ПИТАТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДЛЯ СЕРО- И ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Каршиева М.С.
Навоийский государственный горно-технологический университет
Шарипов С. Ш.
Навоийский государственный горно-технологический университет

Annotatsiya. Oltingugurt va temirni oksidlovchi bakteriyalar biogidrometallurgiya jarayonlarida asosiy mikroorganizmlar hisoblanadi va ularning samarali faoliyati ozuqa muhit tarkibiga bevosita bog‘liq. Tadqiqot davomida Silverman–Lundgren (9K) muhitida *Acidithiobacillus ferrooxidans* bakteriyasining faol o‘sishini ta’minlovchi mineral komponentlarning optimal tarkibi aniqlandi. Aniqlanishicha, oziqlantiruvchi aralashma qo‘shilishi bakteriyalar o‘sish tezligini sezilarli darajada oshiradi: madaniyatning optik zichligi oziq aralashmasi qo‘shilmagan variantga nisbatan 6 baravar ortishi kuzatildi. 96 soat davomida o‘sish dinamikasi tahlil qilinib, lag-faza, eksponensial o‘sish bosqichi va stasionar fazaga o‘tish aniqlangan. Energetik substrat konsentratsiyasi madaniyat rivojlanish intensivligini belgilashi, uning yetishmasligida metabolizm sekinlashishi, ortiqcha miqdorda esa ingibitsiya ta’siri kuzatilishi aniqlandi. Olingan natijalar substrat va mikroelementlar konsentratsiyasini aniq nazorat qilish zarurligini asoslaydi hamda biovyshchelachivanie, oqova suvlarni tozalash va bioremediatsiya jarayonlarini optimallashtirishda qo‘llanilishi mumkin.

Kalit so‘zlar: oltingugurt va temirni oksidlovchi bakteriyalar; ozuqa elementlar; metabolizm; biogidrometallurgiya; bio qayta ishlash; spektrofotometriya; bakteriyalar o‘sishi; Silverman–Lundgren (9K) muhiti; *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Аннотация. Серо- и железоокисляющие бактерии являются ключевыми микроорганизмами в процессах биогидрометаллургии, и эффективность их функционирования напрямую зависит от состава питательной среды. В ходе исследования определён оптимальный состав минеральных компонентов, обеспечивающих активный рост Acidithiobacillus ferrooxidans на среде Сильвермана–Люндгрена (9K). Выявлено, что добавление питательной смеси существенно увеличивает скорость роста бактерий: оптическая плотность культуры увеличивается в 6 раз по сравнению с вариантом без питательной смеси. Проанализирована динамика роста в течение 96 часов, установлены лаг-фаза, экспоненциальная стадия и переход в стационарную фазу. Установлено, что концентрация энергетического субстрата определяет интенсивность развития культуры, при дефиците наблюдается замедление метаболизма, а при избытке — эффект ингибирования. Полученные данные

ISSN 3030-3907

обосновывают необходимость точного контроля концентраций субстрата и микроэлементов и могут быть использованы при оптимизации процессов биовыщелачивания, очистки сточных вод и биоремедиации.

Ключевые слова: серо- и железоокисляющие бактерии; питательные элементы; метаболизм; биогидрометаллургия; биовыщелачивание; спектрофотометрия; рост бактерий; среда Сильвермана–Люндгрена (9K); Acidithiobacillus ferrooxidans.

Abstract. Sulfur- and iron-oxidizing bacteria are essential microorganisms in biohydrometallurgical processes, and their growth efficiency strongly depends on the composition of the nutrient medium. This study investigates the growth kinetics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivated in the traditional Silverman–Lundgren (9K) medium and evaluates the influence of nutrient components on bacterial metabolic activity. Quantitative analysis was performed using UV spectrophotometry (OD600) to monitor biomass accumulation over a 96-hour cultivation period. The results revealed that the presence of a complete nutrient mixture significantly enhanced bacterial growth, increasing optical density more than six-fold compared to nutrient-deficient conditions. The growth curve demonstrated the characteristic lag, exponential, and stationary phases, while the dependence of growth rate on substrate concentration confirmed both the energy limitation at low substrate levels and inhibition under excessive concentrations. The findings substantiate the critical role of balanced macro- and microelements in sustaining high metabolic activity of sulfur- and iron-oxidizing bacteria and provide a scientific basis for optimizing nutrient media used in bioleaching, wastewater treatment, and bioremediation applications.

Keyword: sulfur- and iron-oxidizing bacteria; nutrients; metabolism; biohydrometallurgy; bioleaching; spectrophotometry; bacterial growth; Silverman–Lundgren medium (9K); Acidithiobacillus ferrooxidans.

Введение.

Автотрофные серо- и железоокисляющие бактерии, такие как Acidithiobacillus ferrooxidans и Acidithiobacillus thiooxidans, используют неорганические соединения серы и железа в качестве источников энергии. Их рост зависит от сбалансированного поступления углерода, азота, фосфора, микроэлементов и, конечно, энергетического субстрата (серосодержащих или железосодержащих соединений).

Одной из первых и наиболее широко используемых сред является среда 9K, разработанная Silverman и Lundgren [1] для *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Среда 9K содержит в качестве энергетического субстрата сульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), а также набор минеральных солей и буфер для поддержания

ISSN 3030-3907

кислой среды (pH 2.0). В дальнейшем эта среда стала эталоном для исследований СЖОБ.

Исследования показали, что СЖОБ могут использовать элементарную серу, тиосульфаты и сульфиды в качестве энергетических субстратов [2]. Для сероокисляющих бактерий часто используется среда Starkey, содержащая элементарную серу, а для железоокисляющих — среды на основе сульфата железа.

Углеродный источник у большинства СЖОБ — автотрофный (CO_2), однако исследования показывают, что некоторые штаммы могут использовать миксотрофный метаболизм при добавлении малых концентраций органических соединений [3].

Для поддержания активности ферментов и роста бактерий в питательных смесях вводятся микроэлементы (медь, кобальт, никель, марганец и др.). Их концентрация тщательно контролируется, так как избыток может быть токсичен.

Поддержание кислой среды (pH 1,5–3,0) критично для жизнедеятельности СЖОБ. Буферные системы на основе серной кислоты или фосфатов применяются для стабилизации pH [4-5].

В последние годы развивается направление по оптимизации и адаптации питательных сред для экстремофильных и техногенных штаммов. Например, добавление витаминов и аминокислот показало улучшение роста и активности [6].

Также исследуются среды с комбинированными источниками энергии (железо + сера) для повышения эффективности биовыщивания [7].

Таблица 1

Основные питательные вещества для серо- и железоокисляющих бактерий

Элемент	Функция	Источник
Углерод (C)	Источник органического синтеза (CO_2)	CO_2 (газ)
Азот (N)	Синтез аминокислот и нуклеотидов	$(NH_4)_2SO_4$, NO_3^-
Фосфор (P)	Энергетический обмен (АТФ), нуклеиновые кислоты	KH_2PO_4, NaH_2PO_4
Сера (S)	Энергетический субстрат и структурный элемент	S^0, $Na_2S_2O_3$, H_2S

ISSN 3030-3907

Калий (K)	Осмотическая регуляция, коферментная активность	KCl, K_2SO_4
Магний (Mg)	Кофактор ферментов, структурная стабильность	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
Кальций (Ca)	Поддержка клеточной стенки и ферментов	$CaCl_2$, $CaSO_4$
Железо (Fe)	Источник энергии и элемент ферментов	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
Микроэлементы (Cu, Zn, Co, Mn)	Активаторы ферментов, участие в окислении	Соли Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} и др.

Объект и методика исследования. Объектом исследования служили класс микроорганизмов Acidithiobacillus ferrooxidans, которые являются основной культурой технологии бактериального окисления сульфидных минералов.

Количественный показатель изучали на основании спектрофотометрического метода на приборе Shimadzu UV-1280.

Полученные результаты и их обсуждение. Для нормального роста и развития этих микроорганизмов необходимо создание оптимальных условий выращивания, которые включают в себя физические, химические и биологические факторы.

Для культивирования бактерий используется специальная среда, которые отличаются по составу химических соединений. Наиболее часто используемыми традиционными средами для выращивания бактерий является:

- **Сильвермана и Люндгрена** (9К, *для Acidithiobacillus ferrooxidans*):

Первый раствор: в 700 мл дистиллированной воды растворяют (NH4)2 SO4 - 3,0 г; КС1-0,1 г; K_2HPO_4- 0,5 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г; $Ca(NO_3)_2$- 0,01 г.

Второй раствор: в 300 мл дистиллированной воды растворяют $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 44,2 г, добавляют 1 мл 10 н серной кислоты. Вместо $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ можно брать соль Мора $[FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O]$. В этом случае $(NH)_2SO_4$ к раствору не добавляются, а 2-й раствор готовится следующим образом: в 300 мл дистиллированной воды растворяют 63 г $[FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O]$ и добавляют 1мл 10 н серной кислоты. Такое количество соли Мора соответствует 9 г/л железа и 21,4 г/л $(NH_2)_2SC$. Растворы стерилизуют

ISSN 3030-3907

отдельно: 1-й раствор при 1,0 атм и 2-й при 0,5 атм. Перед употреблением оба раствора смешивают. Эта среда является наиболее благоприятной для роста A. ferrooxidans и поэтому используется чаще других.

Исходя из этого нами изучена кинетика роста микроорганизмов в условиях традиционной среды. С этой целью стерильную среду предварительно разливали в пробирки (колбы) и стерилизовали. В пробирки (колбы) наливали одинаковый объем среды. Посев проводили из каждого разведения или из 4-5 последних, причем каждое разведение высевали в 3-5 повторностях (параллельных пробирках). Количество посевного материала везде одинаково и, как правило, составляло 1 мл. Засеянные пробирки помещали в термостат. Время инкубации колеблется от 2 до 15 суток и зависит от скорости роста микроорганизмов, численность которых определяли в зависимости оптической плотности.

На рис.1 показана типичная зависимость интенсивности роста от концентрации субстрата. При недостатке субстрата бактерии испытывают дефицит энергии, однако при избытке может происходить ингибирование роста из-за токсичности.

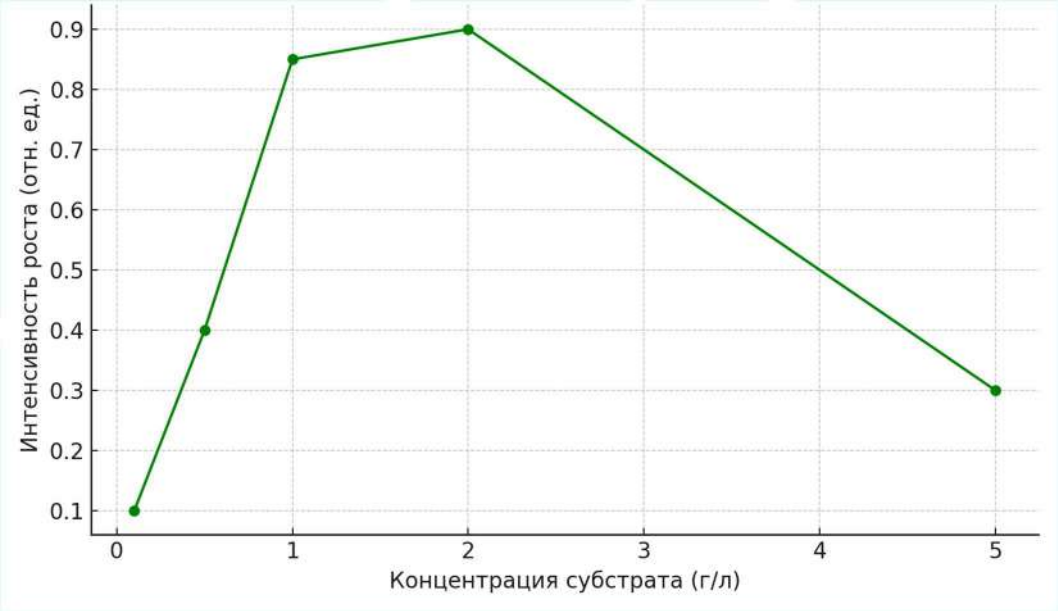


Рис. 1. Зависимость роста бактерий от концентрации субстрата

Таблица 2

Динамика роста бактерий с питательной смесью и без неё

Время (ч)	Оптическая плотность (OD600), с питательной смесью	Оптическая плотность (OD600), без питательной смеси
0	0,05	0,05
12	0,12	0,07
24	0,25	0,10
36	0,45	0,14

ISSN 3030-3907

48	0,70	0,17
60	0,95	0,20
72	1,15	0,21
84	1,20	0,22
96	1,25	0,22

В табл. 2. показан оптическая плотность (OD600) условный показатель концентрации клеток в растворе. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометрического метода на имеющейся лабораторном приборе Shimadzu UV-1280. Динамику роста изучали в течении 96 часовом росте культур.

Полученные данные показывают динамику роста серо- и железоокисляющих бактерий в течение 96 часов при наличии и отсутствии питательной смеси. Из таблицы видно, что в начале эксперимента (0 ч) оптическая плотность культур одинакова - 0,05, что указывает на одинаковую начальную концентрацию клеток. Уже через 12 часов в среде с питательной смесью рост ускоряется (OD600 = 0,12), тогда как без питательных веществ он минимален (OD600 = 0,07). Начиная с 24-60 часов, наблюдается активная фаза роста: показатель OD600 в питательной среде увеличивается почти экспоненциально (до 0,95 к 60 часу), что указывает на высокую метаболическую активность и эффективное использование субстрата. Без питательной смеси рост остаётся слабым (всего 0,20 к 60 часу). К 72-96 часам темпы роста постепенно стабилизируются, что свидетельствует о переходе бактерий в стационарную фазу: OD600 достигает 1,25 в питательной среде и 0,22 -без питательной смеси. Таким образом, результаты ясно демонстрируют, что наличие питательных компонентов значительно стимулирует рост бактерий, обеспечивая более интенсивное размножение и устойчивое развитие популяции.

Заключение. Проведённые исследования показали, что рост серо- и железоокисляющих бактерий напрямую зависит от состава питательной среды. Использование среды Сильвермана–Люндгрена (9К) подтвердило её эффективность для Acidithiobacillus ferrooxidans. Полученные результаты могут быть использованы при оптимизации процессов биовыщелачивания, очистки сточных вод и биоремедиации техногенно загрязнённых объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Silverman, M. P., & Lundgren, D. G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans. Journal of Bacteriology, 77(5), 642–647.

2. Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of Thiobacillus to new genera Acidithiobacillus, Halothiobacillus and

ISSN 3030-3907

Thermithiobacillus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(2), 511-516.
3. Rawlings, D. E., Dew, D., & du Plessis, C. (1999). Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. Trends in Biotechnology, 17(8), 289-295.
4. Dopson, M., & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. Environmental Microbiology, 14(10), 2620–2631.
5. Поведение свободных аминокислот в сернокислотной среде при бактериальном окислении сульфидов- Цветные металлы.- 2022.- №5.-С. 9-14.
6. Sánchez-Andrea, I., et al. (2014). Growth stimulation of acidophilic sulfur-oxidizing bacteria by vitamin B12. FEMS Microbiology Ecology, 90(2), 357-369.
7. Rawlings, D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. Annual Review of Microbiology, 56, 65-91.

ISSN 3030-3907