

Phân lập và sàng lọc vi khuẩn oxy hóa sắt từ các mỏ vàng tại Tây Nguyên, Việt Nam

Vũ Thị Hạnh Nguyên^{1,2}, Phạm Ngọc Cần^{2,3}, Bùi Thị Liên¹,
Quách Ngọc Tùng^{1,2}, Trần Tuấn Anh^{2,3}, Phí Quyết Tiến^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Địa chất, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tác giả liên hệ: tienpq@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 05/01/2021

Ngày chấp nhận đăng: 15/2/2021

Từ khóa: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, tiền xử lý quặng chứa Au, quặng antimon chứa Au, quặng sulfide chứa Au, quặng thiếc-wolfram chứa Au

Tóm tắt: Hiện nay, công nghệ hòa tách quặng vàng sử dụng vi sinh vật ngày càng được quan tâm nghiên cứu và phát triển với mục đích bảo đảm hiệu suất thu hồi vàng cao và giảm ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu này nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa có khả năng oxy hóa sắt từ các mẫu quặng sulfua vàng thu thập tại các mỏ vàng ở Tây Nguyên ứng dụng trong hòa tách quặng. Từ 8 mẫu quặng thu thập đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn và tuyển chọn được chủng TNG13.1 có khả năng oxy hóa Fe cao (89,33%). Chủng TNG13.1 là vi khuẩn hiếu khí, Gram âm, catalase dương tính; khuẩn lạc có dạng tròn, lồi và khô, màu vàng; tế bào hình que, không có khả năng tạo bào tử, có khả năng chịu đựng các điều kiện pH acid, kim loại nặng. Chủng TNG13.1 thuộc nhóm hóa tự dưỡng, sử dụng năng lượng từ quá trình oxy hóa các hợp chất chứa sắt và lưu huỳnh để phát triển; sinh trưởng được trong khoảng pH từ 1,5 – 3,0; dải nhiệt độ từ 20 - 50°C. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rDNA cho thấy chủng TNG13.1 thuộc loài *Acidithiobacillus ferrooxidans* và đặt tên là *A. ferrooxidans* TNG13.1 (Mã số GenBank MW713141). Thử nghiệm khả năng oxy hóa Fe trên quặng sulfide chứa Au, quặng thiếc-wolfram chứa Au và quặng antimon chứa Au cho thấy hiệu quả xử lý tốt nhất tại tỉ lệ quặng 1% (w/v) với hiệu suất lần lượt là 100%; 48,44% và 63,13%. Kết quả khả quan bước đầu cho thấy, tiềm năng ứng dụng chủng *A. ferrooxidans* TNG13.1 trong hòa tách quặng Au ở nước ta; góp phần nâng cao hiệu quả khai thác vàng và giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

1. Giới thiệu

Khai thác sinh học, bao gồm tách lọc sinh học (Bioleaching) và oxy hóa sinh học, là một công nghệ thân thiện với môi trường ngày càng được áp dụng rộng rãi trên toàn thế giới để xử lý nguyên liệu khoáng sản, thu hồi kim loại có giá trị như đồng, uranium, vàng từ quặng và chất thải (Schippers và nnk, 2013; Khachatryan và nnk, 2021). Công nghệ bioleaching chuyển đổi một số sulfua kim loại

có giá trị không hòa tan thành dạng hòa tan nhờ vi sinh vật hoặc phá hủy mạng tinh thể của các khoáng chất sulfua để làm lộ vàng có thể tiếp cận được với sự rửa trôi bởi các chất hóa học (Johnson, 2018; Liao và nnk, 2020).

Các chủng vi sinh vật được sử dụng để khai thác sinh học chủ yếu là vi khuẩn hóa tự dưỡng ion sắt hoặc sulfua (chemoautotroph), như *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*,

Acidithiobacillus caldus và *Leptospirillum* spp. Chúng là vi khuẩn ưa axit hóa trị, lấy Fe^{2+} làm nguồn năng lượng và phản ứng oxy hóa sinh học là: $4\text{FeSO}_4 + 2\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Xiao và nnk, 2013). Trên cơ sở kết quả phân tích trình tự 16S rRNA viết thống nhất 16S rDNA hay 16S rRNA?, *A. ferrooxidans* và *A. thiooxidans* được xếp thành một chi, *Acidithiobacillus*, trong phân lớp γ của Proteobacteria. Các chủng khác nhau của loài này đã được phân lập từ các nguồn tài nguyên thiên nhiên (đá, quặng và nước rỉ từ mỏ) (Jahani và nnk, 2015).

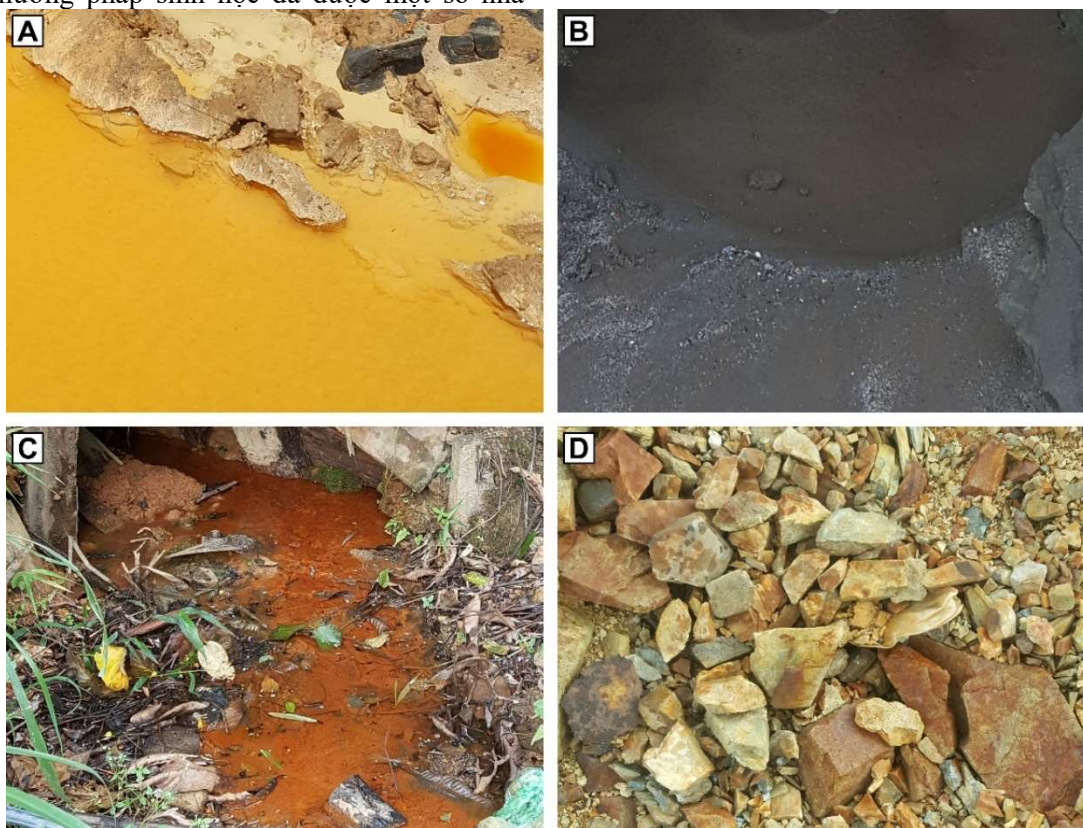
Trong những năm gần đây, có nhiều nghiên cứu về đặc điểm sinh trưởng của vi khuẩn *A. ferrooxidans*, bao gồm tỷ lệ giống, pH ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ ban đầu của sắt (Xiao và nnk, 2013). Trong vài thập kỷ trước vấn đề tách kim loại trong quặng bằng phương pháp sinh học đã được một số nhà

khoa học ở Việt Nam quan tâm nghiên cứu. Tuy nhiên, do điều kiện nghiên cứu trong phòng thí nghiệm còn hạn chế nên việc phân lập được chủng vi khuẩn oxy hóa sắt ưa axit còn chưa được công bố. Trong bài báo này, nghiên cứu phân lập và sàng lọc chủng vi khuẩn oxy hóa sắt từ các mẫu quặng thu thập tại Tây Nguyên và xác định loài *Acidithiobacillus* sp. bản địa Tây Nguyên có khả năng bioleaching các mẫu quặng hiệu quả. Từ đó các hạt Au có kích thước μm nằm trong các khoáng vật có thể được giải phóng hoàn toàn hoặc làm lộ Au ra tạo điều kiện dễ nâng cao hiệu suất hòa tách và thu hồi bằng cyanua, giảm chi phí sản xuất và nâng cao hiệu quả bảo vệ môi trường.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu phân lập



Hình 1. Lấy mẫu thực địa tại các mỏ quặng sulfide chứa Au (A, B), quặng thiếc-wolfram chứa Au (C) và quặng antimon chứa Au (D).

Mẫu phục vụ cho việc phân lập vi sinh được thu thập từ các mỏ sulfide-Au Đắk Blo (xã Đắk Blo, huyện Đắk Glei, tỉnh Kon

Tum) và Tà Năng (xã Tà Năng, huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng), mỏ thiếc chứa Au Núi Cao (xã Đạ Sar, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm

Đồng), và mỏ antimon chứa Au Cù Jút (Đắk Đ'Rông, huyện Cù Jút, tỉnh Đắk Nông). Các mẫu phân lập vi sinh được lấy tại các điểm có tiềm năng cao vi sinh vật bản địa như mẫu quặng đã oxy hóa và nguồn nước đọng lâu ngày trong khu vực khai thác hoặc chảy ra từ thân quặng (Hình 1).

Quá trình lấy mẫu thu được 5 mẫu quặng có màu vàng đến vàng nâu, trên bề mặt xuất hiện nhiều dấu hiệu bị oxy hóa và 3 mẫu nước (pH < 3, có những mẫu pH 1) từ nước rỉ trong hầm mỏ, nước thải trong quá trình khai thác quặng đọng lâu ngày và dòng nước chảy ra từ trong mỏ quặng (Hình 1). Mô tả và đặc tính chi tiết của mẫu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Mô tả và đặc tính của các mẫu quặng và nước từ các mỏ quặng tại Tây Nguyên

TT	KHM	Loại quặng	Vị trí	Dạng	Mô tả
1	DBS3	quặng sulfide-Au	xã Đắk Blo, huyện Đắk Glei, tỉnh Kon Tum	Bột ướt	Màu nâu hơi xám, bột mềm
2	DBS10		xã Tà Năng, huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng	Lỏng	Màu nâu đất, có cặn, pH 6,28
3	TNG6			Rắn	Màu nâu, bề mặt xù xì, bị oxy hóa
4	TNG13		xã Đạ Sar, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng	Lỏng	Màu vàng nâu, cặn nâu, pH 1
5	DST6	quặng thiếc chứa Au	xã Đạ Sar, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng	Rắn	Màu nâu xám, bề mặt khô, nhiều chỗ bị oxy hóa màu vàng
6	DST7			Lỏng	Trong suốt, có cặn màu vàng, pH 1
7	CJA2	quặng antimon chứa Au	xã Đắk Đ'Rông, huyện Cù Jút, tỉnh Đắk Nông	Rắn	Màu vàng, bề mặt khô, bị oxy hóa
8	CJA3			Rắn	Màu nâu, có đất bám xung quanh, hơi ẩm

2.1.2. Đặc điểm quặng hóa

Để phục vụ cho việc tuyển chọn các chủng vi sinh phù hợp các loại quặng, mẫu quặng nguyên khai của từng mỏ được thu thập và tiến hành phân tích xác định thành phần một số nguyên tố chính và nguyên tố vết bằng phương pháp ICP-MS và ASS tại Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Địa chất, Tổng cục Địa chất và Khoáng sản. Hàm lượng trung bình của các mẫu quặng từ các mỏ sulfide-Au Đắk Blo và Tà Năng, mỏ thiếc chứa Au Núi Cao, và mỏ antimon chứa Au Cù Jút được trình bày như trong Bảng 2.

2.1.3. Môi trường

Các môi trường sử dụng để phân lập vi sinh vật bao gồm môi trường 9k, 9kFe và 853. Thành phần và hàm lượng của các môi trường như sau:

Môi trường 9k (g/L): K₂HPO₄ 0,5; KCl 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,5; Ca(NO₃)₂ 0,01; (NH₄)₂SO₄ 3,0; H₂O 1000 mL.

9kFe (g/L): K₂HPO₄ 0,5; KCl 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,5; Ca(NO₃)₂ 0,01; (NH₄)₂SO₄ 3,0; FeSO₄ 44,5; H₂O 1000 mL.

853 (g/L): (NH₄)₂SO₄ 3,0g; KCl 0,1g; KH₂PO₄ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; Ca(NO₃)₂ 0,01g; vi lượng 1 mL, H₂O 1000 mL, pH 1,8-2,0.

Bảng 2. Thành phần hóa học trung bình các mẫu quặng từ các mỏ sulfide-Au Đắk Blo và Tà Năng, mỏ thiếc chứa Au Núi Cao, và mỏ antimon chứa Au Cù Jút.

KHM Mỏ	DB401 Đắk Blo	TN401 Tà Năng	NC401 Núi Cao	CJ401 Cù Jút
TiO ₂ (%tl)	0,67	0,29	0,64	0,31
Al ₂ O ₃	15,9	8,13	20,6	8,66
CaO	0,09	1,79	1,58	1,40
T-Fe ₂ O ₃	8,76	7,92	10,3	4,75
MgO	1,37	1,01	3,94	0,71
MnO	0,13	0,08	0,06	0,03
K ₂ O	3,73	1,65	1,39	1,51
P ₂ O ₅	0,01	0,14	0,15	0,04

KHM Mỏ	DB401 Đắc Blo	TN401 Tà Năng	NC401 Núi Cao	CJ401 Cư Jút
S	0,33	1,76	0,65	2,91
Au (ppm)	0,70	3,10	0,40	1,80
Ag	8,40	10,4	2,10	3,70
As	173	18.116	35,0	15.277
B	< 10	< 10	16.499	25,0
Ba	799	282	184	71,5
Bi	258	< 10	< 10	< 10
Cd	< 2	4,40	< 2	4,60
Ce	147	32,6	13,9	10,9
Co	18,2	19,3	< 2	6,10
Cr	51,50	133	74,90	97,4
Cu	4.952	350	311	258
La	97,2	18,2	11,8	8,00
Li	11,7	52,6	47,9	80,5
Mo	< 5	< 5	< 5	6,90
Nb	17,20	< 5	5,70	< 5
Ni	25,9	47,3	37,7	7,40
Pb	962	3.686	94,7	98,6
Sb	82,4	55,6	22,0	30.126
Sc	9,20	5,60	13,70	< 5
Sn	< 10	39,6	11.158	109
Sr	42,0	123	123	82,6
V	74,6	53,7	126	55,5
W	< 20	50,3	< 20	60,1
Y	32,8	12,5	12,6	7,50
Zn	46,6	3.958	100	50,0

2.2. Phương pháp

2.2.1. Làm giàu và phân lập vi sinh vật

Với các mẫu quặng hoặc nước thải, lấy 10 g quặng (đã nghiền nhỏ) hoặc 10 mL nước thải, được làm giàu với 90 mL môi trường 9kFe và lắc trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C. Sau 1 tuần, chuyển 10 mL từ các bình làm giàu trên môi trường 9kFe sang bình chứa 90 mL môi trường 9kFe; quá trình được lặp lại 4 tuần. Mẫu sau khi làm giàu được pha loãng và trải các mẫu trên các đĩa môi trường thạch 9kFe. Quan sát các đĩa phân lập trong 4 – 8 tuần; tách và làm sạch các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch 9kFe (MP, DG, 1959; Jahani và nnk, 2015).

$$\%Fe^{3+} = \frac{TNFe(III) - ĐCFE(III)}{TFE} \times 100\%; \%Fe^{2+} = 100 - \%Fe^{3+}$$

Trong đó: TNFe (III): lượng Fe (III) trong mẫu thí nghiệm (mg/L); ĐCFE (III): lượng Fe (III) trong mẫu đối chứng (mg/L);

2.2.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh học

Hình thái khuẩn lạc được quan sát trên môi trường 9kFe thạch ở 30°C sau 96 giờ (Khan và

2.2.2. Xác định hàm lượng Fe tổng, Fe²⁺, Fe³⁺

Các chủng nghiên cứu được cấy trên môi trường 9kFe lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 72 giờ. Môi trường 9kFe không bổ sung vi sinh vật được sử dụng làm mẫu đối chứng. Hàm lượng sắt trong dung dịch được xác định bằng phương pháp trắc phổ với thuốc thử 1,10-phenanthroline theo TCVN 6177:1996 thuốc thử là phenantrolin (C₁₂H₉N₂.H₂O) hoặc phenantrolin clorua (C₁₂H₉ClN₂.H₂O); còn phenanthroline có công thức là C₁₂H₈N₂. Vậy thuốc thử chính xác là gì ? theo TCVN 6177:1996. Tỷ lệ phần trăm sắt trong dung dịch được xác định theo công thức:

TFE: Fe tổng ban đầu bổ sung vào môi trường

nnk, 2012). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy gồm các yếu tố: nhiệt độ (15, 20, 25, 30, 37,

40 và 55°C), pH (1, 2, 3, 4, 5) và nồng độ NaCl (0,5-6%) đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn được thực hiện trên môi trường 9kFe thạch và trên môi trường 9k thạch có bổ sung 1% S, Na₂S₂O₃ được sử dụng để khảo sát khả năng sử dụng các nguồn S (Khan và *nnk*, 2012). Khả năng chịu nồng độ kim loại nặng được thực hiện bằng khuếch tán đĩa thạch (Monballiu và *nnk*, 2015). Trong mỗi giếng, 100 µL dung dịch kim loại (Pb²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, As²⁺) với nồng độ 1.000 ppm của thành phần kim loại đã được thêm vào. Sau 96 giờ ủ ở 30°C, ảnh hưởng của kim loại đối với sự tăng trưởng được đánh giá một cách trực quan bằng cách đo và so sánh đường kính của các vùng ức chế tăng trưởng.

2.2.4. Phân loại bằng sinh học phân tử

Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn sử dụng kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Gen mã hóa 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F và 1429R có trình tự như sau: 27F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

và 1429R (5' -TACGGCTACCTTGTACGACTT-3').

Trình tự gene 16S rRNA được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) nhờ công cụ BLAST. Cây phả hệ dựa trên trình tự gen 16S rDNA được xây dựng trên phần mềm MEGA7 sử dụng phương pháp neighbor-joining, dựa trên thuật toán Kimura 2 và gamma với giá trị bootstrap 1000 (Felsenstein, 1985). Cây phả hệ được vẽ với *Bacillus aryabhatai* B8W22 (NR_115953.1) là một out-group và được chỉnh sửa bằng phần mềm Treedyn (Chevenet và *nnk*, 2006) và chỉ những giá trị bootstrap cao hơn 0,5 mới được hiển thị trên cây (Felsenstein, 1985).

2.2.5. Đánh giá khả năng hòa tách quặng Au tại Tây Nguyên của chủng tuyển chọn

Xác định tỷ lệ quặng và mật độ vi sinh vật thích hợp được tiến hành trong bình 250 ml chứa 100 ml môi trường 853 có bổ sung 0,02% FeSO₄.7H₂O ở pH 2. Các bình được hấp khử trùng ở 121°C và áp suất 15 psi trong 15 phút. Sau đó, chuẩn bị quặng Au ở các tỉ lệ (1, 5, 10, 20, 30 và 50% w/v) và bổ sung vào mỗi bình môi trường. Mỗi bình thí nghiệm ban đầu được

tiếp 10% (v/v) giống (mật độ ~10⁷ CFU/mL) và nuôi ở nhiệt độ 30°C và 150 vòng/phút trong 14 ngày. Mẫu đối chứng của mỗi tỷ lệ quặng Au là không bổ sung vi sinh vật được lắc cùng điều kiện với mẫu thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành trên cả 03 loại quặng: sulfide chứa Au, thiếc – wolfram chứa Au và antimon chứa Au. Hàm lượng sắt tổng trong dung dịch được xác định theo TCVN6177:1996. Hiệu suất oxy hóa Fe được xác định theo công thức (Mobini, Salehi, 2013):

$$H(\%) = \frac{(TNFe - ĐCFE) \times V}{a \times V \times TFe} \times 100\%$$

Trong đó: TNFe: Fe tổng trong dung dịch của mẫu thí nghiệm (mg/L); ĐCFE: Fe tổng trong dung dịch của mẫu đối chứng (mg/L); V2 kí hiệu V trong công thức trên là giống hay khác nhau? nếu giống thì có thể bỏ đi?: Thể tích phản ứng (L); a: Tỉ lệ quặng (%); TFe: Fe tổng trong mẫu quặng (%)

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Làm giàu và phân lập vi khuẩn oxy hóa sắt

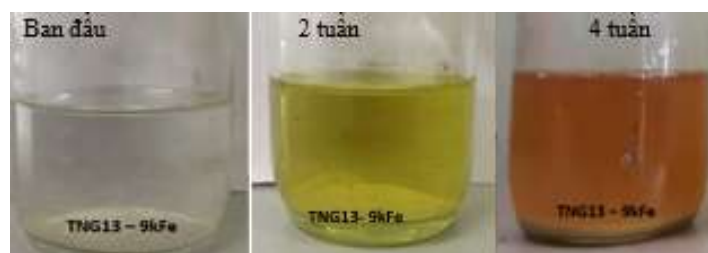
Các mẫu quặng Au được tiến hành làm giàu nhóm vi sinh vật hiếu khí có khả năng oxy hoá sắt từ các mẫu quặng, nước thải tại các mỏ trên môi trường 9kFe. Sau 1 tuần, chuyển 10 mL từ các bình làm giàu sang bình chứa 90 mL môi trường tương ứng; quá trình được lặp lại 4 tuần (Hình 2). Sau 4 tuần, các mẫu làm giàu trên 9kFe chuyển sang màu vàng cam chứng tỏ có sự hiện diện của các chủng vi khuẩn oxy hóa Fe. Các mẫu sau 4 tuần làm giàu vi khuẩn oxy hóa sắt được pha loãng và trải các mẫu trên các đĩa môi trường thạch 9kFe.

Sau 4 - 8 tuần quan sát các đĩa phân lập; tách và làm sạch các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch 9kFe (Hình 3). Các chủng sạch được giữ giống trên môi trường 9kFe có bổ sung glycerol với nồng độ cuối cùng khoảng 30- 35% và được bảo quản ở -69°C. Từ tổng số 8 mẫu quặng, phân lập trên môi trường 9kFe đã tách được tổng số 14 chủng vi khuẩn oxy hóa sắt, trong đó có quặng sulfide chứa Au phân lập được 10 chủng, quặng thiếc-wolfram chứa Au được 2 chủng và quặng antimon chứa Au được 2 chủng.

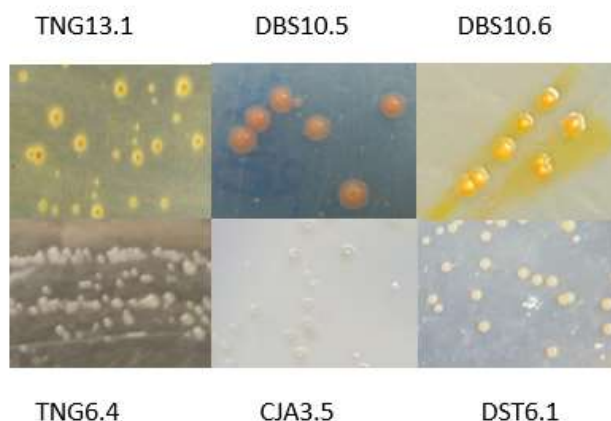
Số lượng chủng phân lập trong nghiên cứu đa

dạng hơn các nghiên cứu đã công bố. Nghiên cứu của Deepak và *nnk* (2014) chỉ phát hiện một dạng khuẩn lạc duy nhất trên môi trường 9kFe từ các mảnh sắt bị oxy hóa. Tương tự, Xiao và *nnk* (2013) cũng chỉ phân lập được 1 chủng duy nhất trên môi trường 9kFe từ mẫu nước thải thu thập từ mỏ than tại tỉnh Shan xi, Trung Quốc. Sự khác nhau về số lượng và độ

đa dạng của các chủng phân lập có thể được giải thích do sự khác nhau về tính chất mẫu (rắn/ lỏng; loại quặng), về điều kiện tự nhiên (độ cao, độ ẩm, khí hậu). Ngoài ra, quy trình lấy mẫu, xử lý mẫu và làm giàu các chủng vi sinh vật bản địa là bước quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến số lượng và thành phần các nhóm chủng phân lập được.



Hình 2. Mẫu làm giàu trên môi trường 9kFe sau 2 và 4 tuần.



Hình 3. Một số khuẩn lạc đặc trưng của các chủng phân lập được

3.2. Sàng lọc chủng vi khuẩn oxy hóa sắt

Để sàng lọc khả năng oxy hóa sắt của mỗi chủng trên môi trường 9kFe, quan sát sự chuyển màu từ không màu thành màu vàng nhạt đến vàng đậm và xác định tỉ lệ Fe^{2+} bị chuyển hóa thành Fe^{3+} bằng phương pháp 1,10-phenanthroline.

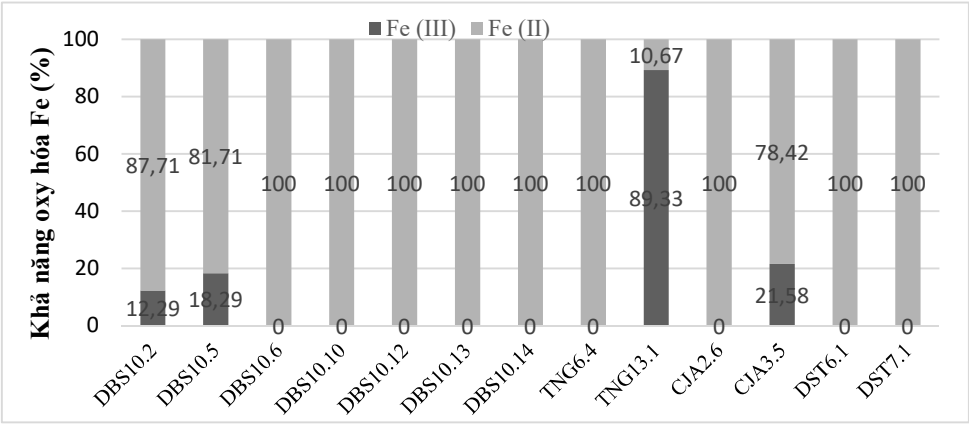
Quan sát khả năng oxy hóa Fe qua sự thay đổi màu sắc môi trường cho thấy: có 4 chủng làm môi trường chuyển sang màu vàng nhạt đến vàng đậm so với đối chứng. Chủng TNG13.1 cho hoạt tính cao nhất (89,33%); các

chủng DBS10.2, DBS10.5, CJA3.5 thể hiện hoạt tính thấp hơn, lần lượt là 12,29%; 18,29%; 21,58%. Các chủng còn lại có thể sinh trưởng trên môi trường 9kFe nhưng không có hoạt tính oxy hóa sắt. Có thể lý giải điều này do một số chủng vi khuẩn khi gặp điều kiện bất lợi (ở đây là pH acid) sẽ hình thành dạng bào tử để duy trì sự sống lâu dài. Vì vậy, khi cấy trên môi trường 9kFe thạch những bào tử này vẫn có khả năng nảy mầm và hình thành khuẩn lạc. Chủng TNG13.1 có khả năng oxy hóa Fe cao nhất (gấp 4 – 5 lần so với các chủng DBS10.2, DBS10.5, CJA3.5)

nên được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh tiềm năng ứng dụng của các chủng vi khuẩn oxy hóa sắt trong công nghệ hòa tách quặng sử dụng vi sinh vật. Chủng *A. ferrooxidans* XJF-8 được phân lập từ nước thải tại mỏ than Shan xi có khả năng oxy hóa

sắt đến 100% sau 60 giờ ủ (Xiao và nnk, 2013). Nghiên cứu của Mobini và Salehi (2013) cũng chỉ ra khả năng oxy hòa sắt cao của chủng *A. ferrooxidans* FOCB và *Leptosprillum ferrooxidans* CLLB. Sử dụng vi sinh vật hòa tách quặng giúp tăng hiệu suất quá trình thu hồi vàng lên từ 40 – 60% so với không sử dụng vi sinh vật (Beolchini và nnk, 2005).

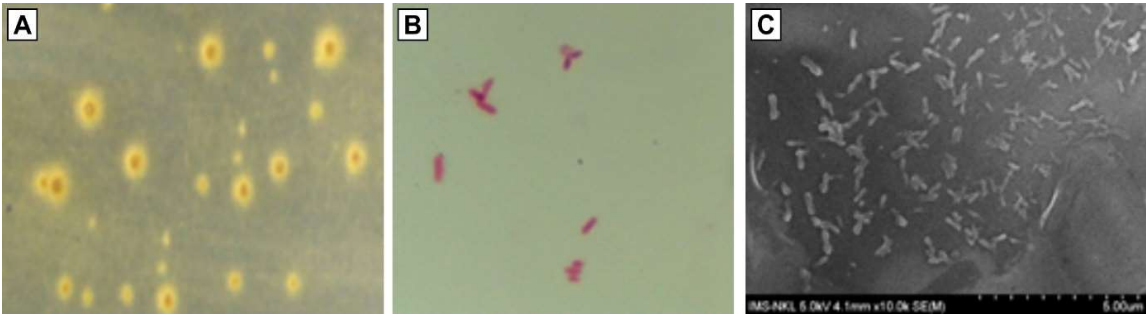


Hình 4. Khả năng oxy hóa Fe của các chủng vi khuẩn

3.3. Nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý-sinh hóa của chủng TNG13.1

Chủng TNG13.1 là vi khuẩn hiếu khí, Gram âm, catalase dương tính. Trên môi trường thạch đĩa 9KFe: Khuẩn lạc của chủng TNG13.1 có dạng hình tròn, màu vàng, có tâm vàng đậm, khuẩn lạc hơi lồi và khô; tế bào hình que và không có khả năng sinh bào tử (Hình 5).

Chủng TNG13.1 thuộc nhóm vi khuẩn hóa tự dưỡng, sử dụng năng lượng từ quá trình oxy hóa các khoáng chất chứa sắt và lưu huỳnh để phát triển. Nó sinh trưởng được ở độ pH thấp cực trị (pH 1-2) và cố định cả cacbon và nitơ từ khí quyển. Chủng *A. ferrooxidans* TNG13.1 sinh trưởng được trong khoảng pH từ 1,5-4,0; tối ưu ở pH 2,0; dải nhiệt từ 20 - 45°C, tối ưu ở 30°C (Bảng 3).



Hình 5. Hình thái khuẩn lạc (A), nhuộm Gram (B) và tế bào trên kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 10.000 lần (C) của chủng *A. ferrooxidans* TNG13.1.

Bảng 3. So sánh đặc điểm phân loại của chủng TNG13.1 với các chủng *A. ferrooxidans* tham chiếu theo khóa phân loại của Bergey (Garrity và nnk, 2005).

Đặc điểm	TNG13.1	<i>A. ferrooxidans</i> *	<i>A. thiooxidans</i> *
Hình thái, tế bào	Hình que	Hình que	Hình que

Đặc điểm	TNG13.1	<i>A. ferrooxidans</i> *	<i>A. thiooxidans</i> *
Nhuộm Gram	(-)	(-)	(-)
Đặc điểm sinh lý			
Nồng độ NaCl (%)	0 - 2	nd	nd
pH	1,5 - 3,0	2,5	2,0 - 3,0
Dải nhiệt độ (°C)	20 - 50	30 - 35	28 - 30
Khả năng sử dụng các hợp chất Fe, S			
Sulfur	+	+	+
Thiosulfate	+	+	+
Ferrous iron	+	+	-
Khả năng chịu kim loại nặng			
Arsenate (1000 ppm)	+	+	+
Nickel (1000 ppm)	+	+	+
Zinc (1000 ppm)	+	+	+
Copper (1000 ppm)	+	+	+
Lead (1000 ppm)	+	+	+

Ghi chú: nd - không có số liệu

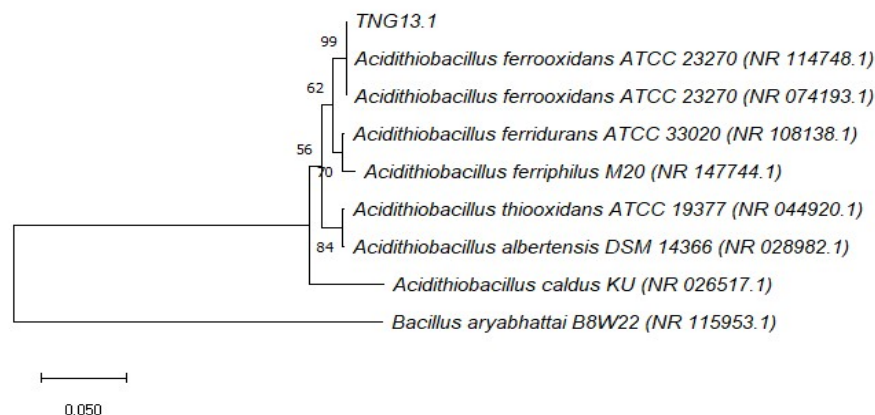
Các vi khuẩn oxy hóa sắt tự dưỡng khác đã được phân lập cho đến nay là *Gallionella ferruginea*, *Metallogenium* sp. và *Leptospirillum ferrooxidans*, chúng rất khác biệt về mặt hình thái và đặc điểm sinh lý sinh hóa (Deepak và nnk, 2014).

So sánh các đặc điểm hình thái, tế bào và sinh lý sinh hóa của chủng TNG13.1 với chi *Acidithiobacillus* và các chủng tham chiếu *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. albertensis* ta có thể khẳng định chủng TNG13.1 thuộc chi *Acidithiobacillus* (Garrrity và nnk, 2005). Ngoài khả năng oxy hóa sắt cao, chủng TNG13.1 còn lấy năng lượng để tăng trưởng bằng cách oxy hóa lưu huỳnh và thiosulfate. Hơn nữa, chủng TNG13.1 có khả năng chịu được trong môi trường chứa kim loại nặng như asenat, niken, kẽm và đồng. Những đặc điểm

sinh học này cho thấy chủng TNG13.1 phù hợp với điều kiện sinh trưởng và phát triển tại các mỏ quặng nghiên cứu và thành phần các loại quặng.

3.4. Phân loại chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng sinh học phân tử

Dựa trên trình tự gen 16S rRNA của chủng TNG13.1 và so sánh trên cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy, gen mã hóa 16S rRNA của chủng TNG13.1 có độ tương đồng 99,87% so với gen tương ứng của loài vi khuẩn *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Kết hợp với đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân loại dựa trên mức độ tương đồng trình tự nucleotide của gen mã hóa 16S rRNA, chủng TNG13.1 được phân loại thuộc loài *A. ferrooxidans* và đặt tên là *A. ferrooxidans* TNG13.1 với mã số truy cập trên cơ sở dữ liệu GenBank là MW713141.



Hình 6. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng TNG13.1 với các chủng đại diện trên GenBank qua phân tích trình tự gen 16S rDNA. Cây phả hệ được vẽ dựa trên thuật toán Kimura 2 và

gamma với giá trị bootstrap 1000 và chỉ những giá trị bootstrap cao hơn 0,5 mới được hiển thị trên cây; *Bacillus aryabhattai* B8W22 (NR_115953.1) là một out-group.

Nghiên cứu của Pachvlvska (2003) cho thấy *A. ferrooxidans* có khả năng oxy hóa sắt tương đối cao so với *Leptosprillum ferrooxidans*. Chủng *A. ferrooxidans* FOEB phân lập tại mỏ vàng Iran có thể làm giảm nồng độ Fe^{2+} từ 0,64 xuống còn 0,004 mg/L (Mobini, Salehi, 2013). Loài *A. ferrooxidans* là được công bố là an toàn đối với động vật, con người và môi trường, có đặc tính oxy hóa sắt và lưu huỳnh, có khả năng sinh trưởng trong môi trường chứa nhiều kim loại nặng; ứng dụng để hòa tách quặng nhằm nâng cao hiệu quả kinh tế và bảo vệ tài nguyên, môi trường trong khai thác khoáng sản.

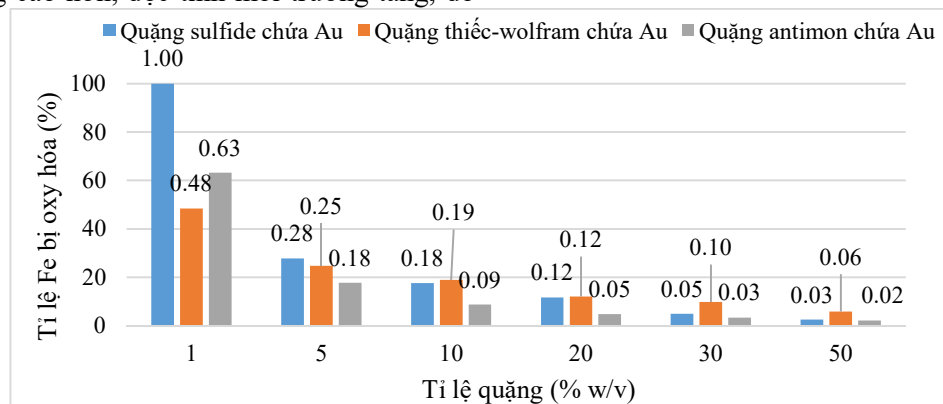
3.5. Đánh giá khả năng hòa tách quặng Au tại Tây Nguyên của chủng TNG13.1

Trong các thí nghiệm hòa tách quặng, nhiều tỉ lệ quặng khác nhau đã được thử nghiệm để xác định sự thay đổi mật độ ảnh hưởng như thế nào đến hiệu quả hòa tách. Trong nghiên cứu này, để khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ quặng đến quá trình tách lọc sinh học, tiến hành thí nghiệm với 1, 5, 10, 20, 30 và 50% (w/v) trên 3 loại quặng: sulfide chứa Au, thiếc wolfram chứa Au và antimon chứa Au.

Tỷ lệ tinh quặng/mật độ vi khuẩn dạng đơn chủng được trình bày trong hình 7. Kết quả quan sát cho thấy rằng tăng tỷ lệ quặng dẫn đến giảm khả năng oxy hóa Fe, S. Ở tỷ lệ quặng cao hơn, độc tính môi trường tăng, do

đó hoạt động của vi khuẩn làm sao? (Natarajan, Ting, 2014). Pradhan và Kumar (2012) cũng báo cáo rằng việc tăng tỷ lệ quặng làm cho quá trình oxy hóa kim loại giảm.

Trên cả ba loại quặng, ở tỉ lệ quặng 1% hiệu suất hòa tách Fe cao nhất: quặng sulfide chứa Au đạt 100%, quặng thiếc wolfram chứa Au đạt 48,44%, quặng antimon chứa Au đạt 63,16%. Với tỉ lệ 5, 10, 20, 30 và 50%: khi tỉ lệ quặng tăng dần hiệu suất hòa tách Fe giảm dần. Tỉ lệ quặng có thể ảnh hưởng đến tốc độ hòa tách kim loại bằng cách hạn chế hàm lượng oxy hòa tan trong dung dịch hoặc trong bã (Amankwah và nnk, 2005). Ngoài ra, tỉ lệ quặng cao hơn có thể hạn chế quá trình hòa tách sinh học bởi kim loại nặng có trong quặng bị rửa trôi ức chế sự phát triển của vi sinh vật (Horiike, Yamashita, 2015; Jeremic và nnk, 2016). Những kim loại này có thể gây độc cho vi sinh vật, mặc dù một số vi sinh vật như *Penicillium* spp. có khả năng chịu các kim loại nặng này cao hơn và có thể hòa tách kim loại ở tỉ lệ quặng cao hơn (Bayat và nnk, 2011; Hewedy và nnk, 2013; Amin và nnk, 2014). Ở tỷ lệ quặng cao hơn, độc tính môi trường tăng, do đó hoạt động của vi khuẩn giảm (Natarajan, Ting, 2014). Pradhan và Kumar (2012) cũng báo cáo rằng việc tăng tỷ lệ quặng làm cho quá trình thu hồi kim loại giảm.



Hình 7. Ảnh hưởng tỷ lệ quặng đến hiệu suất quá trình hòa tách quặng sulfide chứa Au sau 2 tuần.

Trên cả ba loại quặng, ở tỉ lệ quặng 1% hiệu suất hòa tách Fe cao nhất: quặng sulfide chứa Au đạt 100%, quặng thiếc wolfram chứa Au đạt 48,44%, quặng antimon chứa Au đạt

63,16%. Với tỉ lệ 5, 10, 20, 30 và 50%: khi tỉ lệ quặng tăng dần hiệu suất hòa tách Fe giảm dần. Tỉ lệ quặng có thể ảnh hưởng đến tốc độ hòa tách kim loại bằng cách hạn chế hàm

lượng oxy hòa tan trong dung dịch hoặc trong bã (Amankwah và nnk, 2005). Ngoài ra, tỉ lệ quặng cao hơn có thể hạn chế quá trình hòa tách sinh học bởi kim loại nặng có trong quặng bị rửa trôi ức chế sự phát triển của vi sinh vật (Horiike, Yamashita, 2015; Jeremic và nnk, 2016). Những kim loại này có thể gây độc cho vi sinh vật, mặc dù một số vi sinh vật như *Penicillium* spp. có khả năng chịu các kim loại nặng này cao hơn và có thể hòa tách kim loại ở tỉ lệ quặng cao hơn (Bayat và nnk, 2011; Hewedy và nnk, 2013; Amin và nnk, 2014). Ở tỷ lệ quặng cao hơn, độc tính môi trường tăng, do đó hoạt động của vi khuẩn giảm (Natarajan, Ting, 2014). Pradhan và Kumar (2012) cũng báo cáo rằng việc tăng tỷ lệ quặng làm cho quá trình thu hồi kim loại giảm.

Một số nghiên cứu đề xuất sử dụng tỉ lệ quặng thấp hơn (2-5%) để có được tỷ lệ hiệu suất hòa tách tốt hơn (Tipre, Dave, 2004; Kiani và nnk, 2014). (Olubambi và nnk, 2008) đã nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ quặng 5%, 10%, 15% và 20% (w/v) đến quá trình hòa tách sinh học của quặng sulfide. Trong quá trình hòa tách Zn, người ta nhận thấy rằng, tỉ lệ quặng càng nhỏ hiệu suất khai thác tổng kim loại càng cao: đối với tỉ lệ quặng 5% (w/v) hiệu suất là 83,1% và với tỉ lệ 20% (w/v), hiệu suất chỉ đạt 45,0%. Tipre và Dave (2004) nhận thấy rằng việc tăng trọng lượng của mẫu trong dung dịch dẫn đến hoạt động của vi khuẩn thấp hơn. Một môi trường nuôi cấy hỗn hợp vi sinh vật (bao gồm *A. ferrooxidans*) đã được áp dụng và người ta xác định rằng việc tăng tỉ lệ quặng lên 5% (w/v) làm giảm độ hòa tan của Zn và Cu đi 0,2 g/L mỗi ngày.

Mặc dù theo khảo sát hiệu suất hòa tách Fe cao nhất tại tỉ lệ quặng 1% nhưng đây là tỉ lệ chỉ áp dụng trong phòng thí nghiệm, không phù hợp với quy mô pilot và ngoài thực địa. Vì vậy để phù hợp với hệ thống thiết bị và quy mô thực địa, có thể nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ quặng cao hơn (30%) cho các quy mô 5kg/mẻ và 50kg/mẻ. Với tỉ lệ này, dự kiến nghiên cứu tăng mật độ vi sinh và tăng thời gian ủ lên 3 - 6 tuần để tăng hiệu suất hòa tách Fe.

4. Kết luận

Từ 8 mẫu quặng thu thập đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn và tuyển chọn được chủng TNG13.1 có khả năng oxy hóa Fe cao

(89,33%). Chủng TNG13.1 là vi khuẩn hiếu khí, Gram âm, không có khả năng tạo bào tử, sử dụng năng lượng từ quá trình oxy hóa các hợp chất chứa sắt và lưu huỳnh để phát triển. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rDNA cho thấy chủng TNG13.1 thuộc loài *Acidithiobacillus ferrooxidans*; được đăng kí với mã số GenBank MW713141. Thử nghiệm khả năng oxy hóa Fe trên quặng sulfide chứa Au, quặng thiếc-wolfram chứa Au và quặng antimon chứa Au cho thấy hiệu quả xử lý tốt nhất tại tỉ lệ quặng 1% (w/v) với hiệu suất lần lượt là 100%; 48,44% và 63,13%.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài Mã số: TN18/C11 thuộc Chương trình Khoa học và công nghệ phục vụ phát triển kinh tế - xã hội Tây Nguyên trong liên kết vùng và hội nhập quốc tế, Mã số: KHCN-TN/16-20; hỗ trợ máy móc thiết bị Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật-Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (www.vccm.vast.vn).

Văn liệu

- Amankwah R, Yen WT and Ramsay J, 2005.** A two-stage bacterial pretreatment process for double refractory gold ores. *Minerals engineering* 18(1): 103-108.
- Amin MM, Elaassy IE, El-Feky MG, Sallam ASM, et al. 2014.** Effect of mineral constituents in the bioleaching of uranium from uraniferous sedimentary rock samples, Southwestern Sinai, Egypt. *Journal of Environmental Radioactivity* 134: 76-82.
- Bayat O, Arslan V and Bayat B, 2011.** Use of *Aspergillus niger* in the bioleaching of colemanite for the production of boric acid. *Electronic Journal of Biotechnology* 14(3): 7-7.
- Beolchini F, Pagnanelli F, Ubaldini S, Massidda R, et al. 2005.** Biooxidation of gold-bearing sulphide ores: Gold recovery by two leaching treatments. *Proceeding of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium, Section 2*, 219.
- Chevenet F, Brun C, Bañuls AL, Jacq B, et al. 2006.** TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics* 7(1): 1-9.
- Deepak S, Patil A and Matele A, 2014.** Isolation of a novel iron oxidizing bacteria from the iron scraps of a steel industry.
- Felsenstein J, 1985.** Confidence limits on

phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.

Garrity GM, Bell JA and Lilburn T, 2005. Acidithiobacillales ord. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, Springer: 60-63.

Hewedy MA, Rushdy AA and Kamal NM, 2013. Bioleaching of rare earth elements and uranium from Sinai soil, Egypt using actinomycetes. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 53(1): 909-917.

Horiike T and Yamashita M, 2015. A new fungal isolate, *Penidiella* sp. strain T9, accumulates the rare earth element dysprosium. *Applied Environmental Microbiology* 81(9): 3062-3068.

Jahani S, Fatemi F, Firozeshahi M and Zolfaghari M, 2015. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain FJS from Ramsar, Iran. *Electronic Journal of Biology* 11(4): 138-146.

Jeremic S, Beškoski VP, Djokic L, Vasiljevic B, et al. 2016. Interactions of the metal tolerant heterotrophic microorganisms and iron oxidizing autotrophic bacteria from sulphidic mine environment during bioleaching experiments. *Journal of Environmental Management* 172: 151-161.

Johnson DB, 2018. The evolution, current status, and future prospects of using biotechnologies in the mineral extraction and metal recovery sectors. *Minerals* 8(8): 343.

Khachatryan A, Vardanyan N, Vardanyan A, Zhang R, et al. 2021. The Effect of Metal Ions on the Growth and Ferrous Iron Oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* CC Isolated from Armenia Mine Sites. *Metals* 11(3): 425.

Khan S, Haq F, Hasan F, Saeed K, et al. 2012. Growth and biochemical activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* collected from black shale. *Journal of Microbiology Research* 2(4): 78-83.

Kiani M, Ahmadi A and Zilouei H, 2014. Biological removal of sulphur and ash from fine-grained high pyritic sulphur coals using a mixed culture of mesophilic microorganisms. *Fuel* 131:

89-95.

Liao R, Yu SC, Wu BQ, Zhao CX, et al. 2020. Sulfide mineral bioleaching: Understanding of microbe-chemistry assisted hydrometallurgy technology and acid mine drainage environment protection. *Journal of Central South University* 27(5): 1367-1372.

Mobini M and Salehi M, 2013. Facilitate of Gold Extracting From Mouteh Refractory Gold Ore Using Indigenous Bacteria. *Int. J. Bio-Inorg. Hybd. Nanomat* 2(2): 365-371.

Monballiu A, Cardon N, Tri Nguyen M, Cornelly C, et al. 2015. Tolerance of chemoorganotrophic bioleaching microorganisms to heavy metal and alkaline stresses. *Bioinorganic Chemistry Applications* 2015.

MP S and DG L, 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(5): 642-647.

Natarajan G and Ting YP, 2014. Pretreatment of e-waste and mutation of alkali-tolerant cyanogenic bacteria promote gold biorecovery. *Bioresource Technology* 152: 80-85.

Olubambi P, Ndlovu S, Potgieter J and Borode J, 2008. Role of ore mineralogy in optimizing conditions for bioleaching low-grade complex sulphide ores. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18(5): 1234-1246.

Pradhan JK and Kumar S, 2012. Metals bioleaching from electronic waste by *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonads* sp. *Waste Management Research* 30(11): 1151-1159.

Schippers A, Hedrich S, Vasters J, Drobe M, et al. 2013. Biomining: metal recovery from ores with microorganisms. *Geobiotechnology I*: 1-47.

Tipre D and Dave S, 2004. Bioleaching process for Cu-Pb-Zn bulk concentrate at high pulp density. *Hydrometallurgy* 75(1-4): 37-43.

Xiao JF, Qin SY, Huang P, Guo LN, et al. 2013. Isolation and Characterization of a Strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Advanced Materials Research, Trans Tech Publ.*

Summary

Isolation and screening iron oxidizing bacteria from gold ores of Tay Nguyen, Vietnam

Vũ Thị Hạnh Nguyễn^{1,2}, Phạm Ngọc Cần^{2,3}, Bùi Thị Liên¹,
Quách Ngọc Tùng^{1,2}, Trần Tuấn Anh^{2,3}, Phí Quyết Tiến^{1,2*}

At present, gold extraction technology using microorganisms is increasingly interested in research and development with the aim of ensuring high gold recovery efficiency and reducing environmental pollution. This study aims to select indigenous iron-oxidizing bacteria from ore samples collected at gold ores in the Central Highlands (Vietnam) for the use in bioleaching ores. Fourteen strains were isolated from eight ore samples and TNG13.1 strain was selected with high iron-oxidizing ability (89.33%). The strain TNG13.1 is an aerobic, Gram-negative, and catalase positive bacteria; colonies are round, convex and dry, yellow; rod-shaped cells, incapable of forming spores, capable of tolerating acidic pH conditions, and heavy metals. The strain TNG13.1 belongs to the chemolithoautotrophic chemical group, which uses energy from the oxidation of iron and sulfur compounds to grow; grows in the range of pH from 1.5 to 3.0, in temperature range 20 - 50°C. Results of 16S rRNA gene sequence analysis showed that strain TNG13.1 belonged to *Acidithiobacillus ferrooxidans* and named it *A. ferrooxidans* TNG13.1 (GenBank Accession numbers MW713141). Bioleaching on gold-bearing sulfide ore, gold-bearing tin-wolfram ore and gold-bearing antimony ore showed the best treatment efficiency at 1% (w/v) pulp density with efficiency of 100%; 48.44% and 63.13%, respectively. Initial positive results show the potential of the application of *A. ferrooxidans* TNG13.1 strain in the bioleaching of gold ores in Vietnam; contribute to improving the efficiency of gold mining and minimizing environmental pollution.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bioleaching of gold-bearing ores, gold-bearing antimony ore, gold-bearing sulfide ore, gold-bearing tin-wolfram ore.