

UNIVERZITET U BEOGRADU
RUDARSKO-GEOLOŠKI FAKULTET

Srđan B. Stanković

**MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET KISELOG
JEZERA ROBULE I UTICAJ JEZERSKE
VODE NA OKSIDACIJU SULFIDNIH
MINERALA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MINING AND GEOLOGY

Srđan B. Stanković

**MICROBIAL DIVERSITY OF AN
EXTREMELY ACIDIC LAKE ROBULE
AND EFFECT OF THE LAKE WATER ON
OXIDATION OF SULFIDE MINERALS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

prof. dr Vladica Cvetković, redovni profesor. Naučna oblast: geologija

Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet

dr Ivana Morić, naučni saradnik. Naučna oblast: mikrobiologija

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Članovi komisije:

prof. dr Veselin Dragišić, redovni profesor. Naučna oblast: hidrogeologija

Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik. Naučna oblast: mikrobiologija

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane:

Posvećeno kćerki Neveni, supruzi Daliborki i roditeljima

IZRAZI ZAHVALNOSTI

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Vladici Cvetkoviću, koji mi je, i pored toga što je moj put ka nauci bio neuobičajen, omogućio da upišem doktorske studije na Rudarsko-geološkom fakultetu. Zahvaljujući poverenju i podršci profesora Cvetkovića, uspešno sam prebrodio izazove sa kojima sam se suočavao tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalan sam doc. dr Aleksandru Pačevskom koji mi je omogućio inicijalni kontakt sa profesorom Vladicom Cvetkovićem.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ivani Morić, naučnom saradniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), koja mi je tokom izrade disertacije bila mentor, učitelj i prijatelj. Zahvaljujem Ivani na znanju koje mi je nesebično prenela tokom rada u laboratoriji, detaljnom iščitavanju teksta disertacije, komentarima, sugestijama i ispravkama.

Izrada ove disertacije ne bi bila moguća bez pomoći, podrške i razumevanja dr Branke Vasiljević, rukovodioca Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama IMGGI, koja mi je širom otvorila vrata svoje laboratorije. Branki i svim zaposlenima u Lab 05 IMGGI zahvaljujem na srdačnom prijemu i prijateljskom ophođenju tokom rada u laboratoriji.

Zahvalan sam profesoru Bariju Džonsonu sa Univerziteta u Bangoru (UK) koji mi je omogućio da posetim njegovu laboratoriju i naučim metode za kultivaciju i identifikaciju acidofilnih bakterija.

Dr Zoranu Stevanoviću iz Instituta za rudarstvo i metalurgiju u Boru zahvaljujem na ustupljenim uzorcima flotacijske jalovine.

Prof. dr Ljiljani Karanović, penzionisanoj profesorki Rudarsko-geološkog fakulteta, zahvaljujem na pomoći prilikom rendgenske strukturne analize uzoraka flotacijske jalovine.

Zahvaljujem prof. dr Veselinu Dragišiću, redovnom profesoru Rudarsko-geološkog fakulteta, na učešću u Komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije.

Na kraju, ali ne i najmanje bitno, zahvaljujem članovima moje porodice, supruzi Daliborki i roditeljima Borisavu i Nadi, na ljubavi i podršci koja mi je pomogla da istrajem u ovom poslu.

1	UVOD	1
1.1	Kisele rudničke vode	2
1.2	Mehanizmi oksidacije sulfidnih minerala	4
1.2.1	Polisulfidni mehanizam oksidacije sulfidnih minerala	4
1.2.2	Tiosulfatni mehanizam	5
1.3	Jalovišta u borskom rudarskom basenu	6
1.4	Ekstremno kisela staništa	7
1.4.1	Prirodna ekstremno kisela staništa	8
1.4.2	Antropogena ekstremno kisela staništa	8
1.4.3	Jezero Robule	10
1.4.4	Metabolizam acidofilnih bakterija	12
1.4.5	Metabolička oksidacija gvožđa, sumpora i redukovanih jedinjenja sumpora	13
1.4.6	Anaerobna respiracija redukcijom feri jona	16
1.4.7	Mikrobiološki diverzitet ekstremno kiselih staništa	18
1.4.7.1	Rod <i>Leptospirillum</i>	19
1.4.7.2	Rod <i>Acidithiobacillus</i>	20
1.4.7.3	Rod <i>Acidiphilium</i>	21
1.4.7.4	Rod <i>Sulfobacillus</i>	21
1.4.7.5	Rod <i>Alycyclobacillus</i>	22
1.4.7.6	Rod <i>Acidocella</i>	22
1.4.7.7	Rodovi <i>Acidimicrobium</i> i <i>Ferrimicrobium</i>	23
1.4.8	Metode za izučavanje mikrobiološkog diverziteta	23
1.4.8.1	Klasične metode kultivacije i izolacije acidofilnih bakterija	23
1.4.8.2	Metode molekularne biologije za identifikaciju mikroorganizama	24
1.4.8.3	Lančana reakcije polimerizacije (eng. Polymerase Chain Reaction – PCR)	25
1.4.8.4	Analiza polimorfizama dužine terminalnih restrikcionih fragmenata (eng. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)	26
1.5	Ekologija ekstremno kiselih staništa	29
1.5.1	Mutualistički odnosi među acidofilnim mikroorganizmima	29
1.5.2	Kompeticija među acidofilnim mikroorganizmima	30
1.5.3	Sinergističke interakcije među acidofilnim mikroorganizmima	31
1.5.4	Predatorstvo	31
1.6	Primena acidofilnih mikroorganizama u biotehnologiji	32
1.6.1	Hidrometalurgija	32
1.6.1.1	Prednosti hidrometalurgije u odnosu na pirometalurgiju	32
1.6.1.2	Bioluženje	34
1.6.1.3	Mehanizam bioluženja	38
1.6.2	Primena acidofilnih mikroorganizama u bioremedijaciji kiselih rudničkih voda	40
1.6.2.1	Aktivni biološki sistemi – sulfidogeni bioreaktori	41
1.7	Kvalitativna i semi-kvantitativna rendgenska strukturna analiza	44
1.7.1	Rendgensko zračenje	44
1.7.1.1	Uslovi za difrakciju i Bragov zakon	45
1.7.2	Princip rada difraktometra	46
1.7.3	Semi-kvantitativna fazna analiza	48
2	Ciljevi istraživanja	49

3	Materijal i metode	50
3.1	Uzorkovanje	50
3.2	Određivanje ukupnog bakra	51
3.3	Određivanje koncentracije gvožđa	52
3.3.1	Ferozinski test	52
3.3.2	Fenantrolinski i tiocijanatni test	52
3.4	Rendgenska kvalitativna i semi-kvantitativna difrakciona analiza	53
3.5	Svetlosna mikroskopija	53
3.6	Kultivacija i izolacija acidofilnih bakterija	53
3.7	Izolacija metagenomske (ukupne) DNK iz sredinskih uzoraka	55
3.8	Izolacija DNK iz bakterijskih kolonija	56
3.9	Umnožavanje gena za 16S rRNK u reakciji lančane reakcije polimeraze (PCR)	56
3.9.1	PCR protokol - Univerzitet u Bangoru	57
3.9.2	PCR protokol - IMGGI	57
3.10	Agarozna gel elektroforeza	58
3.11	T-RFLP analiza	59
3.11.1	Obrada PCR proizvoda restrikcionim endonukleazama	59
3.11.2	Kapilarna elektroforeza	59
3.11.3	Analiza T-RFLP profila	60
3.12	Bioluženje u laboratorijskim uslovima	61
3.12.1	Mineralni koncentrat	61
3.12.2	Stara flotacijska jalovina Rudnika bakra Bor	61
3.13	Statistička analiza	62
4	Rezultati	63
4.1	Fizičko-hemijske osobine uzoraka vode iz jezera	63
4.2	Analiza mikrobiološkog diverziteta uzorka vode iz jezera Robule	63
4.2.1	Rezultati bojenja i posmatranja mikroorganizama pod mikroskopom	63
4.2.2	Kultivacija acidofilnih bakterija iz jezera Robule na selektivnim čvrstim podlogama	64
4.2.3	T-RFLP analiza uzorka vode iz jezera Robule	65
4.2.4	T-RFLP analiza nakon izolacije DNK iz bakterijskih kolonija	70
4.2.5	Analiza mikrobiološkog diverziteta uzoraka biomase i jalovine	72
4.2.5.1	Izolacija bakterija iz uzoraka biomase na selektivnim čvrstim podlogama	72
4.2.5.2	T-RFLP analiza	75
4.2.5.3	Mikrobiološka aktivnost jalovine	78
4.3	Rezultati eksperimenta bioluženja bakra iz mineralnog koncentrata	79
4.3.1	Analiza sastava bakterijskih konzorcijuma nakon bioluženja	79
4.4	Rezultati eksperimenta bioluženja bakra iz flotacijske jalovine	81
4.4.1	Kvalitativna i semi-kvantitativna rendgenska difrakciona analiza	83
5	Diskusija	86
5.1	Mikrobiološki diverzitet kiselog jezera Robule	86
5.1.1	Mikrobiološki diverzitet vode kiselog jezera Robule	87
5.1.2	Mikrobiološki diverzitet biomase iz jezera Robule	90

5.2	Biogehemijski ciklusi u jezeru.....	95
5.3	Mikrobiološki diverzitet jalovišta koje okružuje jezero Robule	97
5.4	Bioluženje mineralnog koncentrata	98
5.5	Luženje bakra iz uzoraka flotacijske jalovine Starog flotacijskog jalovišta Rudnika bakra Bor	102
6	Zaključci.....	110
7	Literatura	112

MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET KISELOG JEZERA ROBULE I UTICAJ JEZERSKE VODE NA OKSIDACIJU SULFIDNIH MINERALA

REZIME

Jezero Robule, formirano u podnožju rudničke raskrivke Oštrejski planir (Rudnik bakra Bor), je nastalo kao posledica rudarskih aktivnosti. Mikrobiološki diverzitet ekstremno kiselog jezera Robule ispitan je primenom kako klasičnih mikrobioloških metoda (svetlosna mikroskopija i kultivacija na selektivnim podlogama) tako i primenom savremene metode molekularne biologije (analiza polimorfizama terminalnih restrikcionih fragmenata; T-RFLP). Takođe, ispitan je i potencijal i efikasnost jezerske vode u biološkom luženju mineralnog koncentrata, kao i u bioluženju uzoraka stare flotacijske jalovine Rudnika bakra Bor.

Na osnovu dobijenih rezultata oba pristupa potvrđeno je da je mikrobiološki diverzitet vode jezera Robule vrlo ograničen. T-RFLP analizom gena za 16S rRNK umnoženih na osnovu metagenomske DNK su identifikovane svega dve vrste: *Acidiphilium cryptum* (hemoorganoheterotrof), sa zastupljenošću od ~50 % i *Leptospirillum ferrooxidans* (hemolitoautotrofna gvožđe-oksidujuće bakterija) čija se zastupljenost kretala oko 40 %, dok je preostalih 10 % terminalnih restrikcionih fragmenata (T-RF) ostalo neidentifikovano. Hemolitoautotrofna gvožđe i sumpor oksidujuće bakterijska vrsta *Acidithiobacillus ferrooxidans* je identifikovana tek nakon izolovanja na odgovarajućoj selektivnoj podlozi. Analiziran je i mikrobiološki diverzitet uzorka biomase, koja se formirala u obliku tepiha zelene boje u priobalnom području jezera. Svetlosnom mikroskopijom je utvrđeno da osnovu uzorka biomase čine končaste alge, dok je T-RFLP analiza gena 16S rRNK umnoženih na osnovu metagenomske DNK dobijene iz uzorka biomase ukazala na znatno veći mikrobiološki diverzitet u odnosu na analizirani uzorak jezerske vode. Populaciju mikroorganizama u tepihu su činile pretežno heterotrofne acidofilne bakterije, mada su bile prisutne i hemolitoautotrofne bakterije. Najzastupljeniji T-RF su poticali od algi i heterotrofnih bakterija iz rodova *Acidocella*, *Acidiphilium* i *Sulfobacillus*. Prisustvo hemolitoautotrofnih i heterotrofnih acidofilnih bakterija je potvrđeno zasejavanjem

uzoraka na selektivne podloge, mada je ovim pristupom uočen manji bakterijski diverzitet. Iz uzoraka jalovine sa deponije raskrivke na selektivnoj podlozi sa gvožđe(II)sulfatom i ekstraktom kvasca su izolovani gvožđe-oksidujući i heteroorganotrofni acidofili, koji učestvuju u stvaranju tzv. kiselih rudničkih voda koje se slivaju u jezero nakon padavina i neprekidno ga obnavljaju. Na osnovu ovih rezultata predložen je i biogeohemijski ciklus gvožđa u jezeru.

U eksperimentu bioluženja bakra, na laboratorijskoj skali, iz mineralnog koncentrata koji je sadržao 17 % bakra poređena je efikasnost bioluženja bakra jezerskom vodom (nativni autohtoni bakterijski konzorcijum) sa efikasnošću veštačkog konzorcijuma u čiji sastav je ušlo šest vrsta acidofilnih bakterija različitih fizioloških karakteristika. Po završetku eksperimenta, u rastvoru inokulisanom veštačkim bakterijskim konzorcijumom izmerena je statistički značajno veća koncentracija i bakra i gvožđa. Ovi rezultati ukazuju da je za proces bioluženja mineralnih koncentrata bolje kreirati složenije bakterijske konzorcijume, nego koristiti konzorcijume bakterija uzetih iz životne sredine čiji je diverzitet po pravilu veoma ograničen. Kako voda jezera Robule ima osobine rastvora koji bi se mogao koristiti kao liksivijant u procesu oksidacije sulfidnih minerala, na laboratorijskoj skali je testirana mogućnost primene ove vode u bioluženja bakra iz uzoraka stare flotacijske jalovine uzetih sa Starog flotacijskog jalovišta Rudnika bakra Bor, sa dubina od 10, 15 i 20 metara. Najveći prinos bakra od $97,78 \pm 5,50$ % dobijen je nakon tretiranja uzoraka sa dubine od 10 m, dok je prinos bakra kod uzoraka sa dubina od 15 i 20 m iznosio $68,34 \pm 1,21$ % odnosno $72,57 \pm 0,57$ %. Veliki prinos bakra dobijen iz uzoraka uzetih sa dubine od 10 m je posledica prisustva male količine sulfidnih minerala i znatnog sadržaja sekundarnog minerala bakra langita nastalog taloženjem bakar(II)sulfata oslobođenog tokom dugogodišnje oksidacije sulfidnih minerala u površinskim slojevima jalovišta. Rezultati semi-kvantitativne rendgenske strukturne analize su pokazali da je količina pirita u uzorku uzetom sa dubine od 20 m znatno smanjena nakon eksperimenta bioluženja. Ovo je značajan podatak, s obzirom da se smanjenjem količine pirita smanjuje i sposobnost jalovine za generisanje kiselih rudničkih voda.

Ključne reči: jezero Robule, acidofilne bakterije, bioluženje, kisele rudničke vode, flotacijska jalovina

Naučna oblast: geologija

Uža naučna oblast: geohemija

UDK broj: 579.68:556.55(043.3) 577.2:574.5(043.3)

MICROBIAL DIVERSITY OF AN EXTREMELY ACIDIC LAKE ROBULE AND EFFECT OF THE LAKE WATER ON OXIDATION OF SULFIDE MINERALS

SUMMARY

Lake Robule, is an extremely acidic water body formed at the foot of the overburden Oštrejlski planir (the Copper Mine Bor). Microbial diversity of the lake was investigated using both traditional microbiological methods (microscopy and bacterial isolation on selective media) and molecular fingerprinting technique – Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) method. The Lake's water potency for and efficacy of bioleaching of mineral concentrate has also been investigated as well as bioleaching of old flotation tailings samples.

The results of both approaches confirmed that microbial diversity of the Lake's water was very restricted, as expected. T-RFLP analysis of 16S rRNA amplified when metagenomic DNA has been used as a target, showed the presence of only two species: *Acidiphilium cryptum* (hemoorganoheterotrophic bacteria) that represented approximately 50 % of total number of present terminal fragments (T-RFs) and *Leptospirillum ferrooxidans* (chemolithoautotrophic iron-oxidizing bacteria) that corresponded to ~40 %. Remaining 10 % of T-RFs were not identified. Chemolithoautotrophic iron- and sulfur- oxidizing bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* was identified only after its isolation on selective solid media. Microbial diversity of thick, green colored mat, formed in shallow water, was also analyzed. Light microscopy revealed the presence of the green filamentous algae on the surface of the biomass, while T-RFLP analysis of the 16S rRNA genes amplified from metagenomic DNA isolated from the mat revealed significantly higher bacterial diversity when compared to the diversity of the Lake's surface water. The most abundant T-RFs originated from algae and heterotrophic acidophilic bacteria closely related to genera *Acidocella*, *Acidiphilium* and *Sulfobacillus*. Chemolithoautotrophic and heterotrophic acidophilic bacteria were also detected on selective solid media, but observed diversity was lower. Inoculation of overlay solid media containing ferrous(II)sulfate and yeast extract with soil sample of surrounding overburden resulted in development of iron-

oxidizing and heterotrophic acidophilic bacterial colonies. This confirmed that, as a result of metabolic activity of iron-oxidizing bacteria, overburden has continuously been generating acid mine drainage that flows into the lake after rainfall. Based on these results a biogeochemical model of iron circulation in the lake was proposed.

In the experiments at laboratory scale, efficacy of bioleaching of the mineral concentrate (17 % of copper) with the Lake's water containing the native bacterial consortium was compared with bioleaching efficiency of consortium consisting of even six acidophilic bacteria species with different physiological traits. At the end of bioleaching experiment concentration of copper and iron was significantly higher in solution inoculated with artificially created bacterial consortium. These results suggest that better bioleaching performance can be achieved by using more diverse bacterial consortium created in the laboratory. Since the lake Robule is a huge reservoir of acidic water rich in iron and acidophilic bacteria it could be used as a lixiviant for bioleaching. Therefore, bioleaching of samples taken from depths of 10, 15, and 20 meters from Old flotation tailings of the Copper Mine Bor was performed at laboratory scale using the Lake water as lixiviant. Yield of copper after five weeks of the bioleaching experiment was 68.34 ± 1.21 %, 72.57 ± 0.57 % and 97.78 ± 5.50 % for 15 m, 20 m, and 10 m samples, respectively. Almost a complete dissolution of copper of 10 m sample was a result of dissolution of CuSO_4 , which precipitated as a consequence of long-term oxidative dissolution of sulfide minerals in the upper layers of the dump. Precipitation of copper(II)sulfate led to formation of secondary copper containing mineral langite, which was detected in all samples by X-ray powder diffraction analysis. The highest content of langite was detected in the 10 m sample; the content of langite was substantially reduced in the 10 m sample after bioleaching. In comparison to previously published results of acid leaching of old flotation tailings it was concluded that the bioleaching was generally more efficient for treatment of samples taken from depths of 20 m, which contained the highest amount of sulfide minerals. X-ray powder diffraction analysis showed that content of pyrite in the 20 m sample was greatly reduced after bioleaching. This is important finding, since reduction of content of pyrite in tailings reduces its ability to generate acid mine drainage.

Keywords: lake Robule, acidophilic bacteria, acid mine drainage, bioleaching, flotation tailings.

Scientific field: geology

Specific scientific field: geochemistry

UDC number: 579.68:556.55(043.3) 577.2:574.5(043.3)

1 UVOD

Rudarstvo je jedna od najstarijih privrednih aktivnosti. Potražnja za metalima neprestano raste, međutim, ljudska civilizacija skupo plaća glad za metalima. Ogromne količine jalovine koje se stvaraju prilikom iskopavanja i prerade rude predstavljaju veliku opasnost po životnu sredinu. Odlaganjem jalovine uništava se obradivo zemljište i šuma, a prašina koju vetar razvejava sa jalovišta se taloži na obližnjim usevima. Jalovišta su takođe izvor kiselih rudničkih voda koje sadrže velike koncentracije katjona metala, posebno gvožđa, a često i toksične hemijske elemente kao što je arsen.

Kisele rudničke vode su jedan od najznačajnijih ekoloških rizika na globalnom nivou. Stotine hiljada hektara zemljišta i hiljade kilometara vodotokova širom sveta su ugroženi oticanjem kiselih rudničkih voda (Johnson and Hallberg, 2005). Napušteni rudnici i jalovišta mogu generisati kisele vode desetinama, stotinama, pa i hiljadama godina (Dimitrijević, 2012). Na primer, procenjeno je da napušteni rudnik pirita Richmond u Kaliforniji (SAD) može generisati ekstremno kiseli rastvor narednih 3000 godina, dok je za mali rudnik cinka i bakra u severozapadnom Ontariju (Kanada) procenjeno da će stvarati kisele rudničke vode u narednih 10000 - 35000 godina (Dimitrijević, 2012). Iako su ovo ekstremni primeri, nije neuobičajeno da napuštena rudnička okna i jalovišta imaju kapacitet stvaranja kiselih rastvora u periodu koji se meri stotinama godina. U Evropi postoji deset hiljada aktivnih i napuštenih rudnika iz kojih godišnje ističe $5-10 \times 10^9 \text{ m}^3$ veoma zagađene vode (Dimitrijević, 2012). U borskom rudarskom basenu se dnevno u životnu sredinu oslobađa nekoliko hiljada kubnih metara kiselih rudničkih voda koje potiču sa jalovišta, iz akumulacija i metalurških procesa (Korać and Kamberović, 2007, Bogdanović i sar., 2011).

Globalna potražnja za bakrom je u porastu, međutim većina nalazišta bogatih ovim metalom su iscrpljena. Rudna nalazišta koja se trenutno eksploatišu širom sveta uglavnom sadrže male koncentracije bakra, često manje od 1 %, što značajno poskupljuje proizvodnju (Dold, 2008). Na primer, iz rudnika Cerovo i Veliki krivelj, koji pripadaju Rudarsko-topioničarskom basenu Bor, kopa se ruda koja u proseku sadrži 0,34 %, odnosno 0,26 % bakra (<http://rtb.rs/rtb-bor-doo/geologija-i-resursi/>). Globalna proizvodnja bakra sve teže zadovoljava rastuću potrošnju. Velika potražnja za bakrom i

skuplja proizvodnja usloville su skok cena bakra na svetskom tržištu tokom poslednjih deset godina. Cena bakra na svetskim berzama je 2013. bila skoro četiri puta veća u odnosu na 2003. godinu, a prognozira se dalji rast cene ovog metala zbog eksplozivnog razvoja elektronske industrije, pogotovo u Kini, koja je jedan od najvećih potrošača bakra u svetu. Iz navedenih razloga, jalovišta postaju važan resurs. Visoka cena bakra omogućuje ekonomski isplativo dobijanje bakra iz jalovišta sa malim udelom ovog metala (0,1 - 0,2 %) (Dold, 2008). Procenjeno je da deponije raskrivke i flotacijske jalovine u borskom rudarskom basenu sadrže oko milion tona bakra, pa su, osim izvora zagađenja, potencijalno i značajan izvor ovog metala (Bogdanović i sar., 2011).

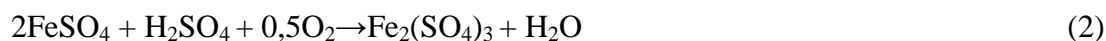
1.1 KISELE RUDNIČKE VODE

Kisele rudničke vode (eng. *Acid Mine Drainage* ili *Acid Rock Drainage*) nastaju u oblastima u kojima se vrši ili je vršena eksploatacija rude. Kisele rudničke vode nastaju oksidacijom sulfidnih minerala, pre svega pirita. Nakon iskopavanja sulfidni minerali dolaze u kontakt sa vodom i kiseonikom iz atmosfere. Posledica oksidacije sulfidnih minerala je nastanak kiselih rudničkih voda koje karakteriše niska pH vrednost i velike koncentracije katjona metala, pre svega gvožđa, a često su prisutni bakar, cink, mangan i drugi metali.

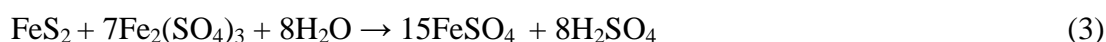
U kontaktu sa kiseonikom i vodom, dolazi do oksidacije pirita, pri čemu nastaju gvožđe(II)sulfat i sumporna kiselina (Dimitrijević, 2013):



Gvožđe(II)sulfat se dalje oksiduje u prisustvu kiseonika do gvožđe(III)sulfata:



Fe(III) je snažan oksidacioni agens, koji oksiduje pirit znatno efikasnije u poređenju sa kiseonikom, što ubrzava proces stvaranja gvožđe(II)sulfata i sumporne kiseline:



Kisele rastvorenje koji pri tom nastaju brzo nastanjuju acidofilni mikroorganizmi. Ovi ekstremofili žive u staništima koje karakteriše veoma niska pH vrednost. Mnoge vrste acidofilnih bakterija obezbeđuju energiju oksidacijom Fe(II) u Fe(III). Oslobođenu energiju zatim koriste za sintezu organskih molekula iz ugljen-dioksida i vode u procesu hemosinteze (Tribusch and Rojas-Chapana, 2007). Oksidacija gvožđe(II)sulfata dejstvom acidofilnih mikroorganizama se može prikazati sledećom hemijskom jednačinom:



Gvožđe(II)sulfat stimuliše rast populacija acidofilnih bakterija, koje veoma efikasno oksiduju Fe(II) do Fe(III). Gvožđe(III)sulfat potom ponovo oksidiše pirit (3), što dovodi do oslobađanja nove količine gvožđe(II)sulfata koji dalje stimuliše rast populacija mikroorganizama. Uz učešće acidofilnih mikroorganizama, oksidacija sulfidnih minerala se ubrzava i do 10^6 puta u odnosu na hemijski mehanizam (Tribusch and Rojas-Chapana, 2007). Ovi procesi dovode do nastanka kiselih rudničkih voda u oknima rudnika i kiselih akumulacija u podnožju jalovišta i u napuštenim površinskim kopovima. Opisani procesi se dešavaju i pod zemljom ukoliko postoji kontakt između podzemnih voda i sulfidnih minerala i imaju značajnu ulogu u formiranju rudnih ležišta (Dragišić, 2005).

U slabo kiseloj i neutralnoj sredini gvožđe(II)sulfat podleže hidrolizi, pri čemu nastaje slabo rastvorljivi gvožđe(III)hidroksid koji precipitira:



Neke vrste acidofilnih mikroorganizama oksiduju elementarni sumpor, što vodi nastanku sumporne kiseline i snižavanju pH vrednosti sredine:



Mikrobiološka oksidacija sumpora je jedan od uzroka koji dovodi do drastičnog snižavanja pH sredine u nekim kiselim rudničkim vodama (Baker and Banfield, 2003).

1.2 MEHANIZMI OKSIDACIJE SULFIDNIH MINERALA

Mehanizam oksidacije sulfidnih minerala zavisi od toga da li je mineral rastvorljiv u kiseloj sredini, ili ne. Sulfidni minerali koji su rastvorljivi u kiseloj sredini se oksiduju polisulfidnim ili vodonik-sulfidnim mehanizmom, dok se minerali koji se ne rastvaraju u kiseloj sredini oksiduju tiosulfatnim mehanizmom (Schippers and Sand, 1999, Vera et al., 2013).

1.2.1 POLISULFIDNI MEHANIZAM OKSIDACIJE SULFIDNIH MINERALA

U sulfidne minerale rastvorljive u kiseloj sredini spadaju sfalerit (ZnS), galenit (PbS), halkopirit (CuFeS₂), kovelin (CuS) i drugi sulfidni minerali bakra. Vodonikovi joni mogu raskinuti kovalentne veze između atoma metala i sumpora u molekulu ovih minerala. Opšti mehanizam oksidacije sulfidnih minerala polisulfidnim mehanizmom se može prikazati sledećim hemijskim reakcijama (Vera et al., 2013):



Polisulfidni mehanizam može biti ilustrovan na primeru sulfidnog minerala bakra – kovelina:



Feri (Fe³⁺) joni su snažan oksidacioni agens prisutan u kiselim rudničkim vodama koji takođe mogu oksidisati kovelin:

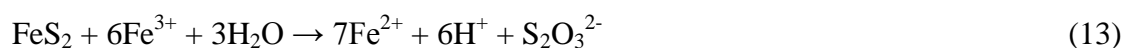


Nastali vodonik sulfid se delovanjem Fe³⁺ jona dalje oksidiše do elementarnog sumpora, koji predstavlja supstrat za oksidaciju nekim acidofilnim mikroorganizmima (9):



1.2.2 TIOSULFATNI MECHANIZAM

Pirit (FeS_2) spada u sulfidne minerale nerastvorljive u kiseloj sredini. To znači da H^+ joni ne mogu raskinuti kovalentnu vezu između atoma gvožđa i sumpora u ovom mineralu. Pirit se sporo oksidiše u prisustvu kiseonika i vode (hemijske jednačine 3-6). U prisustvu Fe^{3+} jona pirit se oksidiše tiosulfatnim mehanizmom (Vera et al., 2013, Dimitrijević, 2013).



Tiosulfat je nestabilan u kiseloj sredini i u prisustvu feri jona se brzo oksidiše u tetratonat:



Tetratonat se hidrolizuje do disulfon-monosulfonske kiseline:



Disulfon-monosulfonska kiselina je vrlo reaktivna i reaguje sa tetratonatom, pri čemu nastaje tiosulfat i pentationat:



U daljim reakcijama oksidacije će nastati elementarni sumpor. Mnogi acidofilni mikroorganizmi kao supstrat za oksidaciju mogu osim gvožđa koristiti sumpor i redukovana jedinjenja sumpora (RJS). Mikrobiološkom oksidacijom sumpora i RJS nastaje sumporna kiselina:





1.3 JALOVIŠTA U BORSKOM RUDARSKOM BASENU

Rudnik bakra u Boru je počeo sa radom 1903. godine. Za nešto više od sto godina u borskom rudarskom basenu je deponovano oko 673,5 miliona tona raskrivke i flotacijske jalovine. Najveće koncentracije bakra sadrži Staro flotacijsko jalovište Rudnika bakra Bor. Ovo jalovište je bilo u upotrebi od 1933. do 1987. godine. Za to vreme je odloženo oko 27×10^6 tona flotacijske jalovine. Prema dostupnim podacima, Staro flotacijsko jalovište sadrži prosečno 0,2-0,3 % bakra, 0,3-0,6 g/t zlata i 2,5-3 g/t srebra (Antonijević et al., 2008, Bugarin et al., 2012, Bogdanović et al., 2011, Stevanović, 2012, Stevanović et al., 2013). Očigledno je da Staro flotacijsko jalovište predstavlja značajan sekundarni izvor bakra i drugih metala. Pored Starog flotacijskog jalovišta, postoje i druge deponije flotacijske jalovine i rudničke raskrivke koje sadrže značajne koncentracije bakra. Raskrivka Rudnika bakra Cerovo sadrži oko 22 miliona tona jalovine, sa prosečnim sadržajem bakra od približno 0,2 %. Bakar je pretežno u obliku oksidnih minerala (približno 70 %), dok među sulfidnim mineralima dominiraju kovelin i halkozin (Stevanović et al., 2009, Bogdanović i sar., 2011). Deponija raskrivke Visoki planir sadrži približno 150 miliona tona rudničke raskrivke sa prosečno 0,15 % bakra, od čega 80 % čine sulfidni minerali (pretežno kovelin i halkozin) a preostalih 20 % oksidni minerali bakra. Deponija raskrivke Severni planir sadrži 20 miliona tona jalovine sa prosečnim sadržajem bakra od 0,3 % (tabela 1; Bogdanović i sar., 2011).

Jalovišta i pogoni RTB Bor stvaraju velike količine kiselih voda koje godišnje zagade vodotokove sa približno 1285 t gvožđa, 500 t bakra, 52 t cinka, 62 t mangana, 1,8 t olova, 1,3 t nikla, 400 kg arsena i oko 250 kg kadmijuma (Korać and Kamberović, 2007). U Borsku i Kriveljsku reku, koje pripadaju dunavskom slivu, dnevno otiče više hiljada kubnih metara kiselih voda (Beškoski i sar., 2009). Osim zagađenja životne sredine, slobodno oticanje kiselih otpadnih voda koje sadrže značajne količine metala predstavlja i nezanemarljiv ekonomski gubitak (Bogdanović i sar., 2011).

Tabela 1. Količina i mineraloški sastav jalovišta u borskom basenu (prema Bogdanović i sar., 2011)

Tip jalovine	Rudnik	Naziv jalovišta	Količina (Mt)	Prosečni sadržaj Cu (%)	Cu (t)	Sastav minerala Cu
Deponija raskrivke	Bor	Visoki planir	150	0,15	225 000	80 % halkozin, kovelin, 20 % oksidni minerali
Deponija raskrivke	Bor	Severni planir	20	0,3	60 000	Uglavnom halkopirit
Deponija raskrivke	Bor	Planir RTH	60	0,1	60.000	Uglavnom halkopirit
Deponija raskrivke	Veliki krivelj	Planir V.krivelj	170	0,1	170 000	Uglavnom halkopirit
Deponija raskrivke	Cerovo	Planir Cerovo	22	0,18	40 000	70 % oksidni minerali, 30 % halkozin, kovelin
Flotacijska jalovina	Bor	Staro flotacijsko jalovište	27	0,3	81 000	50 % oksidni minerali, 50 % sulfidi (kovelin, halkopirit, enargit, halkozin)
Flotacijska jalovina	Veliki krivelj	V. krivelj	130	0,15	195 000	Uglavnom halkopirit

1.4 EKSTREMNO KISELA STANIŠTA

Staništa za koja je karakteristična pH vrednost sredine niža od 3 se označavaju kao ekstremno kisela, dok se staništa čija je pH vrednost između 3 i 5 označavaju kao umereno kisela (Johnson, 2009). Ekstremno kisela staništa mogu nastati usled prirodnih procesa, međutim većina ekstremno kiselih staništa na planeti su antropogena.

1.4.1 PRIRODNA EKSTREMNO KISELA STANIŠTA

Geotermalni izvori bogati sumporom su najčešća kiselna staništa nastala prirodnim putem. Ove izvore nastanjuju mikroorganizmi koji oksidišu sumpor, što dovodi do nastanka sumporne kiseline i snižavanja pH vrednosti sredine. Prvi acidofilni mikroorganizam koji je izolovan iz kisele životne sredine bila je sumpor-oksidišuća bakterija *Acidithiobacillus thiooxidans*, tada nazvana *Thiobacillus thiooxidans* (Waxman and Joffe, 1922). Osobina koja je zajednička za ovu grupu mikroorganizama je da opstaju isključivo u kiselim staništima, stoga je u literaturi opšteprihvaćen naziv acidofilni mikroorganizmi. Geotermalni izvori nastaju na mestima gde je prisutna intenzivna vulkanska aktivnost, ili je Zemljina kora relativno tanka. Temperatura vode u ovim izvorima može biti od 85 do 100 °C, međutim, oticanjem od izvorišta voda se brzo hladi, što omogućuje kolonizaciju acidofilnim mikroorganizmima sa različitim optimalnim temperaturama za rast. Najpoznatiji geotermalni izvori se nalaze u nacionalnom parku Jeloustoun (SAD), zatim na Islandu (Krisuvik), Novom Zeland (Vakarevareva), poluostrvu Kamčatka (Rusija), u okolini Napulja (Italija), na karipskim ostrvima Montserrat i Sveta Lucija (Johnson, 2009). Geotermalni izvori na dnu okeana ne generišu ekstremnu kiselost sredine zbog značajnog puferskog kapaciteta morske vode. U podvodnim hidrotermalnim sistemima pH vrednost sredine se kreće od 3 do 8. Rio Tinto, 100 kilometara duga reka na jugu Španije, je primer kisele životne sredine nastale prirodnim putem, ali na drugačiji način u odnosu na opisana prirodna kiselna staništa. Ova reka protiče kroz Iberijski piritni pojas, 250 km dugačak geološki entitet bogat piritom i drugim sulfidnim mineralima. Oksidacijom piritna voda ove reke je postala kiselna (pH 1,5-3) i tamnocrvena zbog velike koncentracije Fe^{3+} jona koja u proseku iznosi oko 2 gL⁻¹. U reci se nalazi između 10⁵ i 10⁷ acidofilnih bakterija po mililitru (Gonzalez-Toril et al., 2003).

1.4.2 ANTROPOGENA EKSTREMNO KISELA STANIŠTA

Jedna od posledica rudarskih aktivnosti je i nastanak kiselih rudničkih voda. Kada je reč o rudnicima sa podzemnom eksploatacijom, voda koja se sakuplja u oknima dok je rudnik aktivan se neprekidno ispumpava, tako da ne može doći do značajnije akumulacije vode. Međutim, kada prestane eksploatacija rude, rudnik se puni kiselim rudničkim vodama. Voda koja curi kroz pukotine sliva se niz zidove koji sadrže pirit i

druge sulfidne minerale. Hemijskom i biološkom oksidacijom sulfidnih minerala, pre svega pirita, nastaju kiseli rastvori koji pogoduju acidofilnim mikroorganizmima (Johnson, 2006, 2011). Voda koja se akumulira u oknima duboko pod zemljom je uglavnom siromašna kiseonikom, tako da je gvožđe pretežno u redukovanom obliku Fe^{2+} jona (Johnson, 2006, Hallberg, 2010). Voda koja se akumulira u rudnicima bakra može sadržati znatne koncentracije bakra. Zbog boje koja potiče od rastvorenih Cu^{2+} jona ovaj rastvor se nekada naziva „plava voda”. Kisele rudničke vode mogu sadržati i više od 1 gL^{-1} bakra, kao što je slučaj sa kiselim rudničkim vodama iz rudnika podzemne eksploatacije Čoka Marin kod Majdanpeka (slika 1) ili kiselim rudničkim vodama na dnu površinskog kopa rudnika bakra Cerovo u borskom rudarskom basenu (Bogdanović i sar., 2013).



Slika 1. Kisele rudničke vode rudnika bakra Čoka Marin kod Majdanpeka. Boja vode ukazuje na veliku koncentraciju Fe^{2+} jona.

Taloženjem bakra iz plavih voda procesom cementacije Rudarsko-topioničarski basen Bor (RTB Bor) je proizvodio značajne količine bakra; tako je 1975. godine u pogonu cementacije proizvedeno 800 t bakra iz kiselih rudničkih voda (Dragišić, 2005). Nadzemne kisele rudničke vode su bogate rastvorenim kiseonikom, zbog čega je gvožđe uglavnom u oksidovanom obliku Fe^{3+} jona koji vodi daju karakterističnu tamnocrvenu boju rđe (Chunbo et al., 2010, Falagan et al., 2013). Primer ovakvog

kiselog staništa je jezero Robule kod Bora, koje je bilo predmet ovog istraživanja. U tabeli 2 su prikazane osobine kiselih rudničkih voda u različitim delovima sveta.

Tabela 2. Osobine kiselih rudničkih voda iz različitih delova sveta koji su nastali usled rudarskih aktivnosti (prema Johnson, 2006 i Hallberg, 2010).

Mesto	Eh, (mV)	pH	[Fe _{tot}]*	[Fe ²⁺]*	[Cu]*	[Zn]*	[SO ₄ ²⁻]*
Sverdrupbien (Norveška), rudnik uglja	+650	2,7	179	/	16	25	668
Minid Paris (UK), rudnik bakra	+285	2,5	650	650	60	40	3100
Kantareras (Španija), rudnik bakra	+425	2,7	1130	915	160	24	1190
Ričmond (SAD), rudnik pirita	/	<1	19 000	19000	650	2600	160000

*Koncentracije su izražene u mgL⁻¹.

1.4.3 JEZERO ROBULE

Jezero Robule (slika 2), koje se nalazi u neposrednoj blizini grada Bora, je veštačka akumulacija vode koju karakteriše niska pH vrednost i velika koncentracija metala, nastala sredinom sedamdesetih godina prošlog veka kao posledica nanošenja velike količine rudničke raskrivke koja je formirala Oštrejlski planir (Visoki planir). Nanošenjem raskrivke, zatrpani su nadzemni vodotokovi, pa je voda izbila ispod deponije i formirala jezero Robule dužine 450 m i širine 150 m na najširem mestu. Izloženost sulfidnih minerala prisutnih u raskrivci (pre svega pirita) kiseoniku i vodi, inicirala je hemijske i biološke procese koji su doveli do stvaranja kiselih rudničkih voda koje se nakon obilnih kiša slivaju u jezero. Na taj način je voda jezera Robule postala ekstremno kisela i zagađena velikim koncentracijama katjona metala, najviše gvožđa, zatim mangana, bakra i cinka (Korać and Kamberović, 2007, Beškoski et al., 2009). Spiranje površinskih, oksidisanih slojeva raskrivke nakon jakih kiša otkriva slojeve jalovišta u kojima su sulfidni minerali i dalje neoksidisani; na taj način jalovište već četiri decenije snabdeva vodu jezera kiselim vodama. Pored toga, u jezero se slivaju

i kisele vode iz tehnoloških procesa u RTB Bor. Svakodnevno iz jezera ističe oko 500 m³ izuzetno zagađene vode koje se sliva u Borsku reku (Beškoski et al., 2009). Jezero Robule se neprekidno snabdeva svežom vodom, pa je količina vode u jezeru godinama približno ujednačena.

Korać and Kamberović (2007) su objavili rezultate merenja fizičko-hemijskih osobina jezera Robule. Između ostalog, u februaru 2005. godine zabeležena je koncentracija gvožđa od 895 mgL⁻¹, sulfata 4145 mgL⁻¹, bakra 55,6 mgL⁻¹, cinka 26,5 mgL⁻¹, kao i pH vrednost 2,97. Ovi autori su izmerili i koncentraciju ukupnog ugljenika u vodi od 3,4 mgL⁻¹, hemijsku potrošnju kiseonika 4,03 mgO₂L⁻¹, biohemijsku potrošnju kiseonika 4,63 mgO₂L⁻¹, kao i koncentraciju rastvorenog kiseonika - 11,92 mgL⁻¹.

Beškoski et al. (2009) su objavili rezultate tridesetogodišnjeg praćenja fizičko-hemijskih i mikrobioloških osobina jezera. Najveća koncentracija bakra u vodi jezera zabeležena je 1975. godine kada je iznosila 153 mgL⁻¹, a najniža 2008. godine kada je iznosila 96 mgL⁻¹. Smanjenje koncentracije bakra u vodi jezera je verovatno posledica oksidacije sulfidnih minerala bakra u jalovištu koje okružuje jezero. Najveće vrednosti redoks potencijala i koncentracije gvožđa su izmerene 1988. i iznosile su +527 mV i 961 mgL⁻¹, a najmanje 1975. godine kada je izmeren redoks potencijal od +297 mV i koncentracija gvožđa 562 mgL⁻¹ (Beškoski et al., 2009). Stevanović et al. (2013) su objavili rezultate praćenja fizičko-hemijskih osobina vode jezera Robule u periodu od 12 meseci (jun 2011-maj 2012). Zabeležene su značajne fluktuacije pH vrednosti vode - od 4,48 koliko je izmereno u junu 2011. godine do 2,56 u novembru 2011. godine. Najmanja koncentracija sulfata izmerena je u julu 2011. godine, 4602 mgL⁻¹, a najveća u januaru 2012. godine, 10570 mgL⁻¹. Koncentracija gvožđa je takođe fluktuirala i kretala se od minimalne vrednosti 520 mgL⁻¹ u junu 2011. godine do maksimalne 835 mgL⁻¹ u aprilu 2012. godine. Koncentracija bakra se kretala oko vrednosti od 70 mgL⁻¹ (Stevanović et al., 2013).



Slika 2. Ekstremno kiselo jezero Robule kod Bora. Tamnocrvena boja vode potiče od velike koncentracije Fe^{3+} jona.

1.4.4 METABOLIZAM ACIDOFILNIH BAKTERIJA

Litotrofni acidofilni mikroorganizmi koriste neorganske supstrate kao izvor energije (gvožđe, sumpor) dok organotrofi obezbeđuju energiju oksidacijom organskih jedinjenja. Izvor ugljenika za acidofile može biti CO_2 (autotrofne bakterije) ili organska jedinjenja (heterotrofne bakterije). Prema izvoru energije i ugljenika, acidofilni mikroorganizmi mogu biti podeljeni u pet grupa:

- 1) **Hemolitoautotrofni mikroorganizmi.** Energiju za sintezu organskih molekula obezbeđuju oksidacijom neorganskih supstrata (gvožđa, sumpora), a kao izvor ugljenika koriste CO_2 .
- 2) **Fotoautotrofni acidofilni mikroorganizmi.** Koriste energiju sunčeve svetlosti za sintezu organskih molekula i CO_2 kao izvor ugljenika. U ovu grupu spadaju acidofilne alge.
- 3) **Hemolithoheterotrofni acidofilni mikrororganizmi** oksidišu neorganske supstrate, a kao izvor ugljenika koriste organske molekule.
- 4) **Hemoorganoheterotrofni acidofilni mikroorganizmi.** Acidofilne bakterije koje kao izvor energije i ugljenika koriste organska jedinjenja. Uglavnom se kraće nazivaju heterotrofnim bakterijama.

- 5) **Miksotrofni acidofilni mikroorganizmi**, su istovremeno hemoorganoheterotrofi i hemolitoautotrofi. Kada ima dovoljno organskog supstrata, žive kao heterotrofni organizmi, a pritom mogu oksidisati gvožđe i sumpor. U nedostatku organskih supstrata mogu u potpunosti preći na hemolitoautotrofan metabolizam.

Kod prokariota su opisana četiri metabolička puta za usvajanje CO₂: Calvinov ciklus, reduktivni ciklus trikarboksilnih kiselina, acetyl-CoA metabolički put i ciklus 3-hidroksipropionata. Većina acidofilnih mikroorganizama usvaja ugljenik u Calvinovom ciklusu. Alternativni metabolički putevi za usvajanje ugljenika su uglavnom identifikovani kod acidofilnih arhea (Johnson, 2009). Heterotrofne acidofilne bakterije kao izvor energije i ugljenika koriste male organske molekule, kao što su monosaharidi, glicerol, etanol, male alifatične organske kiseline (s tim što jače organske kiseline, kao što je sirćetna, deluju inhibitorno na rast ovih bakterija). Vrsta *Acidocella aromatica* može oksidisati i aromatična jedinjenja.

Prema optimalnoj temperaturi za rast, acidofilni mikroorganizmi se mogu podeliti na mezofile (optimalne temperature za rast 20-40 °C), umerene termofile (optimalne temperature za rast 40-60 °C) i ekstremne termofile (žive na temperaturama većim od 60 °C). Izolovani su psihrotolerantni sojevi koji uspešno opstaju i na temperaturama od 5 °C, međutim, do sada nisu izolovane obligatno psihrofilne acidofilne bakterije. Ekstremno termofilni acidofilni mikroorganizmi su isključivo arhea. Neke vrste termofilnih arhea su izolovane iz geotermalnih izvora u kojima je temperatura vode blizu temperature ključanja. Termofilna i acidofilna arhea *Acidianus infernus* živi na temperaturama od 90-96 °C (Johnson, 1998). Ekstremno acidofilni mikroorganizmi žive u staništima čija je pH <3, dok umereno acidofilni mikroorganizmi nastanjuju životnu sredinu čija je pH vrednost između 3 i 5.

1.4.5 METABOLIČKA OKSIDACIJA GVOŽĐA, SUMPORA I REDUKOVANIH JEDINJENJA SUMPORA

Gvožđe je najzastupljeniji prelazni metal u litosferi, kao i element koji čini najveći deo mase litosfere. Pri neutralnim pH vrednostima hemijske osobine gvožđa utiču na veoma ograničenu biološku dostupnost ovog elementa. U rastvorima se gvožđe nalazi u obliku Fe²⁺ ili Fe³⁺ jona. Oksidaciono stanje gvožđa zavisi od prisustva kiseonika. U sredini zasićenom kiseonikom gvožđe je uglavnom u oksidisanom obliku

Fe^{3+} . Na pH 7, pri koncentraciji O_2 od 100 mgL^{-1} , brzina spontane (abiotičke) oksidacije Fe^{2+} jona iznosi $8,4 \text{ mg min}^{-1}$, dok je na pH 2 brzina oksidacije Fe^{2+} jona $8,4 \times 10^{-7} \mu\text{gmin}^{-1}$. U kiseljoj sredini, spontana abiotička oksidacija gvožđa ne konkuriše biološkoj oksidaciji gvožđa, što je jedan od razloga za znatno veću biološku dostupnost gvožđa u ovoj sredini. Drugi razlog zbog kojeg je gvožđe dostupnije mikroorganizmima pri niskim pH vrednostima sredine je razlika u stepenu rastvorljivosti jona gvožđa između pH neutralne i kisele sredine. Teorijski izračunata maksimalna koncentracija nekompleksovanih Fe^{2+} jona pri pH 2 iznosi 140 mgL^{-1} , na pH 4 maksimalna koncentracija nekompleksovanih Fe^{2+} jona u rastvoru iznosi 140 ngL^{-1} , dok na pH 7 ova vrednost iznosi samo $0,14 \text{ fgL}^{-1}$ (Johnson et al., 2012).

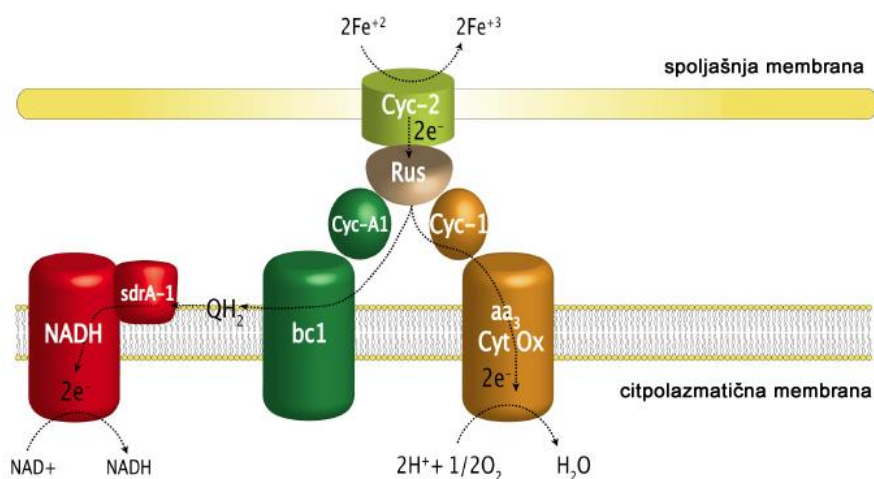
Pored navedenih razloga, postoje i energetski razlozi koji favorizuju biološku oksidaciju Fe^{2+} jona u kiseljoj sredini. U pH neutralnoj sredini redoks potencijal $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ para iznosi $+770 \text{ mV}$, dok je potencijal redoks para $0,5\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = +850 \text{ mV}$, prema tome razlika u redoks potencijalima ova dva redoks para iznosi samo $+80 \text{ mV}$ (Konhauser, 2007). U kiseljoj sredini na pH 2 redoks potencijal $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redoks para iznosi $+700 \text{ mV}$, dok je redoks potencijal para $0,5\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = +1,12 \text{ V}$, pa je razlika redoks potencijala u ovom slučaju približno $+420 \text{ mV}$ (Johnson et al., 2012). Oksidacijom jona gvožđa u kiseljoj sredini u prisustvu kiseonika kao terminalnog akceptora elektrona oslobađa se značajno više energije u poređenju sa istim procesom koji se odvija u pH neutralnoj sredini. U pH neutralnoj sredini oksidacijom jednog mola Fe^{2+} jona oslobađa se -30 kJmol^{-1} energije, dok isti hemijski proces u kiseljoj sredini oslobađa $-138,89 \text{ kJmol}^{-1}$ energije (Johnson and Hallberg, 2009). Mnogi acidofilni mikroorganizmi u nedostatku gvožđa kao supstrat za oksidaciju koriste sumpor i redukovana jedinjenja sumpora (RJS). Oksidacijom sumpora se oslobađa 507 kJmol^{-1} , dok se oksidacijom tetrationata ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) oslobađa 1225 kJmol^{-1} . Međutim, i pored znatno veće količine energije koja se oslobađa oksidacijom jednog mola sumpora i RJS, acidofilni mikroorganizmi kao što je *Acidithiobacillus ferrooxidans* preferiraju gvožđe i preći će na oksidaciju sumpora samo ukoliko u sredini nema dovoljno Fe^{2+} jona. Poređenje brzine oksidacije Fe^{2+} jona i tetrationata pokazalo je da mikroorganizmi daleko brže oksiduju Fe^{2+} u odnosu na tetrationat. Acidofilni mikroorganizmi poseduju konstitutivne mehanizme za oksidaciju Fe^{2+} , dok oksidacija sumpora i RJS zahteva sintezu nekoliko novih enzima, što iziskuje utrošak energije i vremena, pa se ovaj

metabolički put aktivira samo kada bakterije nemaju na raspolaganju dovoljno Fe²⁺ jona. Količina energije koja se oslobodi u jedinici vremena tokom mikrobiološke oksidacije gvožđa i tetracionata je veoma slična (tabela 3; Johnson and Hallberg, 2009).

Tabela 3. Poređenje brzine oksidacije jona gvožđa i tetracionata i energija oslobođena prilikom oksidacije ovih jedinjenja u jedinici vremena (prema Johnson and Hallberg, 2009).

Donor elektrona	Brzina oksidacije mmol min⁻¹ gprotein⁻¹	Oslobođena energija Jmin⁻¹ gprotein⁻¹
Fe ²⁺	7,9 ± 0,21	237 ± 6
S ₄ O ₆ ²⁻	0,21 ± 0,027	260 ± 33

Oksidacija gvožđa i sumpora je najbolje izučena kod bakterije *At. ferrooxidans*. Fero jon predaje elektron kratkom elektron transportnom lancu kojeg čine citohrom c-2, rusticijanin (protein koji sadrži bakar), citohrom c₁ i citohrom oksidaza koja na kraju lanca predaje elektron molekulu kiseonika. Alternativni transportni put elektrona vodi ka redukciji NAD⁺ u NADH + H⁺ koji je nepohodan kao donor elektrona tokom procesa fiksacije CO₂ u Kalvinovom ciklusu. Pošto je oksido-redukциони potencijal redoks para Fe²⁺/Fe³⁺ znatno pozitivniji u odnosu na redoks potencijal para NAD⁺/NADH + H⁺ koji iznosi -320 mV, acidofilne bakterije moraju uložiti energiju dobijenu hidrolizom ATP (adenozin-tri-fosfata) da bi redukovale NAD⁺ (slika 3). Ovaj put se u literaturi označava kao kretanje elektrona nasuprot gradijentu redoks potencijala (eng. *uphill pathway*; Konhauser, 2007, Johnson and Hallberg, 2009, Johnson et al., 2012).



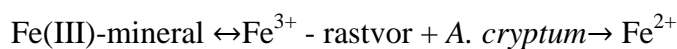
Slika 3. Biohemijski mehanizam oksidacije gvožđa bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Cyc-2: citohrom C-2, Rus: rusticijanin, Cyc-1: citohrom C-1, Cyt-Ox: citohrom oksidaza, Cyc-A1: citohrom A-1, QH₂: ubikinon, NADH: NADH dehidrogenaza (izvor Valdés et al., 2008).

Citoplazma acidofilnih mikroorganizama je pH neutralna, dok je pH vrednost životne sredine niska, tako da između unutrašnjosti ćelije i spoljašnje sredine postoji veliki gradijent u koncentraciji protona koji enzim ATPaza koristi za ATP. Međutim, nekontrolisani ulazak protona u citoplazmu bi doveo do snižavanja pH vrednosti citoplazme i smrti ćelije. Elektronski transportni lanac omogućuje acidofilnim mikroorganizmima izbacivanje viška protona iz ćelije. Iako na prvi pogled deluje da život u uslovima ogromnog protonskog gradijenta omogućuje sintezu neograničene količine energije, acidofilni mikroorganizmi vode stalnu borbu sa prodorom viška protona u ćeliju oksidujući srazmerno velike količine gvožđa i troše značajne količine molekula ATP za redukciju NAD⁺ koji je neophodan za sintezu organskih molekula. Zbog toga je rast acidofilnih hemolitoautotrofnih gvožđe oksidujućih bakterija spor u odnosu na bakterije koje žive u pH neutralnoj sredini (Konhauser, 2007, Johnson, 2012).

1.4.6 ANAEROBNA RESPIRACIJA REDUKCIJOM FERIJONA

Većina acidofilnih bakterija može opstati i u anaerobnim uslovima koristeći Fe³⁺ jon umesto kiseonika kao krajnjeg akceptora elektrona u respiratornom lancu. Zbog visokog pozitivnog redoks potencijala Fe²⁺/Fe³⁺ redoks para, acidofilni mikroorganizmi mogu opstati u anaerobnim uslovima samo ukoliko je krajnji primalac elektrona Fe³⁺

jon, dok supstrati za oksidaciju mogu biti sumpor, redukovana jedinjenja sumpora ili organski molekuli (Johnson and Hallberg, 2009). Vrsta *Acidithiobacillus ferrooxidans*, zatim vrste koje pripadaju rodu *Sulfobacillus*, kao i većina heterotrofnih acidofilnih bakterija su fakultativni anaerobi (Coupland and Johnson, 2008). U nekim slučajevima se javlja i korespiracija pomoću kiseonika i Fe^{3+} (Johnson and Hallberg, 2009, Coupland and Johnson, 2008). Eksperimenti su pokazali da acidofilna heterotrofna bakterija *Acidiphilium cryptum* SJH može indukovati reduktivno rastvaranje minerala koji sadrže trovalentno gvožđe, kao što su jarozit, švertmanit, getit, amorfni gvožđe hidroksid (tabela 4; Bridge and Johnson, 2000, Coupland and Johnson, 2008). Za reduktivno rastvaranje ovih minerala nije neophodan direktan kontakt između bakterijskih ćelija i površine minerala. Takođe, dodavanje helatora koji vezuju gvožđe, kao što je EDTA, ubrzava rastvaranje minerala koji sadrže trovalentno gvožđe. Zaključak koji je izveden na osnovu ovih eksperimenata je da redukcija Fe^{3+} narušava ravnotežu između Fe^{3+} jona koji se nalaze u čvrstoj fazi (mineralu) i u rastvoru (Bridge and Johnson, 2000):



Redukcija rastvorenih Fe^{3+} jona se može prikazati sledećom jednačinom, pri čemu glukoza predstavlja hipotetički donor elektrona:



Redukcija feri jona generiše H^+ jone snižavajući pH sredine, dok redukcija trovalentnog gvožđa u švertmanitu generiše hidroksilne jone, podižući pH sredine:

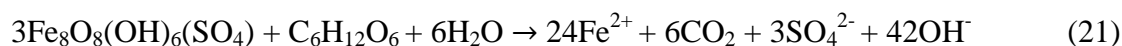


Tabela 4. Specifične brzine redukcije rastvorenih feri jona i trovalentnog gvožđa u mineralima dejstvom bakterije *Acidiphilium cryptum* (prema Bridge and Johnson, 2000)

Rastvoreno gvožđe / mineral	Brzina redukcije Fe³⁺ µgmin⁻¹ mgprotein⁻¹
Rastvoreni Fe ³⁺ jon	1,46 ± 0,46
Amorfni gvožđe-hidroksid	0,76 ± 0,10
Magnetit	0,33 ± 0,04
Getit	0,17 ± 0,05
Jarozit	0,06 ± 0,02
Akagnetit	0,06 ± 0,05
Hematit	0,01 ± 0,01

1.4.7 MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET EKSTREMNO KISELIH STANIŠTA

Kisele vode predstavljaju ekstremnu životnu sredinu, zbog čega je biološki diverzitet u tim staništima ograničen. Kisela staništa koja su izložena sunčevoj svetlosti nastanjuje nekoliko vrsta bakterija, a često su prisutne i arhea, kao i eukariotski organizmi koji su prilagođeni na život u kiseloj sredini: jednoćelijske i končaste alge, gljive i protozoe. Najekstremnija kisela staništa u pogledu pH vrednosti i temperature nastanjuju isključivo arhea.

Waxman i Joffe su 1922. godine izolovali prvi acidofilni mikroorganizam, sumpor-oksidujuću bakteriju *Thiobacillus thiooxidans* (Waxman and Joffe, 1922). Nekoliko godina kasnije izolovana je bakterija koja je, pored mogućnosti oksidacije sumpora i redukovanih jedinjenja sumpora, imala i sposobnost oksidacije Fe²⁺ jona. Izolovani mikroorganizam je okarakterisan i nazvan *Thiobacillus ferrooxidans* da bi, znatno kasnije, ovaj rod dobio novi naziv *Acidithiobacillus* (Kelly and Wood, 2000). Primarni proizvođači organske materije u podzemnim kiselim staništima su hemolitoautotrofne bakterije, dok staništa izložena sunčevoj svetlosti nastanjuju i acidofilne jednoćelijske i končaste alge, koje preuzimaju ulogu primarnih proizvođača organske materije (Johnson, 2012). Heterotrofne acidofilne bakterije su otkrivene tek sedamdeset godina nakon otkrića hemolitoautotrofnih acidofila (Johnson, 2009).

Izvori organskog ugljenika u kiseloj sredini su vrlo oskudni. Acidofilni heterotrofi uglavnom metabolišu organska jedinjenja koja se oslobode iz ćelija autotrofnih acidofila, ili dospeju u životnu sredinu nakon liziranja bakterijskih ćelija, zbog čega je broj heterotrofnih acidofila obično znatno manji u odnosu na autotrofne acidofile (Johnson, 1998). Izuzetak od ovog pravila su ekstremno kisela jezera u kojima su primarni proizvođači organske materije alge koje obezbeđuju dovoljnu količinu organskih molekula koji omogućuju dominaciju heterotrofnih acidofila u ovim staništima (Wendt-Potthoff, 2013). Najrasprostranjeniji, i prvi izolovani, acidofilni heterotrof je bakterija *Acidiphilium cryptum*. Nakon *A. cryptum* je izolovano i okarakterisano više vrsta acidofilnih heterotrofnih bakterija. Heterotrofni acidofili uglavnom metabolišu male organske molekule: alifatične organske kiseline kratkog lanca, monosaharide, glicerol i druga organska jedinjenja male molekulske mase, dok je sposobnost ovih bakterija da metabolišu organske polimere veoma ograničena (Nancucheo and Johnson, 2012). Koncentracija sulfata u kiselim staništima je često izuzetno velika, zbog čega su naučnici pretpostavljali da u ovim staništima žive i anaerobne bakterije koje redukuju sulfate (eng. *Sulfate Reducing Bacteria* – SRB). Pošto su SRB anaerobi, nastanjuju sediment. U nekim uzorcima sedimenta iz kiselih staništa identifikovane su SRB koje opstaju na umereno niskim pH vrednostima - od 3,8 do 5 (Johnson, 2009). U odnosu na kisele vode, pH vrednost sedimenta je uvek viša, zato ove bakterije nisu imale potrebu da se prilagode na život u ekstremno kiseloj sredini. Većina acidofilnih bakterija su fakultativni anaerobi (Coupland and Johnson, 2008).

1.4.7.1 Rod *Leptospirillum*

Predstavnici roda *Leptospirillum* su Gram negativne bakterije svrstane u razdeo Nitrospira. Do sada su identifikovana tri predstavnika ovog roda: *L. ferrooxidans*, *L. ferriphilum* i *L. ferrodiazotrophum* (Baker and Banfield, 2003, Johnson, 2007). To su spiralno uvijene štapićaste bakterije dužine od 0,9 do 3,5 mikrometara koje poseduju bič i veoma su pokretljive. Uvođenjem metoda molekularne biologije u ispitivanje mikrobiološkog diverziteta kiselih staništa utvrđeno je da su predstavnici ovog roda, posebno vrsta *L. ferrooxidans*, često najzastupljeniji mikroorganizmi u ovim staništima (Baker and Banfield, 2003). Predstavnici roda *Leptospirillum* su visoko specijalizovani hemolitoautotrofni obligatni aerobi koji energiju obezbeđuju isključivo oksidacijom

Fe²⁺ jona. Zajednička metabolička karakteristika ovog roda je i sposobnost fiksacije atmosferskog azota. Dobro rastu u uslovima niske pH vrednosti i visokog pozitivnog redoks potencijala sredine (Rawlings et al., 1999, Rawlings 2005). Optimalne pH vrednosti za život *Leptospirillum ferrooxidans* se kreću od 1,6 do 2 (Baker and Banfield, 2003). *Leptospirillum ferrooxidans* toleriše izuzetno visoke koncentracije Fe³⁺ i visoke vrednosti pozitivnog redoks potencijala sredine - u komercijalnim bioreaktorima *L. ferrooxidans* je opstajao pri 800 mM koncentraciji Fe³⁺ jona, kao i u rastvorima čiji je redoks potencijal bio oko +1000 mV (Said, 1990, Rawlings et al., 1999, Baker and Banfield, 2003). *Leptospirillum ferrooxidans* DMZ2705 opstaje u opsegu pH vrednosti od 1,3 do 4,0 dok je optimalna pH vrednost za rast ove bakterije između 1,6 i 2,0. *Leptospirillum ferriphilum* najbolje raste u opsegu pH vrednosti od 1,4 do 1,8 i temperature od 45 do 50 °C, pa se klasifikuje kao umereno termofilni mikroorganizam. Ova vrsta opstaje i u izuzetno kiseloj sredini; *L. ferriphilum* je identifikovan u uzorcima kisele rudničke vode u rudniku Ričmond (SAD) čija je pH vrednost bila oko 0 (Baker and Banfield, 2003). Ova vrsta često dominira u bakterijskim konzorcijumima izolovanim iz bioreaktora u kojima se vrši bioluženje mineralnih koncentrata. *Leptospirillum ferrodiazotrophum* je poslednja opisana vrsta ovoga roda i najmanje je izučavana. Ova acidofilna bakterija je identifikovana u uzorku biofilma uzetom iz rudnika Ričmond (Bond et al., 2000).

1.4.7.2 Rod *Acidithiobacillus*

Bakterije svrstane u rod *Acidithiobacillus* su Gram-negativne štapičaste hemolitoautotrofne bakterije, pripadaju razdelu proteobakterija i klasi γ proteobacteria. Nedavno je predložena reklasifikacija roda *Acidithiobacillus* u novu klasu Acidithiobacillia (Williams and Kelly, 2013). Do sada je identifikovano pet vrsta u okviru ovog roda. Vrsta *Acidithiobacillus thiooxidans* je prvi izolovani i okarakterisani acidofilni mikroorganizam (Waxman and Joffe, 1922). Ova bakterija je obligatni aerob koji kao supstrat za oksidaciju koristi elementarni sumpor i redukovana jedinjenja sumpora. Optimalna temperatura za rast ove vrste je od 20 do 35 °C, a opstaje i u sredini čija pH vrednost iznosi samo 0,5. *Acidithiobacillus caldus* ima slične fiziološke karakteristike kao *At. thiooxidans*, s tom razlikom što je *At. thiooxidans* mezofilna bakterija, dok je *At. caldus* umereni termofil koji najbolje raste na temperaturama od 45 do 55 °C. *Acidithiobacillus albertensis* je vrsta koja je po fiziološkim karakteristikama

slična vrsti *At. thiooxidans*, ali se ove dve vrste acidofila verovatno genetički razlikuju s obzirom na značajne razlike u procentu GC parova u genomu.

Acidithiobacillus ferrooxidans je generalista koji koristi širok spektar supstrata za oksidaciju: Fe^{2+} , sumpor i razna redukovana jedinjenja sumpora. Optimalna pH vrednost za rast ove bakterije je u opsegu od 2 do 2,5, redoks potencijal sredine oko +100 mV, a temperatura 25 - 30 °C. Ova vrsta može opstati u širokom temperaturnom opsegu, što potvrđuju izolovani sojevi koji uspešno rastu i na 5 °C (Johnson, 1998, 2007, 2009). *Acidithiobacillus ferrivorans*, vrsta izolovana iz napuštenog rudnika u Norveškoj, je psihrotolerantna bakterija koja opstaje na niskim temperaturama (Hallberg et al., 2010). Vrste koje pripadaju ovom rodu su fakultativni anaerobi.

1.4.7.3 Rod *Acidiphilium*

Rodu *Acidiphilium* pripadaju heterotrofne acidofilne bakterije svrstane u klasu α proteobacteria, sa izuzetkom vrste *Acidiphilium acidophilum* koja je fakultativni hemolitoautotrof i može koristiti sumpor kao jedini izvor energije. Do sada je identifikovano šest vrsta koje pripadaju ovom rodu (Johnson, 2009). Ove bakterije su veoma rasprostranjene u kiselim staništima - prilagođene su životu na temperaturama od 17 do 45 °C i pH vrednostima sredine od 1,5 do 6 (Baker and Banfield, 2003). Najzastupljenija vrsta ovog roda, *A. cryptum* soj SJH je mezofilna bakterija koja je optimalno prilagođena na život u opsegu pH od 2,5 do 3. Eksperimentalno je pokazano da vrste roda *Acidiphilium* mogu vršiti reduktivno rastvaranje minerala koji sadrže trovalentno gvožđe, kao što su jarožit, getit, švertmanit i amorfni gvožđe hidroksid (Bridge and Johnson, 2000). Vrste koje pripadaju ovom rodu stvaraju bakteriohlorofil *a* koji sadrži atom cinka. *Acidiphilium rubrum* stvara najveću količinu bakteriohlorofila *a* i dokazano je da može vršiti fotosintezu (Wakao et al., 1996). Sve vrste koje pripadaju ovom rodu su fakultativni anaerobi.

1.4.7.4 Rod *Sulfobacillus*

Bakterije iz roda *Sulfobacillus* su svrstane u razdeo Firmicutes: Gram-pozitivne sporogene bakterije. Do sada su identifikovane četiri vrste bakterija u okviru ovog roda: *S. thermosulfidooxidans*, *S. acidophilus*, *S. sibiricus*, *S. thermotolerans* (Golovacheva and Karavaiko, 1977, Bogdanova et al., 2006, Watling et al., 2008). Predložene su i nove vrste: *S. montserratensis* (srodna vrsti *S. thermotolerans*) i *S. yellowstonensis* koja je filogenetski bliska vrsti *S. acidophilus* (Johnson, 2007). Ovi mikroorganizmi su

miksotrofi i karakteriše ih izrazita metabolička fleksibilnost. Primarno su hemoorganoheterotrofi, ali prema potrebi mogu u potpunosti preći na hemolitoautotrofan metabolizam. Ove bakterije oksidišu organska jedinjenja, gvožđe i sumpor, dok izvor ugljenika mogu biti organska jedinjenja i CO₂. Pripadnici roda *Sulfobacillus* su fakultativni anaerobi, kiseonik mogu zameniti Fe³⁺ jonima. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* i *S. acidophilus* su umereno termofilne bakterije sa optimalnom temperaturom za rast od 47 °C, a tolerišu temperature do 60 °C. Predložena nova vrsta *S. montserratensis* ima niži temperaturni optimum - 37 °C, i može rasti na pH 0,8. Vrsta *S. thermotolerans* opstaje u širokom temperaturnom opsegu: od 3 °C do 61 °C, sa optimalnom temperaturom za rast od 45 °C (Bogdanova et al., 2006, Watling et al., 2007). U rudniku Ričmond (SAD) pronađene su bakterije iz roda *Sulfobacillus* u kiselim rastvorima čija se pH vrednost kretala između 0,7 i 0,9 a temperatura između 35 i 43 °C. Ispitivanja populacije mikroorganizama u kiselim vodama ovog rudnika primenom metoda molekularne biologije su pokazala da sulfobacilusi čine 6-8 % od ukupnog broja mikroorganizama (Baker and Banfield, 2003).

1.4.7.5 Rod *Alyciclobacillus*

Rodu *Alyciclobacillus* (razdeo Firmicutes) pripadaju gram pozitivne, umereno termofilne, heterotrofne, sporogene acidofilne bakterije filogenetski bliske rodu *Sulfobacillus*. Identifikovano je 18 vrsta bakterija koje pripadaju ovom rodu (Cheng-Ying et al., 2008). Većinu vrsta ovog roda karakteriše prisustvo omega-alicikličnih masnih kiselina u ćelijskoj membrani, po čemu je ceo rod dobio ime. Većina vrsta aliciklobacilusa su obligatni heterotrofi. Do sada su identifikovane tri vrste koje imaju sposobnost oksidacije gvožđa, sumpora i redukovanih jedinjenja sumpora: *Alc. tolerans*, *Alc. disulfidooxidans* i *Alc. ferrooxidans*. Mikroorganizmi svrstani u ovaj rod uglavnom nastanjuju umereno kiselu sredinu čija se pH kreće između 3 i 4, mada mogu opstati u opsegu pH između 2 i 6 (Cheng-Ying et al., 2008, Johnson, 2009).

1.4.7.6 Rod *Acidocella*

Acidocella sp. su umereno acidofilne heterotrofne bakterije svrstane u klasu α proteobacteria. Metabolišu male organske molekule (alkohole, monosaharide i neke amino-kiseline), dok vrsta *A. aromatica* metaboliše i aromatična jedinjenja. Većina vrsta roda *Acidocella* su fakultativni anaerobi. *A. organivorans* opstaje na

temperaturama do 65 °C i predstavlja acidofilnu bakteriju koja toleriše najviše temperature sredine (Johnson 2007, 2009, Hallberg 2010).

1.4.7.7 Rodovi *Acidimicrobium* i *Ferrimicrobium*

Acidimicrobium i *Ferrimicrobium* pripadaju razdelu Actinobacteria. Do sada je opisana po jedna vrsta koja pripada ovim rodovima. Zajednička osobina ovih bakterija je sposobnost oksidacije gvožđa (hemolitotrofi) i nemogućnost korišćenja sumpora i redukovanih jedinjenja sumpora kao izvora energije. Ove bakterije su heterotrofi, pošto kao izvor ugljenika koriste organska jedinjenja (hemolitoheterotrofi). *Acidimicrobium ferrooxidans* je umereno termofilna bakterija, dok je *Ferrimicrobium acidiphilium* mezofilna bakterija (Johnson 2007, 2009).

1.4.8 METODE ZA IZUČAVANJE MIKROBIOLOŠKOG DIVERZITETA

Tradicionalne tehnike identifikacije bakterija su podrazumevale kultivaciju čistih kultura bakterija u laboratorijskim uslovima. Osnovni nedostatak ove metode je nemogućnost da se ogromna većina od ukupnog broja bakterija koje nastanjuju neku životnu sredinu kultiviraju u laboratoriji. Procenjuje se da je, na primer, moguće kultivirati samo između 0,1 i 1 % od ukupnog broja različitih mikroorganizama koji nastanjuju zemljište (Torsvik and Ovreas, 2002). Početkom devedesetih godina prošlog veka usavršene su tehnike molekularne biologije koje su omogućile analizu raznovrsnosti bakterijskih populacija u životnoj sredini bez potrebe za kultivacijom čistih bakterijskih kultura, što je omogućilo potpuniji uvid u diverzitet mikroorganizama u prirodi. Pristup kojim se, teorijski, mogu analizirati genomi svih bakterijskih sojeva prisutnih u uzorku naziva se metagenomika ili metagenomska analiza.

1.4.8.1 Klasične metode kultivacije i izolacije acidofilnih bakterija

Najbolji rezultati u gajenju acidofilnih bakterija se postižu primenom dvoslojnih podloga koje je prvi opisao Johnson (1995). Dvoslojne podloge omogućuju rast acidofilnih bakterija koje su inače veoma osetljive na prisustvo organskih molekula, posebno malih alifatičnih organskih kiselina. Organske kiseline su u kiseloj sredini nedisosovane. Međutim, ako dospeju u pH neutralnu citoplazmu acidofilnih mikroorganizama, ove kiseline disosuju i snižavaju pH citoplazme što dovodi do smrti mikroorganizma.

Dvoslojne podloge se sastoje od donjeg, tanjeg sloja koji je inokulisan heterotrofnim acidofilnim bakterijama *Acidiphilium cryptum* ili *Acidocella aromatica*, i gornjeg debljeg sloja na koji se zasejavaju bakterije iz uzorka. Heterotrofne bakterije koje rastu u donjem sloju podloge metabolišu organske kiseline koje nastaju kao proizvod metabolizma mikroorganizama i molekule koji su produkti hidrolize agaroze u kiseloj sredini. Uklanjanje alifatičnih organskih kiselina i drugih organskih molekula iz podloge omogućuje rast različitim vrstama acidofila. U zavisnosti od sastava medijuma, na ovim podlogama se mogu kultivisati gvožđe-oksidujuće, sumpor oksidujuće i heterotrofne acidofilne bakterije.

1.4.8.2 Metode molekularne biologije za identifikaciju mikroorganizama

U ranoj fazi razvoja mikrobiologije, bakterije su klasifikovane na osnovu fenotipskih karakteristika, mesta odakle su izolovane, patogenosti. Šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka bakterije su najčešće klasifikovane na osnovu serije biohemijskih testova. Pomoću ovih testova određivan je procenat fenotipske sličnosti među ispitivanim sojevima. Sojevi su svrstavani u istu vrstu ako je procenat sličnosti bio veći od 80 %. Međutim, čak i 100-200 biohemijskih testova pokriva samo 5-20 % ukupnog genetičkog potencijala bakterija (Prosser et al., 2010).

Razvojem tehnika molekularne biologije uvedene su nove, savršenije metode koje su omogućile precizniju identifikaciju i bolju klasifikaciju bakterija. Jedna od prvih molekularnih metoda primenjenih za identifikaciju i klasifikaciju bakterijskih vrsta je hibridizacija molekula DNK izolovanih iz različitih mikroorganizama. Hibridizacija DNK se zasniva na osobini ovog molekula da sa povećanjem temperature molekul DNK denaturiše (dolazi do potpunog razdvajanja lanaca molekula DNK), a smanjenjem temperature molekul DNK renaturiše (lanci se ponovo sparuju). Na ovaj način je moguće hibridizovati lance DNK izolovane iz različitih mikroorganizama. Prilikom sparivanja heterodupleksa (molekula DNK kojeg čine dva lanca poreklom iz različitih mikroorganizama) određeni procenat azotnih baza će ostati nesparen. Procenat nesparenih azotnih baza ukazuje na genetičku različitost među ispitivanim mikroorganizmima, što je veći procenat nesparenih baza, već je filogenetska udaljenost između ispitivanih vrsta mikroorganizama.

Tačka topljenja T_m predstavlja temperaturu na kojoj je 50% molekula DNK denaturisano. Tačka topljenja heterodupleksa je niža u odnosu na homologe lance DNK

s obzirom da su lanci DNK heterodupleksa delimično nesporeni, dok su homologni lanci DNK u potpunosti sporeni. Veća razlika u tački topljenja ukazuje na veću razliku među ispitivanim molekulima DNK. Vrednost ΔT_m predstavlja razliku u tačkama topljenja između heterologe i homologe DNK i varira od 0 °C (potpuno sparivanje) do 20 °C pri čemu svaki stepen razlike predstavlja približno 1% nesporenih baza. Na osnovu brojnih eksperimenata hibridizacije DNK uvedena je definicija bakterijske vrste: „*Ako je tokom eksperimenata hibridizacije više od 70 % DNK iz ispitivanih sojeva hibridizovano i razlika u tački topljenja između homologe i heterologe DNK ΔT_m nije veća od 5 °C ispitivani sojevi pripadaju istoj vrsti*“ (Brenner et al., 2001).

Hibridizacija DNK je postupak koji iziskuje ulaganje mnogo vremena i rada, što je suprotno zahtevima mikrobiologa kojima je bio potreban brz i efikasan metod za identifikaciju i klasifikaciju mikroorganizama. Rešenje je nađeno u poređenju sekvenci 16S ribozomalne RNK iz male subjedinice bakterijskih ribozoma. Ovaj molekul je najvećim delom konzervisan tokom evolucije. Na osnovu malih razlika u sekvenci gena za 16S rRNK moguće je izvršiti filogenetsku klasifikaciju bakterija. Empirijski je utvrđeno da ukoliko sličnost između dve sekvence 16S rRNK iznosi 97% ili više, ispitivane bakterije pripadaju istom rodu, a možda i istoj vrsti (Brenner et al., 2001). Danas postoje javno dostupne baze podataka, kao što su GenBank i Ribosomal Data Base, u kojima je deponovan veliki broj sekvenci gena za 16S rRNK. Postupak taksonomske identifikacije mikroorganizama se zasniva na umnožavanju gena za 16S rRNK pomoću PCR metode i sekvenciranju gena u automatskom DNK sekvenceru, to jest utvrđivanju redosleda nukleotida u genu za 16S rRNK. Nakon toga se poređenjem dobijene sekvence sa podacima iz baze podataka može identifikovati klasa, rod ili vrsta kojoj je proučavani soj filogenetski najbliži.

1.4.8.3 Lančana reakcije polimerizacije (eng. Polymerase Chain Reaction – PCR)

PCR je jedna od osnovnih tehnika molekularne biologije koja omogućuje umnožavanje (amplifikaciju) određenog fragmenta molekula DNK (gena) u ogromnom broju kopija (koji se meri milijardama) za relativno kratko vreme. Na taj način se dobija dovoljno DNK materijala za dalje analize. PCR metoda se zasniva na prirodnom procesu replikacije molekula DNK za koji je potrebna DNK matrica (fragment DNK

koji se umnožava), enzim DNK polimeraza i četiri vrste nukleotida. Ova metoda je vrlo osetljiva, pa je za amplifikaciju dovoljna veoma mala količina DNK.

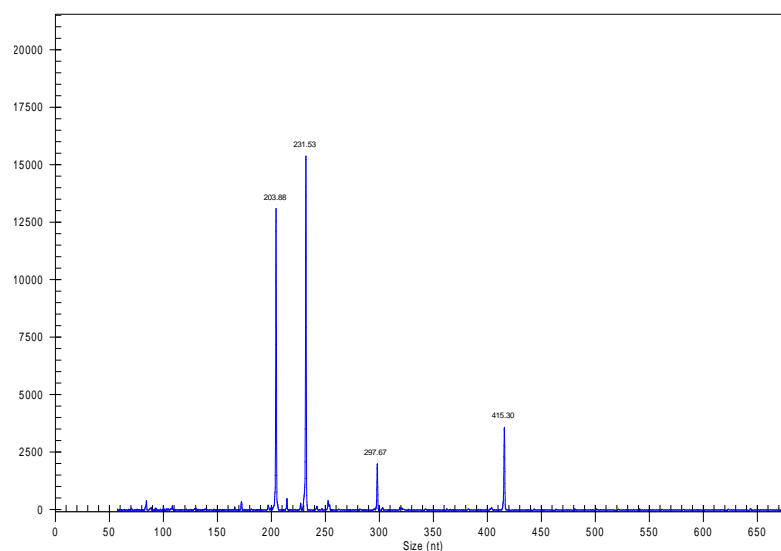
PCR reakcija počinje zagrevanjem reakcione smeše na temperaturu od 95 °C. Na ovoj temperaturi se molekuli DNK denaturišu. Za molekuli DNK se vezuje enzim DNK polimeraza koji sintetiše komplementarni lanac DNK. Da bi započela sintezu novog dvolančanog molekula DNK, enzim DNK polimeraza se mora vezati za oligonukleotid (eng. *primer*) koji formira kratki dvolančani segment DNK. Prajmeri omogućuju ciljanje određenog gena koji se želi umnožiti. Hibridizacija prajmerna sa DNK matricom (eng. *annealing*) se odigrava na temperaturama od 42-65 °C. Nakon hibridizacije sledi elongacija - sinteza komplementarnog lanca DNK ugradnjom odgovarajućih nukleotida pomoću DNK polimeraze. Elongacija se dešava na temperaturi od 72 °C i katalizovana je termostabilnim DNK polimerazama izolovanim iz termofilnih bakterija. Nakon elongacije, ponovo sledi denaturacija i opisani ciklus se ponavlja 25-40 puta (Mullis and Faloona 1987, Romac i sar., 1999).

1.4.8.4 Analiza polimorfizama dužine terminalnih restrikcionih fragmenata (eng. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)

Metoda analize polimorfizama terminalnih restrikcionih fragmenata (T-RFLP) omogućuje relativno jednostavnu i brzu identifikaciju mikroorganizama u uzorcima uzetim iz životne sredine, kao i procenu relativne zastupljenosti mikroorganizama u uzorku. Primenom odgovarajućih statističkih metoda, moguće je pratiti prostorne i vremenske promene u sastavu zajednice mikroorganizama (Osborn et al., 2000, Schutte et al., 2008).

Primena T-RFLP metode za identifikaciju mikroorganizama i procenu mikrobiološkog diverziteta se zasniva na digestiji PCR amplifikovanih gena za 16S rRNK pomoću endonukleaza, enzima koji seku molekuli DNK prepoznajući određenu kratku sekvencu nukleotida. S obzirom da endonukleaze prepoznaju specifičan kratki niz nukleotida, usled razlika u strukturi gena za 16S rRNK među mikroorganizmima koji pripadaju različitim taksonima, endonukleaze će preseći gen za 16S rRNK na različitim mestima, i kao rezultat digestije nastaje fragmenti različite dužine. Ukoliko je prajmer koji se koristi za PCR amplifikaciju 16S rRNK gena obeležen fluorescentnom bojom na 5' kraju, moguće je odrediti dužinu fragmenata dobijenih nakon digestije pomoću mašine za kapilarnu elektroforezu (DNK sekvencera) i odgovarajućeg softvera.

Rezultat je prikazan u obliku elektroferograma na kojem je na apscisi prikazana dužina fragmenta a na ordinati relativni intenzitet fluorescentnog zračenja za odgovarajući fragment (slika 4). Što je fragment zastupljeniji, intenzitet emitovanog zračenja će biti veći, što će rezultirati intenzivnijim signalom (eng. *peak*). Poređenjem dužina fragmenata sa podacima u odgovarajućim bazama podataka teorijski je moguće identifikovati mikroorganizme prisutne u analiziranom uzorku. T-RFLP je semikvantitativna metoda pošto je na osnovu odnosa intenziteta signala kojeg su emitovali T-RF određene dužine i ukupnog intenziteta svih signala na elektroferogramu, moguće približno proceniti relativnu zastupljenost populacija mikroorganizama u uzorku (Liu et al., 1997).



Slika 4. Primer elektroferograma dobijenog digestijom metagenomske DNK jednostavne zajednice mikroorganizama.

Pošto se analiza terminalnih restrikcionih fragmenata zasniva na PCR amplifikaciji gena, ovaj metod ima neke nedostatake svojstvene PCR metodi. Nakon digestije se mogu pojaviti besmisleni fragmenti (pseudo T-RF) koji su posledica stvaranja heterodupleksa, himernih molekula i grešaka DNK polimerze. Formiranje sekundarnih struktura DNK dovodi do nastanka novih restrikcionih mesta, što takođe može rezultirati nastankom pseudo T-RF (Egert and Friedrich, 2003, Acinas et al., 2005). Pseudo T-RF otežavaju proces identifikacije mikroorganizama u uzorku i stvaraju teškoće prilikom identifikacije novih fragmenata koji možda pripadaju još neopisanim vrstama. Na zastupljenost amplifikovanih fragmenata mogu uticati faktori kao što je inhibicija amplifikacije zbog pojave samosparivanja najzastupljenijih

fragmenata DNK (eng. *self-annealing*), kao i različitog afiniteta prajmera prema različitim molekulima genomske DNK (Suzuki and Giovannoni, 1995, Acinas et al., 2005). Eksperimentalni podaci pokazuju da na T-RFLP profil utiču i faktori kao što su: broj ciklusa u PCR reakciji, temperatura anilinga i upotreba DNK polimeraza različitih proizvođača (Osborn et al., 2000, Egert and Friedrich, 2003). Da bi se redukovale varijacije u T-RFLP profilu koje su posledica navedenih nedostataka PCR metode, obično se rade tri nezavisne PCR amplifikacije istog uzorka. Na relativnu zastupljenost T-RF može uticati i broj kopija gena za 16S rRNK u bakterijskom genomu koji se kreće između 1 i 14. Takođe, izvesnu količinu šuma u T-RFLP profil unosi i pojava fragmenata koji su posledica delimične digestije amplifikovanih gena (Osborn et al., 2000). Da bi se smanjio ovaj šum obično se rade tri enzimske digestije za svaki pojedinačni enzim.

Veoma bitan faktor za uspešnu analizu T-RFLP profila je kvalitet baze podataka koja se koristi u procesu identifikacije mikroorganizama. Najobimnija javno dostupna baza podataka restrikcioni fragmenata je MICA (**M**icrobial **C**ommunity **A**nalysis) kojoj se može pristupiti preko web adrese <http://mica.ibest.uidaho.edu> (Shyu et al., 2007). Da bi se postigla bolja rezolucija T-RFLP profila, za digestiju amplifikovanih 16S rRNK gena se koristi više endonukleaza. Izborom odgovarajućeg broja i tipa endonukleaza povećava se broj dobijenih T-RF, kao i verovatnoća da će dobijeni fragmenti preciznije reflektovati diverzitet ispitivanog uzorka. Engbretson and Moyer (2003) su konstruisali bakterijske konzorcijume rastućeg diverziteta (od 5 do 100 operativnih taksonomskih jedinica¹) da bi zatim identifikovali mikroorganizme u uzorku na osnovu dobijenih T-RF. Pomenuti autori su prvo testirali diskriminativnu sposobnost pojedinačnih restrikcioni endonukleaza, a zatim su vršili digestiju koristeći kombinaciju četiri enzima koji su dali najbolje rezultate. Rezultati eksperimenata su pokazali da je upotrebom četiri najdiskriminativnije endonukleaze na uzorcima čiji je diverzitet bio 5 i 10 operativnih taksonomskih jedinica, identifikovano 99 %, odnosno 94 % od ukupnog broja operativnih taksonomskih jedinica. Sa povećanjem broja operativnih taksonomskih jedinica, smanjivala se pouzdanost T-RFLP analize (Engbretson and Moyer, 2003, Schutte et al., 2008). Na osnovu ovih rezultata, može se

¹ Operativna taksonomska jedinica predstavlja taksonomski nivo različitih mikroorganizama koji su korišteni tokom eksperimenta. Na primer, eksperimentatori mogu odabrati poređenje mikroorganizama različitih rodova, vrsta ili sojeva.

izvesti zaključak da je T-RFLP metoda dovoljno pouzdana za procenu diverziteta mikroorganizama u ekstremno kiselim staništima, koja karakteriše veoma ograničen mikrobiološki diverzitet.

1.5 EKOLOGIJA EKSTREMNO KISELIH STANIŠTA

U prirodnim i antropogenim kiselim staništima, acidofilni mikroorganizmi žive u zajednicama koje su često vrlo jednostavne, sačinjene od svega nekoliko vrsta acidofilnih bakterija, ali su opisane i kompleksnije zajednice u kojima učestvuju acidofilne bakterije, alge, gljive i protozoe (Rowe et al., 2007, Chunbo et al., 2010). Dugo je vladalo mišljenje da je *At. ferrooxidans* najzastupljeniji acidofilni mikroorganizam u prirodi. Međutim, zahvaljujući razvoju metoda molekularne biologije, ispostavilo se da je u velikom broju slučajeva *L. ferrooxidans* najzastupljeniji mikroorganizam u kiselim staništima. Pre nego što su razvijene molekularne metode za ispitivanje biodiverziteta životne sredine, raznovrsnost mikroorganizama u životnoj sredini je procenjivana klasičnim mikrobiološkim metodama zasejevanja uzorka na čvrste podloge. Za gajenje acidofilnih mikroorganizama najčešće su korištene podloge kao što je 9K, koje sadrže velike koncentracije gvožđe(II)sulfata ($9-30 \text{ gL}^{-1}$; Sliverman and Lundgren, 1959). Podloge kao što je 9K favorizuju rast *At. ferrooxidans* u odnosu na *L. ferrooxidans*, stoga je dugo vladalo pogrešno uverenje da je *At. ferrooxidans* dominantan acidofilni mikroorganizam u prirodi. Ispitivanjem uzoraka kisele rudničke vode iz rudnika Ričmond (SAD) primenom molekularnih metoda, pokazano je da *At. ferrooxidans* dominira u uzorcima u kojima je $\text{pH} > 1.3$ a temperatura $< 30 \text{ }^\circ\text{C}$, dok je *L. ferrooxidans* bio dominantan mikroorganizam u uzorcima u kojima je $\text{pH} < 1$, a temperatura iznad $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (Baker and Banfield, 2003).

1.5.1 MUTUALISTIČKI ODNOSI MEĐU ACIDOFILNIM MIKROORGANIZMIMA

Mutualizam je odnos između dve ili više vrsta u zajednici u kome svi organizmi koji čine zajednicu imaju koristi. Pored acidofilnih hemolitoautotrofnih mikroorganizama, iz kiselih staništa se redovno izoluju i acidofilni heterotrofni mikroorganizmi. Acidofilna heterotrofna bakterija *Acidiphilium cryptum* je redovno prisutna u kiselim staništima, pošto hemolitoautotrofne bakterije ne mogu opstati bez prisustva heteroorganotrofa. Hemolitoautotrofni acidofili su veoma osetljivi na

prisustvo organske materije u staništu, a posebno malih alifatičnih organskih kiselina. Ove kiseline su u kiseloj sredini u nedisosovanom obliku, međutim kada uđu u pH neutralnu citoplazmu acidofilnih autotrofa organske kiseline disosuju snižavajući pH vrednost citoplazme, što dovodi do prekida fizioloških procesa i smrti bakterije. Pošto hemolitoautotrofne acidofilne bakterije nemaju sposobnost metabolisanja organskih molekula, to za njih čine heterotrofi. Heterotrofne bakterije (kao što su pripadnici rodova *Acidiphilium*, *Acidocoella*, *Sulfobacillus*) efikasno metabolišu organska jedinjenja koja nastaju kao nusprodukti metabolizma autotrofnih acidofila (Johnson, 1998). Eksperimentalno je dokazano da filtrat medijuma u kojem je gajena bakterija *At. ferrooxidans* sadrži dovoljno organske materije da omogući heterotrofni rast bakterije *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Baker and Banfield, 2003).

1.5.2 KOMPETICIJA MEĐU ACIDOFILNIM MIKROORGANIZMIMA

U ekstremnim uslovima koji vladaju bioreaktorima za luženje mineralnih koncentrata (niska pH često blizu 1, povišena temperatura od približno 45 °C i visok pozitivan redoks potencijal) dominiraju vrste koje pripadaju rodu *Leptospirillum*, dok je *Acidithiobacillus ferrooxidans* značajno manje zastupljen ili ga uopšte nema. Eksperimentalno je dokazano da *At. ferrooxidans* ne opstaje u uslovima redoks potencijala iznad +850 mV, dok *L. ferrooxidans* opstaje i na +1000 mV (Rawlings et al., 1999). *Leptospirillum ferrooxidans* toleriše mnogo veće koncentracije Fe^{3+} jona, čak do 800 mM, i ima veći afinitet za Fe^{2+} jone (Said, 1990). Pošto je optimalna vrednost redoks potencijala za rast *At. ferrooxidans* oko +100 mV, u uslovima veće koncentracije Fe^{2+} jona u odnosu na Fe^{3+} jone (i sledstveno nižeg pozitivnog redoks potencijala sredine) *At. ferrooxidans* će rasti brže u odnosu na *L. ferrooxidans* i biće dominantan mikroorganizam u životnoj sredini. Međutim, u uslovima kada je koncentracija Fe^{3+} jona veća u odnosu na koncentraciju Fe^{2+} jona (viši pozitivan redoks potencijal), populacija *L. ferrooxidans* će brže rasti u odnosu na populaciju *At. ferrooxidans*. Na početku procesa bioluženja bakra koncentracija Fe^{2+} jona je veća od koncentracije Fe^{3+} jona (niži redoks potencijal), pH vrednosti sredine su umerenije i temperatura je niža, tako da u ovoj fazi uglavnom dominira *At. ferrooxidans*. Međutim, kako proces bioluženja napreduje, koncentracija Fe^{3+} jona raste dok se koncentracija Fe^{2+} jona drastično smanjuje, što uslovljava i rast redoks potencijala sredine, tako da u kasnijim

fazama bioluženja uglavnom dominiraju vrste iz roda *Leptospirillum* (Rawlings et al., 1999).

1.5.3 SINERGISTIČKE INTERAKCIJE MEĐU ACIDOFILNIM MIKROORGANIZMIMA

Sinergističke interakcije među acidofilnim mikroorganizmima se najbolje uočavaju tokom procesa bioluženja bakra. Za bioluženje bakra se mogu koristiti čiste kulture gvožđe-oksidujućih acidofila kao što je *At. ferrooxidans*, međutim poznato je da je ovaj proces efikasniji ukoliko se rastvor za luženje inokuliše konzorcijumom acidofilnih mikroorganizama različitih fizioloških osobina (Rawlings and Johnson, 2007). Primer sinergističkih interakcija među acidofilnim bakterijama je luženje bakra iz mineralnih koncentrata. Umereno termofilna acidofilna bakterija *L. feriphilum* je pogodna za primenu u bioreaktorima. Osim što podnosi povišene temperature, izuzetno niske pH vrednosti sredine i veoma visoke koncentracije Fe^{3+} jona, *L. feriphilum* i drugi pripadnici ovog roda efikasnije oksidišu Fe^{2+} jone u poređenju sa *At. ferrooxidans*. S druge strane, bakterije koje pripadaju rodu *Leptospirillum* su veoma osetljive na prisustvo organske materije (posebno alifatičnih organskih kiselina) i nemaju mogućnost oksidacije sumpora i redukovanih jedinjenja sumpora. Ovi problemi se rešavaju pravljenjem bakterijskih konzorcijuma koji sadrže gvožđe-oksidujuće bakterije (na primer *L. feriphilum*), zatim heterotrofne bakterije koja će metabolisati organska jedinjenja (obično vrste iz roda *Suflobacillus*, pripadnici roda *Acidiphilium* nisu pogodni pošto imaju niži prag tolerancije na jone bakra) i bakterije koje će oksidovati sumpor (*At. caldus*, na primer). Oksidacijom sumpora snižava se pH sredine i sprečava taloženje elementarnog sumpora na površini minerala. Taloženje sumpora može usporiti ili potpuno prekinuti proces bioluženja (Rawlings and Johnson, 2007, Johnson, 2008).

1.5.4 PREDATORSTVO

Kisela staništa nastanjuju i raznovrsne protozoe koje tolerišu kiselu sredinu. Protozoe se hrane acidofilnim bakterijama, i to uglavnom nepokretnim ili slabo pokretnim vrstama kao što je *At. ferrooxidans*, dok je mali i veoma pokretni *L. ferrooxidans* mnogo ređe plen protozoa (Johnson, 2009). Iz kiselih staništa su izolovani cilijati, flagelati i ameboidni organizmi (Johnson, 2009, Chunbo et al., 2010).

1.6 PRIMENA ACIDOFILNIH MIKROORGANIZAMA U BIOTEHNOLOGIJI

Acidofilni mikroorganizmi se najčešće primenjuju u procesu mikrobiološkog luženja bakra. Poslednjih nekoliko godina se razvija tehnologija za bioremedijaciju kiselih rudničkih voda uz selektivnu precipitaciju sulfida metala pomoću nedavno otkrivenih acidofilnih bakterija koje redukuju sulfate.

1.6.1 HIDROMETALURGIJA

Hidrometalurgija je naziv za tehnologiju ekstrakcije bakra iz ruda, mineralnih koncentrata ili jalovine pomoću kiselih vodenih rastvora koji se koriste za luženje bakra i izdvajanje čistog bakra iz lužnog rastvora. Luženje bakra je postupak solubilizacije ovog metala prisutnog u tretiranom materijalu u obliku sulfidnih ili oksidnih minerala. U procesu luženja vrši se oksidacija minerala i bakar se oslobađa u obliku rastvorljivih Cu^{2+} jona. Proces hidrometalurške proizvodnje bakra se odvija u tri faze: luženje bakra pomoću kiselih rastvora, koncentrovanje bakra i prečišćavanje lužnog rastvora pomoću tehnologija solventne ekstrakcije, jonske izmene, kristalizacije ili cementacije i, na kraju, izdvajanje čistog bakra iz rastvora primenom metoda elektrolitičke ekstrakcije ili precipitacije (Conić, 2015). S obzirom da su sulfidni minerali bakra rastvorljivi u kiseloj sredini, za luženje bakra se može koristiti samo razblaženi rastvor sumporne kiseline (kiselinsko luženje – eng. *acid leaching*). U postupku luženja bakra se mogu koristiti i kiselni rastvori koji sadrže acidofilne mikroorganizme. U literaturi se proces oksidativne solubilizacije bakra u prisustvu acidofilnih mikroorganizama naziva bioluženje (eng. *bioleaching*; Bosecker, 1997). Pojam biohidrometalurgija se odnosi na hidrometalurški postupak proizvodnje bakra koji uključuje primenu metode bioluženja.

1.6.1.1 Prednosti hidrometalurgije u odnosu na pirometalurgiju

Najčešće primenjivana tehnologija za proizvodnju bakra, pirometalurgija, predstavlja tehnološki proces proizvodnje bakra u topionicama. Ruda se prvo prži da bi se oslobodila sumpora, zatim se drobi i melje. Samlevena ruda se koncentriše u pogonima flotacije radi dobijanja mineralnog koncentrata koji obično sadrži 20-30 % bakra. Od ukupne količine rude koja se preradi, u proseku 99 tež. % predstavlja flotacijsku jalovinu, a samo 1 % mineralni koncentrat (Dold, 2008, Conić, 2015). Koncentrat se topi na visokim temperaturama, a potom se izdvaja čist bakar metodama katodne ili anodne rafinacije. Pirometalurška proizvodnja bakra izuzetno štetno utiče na

životnu sredinu. Topionice oslobađaju ogromne količine SO₂ (glavnog uzročnika nastanka kiselih kiša), kao i okside toksičnih hemijskih elemenata koji se mogu nalaziti u rudi, dok pogoni flotacije stvaraju kisele otpadne vode i flotacijsku jalovinu koja sadrži velike količine pirita i manje količine drugih sulfidnih minerala. Deponije flotacijske jalovine mogu biti dugotrajan izvor kiselih rudničkih voda. Hidrometalurška proizvodnja bakra je znatno čistija u odnosu na pirometalurški postupak pošto se ruda ne prži i najčešće ne koncentriše u pogonima flotacije, uglavnom se pre tretmana samo drobi da bi se pospešio proces luženja. Osim toga, kisel rastvor koji se koristi u hidrometalurškom procesu se ne ispušta u životnu sredinu već cirkuliše u sistemu (Dold, 2008). Hidrometalurgija bi mogla biti tehnologija izbora za proizvodnju bakra iz kompleksnih polimetalčnih rudnih tela, koja se zbog sadržaja toksičnih hemijskih elemenata i velikih gubitaka dragocenih metala ne mogu prerađivati klasičnim metodima ekstraktivne metalurgije (Conić et al., 2014). Prednost hidrometalurgije su značajno niža kapitalna ulaganja i operativni troškovi u odnosu na pirometalurgiju, zbog čega je hidrometalurgija tehnologija izbora za ekstrakciju bakra iz jalovišta u kojima su koncentracije bakra po pravilu veoma male, pa bi pirometalurška prerada ovog materijala bila neisplativa (Dold, 2008, Brierley and Brierley, 2013). Međutim, hidrometalurgija ima tri bitna nedostatka:

- 1) Postupak luženja bakra iz sulfidnih minerala je spor i ne može konkurisati topionicama, koje za isto vreme mogu proizvesti daleko veće količine bakra. Proces bioluženja bakra iz sulfidnih minerala na uređenim nasipima (eng. *heap bioleaching*) traje u proseku od nekoliko meseci do godinu dana (Watling, 2006).
- 2) Tokom luženja halkopirita (CuFeS₂) u kiselim rastvorima na sobnoj temperaturi, formiraju se nerastvorljivi minerali (jaroziti, getit, švertmanit) koji formiraju pasivizacioni sloj na površini halkopirita i zaustavljaju proces luženja, što uzrokuje mali prinos bakra tokom luženja rude u kojoj dominira ovaj mineral (Watling, 2006, Pradhan, 2008). Ovo je veliki nedostatak hidrometalurgije, pošto je oko 70 % svetskih rezervi bakra u obliku halkopirita. I pored napora koje ulažu istraživači širom sveta, problem efikasnog luženja bakra iz halkopirita još nije rešen (Watling, 2006, Pradhan et al., 2008, Brierley, 2008, Brierley and Brierley, 2013).

- 3) I drugi primarni sulfidni minerali bakra, enargit (Cu_3AsS_4) i primarni kovelin (CuS) se teško luže. Značajno izluženje bakra iz kovelina je moguće, ali traje relativno dugo. Kada je reč o enargitu, situaciju dodatno komplikuje prisustvo arsena koji je toksičan za sva živa bića, pa je prinos bakra tokom bioluženja enargita veoma mali, svega nekoliko procenata (Brierley and Brierley, 2013).

Zbog navedenih razloga hidrometalurgija predstavlja sekundarnu tehnologiju za proizvodnju bakra i pretežno se koristi za dobijanje bakra iz rudnih tela sa niskim sadržajem ovog metala u kojima dominiraju sekundarni minerali, kao što su oksidi bakra - tenorit (CuO), kuprit (Cu_2O), malahit ($\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$), hrizokola ($\text{CuSiO}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$) i sekundarni sulfidi bakra - halkozin (Cu_2S) i bornit (Cu_5FeS_4) (Watling, 2006, Brierley, 2008, Brierley i Brierley, 2013). Od ukupne svetske proizvodnje bakra, oko 20 % se dobija primenom hidrometalurgije (Watling, 2006).

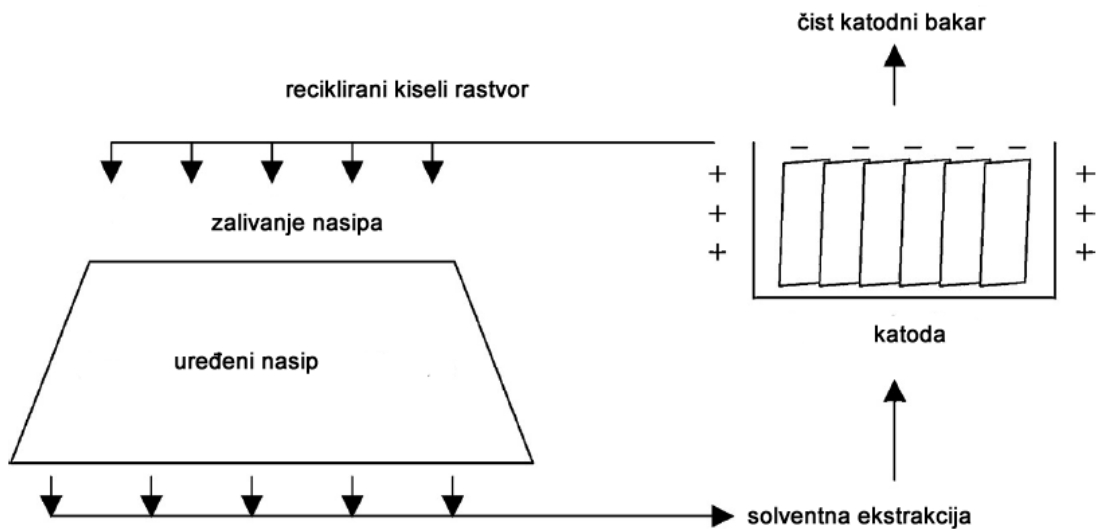
1.6.1.2 Bioluženje

Prednost bioluženja u odnosu na kiselinsko luženje bakra su niži operativni troškovi, pošto za proces bioluženja nije potrebna sumporna kiselina koja se u toku kiselinskog luženja troši u velikim količinama. Međutim, bioluženje se zasniva na živim organizmima koji su osetljivi na promenu uslova sredine, pa je proces bioluženja teže kontrolisati u odnosu na luženje bakra rastvorom sumporne kiseline.

Prva komercijalna primena bioluženja datira iz šezdesetih godina prošlog veka kada je američka kompanija Kenecott Copper Corporation primenila ovu tehnologiju za luženje bakra iz vanbilansne rude (Johnson, 2010). Pomenuta kompanija je odlučila da iskoristi autohtone acidofilne mikroorganizme radi luženja bakra iz neuređenih deponija na koje je istovarana ruda. Rast autohtonih acidofilnih mikroorganizama je pospešivan zalivanjem neuređenog nasipa kiselim rastvorom. Luženje bakra na ovaj način traje godinama, ali primena ove tehnologije zahteva relativno mala novčana ulaganja. U literaturi na engleskom jeziku tehnologija bioluženja na neuređenim nasipima se naziva *dump bioleaching*. Luženje bakra na neuređenim nasipima se i dalje uspešno primenjuje za dobijanje bakra iz rudnih tela sa niskim sadržajem ovog metala. Nakon miniranja, ruda se bez ikakve dodatne prerade dovozi na ogromne nasipe i zaliva kiselim rastvorom koji pospešuje rast acidofilnih mikroorganizama. Primenom ove jednostavne tehnologije, uz određena poboljšanja u odnosu na bazičnu tehnologiju bioluženja na

neuređenim nasipima, rudnik bakra Escondida u Čileu godišnje proizvede između 180.000 i 200.000 tona katodnog bakra (Brierley, 2008).

Metoda bioluženja je nakon prve uspešne primene usavršavana da bi se dobio veći prinos bakra i da bi se proces luženja ubrzao, pa je razvijena tehnologija bioluženja na uređenim nasipima. Ruda se prvo drobi da bi se uvećala površina koja će biti u kontaktu sa oksidacionim agensima i mikroorganizmima, zatim se izdrobljena ruda kvasi kiselim rastvorom i nasipa na gomile oblika zarubljene piramide. Acidofilni mikroorganizmi se gaje u posebno izgrađenim bazenima koji sadrže hranjivi medijum sa velikom koncentracijom gvožđe(II)sulfata. U bazenima se dostiže velika gustina bakterijske populacije (do 10^9 ćelija mL^{-1}) i koncentracija gvožđe(III)sulfata od 2-3 gL^{-1} (Panda et al., 2012). Uređeni nasip se zaliva ovim rastvorom pomoću sistema prskalica. Ispod uređenog nasipa se postavlja vodonepropusni sloj od polietilena visoke gustine koji sprečava zagađivanje zemljišta i oticanje lužnog rastvora. Nekada se postavljaju i cevi kojima se u nasip udvava vazduh da bi se pospešio rast acidofilnih bakterija. Lužni rastvor se sakuplja u bazenu, odakle se usmerava u pogon za solventnu ekstrakciju, a zatim na katodu gde se elektrolitičkom ekstrakcijom proizvodi čist bakar. Kiseli rastvor se nakon elektrolitičke ekstrakcije ponovo koristi za zalivanje nasipa (slika 5). Proces bioluženja bakra na uređenim nasipima obično traje od nekoliko meseci do godinu dana. Nehomogenost sredine utiče na efikasnost procesa luženja. Ruda često sadrži karbonate i alumosilikate koji neutrališu kiselinu, što negativno utiče na aktivnost acidofilnih bakterija. Takođe, problem stvara i neravnomerna raspodela rastvora za luženje, što u dubljim delovima nasipa može dovesti do nedovoljnog izluženja bakra. Pošto se u nasipu odigravaju egzotermni oksidacioni procesi, u unutrašnjosti nasipa može doći do porasta temperature iznad nivoa optimalnog za opstanak mezofilnih acidofilnih bakterija (Watling, 2006, Pradhan et al., 2008, Brierley and Brierley, 2013). Pre primene bioluženja u komercijalnim razmerama, neophodna su temeljna ispitivanja u laboratoriji, zatim ispitivanja na terenu u pilot i poluindustrijskim postrojenjima. Ukoliko se neki od ovih koraka preskoči, ili se ne odradi sa dovoljno pažnje, tokom komercijalnog bioluženja u velikim razmerama može doći do nepredviđenih problema koji mogu učiniti rad postrojenja za proizvodnju bakra neisplativim, što se događalo u praksi (Brierley and Brierley, 2013).



Slika 5. Shematski prikaz pogona za proizvodnju bakra primenom tehnologija bioluženja, solventne i elektrolitičke ekstrakcije. Uređeni nasip se zaliva kiselim rastvorom koji sadrži konzorcijum acidofilnih mikroorganizama i veliku koncentraciju Fe^{3+} jona. Lužni rastvor obogaćen bakrom se prenosi do pogona za solventnu ekstrakciju, gde se primenom odgovarajućih organskih nosača bakar izdvaja iz lužnog rastvora, a zatim se čist bakar taloži na katodi. Kiseli rastvor se, nakon procesa solventne i elektrolitičke ekstrakcije, ponovo koristi za zalivanje uređenog nasipa (prema Bryant, 2006).

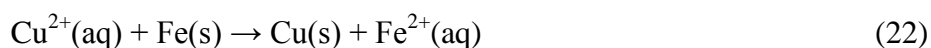
In situ luženje je proces u kom se napušteni rudnik potapa na period od nekoliko nedelja ili meseci. Voda i kiseonik ubrzavaju hemijsku oksidaciju sulfidnih minerala i promovišu rast acidofilnih mikroorganizama. Nakon ispumpavanja vode iz rudnika iz kiselog rastvora se izdvaja bakar ili neki drugi metal. U Kanadi je ovaj pristup iskorišćen za dobijanje preostalog urana iz napuštenih rudnika. Ukupno 300 tona urana je ekstrahovano tokom perioda od godinu dana (Johnson, 2010).

Jedan od predloženih metoda je i kontrolisano pravljenje pukotina u zemljinoj kori (eng. *fracking*) da bi se došlo do dubokih rudnih tela koja sadrže ekonomski korisne metale. U pukotine bi se sipao rastvor za luženje, a zatim nakon nekog vremena izvlačio pomoću pumpi. Ova tehnologija se već koristi da bi se oslobodio prirodni gas koji se nalazi u dubokim slojevima Zemljine kore (Johnson, 2010).

Najefikasniji metod za ekstrakciju bakra uz pomoć acidofilnih mikroorganizama je zasnovan na primeni tehnologije bioluženja u kontinualnom sistemu aerisanih bioreaktora sa konstantnim mešanjem (eng. *stirred tank bioleaching*). U bioreaktorima se ne luži bakar iz rude, već iz mineralnog koncentrata. Konstantno mešanje obezbeđuje homogenost sredine, pored toga kontrolišu se pH vrednost suspenzije, temperatura i

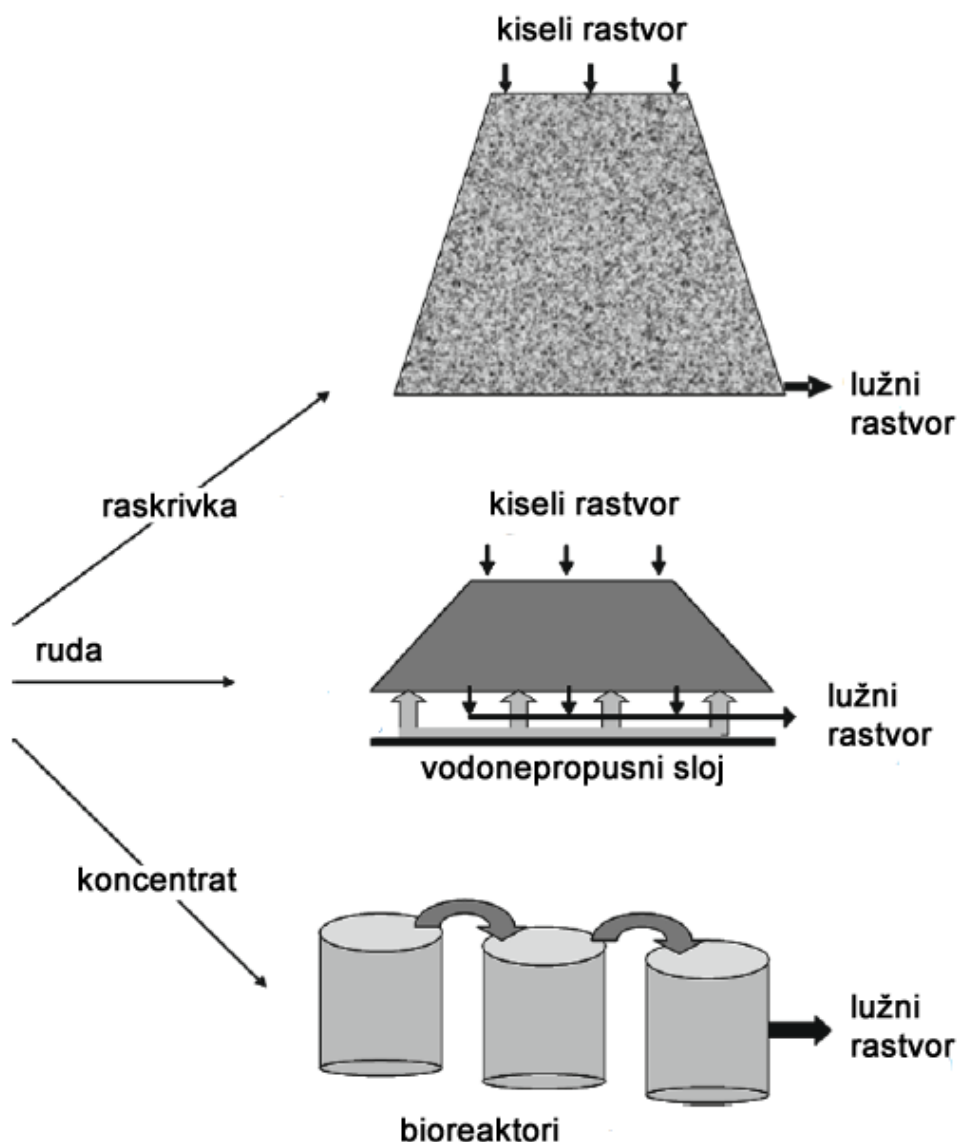
aeracija. Proces se odvija na temperaturama od 40 °C do 78 °C, tako da se konzorcijumi mikroorganizama u bioreaktorima sastoje od umereno termofilnih acidofilnih bakterija (na primer *Sulfobacillus sp.*, *At. caldus*, *L. ferriphilum*) ili ekstremno termofilnih acidofilnih arhea (na primer *Acidianus infernus*). Proces bioluženja u bioreaktorima je brz i efikasan uz veliki prinos bakra. Primenom ove tehnologije može se efikasno lužiti bakar iz refraktornih minerala, kao što su halkopirit i enargit (Brierley 2008, Brierley and Brierley, 2013). Glavni nedostatak luženja bakra u bioreaktorima su velika inicijalna ulaganja i veliki operativni troškovi, tako da ova tehnologija nije konkurentna konvencionalnim tehnologijama za proizvodnju bakra. Stoga se ovaj tehnološki postupak skoro isključivo primenjuje za proces biooksidacije koncentrata koji sadrže značajnu količinu zlata. Čestice zlata su uglavnom impregnirane u piritu i arsenopiritu. Oksidacijom ovih minerala se oslobađaju čestice zlata, a zatim se ovaj dragoceni metal izdvaja klasičnom metodom cijanizacije (Rawlings, 2005, Brierley 2008, Brierley and Brierley, 2013).

Luženje je prvi korak u postupku hidrometalurške proizvodnje bakra. Sledeći korak je ekstrakcija bakra iz lužnog rastvora. Najstarija tehnologija za izdvajanje bakra iz lužnog rastvora je cementacija. Ovaj proces je poznat od davnina, a u srednjem veku je smatran za dokaz alhemijske transmutacije metala. Princip cementacije je jednostavan i zasniva se na dodavanju gvožđa u lužni rastvor. Gvožđe oksidiše, a joni bakra redukuju i talože:



Bakar dobijen na ovaj način se mora preraditi da bi se dobio čisti katodni bakar.

Pedesetih godina prošlog veka je razvijena tehnologija solventne i elektrolitičke ekstrakcije, koja se najčešće primenjuje u hidrometalurškom postupku ekstrakcije i rafinacije bakra. Tokom procesa solventne ekstrakcije joni bakra se vezuju za organski nosač, koji prenosi bakar do katode gde se Cu^{2+} redukuje do Cu^0 i taloži na katodi (slika 6). Ovim postupkom se dobija bakar visoke čistoće (Watling, 2006). Organska faza oslobođena od bakra cirkuliše u sistemu i može se ponovo iskoristiti za vezivanje bakra iz lužnog rastvora. Ovaj postupak je skuplji od cementacije, ali ne zahteva naknadnu preradu bakra. Na slici 6 su prikazane tri navedene tehnologije za bioluženje bakra.



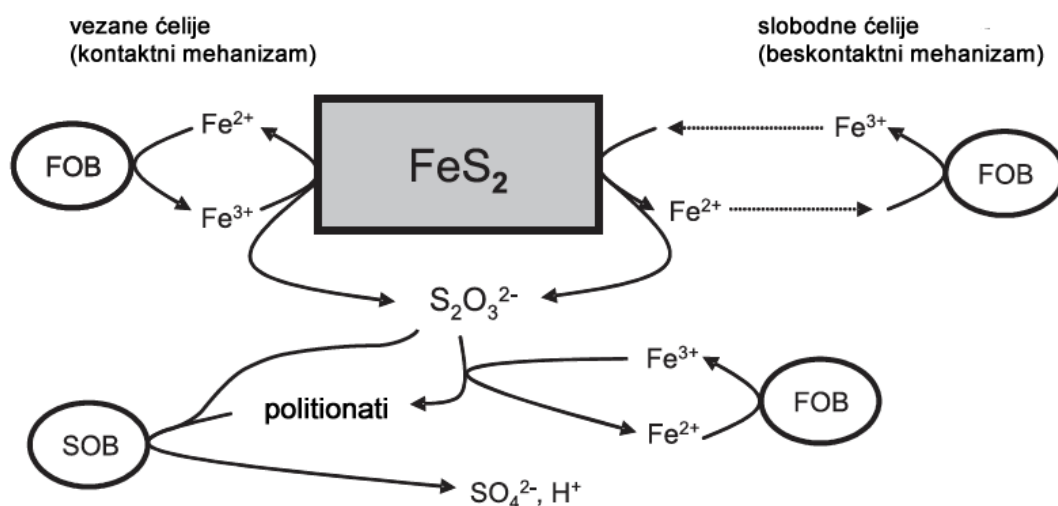
Slika 6. Tehnologije bioluženja – luženje rude na neuređenim naspima, luženje rude na uređenim nasipima, oksidacija koncentrata u bioreaktorima. Prema Johnson (2010).

1.6.1.3 Mehanizam bioluženja

U starijoj literaturi se navodi da se proces biološke oksidacije sulfidnih minerala bakra odvija putem direktnog i indirektnog mehanizma (Bosecker, 1998). Direktni mehanizam bi podrazumevao oksidaciju sulfidnih minerala direktnim delovanjem bakterijske ćelije koja je vezana za mineral koji predstavlja supstrat za oksidaciju. Indirektni mehanizam se odnosio na regeneraciju Fe^{3+} jona koju obezbeđuju mikroorganizmi u planktonskoj fazi oksidacijom Fe^{2+} jona. Ideja o direktnom mehanizmu

je potekla od dobro poznate činjenice da se acidofilni mikroorganizmi vezuju za površinu sulfidnih minerala i formiraju biofilm lučenjem sloja egzopolisaharida. Eksperimenti su pokazali da se u početnim fazama biooksidacije mineralnih supstrata najveći broj acidofilnih mikroorganizama nalazi u biofilmu na površini minerala, dok manji broj mikroorganizama ostaje u planktonskoj fazi. U toku 24 časa od inokulacije, oko 80 % mikroorganizama se veže za površinu minerala (Vera et al., 2013). Određeni broj acidofilnih bakterija uvek ostaje slobodan u planktonskoj fazi, i u situacijama kada površina za vezivanje bakterija nije ograničavajući faktor. Za ovu pojavu još nema zadovoljavajućeg objašnjenja (Zeng et al., 2010, Vera et al., 2013). Skorija istraživanja su pokazala da se oksidacija sulfidnih minerala uvek odvija posredstvom Fe^{3+} jona. U egzopolisaharidnoj kapsuli, Fe^{3+} joni formiraju kompleks sa glukuronskom kiselinom (Rohwerder et al., 2003). Pozitivno naelektrisani Fe^{3+} joni se elektrostatičkim interakcijama vezuju za negativno naelektrisanu površinu pirita. Fe^{3+} jon u kapsuli oksiduje molekul pirita i redukuje se do Fe^{2+} jona. Fero jon nastao oksidacijom pirita se trenutno oksiduje tako što elektron iz ovog jona preuzima respiratorni lanac bakterije koji je lociran u ćelijskoj membrani. Oksidacijom jednog molekula pirita oslobađa se šest elektrona. Nakon oksidacije Fe^{2+} jona regenerisani Fe^{3+} joni ponovo oksidišu pirit.

Uslovi u egzopolisaharidnom sloju (pH, redoks potencijal, koncentracija Fe^{3+} jona) pospešuju proces oksidacije pirita. Procenjeno je da koncentracija Fe^{3+} jona u egzopolisaharidnom sloju iznosi 53 gL^{-1} (Sand et al., 2001). Održavanje tolike koncentracije Fe^{3+} jona je moguće samo u kompleksu sa glukuronskom kiselinom, pošto bi nekompleksovano gvožđe precipitalo. Snimanje površine pirita elektronskim mikroskopom nakon delovanja acidofilnih bakterija je otkrilo jame na površini ovog minerala nastale delovanjem opisanog oksidativnog mehanizma. U savremenoj literaturi se više ne govori o direktnom i indirektnom mehanizmu oksidacije sulfidnih minerala, već su u upotrebi termini kontaktni i beskontaktni mehanizam (Rohwerder and Sand, 2007). Za kontaktni mehanizam oksidacije sulfidnih minerala odgovorni su Fe^{3+} joni i mikroorganizmi u biofilmu na površini minerala koji se oksiduje, dok beskontaktni mehanizam predstavlja oksidaciju Fe^{2+} jona koja se odvija u rastvoru, delovanjem mikroorganizama prisutnih u planktonskoj fazi. Tokom oksidacije pirita i drugih sulfidnih minerala kontaktnim mehanizmom, u rastvor se oslobađa određena količina Fe^{2+} jona i tiosulfata koji predstavljaju supstrat za bakterije u planktonskoj fazi (slika 7).



Slika 7. Mehanizam oksidativne razgradnje pirita. Bakterije koje formiraju biofilm na površini minerala su odgovorne za kontaktni mehanizam oksidacije. Nakon oksidacije pirita deo Fe^{2+} jona i tiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) se oslobađaju u rastvor gde predstavljaju supstrat za oksidaciju bakterijama koje se nalaze u planktonskoj fazi (beskontaktni mehanizam). Regenerisani Fe^{3+} joni mogu ponovo učestvovati u oksidaciji pirita. Tiosulfat se oksidiše u rastvoru do elementarnog sumpora preko niza intermedijarnih jedinjenja – politionata. Sumpor i politionate oksidišu određene vrste acidofilnih bakterija, pri čemu nastaje sumporna kiselina. FOB – Fe oksidujuće bakterije, SOB – S oksidujuće bakterije. Prema Johnson (2013).

1.6.2 PRIMENA ACIDOFILNIH MIKROORGANIZAMA U BIOREMEDIJACIJI KISELIH RUDNIČKIH VODA

Dugo vremena se znalo da kisele rudničke vode koje otiču u močvare izlaze iz močvara prečišćene. U prirodnim vlažnim staništima u procesu truljenja organske materije dejstvom mikroorganizama u anaerobnim uslovima nastaje gas vodonik-sulfid (H_2S). Vodonik-sulfid je slaba kiselina koja u pH neutralnoj sredini disosuje:



Vodonik sulfid reaguje sa rastvorenim jonima metala stvarajući nerastvorljive sulfide.



Zbog veoma slabe rastvorljivosti sulfida metala, proces prečišćavanja kiselih rudničkih voda taloženjem sulfida je značajno efikasniji u odnosu na procese tokom kojih se metali talože u obliku hidroksida, kao što je tretman kiselih rudničkih voda

krečom (Lewis, 2010, Dimitrijević, 2012, Dimitrijević i Alagić, 2012). Kisele rudničke vode se nekada prečišćavaju u veštački konstruisanim vlažnim staništima koja nastanjuju anaerobne sulfidogene bakterije. Veštačka vlažna staništa (zemljišta), koja se u našoj literaturi nekada nespretno prevode kao „mokra polja” (eng. *wetlands*), spadaju u pasivne sisteme za prečišćavanje kiselih rudničkih voda (Johnson, 2005, Dimitrijević i Alagić, 2012).

1.6.2.1 Aktivni biološki sistemi – sulfidogeni bioreaktori

Sulfidogeni bioreaktori predstavljaju radikalno drugačiji pristup remedijaciji kiselih rudničkih voda. To su su aktivni biološki sistemi u kojima se mikroorganizmi koriste za proizvodnju vodonik-sulfida i povećanje alkalnosti sredine. Vodonik sulfid reaguje sa jonima metala pri čemu nastaju slabo rastvorljivi sulfidi, što je u osnovi isti proces koji se dešava u anaerobnim vlažnim staništima. Međutim, sulfidogeni bioreaktori imaju nekoliko bitnih prednosti:

- 1) Kontrolisani uslovi u kojima se proces odigrava;
- 2) Predvidljivost rezultata procesa remedijacije;
- 3) Metali, kao što su bakar i cink, se mogu selektivno izdvojiti iz rastvora u obliku sulfida, koji predstavljaju sirovinu za dobijanje čistog bakra i cinka;
- 4) Koncentracija metala u tretiranim vodama se drastično smanjuje;
- 5) Nakon tretmana voda se može bezbedno ispustiti u životnu sredinu.

Osnovni nedostatak ovih sistema su značajna novčana sredstva potrebna za njihovu konstrukciju i održavanje. U sulfidogenim bioreaktorima se koriste neutrofilne sumpor-redukujuće bakterije, zbog čega nema direktnog kontakta između bakterija i kiselog rastvora. Ovi heterotrofni mikroorganizmi oksidišu organska jedinjenja kao što su glicerol ili etanol, dok je krajnji primalac elektrona u respiratornom lancu sumpor. Nastali vodonik sulfid se ubacuje u drugi reaktor u kome se nalazi kiseli rastvor koji se tretira. Danas postoje dve patentirane tehnologije zasnovane na opisanom principu koje se nalaze u komercijalnoj primeni: Biosulphide i Thiotec.

Biosulphide proces je razvila kanadska kompanija Bioteq (www.bioteq.ca). Vodonik sulfid se proizvodi u anaerobnom biorektoru. Gas se zatim upumpava u drugi reaktor u kojem se tretira kiseli rastvor gde u kontrolisanim uslovima nastaju sulfidi metala. Sulfidi različitih metala precipitiraju pri različitim pH vrednostima sredine, te se kontrolom pH vrednosti rastvora mogu istaložiti različiti metali. Sulfidi metala se talože

u taložniku, uz uklanjanje vode koja je dovoljno čista da se može ispuštati u životnu sredinu, mada i dalje može sadržati velike koncentracije sulfata. Sulfidi metala koji se dobijaju ovim postupkom su prečišćeni i pogodni za preradu u topionicama. Ova tehnologija omogućuje efikasno uklanjanje antimona, arsena, cinka, bakra, kadmijuma, olova, kobalta, nikla, aluminijuma, molibdena, žive i barijuma iz kiselih rudničkih rastvora. Biosulphide proces omogućuje selektivnu precipitaciju sulfida metala koji predstavljaju sirovinu za proizvodnju čistih metala, i to: bakra, cinka, aluminijuma, molibdena, kobalta, nikla, gvožđa, vanadijuma (<http://bioteq.ca/services/solutions-for-mining>).

Kompanija Bioteq je izgradila sistem za proizvodnju bakra iz vanbilansne rude u rudniku Copper Queen u mestu Bizbi u Arizoni (SAD). Bakar se luži iz uređenog nasipa, a zatim se lužni rastvor odvodi u postrojenje gde u reakciji sa biogenim vodonik sulfidom dolazi do precipitacije bakra u obliku CuS. Proces je vrlo efikasan, na ovaj način se iz lužnog rastvora izdvaja oko 99,5 % bakra. Precipitat se suši i zgušnjava da bi se dobio koncentrat koji sadrži oko 45 % bakra. Koncentrat se zatim transportuje u topionicu gde se proizvodi čist bakar. Koncentracija bakra u lužnom rastvoru se kreće između 220 i 360 mgL⁻¹ što isključuje upotrebu solventne i elektrolitičke ekstrakcije za proizvodnju bakra, pošto ova tehnologija zahteva da koncentracije bakra u lužnom rastvoru budu veće od 1 gL⁻¹. Postrojenje dnevno preradi između 8000 i 9000 m³ lužnog rastvora, a godišnja proizvodnja je oko 15 000 tona bakra (slika 8; Lawrence et al., 2007). Troškovi implementacije ove tehnologije su značajno niži u odnosu na tehnologiju solventne i elektrolitičke ekstrakcije. Kompanija Bioteq je takođe instalirala postrojenje za prečišćavanje kiselih industrijskih otpadnih voda u rudniku Dexing u Kini. Ovo postrojenje može proizvesti do 45 000 tona bakra godišnje, koji bi bez primene ove tehnologije bio zauvek izgubljen (Lawrence et al., 2007).

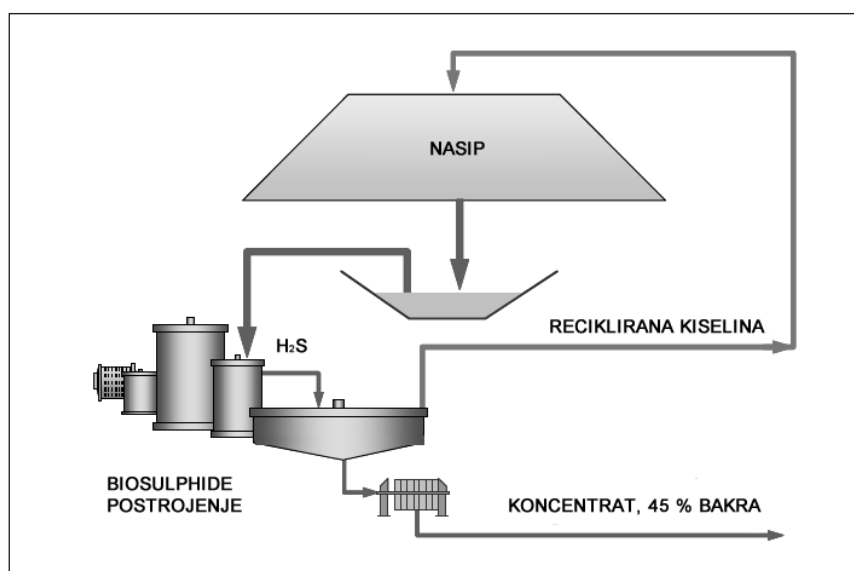
Tehnologija Thiotec koju je razvila holandska kompanija Paques (www.paques.nl) se zasniva na sličnim principima. Pomoću ove tehnologije moguće je prečistiti zagađene vode u kojima se koncentracija metala kreće od 50 do 5000 mgL⁻¹.

Trenutno je u fazi razvoja biotehnologija koja bi mogla pojednostaviti i pojeftiniti postupak bioremedijacije kiselih rudničkih voda uz selektivnu precipitaciju sulfida metala koji imaju ekonomsku vrednost. Tehnologija se zasniva na upotrebi nedavno otkrivenih acidofilnih bakterija koje redukuju sulfate (SRB). Mikrobiološkom

redukcijom sulfata se troše H^+ joni i nastaje vodonik sulfid koji reaguje sa katjonima metala prisutnim u rastvoru. Zahvaljujući SRB koje žive u kiselj sredini, nije potrebno konstruisati dva bioreaktora, već se ceo proces odvija u jednom bioreaktoru. Ove bakterije mogu koristiti vodonik kao supstrat za oksidaciju. Kisele rudničke vode sadrže velike koncentracije sulfata koji je terminalni akceptor elektrona u ovom biohemijskom procesu:



Redukcijom sulfata se neutrališe kiselina i nastaje vodonik-sulfid koji reaguje sa katjonima metala stvarajući nerastvorljive sulfide. Kontrolisanjem pH vrednosti u bioreaktoru, mogu se istaložiti različiti sulfidi metala. Na primer, CuS precipitira pri pH 2, dok ZnS precipitira na pH 4. Prednosti ove tehnologije, u odnosu na opisane tehnološke procese Biosulphide i Thiotec, bi bili niži troškovi izgradnje postrojenja (potreban je samo jedan bioreaktor) i niži operativni troškovi (nema potrebe za dodavanjem sumpora i organskih supstrata, nepochodan je samo vodonik). Tehnologija je još u fazi razvoja i nije u komercijalnoj upotrebi (Jameson et al., 2010, Johnson, 2012).



Slika 8. Shema procesa proizvodnje bakra metodom luženja uz precipitaciju bakra u obliku CuS pomoću biogenog vodonik sulfida. Rudnik Copper Queen, Bizbi, Arizona (SAD). Prema Lawrence et al. (2007).

1.7 KVALITATIVNA I SEMI-KVANTITATIVNA RENDGENSKA STRUKTURNA ANALIZA

Metode rendgenske difrakcije, kojima se ispituju polikristalni uzorci, prvenstveno se koriste za identifikaciju prisutnih kristalnih faza, tj. za kvalitativnu rendgensku analizu. Osim identifikacije kristalnih faza, ove metode omogućuju i određivanje zastupljenosti pojedinih faza, tj. kvantitativnu rendgensku analizu. Ovim metodama mogu se takođe odrediti i parametri jedinične ćelije svih prisutnih kristalnih faza, stepen kristaliniteta i veličina mikrostrukturnih parametara (veličina kristalita i naprezanja rešetke). Tokom procesa bioluženja dešava se oksidacija sulfidnih minerala, što dovodi do promene u odnosu kristalnih faza u tretiranom uzorku. Kvalitativna i semi-kvantitativna rendgenska strukturna analiza predstavljaju metode koje omogućuju praćenje promene relativne zastupljenosti određenih kristalnih faza u uzorku pre i nakon bioluženja.

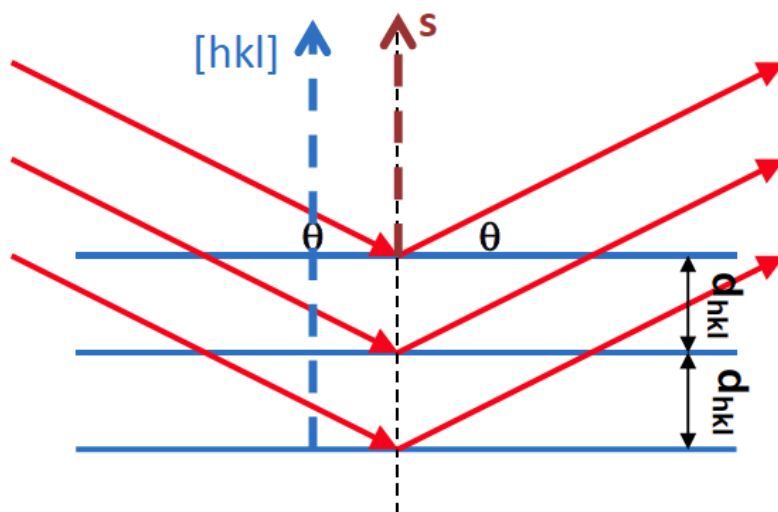
1.7.1 RENDGENSKO ZRAČENJE

Rendgensko zračenje je elektromagnetno zračenje talasnih dužina koje leže između ultraljubičastog i gama zračenja u opsegu od 10^{-8} do 10^{-12} m (100 – 0,01 Å). Da bi se proizvelo rendgensko zračenje elektroni se ubrzavaju u električnom polju i bombarduju metalnu anodu u rendgenskoj cevi. Ubrzani elektroni se sudaraju sa atomima anode gubeći svoju kinetičku energiju koja se delom emituje u obliku kontinuiranog spektra elektromagnetnog zračenja (takozvano belo zračenje). Povećanjem napona dolazi do povećanja intenziteta i pomeranja minimalne talasne dužine λ_{\min} belog zračenja ka kraćim talasnim dužinama. U smeru većih talasnih dužina intenzitet kontinuiranog rendgenskog spektra lagano opada. Kada napon u rendgenskoj cevi pređe određenu kritičnu vrednost karakterističnu za metal od kog je napravljena anoda (ekscitacioni potencijal) iz kontinuiranog spektra će se pojaviti oštri maksimumi na određenim talasnim dužinama. Položaji i intenziteti ovih signala svojstveni su materijalu od koga je napravljena anoda. Tako nastaje karakteristični spektar poznat i pod imenom karakteristično zračenje. Pri ovim energijama, ubrzani elektroni koji se sudaraju sa atomima anode mogu izbaciti elektrone iz nižih elektronskih orbitala. Ako je elektron izbačen iz *K*-orbitale, elektroni sa viših energetske nivoa (*L*, *M*,...) prelaze na niži, *K*-nivo, emitujući pri tom energiju u vidu elektromagnetnog zračenja -

rendgensko zračenje. Prilikom prelaska elektrona sa L na K -nivo emituje se $K\alpha$ - zračenje, a prelaskom sa M na K nastaje $K\beta$ - zračenje. U kristalografiji se koristi $K\alpha$ - zračenje, a kontinuirano (belo) i $K\beta$ - zračenje su neželjena zračenja i uklanjaju se pomoću filtera ili monohromatora. Pošto u L ljusci ima elektrona čiji se energetske nivoi veoma malo razlikuju onda će njihovim prelaskom sa L na K nivo nastati K -dublet sačinjen od $K\alpha_1$ i $K\alpha_2$ - zračenja bliskih talasnih dužina (Karanović i Poleti, 2003).

1.7.1.1 Uslovi za difrakciju i Bragov zakon

Da bi došlo do difrakcije rendgenskih zraka na kristalu, talasna dužina zračenja mora biti bliska dimenzijama kristalne rešetke. Difrakcija rendgenskog zračenja nije jednostavno prelamanje elektromagnetnog zračenja, ali se može opisati pomoću jednostavnih jednačina koje opisuju refleksiju svetlosti. Paralelne i ekvidistantne ravni u kristalnoj rešetki deluju kao poluprovidna ogledala. Jedan deo zračenja se reflektuje sa gornje ravni, a dugi deo zračenja prolazi i reflektuje se sa sledećih ravni u nizu ili prolazi kroz kristal bez difrakcije (slika 9). Ukoliko su difraktovani zraci u fazi, dolazi do pojačavanja zračenja (konstruktivne interferencije rendgenskog zračenja).



Slika 9. Ilustracija difrakcije rendgenskog zračenja na kristalnoj rešetki. svaki niz paralelnih i ekvidistantnih ravni HKL (plave linije) međupljosnog rastojanja d_{hkl} daće refleksiju ako je orijentisan tako da zatvara Bragov ugao θ sa upadnim snopom rendgenskih zraka (crvene linije). Refleksija je prikazana vektorom difrakcije s . Vektor s preseca ugao između upadnog i difraktovanog snopa i normalan je na niz ravnina kojima je došlo do difrakcije (prema Speakman, 2010).

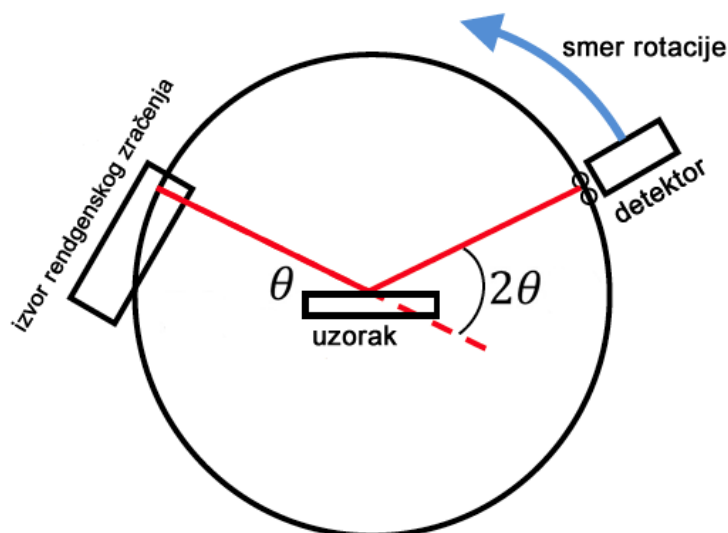
Vežu između talasne dužine rendgenskog zračenja λ , upadnog ugla θ i međupljosnog rastojanja d , daje Bragov zakon definisan Bragovom jednačinom:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Ako je zadovoljen Bragov zakon, reflektovani snopovi su u fazi i javlja se konstruktivna interferencija. Ako upadni snop pada na kristal pod uglom koji je različit od θ dolazi do destruktivne intereferencije i upadni zraci se međusobno poništavaju (Karanović, 1996).

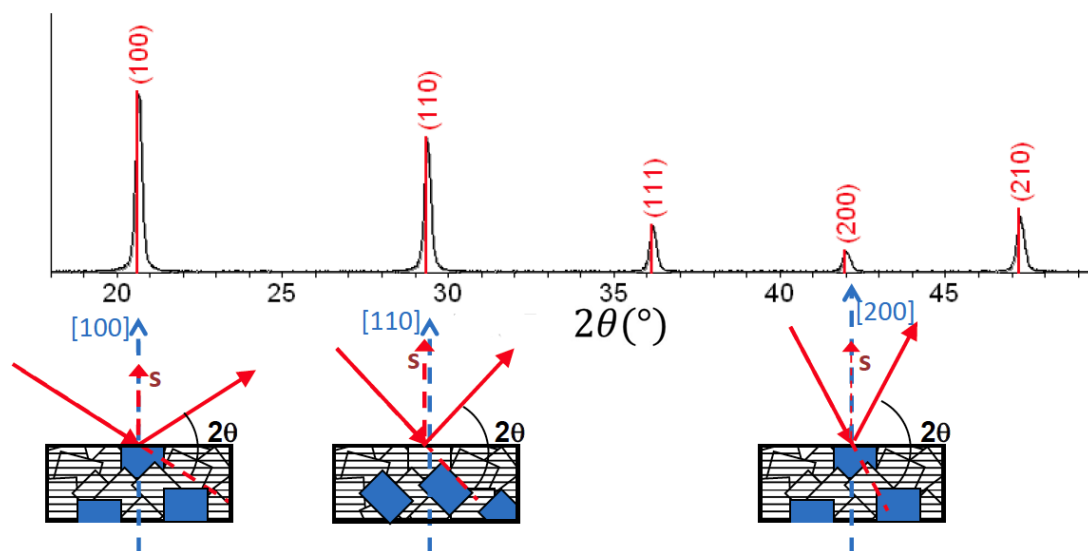
1.7.2 PRINCIP RADA DIFRAKTOMETRA

U osnovne delove rendgenskog difraktometra za prah spadaju izvor rendgenskog zračenja (rendgenska cev) i detektor pomoću koga se beleži difraktovano zračenje (slika 10). Sprašeni uzorak se postavlja u ram i zatim na postolje koje se rotira. Detektor se takođe rotira, brzinom dva puta većom od brzine rotiranja uzorka. Da bi se obezbedilo uniformno zračenje ono se filtrira ili se postavlja monohromator, kristal koji difrakuje samo zračenje određene talasne dužine ($K\alpha_{1,2}$ zračenje koje nastaje prelaskom elektrona sa $L_{1,2}$ na K orbitalu). Detektor registruje intenzitet zračenja u funkciji difrakcionog ugla 2θ .



Slika 10. Shematski prikaz principa rada difraktometra za prah. Uzorak rotira za ugao θ presecajući put usmerenom snopu rendgenskih zraka (crvena linija) koji dolazi iz rendgenske cevi. U isto vreme detektor, rotirajući za ugao 2θ , prikuplja difraktovane zrake. Instrument koji kontroliše rotiranje uzorka i detektora naziva se goniometar (prema Speakman, 2010).

Detektor beleži podatke u digitalnom obliku. Koristeći kompjuterski program, na primer *PowderCell* (Kraus and Noize, 1996), moguće je dobijene rezultate prikazati grafički u obliku difraktograma (slika 11). U uzorku koji je pripremljen u obliku finog praha uvek postoji određeni broj kristala koji su tako orjentisani da zadovoljavaju Bragov zakon, što dovodi do pojave difrakcije i karakterističnih linija (difrakcionih pikova) na difraktogramu. Svaka difrakciona linija predstavlja difrakciju sa određenog niza paralelnih i ekvidistantnih ravni hkl u kristalu. Koristeći Bragovu jednačinu, za svaku difrakcionu liniju može se izračunati međupljosno rastojanje d_{hkl} iz poznatog ugla 2θ i talasne dužine λ . Na osnovu poznavanja vrednosti d i relativnih intenziteta I/I_{\max} , moguće je identifikovati kristalne faze u višefaznim uzorcima poređenjem sa podacima u kristalografskim bazama podataka.



Slika 11. Rendgenska difrakcija na sprašenom polikristalnom uzorku. Do difrakcije dolazi na onim kristalima koji su orjentisani tako da zadovoljavaju Bragov zakon (prema Speakman, 2010).

Apsolutni intenziteti rendgenskog zračenja koje beleži difraktometar mogu da variraju od uređaja do uređaja čak i kad su izabrani slični eksperimentalni uslovi prikupljanja difrakcionih podataka. Zbog toga se koriste relativni intenziteti I/I_{\max} . Intenzitet najjače refleksije I_{\max} se prikazuje kao 100 %, a ostali intenziteti su predstavljeni kao procentualni udeo u odnosu na najjaču refleksiju. Intenziteti difrakcionih linija zavise od difraktovanog intenziteta sa jednog kristala, ukupnog broja kristala koji su u takvoj orijentaciji da je moguća difrakcija i zapremine polikristalnog uzorka koja je izložen zračenju. Takođe, na intenzitet difrakcionih linija utiču i osobine

materijala koji se analizira, kao što su atomski faktor rasipanja, strukturni faktor, faktor pomeranja atoma koji se ranije nazivao temperaturni faktor, apsorpcioni faktor i drugo. Širina difrakcionih linija ukazuje na stepen kristaliniteta pojedinih kristalnih faza. Kristalne faze koje su dobro iskristalisale imaju veće kristalite i daju uske, oštre difrakcione linije, dok slabije iskristalisale faze daju široke difrakcione linije. Na širinu difrakcionih linija utiču i osobine instrumenta (Karanović i Poleti, 2003).

1.7.3 SEMI-KVANTITATIVNA FAZNA ANALIZA

Ukoliko se ispitivani uzorak sastoji od više kristalnih faza, nakon identifikacije kristalnih faza je moguće odrediti procentualnu zastupljenost pojedinih faza u uzorku. Intenziteti difrakcionih maksimuma zavise od količine ozračenog materijala. Pri povećanju udela neke faze u smeši, rastu intenziteti difrakcionih linija na dijagramu. Teorijski je moguće izabrati samo jednu difrakcionu liniju za svaku fazu i na osnovu promene intenziteta tih linija odrediti promene zastupljenosti faza u uzorku. Linije odabrane za posmatranje treba da budu što je moguće jače i da se ne preklapaju sa difrakcionim linijama drugih faza u uzorku. Sve metode kvantitativne fazne analize zasnivaju se na činjenici da su intenziteti refleksija neke kristalne faze proporcionalni udelu te faze u uzorku. Intenzitet I_{iq} refleksije i faze q zavisi od masenog udela w_q faze q u uzorku i masenog apsorpcionog koeficijenta $(\mu/\rho)_m$ uzorka m :

$$I_{iq} = K_{iq} \frac{w_q}{(\frac{\mu}{\rho})_m}$$

Postoji nekoliko klasičnih metoda koje baziraju na određivanju konstante K_{iq} . Njih je uglavnom zamenila Ritveldova metoda, čija je prednost da ne zahteva monofazne uzorke kristalne faze kojoj se zastupljenost određuje, ne koristi samo jednu već sve refleksije na dijagramu, a preklapanje refleksija ne predstavlja prepreku (Karanović, 1996, Karanović i Poleti, 2003).

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Mikrobiološki diverzitet kiselih staništa u Srbiji, koja su nastala kao posledica rudarskih aktivnosti, je veoma malo ispitivan. Jezero Robule je zanimljivo za istraživanje zbog toga što ekstremno kisela jezera te veličine nisu česta kod nas, a ni u svetu. Tokom izrade ove doktorske disertacije su sprovedena istraživanja čiji je cilj bilo da se po prvi put ispita mikrobiološki diverzitet jezera Robule kombinovanjem klasičnih metoda mikrobiologije i molekularne biologije. Kultivacija i izolacija acidofilnih mikroorganizama je značajna zbog mogućnosti njihove primene u tehnologiji bioluženja bakra. Stoga su na početku rada na izradi ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- 1) Ispitivanje mikrobiološkog diverziteta ekstremno kiselog jezera Robule primenom klasične mikrobiološke metode kultivacije mikroorganizama i molekularne metode koja se zasniva na analizi polimorfizama terminalnih restrikcionih fragmenata (T-TRLP);
- 2) procena efikasnosti bioluženja bakra iz mineralnog koncentrata pomoću autohtonih mikroorganizama iz jezera Robule;
- 3) poređenje efikasnosti oksidacije sulfidnih minerala prisutnih u mineralnom koncentratu upotrebom lužnog rastvora inokulisanog autohtonim bakterijama iz jezera Robule i lužnog rastvora inokulisanog veštački konstruisanim bakterijskim konzorcijumom;
- 4) ispitivanje efikasnosti oksidacije sulfidnih minerala (pirita i sulfidnih minerala bakra) iz uzoraka stare flotacijske jalovine Rudnika bakra Bor uzetih sa dubina od 10, 15 i 20 metara primenom jezerske vode kao rastvora za luženje.

3 MATERIJAL I METODE

Eksperimenti su urađeni u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI) Univerziteta u Beogradu i u Laboratoriji za istraživanje acidofilnih mikroorganizama Univerziteta u Bangoru, Velika Britanija (Bangor Acidophile Research Team, Bangor University, United Kingdom). U eksperimentima istog tipa su nekada korišćene različite metode i uređaji, pa je za svaku metodu naglašeno u kojoj laboratoriji je primenjena. Kvalitativne i semi-kvantitativne rendgenske analize uzoraka flotacijske jalovine su urađene u Laboratoriji za kristalografiju (Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet).

3.1 UZORKOVANJE

Uzorci vode iz jezera Robule su uzeti u dva navrata, 26. jula 2012. i 12. juna 2013. godine. Dana 26. jula 2012. godine uzorci su uzeti sa površine jezera, na strani jezera koje se nalazi ispod deponije rudničke raskrivke (slika 12). Tokom drugog uzorkovanja prikupljeni su uzorci vode sa približnoistog mesta gde je uzorkovana voda prvi put, kao i uzorci biomase iz plitke vode u neposrednoj blizini cevi koja odvodi vodu iz jezera. Za uzimanje uzoraka su korištene sterilne plastične bočice zapremine 50 mL. Nakon uzorkovanja, bočice su stavljene u prenosni frižider i transportovane su do laboratorije gde su čuvane u zamrzivaču na temperaturi od +4 °C, ne duže od 24 časa. Provodljivost i temperatura vode jezera Robule su mereni prilikom oba uzorkovanja prenosnim uređajem HI 98312 (Hanna Instruments, SAD). Redoks potencijal i pH vrednost vode su izmereni u laboratoriji. Za merenje redoks potencijala korištene su Pt-Ag/AgCl elektrode. Na isti način su uzeti i uzorci jalovine (raskrivke) koja okružuje jezero.



Slika 12. Satelitski snimak jezera Robule sa označenim mestima uzrokovanja. Brojem 1 je označeno mesto uzorkovanja vode, a brojem 2 mesto uzorkovanja biomase. Snimak je preuzet iz aplikacije Google Earth.

3.2 ODREĐIVANJE UKUPNOG BAKRA

Ukupni bakar u rastvoru je određivan primenom modifikovane metode koju su prvi put opisali Amwar et al. (2000). U prvom koraku je Cu(II) redukovano do Cu(I) dodavanjem 200 μ L 10% rastvora hidroksilamina u 100 μ L uzorka. Rastvor je kratko izmešan na mešalici, a zatim inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodat 1 mL tartaratnog pufera. Zatim je dodato 500 μ L fosfatnog pufera i 100 μ L 0,1 % bicinhoninične kiseline rastvorene u tartaratnom puferu. Rastvor je potom nakratko promešan. Na kraju je dodato 0,8 mL destilovane vode i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 562 nm. Koncentracija bakra je određivana na osnovu standardne krive, koja je konstruisana merenjem apsorbanca za poznate koncentracije bakar(II)sulfata u opsegu od 0 do 1 mM.

Tartaradni pufer se sastoji od 1 mL 0,5M HCl u 100 mL 0,5 M natrijum tartarata pH 5,5. Fosfatni pufer se sastoji od 87,7 mL 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 13,3 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

3.3 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GVOŽĐA

Za određivanje koncentracije Fe(II) i Fe(III) u laboratoriji Univerziteta u Bangoru primenjen je ferozinski test, dok su u laboratoriji IMGGI primenjeni fenantrolinski i tiocijanatni test.

3.3.1 FERAZINSKI TEST

Ferozinski test (Lovely and Philips, 1987) se koristi za određivanje koncentracije Fe(II) u uzorku. Da bi se odredila koncentracija ukupnog gvožđa u uzorku potrebno je redukovati Fe(III) jone dodavanjem hidroksilamina. Jedan litar ferozinskog reagensa (pH 7) sadrži 11,915 g HEPES rastvorenog u vodi. Za merenje koncentracije Fe(II) jona uzima se 50 μL uzorka, ako eksperimentator na osnovu boje proceni da je uzorak suviše koncentrovan, potrebno ga je prvo razblažiti dejonizovanom vodom. U uzorak se dodaje 950 μL ferozinskog reagensa i promeša, a zatim se očitava apsorbancu na talasnoj dužini od 562 nm. Koncentracija Fe(II) jona se određuje na osnovu standardne krive koja se konstruiše merenjem apsorbance poznatih koncentracija $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ od 0 do 1 mM rastvorenog u dejonizovanoj vodi.

3.3.2 FENANTROLINSKI I TIOCIJANATNI TEST

Koncentracije rastvorenih Fe(II) i Fe(III) jona tokom eksperimenta bioluženja flotacijske jalovine su određivane fenantrolinskim (Komadel and Stucki, 1988), odnosno tiocijanatnim testom (Luke, 1966). Za određivanje koncentracije Fe(II) jona 1 mL uzorka rastvora iz eksperimenta bioluženja je centrifugiran 10 min na 13000 rpm. Zatim je 50 μL supernatanta pomešano sa 20 μL 1M Na-acetata, 150 μL 5mM 1,10-fenantrolin-monohidrata, a zapremina do 1 mL dopunjena dejonizovanom vodom. Nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, očitavana je apsorbancu na talasnoj dužini od 510 nm. Koncentracija Fe(II) jona je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu poznatih koncentracija $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Za određivanje koncentracije Fe(III) jona u 500 μ L supernatanta dodato 500 μ L 1M NaSCN, promešano i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitavana apsorbanca na 490 nm. Koncentracija Fe(III) jona je određivana na osnovnu standardne krive koja je konstruisana merenjem apsorbance poznatih koncentracija $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$.

3.4 RENDGENSKA KVALITATIVNA I SEMI-KVANTITATIVNA DIFRAKCIONA ANALIZA

Uzorci flotacijske jalovine pre i nakon eksperimenta bioluženja su ispitani u Laboratoriji za kristalografiju Rudarsko-geološkog fakulteta na difraktometru za prah PHILIPS PW 1710 pod sledećim uslovima: radni napon, $U = 40$ kV; jačina struje, $I = 30$ mA; rendgensko zračenje sa antikatode bakra talasne dužine, $\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1,54178$ Å; grafitni monohromator; opseg ispitivanja, $4 - 90^\circ 2\theta$, korak $0,02^\circ 2\theta$, vremenska konstanta, 1 s (po koraku). Upoređivanjem izmerenih vrednosti relativnih intenziteta I/I_{max} i međupljosnih rastojanja d sa literarnim podacima (JCPDS – kartice), identifikovani su prisutni minerali. Semi-kvantitativna fazna analiza je urađena korišćenjem računarskog programa PowderCell (Kraus and Noize, 1996).

3.5 SVETLOSNA MIKROSKOPIJA

Pod svetlosnim mikroskopom su posmatrani mikroorganizmi nakon bojenja i kolonije izrasle na selektivnim čvrstim podlogama. Za bojenje mikroorganizama je korištena metoda bojenja metilenskim plavim po Lefleru (Knežević-Vukčević i Simić, 2006). Sterilnom ezom uzorak vode je nanošen na mikroskopsku pločicu i pravljen razmaz koji je potom fiksiran na plamenu. Nakon fiksiranja, dodavane su 1-2 kapi boje, koja je nakon 5 minuta ispirana destilovanom vodom. Preparat je posmatran pod binokularnim mikroskopom Leica DM 1000 pri uveličanju od $1000\times$, dok su kolonije na Petri šoljama posmatrane pod uveličanjem od $50\times$. Mikroskop je bio povezan sa digitalnim fotoaparatom i računarom.

3.6 KULTIVACIJA I IZOLACIJA ACIDOFILNIH BAKTERIJA

Acidofilne bakterije su izolovane na dvoslojnim podlogama koje je prvi opisao Johnson (1995). Za pripremu čvrste podloge korišten je 0,5% rastvor agaroze. Tečni

medijumi i agarozna su autoklavirani odvojeno 15 minuta na 121 °C, i zatim pomešani nakon autoklaviranja. Gvožđe(II)sulfat je dodavan naknadno, nakon što se medijum posle autoklaviranja ohladio do približno 50 °C, iz 1M stoka pH 2,0 sterilisanog filtracijom kroz 0,2 µm filter.

Nakon dodavanja agaroze i gvožđe(II)sulfata u tečni medijum, otprilike polovina od ukupne količine medijuma je presipana u drugi sud i inokulisana aktivnom kulturom *A. cryptum* (0,5% v/v). Prvo je izlivan inokulisani medijum, otprilike do polovine Petri šolje, a zatim je preko ovog sloja izlivan drugi sloj podloge, koji je po solidifikaciji medijuma inokuliran bakterijama iz uzorka. Da bi se sprečila solidifikacija medijuma dok traje izlivanje prvog sloja, druga polovina medijuma je držana u vodenom kupatilu na temperaturi od 50 °C. Nakon zasejavanja, Petri šolje su inkubirane na temperaturi od 30 °C tokom 30 dana. Sastav svih dvoslojnih podloga koje su korištene za kultivaciju acidofilnih bakterija je dat u tabeli 5. Podloge su zasejavane nanošenjem male količine uzorka sterilnom ezom.

Rastvor bazalnih soli (BS) koji je korišten za pripremu podloga je 10× koncentrovan i sadrži u gL⁻¹: (NH₄)₂SO₄ – 12,5 i MgSO₄×7H₂O – 5,0.

Rastvor bazalnih soli za gajenje heterotrofa (HBS), 50× koncentrovan rastvor (gL⁻¹): (NH₄)₂SO₄ – 22,5 Na₂SO₄×10H₂O – 7,5 KCl – 2,5 MgSO₄×7H₂O – 25 KH₂PO₄ – 2,5 Ca(NO₃)₂×4H₂O – 0,7.

Rastvor elemenata u tragovima (ET) u 0,01M H₂SO₄ (gL⁻¹): ZnSO₄×7H₂O – 10, CuSO₄×5H₂O – 1, MnSO₄×4H₂O – 1, CoSO₄×7H₂O – 1, Cr₂(SO₄)₃×15H₂O – 0,5, H₃BO₃ – 0,6 , Na₂MoO₄×2H₂O – 0,5, NiSO₄×6H₂O – 1, Na₂SeO₄×10H₂O – 1, Na₂WO₄×2H₂O – 0,1, NaVO₃ – 0,1.

Tabela 5. Sastav medijuma koji su korišteni za kultivaciju acidofilnih bakterija.

Medijum (šifra)	Sastav (finalne koncentracije)	pH	Tip bakterija
Neorgansko gvožđe (iFe ₀)	1×BS, 0,1% ET, 25 mM FeSO ₄	2,5	Gvožđe-oksidujući autotrofi
Gvožđe(II)sulfat i ekstrakt kvasca (FeYe ₀)	1×BS, 0,1% ET, 0,02% EK, 25 mM FeSO ₄	2,5	Gvožđe-oksidujući heterotrofi
Gvožđe(II)sulfat i tetracionat (FeSo)	1×BS, 0,1% ET, 0,025% TSB, FeSO ₄ 25 mM FeSO ₄ , 2,5 mM K ₂ S ₄ O ₆	2,5	Gvožđe i sumpor oksidujući autotrofi
Ekstrakt kvasca (Ye ₀)	1×HBS, 0,1% ET, 0,02% EK, 100 μM FeSO ₄	3,0	Heterotrofi
Ekstrakt kvasca (Ye ₀)	1×HBS, 0,1% ET, 0,02% EK	4,0	Umereno acidofilni heterotrofi

BS - bazalne soli; HBS - bazalne soli za heterotrofe; ET - elementi u tragovima; TSB - tripton sojin bujon; EK - ekstrakt kvasca.

3.7 IZOLACIJA METAGENOMSKE (UKUPNE) DNK IZ SREDINSKIH UZORAKA

Izolacija DNK iz sredinskih uzoraka je urađena pomoću UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, SAD). Ovaj kit je prvenstveno namenjen za izolaciju DNK iz uzoraka zemljišta, ali se u praksi veoma dobro pokazao i za izolaciju DNK iz materijala koji sadrži acidofilne bakterije.

Za izolaciju DNK iz uzorka biomase korišćen je približno 1g uzorka. Za izolaciju DNK iz uzorka vode jezera Robule i iz lužnog rastvora, oko 400 mL vode, odnosno 30 mL rastvora je profiltrirano kroz 0,2 μm filtere. Filteri su zatim isečeni na sitne komade i korišteni u daljem postupku izolacije DNK. Detaljan protokol za izolaciju DNK se dobija uz kit, pa će biti opisani samo osnovni principi metode.

Najveća prepreka u izolaciji DNK iz bakterijskih ćelija predstavlja nedovoljno uspešno razbijanje čvrstog ćelijskog zida. Izolacija DNK ovim kitom uključuje korak

razbijanja ćelijskog zida sitnim kuglicama (eng. *bead beating*) u kombinaciji sa deterdžentima, kao što je SDS, koji pomažu u liziranju ćelijskih membrana.

U epruvetu zapremine 2 mL koja sadrži kuglice se dodaje uzorak iz kojeg izolujemo DNK, rastvor koji sadrži deterdžente i rastvor koji uklanja primese koje se često nalaze u uzorcima koji potiču iz životne sredine i koje mogu delovati inhibitory na PCR. Epruvete se zatim stavljaju u poseban adapter u horizontalnom položaju na mešalici u kome se uzorci tresu maksimalnom brzinom u trajanju od 10 minuta. Nakon ovog koraka uzorak se centrifugira da bi se istaložili delovi ćelija, dok DNK ostaje u supernatantu. U supernatant se dodaje rastvor koji precipitira proteine, a zatim se ponovo centrifugira. Tečnost koja sadrži DNK se prebacuje u epruvetu sa silikonskom membranom, dodaje se rastvor koji će omogućiti vezivanje DNK za membranu i centrifugira. DNK će se vezati za silikonsku membranu, dok će svi kontaminanti biti oboreni na dno epruvete. Na kraju se membrana prebacuje u čistu epruvetu, dodaje se rastvor za eluciju DNK i ponovo centrifugira. Na dnu epruvete će ostati rastvor koji sadrži izolovanu metagenomsku DNK.

3.8 IZOLACIJA DNK IZ BAKTERIJSKIH KOLONIJA

Za izolaciju DNK iz kolonija uzimano je nekoliko morfološki identičnih kolonija, koje su zatim suspendovane u 20 μ L rastvora za liziranje ćelija koji se sastojao od 0,05 M NaOH i 0,25 % SDS. Suspenzija je zatim zagrevana u termobloku na 95 °C tokom 15 minuta. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi dodavano je 180 mL destilovane vode i rastvor je zatim 5 minuta centrifugiran na 13000 rpm.

Za izolaciju DNK iz kolonija koje su obložene gvožđem potrebno je u postupak uvesti korak uklanjanja gvožđa pre liziranja ćelija, što se postiže višestrukim ispiranjem kolonija 100 mM oksalnom kiselinom i destilovanom vodom.

3.9 UMNOŽAVANJE GENA ZA 16S rRNK U REAKCIJI LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE (PCR)

Za potrebe T-RFLP analize geni za 16S rRNK umnožavani su PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) tehnikom. Analiza polimorfizma terminalnih restrikcioniha fragmenata zahteva da jedan od prajmera bude obeležen fluoroforom. Kada je rađena T-RFLP analiza na Univerzitetu u Bangoru 27F prajmer (5'-

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; Lane, 1991) je bio obeležen Cy-5 fluorescentnom bojom, dok je isti prajmer bio obeležen 6-FAM fluorescentnom bojom kada je ista analiza rađena u laboratoriji u IMGGI.

3.9.1 PCR PROTOKOL - UNIVERZITET U BANGORU

U reakciji umnožavanja gena za 16S rRNK korišćen je Promega Master Mix (Promega, SAD) koji sadrži *Taq* DNK polimerazu, pufer i smešu dNTP. Reakciona smeša, finalne zapremine 25 µL, sadržala je 12,5 µL master miksa, po 10 pmol 27F - Cy-5 obeleženog prajmera i 1387R (5'-GGGCGGAGTGTACAAGGC-3'; Marchesi et al., 1998) prajmera, 2,5 mM MgCl₂, 5 % DMSO i 1 µL DNK uzorka. Finalna zapremina je podešena dodavanjem destilovane vode. Kao matrica za PCR amplifikaciju korištena je metagenomska DNK izolovana iz vode jezera Robule i DNK izolovana iz bakterijskih kolonija.

PCR reakcija se odvijala pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 95 °C 5 min, zatim 30 ciklusa denaturacije na 95 °C u trajanju od 30 s, hibridizacijena 55 °C 30 s, i elongacije na 72 °C tokom 90 s, uz završnu elongaciju na 72 °C u trajanju od 10 minuta. Umnožavanje gena za 16S rRNK je urađeno u tri nezavisne PCR reakcije na aparatu Techne TC-312 (Midwest Scientific, SAD). Produkti PCR amplifikacije su zatim upotrebljeni za tri nezavisne digestije restrikcionim endonukleazama.

3.9.2 PCR PROTOKOL - IMGGI

U Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama (IMGGI) korišten je Kapa 2G Fast kit (Kapa Biosystems, SAD) za PCR reakcije. Reakciona smeša finalne zapremine 25 µL je sadržala 1×Kapa 2G pufera, 0,2 mM smeše svih dNTP, 0,5 µM 27F - 6-FAM obeleženog prajmera i 0,5 µM 1492R (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT- 3'; Lane et al., 1991) prajmera, 5 % DMSO, 0,1 µL Kapa 2G Fast DNK polimeraze i 1-2 µL uzorka DNK. Finalna zapremina reakcije podešavana je dodavanjem destilovane vode. Kao matrica za PCR amplifikaciju je korištena metagenomska DNK izolovana iz biomase sa dna jezera Robule. Za pozitivnu kontrolu je korištena metagenomska DNK iz laboratorijske kolekcije za koju je već utvrđeno da se može koristiti kao matrica za PCR amplifikaciju gena.

PCR reakcija se odvijala pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 3 minuta na 95 °C, zatim 35 ciklusa denaturacije na 95 °C u trajanju od 15s, hibridizacije na 52 °C tokom 15s i elongacije na 72 °C u trajanju od 30s. Umožavanje gena za 16S rRNK je urađeno u tri nezavisne PCR reakcije na aparatu GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD). Produkti PCR amplifikacije su zatim upotrebljeni za tri nezavisne digestije restrikcionim endonukleazama.

3.10 AGAROZNA GEL ELEKTROFOREZA

Rezultati izolacije metagenomske DNK i PCR amplifikacije gena za 16S rRNK su vizualizovani horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznim gelovima. Za pravljenje gela je korišten 1% rastvor agaroze u 1×TBE puferu. Kao stok je korišten 5×TBE (54 g Tris, 27,5 g borna kiselina i 20 ml 0,5 M EDTA pH 8, dopunjeno do zapremine od 1 L). Agarozu je rastvorena zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja gela, ali pre nego što gel očvrstne, dodavan je etidijum bromid u finalnoj koncentraciji od 5 µg mL⁻¹. Ovo jedinjenje interkalira u dvolančani molekul DNK i omogućuje vizuelizaciju DNK pod UV svetlom. Uzorci DNK su mešani sa puferom za nanošenje uzorka na gel u odnosu 6:1 i dodavani u udubljenja koja ostaju u očvrstlom gelu nakon izvlačanja češljeva. Najvažnije komponente pufera za nanošenje uzorka DNK na gel su boja bromfenol plavo i glicerol. Boja bromfenol plavo omogućuje praćenje kretanja fronta DNK kroz gel tokom elektroforeze, dok glicerol obara DNK na dno udubljenja u gelu, sprečavajući da se molekul DNK koji je rastvoren u vodi razlije po gelu. Veličina DNK fragmenata nakon PCR amplifikacije gena za 16S rRNK je procenjena poređenjem sa elektroforetskom pokretljivošću standarda koji sadrži DNK fragmente poznatih dužina. Kao standard (eng. *ladder*) za procenu dužine PCR amplifikovanih fragmenata korišten je *O'Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific, SAD) i *Lambda DNA EcoRI Plus HindIII* (Thermo Scientific, SAD). Očekivana dužina DNK fragmenta nakon PCR amplifikacije gena za 16S rRNK iznosi oko 1500 bp. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 9V po dužnom centimetru gela. Nakon završetka elektroforeze, detekcija fragmenata DNK je vršena pod UV svetlom talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

3.11 T-RFLP ANALIZA

3.11.1 OBRADA PCR PROIZVODA RESTRIKCIJOM ENDONUKLEAZAMA

Proizvodi PCR umnožavanja su sečeni *AluI*, *MspI*, *CfoI* i *HaeIII* restrikcijom endonukleazama. Za svaki restrikcijom enzim urađene su po tri PCR amplifikacije. PCR proizvodi koji su dobijeni umnožavanjem gena za 16S rRNK korišćenjem metagenomske DNK izolovane iz uzoraka vode jezera Robule uzorkovane u julu 2012. godine restrikcijom su sečeni sa *HaeIII*, *AluI* i *CfoI* endonukleazama (Promega, SAD), dok su za digestiju 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK izolovane iz biomase uzorkovane u junu 2013. korišteni enzimi *AluI*, *MspI* (*HpaI*) i *BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas, Litvanija).

Svaka reakciona smeša, finalne zapremine od 10 μL , sadržala je 1 μL odgovarajućeg pufera, 0,5 μL enzima, 7,5 μL dH_2O i 1 μL DNK, tj. PCR produkta. Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na 37 $^\circ\text{C}$, smeša je stavljana u frižider na +4 $^\circ\text{C}$ preko noći.

3.11.2 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Analiza dužine terminalnih restrikcijom fragmenata je rađena na aparatima za kapilarnu elektroforezu Beckman Coulter CEQ 8000 (Bangor University) i Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (IMGGI).

U bunariće mikrotitracionih ploča je dodavano po 2 μL produkta digestije i 28 μL rastvora koji sadrži 0,5 μL standarda u formamidu. Za Beckman Coulter CEQ 8000 je korišten standard *CEQ DNA Size Standard Kit 600* koji sadrži fragmente DNK dužine od 60 do 600 bp.

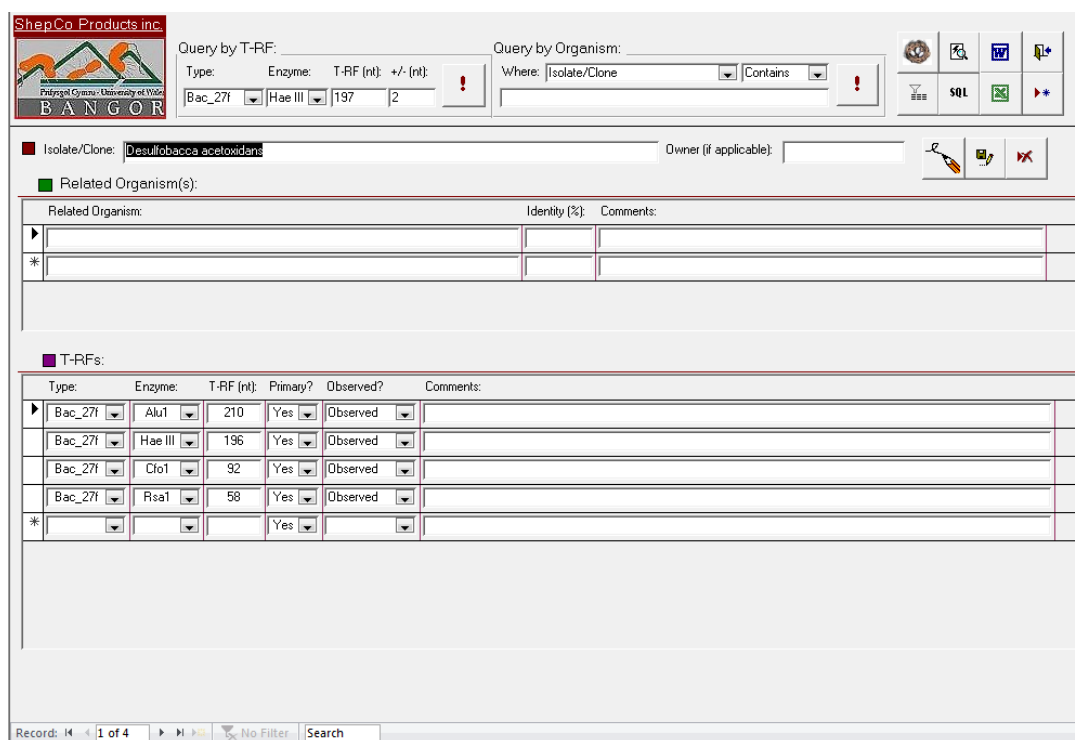
Za Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer korišten je *GeneScan 500 LYS* standard koji sadrži fragmente od 35 do 500 bp. U bunariće mikrotitracionih ploča je dodavano po 1 μL produkta digestije i 18 μL rastvora koji sadrži 1 μL standarda u formamidu.

Podaci o dužini terminalnih restrikcijom fragmenata (T-RF) i jačini fluorescentnog signala kojeg je emitovao svaki detektovani fragment su dobijeni pomoću softvera koji upravlja radom aparata za kapilarnu elektroforezu. Softver su razvile kompanije koje su proizvođači aparata i isporučuje se u paketu sa aparatom.

Relativna zastupljenost T-RF je izračunata kao procentualni udeo jačine fluorescentnog signala svakog pojedinačnog fragmenta u odnosu na ukupni intenzitet signala svih fragmenata. Signali intenziteta manjeg od 50 jedinica kao i T-RF kraći od 50 bp nisu uzimani u obzir.

3.11.3 ANALIZA T-RFLP PROFILA

Pošto javno dostupne baze podataka ne sadrže dovoljno podataka o acidofilnim organizmima, dobijeni rezultati o dužini T-RF su poređeni sa podacima u bazi podataka koju je razvio tim za izučavanje acidofila Univerziteta u Bangoru (Bangor Acidophile Research Team, Bangor University, UK) u programu Microsoft Access (slika 13). Bazu podataka je ljubazno ustupio profesor D. Barrie Johnson, rukovodilac ove laboratorije. Dobijeni rezultati su korišteni za procenu mikrobiološkog diverziteta analiziranih uzoraka.



Slika 13. Korisničko okruženje softvera za pretragu baze podataka T-RF.

Softver omogućuje pretragu po dva kriterijuma: dužini T-RF ili nazivu roda, vrste, izolata ili klona. Za pretragu po dužini T-RF treba izabrati prajmer koji je korišten u PCR amplifikaciji, enzim koji je korišten za digestiju, i na kraju uneti dužinu T-RF. Program će kao rezultat prikazati klonove ili izolate iz kojih je amplifikovana 16S

rRNK čijom digestijom su dobijeni T-RF odgovarajuće dužine. Postojanje većeg broja vrsta kojima odgovara isti T-RF otežava identifikaciju, što je jedan od razloga zašto se rade digestije sa tri enzima. Za pretragu po nazivu je potrebno uneti naziv izolovane vrste ili roda, ili šifru neidentifikovanog izolata ili klona. Nakon pretrage program će izlistati sve T-RF koji odgovaraju zadatom kriterijumu.

3.12 BIOLUŽENJE U LABORATORIJSKIM USLOVIMA

3.12.1 MINERALNI KONCENTRAT

U eksperimentima bioluženja uzorka mineralnog koncentrata korišten je mineralni koncentrat proizveden u pogonu flotacije Rudnika bakra Majdanpek koji je sadržao 17 % bakra. Dominantan mineral bakra u koncentratu je bio halkopirit. Radi tačnosti, eksperimenti su rađeni u triplikatu. U tri erlenmajera zapremine 250 mL dodato je po 100 mL rastvora bazalnih soli za heterotrofe (pH 2,0), 1 g uzorka koncentrata i 1 mL vode iz jezera Robule. Tri erlenmajera (u koje je dodat rastvor bazalnih soli i uzorci koncentrata) su inokulisana veštačkim bakterijskim konzorcijumom. Veštački bakterijski konzorcijum su činile sledeće vrste acidofilnih bakterija: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum feriphilum*, *Acidiphilium cryptum*. U erlenmajere je dodato po 150 µL svake čiste bakterijske kulture. Erlenmajeri su stavljeni na rotacionu mešalicu sa konstantnom brzinom mešanja od 150 obrtaja u minuti. Bioluženje se odvijalo na konstantnoj temperaturi od 30 °C i trajalo je četiri nedelje.

3.12.2 STARA FLOTACIJSKA JALOVINA RUDNIKA BAKRA BOR

Za eksperiment bioluženja uzoraka flotacijske jalovine upotrebljeni su uzorci uzeti iz Starog flotacijskog jalovišta Rudnika bakra Bor sa dubina od 10 m, 15 m i 20 m. Koncentracija bakra u uzorcima je iznosila 0,51 %, 0,33 %, odnosno 0,43 % (Stevanović, 2012). Kao rastvor za luženje upotrebljena je voda iz jezera Robule uzorkovana 12. juna 2013. godine. U erlenmajer zapremine 250 mL sipano je 100 mL jezerske vode i 5 g flotacijske jalovine. Uzorci su obeleženi kao 10, 15 i 20, u zavisnosti od uzorka jalovine koji je korišćen. Svaki uzorak je imao odgovarajuću abiotičku kontrolu koja se sastojala od 100 mL rastvora sumporne kiseline pH 2,5 (što odgovara

pH vrednosti jezerske vode) i 5 g odgovarajuće flotacijske jalovine. Kao dodatna kontrola u jedan erlenmajer je dodato samo 100 mL vode iz jezera Robule. Svi erlenmajeri su stavljeni na rotacionu mešalicu sa konstantnom brzinom mešanja od 150 obrtaja u minuti. Eksperiment se odvijao na konstantnoj temperaturi od 30 °C i trajao je pet nedelja.

3.13 STATISTIČKA ANALIZA

Uticaj rastvora koji je primenjen za bioluženje flotacijske jalovne na prinos bakra i uticaj sastava bakterijskog konzorcijuma na koncentraciju gvožđa i bakra u lužnom rastvoru nakon bioluženja mineralnog koncentrata su analizirani jednofaktornim ANOVA testom sa graničnom vrednošću od $P=0,05$. Analiza je urađena pomoću statističkog softvera SPSS 2.0 (SPSS Inc. Chicago, SAD)

4 REZULTATI

4.1 FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE UZORAKA VODE IZ JEZERA

U tabeli 6 su prikazani podaci o fizičko-hemijskim osobinama vode jezera Robule uzorkovane 26. jula 2012. godine i 12. juna 2013. godine.

Tabela 6. Fizičko-hemijske osobine uzoraka vode jezera Robule.

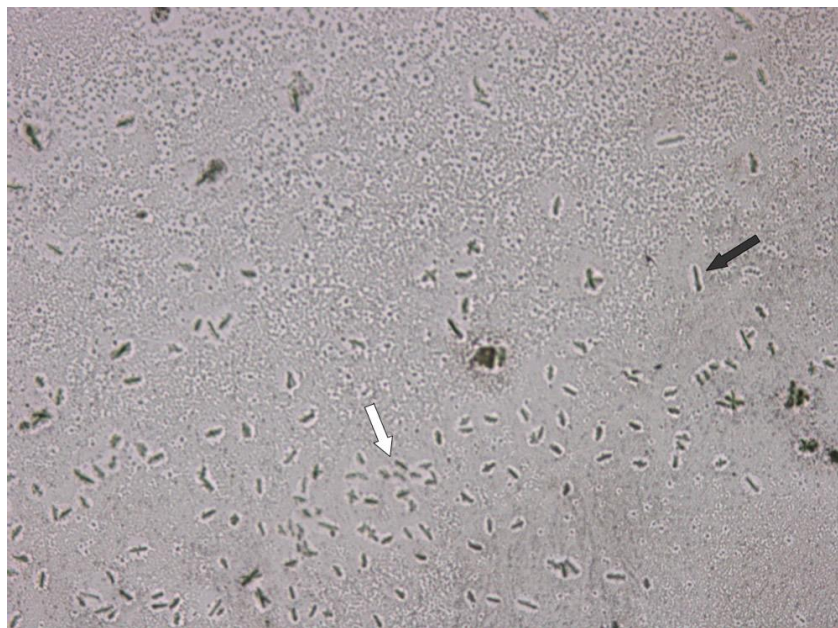
Datum	t, °C	Boja	pH	Eh, mV	Provodljivost, mScm ⁻¹	[Fe ³⁺], mgL ⁻¹	[Fe ²⁺], mgL ⁻¹	[Cu ²⁺], mgL ⁻¹
26. jul 2012.	26	crvena	2,55	+850	10	614±2,25	1,68±0,02	73±0,92
12. jun 2013.	21	crvena	2,53	/	/	250±1,54	0,3±0,01	47,24±0,61

4.2 ANALIZA MIKROBIOLOŠKOG DIVERZITETA UZORKA VODE IZ JEZERA ROBULE

Za procenu mikrobiološkog diverziteta uzorka vode iz jezera Robule korištene su klasične mikrobiološke metode (bojenje i posmatranje bakterija pod mikroskopom, gajenje bakterija na čvrstim podlogama), kao i molekularna metoda analize polimorfizma terminalnih restrikcionihih fragmenata (T-RFLP).

4.2.1 REZULTATI BOJENJA I POSMATRANJA MIKROORGANIZAMA POD MIKROSKOPOM

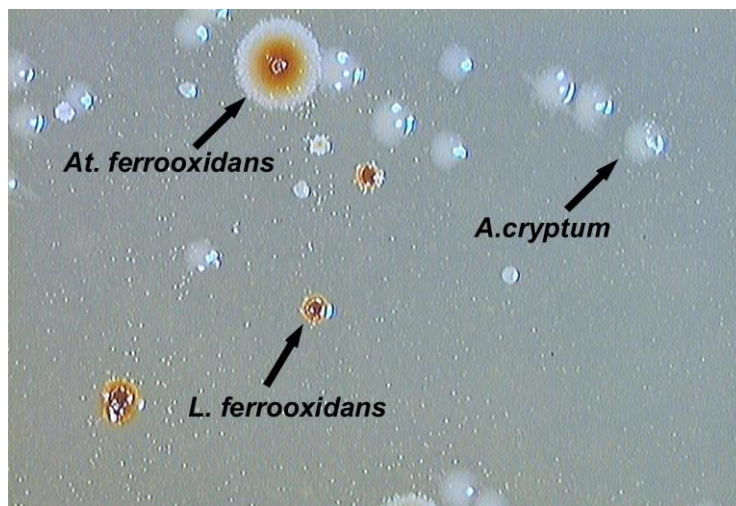
Na mikroskopskom preparatu se nakon bojenja bojom metilensko plavo po Lefleru mogu uočiti brojne sitnije bakterije koje oblikom podsećaju na zapetu (*Leptospirillum ferrooxidans*), kao i krupniji bacili (slika 14).



Slika 14. Mikroskopska fotografija bakterija u uzorku vode iz jezera Robule nakon bojenja. Bela strelica označava sitnije spirile, a crna strelica krupnije bacile.

4.2.2 KULTIVACIJA ACIDOFILNIH BAKTERIJA IZ JEZERA ROBULE NA SELEKTIVNIM ČVRSTIM PODLOGAMA

Uzorci vode su sterilnom ezom zasejani na dvoslojne podloge FeSO_4 (podloga sa gvožđe sulfatom i tetratonatom) i iFeO (podloga sa gvožđe(II)sulfatom). Nakon inkubacije na podlogama su uočene tri vrste kolonija: bele do bledoružičaste kolonije, sitne kolonije obložene oksidovanim gvožđem, krupnije kolonije obložene oksidisanim gvožđem sa svetlijim oreolom kao i žute kolonije (slike 15 i 16). Na iFeO podlozi su uočene isključivo sitne kolonije obložene gvožđem. Na FeSO_4 podlozi je izraslo najviše belih i bledoružičastih kolonija, zatim sitnih obloženih gvožđem, a najmanje je uočeno krupnijih kolonija obloženih gvožđem. Morfologija bakterijskih kolonija može u nekim slučajevima biti dovoljno pouzdan metod za identifikaciju roda ili vrste acidofilnih bakterija (Johnson et al., 2005). *Leptospirilumi* se mogu lako identifikovati na osnovu izgleda kolonija koje su sitne i obložene oksidisanim gvožđem. *Acidithiobacillus ferrooxidans* formira znatno krupnije kolonije takođe obložene oksidisanim gvožđem. Vrsta *Acidiphilium cryptum* stvara kolonije koje pod mikroskopom imaju belu ili bledoružičastu boju. Bledoružičasta boja potiče od prisustva bakteriohlorofila *a* u ćelijama ovih bakterija.



Slika 15. Kolonije acidofilnih bakterija na FeSO_4 podlozi inkulisanoj vodom iz jezera Robule uzorkovanom 12. jula 2012. Na slici se vidi da su najbrojnije bele kolonije heterotrofne bakterije *A. cryptum*. Uočavaju se tri male kolonije obložene gvoždem koje formira vrsta *L. ferrooxidans* i jedna veća kolonija obložena gvoždem koju formira vrsta *Acidithiobacillus ferrooxidans*.



Slika 16. Mikroskopski snimak krupnije kolonije gvožđe-oksidujućih bakterija (*At. ferrooxidans*) i sitnih kolonija gvožđe-oksidujućih bakterija (*L. ferrooxidans*) na FeSO_4 podlozi inkulisanoj uzorkom vode iz jezera Robule jula 2012. Mogu se uočiti i bele kolonije heterotrofnih bakterija.

4.2.3 T-RFLP ANALIZA UZORKA VODE IZ JEZERA ROBULE

Nakon izolacije DNK iz uzorka vode jezera Robule, urađena je PCR amplifikacija gena za 16S rRNK sa metagenomske DNK, a potom enzimska digestija pomoću tri restriktione endonukleaze: *HaeIII*, *AluI* i *CfoI*. U tabeli 7 su prikazani

podaci koje je generisao softver tokom T-RFLP analize. Ukupni intenzitet fluorescentnih signala se računa kao suma intenziteta izmerenih za svaki T-RF. Relativna zastupljenost T-RF je izračunata kao procentualni udeo intenziteta signala detektovanog za svaki T-RF u odnosu na ukupni intenzitet signala. Relativna zastupljenost bakterija u uzorku je procenjena na osnovu intenziteta signala za svaki T-RF generisan nakon digestije sa tri enzima za koji je, na osnovu podataka u bazi, utvrđeno da potiče od iste vrste bakterija.

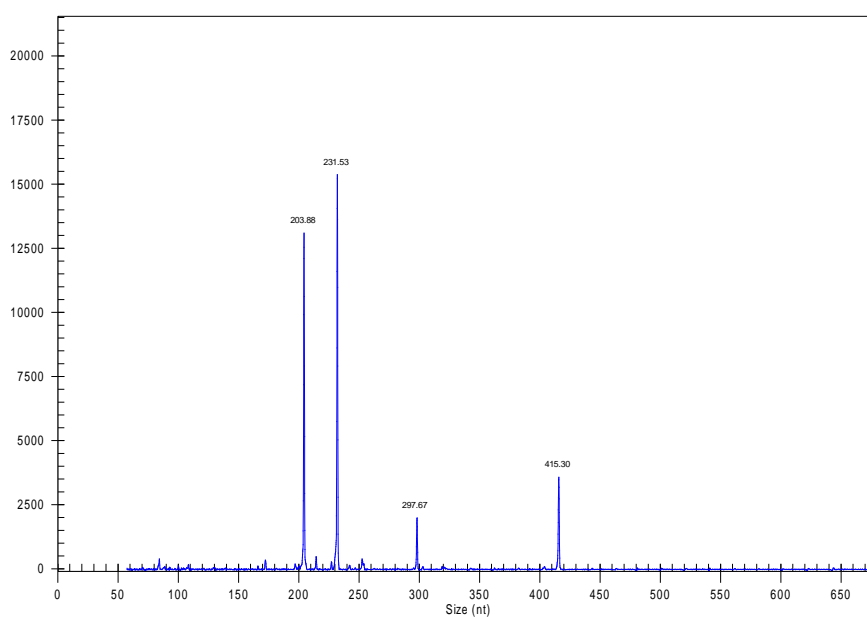
Potrebno je napomenuti da se procena zastupljenosti bakterija u uzorku na osnovu podataka dobijenih T-RFLP analizom smatra semi-kvantitativnom metodom. Slike 17-20 predstavljaju grafički prikaz podataka predstavljenih u tabeli 7.

Tabela 7. T-RFLP analiza uzoraka vode iz jezera Robule.

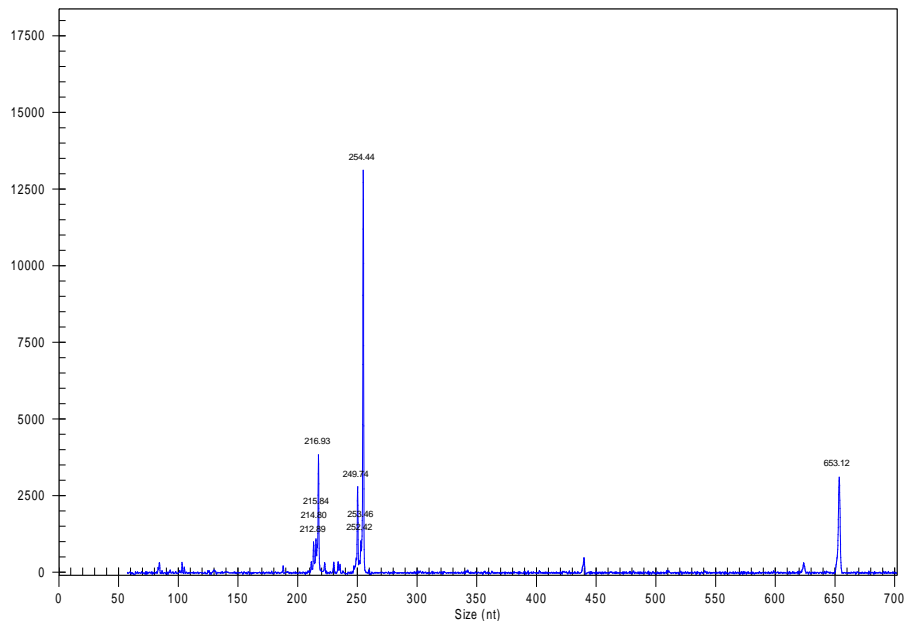
Enzim	Dužina T-RF, nt	Intenzitet signala
<i>HaeIII</i>	204	8123
	232	9600
	298	1252
	415	2025
<i>AluI</i>	213	648
	215	675
	216	499
	217	2363
	250	1716
	252	650
	253	714
	254	7890
	653	1824
	<i>CfoI</i>	263
265		944
374		4285
519		5814

Upotreba T-RFLP metode za identifikaciju mikroorganizama u sredinskim uzorcima se može smatrati dovoljno pouzdanom samo u slučaju da životnu sredinu karakteriše veoma ograničen mikrobiološki diverzitet (poglavlje 1.4.2.4), kao što je

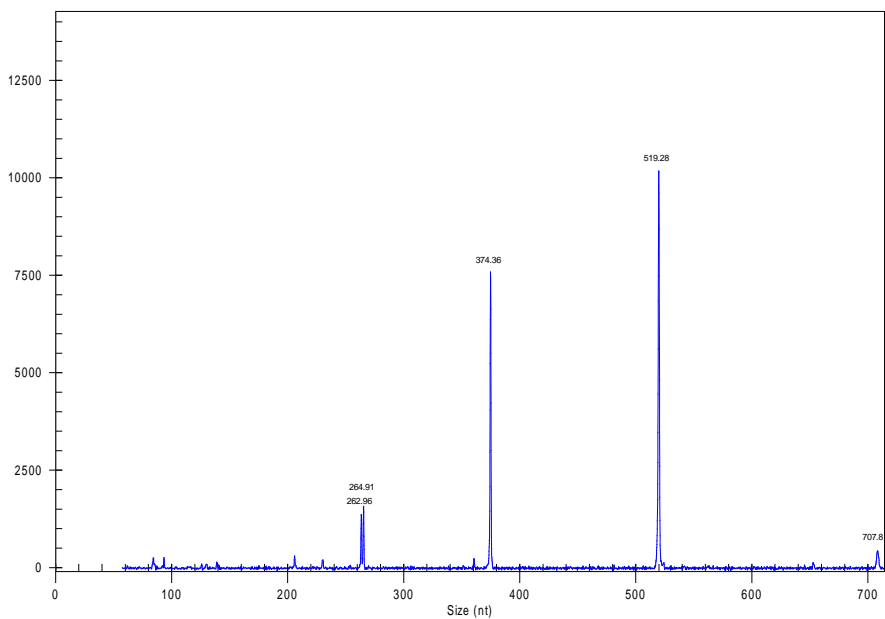
slučaj sa jezerom Robule. Identifikacija mikroorganizama je urađena poređenjem podataka dobijenih digestijom sa informacijama u bazi podataka terminalnih restrikcionih fragmenata (Bangor Acidophile Research Team, Bangor University, UK). Poklapanjem tri T-RF dobijena digestijom pomoću tri različita enzima sa podacima iz baze podataka, možemo tvrditi sa značajnim stepenom sigurnosti da je identifikovana vrsta mikroorganizma prisutnog u uzorku (pod uslovom da je mikroorganizam kultivisan i da podaci o dužini T-RF postoje u bazi podataka). Ukoliko postoje jedno ili dva poklapanja, postoji samo indicija da je određeni mikroorganizam prisutan u uzroku.



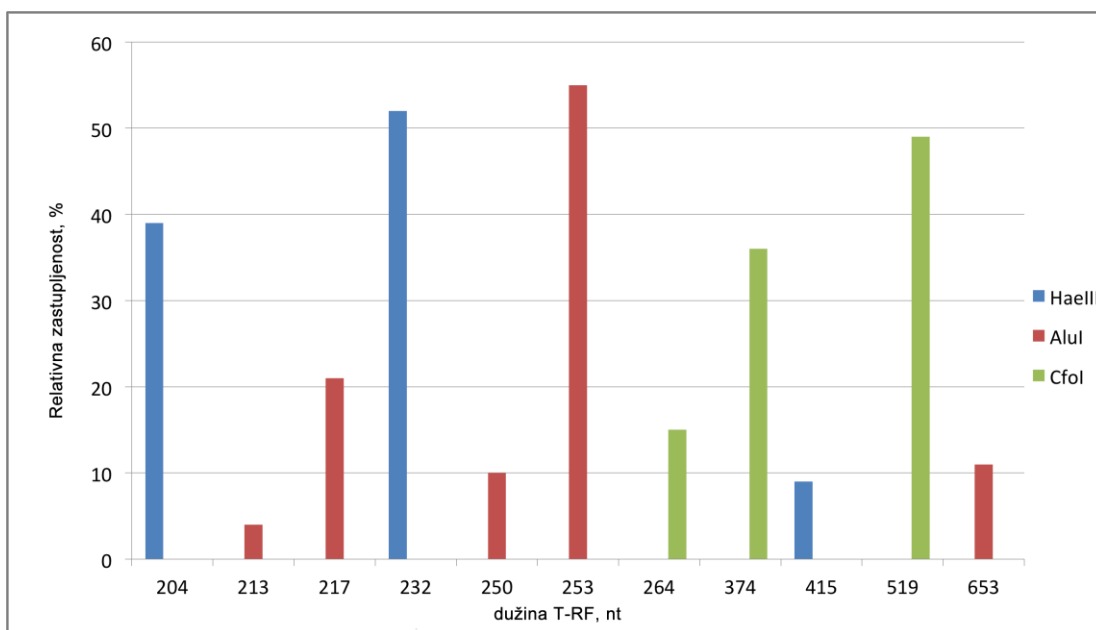
Slika 17. Elektroferogram dobijen nakon digestije 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK izolovane iz vode jezera Robule *HaeIII* restrikcionom endonukleazom



Slika 18. Elektroferogram dobijen nakon digestije 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK izolovane iz vode jezera Robule *AluI* restrikcionom endonukleazom.



Slika 19. Elektroferogram dobijen nakon digestije 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK izolovane iz vode jezera Robule *CfoI* restrikcionom endonukleazom.



Slika 20. Relativna zastupljenost T-RF nakon digestije 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK izolovane iz vode jezera Robule sa tri endonukleaze.

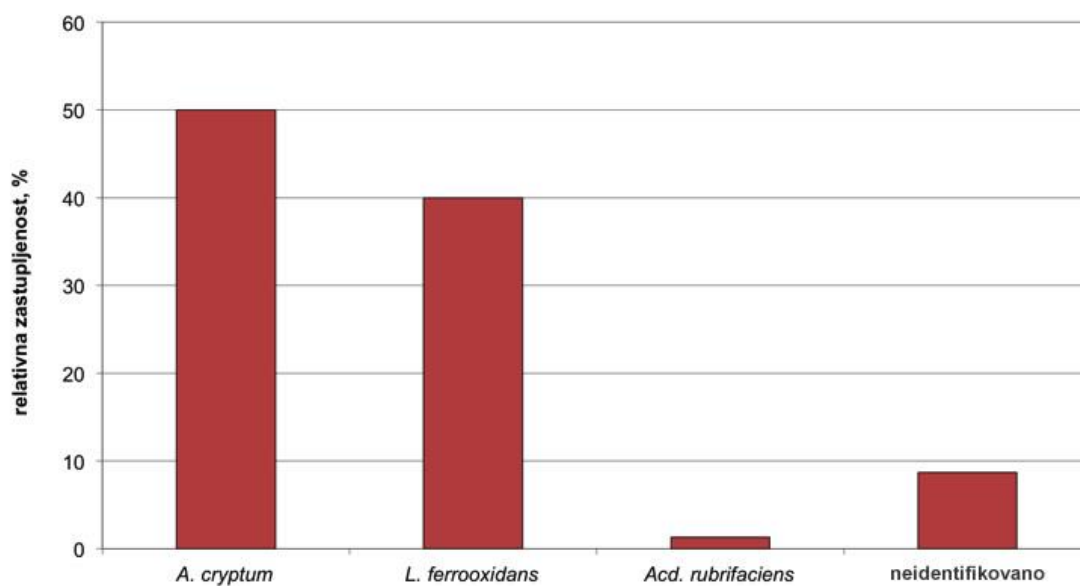
U tabeli 8 su prikazane vrste acidofilnih bakterija identifikovane u uzorku vode sa površine jezera Robule na osnovu T-RF dobijenih nakon digestije gena za 16S rRNK sa tri endonukleaze.

Tabela 8. Vrste acidofilnih bakterija identifikovanih poređenjem podataka dobijenih analizom T-RF sa podacima u bazi terminalnih restrikcionih fragmenata.

Enzim	T-RF iz baze podataka	T-RF dobijen digestijom	Identifikovana bakterija
<i>HaeIII</i>	204	204	
<i>AluI</i>	217	217	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
<i>CfoI</i>	374	374	
<i>HaeIII</i>	232	231	
<i>AluI</i>	255	253	<i>Acidiphilium cryptum</i>
<i>CfoI</i>	519	519	
<i>AluI</i>	213	214	<i>Acidisphaera rubrifaciens(?)</i>

U uzorku vode iz jezera Robule su identifikovane vrste *Lepstospirillum ferrooxidans* i *Acidiphilium cryptum*. Pod znakom pitanja je heterotrofna bakterija *Acidisphaera rubrifaciens* pošto je dobijen samo jedan T-RF koji ukazuje na prisustvo ove vrste u

uzorku. Potom je na osnovu podataka dobijenih T-RFLP analizom izvršena procena relativne zastupljenosti bakterijskih vrsta u analiziranom uzorku (slika 21). Najzastupljenije su bile vrste *Acidiphilium cryptum* (~50 %) i *Leptospirillum ferrooxidans* (~40 %). Relativna zastupljenost TR-F koji verovatno potiče iz vrste *Acidisphaera rubrifaciens* je iznosila ~1,3 % dok su neidentifikovani fragmenti (pseudo T-RF) bili zastupljeni sa ~8,7 %.

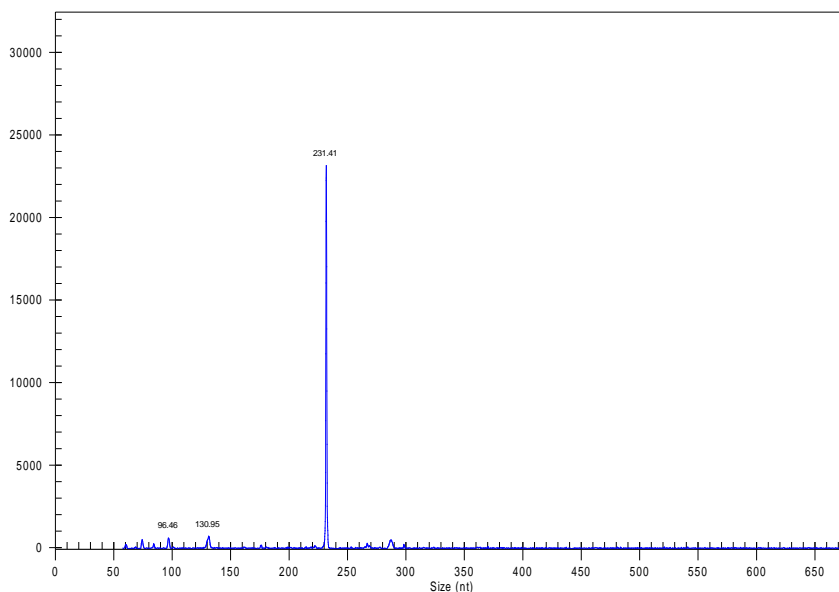


Slika 21. Relativna zastupljenost acidofilnih bakterija u uzorku vode iz jezera Robule

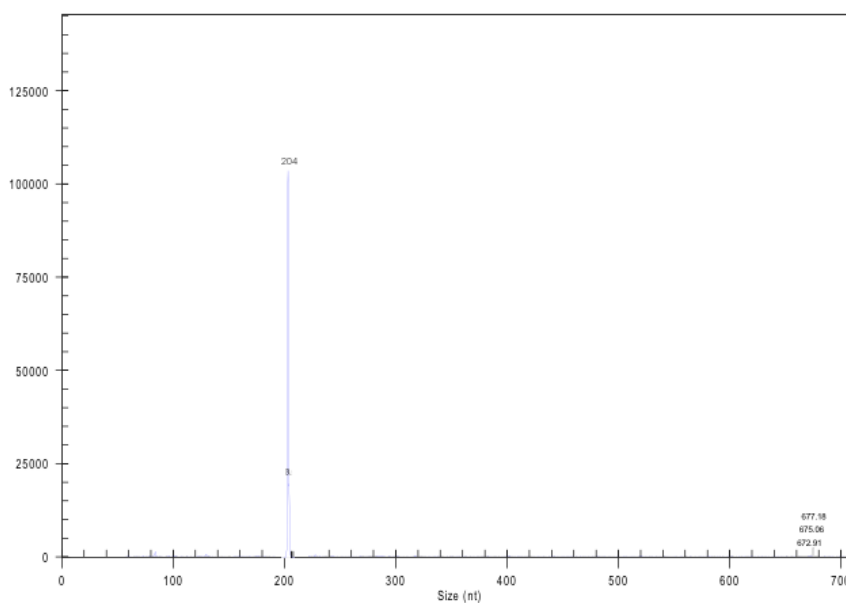
4.2.4 T-RFLP ANALIZA NAKON IZOLACIJE DNK IZ BAKTERIJSKIH KOLONIJA

Analiza T-RF dobijenih nakon digestije 16S rRNK amplifikovane iz DNK izolovane iz bakterijske kolonije daje samo jedan signal na osnovu kojeg se pomoću baze podataka T-RF može identifikovati bakterijska vrsta koja je formirala koloniju. Digestijom DNK iz bledoružičastih kolonija dobijen je fragment dužine 231 bp koji ukazuje na vrstu *Acidiphilium cryptum* (slika 22). Nakon digestije gena za 16S rRNK dobijene iz sitnih kolonija obloženih gvožđem identifikovan je fragment dužine 204 bp koji, na osnovu podataka iz baze, odgovara vrsti *Leptospirillum ferrooxidans* (slika 23). Digestijom DNK iz krupnijih kolonija obloženih gvožđem dobijen je fragment dužine 253 bp koji odgovara vrsti *Acidithiobacillus ferrooxidans* (slika 24). Analiza T-RF dobijenih iz kolonija potvrdila je rezultate dobijene T-RFLP analizom metagenomske DNK. Identifikovana je i vrsta *Acidithiobacillus ferrooxidans* koja nije detektovana T-

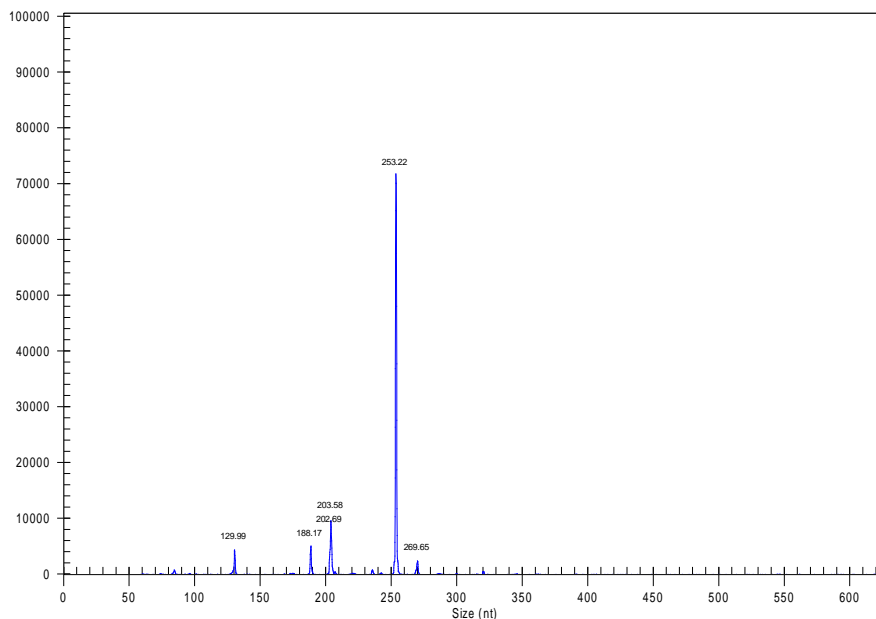
RFLP analizom. Fragmenti sa minornom visinom signala su PCR artefakti (pseudo T-RF).



Slika 22. T-RF dužine 231 bp dobijen nakon digestije 16S rRNK iz bele kolonije sa FeSO₄ podloge. Informacije u bazi podataka ukazuju da T-RF potiče od bakterije *Acidipillum cryptum*



Slika 23. T-RF dužine 204 bp dobijen nakon digestije 16S rRNK iz sitne kolonije obložene oksidovanim gvožđem. Informacije u bazi podataka ukazuju da T-RF potiče od bakterije *Leptospirillum ferrooxidans*.



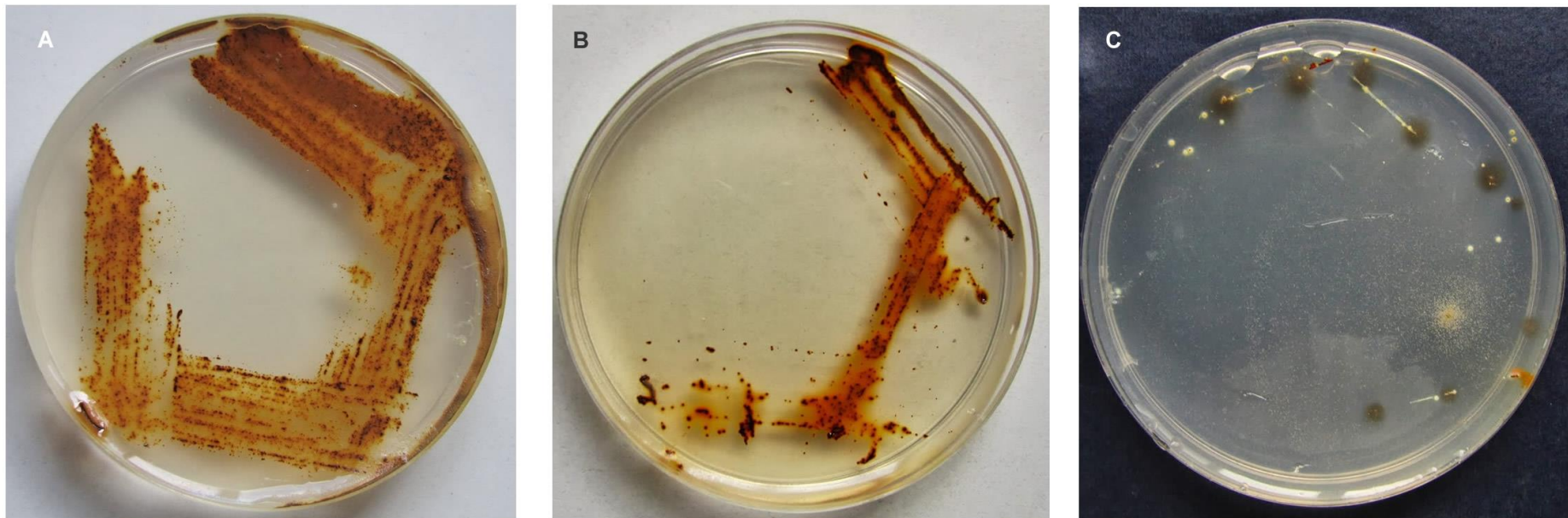
Slika 24. T-RF dužine 253 bp dobijen nakon digestije 16S rRNK iz krupnije kolonije obložene gvožđem. T-RF potiče od bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans*

4.2.5 ANALIZA MIKROBIOLOŠKOG DIVERZITETA UZORAKA BIOMASE I JALOVINE

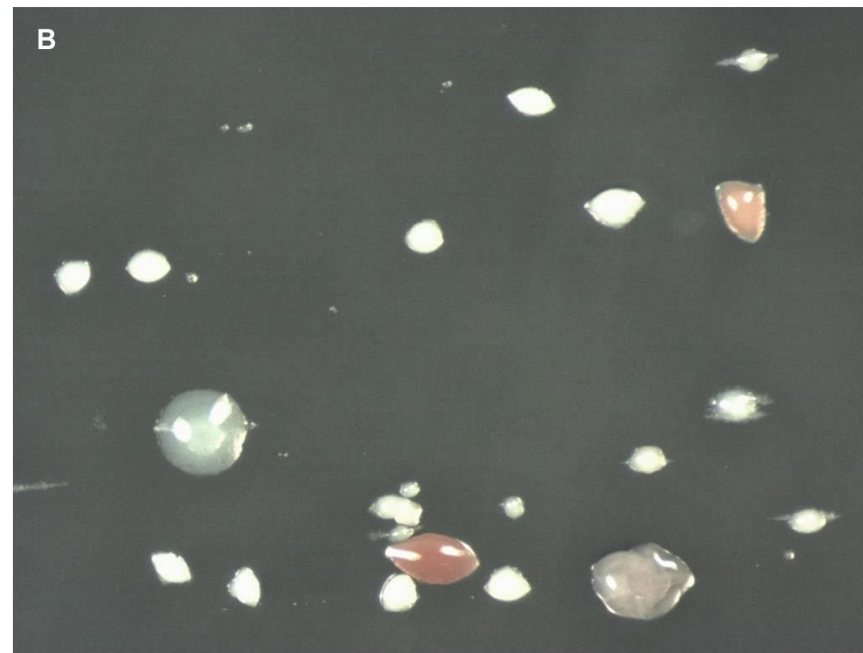
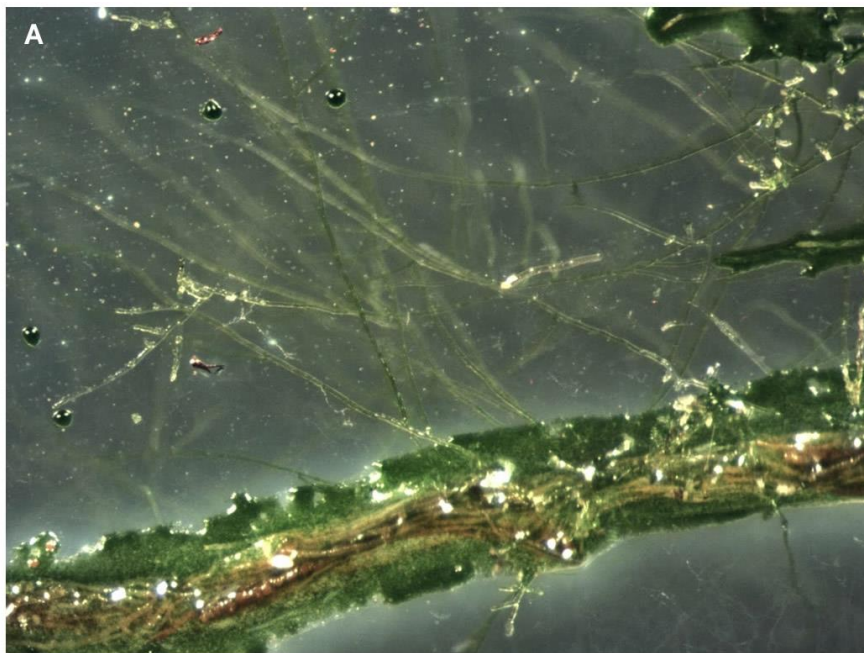
Mikrobiološki diverzitet biomase je procenjen na osnovu kultivacije acidofilnih bakterija na selektivnim čvrstim podlogama i T-RFLP analize. Za procenu mikrobiološke aktivnosti jalovine korištena je samo metoda kultivacije na selektivnoj čvrstoj podlozi.

4.2.5.1 Izolacija bakterija iz uzoraka biomase na selektivnim čvrstim podlogama

Bakterije iz uzorka biomase uzetog 12. Juna 2013. godine su zasejane na $iFe_{\underline{0}}$, $Ye_{\underline{0}}$ i $FeYe_{\underline{0}}$ selektivne čvrste podloge. Nakon četiri nedelje gajenja na temperaturi od 30 °C, na podlogama su bile jasno uočljive kolonije mikroorganizama. Na slici 25 se uočavaju sitne kolonije obložene gvožđem koje su izrasle na podlozi sa gvožđe-sulfatom $iFe_{\underline{0}}$. Kolonije sa ovakvom morfologijom su karakteristične za acidofilne gvožđe-oksidujuće bakterije *Leptospirillum ferrooxidans*. Na podlozi sa gvožđe(II)sulfatom i ekstraktom kvasca ($FeYe_{\underline{0}}$) izrasle su krupnije kolonije gvožđe-oksidujućih bakterija tipičnih za vrstu *At. ferrooxidans*. Na podlogama sa ekstraktom kvasca $Ye_{\underline{0}}$ izrasle kolonije acidofilnih heterotrofnih bakterija. Na slici 26 je prikazan snimak končaste alge iz uzorka biomase i mikroskopski snimak kolonija heterotrofnih bakterija *Acidiphilium cryptum* i *Acidocella aromatica* izraslih na $Ye_{\underline{0}}$ podlozi.



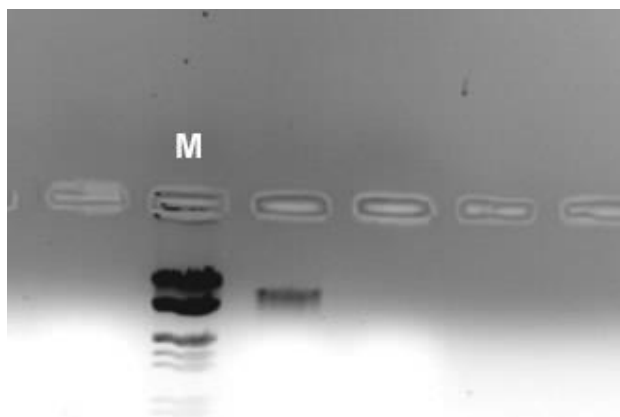
Slika 25. Kolonije acidofilnih bakterija izrasle nakon inokulacije tri različite podloge uzorcima biomase uzetim iz jezera Robule juna 2013. godine. A) Sitne kolonije obložene gvoždem izrasle na iFe_0 podlozi koje formira vrsta *Leptospirillum ferrooxidans*. B) Krupnije kolonije gvožđe-oksidujućih bakterija na $FeYe_0$ podlozi. C) Kolonije heterotrofnih acidofila na Ye_0 podlozi.



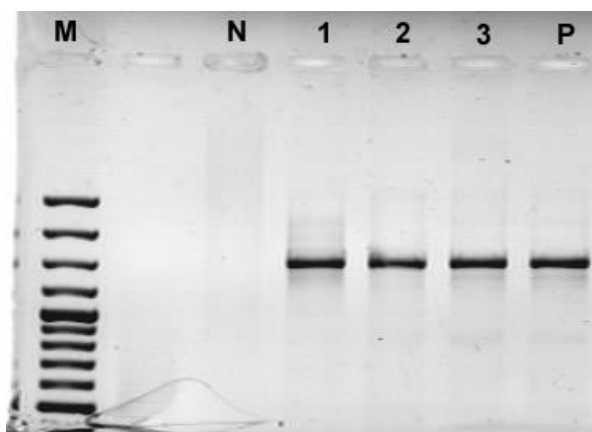
Slika 26. A) Mikroskopska fotografija končaste alge izolovane iz biomase. B) Mikroskopska fotografija kolonija heterotrofnih bakterija izraslih na Ye_o podlozi inokulisanoj uzorcima biomase. Ružičaste kolonije su karakteristične za vrstu *Acidiphilium cryptum*, dok bele kolonije formira *Acidocella aromatica*.

4.2.5.2 T-RFLP analiza

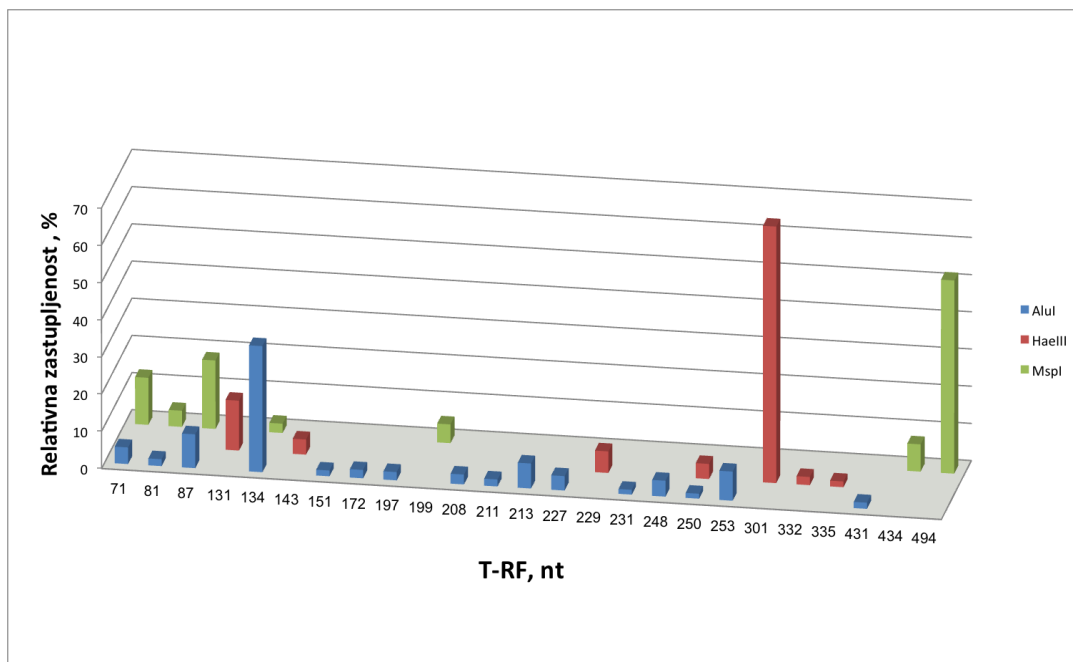
Nakon izolacije DNK iz biomase (slika 27) i PCR amplifikacije metagenomske 16S rRNK (slika 28), urađena je digestija amplifikovanih fragmenata DNK pomoću tri restriktione endonukleaze *AluI*, *HaeIII* i *MspI* i izračunata je relativna zastupljenost T-RF nakon digestije (slika 29). U tabeli 9 su prikazani podaci iz baze podataka T-RF koji odgovaraju restriktionim fragmentima detektovanim nakon T-RFLP analize, kao i relativna zastupljenost detektovanih T-RF.



Slika 27. Metagenomska DNK izolovana iz biomase uzorkovane iz jezera Robule, vizualizovana na agaroznom gelu nakon elektroforeze. M- marker (Lambda DNA EcoRI/HindIII).



Slika 28. Agarozna gel elektroforeza produkata reakcije umnožavanja gena za 16S rRNK. M – marker (O'Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder), N – negativna kontrola, 1,2,3 – produkti PCR amplifikacije, P – pozitivna kontrola.



Slika 29. Relativna zastupljenost T-RF nakon enzimske digestije 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK uzorka biomase

Tabela 9. Približna identifikacija mikroorganizama i relativna zastupljenost T-RF nakon enzimske digestije 16S rRNK gena amplifikovanih iz metagenomske DNK uzorka biomase.

Enzim	T-RF	Rod/vrsta	Komentar	Relativna zastupljenost, %
AluI	71	/	Nema podataka (pseudo T-RF)	4,47
	81	<i>Sulfobacillus sp.</i>	Nekultivisani klonovi svrstani u rod <i>Sulfobacillus sp.</i>	1,85
	87	/	Nema podataka	9,09
	134	<i>Acidocella aromatica</i> ili <i>Ferrimicrobium acidophilum</i>		33,9*
	151	<i>Acidobacterium</i>	98 % identičnosti sa <i>Acidobacterium sp.</i>	1,55
	172	<i>Sulfobacillus termotolerans</i>	99,6 % identičnosti sa <i>Sulfobacillus termotolerans</i>	2,25

<i>AluI</i>	197	Hloroplast	16S rRNK hloroplasta	2,22	
	208	<i>Acidocella sp.</i>	Više izolata sa 99 % identičnosti sa <i>Acidocella sp.</i>	2,66	
	211	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	T-RF karakterističan za ovu vrstu	1,88	
	213	<i>Sulfobacillus sp.</i> / <i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	Nekultivisani klonovi srodni <i>Sulfobacillus sp.</i> ili <i>Acidosphaera rubrifaciens</i>	6,72	
	227		<i>nepoznato</i>		
	231	<i>Acidithiobacillus sp.</i> / <i>Alycyclobacillus sp.</i>	Izolati <i>Acidithiobacillus sp.</i> ili <i>Alycyclobacillus sp.</i>	1,29	
	248	<i>Leptospirillum sp.</i>		4,28	
	250	<i>Leptospirillum sp.</i>		1,33	
	253	<i>Acidiphilium cryptum</i>		7,83	
	431	<i>Acidiphilium sp.</i>	96,7 % identičnosti sa <i>Acidiphilium sp.</i>	1,66	
	<hr/>				
	<i>HaeIII</i>	131	<i>Sulfobacillus sp.</i>	98 % identičnosti sa <i>Sulfobacillus sp.</i>	13,4
		143	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>		4,06
229		<i>Acidocella aromatica</i>		5,79	
250		<i>Alycyclobacillus sp.</i>	97 % identičnosti sa <i>Alycyclobacillus sp.</i>	4,06	
301		Hloroplast	16S rRNK hloroplasta	68,94*	
332		/	Nema podataka	2,2	
335		/	Nema podataka	1,54	

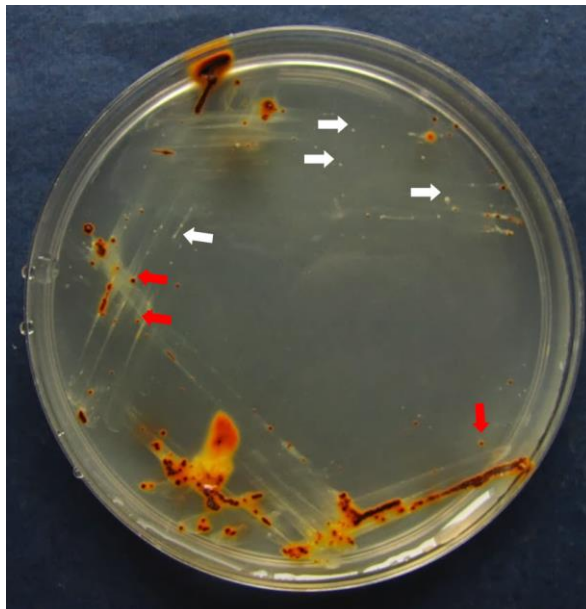
71	/	Nekultivisani heterotrofni acidofili	12,65
81	<i>L. ferrooxidans</i>	Klon 98 % identičnosti sa <i>L. ferrooxidans</i>	4,34
87	/	Nema podataka	18,4
199	<i>Sulfobacillus</i> <i>thermotolerans</i>		5,04
434	/	Nema podataka	7,34
494	<i>Acidithiobacillus</i> <i>ferrooxidans</i>		51,93*

*T-RF sa najvećom relativnom zastupljenošću.

Dužine dobijenih T-RF su poređene sa podacima u bazi podataka. Podaci o najzastupljenijem fragmentu su podebljani.

4.2.5.3 Mikrobiološka aktivnost jalovine

Radi procene mikrobiološke aktivnosti jalovine, a samim tim i procene sposobnosti jalovine da generiše kisele rudničke vode, uzorci jalovine su zasejani na selektivne FeYe₀ podloge sa gvožđe-sufatom i ekstrakom kvasca (slika 30). Na podlogama su izrasle su kolonije gvožđe-oksidujućih acidofila i heterotrofnih acidofila.



Slika 30. Kolonije heterotrofnih i gvožđe-oksidujućih bakterija na FeYe₀ podlozi zasejanoj uzorkom jalovine. Bele strelice označavaju kolonije heterotrofnih bakterija, a crvene pokazuju na kolonije gvožđe-oksidujućih bakterija.

4.3 REZULTATI EKSPERIMENTA BIOLUŽENJA BAKRA IZ MINERALNOG KONCENTRATA

Nakon završetka eksperimenta bioluženja izmereni su pH, redoks potencijal, koncentracija gvožđa i bakra u rastvorima. Rezultati su prikazani u tabeli 10 kao srednja vrednost tri nezavisna merenja. Statistička analiza (ANOVA, $P < 0,05$) pokazuje da je količina bakra oslobođena tokom bioluženja koncentrata u rastvoru inokulisanom veštačkim bakterijskim konzorcijumom bila statistički značajno veća od koncentracije bakra oslobođene nakon bioluženja u rastvoru koji je inokulisan vodom iz jezera Robule ($963 \pm 3,523 \text{ mgL}^{-1}$, odnosno $808,97 \pm 5,735 \text{ mgL}^{-1}$). Količina ukupnog gvožđa oslobođena tokom bioluženja koncentrata pomoću veštačkog konzorcijuma je bila statistički značajno veća od količine ukupnog gvožđa oslobođenog tokom bioluženja konzorcijumom bakterija iz jezera Robule (ANOVA $P < 0,05$; $1960 \pm 2,298 \text{ mgL}^{-1}$, odnosno $815 \pm 1,633 \text{ mgL}^{-1}$).

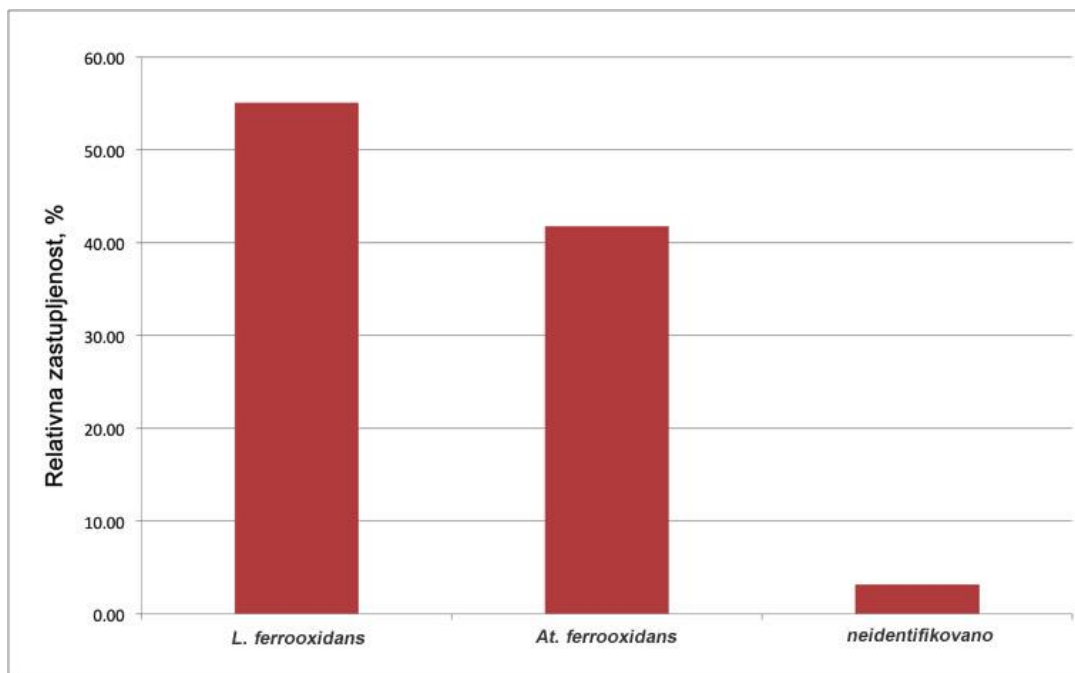
Tabela 10. Rezultati eksperimenta bioluženja mineralnog koncentrata u rastvorima koji su inokulirani vodom iz jezera Robule i veštački pripremljenim bakterijskim konzorcijumom.

Inokulat	pH	Eh, mV	[Fe], mgL^{-1}	[Cu], mgL^{-1}	PrinosCu, %
Voda iz jezera	2,20	$820 \pm 0,238$	$815 \pm 1,633$	$808,97 \pm 5,735$	47,5 %
Veštački konzorcijum acidofilnih bakterija	2,05	$860 \pm 0,455$	$1960 \pm 2,298^*$	$963 \pm 3,523^*$	56,64 %

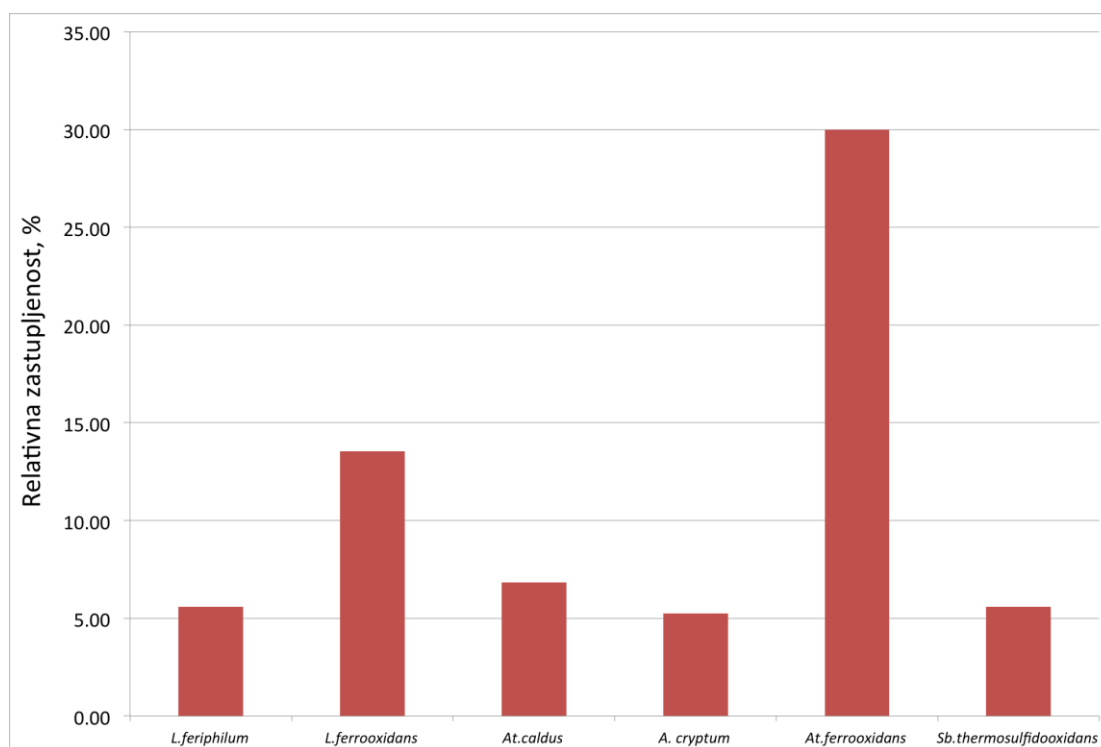
*Vrednost koja je statistički značajno veća.

4.3.1 ANALIZA SASTAVA BAKTERIJSKIH KONZORCIJUMA NAKON BIOLUŽENJA

Nakon završetka eksperimenta bioluženja, izolovana je DNK iz lužnih rastvora, a zatim je urađena digestija amplifikovanih fragmenata pomoću restriktione endonukleaze *HaeIII* i T-RFLP analiza. Na osnovu dobijenih podataka, procenjena je relativna zastupljenost mikroorganizama u lužnim rastvorima (slike 31 i 32).



Slika 31. Relativna zastupljenost mikroorganizama nakon eksperimenta bioluženja u uzorku inokulisanom vodom iz jezera Robule



Slika 32. Relativna zastupljenost mikroorganizama nakon bioluženja u uzorku inokulisanom veštački kreiranim bakterijskim konzorcijumom.

Nakon bioluženja, u uzorku inokulisanom vodom iz jezera Robule identifikovane su samo dve vrste: *Leptospirillum ferrooxidans* (55,06 %) i

Acidithiobacillus ferrooxidans (41,78 %). Zastupljenost neidentifikovanih fragmenata je bila 3,16 %. U uzorku inokulisanom veštačkim bakterijskim konzorcijumom identifikovane su vrste *Acidithiobacillus ferrooxidans* (30 %), *Leptospirillum ferrooxidans* (13,54 %), *Acidithiobacillus caldus* (6,83 %), *Leptospirillum feriphilum* (5,59 %), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (5,59 %) i *Acidiphilium cryptum* (5,26 %).

4.4 REZULTATI EKSPERIMENTA BIOLUŽENJA BAKRA IZ FLOTACIJSKE JALOVINE

Koncentracije bakra izmerene nakon pet nedelja eksperimenta bioluženja kao i prinosi bakra izraženi u procentima su prikazani u tabeli 11. Promene koncentracija ukupnog Cu, zatim Fe²⁺ i Fe³⁺ jona, kao i promene pH vrednosti lužnog rastvora tokom bioluženja su prikazane u tabelama 12-15.

Tabela 11. Koncentracije bakra izmerene nakon eksperimenta bioluženja uzoraka flotacijske jalovine i procenjeni prinos bakra.

	Uzorak			
	10 m	15 m	20 m	Srednja vr.
Sadržaj Cu, mgkg ⁻¹	5100	3300	4300	4233.33
Izlužen Cu, mgL ⁻¹	249,33±13,84	112,77±2,13	156,03±1,23	172,71±14,05
Prinos Cu, %	97,78±5,50	68,34±1,21	72,57±0,57	81,59±8,15

Prikazane koncentracije bakra u lužnom rastvoru su korigovane za koncentraciju bakra koja je izmerena u jezerskoj vodi (47,24±0,61mgL⁻¹).

Tabela 12. Promene koncentracije bakra tokom bioluženja i kiselinskog luženja.

		Nedelje				
		1	2	3	4	5
10 m	BIO	52,30±0,69	298,60±3,09	300,23±2,11	216,69±18,64	305,82±13,84
	KIS	49,77±0,46	186,74±9,28	215,76±4,09	129,88±85,87	193,55±7,47
15 m	BIO	53,36±0,83	142,54±2,34	171,22±0,58	126,81±2,96	168,72±2,13
	KIS	60,15±0,61	77,43±8,03	84,85±0,58	77,43±3,08	95,67±15,09
20 m	BIO	52,43±0,23	188,09±8,18	202,26±2,11	161,88±4,76	211,99±1,23
	KIS	56,95±0,46	103,07±1,17	109,14±1,55	99,65±0,86	94,96±2,46

BIO – bioluženje, KIS – kiselinsko luženje

Tabela 13. Promene koncentracije Fe³⁺ jona tokom bioluženja i kiselinskog luženja.

		Nedelje				
		1	2	3	4	5
10 m	BIO	330,98±1,40	358,47±0,91	549,8±2,866	1785,04±206,21	1029,03±4,00
	KIS	103,68±0,25	103,53±0,00	103,97±0,76	19,47±2,48	355,11 ± 3,35
15 m	BIO	202,86±1,65	443,84±1,90	379,85±1,53	1713,44±71,45	1139,27±2,81
	KIS	103,39±0,25	107,60±1,10	102,80±0,25	13,75±8,59	296,65±1,01
20 m	BIO	146,72±1,90	247,07±1,91	236,16±0,87	1485,76±43,24	938,57 ±2,52
	KIS	104,70±0,25	209,26±0,25	104,26±0,67	39,52±11,37	425,79±0,50

BIO – bioluženje, KIS – kiselinsko luženje

Tabela 14. Promena koncentracije Fe²⁺ jona tokom bioluženja i kiselinskog luženja.

		Nedelje				
		1	2	3	4	5
10 m	BIO	0,030±0,00	4,510±1,25	4,920±0,12	0,080±0,00	0,300±0,00
	KIS	0,270±0,00	0,430±0,00	0,450±0,13	0,020±0,00	0,646±0,00
15 m	BIO	0,360±0,04	6,130±0,05	6,070±0,40	1,150±0,04	3,770±0,03
	KIS	0,610±0,03	1,770±0,04	1,760±0,12	1,080±0,05	1,475±0,00
20 m	BIO	0,410±0,05	6,110±0,93	6,920±0,45	1,610±0,05	4,041±0,02
	KIS	0,640±0,05	1,700±0,14	1,720±0,04	0,410±0,01	0,287±0,00

BIO – bioluženje, KIS – kiselinsko luženje

Tabela 15. Promene pH vrednosti u lužnim rastvorima tokom bioluženja i kiselinskog luženja.

		Nedelje				
		1	2	3	4	5
10 m	BIO	2,54	2,58	2,43	2,24	2,22
	KIS	2,50	3,44	3,27	3,02	3,34
15 m	BIO	2,53	2,50	2,33	2,26	2,20
	KIS	2,50	2,80	2,65	2,67	2,68
20 m	BIO	2,55	2,88	2,36	2,33	2,31
	KIS	2,50	2,88	2,63	2,70	2,77

BIO – bioluženje, KIS – kiselinsko luženje

Rezultati statističke analize su pokazali da je količina bakra oslobođena tokom bioluženja uzoraka flotacijske jalovine uzetih sa dubine od 10 i 20 m bila značajno veća u odnosu na količinu bakra oslobođenu tokom kiselinskog luženja istih uzoraka. Nije bilo statistički značajne razlike u količini oslobođenog bakra tokom bioluženja i kiselinskog luženja uzoraka uzetih sa dubine od 15 m. Na slici 33 su prikazane promene koncentracija Cu, Fe²⁺ i Fe³⁺ jona u lužnim rastvorima tokom procesa bioluženja i luženja kiselinom. Koncentracije bakra koje su bile statistički značajno veće tokom bioluženja u odnosu na kiselinsko luženje su označene zvezdicom.

4.4.1 KVALITATIVNA I SEMI-KVANITATIVNA RENDGENSKA DIFRAKCIONA ANALIZA

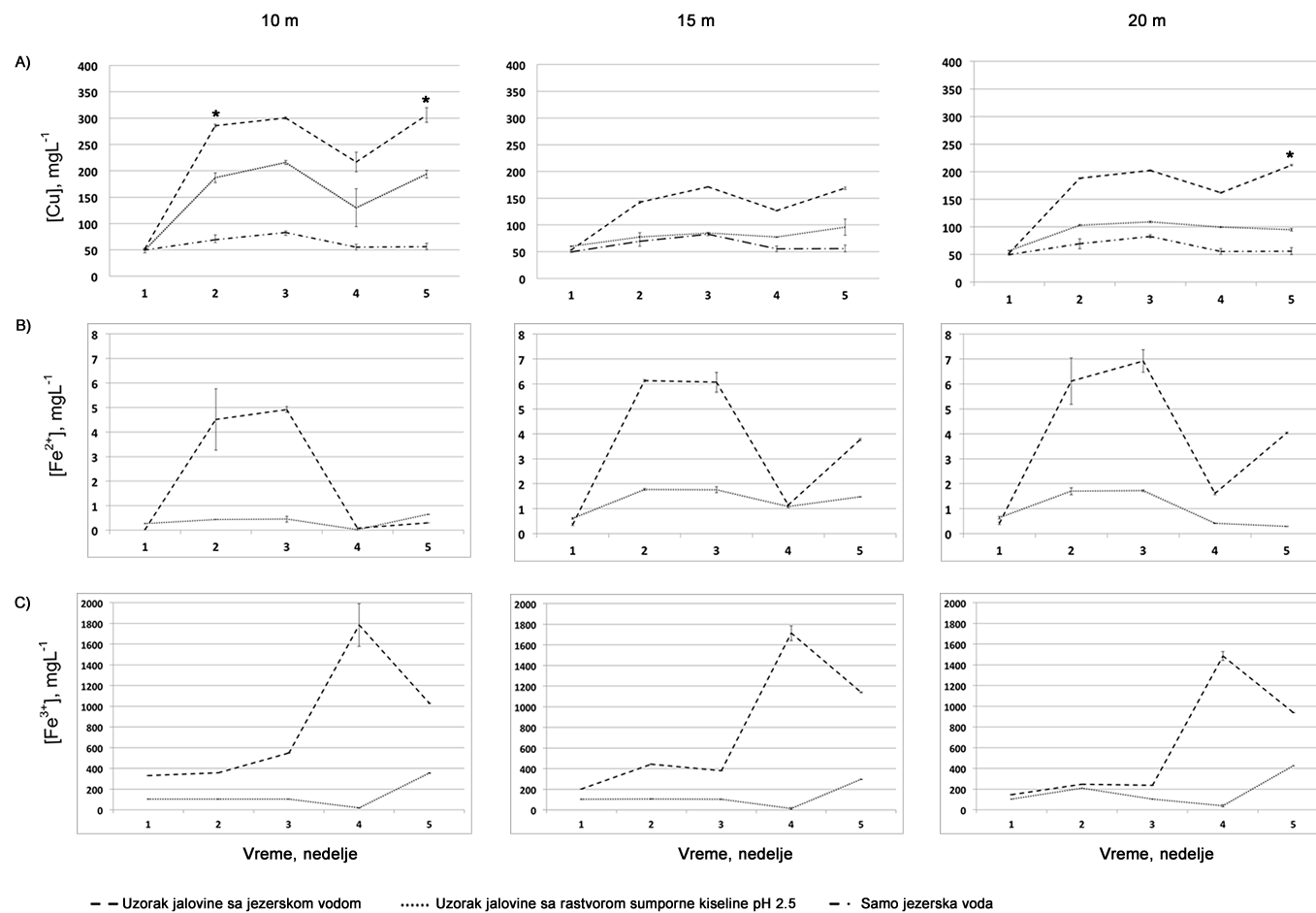
U ispitivanim uzorcima flotacijske jalovine su identifikovane tri kristalne faze: kvarc (SiO₂), pirit (FeS₂) i langit (Cu₄(SO₄)(OH)₆×2H₂O). Signal veoma slabog intenziteta na oko 7,55 Å u svim uzorcima ukazuje na moguće prisustvo izuzetno malih količina gipsa (CaSO₄×2H₂O). Rezultati semi-kvantitativne rendgenske difrakcione analize su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. Rezultat semi-kvantitativne rendgenske difrakcione analize uzoraka flotacijske jalovine pre i nakon bioluženja.

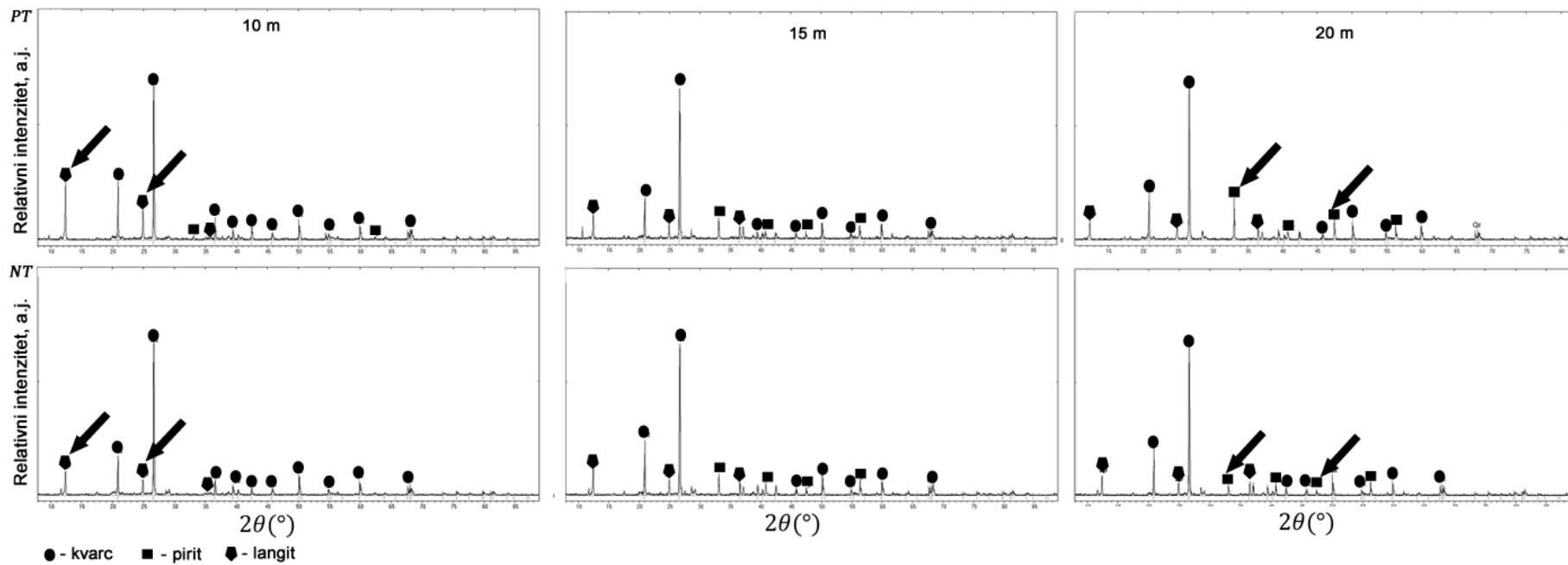
		Sadržaj kristalne faze, %		
		Kvarc	Pirit	Langit
10 m	PRE	76	3	22
	POSLE	86	2	12
15 m	PRE	74	10	16
	POSLE	76	11	13
20 m	PRE	72	20	8
	POSLE	80	11	9

PRE – pre bioluženja, POSLE – nakon bioluženja

Rezultati kvalitativne difrakcione analize uzoraka flotacijske jalovine pre i nakon bioluženja su prikazani na slici 34.



Slika 33. Promene koncentracije Cu, Fe²⁺ i Fe³⁺ jona tokom procesa bioluženja uzoraka flotacijske jalovine. Zvezdica označava koncentracije bakra koje su bile statistički značajno veće tokom bioluženja u odnosu na kiselinu luženje.



Slika 34. Rezultati kvalitativne difrakcione analize uzoraka flotacijske jalovine pre i nakon procesa bioluženja. Strelice ukazuju na pikove čija se visina značajno promenila nakon tretmana. Red označen sa PT – rezultati kvalitativne difrakcione analize pre tretmana, red označen sa NT – nakon tretmana

5 DISKUSIJA

5.1 MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET KISELOG JEZERA ROBULE

Danas je opšte prihvaćeno da se ogromna većina mikroorganizma koji nastanjuju neko stanište ne može kultivisati, te da je za procenu mikrobiološkog diverziteta, pored klasičnih metoda, neophodno koristiti i savremene, molekularno-biološke pristupe koji ne zahtevaju izolovanje i kultivaciju mikroorganizama, već se zasnivaju na metagenomskoj analizi. Međutim, treba imati u vidu da se metode koja se baziraju na izolaciji ukupne DNK iz uzorka tj. metagenomske metode često zasnivaju na umnožavanju gena za 16S rRNK i njihovoj analizi. To znači da rezultati ove metode zavise ne samo od efikasnosti protokola za izolaciju ukupne DNK već i da dele određene nedostake PCR metode. Tako se može dogoditi da neki mikroorganizmi budu nedetektovani ovim pristupom, jer njihova DNK nije izolovana, pa nema ni umnožavanja njihovih gena. Opet, moguće je da izolacija DNK bude uspešna, te da je i DNK vrsta prisutnih u malom broju prisutna u uzorku metagenomske DNK, ali da se njihovi geni za 16S rRNK ne umnožavaju zbog samih ograničenja PCR metodologije. Pored toga, jaki fluorescentni signali koji potiču od T-RF vrsta čija je relativna zastupljenost u uzorku velika, mogu zamaskirati signale koji potiču od T-RF manje zastupljenih vrsta, čak i u slučaju kada apsolutni broj bakterija koje pripadaju nedetektovanim vrstama nije zanemarljiv.

S druge strane, iako ogroman broj bakterijskih vrsta nismo u mogućnosti da izolujemo, jer nam uslovi za njihovo gajenje nisu poznati, teorijski je dovoljno postojanje samo jedne bakterije koja bi formirala koloniju na čvrstoj mikrobiološkoj podlozi, što može pomoći u identifikaciji bakterijskih vrsta koje zbog nekog od navedenih razloga nisu detektovane T-RFLP metodom. Shodno tome, da bi se u što većoj meri prevazišla ograničenja oba pristupa, i dobila što potpunija slika diverziteta potrebno je kombinovati klasične mikrobiološke tehnike izolovanja i kultivacije mikroorganizama sa metagenomskim metodama molekularne biologije. Stoga je u ovom radu korišćen kombinovani pristup i po prvi put je upotrebljena metagenomska T-RFLP metoda u proceni mikrobiološkog diverziteta vode kiselog jezera Robule. Takođe, po prvi put je u ovom radu analiziran diverzitet biomase iz jezera Robule.

5.1.1 MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET VODE KISELOG JEZERA ROBULE

U analiziranim površinskim priobalnim uzorcima vode jezera Robule primenom klasične mikrobiološke metodologije, tj. izolacijom i kultivacijom bakterija na selektivnim dvoslojnim podlogama paralelno sa primenom T-RFLP metode utvrđeno je prisustvo tri vrste acidofilnih bakterija: *Acidiphilium cryptum*, *Leptospirillum ferrooxidans* i *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Na osnovu podataka dobijenih T-RFLP analizom procenjeno je da su najzastupljenije acidofilne bakterije u jezerskoj vodi *A. cryptum* i *L. ferrooxidans*. Vrsta *At. ferrooxidans*, koja je identifikovana na FeSO_4 čvrstoj podlozi, nije detektovana T-RFLP analizom, tj. nije identifikovan ni jedan restrikcioni fragment koji pripada ovoj vrsti. Ovaj podatak ukazuje da je *At. ferrooxidans* možda relativno malo zastupljen u jezerskoj vodi u odnosu na *A. cryptum* i *L. ferrooxidans*, što bi bilo u skladu sa dostupnim literaturnim podacima koji ukazuju da je vrsta *Acidithiobacillus ferrooxidans* slabo zastupljena u kiselim jezerima (Wendt-Potthoff, 2013).

Najveća relativna zastupljenost heterotrofne bakterije *A. cryptum*, izračunata nakon T-RFLP analize, od približno 50 % od ukupnog broja bakterija u površinskoj vodi jezera Robule je u potpunosti u skladu sa dostupnim literaturnim podacima. Chunbo et al. (2010) su takođe identifikovali *A. cryptum* kao dominantan mikroorganizam u vodi kiselog jezera nastalog u podnožju rudničkog jalovišta u kineskoj provinciji Anhui. Ova vrsta je redovno zastupljena u različitim kiselim staništima (Baker and Banfield, 2003, Gonzalez-Toril et al., 2003, Wendt-Potthoff, 2013). Prisustvo heterotrofnih acidofila u je neophodno zbog mutualističkog odnosa između heterotrofnih i hemolitoautotrofnih acidofila (poglavlje 1.5.1). Vrste koje pripadaju rodu *Acidiphilium* uglavnom nastanjuju umerenije kisela staništa (Baker and Banfield, 2003). Optimalna pH vrednost sredine za rast *A. cryptum* iznosi 3,0, dok se optimalna temperatura za opstanak ove bakterije kreće u opsegu od 20 do 30 °C (Baker and Banfield, 2003). Kiselost i temperatura jezera Robule su u julu 2012. godine bile oko optimalnih vrednosti za rast populacije ovog mikroorganizma; pH vrednost jezerske vode je iznosila 2,55, a temperatura površinske vode je bila 26 °C (poglavlje 4.1). U jezeru u Kini u kome je takođe dominirala vrsta *A. cryptum* izmerena je pH vrednost 3,0 i temperatura vode 30 °C (Chunbo et al., 2010).

Ispitivanja mikrobiološkog diverziteta više kiselih jezera nastalih nakon eksploatacije uglja u nemačkoj pokrajini Luzacija su takođe pokazala da u ovim jezerima dominiraju heterotrofne bakterije iz rodova *Acidiphilium*, *Acidocella* i *Acidisphaera*, dok su hemolitoautotrofne bakterije bila zastupljene u relativno malom broju (Wendt-Potthoff, 2013). Santofimia et al. (2013) su ispitivali mikrobiološki diverzitet dva kisela jezera nastala u napuštenim kopovima rudnika površinske eksploatacije u Iberijskom pirijskom pojasu u Španiji. Sekvenciranjem biblioteke klonova 16S rRNK gena dobijene iz uzoraka vode uzetih sa površine oba jezera, autori su zaključili da 80 %, odnosno 70 % analiziranih sekvenci ukazuje na prisutvo heterotrofnih bakterija koje su filogenetski bliske rodu *Acidiphilium*, odnosno rodovima *Acidiphilium* i *Acidisphaera*, dok preostalih 20 % i 30 % sekvenci većinom ukazuje na prisutvo bakterija srodnih rodu *Leptospirillum*, odnosno rodovima *Bacillus* i *Legionella*. Falagan et al. (2013) su ispitivali mikrobiološki diverzitet dva duboka meromiktična ekstremno kisela jezera u Iberijskom pirijskom pojasu. Kultivacija mikroorganizama na dvoslojnim čvrstim podlogama je pokazala da površinske slojeve jezera nastanjuju pretežno heterotrofni acidofili. Nakon T-RFLP analize, a potom kloniranja i sekvenciranja gena za 16S rRNK, autori su identifikovali najzastupljenije bakterije u površinskim uzorcima kao predstavnike rodova heterotrofnih bakterija *Acidobacterium*, *Acidocella*, *Acidisphaera* i vrste *Metallibacterium scheffleri*.

Kisela staništa izložena sunčevoj svetlosti nastanjuju, pored acidofilnih bakterija, i alge, gljive i protozoe (Chunbo et al., 2010, Johnson, 2012, Wendt-Potthoff, 2013). Eskudati algi, pre svega glikolna kiselina i u manjoj meri monosaharidi, su jedan od izvora organskih molekula u ovim staništima. Eksperimentalno je dokazano da eskudati algi mogu održavati populaciju heterotrofnih acidofila, tj. da ukoliko imaju na raspolaganju dovoljno organskog supstrata, acidofilni heterotrofi rastu znantno brže od acidofilnih hemolitoautotrofa i mogu ih brojčano nadmašiti (Nancuqueo and Johnson, 2012).

Organski molekuli u jezeru Robule verovatno potiču od bakterija i algi, ali i okolne sredine, pošto je jezero delom okruženo šumom. Autotrofni acidofili oslobađaju male organske molekule kao što su piruvat, glikolna i oksalsirćetna kiselina (Nancuqueo and Johnson, 2010). U podzemnim kiselim staništima eskudati i lizati acidofilnih hemolitoautotrofa su dovoljni za održavanje populacije heterotrofnih acidofila, ali je u

takvim staništima broj heterotrofa manji od broja hemolitoautotrofa, što je posledica prisustva veoma malih količina organske materije (Johnson, 2011).

Najznačajniji sastojci eksudata acidofilnih bakterija su male alifatične organske kiseline (piruvat, glikolat, oksalacetat) koje su u kiseloj sredini nedisosovane i toksične za acidofilne mikroorganizme. Mikromolarne koncentracije rastvorenih organskih kiselina inhibiraju rast hemolitoautotrofnih acidofila. Koncentracija piruvata od 20-40 μM potpuno inhibira rast *Acidithiobacillus thiooxidans*, dok 500 μM koncentracija glikolne kiseline inhibira rast *Leptospirillum feriphilum* (Nancucheo and Johnson, 2010). Heterotrofni acidofilni mikroorganizmi mogu drastično smanjiti koncentraciju rastvorenih organskih jedinjenja u tečnoj kulturi u kojoj su gajene acidofilne hemolitoautotrofne bakterije (Okibe and Johnson, 2004). Od prisustva *A. cryptum* u vodi jezera verovatno zavisi opstanak gvožđe-oksidujućih bakterija, pogotovo *L. ferrooxidans*, pošto je ova vrsta izuzetno osetljiva na prisustvo organskih molekula u staništu, posebno malih alifatičnih organskih kiselina.

Na osnovu podataka dobijenih T-RFLP analizom je izračunato da oko 40 % bakterija prisutnih u uzorku pripada vrsti *L. ferrooxidans*, dok *At. ferrooxidans* nije detektovan nakon T-RFLP analize, što je verovatno posledica znatno manje relativne zastupljenosti ove vrste u odnosu na dve vrste koje su dominirale u površinskoj vodi jezera, pa su intenzivniji fluorescentni signali koji potiču od T-RF dominantnih bakterijskih vrsta verovatno maskirali signal koji su emitovali T-RF poreklom iz *At. ferrooxidans*. Na ovaj zaključak upućuje i podatak da je na osnovu T-RFLP analize nakon bioluženja mineralnog koncentrata u lužnom rastvoru inokulisanom autohtonim bakterijskim konzorcijumom iz jezera Robule izračunata relativna zastupljenost *At. ferrooxidans* od oko 40 %, kao i prisustvo kolonija ove vrste na dvoslojnim čvrstim podlogama sa gvožđe(II)sulfatom i tetratomom (FeSO_4). Osobine vode jezera Robule u momentu uzorkovanja 12. jula 2012. godine, visok pozitivan redoks potencijal (+850 mV) i velika koncentracija Fe^{3+} jona (11 mM), pogodovale su rastu populacije *L. ferrooxidans*, ali ne i rastu populacije vrste *At. ferrooxidans* koja je prilagođena na život u uslovima nižeg redoks potencijala sredine i niže koncentracije Fe^{3+} jona (Rawlings et al., 1999). S obzirom da fizičko-hemijske osobine jezera variraju tokom godine, moguće je da pri određenim uslovima *At. ferrooxidans* bude više zastupljen u jezeru nego što je bio slučaj u julu 2012. godine. Prema podacima Republičkog hidrometeorološkog

zavoda, leto 2012. godine je bilo najtoplije i jedno od najsušnijih leta otkada se vrše meteorološka merenja u Srbiji (Smailagić i sar., 2013), što je verovatno uticalo i na sastav zajednice mikroorganizama u površinskim slojevima jezerske vode.

5.1.2 MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET BIOMASE IZ JEZERA ROBULE

Osim što u prisutne u kiselim staništima kao planktonski mikroorganizmi, acidofilne bakterije mogu formirati i makroskopske strukture u vidu končastih tvorevina u tekućoj vodi (eng. *acid streamers*; Dougan et al., 1970, Lopez-Archilla et al., 2004, Kimura et al., 2011, Kay et al., 2013), sluzavih tvorevina na stenama bogatim sulfidnim mineralima (eng. *Slimes*; Bond et al., 2000) i biomase u obliku gustih tepiha (eng. *micorbial mats*; Rowe et al., 2007). Osnovu ovih struktura čini egzopolisaharidni sloj kojeg acidofilne bakterije obilato luče (Johnson, 2009). Dougan et al. (1970) su opisali končaste tvorevine u kiselim rudničkim vodama nastalim u napuštenom rudniku uglja. Na elektronskim mikrografijama se uočavaju mikroorganizmi uronjeni u egzopolisaharidnu masu, ali su uočljivi i kristali precipitiranih soli. Na osnovu prisustva kristala soli, autori su zaključili da su fizičko-hemijski uslovi u končastim strukturama drugačiji u odnosu na okolnu sredinu. Bond et al. (2000) su ispitivali mikrobiološki diverzitet sluzave mase nastale u toplim (40 °C) i ekstremno kiselim (pH 1) vodama u napuštenom rudniku pirita Ričmond (SAD). Dominantni mikroorganizmi identifikovani u sluzavoj masi su bile različite vrste roda *Leptospirillum* i arhea *Ferroplasma acidarmanus*. Gonzalez-Toril et al. (2003) su ispitivali mikrobiološki diverzitet kisele reke Rio Tinto (Španija) i identifikovali su uobičajene acidofilne bakterije: *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* i *Acidiphilium cryptum*. Međutim, Lopez-Archilla et al. (2004), koji su proučavali dugačke končaste strukture iz reke Rio Tinto, sekvenciranjem biblioteke gena za 16S rRNK su utvrdili da končaste strukture nastanjuju neutrofilne heterotrofne bakterije koje pripadaju rodovima *Bacillus*, *Sphingomonas* i *Pseudomonas*. Ovi rezultati su nedvosmisleno pokazali da u končastim strukturama u reci Rio Tinto vladaju znatno drugačiji uslovi u odnosu na rečnu vodu (Lopez-Archilla et al., 2004). Rowe et al. (2007) su ispitivali diverzitet zelenog tepiha nastalog u kanalu koji odvodi kisele rudničke vode iz napuštenog rudnika bakra u Španiji. Autori su opisali uzorak tepiha kao zelen na površini i taman u donjem, debljem sloju, kojeg su činila četiri podsloja različitih nijansi, od smeđe do tamnosive, dok je

jedan sloj bio tirkizne boje. Ispitivanjem biodiverziteta različitih slojeva uzorka tepiha, autori su utvrdili da površinski sloj čine končaste i jednoćelijske alge *Zygnema* i *Chlamidomonas* dok donje, tamnije slojeve nastanjuju isključivo heterotrofne acidofilne bakterije. Nakon izolacije metagenomske DNK iz donjeg, tamnijeg sloja tepiha, i pravljenja biblioteke gena za 16S rRNK, identifikovane su heterotrofne bakterije *Acidimicrobium capsulatum*, *Acidiphilum sp.* i nekoliko vrsta srodnih heterotrofnim acidofilnim bakterijama koje nisu kultivisane i okarakterisane. U dubljim slojevima tepiha autori su identifikovali i nekoliko vrsta anaerobnih bakterija koje redukuju sulfata. Prisustvo ovih bakterija ukazuje da u dubljim slojevima tepiha nema kiseonika, tako da heterotrofne bakterije iz ovih slojeva koriste Fe^{3+} i SO_4^{2-} jone kao terminalne akceptore elektrona u respiratornom lancu. Mikrobiološkom redukcijom sulfata nastaje H_2S koji je reagovao sa katjonima bakra stvarajući CuS koji se nataložio u biomasi formirajući sloj tirkizne boje. Kimura et al. (2011) su identifikovali acidofilne bakterije *Ferrovum mixofaciens* kao dominantne mikroorganizme u končastim strukturama uzorkovanim u napuštenom podzemnom rudniku pirita. Ove bakterije stvaraju neobično velike količine egzopolisaharida i brzo formiraju končaste strukture tokom gajenja *in vitro*. Kay et al. (2013) su identifikovali acidofilne bakterije *Acidithiobacillus ferrivorans* i *Ferrovum myxofaciens* u uzorcima končastih struktura uzetim iz kanala koji odvodi kisele rudničke vode iz napuštenog rudnika bakra u severnom delu Velsa (UK). Navedeni literaturni podaci pokazuju da se fizičko-hemijski uslovi koji vladaju u makroskopskim strukturama koje formiraju mikroorganizmi u kiselim staništima, kao i diverzitet mikroorganizama, mogu značajno razlikovati u odnosu na sredinu koja okružuje ove makroskopske strukture.

Na osnovu ukupnog broja T-RF dobijenih nakon digestije sa tri restrikciona enzima (35) može se zaključiti da je mikrobiološki diverzitet biomase značajno veći u poređenju sa površinskom vodom jezera u kojoj je nakon digestije gena za 16S rRNK detektovano ukupno 17 T-RF, od čega je samo sedam identifikovano u bazi podataka T-RF. Veći broj restrikcionih fragmenata otežava identifikaciju mikroorganizama, pošto se javljaju situacije da nakon digestije gena za 16S rRNK različitih vrsta dobijaju T-RF iste dužine.

Digestija restrikcionom endonukleazom *AluI* je proizvela najviše T-RF. Pretaga baze podataka T-RF je pokazala da najzastupljeniji fragment dobijen nakon digestije

ovim enzimom dužine 134 bp potiče od heterotrofnih acidofilnih bakterija *Ferrimicrobium acidiphilum* ili *Acidocella aromatica*. Najzastupljeniji T-RF dobijen nakon digestije enzimom *HaeIII* je identifikovan kao fragment 16S rRNK gena hloroplasta, što je očekivano s obzirom na prisustvo algi u uzorku. Digestija ovim enzimom je proizvela i fragmente koji verovatno potiču od vrsta koje pripadaju rodovima *Sulfobacillus* i *Alyciclobacillus*. Najzastupljeniji T-RF dobijen nakon digestije endonukleazom *MspI* dužine 494 bp verovatno potiče od vrste *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Terminalni restrikcioni fragmenti dobijeni digestijom gena za 16S rRNK sa tri enzima ukazuju na vrlo verovatno prisustvo predstavnika roda *Sulfobacillus* i filogenetski bliskog roda *Alyciclobacillus* u uzorku. Prema optimalnoj temperaturi za rast, ovi mikroorganizmi se svrstavaju u umerene termofile, mada neke vrste opstaju u veoma širokom temperaturnom opsegu; na primer *Sulfobacillus termotolerans* opstaje na temperaturama od 3 °C do 60 °C (Watling et al., 2008). Iako je prisustvo bakterija koje pripadaju rodu *Sulfobacillus* u izvesnoj meri neočekivano u staništima sa umerenom temperaturom, uzimajući u obzir izuzetnu prilagodljivost i metaboličku fleksibilnost ovih bakterija (poglavlje 1.4.7.4), moguće je da se u analiziranom uzorku biomase nalaze i predstavnici ovog roda. Iako ovaj zaključak podržavaju podaci dobijeni T-RFLP analizom, činjenica da na Petri šoljama nisu identifikovane kolonije sulfobacilusa, koje je relativno lako identifikovati pod mikroskopom zbog prisustva endospora (Johnson, 2005), definitivan odgovor na dilemu o mogućem prisustvu ovih bakterija u biomasi bi moglo dati pravljenje biblioteke klonova gena za 16S rRNK. T-RFLP analiza često ne može pružiti podatke koji omogućuju nedvosmisleno identifikaciju vrsta u uzorku, ali može pružiti manje ili više jasne indicije o prisustvu određenih vrsta mikroorganizama. U kombinaciji sa klasičnom metodom kultivacije mikroorganizama na selektivnim čvrstim podlogama, u nekim situacijama se mogu izvesti pouzdani zaključci o prisustvu određenih vrsta mikroorganizama u analiziranom uzorku (Johnson, 2005).

Na osnovu podataka dobijenih T-RFLP analizom i kultivacijom bakterija na dvoslojnim čvrstim podlogama, može se zaključiti da su u uzorku biomase prisutne vrste heterotrofnih acidofila *Acidiphilium cryptum*, *Acidocella aromatica*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, i možda neki predstavnici rodova *Sulfobacillus* i

Alicyclobacillus. Poređenjem morfologije kolonija gvožđe-oksidujućih bakterija koje su izrasle na Petri šoljama i podataka dobijenih analizom dužine T-RF, sa velikom pouzdanošću se može tvrditi da su u uzorku biomase identifikovane i bakterije *Acidithiobacillus ferrooxidans* i *Leptospirillum ferrooxidans*, mada postoji mogućnost da ove bakterije potiču iz jezerske vode. Na osnovu podataka dobijenih T-RFLP analizom, može se reći da postoje indicije da su u uzorku prisutne i vrste *Acidisphaera rubrifaciens*, *Desulfobacca acetoxidans*, kao i neke vrste nekultivisanih mikroorganizama srodnih bakterijama svrstanim u rodove *Sulfobacillus* i *Alicyclobacillus*. Prisustvo T-RF koji verovatno potiče od vrste *Desulfobacca acetoxidans* sugerše moguće prisustvo bakterija koje redukuju sulfate u anaerobnom sloju biomase.

Na dvoslojnoj čvrstoj podlozi sa gvožđe-sulfatom (iFe_0) je izrastao veliki broj kolonija vrste *L. ferrooxidans*, dok je na podlozi sa gvožđe-sulfatom i ekstraktom kvasca $FeYe_0$ izrastao znatan broj kolonija gvožđe-oksidujućih bakterija. Dvoslojna podloga $FeYe_0$ je osmišljena za kultivaciju heterotrofnih gvožđe-oksidujućih bakterija, kao što je vrsta *Ferrimicrobium acidiphilum*, što bi mogla biti potvrda nalaza T-RF koji ukazuje na prisustvo ove vrste u T-RFLP profilu.

Na dvoslojnim čvrstim podlogama sa ekstraktom kvasca Ye_0 se može uočiti upadljivo manje kolonija heterotrofnih bakterija u odnosu na kolonije gvožđe-oksidujućih bakterija izraslih na iFe_0 i $FeYe_0$ podlogama (poglavlje 4.2.5.1). Međutim, T-RFLP analiza je pokazala da u uzorku biomase dominiraju heterotrofne bakterije, a da su hemolitoautotrofne gvožđe-oksidujuće bakterije relativno malo zastupljene. Ovi rezultati navode na zaključak da treba biti oprezan prilikom procene relativne zastupljenosti bakterijskih vrsta isključivo primenom metode kultivacije mikroorganizama na selektivnim čvrstim podlogama. Neke podloge omogućuju intenzivan rast populacije određene vrste mikroorganizama koja je možda relativno malo zastupljena u životnoj sredini, dok druge vrste, možda znatno zastupljenije u životnoj sredini, slabije uspevaju na čvrstim podlogama, ili se uopšte ne mogu kultivisati, što jedan od razloga za primenu T-RFLP metode u proceni relativne zastupljenosti mikroorganizama u uzorku.

Posmatranjem uzorka zelenog tepiha iz jezera Robule pod mikroskopom je utvrđeno da zeleni deo ove biomase čine končaste alge. U nadzemnim kiselim

staništima su često prisutne jednoćelijske alge *Dunainella acidophila*, *Chlamidomonas acidophila*, *Chlorella protothecoides*, *Cyanidium caldarium*, *Euglena mutabilis* (Nancuqueo and Johnson, 2012). Končaste alge iz rodova *Zygnema* i *Zyggognium* su rasprostranjene u kiselim jezerima u nemačkoj pokrajini Luzacija, gde u nekim slučajevima formiraju makroskopske strukture u obliku gustih tepiha ili plutajućih formacija (Kleeberg, 2013). Fitoplankton površinskih slojeva kiselog jezera Kueva de la Mora u Iberijskom piritskom pojasu čine jednoćelijske alge *Chlamidomonas sp.* i *Ochromonas sp.*, silikatne alge, kao i končaste alge *Zygnema sp.* (Sanchez-Espana et al., 2009). Opstanak algi u kiseljoj sredini omogućuje relativno nepropustljiva plazma membrana i prisutvo brojnih protonskih pumpi u membrani (Kleeberg, 2013).

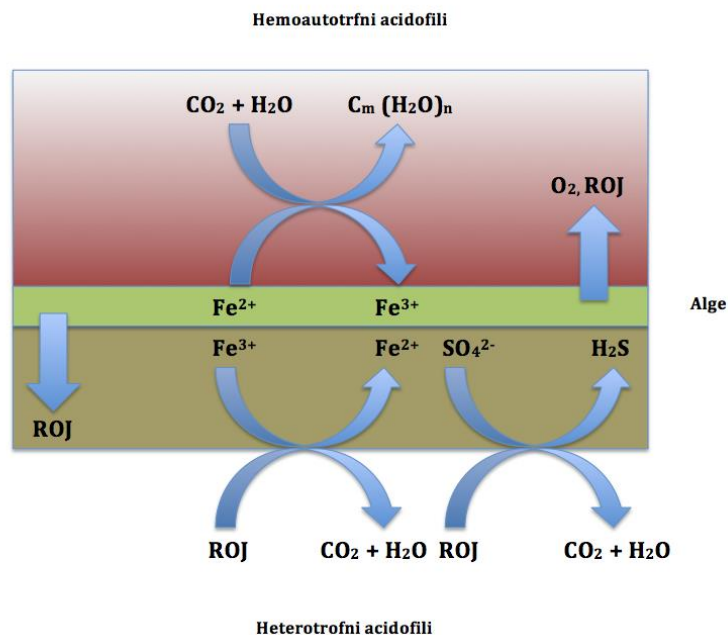
Nancuqueo and Johnson (2010) su gajili jednoćelijske acidofilne alge *Chlorella protothecoides* i *Euglena mutabilis*² u čistim kulturama i analizirali sastav rastvorenih organskih jedinjenja nakon šest dana inkubacije. U rastvorima iz kojih su uklonjene ćelije detektovano je najviše glikolne kiseline (12-14 %) i znatno manje monosaharida, glukoze i fruktoze. Nancuqueo and Johnson (2012) su gajili acidofilne heterotrofne bakterije *Acidiphilium cryptum*, *Acidibacterium capsulatum* i *Acidocella aromatica* u rastvoru u kom su rasle acidofilne alge *Chlorella protothecoides* i *Euglena mutabilis* iz kog su, nakon inkubacije, filtriranjem uklonjene ćelije algi. Ovi autori su utvrdili da populacije heterotrofnih acidofila mogu efikasno rasti samo zahvaljujući eskudatima acidofilnih algi.

Wendt-Potthoff et al. (2013) su dokazali da u kiselom jezeru 111 (nastalom nakon eksploatacije uglja u nemačkoj pokrajini Luzacija) organski ugljenik, koji u najvećoj meri potiče od bentosnih algi, omogućuje opstanak planktonskim heterotrofnim acidofilnim bakterijama. Navedeni podaci ukazuju na mogućnost da je dominacija vrste *Acidiphilium cryptum* u površinskoj vodi jezera Robule posledica, između ostalog, i prisustva organskih molekula koji potiču od algi.

² Ova vrsta je u stvari zeleni bičar i svrstava se u carstvo Protista, ali se u literaturi radi jednostavnosti često označava kao alga. Zeleni bičari su miksotrofi, mogu se hraniti heterotrofno, loveći druge protozoe, ili autotrofno kao fotosintetički organizmi.

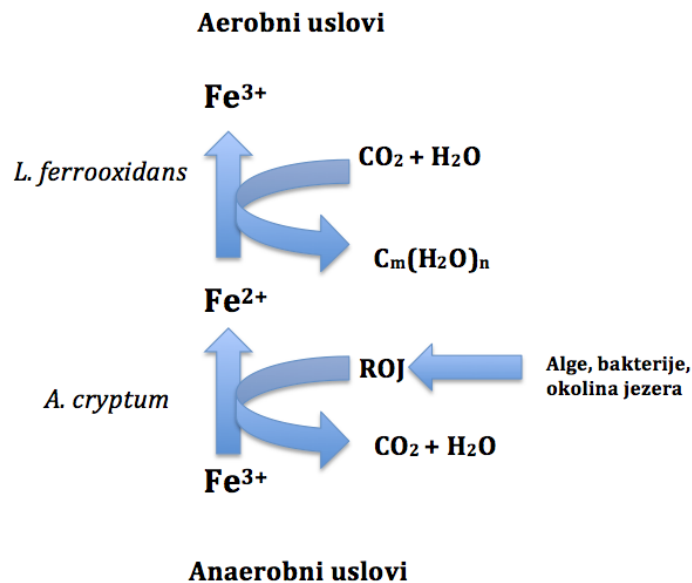
5.2 BIOGEOHEMIJSKI CIKLUSI U JEZERU

Na osnovu rezultata ispitivanja mikrobiološkog diverziteta površinske vode jezera Robule i biomase, predložen je okvirni biogeohemijski model kruženja gvožđa u jezeru (slika 35). Primarni proizvođači u ovom ekosistemu bi mogle biti alge i hemolitoautotrofne bakterije *Leptospirillum ferrooxidans* i *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Proizvođači oslobađaju organska jedinjenja koja metabolišu heterotrofne acidofilne bakterije. Biomasu jezera Robule nastanjuju alge, heterotrofne i autotrofne acidofilne bakterije. Na osnovu podataka koje su objavili drugi autori (Rowe et al., 2007) možemo pretpostaviti da heterotrofne bakterije verovatno nastanjuju deblji, tamniji sloj koji se nalazi ispod zelenog sloja biomase kojeg nastanjuju alge. Heterotrofi metabolišu organska jedinjenja u uslovima niske koncentracije kiseonika redukujući Fe^{3+} jone na kraju respiratornog lanca. Hemolitoautotrofne gvožđe-oksidujuće vrste *Acidithiobacillus ferrooxidans* i *Leptospirillum ferrooxidans* verovatno nastanjuju gornji, zeleni sloj biomase, bogat kiseonikom kojeg produkuju alge. Redukujući Fe^{3+} jone heterotrofi iz dubljeg sloja obezbeđuju Fe^{2+} jone autotrofnim gvožđe-oksidujućim bakterijama koje nastanjuju gornji sloj biomase. Stalni dotok Fe^{2+} jona, uz obilje kiseonika, bi mogao stimulisati rast gvožđe-oksidujućih autotrofa. U anaerobnom sloju biomase se možda nalaze i heterotrofne acidofilne bakterije koje redukuju sulfate stvarajući H_2S .



Slika 35. Hipotetički biogeochemijski procesi u biomasi jezera Robule. Acidofilne alge stvaraju organska jedinjenja. U tamnom anaerobnom sloju biomase, heterotrofne acidofilne bakterije metabolišu organska jedinjenja i redukuju Fe^{3+} jone koji imaju ulogu terminalnih akceptora elektrona. Bakterije koje redukuju sulfate takođe metabolišu organska jedinjenja i redukuju SO_4^{2-} do H_2S . U aerobnim uslovima u vodi jezera hemoautotrofni acidofili oksiduju Fe^{2+} jone i proizvode organska jedinjenja. ROJ – rastvorena organska jedinjenja, $\text{C}_m(\text{H}_2\text{O})_n$ – ugljeni hidrati.

U dubokim kiselim jezerima koncentracija kiseonika se smanjuje sa povećanjem dubine vode; na dubinama od približno deset metara voda kiselih jezera je uglavnom potpuno anoksična, ali je i pored toga nastanjena znatnim brojem acidofilnih mikroorganizama (Falagan et al., 2013, Geller et al., 2013, Wendt-Pothoff et al., 2013, Santofimia et al., 2013). Možemo pretpostaviti da je to slučaj i sa jezerom Robule. *Acidiphilium cryptum* je fakultativni anaerob koji u dubljim slojevima jezera može oksidisati organska jedinjenja redukujući Fe^{3+} umesto kiseonika. U oksigenisanim slojevima jezera obligatni aerob *Leptospirillum ferrooxidans* oksiduje Fe^{2+} jone i oslobođenu energiju koristi za fiksiranje CO_2 i sintezu organskih jedinjenja (slika 36). Organska jedinjenja koja sintetišu alge i hemolitoautotrofni acidofilni mikroorganizmi bi mogli obezbediti energiju za ciklus gvožđa u jezeru, pa bi se moglo reći da biogeochemijski ciklus gvožđa u jezeru Robule pokreću fotosinteza i hemosinteza. Za punu potvrdu predloženih biogeochemijskih modela potrebna su dodatna hidrogeohemijska i mikrobiološka istraživanja.



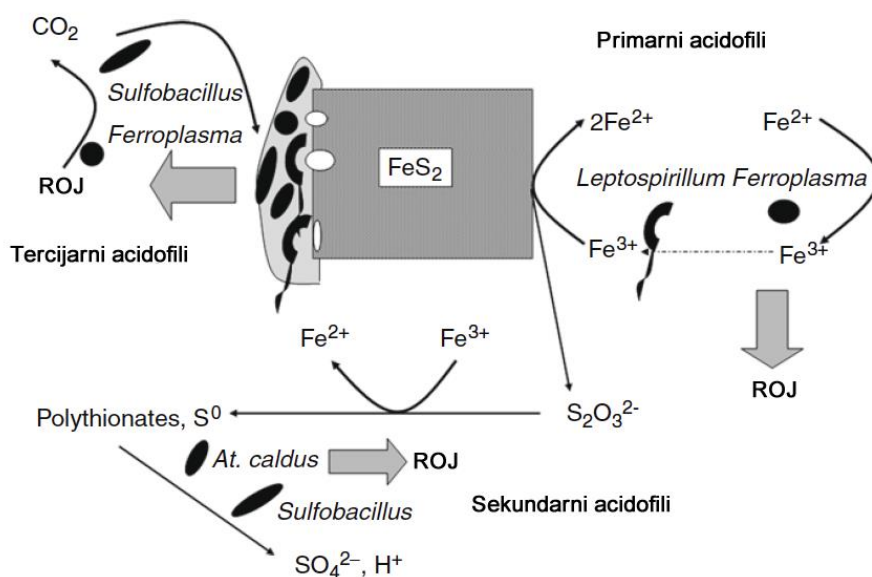
Slika 36. Hipotetički biogeohemijski ciklus gvožđa u jezeru Robule. U dubljim slojevima jezera verovatno vladaju anaerobni uslovi. U nedostatku kiseonika heterotrofne bakterije *Acidiphilium cryptum* metabolišu organska jedinjenja i redukuju Fe^{3+} do Fe^{2+} . U aerobnoj sredini gvožđe-oksidujuće bakterije *Leptospirillum ferrooxidans* i *Acidithiobacillus ferrooxidans* oksiduju Fe^{2+} jone. Energiju za ciklus gvožđa u jezeru obezbeđuju fotosinteza i hemosinteza. ROJ – rastvorena organska jedinjenja

5.3 MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET JALIVIŠTA KOJE OKRUŽUJE JEZERO ROBULE

Na dvoslojnim čvrstim podlogama sa gvožđe(II)sulfatom i ekstraktom kvasca (FeYeO) na koje su zasejani uzorci jalovine izrasle su kolonije gvožđe-oksidujućih i heterotrofnih acidofilnih bakterija. Prisustvo ovih mikroorganizama dokazuje da je jalovište i dalje izvor kiselih rudničkih voda koje se slivaju u jezero Robule. Na jalovištu se uočavaju duboki useci koje formiraju bujice koje se slivaju niz strme kosine nakon obilnih kiša spirajući površinske, oksidisane slojeve jalovišta i odnoseći kisele vode sa velikom koncentracijom metala u jezero. Tako se otkrivaju novi slojevi jalovine u kojima sulfidni minerali još nisu oksidisani. Mestimično se na jalovištu uočava crvena boja, koja je nastala usled oksidacije gvožđa u jalovini. S obzirom na količinu raskrivke koja je deponovana oko jezera Robule, proces stvaranja kiselih rudničkih voda bi mogao trajati veoma dugo.

5.4 BIOLUŽENJE MINERALNOG KONCENTRATA

Eksperimentom bioluženja bakra iz mineralnog koncentrata testirana je efikasnost autohtonog konzorcijuma bakterija iz jezera Robule u procesu oksidacije sulfidnih minerala prisutnih u mineralom koncentratu. Dobijeni rezultat je upoređen sa efikasnošću oksidacije sulfidnih minerala bakterijskog konzorcijuma napravljenog u laboratoriji, kojeg je činilo šest vrsta acidofilnih bakterija sa različitim fiziološkim osobinama. Veštački kreiran konzorcijum acidofilnih mikroorganizama je pokazao veću efikasnost tokom tretmana mineralnog koncentrata proizvedenog od rude iz Rudnika bakra Majdanpek, pošto su koncentracije gvožđa i bakra bile statistički značajno veće u rastvoru inokulisanim veštačkim bakterijskim konzorcijumom. U lužnom rastvoru koji je sadržao ovaj konzorcijum, prinos bakra je bio oko 10 % veći u odnosu na lužni rastvor inokulisan vodom iz jezera Robule. Prinos bakra nakon eksperimenta bioluženja koncentrata je u proseku iznosio oko 50 %, što je veoma dobar prinos ako se uzme u obzir da se bakar u uzorku koncentrata nalazio u halkopiritu, mineralu iz kojeg se bakar teško luži, i da su uobičajeni prinosi bakra nakon bioluženja halkopirita znatno manji. Uzrok relativno velikog prinosa bakra može biti građa kristalne rešetke halkopirita u uzorku. Koncentracija gvožđa u rastvoru inokulisanom veštačkim bakterijskim konzorcijumom je bila približno dvostruko veća, što ukazuje na znatno veću efikasnost veštačkog konzorcijuma u procesu oksidacije pirita u odnosu na konzorcijum autohtonih bakterija iz jezera Robule. Prilikom kreiranja bakterijskih konzorcijuma za bioluženje često se koristi pristup “odozgo-nadole” (eng. *top-down*), što znači da se kreće od bakterijskog konzorcijuma koji sadrži više vrsta acidofilnih mikroorganizama sa različitim fiziološkim osobenostima (a koji se nikada ne bi mogli naći u istom prirodnom staništu), a zatim se tokom eksperimenata adaptacije selektuje bakterijski konzorcijum koji pokazuje najveću efikasnost u tretmanu određenog supstrata. (Rawlings and Johnson, 2007, Johnson 2008). Konzorcijumi koji se konstruišu za proces bioluženja bi trebalo da sadrže primarne, sekundarne i tercijarne acidofile (Johnson 2013; slika 37).



Slika 37. Primer konzorcijuma acidofilnih bakterija tokom luženja u bioreaktoru. Primarni acidofili oksiduju gvožđe, sekundarni acidofili oksiduju sumpor i politionate, dok tercijarni acidofili oksiduju rastvorena organska jedinjenja (ROJ). Prema Johnson (2010).

Primarni acidofilni mikroorganizmi su gvožđe oksidujući hemolitoautotrofi. Ovi acidofili imaju najvažniju ulogu u procesu oksidacije sulfidnih minerala. U procesu bioluženja uloga primarnih acidofila pripada gvožđe-oksidujućim hemolitoautotrofima *Leptospirillum ferrooxidans* i *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Oksidacijom pirita se oslobađa tiosulfat, koji se u prisustvu Fe³⁺ jona dalje oksiduje do politionata i elementarnog sumpora. Politionati i sumpor su supstrat za oksidaciju sekundarnim acidofilima, kao što su *Acidithiobacillus claudus* (obligatno sumpor-oksidujuća bakterija) ili *Sulfobacillus sp.* Oksidacijom politionata i sumpora stvara se sumporna kiselina koja snižava pH vrednost sredine, što je bitno za uspeh procesa bioluženja pošto se tokom oksidacije Fe²⁺ jona troše H⁺ joni. Sekundarni acidofili takođe sprečavaju formiranje sumpornog filma na površini minerala koji se oksiduje; bez sekundarnih acidofila sumporni film bi mogao usporiti ili zaustaviti proces oksidacije sulfidnih minerala. Tercijarni acidofili metabolišu organska jedinjenja, što omogućuje nesmetani rast populacije primarnih acidofila. Ulogu tercijarnih acidofila uglavnom vrše predstavnici rodova *Sulfobacillus* (miksotrofi), *Ferrimicrobium*, *Acidimicrobium* i *Ferroplasma* (gvožđe-oksidujući heterotrofi). Heterotrofne bakterije koje pripadaju rodovima *Acidiphilium* i *Acidocella* nisu pogodne za primenu u procesu bioluženja zbog relativno

niske tolerancije na prisustvo bakra u sredini (*Acidiphilium*) i prilagođenosti na život u uslovima umerenijih pH vrednosti (*Acidocella*; Rawlings and Johnson 2007, Johnson, 2008, Johnson, 2013).

Veštački konzorcijum koji je upotrebljen u eksperimentu bioluženja mineralnog koncentrata je sadržao primarne acidofile (*L. ferrooxidans*, *At. ferrooxidans*, *L. feriphilum*), sekundarne acidofile (*At. caldus*) i tercijarne acidofile (*A. cryptum*, *S. thremosulfidooxidans*). Konzorcijum mikroorganizama u vodi jezera Robule su činile vrste *A. cryptum*, *L. ferrooxidans*, *At. ferrooxidans* i možda heterotrofna bakterija *Acd. rubrifaciens*. Pri tom je *A. cryptum* bio najbrojniji mikroorganizam u uzorku, dok je zastupljenost vrste *At. ferrooxidans* bila relativno mala. Razlike u sastavu bakterijskih konzorcijuma mogu objasniti značajno veću efikasnost veštačkog konzorcijuma u procesu bioluženja koncentrata.

Zbog male zastupljenosti u konzorcijumu iz jezerske vode, vrsta *At. ferrooxidans* nije detektovana u T-RFLP profilu (poglavljje 4.2.3). Međutim, zastupljenost *At. ferrooxidans* je znatno porasla nakon bioluženja. Analiza relativne zastupljenosti T-RF u lužnom rastvoru je pokazala da su u uzorku inokulisanom vodom iz jezera Robule bile prisutne samo dve vrste bakterija: *Leptospirillum ferrooxidans* (55,06 %) i *Acidithiobacillus ferrooxidans* (41,78 %). Zastupljenost neidentifikovanih fragmenata je bila 3,16 %. U uzorku inokulisanom veštačkim bakterijskim konzorcijumom najzastupljeniji su bili primarni acidofili *Acidithiobacillus ferrooxidans* (30 %) i *Leptospirillum ferrooxidans* (13,54 %), zatim umereno termofilna sumporoksidujuća bakterija (sekundarni acidofil) *Acidithiobacillus caldus* (6,83 %), umereno termofilna gvožđe-oksidujuća bakterija *Leptospirillum feriphilum* (5,59 %), i heterotrofne bakterije (tercijarni acidofili) *Sulfobacillus thremosulfidooxidans* (5,59 %) i *Acidiphilium cryptum* (5,26 %).

Najvažniji faktor koji utiče na relativnu zasupljenost *At. ferrooxidans* i *L. ferrooxidans* u lužnom rastvoru je odnos Fe^{2+}/Fe^{3+} jona (od čega direktno zavisi redoks potencijal rastvora). Na početku procesa bioluženja dominiraju Fe^{2+} joni što uslovljava niži pozitivan redoks potencijal rastvora u odnosu na kasnije faze bioluženja, kada u rastvoru dominiraju Fe^{3+} joni koji uslovljavaju visok pozitivan redoks potencijal rastvora. Vrsta *At. ferrooxidans* je prilagođena životu u uslovima nižeg redoks potencijala, niže koncentracije feri jona i umerenije kiselosti sredine u odnosu na *L.*

ferrooxidans. Zbog toga na početku procesa bioluženja uglavnom dominira vrsta *At. ferrooxidans*. Sa porastom redoks potencijala i povećanjem koncentracije Fe^{3+} jona nastaju uslovi koji više pogoduju rastu populacije *L. ferrooxidans*, koja preuzima primat i postaje najzastupljenija populacija mikroorganizama u lužnom rastvoru (Rawlings et al., 1999). Uslovi koji su vladali na početku eksperimenta bioluženja koncentrata su doveli do brzog rasta populacije *At. ferrooxidans* u uzorku inokulisanom vodom iz jezera. U kasnijim fazama procesa bioluženja porastao je redoks potencijal, što je favorizovalo rast *L. ferrooxidans* (na kraju eksperimenta je izmeren redoks potencijal od +820 mV u ovom lužnom rastvoru). Skoro jednaka zastupljenost ove dve vrste u trenutku u kome je završen eksperiment, sugerise da su uslovi tokom trajanja eksperimenta uglavnom bili takvi da je favorizovan rast populacije *At. ferrooxidans*. U uzorku inokulisanom veštačkim konzorcijumom, najzastupljeniji mikroorganizmi su bili *At. ferrooxidans* (oko 30 %) i *L. ferrooxidans* (oko 14 %). Acidofilna heterotrofna bakterija *A. cryptum* nije detektovana u lužnom rastvoru inokulisanom uzorkom jezerske vode, što se može objasniti znatno nižim pragom tolerancije ove bakterije na prisustvo Cu^{2+} jona u odnosu na *L. ferrooxidans* i *At. ferrooxidans*. Vrsta *A. cryptum* toleriše maksimalno 10 mM koncentraciju bakra (635 mgL^{-1} ; Said, 1990). Koncentracija bakra u lužnom rastvoru je bila znatno veća (poglavlje 4.3). Međutim, *A. cryptum* je identifikovan u lužnom rastvoru inokulisanom veštačkim konzorcijumom, u kom je koncentracija bakra na kraju eksperimenta iznosila $963 \pm 3,52 \text{ mgL}^{-1}$. Moguće je da interakcija sa drugim mikroorganizmima u uzorku doprinosi opstanku *A. cryptum* u uslovima povišene koncentracije bakra, ili je soj *A. cryptum* koji je korišten za inokulaciju adaptiran na više koncentracije bakra u odnosu na sojeve izolovane iz životne sredine. Nakon bioluženja zastupljenost heterotrofnih acidofila *A. cryptum* i miksotrofnih *S. thermosulfidooxidans* je iznosila oko 5 %. Relativno mala zastupljenost heterotrofa je očekivana, s obzirom da ove bakterije opstaju zahvaljujući eskudatima i lizatima drugih bakterija.

Razlika u količini izluženog bakra može biti značajna u zavisnosti od sastava bakterijskih konzorcijuma koji se primenjuju u procesu bioluženja, pri čemu su mešovite kulture mikroorganizama efikasnije u odnosu na čiste kulture (Qiu et al., 2005, Fu et al., 2008, Yang et al., 2013). U komercijalnoj primeni, te razlike se mogu meriti u hiljadama tona bakra. Stoga je izbor i adaptacija odgovarajućeg bakterijskog

konzorcijuma od izuzetnog značaja za efikasnost i isplativost primene tehnologije bioluženja.

5.5 LUŽENJE BAKRA IZ UZORAKA FLOTACIJSKE JALOVINE STAROG FLOTACIJSKOG JALoviŠTA RUDNIKA BAKRA BOR

Flotiranje je tehnološki proces tokom kojeg se od rude koja sadrži male količine bakra (nekada i manje od 0,5 %) proizvodi mineralni koncentrat koji sadrži znatno veću koncentraciju bakra – uglavnom više od 20 %. Tokom flotiranja nastaju velike količine flotacijske jalovine koju čine uglavnom silikati (najčešće kvarc), karbonati, gips, gline i pirit. Mineralni koncentrat čini u proseku 1 tež. % od ukupne mase prerađene rude, preostalih 99 tež. % postaje flotacijska jalovina (Dold, 2008). Izdvajanje preostalog bakra iz flotacijske jalovine primenom tradicionalne pirometalurške tehnologije nije ekonomski isplativo. Hidrometalurgija je tehnologija izbora za ekstrakciju bakra iz flotacijske jalovine zbog značajno nižih troškova u odnosu na pirometalurški postupak.

Antonijević et al. (2008) su ispitivali mogućnost kiselinskog luženja bakra iz uzoraka Starog flotacijskog jalovišta Rudnika bakra Bor uzetih 1998. godine iz osam buština sa dubina od 16 do 40 metara. Autori su utvrdili da približno 78 % minerala u uzorku čine kvarc, silikati i karbonati. Sadržaj pirita u analiziranim uzorcima je u proseku iznosio oko 21 %. U uzorcima su identifikovani sulfidni minerali bakra, i to kovelin (0,081%), halkopirit (0,049 %), enargit (0,037 %) i halkozin (0,018 %). Prosečni sadržaj bakra u uzorcima je bio 0,2 %. Oko 50 % minerala koji sadrže bakar su bili oksidni minerali. Prosečan sadržaj gvožđa je bio 8,69 %, zlata 0,35 g/t i srebra 3 g/t. Autori su ispitivali mogućnost luženja bakra metodom agitacionog luženja u rastvoru sumporne kiseline. Najbolji prinos bakra na sobnoj temperaturi je dobijen primenom 0,1 M rastvora H_2SO_4 uz dodatak 5 gL^{-1} $Fe_2(SO_4)_3$ kao oksidacionog agensa uz konstantno mešanje brzinom od 600 obrtaja u minutu. Odnos čvrste i tečne faze je bio 1:5. Nakon dva sata luženja dobijen je prinos od 68 % izluženog bakra, dok je produžavanjem vremena luženja na 30 sati dobijen prinos od 88 % bakra.

Stevanović et al. (2013) su sprovedli eksperiment kiselinskog luženja bakra iz uzoraka Starog flotacijskog jalovišta u kolonama primenom 0,01 M rastvora sumporne kiseline sa i bez dodavanja oksidacionih agenasa (kiseonika ili vodonik-peroksida). Odnos čvrste i tečne faze je bio 1:1, eksperiment je trajao četiri meseca. Uzorci su

sakupljeni iz osam bušotina sa dubina od 0 do 20 m. Autori su utvrdili da je flotacijska jalovina u proseku sadržala 77 % kvarca, silikata i karbonata, 21 % pirita i 1,4 % drugih sulfida metala. Među sulfidima bakra najzastupljeniji je bio kovelin (0,21%), zatim slede halkopirit (0,16 %), enargit (0,14 %) i halkozin (0,04 %).

Stevanović (2012) je objavio rezultate određivanja prosečne koncentracije metala u različitim slojevima Starog flotacijskog jalovišta. Na površini (0 m) i dubini od 1 m koncentracija bakra je iznosila 260 mgkg^{-1} odnosno 320 mgkg^{-1} . Na dubini od 5 m prosečna koncentracija bakra je bila 2500 mgkg^{-1} , na dubini od 10 m 4200 mgkg^{-1} , na dubini od 15 m 3300 mgkg^{-1} i na dubini od 20 m 4300 mgkg^{-1} . Sa porastom dubine rastao je sadržaj gvožđa. Koncentracija ovog metala na površini jalovišta iznosi 44600 mgkg^{-1} , a na dubini od 15 m i 20 m 142400 mgkg^{-1} , odnosno 139600 mgkg^{-1} . Niska koncentracija bakra na površini jalovišta ukazuje da su u ovim slojevima sulfidni minerali bakra skoro u potpunosti oksidisani. Porast koncentracije gvožđa sa dubinom ukazuje na porast sadržaja pirita u dubljim slojevima jalovišta.

Nakon eksperimenta kiselinskog luženja uzoraka stare flotacijske jalovine u 0,01 M rastvoru sumporne kiseline bez dodavanja oksidacionih agenasa, uz prethodno ispiranje uzorka, kompozitni uzorci iz osam bušotina uzeti sa dubina od 5 m i 10 m su dali najveći prinos bakra od 83,94 % i 89,87 %. Nakon luženja uzoraka sa dubina od 15 i 20 m izmereni su prinosi bakra od 73,97 %, odnosno 48,12 %. Bakar je u ovom slučaju lužen u 0,01 M sumpornoj kiselini sa dodatkom 3 % H_2O_2 uz prethodno ispiranje uzoraka. Najmanji prinos bakra je dobijen luženjem uzorka sa dubine od 20 m, koji je sadržao najviše sulfidnih minerala (Stevanović et al., 2013).

Valorizacija bakra iz starog flotacijskog jalovišta primenom hidrometalurških metoda je rađena više puta tokom proteklih nekoliko decenija (Antonijević et al., 2008, Stevanović, 2012). Međutim, nema dostupnih podataka o ispitivanju mogućnosti primene metode bioluženja radi ekstrakcije bakra iz uzoraka Starog flotacijskog jalovišta rudnika bakra Bor, tako da ova studija predstavlja pionirski korak u ovom smeru istraživanja.

Tokom eksperimenta bioluženja bakra iz uzoraka uzetih sa dubina od 10, 15 i 20 metara iz Starog flotacijskog jalovišta praćene su promene koncentracije ukupnog bakra, Fe^{2+} i Fe^{3+} jona (poglavlje 4.4). Krive koje prikazuju promene koncentracije bakra, Fe^{2+} i Fe^{3+} jona su pratile sličan obrazac za sve tretirane uzorke. Tokom prve dve nedelje

bioluženja zabeležen je brz porast koncentracije bakra, do treće nedelje rast je bio znatno blaži, da bi u četvrtoj nedelji bio zabeležen pad koncentracije bakra. U petoj nedelji bioluženja došlo je do skoka koncentracije bakra na maksimalne vrednosti ($305,82 \pm 13,84 \text{ mgL}^{-1}$, $168,72 \pm 2,13 \text{ mgL}^{-1}$ i $211,99 \pm 1,23 \text{ mgL}^{-1}$ za uzroke sa dubina od 10, 15 i 20 m, što odgovara prinosima bakra od $97,78 \pm 5,50 \%$, $68,34 \pm 1,21 \%$ i $72,57 \pm 0,57 \%$; tabele 11 i 12).

Tokom kiselinskog luženja su zabeležene znatno manje fluktuacije u koncentraciji bakra. U prvoj nedelji bioluženja došlo je do porasta koncentracije Fe^{2+} jona u uzorku, što ukazuje da se proces oksidacije sulfidnih minerala u određenoj meri odvijao dejstvom Fe^{3+} jona koji su bili prisutni u jezerskoj vodi. Porast koncentracije Fe^{3+} je bio blag do treće nedelje eksperimenta, kada je zabeležen nagli skok koncentracije Fe^{3+} jona, istovremeno, došlo je do naglog pada koncentracije Fe^{2+} jona. Takođe, koncentracija bakra je opala u četvrtoj nedelji eksperimenta, kada je koncentracija Fe^{3+} dostigla maksimalnu vrednost, da bi nakon toga u petoj nedelji eksperimenta koncentracija bakra dostigla maksimalnu vrednost. Na osnovu dobijenih podataka se može zaključiti da uticaj acidofilnih bakterija na oksidaciju sulfidnih minerala tokom prve tri nedelje eksperimenta nije bio značajan. Koncentracije bakra tokom prve tri nedelje eksperimenta nisu bile statistički značajno veće u odnosu na koncentracije bakra tokom kiselinskog luženja, osim u slučaju uzorka sa dubine od 10 m kada je u drugoj nedelji eksperimenta zabeležena značajno veća koncentracija bakra tokom bioluženja. Nagli skok koncentracije Fe^{3+} jona tokom četvrte nedelje bioluženja svedoči o intenzivnoj aktivnosti mikroorganizama u ovom periodu.

Prvi korak u procesu bioluženja je vezivanje gvožđe-oksidujućih bakterija (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*) za površinu minerala. U roku od 24 časa nakon inokulacije, oko 80 % acidofilnih gvožđe-oksidujućih bakterija se veže za površinu minerala (Gauri et al., 2007, Vera et al., 2013). Ove bakterije stvaraju biofilm čiju osnovu čine egzopolisaharidi. U biofilmu vladaju uslovi koji favorizuju oksidaciju sulfidnih minerala (Rohwerder et al., 2003, Rohwerder and Sand., 2007) i omogućuju brzi rast bakterijske populacije na površini minerala (Zeng et al., 2010, Dong et al., 2013).

Zeng et al. (2010) su tokom eksperimenta oksidacije halkopirita u prisustvu umereno termofilnih acidofila pratili odnos broja ćelija koje su vezane za površinu

minerala i broja slobodnih ćelija u planktonskoj fazi. Prema podacima ovih autora, broj ćelija vezanih za površinu minerala je brzo rastao i dostigao maksimum nakon 20. dana, da bi zatim stagnirao do 36. dana, kada je broj vezanih ćelija počeo da opada. Broj planktonskih ćelija je bio znatno manji od broja vezanih ćelija tokom prve tri nedelje eksperimenta. Nakon 20. dana, broj planktonskih ćelija se brzo uvećavao da bi u kasnijoj fazi eksperimenta znatno nadmašio broj vezanih ćelija (Zeng et al., 2010). Usled intenzivne metaboličke aktivnosti bakterija u biofilmu na površini minerala, nastaje velika količina Fe^{2+} jona. Deo Fe^{2+} jona nastalih oksidacijom halkopirita se oslobađa u rastvor, gde ga oksidišu bakterije u planktonskoj fazi, što omogućuje brzi rast populacije ovih mikroorganizama. Acidofilne bakterije regenerišu Fe^{3+} jone koji potom vrše oksidativni napad na halkopirit, oslobađajući nove količine Fe^{2+} . Kada populacija bakterija na površini minerala dostigne kritičnu gustinu, dalji rast te populacije nije moguć, dok broj bakterija u planktonskoj fazi i dalje nesmetano raste, tako da je u kasnijim fazama opisanog eksperimenta broj slobodnih ćelija bio znatno veći od broja ćelija vezanih za površinu minerala. Nakon približno 30 dana, broj planktonskih ćelija je počeo da opada, pošto su bakterije utrošile Fe^{2+} jone (Zeng et al., 2010).

XingQing et al. (2013) su pratili broj ćelija tokom bioluženja halkopirita u čistoj kulturi bakterija *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Maksimalan broj ćelija u lužnom rastvoru je dostignut nakon 50. dana, kada je zabeležena i maksimalna koncentracija Fe^{3+} jona i maksimalni redoks potencijal rastvora. Koncentracija Fe^{2+} jona bila je znatno niža od koncentracije Fe^{3+} jona i blago je rasla do 50. dana, da bi zatim došlo do naglog pada koncentracije Fe^{2+} jona. Nakon 50. dana bioluženja, broj planktonskih ćelija u rastvoru je počeo da opada, što je uzrokovalo pad koncentracije Fe^{3+} jona, rast koncentracije Fe^{2+} jona i pad vrednosti pozitivnog redoks potencijala rastvora (XingQing et al., 2013).

Na osnovu navedenih literaturnih podataka (Zeng et al., 2010, XingQing et al., 2013), kao i rezultata koji su dobijeni tokom eksperimenata opisanih u ovoj disertaciji, može se zaključiti da je nakon treće nedelje eksperimenta bioluženja bakra iz uzoraka stare flotacijske jalovine broj ćelija vezanih za površinu minerala dostigao maksimum, što je dovelo do intenzivne oksidacije sulfidnih minerala u uzorku i oslobađanja Fe^{2+} u rastvor. Oslobođene Fe^{2+} jone su brzo oksidisali mikroorganizmi prisutni u planktonskoj

fazi, pa je naglo porasla koncentracija Fe^{3+} u rastvoru. Maksimalna koncentracija Fe^{3+} jona zabeležena je u četvrtoj nedelji eksperimenta, što ukazuje da je u tom trenutku aktivnost mikroorganizama bila najintenzivnija. Do pete nedelje, koncentracija Fe^{3+} jona u rastvoru je opala, a koncentracija Fe^{2+} jona porasla, što je verovatno posledica smanjenja broja mikroorganizama i samim tim oksidativne aktivnosti u lužnom rastvoru.

Efikasnost luženja u velikoj meri zavisi od vrste minerala od kojih je sačinjen materijal koji se tretira. Najefikasnije se luži bakar iz oksidnih minerala: tenorita (CuO), kuprita (Cu_2O), malahita ($\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$) i hrizokole ($\text{CuSiO}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Bakar se može lako izdvojiti iz ovih minerala pomoću razblaženog rastvora sumporne kiseline (Watling et al., 2008). Sulfidi bakra se teže rastvaraju u kiselini, pa je za dobijanje bakra iz sulfidnih minerala pogodnija metoda bioluženja. Efikasnost bioluženja bakra iz različitih sulfidnih minerala se značajno razlikuje (tabela 17). Najefikasnije se luži bakar iz sekundarnih sulfidnih minerala: halkozina (Cu_2S), sekundarnog kovelita (CuS) i bornita (Cu_5FeS_4). Prinos bakra nakon bioluženja halkopirita (CuFeS_2), najčešćeg minerala bakra u prirodi, je nezadovoljavajući za komercijalnu primenu i u proseku iznosi oko 20 % (Watling, 2006, Pradhan et al., 2008). Tokom bioluženja halkopirita u prisustvu Fe^{3+} jona nastaju jaroziti $[(\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{NH}_4^+)\text{Fe}^{3+}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2]$ koji se talože na površini minerala i blokiraju proces oksidacije halkopirita u ranom stadijumu bioluženja (Watling, 2006, Pradhan et al., 2008). Ovaj proces se naziva pasivizacija (Pradhan et al., 2008). Problem pasivizacije koji se javlja tokom bioluženja halkopirita na sobnoj temperaturi još nije rešen na zadovoljavajući način, što predstavlja prepreku za širu primenu biohidrometalurgije u proizvodnji bakra. Pasivizacija blokira i proces luženja bakra iz enargita (Cu_3AsS_4). Osim toga, prisustvo arsena u enargitu, koji je toksičan za sve žive organizme, ograničava mogućnost primene acidofilnih mikroorganizama u procesu luženja bakra iz ovog minerala.

Tabela 17. Mehanizmi oksidacije oksidnih i sulfidnih minerala bakra i procenjeno vreme potrebno za potpunu oksidaciju minerala (prema Watling, 2006).

Mineral	Reakcija oksidacije	Trajanje oksidacije
Hzizokola	$\text{CuSiO}_3 + 3\text{H}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{SiO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$	Sati-dani
Tenorit	$\text{CuO} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$	
Malahit	$\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2 + 2\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{CuSO}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	
Azurit	$\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 3\text{CuSO}_4 + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	
Kuprit	$\text{Cu}_2\text{O} + 0,5\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{CuSO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	
Halkozin	$\text{Cu}_2\text{S} + 0,5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CuS} + \text{CuFeS}_2$	Dani-meseci
Bornit	$\text{Cu}_2\text{FeS}_4 + 2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \rightarrow 2\text{CuS} + \text{CuFeS}_2 + 2\text{CuSO}_4 + 4\text{FeSO}_4$	
Kovelin	$\text{CuS} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \rightarrow \text{CuSO}_4 + 2\text{FeSO}_4 + \text{S}$	
Enargit	$\text{Cu}_3\text{AsS}_4 + 4,5\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CuSO}_4 + 9\text{FeSO}_4 + 4\text{S} + \text{HAsO}_2 + 1,5\text{H}_2\text{SO}_4$	Godine
Halkopirit	$\text{CuFeS}_2 + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \rightarrow \text{CuSO}_4 + 2\text{S} + 3\text{FeSO}_4$	

Nakon tretmana uzorka flotacijske jalovine uzetog sa dubine od 10 m, skoro sav bakar koji se nalazio u uzorku je izlužen. Takođe, sadržaj bakra u ovom uzorku je bio najviši i iznosio je 0,51 %. Relativno velika koncentracija bakra je posledica dugogodišnje precipitacije bakar(II)sulfata (CuSO_4) nastalog oksidacijom sulfidnih minerala bakra u gornjim slojevima jalovišta koji su dugo bili izloženi dejstvu kiseonika i vode, što je iniciralo hemijske i biološke procese koji su doveli do oksidacije sulfidnih minerala (hemijske jednačine 1-5). Sulfidni minerali bakra u površinskim slojevima jalovišta su skoro u potpunosti oksidisani, na šta ukazuje veoma niska koncentracija bakra u ovim slojevima (Stevanović, 2012), kao i rezultati semi-kvantitativne difrakcione analize koji su pokazali da je sadržaj pirita najmanji u uzorku uzetom sa dubine od 10 m i iznosi približno 3 %. Pored toga, kvalitativnom difrakcionom analizom je utvrđeno prisustvo minerala langita ($\text{Cu}_4[(\text{SO}_4)(\text{OH})_6] \times 2\text{H}_2\text{O}$) u sva tri uzorka. Sadržaj langita je bio najveći u uzorku uzetom sa dubine od 10 m, a najmanji u uzorku sa dubine od 20 m. Langit je sekundarni mineral koji se često nalazi u jalovištima i nastaje nakon oksidacije sulfida bakra i taloženja bakar(II)sulfata (Livingstone, 1976), stoga je očekivano da sadržaj langita bude najveći na površini i da

opada sa dubinom flotacijskog jalovišta. Sadržaj langita u uzorku uzetom sa dubine od 10 m je značajno smanjen nakon bioluženja, sa približno 22 % na 12 %. Lako rastvaranje bakar(II)sulfata i langita u kiselom rastvoru je verovatno uzrok veoma visokog prinosa bakra tokom bioluženja uzoraka sa dubine od 10 m.

Količina sulfidnih minerala raste sa dubinom jalovišta: sadržaj pirita na dubini od 15 m iznosi približno 10 %, dok je na dubini od 20 m približno 20 %. Sadržaj bakra u uzorku sa dubine od 20 m je bio veći od sadržaja bakra u uzorku sa dubine od 15 m (0,41 %, odnosno 0,33 %). Veći sadržaj bakra u dubljim slojevima jalovišta je očekivan uzimajući u obzir činjenicu da se sadržaj bakra u rudi vremenom smanjivao i da je tehnologija flotiranja usavršavana, što je uzrokovalo manji sadržaj bakra u jalovini. Takođe, veći sadržaj pirita i drugih sulfidnih minerala u dubljim slojevima je posledica kraće izloženosti ovih slojeva delovanju oksidacionih faktora.

Tokom bioluženja je izluženo približno 74 %, odnosno 72 % bakra iz uzoraka sa dubina od 15 m i 20 m. Manji prinos bakra u odnosu na uzorak sa dubine od 10 m je posledica nižeg sadržaja bakar(II)sulfata, sekundarnih oksidnih minerala bakra i langita, kao i većeg prisustva sulfidnih minerala u ovim uzorcima. Nakon bioluženja sadržaj pirita u uzorku sa dubine od 15 m je ostao nepromenjen, dok je u uzorku sa dubine od 20 m smanjen sa približno 20 % na približno 10 %. Moguće je da je pirit u uzorku sa dubine od 15 m nedostupan za oksidaciju zbog strukture kristalne rešetke. Znatno smanjenje sadržaja pirita u uzorku sa dubine od 20 m je značajno sa aspekta zaštite životne sredine, pošto se smanjenjem količine pirita smanjuje i sposobnost jalovišta da generiše kisele rudničke vode.

Na osnovu podataka predstavljenih u ovoj disertaciji i podataka koje su objavili drugi autori (Antonijević et al., 2008, Stevanović, 2012, Stevanović et al., 2013) Staro flotacijsko jalovište Rudnika bakra Bor bi moglo biti podeljeno u tri sloja: oksidisani sloj (0-5 m) u kojem su sulfidni minerali skoro u potpunosti oksidisani a sadržaj bakra veoma nizak, sloj precipitacije (5-15 m) u kojem je došlo do precipitacije bakar-sulfata iz gornjih slojeva, što je uzrokovalo povećanu koncentraciju bakra u ovom sloju, i neoksidisanog sloja (20-30 m) u kojem je stepen oksidacije sulfidnih minerala najmanji, a prosečan sadržaj bakra najveći. U oksidisanim slojevima su vremenom nastali sekundarni minerali bakra – sekundarni kovelin, halkozin, oksidni minerali bakra i

langit. U dubljim slojevima su se zadržali primarni sulfidni minerali bakra - halkopirit i enargit.

U proseku približno 80 % bakra je izluženo tokom bioluženja jezerskom vodom. Znatni prinos bakra se može objasniti prisustvom bakar(II)sulfata rastvorljivog u vodi, sekundarnih minerala koji se lako rastvaraju u kiselj sredini (langita, oksidnih minerala bakra), kao i sastavom sulfidnih minerala bakra, među kojima je najzastupljeniji kovelin. Količina bakra oslobođena iz uzoraka flotacijske jalovine tretiranih rastvorom sumporne kiseline je generalno manja u odnosu na količinu bakra oslobođenu tokom bioluženja. Oksidni minerali bakra se lako rastvaraju i u blagom rastvoru sumporne kiseline. Za rastvaranje sulfidnih minerala bakra potrebna je veća koncentracija sumporne kiseline i prisustvo oksidacionih agenasa, kao što su gvožđe(III)sulfat ili vodonik-peroksid (Antonijević et al., 2008, Stevanović et al., 2013). Tokom bioluženja, bakterije su generisale znatnu koncentraciju Fe^{3+} jona u lužnom rastvoru, što je omogućilo da sulfidni minerali bakra budu u značajno većoj meri oksidisani u odnosu na tretman istih uzoraka rastvorom sumporne kiseline.

6 ZAKLJUČCI

- 1) Mikrobiološki diverzitet površinske vode jezera Robule je ograničen; identifikovane su samo tri vrste acidofilnih bakterija: *Acidiphilium cryptum*, *Leptospirillum ferrooxidans* i *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
- 2) Zeleni tepih koji je formiran u plitkoj vodi u obalskoj zoni jezera nastanjuju končaste alge i pretežno heterotrofne acidofilne bakterije. Rezultati T-RFLP analize su pokazali da je mikrobiološki diverzitet tepiha značajno veći u poređenju sa površinom jezerske vode.
- 3) Zasejavanje dvoslojne čvrste podloge uzorcima jalovine uzete sa odlagališta rudničke raskrivke koja delom okružuje jezero Robule, je pokazalo da jalovište nastanjuju acidofilne gvožđe-oksidujuće i heterotrofne bakterije, što dokazuje da se na jalovištu odigravaju procesi oksidacije sulfidnih minerala i da je jalovište izvor kiselih rudničkih voda.
- 4) Prinos bakra nakon bioluženja uzoraka mineralnog koncentrata je bio statistički značajno veći kada je rastvor za luženje inokulisan veštački kreiranim bakterijskim konzorcijumom koji je sadržao šest vrsta acidofilnih bakterija, u poređenju sa bioluženjem istih uzoraka rastvorom inokulisanim autohtonim bakterijskim konzorcijumom iz jezera Robule. Prirodna kisela staništa odlikuje izuzetno mali biodiverzitet, stoga je za proces bioluženja bakra bolje primenjivati bakterijske konzorcijume napravljene u laboratoriji, koji su složeniji od prirodnih i sadrže mikroorganizme sa različitim fiziološkim osobinama.
- 5) Nakon tretiranja jezerskom vodom uzoraka stare flotacijske jalovine uzetih sa dubine od 10 metara iz Starog flotacijskog jalovišta Rudnika bakra Bor izlužen je skoro sav bakar. U površinskim slojevima jalovišta je nataložen bakar(II)sulfat nastao oksidacijom sulfidnih minerala bakra, što je uzrok veoma visokog prinosa bakra tokom luženja ovih uzoraka flotacijske jalovine.
- 6) Taloženje bakar(II)sulfata je dovelo do nastanka sekundarnog minerala langita u uzorcima flotacijske jalovine. Semi-kvantitativna rendgenska strukturalna analiza je pokazala da je količina langita u uzorku uzetom sa dubine od 10 m najveća i da je znatno smanjena nakon eksperimenta bioluženja.

- 7) Sa povećanjem dubine, opada sadržaj langita i raste sadržaj sulfidnih minerala u uzorcima flotacijske jalovine, što uslovljava i manji prinos bakra tokom bioluženja ovog metala iz uzoraka uzetih sa dubine od 15 i 20 metara.
- 8) Nakon tretiranja jezerskom vodom uzoraka flotacijske jalovine uzete sa dubine 20 metara, prinos bakra je bio statistički značajno veći u odnosu na kiselinsko luženje bakra iz istog uzorka. Na osnovu toga se može zaključiti da je, u poređenju sa kiselinskim luženjem, za ekstrakciju bakra iz materijala sa većim sadržajem sulfidnih minerala bolje primeniti metod bioluženja.
- 9) Semi-kvantitativna rendgenska strukturna analiza uzoraka flotacijske jalovine nakon bioluženja je pokazala da je nakon tretmana jezerskom vodom znatno smanjen sadržaj pirita u uzorcima flotacijske jalovine uzetim sa dubine od 20 metara. Ovo je značajno sa aspekta zaštite životne sredine, pošto se smanjenjem sadržaja pirita smanjuje kapacitet jalovišta za generisanje kiselih rudničkih voda.
- 10) Jezero Robule je prirodni rezervoar ogromne količine kisele vode bogate Fe^{3+} jonima i acidofilnim mikroorganizmima koja bi se mogla primeniti u postupku bioluženja bakra iz flotacijske jalovine.

7 LITERATURA

1. Acinas S.G., Sarma-Rupavtaram R., Klepac-Ceraj V., Ploz M.F. (2005) PCR induced sequence artifacts and bias: Insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12): 8966-8978
2. Antonijević M.M., Dimitirijević M.D., Stevanović Z.O., Serbula S.M., Bogdanović G.D. (2008) Investigation of the possibility of copper recovery from the flotation tailings by acid leaching, *Journal of Hazardous Materials* 158: 23-34
3. Anwar M. A., Iqbal M., Qamar M. A., Rehman M., Khalid A. M. (2000) Determination of cuprous ions in bacterial leachates and for environmental monitoring, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 135-138
4. Baker B.J., Banfield J.F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage, *FEMS Microbiology Ecology* 44: 139-152
5. Beškoski V.P., Papić P., Dragišić V., Matić V., Vrvic M.M. (2009) Long term studies on the impact of thionic bacteria on the global pollution of waters with toxic ions, *Advanced Materials Research* 71-73: 105-108
6. Bogdanović G., Trumić M., Trumić M., Antić D.V. (2011) Upravljanje otpadom iz rudarstva - nastanak i mogućnost prerade, *Reciklaža i održivi razvoj* 4: 37-43
7. Bogdanović G., Trumić M.Ž., Stanković V., Antić D.V., Trumić M.S., Milanović Z. (2013) Rudničke vode iz rudnika RTB Bor – resurs za dobijanje bakra ili zagađivač životne sredine, *Reciklaža i održivi razvoj* 6: 41-50
8. Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrateva T.F., Duda V.I., Suzina N.E., Melamud V.S., Tourova T.P., Karavaiko G.I. (2006) *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant chemolithotropic bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (5): 1039-1042
9. Bond P.L., Druschel G.K., Banfield J.F. (2000) Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 4962–4971

10. Bosecker K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms, *FEMS Microbiology Reviews* 20: 591-604
11. Brenner D.J., James T.S., Krieg N.R. (2001) Classification of procariotic organisms and the concept of bacterial speciation in Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. (editors): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, volume 1, Springer, New York: 352-415
12. Bridge, T.A.M., Johnson D.B. (2000) Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium* SJH, *Geomicrobiology Journal* 17: 193-206
13. Brierley C. (2008) How will biomining be applied in future? *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18: 1302-1310
14. Brierley C., Brierley J. (2013) Progress in bioleaching part B: applications of microbial processes in the minerals industries, *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 7543-7522
15. Bryant C. (2006) A study of the microbiological populations of mine wastes, PhD thesis, University of Wales, United Kingdom
16. Bugarin M., Stevanović Z., Gardić V., Marinković V. (2012) Pregled dosadašnjih geoloških istraživanja starog flotacijskog jalovišta i EU regulativa iz oblasti zaštite voda, *Rudarski radovi* 4: 1-4
17. Cheng-Ying J., Ying L., Yan-Yang L., Xiao-Yan Y., Xu G., Shuang-Jiang L. (2008) *Alycyclobacillus ferrooxidans* sp. nov., a ferrous oxidizing bacterium from solfataric soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2898-2903
18. Chunbo H., Lihua W., Yanan G., Lina Z., Hailiang D. (2010) Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine (Anhui province, China), *Extremophiles* 14: 465-474
19. Conić V., Rajčić Vujasinović M., Trujić V., Cvetkovski V. (2014) Copper, zink and iron bioleaching from polymetallic sulphide concentrate, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 24: 3688-3695
20. Conić V. (2015) Biotehnologija za tretman kompleksnih sulfidnih koncentrata, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru

21. Coupland K., Johnson D.B. (2008) Evidence that the potential for dissimilatory reduction of iron is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria, *FEMS Microbiology Letters* 279: 30-35
22. Dimitrijević M.D. (2012) Kisele rudničke vode, *Bakar* 37 (1): 33-44
23. Dimitrijević M.D., Alagić S.Č. (2012) Pasivni tretman kiselih rudničkih voda, *Bakar* 37 (1): 58-68
24. Dimitrijević M.D., Nujkić M.M., Milić S.M. (2012) Obrada kiselih rudničkih voda krečom, *Bakar* 37 (1): 45-55
25. Dimitrijević M. D. (2013) Kisele rudničke vode, Univerzitet u Beogradu - Tehnički fakultet u Boru, Bor
26. Dold B. (2008) Sustainability in metal mining: from exploration, over processing to mine waste management, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7: 275-285
27. Dong Y., Lin H., Xu X., Zhou S. (2013) Bioleaching of different copper sulfides by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its adsorption on minerals, *Hydrometallurgy* 140: 42-53
28. Dragišić V. (2007) Hidrogeologija ležišta mineralnih sirovina, Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet, Beograd
29. Dugan P., MacMillan C., Pfister R. (1970) Anaerobic heterotrophic bacteria indigenous to pH 2.8 acid mine water: Microscopic examination of acid streamers, *Journal of Bacteriology*, 101 (3): 973-981
30. Egert M., Friedrich M.W. (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5): 2555-2562
31. Engbretson J.J., Moyer C.L. (2003) Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphism, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4823-4829
32. Falagan C., Sanchez-Espana J. and Johnson D. B. (2013) New insights into the biogeochemistry of extremely acidic environments revealed by a combined cultivation-based and culture-independent study of two stratified pit lakes, *FEMS Microbiology Ecology* 87: 237-243

33. Fu B., Zhou H., Zhang R., Qiu G. (2008) Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus sp.* and *Leptospirillum feriphilum*, *International Biodeterioration and Biodegradation* 62: 109-115
34. Geller W., Shultze M., Klenimann R., Wolkersdorfer C. (2013) *Acidic pit lakes: the legacy of coal and metal surface mines*, Springer, Berlin
35. Ghauri M.A., Okibe N., Johnson D.B. (2007) Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations, *Hydrometallurgy* 85: 72–80
36. Golovacheva R.S., Karavaiko G.I. (1977) *Sulfobacillus*, a new genus of thermophilic sporulating bacteria, *Mikrobiologia* 47 (5): 815-822
37. Gonzalez-Toril E., Llobet-Brossa E., Casamayor E.O., Amann R., Amils R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River, *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4853-4865
38. Hallberg K.B. (2010) New perspectives in acid mine drainage microbiology, *Hydrometallurgy* 104: 448-453
39. Hallberg K.B., González-Toril E., Johnson DB. (2010) *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov. facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments, *Extremophiles* 14 (1): 9-19
40. Jameson E., Rowe O., Hallberg K., Johnson D.B. (2010) Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus sp.* and acidophilic sulfate-reducing bacteria, *Hydrometallurgy* 104: 488-493
41. Johnson D.B. (1995) Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria, *Journal of Microbiological Methods* 23: 205-218.
42. Johnson D.B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms, *FEMS Microbiology Ecology* 27: 307-317
43. Johnson D.B., Okibe N., Hallberg K.B. (2005) Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis, *Journal of Microbiological Methods* 60: 299-313
44. Johnson D.B., Hallberg K.B. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review, *Science of the Total Environment* 338: 3-14

45. Johnson D.B. (2006) Biohydrometallurgy and environment: Intimate and important interplay, *Hydrometallurgy* 83: 153-166
46. Johnson D.B. (2007) Physiology and biochemistry of acidophilic microorganisms in Gerday C., Glansdorff N. (editors): *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*, ASM Press, Washington D.C: 98-115
47. Johnson D.B. (2008) Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates, *Transactions of Nonferrous Metal Society of China* 18: 1367-1373
48. Johnson D.B., Hallberg K.B. (2009) Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic microorganisms, *Advances in Microbial Physiology* 54: 126-139
49. Johnson D.B. (2009) Extremophiles: Acidic Environments in Moselio Schaechter (editor): *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Academic Press, Oxford: 107-122
50. Johnson D.B. (2010) The biogeochemistry of biomining in L.L. Barton et al. (editors): *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*, Springer Science + Business Media: 401-426
51. Johnson D.B. (2011) Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments, *FEMS Microbiology Ecology* 81: 2-12
52. Johnson D.B. (2012) Reductive dissolution minerals and selective recovery of metals using acidophilic iron- and sulfate-reducing acidophiles, *Hydrometallurgy*, 127-128: 172-189
53. Karanović Lj. (1996) *Primenjena kristalografija*, Univerzitet u Beogradu, Rudarsko-geološki fakultet, Beograd
54. Karanović Lj., Poleti D. (2003) *Rendgenska strukturna analiza*, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
55. Kraus W., Noize G. (1996) POWDER CELL - a program for the representation and manipulation of crystal structures and calculation of the resulting X-ray powder patterns, *Journal of Applied Crystallography* 29: 301-303.
56. Kay C.M., Rowe O.F., Rocchetti L., Coupland K., Hallberg K.H. and Johnson D.B. (2013) Evolution of microbial “streamer” growths in an acidic metal-contaminated stream draining abandoned underground copper mine, *Life* 3: 189-210

57. Kelly D.P., Wood A.P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermothiobacillus* gen.nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 511-516
58. Kimura S., Bryan C.G., Hallberg K.B., Johnson D.B. (2011) Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy, *Environmental Microbiology* 13 (8): 2092-2105
59. Kleeberg A. (2013) Zygnematalean green algae (Streptophyta, Zygnematales) in lakes impacted by acidic precipitation, experimental acidification, and acid mine drainage in Geller W., Shultze M., Kleinmann R., Wolkersdorfer C. (editors): *Acidic pit lakes: the legacy of coal and metal surface mines*, Springer, Berlin: 159-172
60. Knežević-Vukčević J., Simić D. (2006) Metode u mikrobiologiji, Biološki fakultet, Beograd
61. Komadel P, Stucki J (1988) Quantitative assay of minerals for Fe²⁺ and Fe³⁺ using 1,10-phenanthroline: III. A rapid photochemical method, *Clays and Clay Minerals* 36: 379-386
62. Kondrateva T. F., Pivovarova T.A., Bulaev A.G., Melamud V.S., Muravyov M.I., Usoltsev A.V., Vasilev E.A. (2012) Percolation bioleaching of copper and zinc and gold recovery from flotation tailings of the sulfide complex ores from the Ural region, Russia, *Hydrometallurgy* 111-112: 82-86
63. Konhauser K. (2007) Introduction to Geomicrobiology, Blackwell Publishing, Oxford
64. Korać M., Kamberović Ž. (2007) Characterization of wastewater streams from Bor site, *Metallurgical & Materials Engineering* 13 (1): 41-51
65. Lane D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing in Stackebrandt E., Goodfellow M. (editors): *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, New York: 115-175.
66. Lawrence R., Phillipe R., Fleming C. (2007) Sulphide and ion exchange technologies for metal recovery and water treatment in the copper mining industry, *Proceedings of the Hydro Copper Conference 2007*, Santiago Chile: 96-104

67. Lewis A. E. (2010) Review of metal sulphide precipitation, *Hydrometallurgy* 104: 222-232
68. Liu W., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. (1997) Characterisation of microbial diversity by determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of genes encoding 16s rRNA, *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11): 4516-4522
69. Livingstone, A., Macpherson, H.G., Jackson B. (1976) Wroewolfeite and other Langite-Group Minerals from Blackcraig, Kirkcudbrightshire, *Mineralogy Magazine* 40: 893-902
70. Lopez-Archilla A., Gerard E., Moreira D., Lopez-Garcia P. (2004) Microfilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain, *FEMS Microbiology Letters* 235: 221-228
71. Lovely D. R., Phillips E. J. P. (1987) Rapid assay for microbially reduced ferric iron in aquatic sediments, *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1536-1540
72. Luke C.L. (1966) New spectrophotometric thiocyanate determination of iron in metals, alloys, acids and salts, *Analytica Chimica Acta* 36: 122–129
73. Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hlom S.J., Dymock D., Wade W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2): 795-799
74. Mullis K.B., Faloona K.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology* 155: 335-350
75. Nancuqueo I., Johnson D.B. (2010) Production of glycoloc acid by chemolithotrophic iron- and sulfur- oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining acidophilic mineral-oxidizing consortia, *Applied and Environmental Microbiology* 76 (2): 461-472
76. Nancuqueo I., Johnson D.B. (2011) Significance of microbial communities and interactions in safeguarding reactive mine tailings by ecological engineering, *Applied and Environmental Microbiology* 77(23): 8201-8208

77. Nancucheo I., Johnson D.B. (2012) Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles, *Frontiers in Microbiology*, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00325
78. Okibe N., Johnson D. B. (2004) Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: the significance of microbial interactions, *Biotechnology and Bioengineering* 87: 574-583
79. Osborn M.A., Moore E.R.B., Timmis K. (2000) An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism for the study of microbial community structure and dynamics, *Environmental Microbiology* 2 (1): 13-50
80. Panda S., Sajay K., Sukla L.B., Pradhan N., Subbaiah T., Mishra B.K., Ray S.K. (2012) Insights into heap bioleaching of low grade chalcopyrite ore - a pilot scale study, *Hydrometallurgy* 125-126: 157-165
81. Pradhan N., Nathsarma K., Srinavasa Rao, Sukla L.B., Mishra B.K. (2008) Heap bioleaching of chalcopyrite: A review, *Minerals Engineering* 21: 355-365
82. Prosser J., Jansson J.K., Liu W. (2010) Nucleic-acid-based characterisation of community structure and function in Liu W., Jansson J.K. (editors): *Environmental Molecular Biology*, Caister Academic Press, Norfolk: 127-205
83. Qiu M., Xiong S., Zhang W., Wang G. (2005) A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or mixed culture, *Minerals Engineering* 18: 987-990
84. Romac S., Vukosavić S., Stojković O., Čuljković B. (1999) PCR u kliničkoj dijagnostici, Biološki fakultet, Beograd
85. Rowe O.F., Sanchez-Espana H., Hallberg K.H. and Johnson D.B. (2007) Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems, *Environmental Microbiology* 9 (7): 1761-1771
86. Rawlings D.E. (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates, *Microbial Cell Factories* 4 (13), DOI:10.1186/1475-2859-4-13

87. Rawlings D.E., Johnson D.B. (2007) The microbiology of biomining: development and optimization of mineral oxidizing microbial consortia, *Microbiology* 153: 315-324
88. Rawlings D.E., Tribusch H., Hansford G.S. (1999) Reasons why "*Leptospirillum*" like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores, *Microbiology* 145: 5-13
89. Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W. (2003) Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation, *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 239-248
90. Rohwerder T., Sand W. (2007) Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation in Rawlings D.E., Johnson D.B. (editors): *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
91. Rowe O., Javier Sánchez-España, Kevin B. Hallberg, D. Barrie Johnson (2007) Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems, *Environmental Microbiology* 9 (7): 1761–1771
92. Said M.F. (1990) The tolerance of acidophilic bacteria to high concentrations of some metals, Ph.D. thesis, University of Wales, United Kingdom
93. Sand W., Gehrke T., Josza P.G., Schippers A. (2001) (Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching, *Hydrometallurgy* 59: 159-175
94. Santofimia E., González-Toril E., López-Pamo E., Gomariz M., Amils R., Aguilera A. (2013) Microbial diversity and its relationship to physicochemical characteristics of the water in two extreme acidic pit lakes from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain), *PLoS ONE* 8(6), DOI:10.1371/journal.pone.0066746
95. Schippers A, Sand W. (1999) Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1): 319-321
96. Schutte U.M.E., Abdo Z., Bent S.J., Shyu C., Williams C.J., Pierson J.D., Forney L. (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length

- polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterise microbial communities, *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 365-380
97. Shyu C., Soule T., Bent S.J., Foster J.A., and Forney L. (2007) MiCA: A Web-Based Tool for the Analysis of Microbial Communities Based on Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP) of 16S and 18S rRNA Genes, *Journal of Microbial Ecology* 53: 562-570.
 98. Silverman M.P., Lundgren D.G. (1959) Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields, *Journal of Bacteriology* 77, 642-647
 99. Smailagić J., Savović A., Nešić D., Milenković M., Zdravković S. (2013) Klimatološka analiza leta 2012. godine za Srbiju, *Sezonski bilten Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije*
 100. Speakman S. A. (2010) *Basics of x-ray powder diffraction*, <http://prism.mit.edu/xray> (pristupljeno aprila 2014. godine)
 101. Stevanović Z., Antonijević M., Bogdanović G., Bugarin M., Trujić V., Marković R., Nedeljković D. (2013) The effect of oxidants through a tailing dump depth and the leaching of copper, *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences* 8 (1): 29-38
 102. Stevanović Z., Antonijević M., Jonović R., Avramović Lj., Marković R., Bugarin M., Trujić V. (2009) Leach SW-EX copper revalorization from overburden of abandoned copper mine Cerovo, eastern Serbia, *Journal of Mining and Metallurgy* 45 B (1): 45-57
 103. Stevanović Z., Obradović Lj., Marković R., Jonović R., Avramović Lj., Bugarin M., Stevanović J. (2013) Mine waste water management in the Bor municipality in order to protect the Bor River water in Einschlag F.S.G. and Carlos L. (editors): *Waste water - treatment technologies and recent analytical developments*, InTech, Rijeka, DOI: 10.5772/34443
 104. Stevanović Z. (2012) Luženje teških metala iz flotacijske jalovine, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru
 105. Svoboda, E., Mims C., Fecht S., Peck M., Diep F. (2011) World changing ideas, *Scientific American* 305 (6): 40-51

106. Suzuki M.T., Giovannoni S. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Applied and Environmental Microbiology* 62 (2): 625-630
107. Torsvik V., Ovreas L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, *Current Opinion in Microbiology* 5 (3): 240-245
108. Tributsch H., Rojas-Chapana J. (2007) Bacterial strategies for obtaining chemical energy by degrading sulfide minerals in Rawlings D.E., Johnson D.B. (editors): *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
109. Valdés J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R.J., Tettelin H., Blake R., Eisen J.A., Holmes D.S. (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications, *BMC Genomics* 9, DOI:10.1186/1471-2164-9-597
110. Vera M., Schippers A., Sand W. (2013) Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation - Part A, *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 7529-7541
111. Wakao N., Yokoi N., Isoyama, N., Hiraishi, A., Shimada, K., Kobayashi, M., Kise, Hideo I., Masayo I., Shigeru T. (1996) Discovery of natural photosynthesis using Zn-containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Acidiphilium rubrum*, *Plant & Cell Physiology* 37 (6): 889-895
112. Watling H.R. (2006) The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review, *Hydrometallurgy* 84: 81-108
113. Watling H.R., Perrot F.A., Shiers D.W. (2007) Comparison of selected characteristics of *Sulfobacillus* species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments, *Hydrometallurgy* 93: 57-65
114. Waxman S., Joffe W. (1922) Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil, *Journal of Bacteriology* 7 (2): 239–256
115. Wendt-Potthoff K. (2013) Procariotic microorganisms, protists and fungi in Geller W., Shultze M., Kleinmann R., Wolkersdorfer C. (editors): *Acidic pit lakes: the legacy of coal and metal surface mines*, Springer, Berlin: 126-159
116. Williams, K. P., Kelly, D. P. (2013) Proposal for a new Class within the Proteobacteria, the Acidithiobacillia, with the Acidithiobacillales as the type

Order, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2901-2906

117. XingQing Z., RuCheng W., XianCai L., JianJun L., ChengXiang L., Juan L. (2013) Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Minerals Engineering* 53: 184-192
118. Yang Y., Diao M., Liu K., Qian L., Nguyen A., Qiu G. (2013) Column bioleaching of low grade copper ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures with a heterotrrophic acidophile *Acidiphilium sp.*, *Hydrometallurgy* 131-132: 93-98
119. Zeng W., Tan S., Chen M., Qiu G. (2010) Detection and analysis of attached microorganisms on the mineral surface during bioleaching of pure chalcopyrite with moderate thermophiles, *Hydrometallurgy* 106: 46-59

BIOGRAFIJA AUTORA

Srđan (Borisav) Stanković je rođen 1975. godine u Livnu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu je pohađao u Kupresu (Bosna i Hercegovina), a zatim u Pančevu Gimnaziju „Uroš Predić”. Diplomirao je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija 2001. godine sa prosečnom ocenom 8,89. Nakon što je kratko volonterski radio u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, 2002. godine zaposlio se u preduzeću „Božić i sinovi” u Pančevu na mestu predavača u školi računara, da bi kasnije prešao na mesto menadžera prodaje računarske opreme. U julu 2005. godine osniva preduzeće „Kubit” koje se bavilo razvojem i prodajom sadržaja za mobilne telefone i razvojem internet prezentacija. Od 2008. godine radi kao nastavnik biologije, ekologije i zaštite životne sredine u Elektrotehničkoj školi „Nikola Tesla” u Pančevu, a od 2009. godine i kao nastavnik biologije u Osnovnoj školi „Borisav Petrov Braca” u Pančevu. Od 2010. godine Srđan Stanković je bio student doktorskih studija Rudarsko-geološkog fakulteta na studijskoj grupi Geologija.

Srđan Stanković je do sada objavio tri naučna rada u međunarodnim časopisima, kao i jednu naučnu polemiku. Dva rada objavljena u časopisu *Journal of the Serbian Chemical Society* su proistekla iz rada na doktorskoj disertaciji.

Međunarodni časopisi (M23)

1. S. Stanković, I. Morić, A. Pavić, B. Vasiljević, D.B. Johnson, V. Cvetković (2014) Investigation of the microbial diversity of an extremely acidic metal-rich water body (Lake Robule, Bor, Serbia), *Journal of the Serbian Chemical Society* 79 (6): 729-741
2. S. Stanković, I. Morić, A. Pavić, S. Vojnović, B. Vasiljević, V. Cvetković (2015) Bioleaching of copper from samples of Old flotation tailings (Copper mine Bor, Serbia), *Journal of the Serbian Chemical Society* 80 (3): 391-405

3. D. Randelović, S. Stanković, N. Mihailović, D. Leštan (2015) Bioremediation of Cu from copper mine wastes and contaminated soils using EDDS and acidophilic bacteria, *Bioremediation Journal* 19 (3): 231-238

Naučna kritika i polemika u međunarodnom časopisu (M26)

S. Stanković, B. Vasiljević, V. Cvetković (2014) Reply on the commentary on paper «Investigation of microbial diversity of an extremely acidic metal-rich water body lake Robule (Bor, Serbia)» published in Journal of the Serbian Chemical Society, Volume 79, Issue 6, 729–741, *Journal of the Serbian Chemical Society* 79 (12): 1575-1578

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а : Срђан Станковић

број индекса Г819/2010

Изјављујем

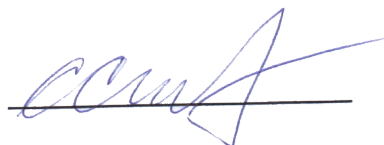
да је докторска дисертација под насловом

Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 15.01.2016.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Срђан Станковић

Број индекса Г819/2010

Студијски програм Геологија

Наслов рада: **Микробиолошки диверзитет киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала**

Ментори: проф. др Владица Цветковић, др Ивана Морић

Потписани Срђан Станковић

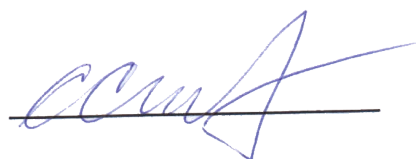
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 15.01.2016.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Микробиолошки диверзитет екстремно киселог језера Робуле и утицај језерске воде на оксидацију сулфидних минерала

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15.01.2016.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.