

Elżbieta Konopka, Ewa Kisielowska**

OCENA I WYKORZYSTANIE WARUNKÓW ŚRODOWISKOWYCH W PROCESIE WZBOGACANIA KOPALINY NA DRODZE (BIO)HYDROMETALURGICZNEJ**

1. Wprowadzenie

Procesy biogeochemiczne z udziałem składników złoża — w tym metali — zachodzą w przyrodzie w sposób naturalny i mają często znaczenie złożotwórcze [2, 6, 10, 22, 24] a także mogą stanowić o zanieczyszczeniu wód złożowych i śródlądowych [12, 14]. Ze względu na to, że procesy te są z natury rzeczy długotrwałe — nie mogą mieć w tej postaci znaczenia praktycznego jako podstawa procesu technologicznego. Stworzenie optymalnych warunków namnażania odpowiednich mikroorganizmów w warunkach środowiskowych określonego złoża może wpływać na zintensyfikowanie właściwych im procesów biochemicznych, a produkty ich metabolizmu mogą znacząco efektywniej uczestniczyć w ługowaniu chemicznym metali w sytuacji, gdy żadnej z klasycznych metod przerobczych nie można uznać za racjonalną. Zagadnienie to wpisuje się w problematykę zrównoważonego użytkowania surowców mineralnych i odpadów [7, 8, 11, 18, 21, 23] i jest podstawą rozwoju technologii przemysłowych [12, 16]. W badaniach nad tym zagadnieniem wykorzystuje się zarówno chemo-litoautotrofy [3, 5, 20, 23] jak i mikroorganizmy chemoorganoheterotroficzne [4, 11, 21, 25].

Przedmiotem badań nad możliwością wykorzystania potencjału naturalnych właściwości kopaliny w procesie jej wzbogacania ze względu na pozyskanie metali są dwa rodzaje materiału łupkowego: łupek dictyonemowy (łupek czarny) i łupek walchiowy. Na ich przykładzie omówiona zostanie metodologia i wyniki badań środowiskowo-technologicznych w skali laboratoryjnej w sytuacji, gdy w surowcach różniących się zdecydowanie zespołem cech geochemicznych podstawowej skały płonnej występują cenne gospodarczo metale o porównywalnej, śladowej koncentracji. Odzysk metali rozproszonych należy traktować nie tylko jako sposób ich pozyskiwania dla celów przemysłu metalurgicznego, ale również

* Wydział Górnictwa i Geoinżynierii, Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków

** Artykuł opracowano w ramach badań statutowych AGH nr 11.11.100.196

przydatny przy dezaktywacji stałych odpadów przemysłowych zanieczyszczających środowisko naturalne, zwłaszcza w przypadku ich długoterminowego składowania [13, 15, 19].

2. Charakterystyka biogeochemiczna łupków — wyniki badań

2.1. Założenia metodyczne

W celu wykorzystania naturalnych właściwości środowiskowych surowca polimetalicznego w procesie jego wzbogacania na drodze hydrometalurgicznej konieczne jest dokonanie jego charakterystyki biogeochemicznej, rozumianej jako opis stanu jakościowego i ilościowego: pod względem składu chemicznego i jego mikroflory, a w szczególności określenie mikroorganizmów dominujących w każdym ze środowisk geochemicznych. Przedmiotem badań szczegółowych są dwa uranonośne łupki: dictyonemowy łupek czarny i łupek walchiowy. W każdym przypadku przeprowadzono badania chemiczne ze względu na skład podstawowej substancji mineralnej, a także metalonośność: w zakresie ograniczonym do pięciu wytypowanych do badań szczegółowych metali (U, V, Mo, Zn i Pb). W serii badań nad dynamiką bakterii ocenie ługowania w tych warunkach poddany zostanie tylko uran [1]. W przypadku bogatych w uran surowców np. o zawartości 1950 ppm U z powodzeniem stosowane mogą być fizyczne metody wzbogacania: techniki grawitacyjne i separacji magnetycznej, dające około 80% uzysk składnika użytecznego [17].

Łupek czarny (materiał pochodził z zasobów archiwalnych zgromadzonych na etapie dokumentowania złoża przez PIG w Warszawie) został tak przygotowany, aby zawierał minimalną ilość frakcji najdrobniejszej < 0,06 mm, przy maksymalnej zawartości klas drobnych (< 0,06÷0,5) przeznaczonych do badań nad dynamiką bakterii (P.2) oraz klas grubszych (> 2÷0,5 mm) do badań systemowych (P.1). W obecnej serii badań z udziałem próbki P.2 jej skład ziarnowy przedstawiono w tabeli 1, a wyniki badań chemicznych — koncentracja uranu w próbce wynosiła 130 ppm — zamieszczono w tabeli 3.

TABELA 1

Wyniki analizy składu ziarnowego próbki łupku czarnego (P.2)

Klasa [mm]	0,5÷0,315	0,315÷0,125	0,125÷0,06	< 0,06	100
Udział [%]	25,3	30,0	32,1	12,6	

Na podstawie wyników badań chemicznych można stwierdzić, że badany łupek czarny charakteryzuje się przeważającym udziałem części glinokrzemianowej (ponad 60%) i organicznej (ok. 25%) z minimalnym udziałem części węglanowej; zawiera ponadto 3,2–3,5% pirytu, a skała ma charakter kwaśny.

W zakresie rozpatrywanych klas ziarnowych obie próbki nie różnią się w sposób znaczący, przynajmniej nie w stopniu mającym wpływ na zasadniczy cel badań.

Łupek walchiowy pobrany w trakcie badań terenowych został rozklasyfikowany na szerokie klasy ziarnowe: (P.1) > 10 mm, (P.2) 10÷1 mm, (P.3) < 1 mm. Materiał każdej klasy został uśredniony i pobrano z niego próbki analityczne do badań chemicznych.

Analiza wyników badań chemicznych wykazała, że klasy grubsze > 10 mm charakteryzują się podwyższoną alkaliznością skały płonnej — pH = 10,55 — spowodowaną wysokim udziałem CaO + MgO wynoszącym aż 34,0%. W klasach drobniejszych maleje zawartość składników o charakterze zasadowym, a alkalizność obniża się do pH = 7,78÷7,61. Stwierdza się występowanie niewielkich ilości pirytu — około 0,6%, którego rozproszenie w poszczególnych klasach jest dość równomierne. Do badań nad dynamiką bakterii (heterotroficznych) przeznaczony został materiał o uziarnieniu < 1 mm (próbka P.3) — charakteryzujący się najwyższą koncentracją uranu: 90 ppm. Jej skład ziarnowy przedstawiono w tabeli 2, a wyniki badań chemicznych ze względu na skład podstawowej substancji mineralnej i metaloność zamieszczono w tabeli 4.

TABELA 2

Wyniki analizy składu ziarnowego próbek łupku walchiowego (P.3)

Klasa [mm]	1÷0,16	0,16÷0,09	0,09÷0,06	0,06÷0,025	< 0,025	100
Udział [%]	35,3	15,9	11,2	13,3	24,3	

W celu doboru mikroorganizmów, które mogłyby uczestniczyć w procesie ługowania metali z różnych środowisk geochemicznych badanych łupków — przy minimalnej ingerencji w to środowisko — największe szanse mają te, które są dominującymi składnikami mikroflory autochtonicznej każdego z nich zakładając, że w opisanych wcześniej środowiskach geochemicznych znalazły one najlepsze warunki namnażania i rozwoju.

Charakterystyka mikrobiologiczna obu łupków została dokonana w oparciu o próbki reprezentatywne dla materiałów badawczych, i były to trzy próbki łupku czarnego oraz dwie (w tym jedna pobrana z nadkładu) próbki łupku walchiowego. Próbki analityczne poddano szczegółowej analizie mikrobiologicznej, obejmującej określone grupy i gatunki wyhodowane na odpowiednich podłożach wybiórczych o zadanym składzie chemicznym. Diagnostykę bakterii mezo- i psychrofilnych oraz grzybów przeprowadzono tylko dla łupku walchiowego zakładając, że uzyskane w tym przypadku wyniki będą realnie opisywały naturalne środowisko badanego łupku (analizowana była „świeża próbka”).

2.2. Metodyka badań i wyniki

Przedmiotem analizy mikrobiologicznej były sterylne zawiesiny analityczne: 10 g łupku w 100 cm³ 0,9% NaCl. Zawartość kolbek stożkowych wytrząsano około 10 minut w celu przejścia mikroorganizmów do roztworów analitycznych.

TABELA 3

Wyniki badań chemicznych próbek łupku czarnego

Próbka	Klasa [mm]	Straty prażenia	SiO ₂	Fe ₂ O ₃ (utl.)	FeS ₂	Al ₂ O ₃	CaO + MgO	pH	U	V	Mo	Zn	Pb
P.1	2,5÷0,5	28,00	48,76	1,66	3,52	13,21	1,66	3,78	140	1050	200	7160	700
P.2	< 0,5	27,58	50,01	1,81	3,22	13,05	1,32	3,80	130	1800	19	4978	481

TABELA 4

Wyniki badań chemicznych próbki łupku walcziowego

Próbka	Klasa [mm]	Straty prażenia	SiO ₂	Fe ₂ O ₃ (Fe _{calc.})	Al ₂ O ₃	CaO	MgO	K ₂ O + Na ₂ O	SO ₄	pH	U	V	Mo	Zn	Pb
P.3	< 1	11,15	45,26	8,40	17,05	7,26	2,60	5,93	0,90	7,61	90	143	2	2500	440

Zawiesiny wodne obu łupków miały odmienne wartości pH, które określają łupek czarny jako skałę kwaśną o pH = 3,76, natomiast łupek walchiowy jest skałą o charakterze zasadowym o pH = 10,55 (7,61).

Analizę mikrobiologiczną zawiesin pozwalającą na jakościowe i ilościowe scharakteryzowanie badanego materiału: łupku czarnego i łupku walchiowego wykonano metodą płytkową Kocha, z zastosowaniem odpowiednich podłoży wybiórczych dla różnych grup i gatunków mikroorganizmów. Liczbę występujących drobnoustrojów określano przeliczając bezpośrednio wyrosłe kolonie bakterii lub grzybów na płytkach lub poprzez ich miano tj. największe rozcieńczenie, w którym stwierdza się jeszcze ich obecność. Zakres badań mikrobiologicznych oraz skład chemiczny jakościowy wybiórczych podłoży został przedstawiony w tabeli 5.

TABELA 5
Zakres badań mikrobiologicznych i podłoża hodowlane

Mikroorganizmy	Rodzaj podłoża wybiórczego	Skład chemiczny jakościowy	pH ~
Bakterie psychrofilne	MPA	Bulion, agar	7,6
Bakterie mezofilne	MPA	Bulion, agar	7,6
Nitryfikatory	wg Winogradskiego	(NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, FeSO ₄ , MnSO ₄	7,0
Denitryfikatory	wg Winogradskiego	KNO ₃ , K ₂ HPO ₄ , CaCl ₂ , MgSO ₄ , FeSO ₄ , glukoza	7,0
<i>A.ferrooxidans</i>	wg Silvermana-Lundgrenna – 9K	1: (NH ₄) ₂ SO ₄ , KCl, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , Ca(NO ₃) ₂ 2: FeSO ₄ , H ₂ SO ₄	3,5
<i>A.thiooxidans</i>	wg Collinsa	(NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , FeSO ₄ , K ₂ HPO ₄ , CaCl ₂ , S pył	4,5
<i>T.denitrificans</i>	wg Collinsa	Na ₂ S ₂ O ₃ , KNO ₃ , NaHCO ₃ , K ₂ HPO ₄ , MgCl ₂ , CaCl ₂ , FeCl ₃	7,0
<i>T.thioparus</i>	wg Beijerinckia	Na ₂ S ₂ O ₃ , NH ₄ Cl, NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , MgCl ₂ , FeSO ₄	8,5
Bakterie żelazowe	wg Winogradskiego	NH ₄ NO ₃ , NaNO ₃ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂ , cytrynian żelazowo-amonowy	6,8
Grzyby	wg Czapek-Doxa	NaNO ₃ , KCl, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , Fe ₂ (SO ₄) ₃ , sacharoza, agar	6,5

Bakterie mezo- i psychrofilne łupku walchiowego zdiagnozowano w oparciu o badania mikroskopowe i odpowiednie testy biochemiczne (trzy szczepy bakterii) lub tylko makroskopowo (jeden szczep). Przy oznaczaniu przynależności systematycznej badanych szczepów bakterii korzystano z: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (wyd. II, tom 2, 2005).

Grzyby pleśniowe (z klasy *Micromycetes*) oznaczono w oparciu o klucz Fassiatovej „Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej”, WNT, Warszawa 1983.

Wyniki badań mikrobiologicznych trzech próbek łupku czarnego oraz wyniki badań dwóch próbek łupku walchiowego (* próbka z nadkładu) zestawiono w tabeli 6.

TABELA 6

Charakterystyka mikrobiologiczna środowisk geochemicznych łupków

Mikroorganizmy	Łupek czarny		Łupek walchiowy		
	Średnia liczba kom. bakt/cm ³	Miano	Średnia liczba kom. bakt/cm ³	Miano	Dominujące mikroorganizmy
Bakterie psychrofilne (20°C)	980 780 1 600	×	415 000 278 000*	×	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus mycoides</i>
Bakterie mezofilne (37°C)	23 000 14 400 5 500	×	155 000 54 000*	×	
Grzyby	maks. 50	×	1 500 160*	×	<i>Alternasic geophila</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Mucor hiemalis</i> <i>Rhizopus nigricans</i> <i>Verticilium sp.</i>
Nitryfikatory	×	0,01	×	0,00001	×
Denitryfikatory	×	0,01	×	0,00001	×
<i>A.ferrooxidans</i>	×	0,0001	×	0,0	×
<i>A.thiooxidans</i>	×	0,001	×	0,0	×
<i>T.denitrificans</i>	×	0,01	×	0,0	×
Bakterie żelazowe	×	0,1	×	0,0	×
<i>T.thioparus</i>	×	0,0	×	0,0	×

* Próbką z nadkładu.

3. Badania nad dynamiką wzrostu bakterii w środowiskach geochemicznych łupków

3.1. Założenia metodyczne

Badanie natury geochemicznej łupku czarnego wykazało, że jest on skałą o charakterze zdecydowanie kwaśnym, o podwyższonej zawartości pirytu. W tym środowisku domi-

nującymi mikroorganizmami są bakterie z gatunku *Acidithiobacillus ferrooxidans*, niemniej jednak licznie występujące bakterie z gatunku *Acidithiobacillus thiooxidans*. Łupek walchiowy reprezentuje zupełnie odmienny typ środowiska: jest skałą o charakterze zasadowym, w której dominują bakterie z gatunku *Bacillus*. Celowe jest więc sprawdzenie, jakie są możliwości wzrostu i działalności biochemicznej chemolitoautotroficznych bakterii tionowych w środowisku łupku czarnego oraz chemoorganoheterotroficznych bakterii w środowisku łupku walchiowego. Ocenie zostaną poddane możliwości wzrostu bakterii w przypadku podwyższonej koncentracji każdego z łupków oraz efektywność ługowania w tych warunkach geochemicznych uranu. Dla celów porównawczych badano również dynamikę wzrostu bakterii w środowisku nie zawierającym łupku (0 g).

Głównym celem tych badań jest dobór mikroorganizmów, których procesy życiowe realizowane w środowisku geochemicznym łupków, a zwłaszcza przy jego podwyższonej zawartości — sprzyjałyby najefektywniej ługowaniu śladowych ilości metali w nim obecnych, a także ustalenie najkorzystniejszych z tego punktu widzenia ilościowych parametrów metodycznych, w tym również zastosowanie odpowiedniego podłoża. Oprócz wysokiej aktywności w zakresie ługowania powinny one charakteryzować się też odpornością na podwyższone stężenia licznych metali. Takich właściwości należy spodziewać się przede wszystkim u dominujących mikroorganizmów autochtonicznych, wyizolowanych z naturalnego środowiska łupków lub zaadaptowanych do jego podwyższonej koncentracji.

3.2. Metodyka badań i wyniki

W badaniach nad dynamiką wzrostu bakterii tionowych stosowano zawiesinę bakteryjną *A.ferrooxidans*-1 wyizolowaną z podłoża pirykowego w środowisku pożywki 9 K, zagęszczoną po 14-dniowym okresie inkubacji w temperaturze 28°C. Uzyskana zawiesina zawierała $10^5 \div 10^6$ kom. bakt./cm³ (dodatkowo stosowano zawiesinę *A.ferrooxidans*-2 o wyższej jakości, uzyskaną w wyniku naturalnej selekcji mikroorganizmów aktywnych w obecności coraz wyższych zawartości łupku — w postaci zawiesiny o zawartości $10^6 \div 10^7$ kom. bakt./cm³).

Dynamikę wzrostu bakterii *A.ferrooxidans* badano w okresie 0–28 dni, przy czym efekt ilościowy postępu procesów biologicznych był sprawdzany w odstępach tygodniowych. W stałej objętości 100 cm³ roztworu ługującego: 10 cm³ zawiesiny bakteryjnej oraz 90 cm³ pożywki (9 K) — stosowano zmienną ilość: 5, 10 i 20 g ługowanego materiału: łupku czarnego (próbka P.2). Eksperymenty prowadzono w sterylnych 250 cm³ erlenmajerkach, w termostatowanej temperaturze 28°C. Doświadczenia zostały założone w tym samym czasie i kończone kolejno po 1, 2, 3 i 4 tygodniach. Wszystkie doświadczenia prowadzono w zasadzie w warunkach stacjonarnych, bez wymiany roztworu ługującego. Niektóre z doświadczeń (*) z udziałem bakterii *A.ferrooxidans* powtórzono z całkowitą cotygodniową wymianą roztworu ługującego wraz z doszczepianiem zawiesiną bakteryjną *A.ferrooxidans*-2.

Wyniki badań nad dynamiką wzrostu bakterii *A.ferrooxidans* w założonym czasie czterech tygodni obejmujące liczbę bakterii, wartość końcową pH oraz osiągnięty uzysk (ε) metali na przykładzie tylko uranu zostały zamieszczone w tabeli 7.

TABELA 7
Wyniki badań nad dynamiką wzrostu bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans w środowisku zawierającym łupek czarny**

Ilość łupku	0 g			5 g			10 g			20 g		
	liczba komórek bakt./cm ³	pH	liczba komórek bakt./cm ³	pH	uzysk (ε) U [%]	liczba komórek bakt./cm ³	pH	uzysk (ε) U [%]	liczba komórek bakt./cm ³	pH	uzysk (ε) U [%]	
1 tydzień	5,2 · 10 ⁶	1,80	1,8 · 10 ⁶	1,80	18,6	1,3 · 10 ⁶	1,98	7,3	8,3 · 10 ⁵	1,95	3,2	
2 tygodnie	5,2 · 10 ⁶	1,78	4,3 · 10 ⁶	1,33	18,6 29,0**	2,7 · 10 ⁶	1,33	11,2	2,3 · 10 ⁶	1,29	5,4	
3 tygodnie	6,7 · 10 ⁶	1,76	5,2 · 10 ⁶	1,27	18,8 37,2**	3,0 · 10 ⁶	1,29	16,2 34,6**	2,9 · 10 ⁶	1,26	11,2 29,7**	
4 tygodnie	5,3 · 10 ⁶	1,66	5,7 · 10 ⁶	1,30	25,1 39,0**	4,1 · 10 ⁶	1,25	23,8 37,2**	2,7 · 10 ⁶	1,20	11,5 29,9**	

* W chwili założenia doświadczeń w roztworze lęgającym znajdowało się 5,1 · 10⁵ komórek bakt./cm³.

** Powtórzenie doświadczeń przy całkowitej cotygodniowej wymianie roztworu oraz doszczepianiu.

Czyste kultury czterech gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*: *B.circulans*, *B.firmus*, *B.megaterium*, *B.mycoides* (zdiagnozowane wg tab. 6) przeszczepiono na podłoże płynne (15 g bulionu/dm³, pH = 7,6) w objętości 100 cm³, z dodatkiem różnych ilości łupku (próbka P.3): 5, 10 i 20 g wysterylizowanych poprzez naświetlanie lampą bakteriologiczną. Zaszczepiano 1 cm³ zawiesiny o zawartości około 10⁷ kom. bakt./cm³, którą uzyskano z czystych kultur bakterii poprzez odwirowanie.

Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny i po tym czasie przeprowadzano analizę ilościową próbek metodą płytkową Kocha.

Stwierdzono, że w środowisku badanego łupku najlepiej rozwijają się bakterie autochtoniczne z gatunków: *Bacillus circulans* i *Bacillus megaterium*, przy czym maksimum wzrostu zostaje osiągnięte po dwóch dobach inkubacji (~108 kom. bakt./cm³) i utrzymuje się do trzeciej doby (~10⁷ kom. bakt./cm³ roztworu ługującego) pod warunkiem, że stosunek fazy stałej do ciekłej nie będzie wyższy niż 5 g łupku/100 cm³ roztworu. Dwukrotne zwiększenie stężenia łupku w roztworze ługującym wpływa już mniej korzystnie na stan życia biologicznego, jednak utrzymuje się ono na wysokim poziomie (10⁷+10⁶). Roztwory po dwóch dobach inkubacji pełniły rolę zawiesin bakteryjnych w dalszych badaniach nad dynamiką wzrostu w środowisku geochemicznym łupku walchiowego.

W kolbkach stożkowych erlenmajera umieszczano 5, 10 i 20 g próbki łupku (P.3) wyjałowione przy użyciu lampy bakteriologicznej i zadawano 90 cm³ roztworu pożywki bulionowej (badano również podłoże z glukożą), oraz wprowadzano 10 cm³ odpowiedniej zawiesiny bakteryjnej: *B.circulans* (lub *B.megaterium*) uzyskanej we wcześniejszej fazie badań, o zawartości 10⁷ kom. bakt./cm³. Doświadczenia prowadzono w warunkach stacjonarnych, w termostatowanej temperaturze 37°C (28°C), w pięciu cyklach czterotygodniowych, z częściową wymianą roztworu ługującego w ramach cyklu: dwa razy w tygodniu odbierając każdorazowo 10 cm³ roztworu ługującego i zastępując ubytek objętości taką samą ilością świeżego roztworu pożywki (bulionu lub glukozy).

Badania dla każdego z okresów badawczych były realizowane jako niezależne od siebie doświadczenia, rozpoczęte w tym samym czasie i zakończone odpowiednio po jednym, dwu lub pięciu miesiącach. Uzysk uranu sprawdzano w pierwszym i drugim miesiącu ługowania, a następnie dopiero po pięciu miesiącach ługowania — jako efekt całkowity. Taką opcję przyjęto ze względu na niskie uzyski uranu.

Wyniki badań nad dynamiką wzrostu bakterii obejmujące liczbę bakterii, wartość końcową pH oraz wyniki efektywności ługowania uranu przy współdziałaniu bakterii *B.circulans* (*B. megaterium* miał jeszcze niższe uzyski) w środowisku geochemicznym łupku walchiowego, wzbogaconym pożywką bulionową przedstawiono w tabeli 8.

Zagęszczanie zawiesin bakteryjnych odbywało się w wirówce przy 25 tys. obr./min. i $r = 208$ mm, w czasie 15 minut. Liczbę bakterii — co było głównym zadaniem tej serii doświadczeń — określano metodą bezpośredniego liczenia na powierzchni preparatu sporządzonego do objętości 0,02 cm³ każdego z analizowanych roztworów z dodatkiem 0,03% agaru, utrwalonego alkoholem absolutnym i barwionego erytrozyną, a następnie fuksyną.

TABELA 8
Wyniki badań nad dynamiką wzrostu bakterii *Bacillus circulans w środowisku zawierającym łupki walcziowy**

Ilość łupku	0 g		5 g		10 g		20 g		
	liczba komórek bakt./cm ³	pH	liczba komórek bakt./cm ³	pH	liczba komórek bakt./cm ³	pH	liczba komórek bakt./cm ³	pH	
Parametry badane:									uzysk (ε) U [%]
4 tygodnie	5,1 · 10 ⁸	6,35	2,8 · 10 ⁷	6,48	1,2	6,16	1,3 · 10 ⁷	6,95	<0,1
8 tygodni	2,8 · 10 ⁸	5,84	4,3 · 10 ⁶	6,33	2,3	6,37	3,7 · 10 ⁶	6,59	1,1
20 tygodni	4,8 · 10 ⁸	5,76	5,2 · 10 ⁶	6,14	9,6	6,05	8,5 · 10 ⁵	6,26	4,5

* W chwili założenia doświadczeń w roztworze ługującym znajdowało się 8,3 · 10⁷ komórek bakt./cm³.

4. Omówienie wyników badań

Analiza wyników badań chemicznych wykazała, że przyjęte w badaniach łupki: czarny i walchiowy (tab. 3 i 4) reprezentują zupełnie inny typ środowiska skalnego. Łupki czarne charakteryzuje się przeważającym udziałem części glinokrzemianowej (ponad 60%) i organicznej (ok. 25%) z minimalnym udziałem części węglanowej; zawiera ponadto 3,2–3,5% pirytu, a skała ma charakter kwaśny o $\text{pH} = 3,8$. W przypadku łupki walchiowej klasy grubsze >10 mm charakteryzują się wysokim udziałem $\text{CaO} + \text{MgO}$ wynoszącym aż 34,0%, co skutkuje wysoką alkalicznością o $\text{pH} = 10,6$; w klasach drobniejszych — które wykorzystano w badaniach — maleje zawartość składników o charakterze zasadowym (odpowiednio do ok. 10%), a alkaliczność obniża się do $\text{pH} = 7,6$. Stwierdza się obecność niewielkich ilości pirytu (ok. 0,6%), którego rozproszenie w poszczególnych klasach jest dość równomierne.

Na podstawie wyników analizy mikrobiologicznej (tab. 6) próbek łupki czarnego można stwierdzić, że środowisko geochemiczne tego łupki sprzyja bogactwu i różnorodności życia biologicznego. Organiczna część łupki czarnego nie wywołuje istotnych skutków biologicznych, o czym świadczy niezbyt wysoka średnia liczba kom. bakt./ cm^3 analizowanych roztworów, zarówno psychrofilnych: $780 \pm 1,6$ tys., jak i mezofilnych: $5,5 \pm 23$ tys., a także grzybów: około 20 ± 50 . Ogólnie obserwuje się intensywny rozwój bakterii tlenowych: *A.ferrooxidans* (miano 0,0001), oraz *A.thiooxidans* (miano 0,001). Stwierdzono również obecność bakterii przeprowadzających procesy nityfikacji i denityfikacji (0,01), a także pojawiają się bakterie żelazowe (0,1). Dominującymi osobnikami mikroflory autochtonicznej są jednak bakterie *A.ferrooxidans*, co świadczy o tym, że właśnie one najlepiej adaptują się do warunków geochemicznych łupki czarnego.

Na podstawie wyników badań mikrobiologicznych próbek łupki walchiowego po-branych bezpośrednio ze środowiska naturalnego (tab. 6) — ogólnie można stwierdzić, że badaną skałę charakteryzuje stosunkowo ubogie życie biologiczne. Rozwijają się tu głównie bakterie psychrofilne — w analizowanym roztworze było średnio maksymalnie 415 tys. oraz mezofilne — których maksymalnie stwierdzono 155 tys. kom. bakt./ cm^3 — i są to bakterie z rodzaju *Bacillus*, zdiagnozowane jako *B.megaterium*, *B.firmus*, *B.circulans* oraz *B.mycoides*. Licznie występują bakterie uczestniczące w przemianach związków azotowych: nityfikujące i denityfikujące, których występowanie może mieć jednak charakter wtórny. Stwierdzono występowanie pewnej ilości — około 1500 — grzybów pleśniowych z klasy *Micromycetes*.

Każde z badanych środowisk, traktowanych jako stałe podłoże mikrobiologiczne wykształciło zupełnie inny typ mikroflory autochtonicznej reprezentowany przez całkowicie różne gatunki bakterii. W środowisku łupki czarnego dominującymi mikroorganizmami są chemolitoautotroficzne bakterie tlenowe: *A.ferrooxidans* i *A.thiooxidans*, natomiast w środowisku łupki walchiowej rozwinęły się mikroorganizmy chemoorganoheterotroficzne, a w szczególności bakterie z rodzaju *Bacillus*. Dominujące mikroorganizmy przebadano ze względu na ich dynamikę wzrostu w każdym z ich naturalnych środowisk geochemicznych, w warunkach zwiększonego udziału łupki, mając na uwadze wpływ typu ich przemian biologicznych na ługowanie metali, a w szczególności uranu.

W środowisku pozbawionym łupku ilościowy stan bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans* z wyjściowej wartości $5,1 \cdot 10^5$ kom. bakt./cm³ jaka istniała w chwili założenia doświadczenia już po tygodniu w świeżej pożywce rośnie dziesięciokrotnie, i dopiero w czwartym tygodniu wykazuje tendencję zniżkową. Zwiększony udział łupku w ilości 5 i 10 g powoduje zmniejszenie dynamiki wzrostu bakterii w pierwszym tygodniu, obserwuje się jednak ciągły jej wzrost do czwartego tygodnia. O ile przy 10 g próbce w warunkach doświadczeń obserwuje się jeszcze przeszło dwukrotny wzrost liczby bakterii w pierwszym tygodniu: z $0,5 \cdot 10^6$ do $1,3 \cdot 10^6$ kom. bakt./cm³, to przy 20 g ten wzrost jest już bardzo powolny: z $5 \cdot 10^5$ do $8 \cdot 10^5$ w pierwszym tygodniu i dalej do trzeciego — $3 \cdot 10^6$ kom. bakt./cm³. W następnym tygodniu liczba bakterii zmalała już wyraźnie.

Ogólnie można powiedzieć, że w bezprzepływowym warunkach prowadzenia doświadczeń, przy stałych proporcjach reagentów, bez doszczepiania i bez wymiany roztworu ługującego oraz przy aeracji naturalnej obecność łupku w roztworze powoduje zawsze w pierwszym tygodniu obniżenie liczby bakterii w stosunku do możliwości, jakie istnieją w środowisku pozbawionym łupku — i to nawet znaczne w przypadku nadmiaru fazy stałej — aby już w następnym tygodniu i dalszych działać stymulująco na ich rozwój, przynajmniej w zakresie zawartości łupku: do 10 g. W zakresie badanych wartości średnich dodatku łupku: 5 i 10 g obserwuje się ciągły wzrost liczby bakterii do czwartego tygodnia, aczkolwiek wolniejszy dla 10 g. Takie zachowanie się bakterii wydaje się być uzasadnione różną koncentracją pirytu wprowadzonego do roztworu ługującego wraz z łupkiem. Najwyższa zawartość łupku: 20 g — w tych warunkach daje porównywalny z 10 g wzrost liczby bakterii w tygodniu drugim i trzecim, ich ilość jednak w następnym tygodniu zaczyna istotnie maleć. Może to świadczyć o tym, że w zakresie tych stężeń mają one znacznie gorsze warunki rozwoju: pogarszają się warunki tlenowe (utrudniona aereacja) zwłaszcza, że tworzy się widoczny koloidalny produkt hydrolizy Fe^{3+} , eliminujący ten jon z procesu ługowania, obniżając tym samym stężenie biopierwiastka Fe^{2+} . Pewna liczba bakterii może ponadto tkwić w formie zaadsorbowanej na powierzchni łupku, co wyłącza je z zasięgu pomiarów wykonywanych dla roztworów ługujących. Wszystkie te niekorzystne zjawiska mogły ulec nasileniu w przypadku drobniejszej klasy łupku (próbka P.2), którą wykorzystywano w badaniach. We wszystkich doświadczeniach obserwuje się znaczny wzrost kwasowości, nasilający się z czasem oraz ze zwiększeniem udziału fazy stałej w roztworze ługującym.

Analizując wyniki badań nad efektywnością ługowania uranu w warunkach prowadzenia tej serii doświadczeń (tab. 7) ogólnie można stwierdzić, że w zakresie stężeń średnich łupku: 5 i 10 g — osiągnięty został po czterech tygodniach najwyższy jego uzysk (ϵ) wynoszący 24–25%. Zwiększenie udziału fazy stałej (10 g) początkowo pogarsza efektywność ługowania, lecz z czasem rośnie ona sukcesywnie. Dalsze zwiększenie udziału drobnej fazy stałej (20 g) nie sprzyja zarówno życiu bakterii, jak i procesowi ługowania uranu, który stabilizuje się na dość niskim poziomie z około 11% uzyskiem. Duże możliwości zwiększenia uzysku — przynajmniej na przykładzie uranu — istnieją w prowadzeniu procesu z wymianą roztworu ługującego oraz z zastosowaniem bakterii *A.ferrooxidans-2* zaadoptowanych uprzednio do podwyższonej zawartości łupku.

Dynamika wzrostu bakterii chemoorganoheterotroficznych: *Bacillus circulans* i *Bacillus megaterium* w środowisku zawierającym łupkę walchiowy kształtowała się bardzo korzystnie: dodatek łupki sprzyja rozwojowi tych bakterii, przy czym maksimum wzrostu (10^8 kom. bakt./ cm^3) zostaje osiągnięte już po dwóch dobach. Nie jest wskazany wysoki udział fazy stałej — i ze względu na stan życia biologicznego nie powinien być większy, niż $5\div 10$ g łupki/ 100 cm^3 roztworu. Zastosowana metodyka: częściowa wymiana co 3–4 dni roztworu ługującego i uzupełnienie go świeżą pożywką okazała się celowa, gdyż w ciągu 5-miesięcznego cyklu ługowania stan życia biologicznego utrzymywał się przez cały czas na wysokim poziomie, określonym liczbą rzędu $10^6\div 10^7$ kom. bakt./ cm^3 . Pomimo wysokiej dynamiki wzrostu bakterii heterotroficznych — osiąganey znacznie szybciej, niż a przypadku bakterii tionowych — nie towarzyszyło jej ługowanie uranu w stopniu zadawalającym: po 4 tygodniach ługowania był to zaledwie uzysk $1,2\text{--}1,4\%$ w przypadku *B.circulans*. Z tego powodu kontynuowano badania — uzysk uranu zwiększył się do $9,2\text{--}9,6\%$ po czterech kolejnych okresach 4-tygodniowych (tab. 8). Analiza wyników badań nad efektywnością ługowania metali (uranu) obecnych w łupku walchiowym przy współdziale bakterii autochtonicznych: *B.circulans* (i *B.megaterium*) wykazała, że w badanym środowisku zachodzą procesy biologiczno-chemiczne, o czym świadczą subtelne zmiany pH, oraz przechodzenie uranu do roztworu. Ogólnie można stwierdzić, że proces ługowania przy współdziale bakterii heterotroficznych zachodzi bardzo powoli — w warunkach doświadczeń znaczniesze uzyski osiągnięto dopiero po pięciu miesiącach ługowania, jednak można przypuszczać, że mógłby on przebiegać dalej, być może z większą intensywnością, o czym świadczą większe dalsze przyrosty uzysku, niż w pierwszych dwóch miesiącach. Korzystniejsze wyniki osiągnięte zostały w przypadku bakterii *B.circulans* (tab. 8): pH z wyjściowej wartości $7,5$ obniżyło się do maksymalnie do $6,14\div 6,05$, zwiększył się uzysk uranu do wartości maksymalnej w danych warunkach. W przypadku bakterii *Bacillus megaterium* utrzymany został zasadowy charakter środowiska (a nawet pogłębiony): $\text{pH} = 7,09\div 8,44$, co nie miało korzystnego wpływu na efektywność ługowania, i osiągnięte uzyski w porównaniu z *B.circulans* były z reguły niższe (danych tych nie przytoczono).

5. Podsumowanie

Przedmiotem badań nad wykorzystaniem właściwości środowiskowych surowca w procesie jego wzbogacania były dwa materiały łupkowe: czarny łupek dictyonemowy i łupek walchiowy, które — przy porównywalnej na poziomie wartości ppm metalonośności — zdecydowanie różniły się między sobą pełnym zespołem pozostałych cech biogeochemicznych.

Łupek czarny był skałą o charakterze kwaśnym, a jej skład i obecność pirytu powodował, że dominującymi mikroorganizmami mikroflory autochtonicznej były chemolitoautotroficzne bakterie tionowe: przede wszystkim *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ale również i *Acidithiobacillus thiooxidans*. Łupek walchiowy przedstawiał zupełnie inne środowisko — był skałą o podwyższonym udziale składników alkalicznych, której skład miernie sprzyjał

życiu biologicznemu, reprezentowanemu niezbyt licznie głównie przez chemoorganoheterotroficzne bakterie z rodzaju *Bacillus*, a w szczególności: *Bacillus circulans* i *Bacillus megaterium*. W założeniach szczegółowych przyjęto, że czynnik biologiczny sprzyjający chemicznemu ługowaniu metali: na przykładzie uranu — w pierwszej kolejności będzie poszukiwany wśród mikroorganizmów najliczniej reprezentowanych w danym środowisku geochemicznym — jako najlepiej zaadaptowanych do pełnienia funkcji życiowych w każdym ze środowisk.

Porównanie wyników badań nad dynamiką wzrostu autochtonicznych bakterii tlenowych oraz związaną z tym ich efektywnością ługowania uranu w środowisku geochemicznym łupku czarnego wykazało, że istnieją duże potencjalne możliwości wykorzystania do tego celu uzdolnień biochemicznych bakterii *A. ferrooxidans*. W ciągu jednego cyklu trwającego 4 tygodnie eksperymentu wykazano, że optymalizująca proces ingerencja w środowisko ługowania powoduje pozytywne skutki ilościowe, zarówno ze względu na stan życia biologicznego jak również uzysk uranu (i pozostałych metali), pozwalające na wyciągnięcie wniosków co do możliwości jego modelowania, a także prognozowania. W przypadku klasy drobnej polimetalicznego surowca o kwasowym charakterze skały, zastosowana do jego wzbogacania metoda biotechniczna okazała się efektywna.

Zastosowanie podobnej procedury – to znaczy przeprowadzenie badań nad dynamiką wzrostu najliczniej reprezentowanych bakterii autochtonicznych w przypadku łupku walczyńskiego wykazało, że chemoorganoheterotroficzne bakterie z rodzaju *Bacillus*: *B. circulans* i *B. megaterium* zachowują się podobnie: ogólnie obecność łupku sprzyja ich rozwojowi. W trakcie jednego cyklu ługowania zaobserwowano znacznie wyższą, niż w przypadku bakterii tlenowych dynamikę ich wzrostu, jednak nie towarzyszyła jej zadawalająca efektywność ługowania. Znaczniejsze uzyski uranu zarejestrowano dopiero po 4 cyklach ługowania — jednak osiągnęły one 3–4-krotnie niższy poziom wartości, niż analogiczne dla łupku czarnego: uzysk uranu wyniósł zaledwie 9,6%. Jednocześnie zwiększony w końcowej fazie przyrost uzysku sugerował, że znaczne wydłużenie czasu ługowania mogłoby przynieść pozytywny skutek.

Ogólnie można powiedzieć, że wzbogacanie dwóch skrajnie różnych surowców łupkowych — z wykorzystaniem do tego celu metod biotechnicznych — jest procesem długotrwałym, wielomiesięcznym. W celu ograniczenia zakresu ingerencji w środowisko ługowania, istnieje możliwość maksymalnego wykorzystania w tym procesie naturalnych warunków biogeochemicznych surowca, jednak odbywa się to kosztem dalszego spowolnienia procesu, a w konsekwencji znacząco maleje uzysk metali.

W oparciu o wyniki tego zakresu badań można stwierdzić, że pozyskiwanie metali z surowców o różnej charakterystyce biogeochemicznej — na przykładzie dwóch surowców łupkowych — jest możliwe, przy uwzględnieniu jednak każdorazowo zindywidualizowanych metodyk szczegółowych. Osiągnięcie w każdym przypadku postępu wzbogacania wymaga stymulowania odpowiedniego procesu biotechnicznego poprzez systemowe (i doraźne): wykorzystanie wysokoefektywnych zawiesin bakteryjnych oraz dotowanie odpowiednich składników pokarmowych.

LITERATURA

- [1] *Balicki L.*: Uran — niebezpieczeństwo czy źródło doskonałej energii. *Rudy Metale*, 3, 2008, 170–176
- [2] *Crundwell F.K.*: How do bacteria interact with minerals. *Hydrometallurgy*, 71, 2003, 75–81
- [3] *Deveci H.*: Effect of solids on viability of acidophilic bacteria. *Minerals Engineering*, 15, 2002, 1181–1189
- [4] *Farbiszewska T., Farbiszewska-Kiczma J., Jażdżyk E., Sadowski Z., Szubert A.*: Kinetic study of biodegradation of organic matter extracted from black shale ore. *Fizykochem. Probl. Mineral.*, 40, 2006, 317–325
- [5] *Fowler T.A., Holmes P.S., Crundwell F.K.*: On the kinetics and mechanism of the dissolution of pyrite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 59, 2001, 257–270
- [6] *Frac M., Jezierska-Tyc S.*: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Postępy Mikrobiol.* 1, 2010, 47–58
- [7] *Galuszka A.*: Wykorzystanie mikroorganizmów i roślin do pozyskiwania metali. *Przegląd Geologiczny*, nr 10/1, 2005, 858–862
- [8] *Galuszka A., Migaszewski Z.*: Problemy zrównoważonego użytkowania surowców mineralnych. *Problemy Ekorozwoju*, 1, 2009, 123–130
- [9] *Ginder-Vogel M., Stewart B., Fendorf S.*: Kinetic and mechanistic constraints on the oxidation of biogenic uranite by ferrihydrite. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 2010, 163–169
- [10] *Grafka O.*: Udział mikroorganizmów w biogeochemicznym obiegu węgla. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 41, 2009, 151–156
- [11] *Groudev S.N.*: Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. *Acta Biotechnologica*, 4, 2004, 299–306
- [12] *Groudev S.N., Spasova I., Nicolova M., Georgiev P.*: Acid mine drainage cleanup a uranium deposit by means of passive treatment system. *Fizykochem. Probl. Mineral.*, 41, 2007, 265–274
- [13] *Kaczorek K., Ledakowicz S.*: Analiza pracy składowiska odpadów z punktu widzenia inżynierii bioreaktorowej. *Biotechnologia*, 2, 2005, 69–87
- [14] *Morel F.M., Price N.M.*: The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science*, 300, 2003, 944–947
- [15] *Pacholewska M., Cwalina B., Sozańska M., Cabala J.*: Środowiskowe uwarunkowania procesów (bio)ługowania metali z odpadów poflotacyjnych rud cynkowo-olowiowych. *Rudy Metale*, 6, 2008, 337–342
- [16] *Pacholewska M.*: Rozwój przemysłowych technologii bioługowania rud i koncentratów metali. *Rudy Metale*, 4, 2004, 159–165
- [17] *Raslan M.F.*: Beneficiation of uranium-rich fluorite from El-Missikat (Egypt) mineralized granite. *Fizykochem. Probl. Mineral.*, 42, 2008, 185–194
- [18] *Rawlings D.E.*: Biomineralization of metal containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology*, 1, 2003, 38–44
- [19] *Rawlings D.E.*: Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 2002, 65–91
- [20] *Sharma P.K., Das A., et al.*: Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. *Hydrometallurgy*, 71, 2003, 285–292
- [21] *Szubert A., Grotowski A.*: Possibilities of metals recovery from nonsulfide ores using biological methods. *Rudy Metale*, 4, 2009, 191–196
- [22] *Turkiewicz A., Niewiadomska A.*: Mikrobiologia złożowa i jej zastosowanie w przemyśle naftowym. *Nafta – Gaz*, 11, 2001, 615–619
- [23] *Uryga A., Sadowski Z., Grotowski A.*: Bioleaching of cobalt from mineral products. *Fizykochem. Probl. Mineral.*, 38, 2004, 291–299
- [24] *Werońska A.*: Wpływ warunków środowiskowych na powstanie holocenijskich rud żelaza. *Gospodarka Surowcami Mineralnymi*, 2, 2009, 23–36
- [25] *Wilscher S., Bosecker K.*: Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from alkaline slag dump. *Hydrometallurgy*, 71, 2003, 257–264