

**Мусихин Вячеслав Олегович**

Выпускник Челябинского государственного университета по специальности «Биология». С 2015 г. работает в НИГТЦ ДВО РАН младшим научным сотрудником, там же проходит обучение в аспирантуре (специальность «Геоэкология») под руководством д.г.-м.н. Ю.П. Трухина. Занимается изучением воздействия УЗИ на процессы бактериально-химического выщелачивания аборигенными хемолитотрофными кислотофильными микроорганизмами Камчатской никеленой провинции. В рецензируемых журналах опубликовано 8 статей по теме исследования. Принимал участие в работе XVIII Международной научно-практической конференции «Приоритеты мировой науки: эксперимент и научная дискуссия» (2018 г.).



**Киореску Александр Вадимович**

Выпускник Челябинского государственного университета. В 2015 г. защитил диплом о высшем образовании по специальности «Биология» и был зачислен в аспирантуру в Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, где под руководством д.г.-м.н. Ю.П. Трухина проводит исследования по интенсификации процессов бактериально-химического выщелачивания сульфидных руд с применением микроволнового излучения. Имеет 9 опубликованных работ.

В.О. МУСИХИН, А.В. КИОРЕСКУ

## Сочетанное воздействие СВЧ-излучения и ультразвука на смешанную культуру хемолитотрофных аборигенных микроорганизмов Камчатской никеленосной провинции

*Представлены результаты эксперимента по изучению комбинированного воздействия микроволнового и ультразвукового излучения на жизнедеятельность ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Получены данные о независимом и взаимном влиянии излучений. Сочетанное использование двух типов волновых излучений в зависимости от режима облучения может вызывать более выраженные биологические отклики в сравнении с изолированным воздействием СВЧ и УЗИ. Более выраженными могут быть как положительные, так и отрицательные биологические эффекты.*

*Ключевые слова:* СВЧ, микроволны, УЗИ, ультразвук, биовыщелачивание, бактерии, ацидофилы, хемолитотрофы, биотехнология.

**Influence of a combined impact of microwave emission and ultrasound on a mixed culture of chemolithotrophic indigenous microorganisms of the Kamchatka nickel-bearing province.** V.O. MUSIKHIN, A.V. KIORESKU (Scientific Research Geotechnological Center, FEB RAS, Petropavlovsk-Kamchatsky).

*The paper presents results of the combined effects of microwave and ultrasound emission on the vital functions of acidophilic chemolithotrophic microorganisms. The results on the independent and mutual influence of emissions were obtained. The combined use of two types of waves, depending on the irradiation regime, can cause more pronounced biological effects, in comparison with the isolated effect of microwave and ultrasound. Both positive and negative biological effects can be more pronounced.*

*Key words:* microwave frequencies, microwaves, ultrasonic radiation, ultrasound, bioleaching, bacteria, acidophiles, chemolithotrophs, biotechnology.

Рост спроса на металлы на фоне истощения мировых запасов высококачественного минерального сырья и ужесточение природоохранных мер вынуждают находить новые источники ресурсов и технологии переработки в горнодобывающей промышленности [4].

Одно из главных направлений научно-технического прогресса в области переработки минерального сырья – применение технологии биовыщелачивания металлов из низкосортных труднообогатимых руд и отвальных «хвостов» обогащения. Бактериально-химическое выщелачивание (БХВ) характеризуется высокой экологической безопасностью, низкими капитальными затратами и технической простотой используемой аппаратуры [17].

Скорость и эффективность процессов биовыщелачивания зависит от температуры, рН, ОВП, вида выщелачиваемого сырья. Среди прочих важным фактором является окислительная активность микроорганизмов – ключевого компонента БХВ [3, 9, 12, 14, 18, 19].

Основной недостаток БХВ в сравнении с классическими методами получения металлов – относительная низкая скорость процессов. Микроорганизмы не способны создавать такие же агрессивные условия среды, какие используются в пиро- и гидрометаллургии, что негативно сказывается на продолжительности переработки минерального сырья [2].

---

\*МУСИХИН Вячеслав Олегович – аспирант, младший научный сотрудник, КИОРЕСКУ Александр Вадимович – аспирант, младший научный сотрудник (Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский). \*E-mail: bioleaching@yandex.ru

По этой причине в биотехнологии получения металлов актуальны вопросы о механизмах и особенностях влияния внешних физических факторов на состояние микроорганизмов и протекающие физико-химические процессы для возможного применения таких воздействий в решении прикладных задач биотехнологии и внедрения новых методик производства. В числе физических агентов, вызывающих биологический отклик, – ионизирующее, микроволновое, инфракрасное излучения, УФ, ультразвук [13].

Механизм бактериального окисления большинства минералов преимущественно косвенный. Способность к быстрому окислению  $Fe^{2+}$  определяет интенсивность генерации  $Fe^{3+}$  – главного окисляющего агента в непрямом механизме выщелачивания ценных компонентов и деструкции сульфидных минералов. Ионы металлов, в свою очередь, могут подавлять метаболическую активность и жизнедеятельность микроорганизмов. Несмотря на то что ионы закисного железа являются источником энергии для микроорганизмов, это – ингибирующие микробную жизнедеятельность агенты, влияющие на интенсивность окислительных процессов [16].

Цель исследования – изучение сочетанного воздействия микроволнового излучения и ультразвука на скорость роста железо- и сероокисляющих микроорганизмов и скорость генерации  $Fe^{3+}$ .

Долгое время считали, что биологический эффект СВЧ-излучения проявляется вследствие локального нагрева за счет выделения тепла от трения молекул. Однако в последние годы было показано, что биологический отклик проявляется и при сверхмалых интенсивностях электромагнитного излучения, когда средний по объему нагрев тканей не является определяющим или пренебрежимо мал. Такие эффекты получили название нетепловых, или «специфических» [1].

Известно, что под действием микроволнового излучения низкой интенсивности происходят изменения в структуре ДНК, биологической мембраны и белков [10]. Изменения на молекулярном уровне способствуют проявлению нетепловых эффектов на более высоких уровнях организации живой материи.

Механизм, обуславливающий эффекты УЗИ на процессы биовыщелачивания, до сих пор полностью не изучен. Возникновение биологических эффектов, связанных с воздействием ультразвука, имеет несколько причин (тепловые, химические, механические, кавитационные), которые не в полной мере характеризуют это явление.

Эффекты ультразвукового воздействия на БХВ описываются следующими положениями:

- дисперсия микробных клеточных агрегатов (приводит к появлению в растворе большего количества единичных микроорганизмов);
- активация пролиферации микроорганизмов;
- дегазация, обусловленная УЗИ (удаляет избыток кислорода и диоксида углерода, обеспечивая благоприятную среду для роста микроорганизмов);
- равномерное распределение газов (необходимо для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов);
- увеличение скорости усвоения питательных веществ клеткой за счет равномерного распределения питательных веществ по всему объему пульпы;
- выделение тепловой энергии при кавитационных процессах. Дополнительный источник тепла увеличивает темпы роста некоторых микроорганизмов [5–8, 11, 15, 20].

## **Материалы и методы исследования**

### ***Бактериальная культура***

В эксперименте использована культура хемолитотрофных ацидофильных микроорганизмов, выделенных из образца сульфидной кобальт-медно-никелевой руды

месторождения Шануч (Камчатка). По данным ПЦР-диагностики, в состав данного сообщества входили *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *Sulfobacillus* sp. [8].

### ***Наработка биомассы***

Накопление культуры микроорганизмов произведено в биореакторе, содержащем 1800 мл среды Сильвермана и Лундгрена и 200 г сульфидной медно-никелевой руды. Культивация микроорганизмов проходила при температуре 30 °С, дополнительной аэрации воздухом (2 л/мин) и перемешивании со скоростью 90 об/мин. При достижении численности клеток порядка  $10^7$  в 1 мл необходимое количество биомассы было изъято из биореактора, сконцентрировано до численности порядка  $10^9$  мл<sup>-1</sup> и перенесено в пробирки типа Эппендорф. Объем клеточной суспензии в каждой из пробирок составлял 1 мл.

### ***Процесс облучения СВЧ***

Облучение проводилось в СВЧ-печи. Частота облучения составляла 2,45 ГГц, мощность 900 Вт. Для минимизации теплового эффекта пробирки находились в специальном боксе со льдом. Время облучения – 5 с и 10 с.

### ***Процесс облучения УЗИ***

Перед началом процесса содержимое каждой из пробирок перенесли в 100 мл питательной среды Сильвермана и Лундгрена. Ультразвуковое воздействие на минеральную среду, содержащую микроорганизмы, было произведено в ультразвуковой ванне «Сапфир» ТТЦ 28 с термостатом с внутренним размером камеры 50 × 30 × 20 см, ультразвуковым генератором с частотой 40 кГц, мощностью 240 Вт.

### ***Культивирование***

Непосредственно эксперимент проведен в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл питательной среды 9К с добавлением Fe(II). Концентрация двухвалентного железа составляла 10 г/л.

Каждые сутки на протяжении всего эксперимента определяли общее количество микроорганизмов методом прямого подсчета под микроскопом (МИКРОМЕД 3) и степень окисления двухвалентного железа методом визуального колориметрического титрования. Также производили измерение параметра pH и окислительно-восстановительного потенциала среды.

### **Результаты и их обсуждение**

Бактериальное окисление большинства минералов проходит преимущественно по косвенному механизму. Фактическими коррозионными агентами являются ионы окисного железа [16].

Переход ионов металла из одного состояния в другое обеспечивает метаболизм ацидофильных микроорганизмов. Поскольку главным недостатком биовыщелачивания является медленность протекающих процессов, за основные критерии оценки были приняты увеличение численности микроорганизмов и скорость окисления двухвалентного железа.

На графике (рис. 1) представлены результаты измерений концентрации трехвалентного железа в контроле и двух экспериментальных образцах с максимальной и минимальной скоростями окисления железа (V20, X20). В экспериментальной группе V20 (СВЧ 5 с + УЗИ 20 мин) процессы окисления соединений двухвалентного железа

Рис. 1. Изменение концентрации трехвалентного железа в растворе. К – контроль; V20: СВЧ 5 с + УЗИ 20 мин; X20: СВЧ 10 с + УЗИ 40 мин

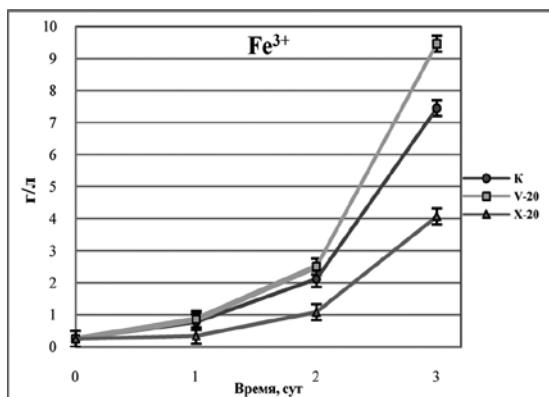


Рис. 2. Количество окисленного Fe(II) в различных экспериментальных группах. К – контроль; 20: УЗИ 20 мин; 40: УЗИ 40 мин; V: СВЧ 5 с; V20: СВЧ 5 с + УЗИ 20 мин; V40: СВЧ 5 с + + УЗИ 40 мин; X: СВЧ 10 с; X20: СВЧ 10 с + + УЗИ 20 мин; X40: СВЧ 5 с + УЗИ 40 мин

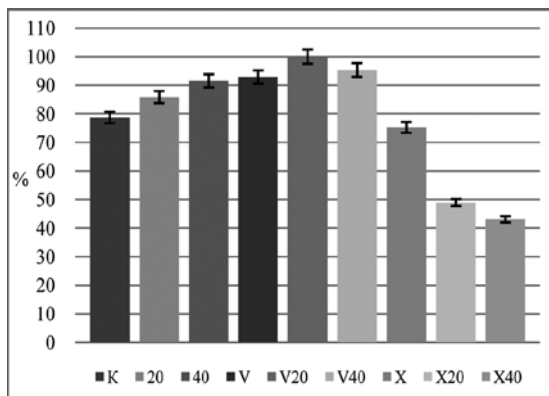


Рис. 3. Изменение количества микроорганизмов в 1 мл раствора. К – контроль; V20 : СВЧ 5 с + УЗИ 20 мин; X40: СВЧ 10 с + УЗИ 40 мин

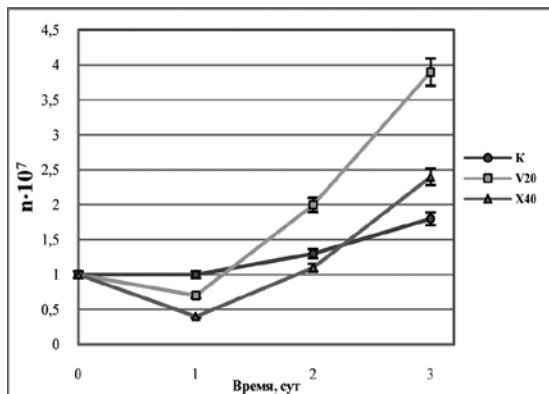
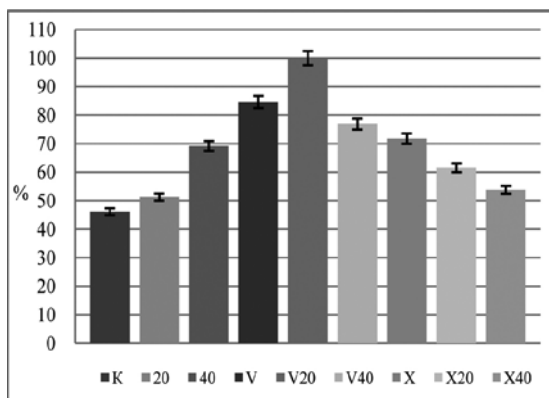


Рис. 4. Степень накопления биомассы в различных экспериментальных группах. К – контроль; 20: УЗИ 20 мин; 40: УЗИ 40 мин; V: СВЧ 5 с; V20: СВЧ 5 с + УЗИ 20 мин; V40: СВЧ 5 с + + УЗИ 40 мин; X: СВЧ 10 с; X20: СВЧ 10 с + + УЗИ 20 мин; X40: СВЧ 5 с + УЗИ 40 мин



протекали наиболее эффективно. К концу эксперимента в этой группе концентрация  $Fe^{3+}$  была на 21 % выше, чем в контрольном образце. Обратный эффект наблюдался в экспериментальной группе X40 (СВЧ 10 с + УЗИ 40 мин), где концентрация трехвалентного железа была на 36 % ниже по сравнению с контролем. На рис. 2 представлена диаграмма с процентным соотношением количества окисленного  $Fe(II)$  во всех исследуемых группах.

Наиболее высокая скорость размножения микроорганизмов (рис. 3, 4) наблюдалась в экспериментальной группе V20, где максимальное значение количества клеток в 1 мл раствора было равно  $3,9 \cdot 10^7$  и более чем в два раза превосходило значение в контрольной группе ( $1,8 \cdot 10^7$  кл./мл). В образце X40, несмотря на изначальное угнетение деления клеток микроорганизмов и снижение их концентрации в растворе, к концу эксперимента их численность превосходила таковую в контроле, составив  $2,1 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>.

## Выводы

1. Увеличение скорости окисления железа хемолитотрофными микроорганизмами обнаружено после ультразвукового облучения в течение 20 мин и 40 мин. Пятисекундное воздействие СВЧ-излучением также приводит к увеличению их окислительной активности. Сочетание 5-секундного облучения СВЧ с УЗ (20, 40 мин) приводит к суммации положительных эффектов. Так, к концу эксперимента в группах V20 (СВЧ 5 с + УЗИ 20 мин) и V40 (СВЧ 5 с + УЗИ 40 мин) концентрация  $Fe^{3+}$  была на 21 % и 16 % выше, чем в контрольном образце соответственно.

2. Воздействие микроволнового излучения продолжительностью 10 с способствовало снижению окислительной активности микроорганизмов. Концентрация окисленного железа в этих образцах была на 4 % ниже, чем в контроле. Более выраженный негативный эффект наблюдался после комбинации 10-секундного воздействия СВЧ-волнами с последующей ультразвуковой обработкой. В экспериментальных группах X20 (СВЧ 10 с + УЗИ 20 мин) и X40 (СВЧ 10 с + УЗИ 40 мин) концентрация  $Fe^{3+}$  была ниже, чем в контроле, на 20 % и 26 % соответственно. По всей видимости, 10-секундное воздействие СВЧ-волн вызывает повреждение клеток свыше их репаративных возможностей, вследствие чего бактерии становятся более чувствительными к воздействию УЗ.

3. Воздействие излучений при всех исследуемых параметрах способствовало увеличению числа планктонных форм микроорганизмов по сравнению с контрольной группой. Данный эффект можно связать с изменением механизмов адгезии микроорганизмов после воздействия ультразвукового излучения и СВЧ.

Результаты исследований позволяют оценить перспективы применения новых методов биотехнологии в промышленной практике переработки рудного сырья с улучшением качественных показателей. Эффекты сочетанного воздействия СВЧ-излучения и ультразвука представляют большой интерес для дальнейшего изучения. Необходимо детально выявить механизмы и особенности волновой интенсификации, ее воздействие на жизнедеятельность изучаемых микроорганизмов и структурные составляющие горных пород и полиметаллических руд.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бецкий О.В., Лебедева Н.Н. Миллиметровые волны и живые системы // Наука в России. 2005. № 6. С. 13–19.
2. Заварзин Г.А. Литотрофные микроорганизмы. М.: Наука, 1972. 322 с.
3. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 1972. 218 с.
4. Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О. Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестн. КРАУНЦ. Науки о Земле. 2008. Вып. 12, № 2. С. 76–86.

5. Мусихин В.О. Методы интенсификации процессов бактериально-химического выщелачивания воздействием ультразвукового излучения // Горный информ.-аналит. бюл. 2015. № 63. С. 351–356.
6. Мусихин В.О. Механизм воздействия ультразвукового излучения на процессы бактериально-химического выщелачивания // Горный информ.-аналит. бюл. 2015. № S63. С. 356–359.
7. Мусихин В.О. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы в процессе бактериально-химического выщелачивания // Горный информ.-аналит. бюл. 2017. № S32. С. 264–271.
8. Рогатых С.В. и др. Оценка качественного и количественного состава сообществ культивируемых ацидофильных микроорганизмов методами ПЦР-РВ и анализа библиотеки клонов // Микробиология. 2013. Т. 82, № 2. С. 212–212.
9. Akcil A., Ciftci H., Deveci H. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcocopyrite concentrate // Miner. Eng. 2007. Vol. 20. P. 310–318.
10. Apollonio F. et al. Feasibility for microwaves energy to affect biological systems via nonthermal mechanisms: a systematic approach // IEEE Transactions on microwave theory and techniques. 2013. Vol. 61, N 5. P. 2031–2045.
11. Bar R. Ultrasound-enhanced bioprocesses: cholesterol oxidation by *Rhodococcus erythropolis* // Biotechnol. Bioeng. 1988. Vol. 32. P. 655–663.
12. Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms // FEMS Microbiol. Rev. 1997. Vol. 20. P. 591–604.
13. Bryan C., Joulain C., Spolaore P., El Achbouni H., Challan-Belval S., Morin D., d'Hugues P. The efficiency of indigenous and designed consortia in bioleaching stirred tank reactors // Miner. Eng. 2011. Vol. 24. P. 1149–1156.
14. Cameron R.A., Yeung C.W., Greer C.W., Gould W.D., Mortazavi S., Bédard P.L., Morin L., Lortie L., Dinardo O., Kennedy K.J. The bacterial community structure during bioleaching of a low-grade nickel sulphide ore in stirred-tank reactors at different combinations of temperature and pH // Hydrometallurgy. 2010. Vol. 104. P. 207–215.
15. Chisti Y. Mass transfer // M.C. Flickinger, S.W. Drew (eds). Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. Vol. 3. John Wiley, 1999. P. 1607–1640.
16. Gehrke T., Hallmann R., Kinzler K., Sand W. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* – a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology // Water Science and Technology. 2001. Vol. 43 (6). P. 159–167.
17. Han C.J. Physiological studies of extremely thermoacidophilic microorganisms under normal and stressed conditions: Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy. North Carolina State University, 1998. 220 p.
18. Norris P.R., Burton N.P., Foulis N.A.M. Acidophiles in bioreactor mineral processing // Extremophiles. 2000. Vol. 4. P. 71–76.
19. Rawlings D.E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates // Microbial Cell Factories. 2005. Vol. 4, N 13. P. 1–15. DOI: 10.1186/1475-2859-4-13.
20. Swamy K.M., Narayana, K.L., Vibhuti N. Misra. Bioleaching with ultrasound // Ultrason. Sonochem. 2005. N 12. P. 301–306.