sadržaja gvožđa:



Mikroskopska posmatranja (400×) potvrdila su da je inkubacija obogaćenih kultura dala mnoštvo bakterija. Prema literaturnim podacima [6], za 9K nutrient rastvor broj bakterija na kraju perioda inkubacije iznosi 10^8 bakterija/cm³.

ZAKLJUČAK

Dva uzorka 9K medijuma (Silverman and Lundgren, 1959) inokulirana su selektiranim uzorcima jamskih rastvora rudnika „Tilva Roš“. Inokulirani 9K medi-

jumi inkubirani su bez prethodne sterilizacije u autoklavu u periodu od 6 dana na temperaturi od 28 °C, uvođenjem vazduha u sistem sa dovoljnom količinom kiseonika i ugljen dioksida. Brzina oksidacije fero jona u prvih 3 dana inkubacije iznosila je 14,8 i 10,7 tež.% Fe²⁺/dan, sledećih 3 dana 17,3 i 13,6, a u ukupnom periodu od 6 dana 98,3 i 74,8 tež.% redom, t.j. 100 tež.% sa početnim sadržajem fero jona posebno u svakom medijumu. Nakon centrifugiranja obogaćenih medijuma na 3000 min⁻¹ optičkom mikroskopijom detektovan je veliki broj bakterija. U procesu inkubacije u 9K nutrient rastvoru broj bakterija dostiže vrednost od 10^8 bakterija/cm³ [6].

Zahvalnica

Ovo istraživanje je delom pomogao Institut za zaštitu zdravlja „Timok“, Odeljenje za mikrobiologiju, Zaječar.

This work was carried out in the frame of BioMinE (European project contract NMP1-CT-500329-1). The authors acknowledge the financial support given to this project by the European Commission under the Sixth Framework Program for Research and Development. We also wish to thank our partners on the project for their contributions to the work reported in this paper.

LITERATURA

- [1] M.P. Silverman, D.G. Lundgren, *J. Bacteriol.* **77** (1959) 642-647.
- [2] A.E Torma, F. Habashi, *Can. J. Microbiol.* **18** (1972) 178.
- [3] G.I. Karavaiko, A.E. Torma, *Microbiological Processes for the leaching of Metals from Ores, State-of-the art, Review*, (Ed.), Centre for Internal Project GKNT, Moscow, 1985, p. 69.
- [4] F. Habashi, *A Textbook of Hidrometallurgy*, Lavel University, Quebec, Canada, 1999, p.195-199.
- [5] D. Morin et.al, Progress after three years of BioMinE research and technological development project for a global assessment of biohydrometallurgical processes applied to European non- ferrous metal resources, Article in press, HYDROM-02835 (2008) p. 11.
- [6] G.I. Karavaiko, G. Rossi, A.D. Agate, S.N. Groudev, Z.A. Avakyan, *Biogeotechnology of Metals, Manual*, Centre for International Projects GKNT, Moscow, 1988, p. 10-11.
- [7] D.B. Johnson, W.I. Kelso. *J. Gen. Microbiol.* (1983) 129.
- [8] K. Imai, K. Sugio, in *Recent Progress in Biohydrometallurgy*, G. Rossi, A.E. Torma (Eds.), Cagliari, Italy,1983, 43.

SUMMARY

ENRICHMENT OF MESOPHILIC ACIDOPHILES FROM THE UNDERGROUND COPPER MINE BOR

Vesna T. Conić¹, Vladimir B. Cvetkovski¹, Emin D. Požega¹, Milovan D. Vuković², Milena V. Cvetkovska³

¹Institute for Mining and Metallurgy Bor

²University in Belgrade, Technical Faculty Bor

³Faculty of Chemistry, University of Belgrade

(Scientific paper)

In this work, autotrophic growth of *mesophilic acidophiles* from the Underground Copper Mine Bor was performed. Two selected solution samples collected from the "Tilva Roš" ore body were prepared in a 9K nutrient medium (Silverman and Lundgren, 1959). The first sample TR k-16 was obtained during the hole drilling of the ore body, and the second TR k-31 from the drainage channel. Two samples of 9K media (Silverman and Lundgren, 1959) were inoculated with two selected solution samples from the underground mine Tilva Roš. Inoculated culture media were incubated without prior autoclaving in the period of 6 days at a temperature of 28 °C with purging air through the system with enough oxygen and carbon dioxide. Oxidation rate of ferrous ions in the first 3 days of incubation was 14.8 and 10.7 wt.% Fe²⁺/day, the next 3 days 17.3 and 13.6 and for the total period of 6 days 98.3 and 74.8 wt.% for the first and second sample, respectively, *i.e.* 100 wt.% with initial percentage of ferrous ion in each medium. After centrifugation of enriched samples of culture media at 3000 rpm for 5 min, a plenty of *mesophilic acidophiles* were determined by microscopic method. According to Karavaiko [6], in the processes of incubation for 9K nutrient solution cells number reach a value of 10⁸ cells/cm³.

Key words: Incubated • Autoclaving • Ferrous ions • Centrifugation
Ključne reči: Inkubacija • Autoklav • Fero joni • Centrifugiranje