

Г.Г. АБДУЛЛИНА

## РОЛЬ БАКТЕРИЙ В ТРАНСФОРМАЦИЯХ МЫШЬЯКА ПРИ СКЛАДИРОВАНИИ МЫШЬЯКСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ

*(Институт микробиологии и вирусологии МОН РК)*

Проведены модельные испытания с бактериями, потенциально способными к трансформации мышьяка из мышьяксодержащих отходов. Показано, что только арсенатовосстанавливающие бактерии могут влиять на состав арсенат-кальциевого кека.

Существующая сегодня практика захоронения мышьяксодержащих отходов в специальных могильниках не предотвращает возможности попадания в них почв, воздуха и т.п., что может инициировать или ингибировать протекание реакций превращения одних соединений мышьяка в другие. Длительное хранение мышьяксодержащих отходов в могильниках может привести к их превращению под воздействием внешних условий и микроорганизмов, способных окислять и/или восстанавливать мышьяк. Это вызовет изменение растворимости мышьяковистых соединений и будет влиять на возможность переноса мышьяка в окружающую среду.

Исследования лаборатории мышьяка и сурьмы Агентства по охране окружающей среды США показали, что арсенатные кеки не могут быть стабильными при длительном хранении, поскольку диоксид углерода на воздухе превращает арсенат и арсенит кальция в карбонат кальция, а высвобождающийся при этом растворимый мышьяк попадает в окружающую среду [1-3]. На трансформацию мышьяка оказывают влияние естественные условия захоронения кеков, климатические факторы, присутствие микроорганизмов и т.д.

Наиболее значимыми среди тионовых бактерий, способных влиять на растворимость серусодержащих мышьяковых отходов являются *Thiobacillus thioparus*, *T. thiooxidans* и *T. ferrooxidans*.

Важную роль в процессе образования растворимых форм мышьяка играют и мышьякоокисляющие бактерии, которые, окисляя трехвалентный мышьяк до пятивалентного, могут образовывать гидросульфиды мышьяка и этим повышают растворимость труднорастворимых полисульфидов мышьяка. В то же время, мышьяковосстанавли-

вающие анаэробные бактерии способны восстанавливать пятивалентный мышьяк до трехвалентного с образованием практически нерастворимого сульфида мышьяка, используя пятивалентный мышьяк в качестве конечного акцептора электронов в дыхательной цепи. В присутствии в среде сульфат-ионов, которые также могут восстанавливаться бактериями до сульфид-иона, образуется практически нерастворимый сульфид мышьяка  $As_2S_3$ , растворимость которого составляет  $0,000005 \text{ г/дм}^3$ .

Целью настоящей работы явилось проведение лабораторных модельных экспериментов с чистыми культурами бактерий, потенциально способными к переводу труднорастворимых соединений мышьяка в подвижную форму.

**Материалы и методы.** Модельные эксперименты проводили с арсенат-кальциевым кеком и возгоном после сульфидирующего обжига концентрата. Для этого сосуды, содержащие оптимальные для развития соответствующей группы бактерий среды, были инокулированы чистыми культурами бактерий. Через каждые 1,5 месяца проводили анализ на содержание в этих сосудах тионовых бактерий, арсенатовосстанавливающих и арсенитоокисляющих бактерий, изменение pH и содержание общего мышьяка в растворе.

Исследования проводили с нестерильными мышьяксодержащими продуктами. В сосуды с соответствующей средой вносили 1г арсенат-кальциевого кека или возгона после сульфидирующего обжига концентрата. В каждый сосуд добавляли по 400 мл соответствующей среды и чистые культуры бактерий. Эксперимент проводили в 2-х повторностях.

В экспериментах использовали чистые культуры тионовых бактерий *Thiobacillus thioparus*, *T. thiooxidans* и *T. ferrooxidans*, а также арсе-

натвосстанавливающих и арсенитооксиляющих бактерий, которые выращивали в оптимальных для каждой группы бактерий средах [4, 5].

Численность микроорганизмов определяли путем посева проб на элективные среды [4, 5].

Содержание мышьяка определяли в соответствии с ГОСТ [6].

Содержание различных форм мышьяка в мышьяксодержащих продуктах определяли рентгено-фазовым методом.

**Результаты исследований.** Анализ результатов, полученных в экспериментах с арсенат-кальциевым кеком, свидетельствует о том, что бактерии *T.thiooxidans* уже через 1,5 месяца и до конца эксперимента не обнаруживались. Численность *T.ferrooxidans* уменьшалась до 10кл/мл через 4,5 месяца и к 6 месяцу они также не обнаруживались. Бактерии *T.thioparus* при исходном содержании 10<sup>9</sup>кл/мл не обнаруживались уже через 1,5 месяца эксперимента.

Содержание As<sup>3+</sup> окисляющих бактерий постепенно уменьшалось, но даже через 6 месяцев она составляло 10<sup>3-4</sup>кл/мл.

Численность As<sup>5+</sup> восстанавливающих бактерий при исходном их содержании 10<sup>6</sup>кл/мл уменьшалась и к концу эксперимента составляла 10<sup>2-3</sup>кл/мл.

Через 1,5 месяца эксперимента практически во всех вариантах, включая контрольные варианты без внесения бактерий, наблюдалось повышение рН среды, что, по-видимому, связано с переходом в раствор гидроксильных групп, присутствующих в арсенат-кальциевом кеке. Поэтому через каждые 1,5 месяца после отбора проб рН сред во всех вариантах доводили до соответствующего каждой среде показателя.

Данные по содержанию растворимого мышьяка показали, что в варианте с *T.thiooxidans* наблюдается увеличение его количества от 20мг/л в начале эксперимента до 150мг/л через 4,5 месяца и небольшое снижение к 6-му месяцу (таблица 1). В контрольном варианте без бактерий также наблюдалось увеличение содержания мышьяка в течение эксперимента, но в этом случае количество растворимого мышьяка было в два раза меньше.

Содержание мышьяка в варианте с использованием *T.ferrooxidans* приблизительно одинаковое как в контроле, так и в опыте. Увеличение содержания мышьяка в течение эксперимента, по-видимому, связано с низким рН среды (2-2,5), в которой выращивалась культура, что способствовало растворению части арсенат-кальциевого кека.

Таблица 1. Содержание мышьяка в эксперименте с арсенат-кальциевым кеком (мг/л)

Исследуемые бактерии	Повторности	Исходное содержание	Через 1,5 месяца	Через 3 месяца	Через 4,5 месяца	Через 6 месяцев
<i>T. thiooxidans</i>	1	20	60	120	150	100
	2		20	120	150	75
	Контроль	20	20	60	80	70
	Контроль		20	60	70	100
<i>T. ferrooxidans</i>	1	48	180	30	70	50
	2		80	90	60	90
	Контроль	48	160	80	60	50
	Контроль	48	40	100	225	25
As <sup>3+</sup> окисляющие	1	14	30	30	60	20
	2	не опр.	8	30	60	20
	Контроль	14	20	10	50	50
	Контроль	14	8	10	5	50
<i>T. thioparus</i>	1	0,2	4	20	60	90
	2		2	15	30	10
	Контроль	0,2	160	20	5	10
	Контроль		80	16	30	10
As <sup>5+</sup> восстанавливающие	1	300	20	10	30	90
	2		2	10	40	50
	Контроль	300	0,2	10	20	100
	Контроль		0,2	10	15	50

В экспериментах с мышьякооксиляющими бактериями содержание мышьяка в растворе немного увеличивалось в течение эксперимента

и это отмечалось как в вариантах без бактерий, так и с бактериями.

В вариантах с *T.thioparus* содержание растворимого мышьяка увеличивается от 0,2мг/л

в начале эксперимента до 10-90мг/л через 6 месяцев. Аналогичная тенденция наблюдалась в вариантах без бактерий, хотя в этом случае содержание мышьяка было значительно ниже.

При выращивании  $As^{5+}$  восстанавливающих бактерий отмечалось уменьшение содержания растворимого мышьяка на протяжении всего эксперимента в варианте с бактериями и увеличение его содержания в контроле.

Таким образом, результаты, полученные в этом эксперименте показали, что тионовые бактерии *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus* и *Thiobacillus ferrooxidans*, несмотря на создание оптимальных условий для их роста, не способны расти в присутствии арсенат-кальциевого кека. Следовательно, эти бактерии не могут оказывать влияния на подвижность мышьяка в арсенат-кальциевом кеке. В то же время рост арсеникотоксилирующих и арсенатовосстанавливающих бактерий в таких условиях свидетельствует о том, что они могут оказывать влияние на процесс трансформации мышьяка в арсенат-кальциевом кеке.

Аналогичные исследования с возгоном после сульфидирующего обжига концентрата показали,

что на протяжении всего эксперимента численность исследуемых групп бактерий изменялась поразному. Так, бактерии *T.thiooxidans* не обнаруживались уже через 1,5 месяца эксперимента.

Анализ данных об изменении рН свидетельствовал о том, что при инкубации сосудов с *T.thiooxidans* не отмечалось изменения рН среды в сравнении с контрольными вариантами без бактерий, что также подтверждает отсутствие в среде жизнеспособных клеток. Визуально также не было отличий между опытными и контрольными вариантами. Следует отметить, что через 1,5 месяца содержание растворимого мышьяка увеличилось в варианте с культурой *T.thiooxidans* до 400-600 мг/л в опытных сосудах и 800 мг/л в контрольных сосудах без бактерий и затем постепенно снижалось. Содержание мышьяка в опытных вариантах всегда было в 2-3 раза меньше, чем в контрольных вариантах (таблица 2).

В экспериментах с *T. thioparus* содержание мышьяка увеличилось с 9-20мг/л в начале опыта до 1000мг/л через 1,5 месяца в варианте с бактериями и 1200мг/л в контрольном (таблица 2). Возможно, это связано с растворимостью полисульфидов возгона в слабощелочных условиях.

Таблица 2. Содержание растворимого мышьяка в опытных сосудах в процессе инкубации бактерий с возгоном после сульфидирующего обжига (мг/л)

Исследуемые культуры	Повторность	Продолжительность эксперимента, месяцы				
		исходная	1,5	3	4,5	6
<i>T. thiooxidans</i>	1	50	400	180	100	190
	2	2	600	180	100	208
Контроль	1	34	800	350	450	178
	2	22,6	800	250	500	204
<i>T. ferrooxidans</i>	1	15	800	210	100	178
	2	3,2	600	100	100	178
Контроль	1	5	200	100	50	184
	2	6,6	200	200	50	276
$As^{3+}$ окисляющие	1	10	200	300	50	298
	2	6	200	300	50	248
Контроль	1	2	1000	150	66	344
	2	8	900	150	70	344
<i>T. thioparus</i>	1	9	1000	1000	800	858
	2	20	1000	1000	1000	728
Контроль	1	5	1200	400	50	788
	2	20	1200	410	-	576
$As^{5+}$ -восстанавливающие	1	50	200	20	46	47
	2	40	200	20	126	38
Контроль	1	10	300	500	300	114
	2	10	300	400	-	-

Можно предположить, что гибель бактерий связана с токсичностью столь высоких концентраций мышьяка, перешедшего в растворимую форму, на бактерии *T. thioparus* и *T. thiooxidans*.

Количество бактерий *T. ferrooxidans* начинало уменьшаться с  $10^3$  клеток/мл в исходной пробе до  $0-10^2$  клеток/мл к третьему месяцу эксперимента и через 4,5 месяца эксперимента бактерии не обнаруживались.

Следует отметить, что в вариантах с культурой *T. ferrooxidans* через 4,5 месяца при визуальном рассмотрении возгон, который представлял собой легкую взвесь на поверхности среды, растворился и в сосудах были видны только осадки гидроксидов железа, образовавшихся при окислении железа культурой *T. ferrooxidans*. В контрольных вариантах без бактерий возгон практически не изменился и находился на поверхности среды. Повидимому, *T. ferrooxidans* в благоприятных для него условиях способен использовать серу из полисульфидов возгона, растворяя тем самым возгон. Это подтверждается результатами химического анализа, согласно которым через 1,5 месяца эксперимента содержание мышьяка в варианте с бактериями *T. ferrooxidans* составляло 600-800 мг/л, тогда как в контрольных вариантах эта цифра составляла 200 мг/л (таблица 2). Затем содержание растворимых форм мышьяка постепенно снижается как в опытном, так и в контрольных вариантах, что, повидимому, связано с образованием комплексов мышьяка с гидроксидами железа.

Уменьшение численности бактерий *T. ferrooxidans* по мере растворения возгона позволяет говорить о том, что переходящий в раствор мышьяк губительно влияет на жизнеспособность бактерий.

Арсенитоксилирующие бактерии хорошо росли в присутствии возгона и их численность увеличивалась с  $10^{3-4}$  кл/мл в исходной пробе до  $10^{7-8}$  кл/мл на протяжении всего эксперимента. В варианте с бактериями наблюдалось подкисление среды по сравнению с контрольным вариантом, что свидетельствовало о хорошем росте бактерий. Содержание растворимого мышьяка в опытном варианте через 1,5 месяца составляло 200 мг/л, тогда как в контрольном – 900-1000 мг/л (таблица 2). Трудно объяснить, за счет чего в опытном варианте через 1,5 месяца было обнаружено в 5 раз меньше мышьяка, чем в контрольном. Возможно, что продукты метаболизма арсенитоксилирующих бактерий оказывают влияние на растворимость мышьяка. К концу эксперимента содержание мышьяка в опытном и контрольном

вариантах было практически одинаковым. Повидимому, арсенитоксилирующие бактерии практически не влияют на растворимость возгона.

Следует отметить, что через 1,5 месяца эксперимента содержание растворимого мышьяка увеличилось максимально во всех вариантах, как с бактериями, так и без них по сравнению с исходным количеством в начале эксперимента, за исключением вариантов с арсенатовосстанавливающими бактериями.

Наибольший интерес представляют результаты, полученные в экспериментах с арсенатовосстанавливающими бактериями. Содержание арсенатовосстанавливающих бактерий находилось приблизительно на одном уровне в течение всего эксперимента и составляло  $10^{3-6}$  кл/мл. Если содержание растворимых форм мышьяка в начале опыта в варианте с бактериями составляло 40-50 мг/л и через 1,5 месяца увеличилось до 200 мг/л, то в контрольном варианте эта величина увеличилась от 10 до 300 мг/л (таблица 2). Через 3 месяца в варианте с бактериями содержание растворимого мышьяка уменьшилось до 20 мг/л, тогда как в контрольном варианте эта величина увеличилась до 400-500 мг/л (таблица 2). Визуально наблюдалось образование мелкодисперсного желто-оранжевого осадка, предположительно, сульфид мышьяка, который оседал на дно и стенки опытных сосудов. В опытных сосудах отмечалось увеличение pH среды, что также свидетельствовало о хорошем развитии бактерий и восстановлении ими арсената до арсенита.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что даже при создании благоприятных условий для роста бактерий *Thiobacillus thioparus* и *T. thiooxidans* переход в культуральную жидкость больших количеств растворимых форм мышьяка ингибирует рост вышеуказанных бактерий. В то же время, обнаружено, что, попадая в растворы с кислым или щелочным pH, часть мышьяка из возгона после сульфидирующего обжига может переходить в растворимую форму. Бактерии *T. ferrooxidans*, развивающиеся при очень низких pH (1,5-2), способны растворять возгон после сульфидирующего обжига путем использования серы из полисульфидов. Арсенитоксилирующие бактерии практически не влияли на растворимость мышьяка из возгона, а арсенатовосстанавливающие бактерии могли осаждать мышьяк, переходящий в раствор, переводя его в нерастворимый сульфид мышьяка.

Следующим этапом исследований явилось изучение влияния арсенитоксилирующих и арсенат-



восстанавливающих бактерий на изменение рентгено-фазового состава арсенат-кальцевого кека.

Результаты работы показали, что через 3 месяца эксперимента численность арсенитооксилюющих бактерий несколько снизилась от  $10^8$ - $10^9$  клеток/мл в исходной пробе до  $10^{6-7}$  клеток/мл. Численность арсенатовосстанавливающих бактерий не изменилась и составляла  $10^{3-4}$  клеток/мл. Отмечено, что в сосудах с арсенитооксилюющими бактериями через 3 месяца эксперимента pH увеличился от 7,48-7,51 до 8,82-9,02, по-видимому, за счет растворения гидроксида кальция, входящей в состав арсенат-кальцевого кека.

Содержание мышьяка в сосудах с арсенитооксилюющими бактериями увеличилось от 6,4-7,4 в вариантах с бактериями до 20-26,6 мг/л, в то время как в контрольных вариантах эта величина увеличилась от 8,0-9,4 до 38-44,4 мг/л через 3 месяца.

В вариантах с использованием арсенатовосстанавливающих бактерий содержание мышьяка снижалось от 11,6-17,0 мг/л до 3,0-11,6 мг/л через 3 месяца эксперимента, что свидетельствует о том, что арсенат-кальцевый кек не влияет на жизнеспособность арсенатовосстанавливающих бактерий, которые способны осажать растворимый мышьяк в нерастворимые соединения мышьяка.

Рентгено-фазовый анализ показал, что арсенитооксилюющие бактерии практически не изменяют состав кека по сравнению с исходным необработанным кеком.

Во всех вариантах, как в контрольных без бактерий, так и в вариантах с бактериями отмечается исчезновение мышьяковой кислоты  $H_3AsO_4 \cdot 3H_2O$ , что, по-видимому, связано с ее растворением.

Интересные результаты получены в вариантах с арсенатовосстанавливающими бактериями. Здесь только в опытном варианте с бактериями из кека исчезают все натриевые серосодержащие соли, а также мышьяковая кислота. По-видимому, когда мышьяковая кислота переходит в раствор, то пентавалентный мышьяк восстанавливается бактериями с последующим образованием мышьяк-кальцевых комплексов. В вариантах с использованием мышьяковосстанавливающих бактерий исчезают все натриевые серосодержащие соли ( $Na_2S_5O_{16}$ ,  $Na_2SO_4$ ), а также  $NaCaAsO_4$ , хотя они присутствуют в исходном необработанном кеке и в контролях без бактерий. Известно, что арсенатовосстанавливающие бактерии способны использовать серу из этих соединений в процессе метаболизма с последующим ее восстановлением.

Таким образом, модельные эксперименты с чистыми культурами бактерий показали, что даже при создании благоприятных условий для роста бактерий *Thiobacillus thioparus* и *T.thiooxidans*, переход в культуральную жидкость больших количеств растворимых форм мышьяка ингибирует рост вышеуказанных бактерий. В то же время обнаружено, что, попадая в растворы с кислым или щелочным pH, часть мышьяка из арсенат-кальцевого кека или возгона после сульфидирующего обжига может переходить в растворимую форму. Бактерии *T.ferrooxidans*, развивающиеся при очень низких pH (1,5-2), способны растворять возгон после сульфидирующего обжига путем использования серы из полисульфидов. Арсенитооксилюющие бактерии практически не влияют на растворимость мышьяка из арсенат-кальцевого кека и возгона, а арсенатовосстанавливающие бактерии могут осажать растворимый мышьяк, переводя его в нерастворимое соединение мышьяка.

Результаты рентгено-фазового анализа позволили установить, что только арсенатовосстанавливающие бактерии влияют на состав арсенат-кальцевого кека. Они способны восстанавливать мышьяк из мышьяковой кислоты, присутствующей в арсенат-кальцевом кеке, а также все водорастворимые соли мышьяка, содержащиеся в кеке с образованием нерастворимых мышьяковых комплексов с кальцием.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Копылов Н.И., Каминский Ю.Д. Проблема мышьяка при переработке минерального сырья // Химия в интересах устойчивого развития. 1997. № 5. С.221-258.
2. Robins R.G. Proc. Arsenic and Mercury Workshop on Removal, Recovery, Treatment and Disposal. EPA/600/R-92/105, 1992, P.4-8.
3. Рабинович В.А., Хавин З.Я. Краткий химический справочник. Л.: "Химия", 1977г. С.87.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. – М.: 1972. – 247с.
5. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – М.: 1984.
6. ГОСТ 415281 «Вода питьевая. Метод определения массовой концентрации мышьяка».

#### Резюме

Құрамында мышьяғі бар қоқыстардың мышьяқті өзгерту әлеуетті қаблеті бар бактериялармен қалыпта сынатқан өткізіді. Арсенатты кальций кегіне арсенатты қайта қалпына келтіру бактериялар ғана әсер ететіндігі көрсетілді.

#### Summary

Model tests with bacteria potentially able to transform arsenic from arsenic waste products were conducted. It has been shown that only arsenate reducing bacteria can influence on the composition of arsenate-calcium cake.