

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՂՈՍԿ

ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ ԱՆՆԱ ՄԵՐԺԻԿԻ

**ԾԱՆՐ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ՀԱՆԴԵՊ ԿԱՅՈՒՆ ՆՈՐ ՔԵՄՈԼԻԹՈՏՐՈՑ
ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ, ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ԵՎ ԿԻՐԱՌՄԱՆ
ՀԵՌԱՆԿԱՐՆԵՐԸ ԿԵՆՍԱՏԱՐԳԱԼՈՒԾՄԱՆ ԳՈՐԾՆԹԱՑՆԵՐՈՒՄ**

**Գ.00.07 «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության**

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան - 2023

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ХАЧАТРЯН АННА СЕРЖИКОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
УСТОЙЧИВЫХ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В
ПРОЦЕССАХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 - «Микробиология. биотехнология»**

Ереван - 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ Կ.գ.դ.Նարինե Մերյոժայի Վարդանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հրաչյա Գարեգինի Հովհաննիսյան
Կ.գ.թ. Պետրոս Վաղարշակի Թոգալայկյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2023 թ. հունիսի 23-ին ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի կիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654180:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Մեղմագիրն առաքված է 2023թ. մայիսի 12-ին:

018 մասնագիտական խորհրդի

գիտական քարտուղար, Կ.գ.թ.՝

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета НИЦ «Армбиотехнология» НАН РА

Научный руководитель: д.б.н. Нарине Серезаевна Варданян

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор Грачя Гарегинович Оганесян

к.б.н. Петрос Вагаршакович Тозалакян

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 23 июня 2023 г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НИЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410) 654180.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 12 мая 2023г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ՆԵՐԱՄՈՒԹՅՈՒՆ

Արդիականությունը: Էքստրեմոֆիլ մանրէների ուսումնասիրությունը և դրանց հիման վրա նոր կենսատեխնոլոգիաների մշակումը համարվում է արդի գիտության հեռանկարային ուղղություններից մեկը: Այդ նպատակով անհրաժեշտ է դրանց համալիր գիտական հետազոտության իրականացում՝ տեսական և գործնական-կիրառական ասպեկտներով:

Մուլֆիդային ապարների տարրալուծումը բակտերիաների կողմից իրականանում է հիմնականում անուղղակի կոնտակտային մեխանիզմով՝ կենսածին Fe^{3+} -ի իոններով, և մանրէների դերը այս գործընթացում հանգեցվում է Fe^{3+} -ի ռեգեներացիային (Bosecker, 1997; Rawlings, 2002): Fe^{3+} -ի ռեգեներացիայի և սուլֆիդային հանքաքարերի կենսաքայքայման գործընթացում ներագրավված առավել կարևոր բակտերիաներն են՝ *Acidithiobacillus ferrooxidans*-ը, *Leptospirillum ferrooxidans*-ը, *Leptospirillum ferriphilum*-ը, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*-ը, *Acidimicrobium ferrooxidans*-ը և *Acidithiobacillus ferrivorans*-ը: Սակայն, վերջին տարիներին *Leptospirillum* ցեղի տեսակներն ավելի ու ավելի են գրավում հետազոտողների ուշադրությունը՝ որպես երկաթի այլընտրանքային օքսիդիչներ: *Leptospirillum* ցեղի բակտերիաները հանդիսանում են ամենաներկայացուցչական պրոկարիոտները ոչ միայն հանքավայրերի էքստրեմալ էկոխորշերում (García-Moyano et al., 2007; López-Archilla et al., 2001), այլև մետաղների կենսատարրալուծման (ԿՏ) արտադրական համակարգերում (Johnson and Hallberg, 2003; González-Toril et al., 2003; Tyson et al., 2005): Հետաքրքրությունը *Leptospirillum* sp. բակտերիաների նկատմամբ բացատրվում է այն հանգամանքով, որ դրանք ավելի դիմացկուն են ցածր pH-ի, բարձր ջերմաստիճանների նկատմամբ և օժտված են ավելի բարձր երկաթ օքսիդացնող ակտիվությամբ (Rawlings, 2002; 2005; Vardanyan et al., 2015): Այս առանձնահատկությունների շնորհիվ *Leptospirillum* ցեղի տեսակները դիտարկվում են որպես մեծ ներուժ ունեցող հեռանկարային թեկնածուներ՝ նոր կենսահիդրոմետալուրգիական տեխնոլոգիաների մշակման համար, որոնց հիմքում ընկած է Fe^{2+} -ի կենսաբանական օքսիդացումը: Բակտերիաների թուլերանսությունը Fe^{2+} և Fe^{3+} իոնների բարձր կոնցենտրացիաների նկատմամբ շատ կարևոր է անուղղակի չանային տարրալուծման տեխնոլոգիաներում կիրառելու համար, քանի որ հենց այդ իոններն են որոշում տարրալուծման գործընթացի ինտենսիվությունը (Lizama and Suzuki, 1989):

Մետաղները կարևոր դեր են խաղում բջջի կենսաքիմիական գործընթացներում, հանդես են գալիս որպես կատալիզատորներ, ֆերմենտների կոֆերմենտներ, մասնակցում են օքսիդավերականգնման գործընթացներին, կայունացնում սպիտակուցների կառուցվածքը և այլն (Bruins et al., 2000): Սակայն ֆիզիոլոգիական նորմայից բարձր քանակությունների դեպքում կուտակվելով բջջում մետաղները բացասաբար են անդրադառնում բջջի կենսագործունեության վրա: Դրանք կարող են կապվել անիոնների հետ՝ բոլկադայի ենթարկելով ֆերմենտների գործառնական խմբերը, ճնշել փոխադրիչ համակարգերը, դուրս մղել հիմնական մետաղները դրանց կապվածության տեղերից, խախտել բջջաթաղանթի ամբողջականությունը և այլն (Nies,

1999): Հարկ է նշել, որ կենսաթաղանթի ձևով աճելիս զգալի բարձրանում է մանրէների կայունությունը մետաղների նկատմամբ (Costerton et al., 1995; Harneit et al., 2006; Sand, Gehrke, 2006; Sutherland, 2001): Կենսաթաղանթի բաղադրիչների վրա, ինչպիսիք են արտաբջջային պոլիմերային միացությունները, բջջաթաղանթը և բջջապատը, կենսաստորբջիայի շնորհիվ մեկուսացվում են մետաղական իոնները և կանխվում է դրանց միջամտությունը նյութափոխանակության զգայուն գործընթացներին: Մետաղների իոնների նկատմամբ տարրալուծող բակտերիաների կայունության և աղապատացվելու ունակության ուսումնասիրությունը մեծ գիտական և գործնական հետաքրքրություն է ներկայացնում: Առանձնակի կարևորություն ունի բակտերիաների կայունությունը պղնձի նկատմամբ՝ կենսատեխնոլոգիական գործընթացներում դրանց կիրառման տեսանկյունից, որտեղ պղնձի կոնցենտրացիան կարող է գերազանցել 100 մՄ-ը (Watling, 2006):

Ներկայումս ամբողջ աշխարհում պղնձի աղքատ պորֆիրային հանքաքարերը հանդիսանում են պղնձի հիմնականում աղբյուրը և շարունակում են մնալ հանքարդյունահանման գլխավոր թիրախներից մեկը (Acevedo, 2002; Holliday and Cooke, 2007, Petersen, 2016): Պղնձի պորֆիրային հանքաքարերը սովորաբար պարունակում են խալկոպիրիտ, պիրիտ, մոլիբդեն, ոսկի և այլ արժեքավոր ուղեկցող բաղադրիչներ (Sinclair, 2007; Sillitoe, 2010): Աղքատ սուլֆիդային հանքաքարերից պղնձի և այլ մետաղների կորզումը մեծացնելու նպատակով առաջարկվել են բազմազան մեթոդներ, սակայն կենսաստորբալուծումը (ԿՏ) համարվում է առավել արդյունավետ և շրջապատող միջավայրի համար անվտանգ եղանակ (Yin et al., 2018):

Համեմատական ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ պղնձի ԿՏ կարող է առավելագույնի հասել *At. ferrooxidans*-ից, *At. thiooxidans*-ից և *L. ferrooxidans*-ից կազմված համակեցության կիրառման դեպքում (Pogliani et al., 2005; Yang et al., 2013; Hedrich et al., 2016; Vardanyan et al., 2018; Wang et al., 2014): Այս տեսակետից շատ կարևորվում է բակտերիային համակեցությունների ստեղծումը և ուսումնասիրումը՝ որպես պղնձի առավել արդյունավետ կենսաստորբալուծիչներ:

Նպատակը և խնդիրները: Հետազոտության նպատակն է՝ ՀՀ և ԼՂ մետաղական հանքավայրերի բնական բիոտոպերից և ԿՏ փորձարարական համակարգերից մեկուսացնել նոր քեմոլիթոտոքս բակտերիաներ (ՔԲ), բնութագրել և նույնականացնել առավել հեռանկարային շտամները, ուսումնասիրել նրանց կայունությունը մետաղների իոնների և ապարաիյուսի բարձր խտությունների նկատմամբ, պղնձի ԿՏ հնարավորությունները պորֆիրային հանքաքարից, պարզաբանել հանքաքարի տարրալուծման մեխանիզմը ապարագիտական հետազոտությունների հիման վրա:

Ելնելով հետազոտության նպատակից՝ հեղինակն իր առջև դրել է հետևյալ խնդիրները.

- ՀՀ և ԼՂ պղնձային հանքավայրերի բիոտոպերից, ինչպես նաև տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացնել երկաթ/ծծումբ օքսիդացնող ՔԲ նոր ակտիվ, թթվա- և մետաղակայուն շտամներ,

- նույնականացնել մեկուսացված շտամները՝ մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական և մոլեկուլային կենսաբանական հատկանիշների ուսումնասիրության հիման վրա,
- ուսումնասիրել մեկուսացված շտամների կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման կինետիկական կախված սուբստրատի և Fe^{3+} -ի խտությունից,
- ուսումնասիրել մեկուսացված շտամների կայունությունը Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} և Mo^{6+} իոնների նկատմամբ, պարզել դրանց նվազագույն ճնշող խտությունները (ՆՃԽ),
- մեկուսացված առավել ակտիվ և կայուն շտամներն ու նրանց համակեցությունները փորձարկել սուլֆիդային միներալների ԿՏ նպատակով,
- ուսումնասիրել շտամների ադիեզիայի և կենսաթաղանթ առաջացնելու ունակությունները, արտաբջջային պոլիմերային միացությունները (ԱՊՄ)՝ տարբեր սուբստրատների դեպքում,
- ուսումնասիրել Քաջարանի պորֆիրային պղնձային հանքաքարի ԿՏ հնարավորությունները, ֆիզիկաքիմիական և այլ գործոնների ազդեցությունը՝ գործընթացի արդյունավետությունը բարձրացնելու նպատակով,
- ուսումնասիրել նախնական հանքանմուշների և տարրալուծման մնացորդների ապարային կազմը, ապարային մասնիկների բաշխվածությունը և դրանց բացազատումը՝ նպատակ ունենալով պարզաբանել հանքաքարի ԿՏ գործընթացի մեխանիզմը:

Գիտական նորույթը: ՀՀ և ԼՂ պղնձային հանքավայրերից, ինչպես նաև ԿՏ համակարգերից մեկուսացվել են թթվա- և մետաղակայուն ՔՔ, որոնք ժամանակակից մոլեկուլային կենսաբանական մեթոդների կիրառմամբ նույնականացվել են որպես *At. ferrooxidans* ZnC և *Leptospirillum ferrodiazotrophum* Ksh-L: Ընդ որում, վերջին տեսակը առաջին անգամ է մեկուսացվում և նկարագրվում Հայաստանում: Մեկուսացված *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L և *At. ferrooxidans* ZnC բակտերիաներն ավանդադրվել են «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման կենտրոնում (ՄԱԿ)՝ ստանալով համապատասխան համարներ MDC7057 և MDC7058: *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L-ի և նախկինում մեկուսացված և ավանդադրված *L. ferriphilum* CC-ի (MDC 7047) նուկլեոտիդային հաջորդականությունները մուտքագրվել են GenBank՝ ստանալով համապատասխան համարներ՝ ON226845 և OM272948 [191]:

Ուսումնասիրվել են *L. ferriphilum* CC-ի աճի և Fe^{2+} -ի օքսիդացման կինետիկական պարամետրերը: Բացահայտվել է Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} Co^{2+} և Mo^{6+} իոնների ճնշող ազդեցությունը *At. ferrooxidans* ZnC-ի և *L. ferriphilum* CC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա, որոշվել են ՆՃԽ-ները: Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է մեկուսացված բակտերիաների պատիճային և կոլոիդային արտաբջջային պոլիմերային միացությունների (ԱՊՄ) կազմը սուբստրատից կախված: Առաջին անգամ հանքային հումքի և տարրալուծման մնացորդների ապարագիտական, խալկոպիրիտի հատիկների բացազատման, դրանց չափային բաշխման հետազոտություններն օգտագործվել են բացահայտելու համար պղնձի սուլֆիդային և օքսիդացված հանքանմուշների ԿՏ մեխանիզմը:

Գործնական նշանակությունը: Ուսումնասիրվել է մեկուսացված *At. ferrooxidans* ZnC և *L. ferriphilum* CC շտամների, նրանց համակեցությունների կայունությունը և ադապտացման հնարավորությունները մետաղների իոնների և ապարախյուսի բարձր խտությունների նկատմամբ: Ստացված ադապտացված կայուն շտամները կարող են հիմք հանդիսանալ խտանյութերից, աղքատ հանքաքարից, ինչպես նաև երկրորդային հումքից պղնձի արդյունավետ կորզման կենսատեխնոլոգիական գործընթացների մշակման համար:

Բացահայտվել են միջավայրի գործոնների (մասնիկների չափեր (ՄՉ), pH, ապարախյուսի խտություն (ԱԽ), սուլֆիդային և օքսիդացված հանքանյութերի հարաբերակցություն և այն) օպտիմալ արժեքները՝ Քաջարանի պղնձամուլիբդենային հանքավայրի օքսիդացած և սուլֆիդային հանքանյութերից պղնձի արդյունավետ կենսակորզման համար: Միաժամանակ պարզվել է, որ հանքանյութերից պղնձի կորզման արդյունավետությունը մեծապես պայմանավորված է կենսաբանական գործոնով՝ բակտերիալ համակեցությամբ սուբստրատի մակերեսին բակտերիալ բջիջների ադիեզվելու, կենսաթաղանթ առաջացնելու, մետաղների իոնների նկատմամբ կայունությամբ և ադապտացվելու ունակությամբ:

Պաշտպանության ներկայացվող հիմնական դրույթները:

- ՀՀ և ԼՂ պղնձային հանքավայրերից և տարրալուծման համակարգերից մեկուսացվել են ՔԲ-ի նոր և առավել արդյունավետ հեռանկարային շտամներ:
- *L.ferriphilum* CC-ի աճի և երկաթի օքսիդացման կինետիկան կարելի է նկարագրել է Մոնոյի և Միխաելիս-Մենթենի հավասարումներով: μ_{max} -ի և V_{max} -ի առվելագույն արժեքները դիտվել են Fe^{2+} -ի 100 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում: Fe^{3+} իոնները մրցակցորեն ճնշում են երկաթի օքսիդացումը մեկուսացված *L. ferriphilum* CC-ի մոտ:
- Մեկուսացված բակտերիաների համար ՆՃԽ-ն Zn^{2+} -ի և Co^{2+} -ի դեպքում կազմել է 10 մՄ, Cu^{2+} -ի և Ni^{2+} -ի դեպքում 20 մՄ: Ըստ թունավորության աստիճանի մետաղների իոնները կարելի է դասավորել հետևյալ շարքով՝ $Mo > Co > Zn > Ni > Cu$:
- Բացահայտվել է համահարաբերակցություն՝ բակտերիաների կողմից արտազատված ընդհանուր ԱՊՄ-ների քանակության և սուբստրատի մակերեսին նրանց ադիեզվելու աստիճանի միջև: Արտազատված ԱՊՄ-ների կազմը և քանակությունը կախված է բակտերիայի տեսակից և օգտագործվող սուբստրատից: Մեկուսացված շտամների մոտ հայտնաբերվել է կոլոիդային ԱՊՄ-ի զգալի քանակություն: Ենթադրվում է, որ կոլոիդային ԱՊՄ-ը ձևավորում են կոնդիցիոնացնող թաղանթ, որն ակտիվորեն փոփոխում է պիրիտի մակերեսի հատկությունները:
- Պղնձի հանքաքարի ներկայությամբ հաջորդական ցանքերի արդյունքում ստացված ադապտացված կուլտուրաների օգտագործումը թույլ է տալիս ավելացնել սուլֆիդային հանքաքարից պղնձի կորզման աստիճանը մինչև 91-98%:
- Սուլֆիդային հանքանյութից պղնձի կորզման աստիճանը կարելի է բարձրացնել մեծացնելով ԱԽ օքսիդային հանքանյութի հաշվին: Պղնձի կորզման

տեսակետից սուլֆիդային և օքսիդային հանքանւուշների օպտիմալ տոկոսային հարաբերակցությունը ԱՄՆ-ում կազմել է 10:14:

➤ Նախնական հանքային հումքի և ԿՏ մնացորդների քիմիական, ապարագիտական, ինչպես նաև ՄՉ ու բաշխվածության ուսումնասիրությունների արդյունքները լիովին համադրելի են ԿՏ արդյունքների հետ:

Առնչությունը գիտական թեմաների հետ: Ատենախոսական աշխատանքը իրականացվել է Կենտրոնի բազային ֆինանսավորմամբ իրականացվող գիտահետազոտական թեմայի, ինչպես նաև Եվրոպական Մանրէաբանական Ասոցիացիաների Ֆեդերացիայի (FEMS-GO-2018-136)՝ (Innovative microbiological methods for risks characterization of sites contaminated by metals), Հայ օգնության ֆոնդի Գիտության և կրթության հայկական ազգային հիմնադրամի (ANSEF) microbio-2227 " Biotechnology for recovery of valuable metals from secondary wastes" դրամաշնորհների շրջանակներում:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակը վերլուծաբար մշակել է թեմայի հետ առնչվող գիտական գրականությունը, գործնականորեն իրականացրել առաջադրված խնդիրները, անձամբ կատարել փորձարարական աշխատանքները, մասնակցել հետազոտական աշխատանքի արդյունքների ամփոփմանը, գիտական հոդվածների և ատենախոսության ձևակերպմանը:

Աշխատանքի ապրոքացիան: Ատենախոսական աշխատանքի հիմնական արդյունքները զեկուցվել են Կենտրոնի գիտական խորհրդի նիստերում, ինչպես նաև տեղական և միջազգային գիտաժողովներում, այդ թվում՝ "Culture of Responsibility: From Lab to Environment" խորագրով գիտաժողովին (Երևան, 2015թ.), "Innovative Materials and Processes (ICCE) 3-րդ միջազգային գիտաժողովին (Լասի, Ռուսիայի, 2016թ.), "Biotechnology: Science and Practice" երիտասարդ գիտնականների IV միջազգային գիտաժողովին (Երևան, 2017թ.), «Կենսաքիմիայի անցյալը, ներկան և ապագան» խորագրով երիտասարդ գիտնականների միջազգային գիտաժողովին (Երևան, 2017թ.), "Microbes: Biology and Application" խորագրով միջազգային գիտաժողովին (Երևան, 2019թ.), "International Symposium on Biohydrometallurgy" (IBS2019) (Fukoyoko, Japan, 2019), "Biotechnology: Science and Practice, Innovation and Business" խորագրով գիտաժողովին (Երևան, 2021թ.), "International Symposium on Biohydrometallurgy" (Perth, Australia, 2022):

Աշխատանքի կատարման վայրը: Ատենախոսական աշխատանքի փորձարարական մասը հիմնականում իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Մետաղների կենսատարրավազման լաբորատորիայում: Փորձարարական հետազոտությունների որոշ մասը իրականացվել է Մարտին Լյութերի անվան Հալլե Վիթենբերգի համալսարանում (Գերմանիա) Եվրոպական Մանրէաբանական Ասոցիացիաների Ֆեդերացիայի FEMS-GO-2018-136 դրամաշնորհի շրջանակներում: Համալսարանի Մոլեկուլային և բջջային կենսագիտություն ինստիտուտում իրականացվել են մեկուսացված շտամների ԴՆԹ-ի անջատում, մարկերային գեների ՊՇՌ ամպլիֆիկացում, նուկլեոտիդային հաջորդականությունների սեքվենավորում և ստացված արդյունքների կենսաինֆորմատիկական վերլուծություն: Նույն համալսարանի Բնական գիտությունների ֆակուլտետում և Երկրաբանության ինստիտուտում Սաբինե Վիլչերի

և Անդրեաս Կամբադտի հետ համատեղ ուսումնասիրություններ են իրականացվել՝ գնահատելու համար Քաջարանի հանքավայրի հանքանմուշների մանրէաբանական տարրալուծման և պղնձի կորզման հնարավորությունները: Կատարվել է նաև հանքանմուշների և տարրալուծման մնացորդների ապարագիտական անալիզ:

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Ատենախոսական աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից և փորձարարական մասից՝ հետազոտության նյութը և մեթոդները, հետազոտության արդյունքները, ամփոփում, եզրակացություններ բաժիններից, օգտագործված գրականության ցանկից (214 անուն), հապավումներից և 4 հավելվածներից: Աշխատանքը ձևակերպված է հայերեն լեզվով 140 էջի վրա՝ լուսաբանված 36 նկարներով և 16 աղյուսակներով:

Հրատարակումները: Ատենախոսության հիմնական արդյունքները արտացոլված են 7 գիտական հոդվածներում՝ հրատարակված տեղական և միջազգային ամսագրերում, 3 հոդվածներում՝ հրատարակված հոդվածների ժողովածուներում և 8 միջազգային գիտաժողովների թեզիսներում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱՎՆԱՐԿ

Գրական ակնարկում ներկայացված են մետաղներ տարրալուծող բակտերիաների բազմազանությանը, նրանց կողմից երկաթի, ծծմբի և սուլֆիդային միներալների օքսիդացման մեխանիզմները, ադիեզիայի և կենսաթաղանթի առաջացման վերաբերյալ ժամանակակից պատկերացումները և այդ գործընթացների կարևորությունը մետաղների կենսատեխնոլոգիայում:

ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Ուսումնասիրության օբյեկտ են հանդիսացել «Ksh», «Kv» երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների հարստացված կուլտուրաները՝ մեկուսացված Կաշենի (ԼՂ, Մարտակերտի շրջան) և Կավարտի (ՀՀ, Սյունիքի մարզ) պղնձային հանքավայրերից, ինչպես նաև *At. ferrooxidans* Ksh (Vardanyan et al., 2020) և պղնձի ու ցինկի ԿՏ փորձարարական համակարգերից մեկուսացված *L. ferriphilum* CC և *At. ferrooxidans* ZnC երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների մաքուր կուլտուրաները (Vardanyan et al., 2019):

Բակտերիաների մեկուսացման նպատակով օգտագործվել են Միլվերման, Լյունդգրենի 9K (Биогеотехнология металлов, 1989) և Մակինտոշի (MAC) (Makintosh, 1978) սննդամիջավայրերը՝ մեզոֆիլ երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների համար, ինչպես նաև Բրայերլիի մոդիֆիկացված սննդամիջավայրը (Варданын и др. 1988)՝ չափավոր ջերմասեր բակտերիաների համար: Որպես էներգիայի աղբյուր օտագործվել է երկարժեք երկաթը ($Fe_2SO_4 \times 7H_2O$):

ՂՆԹ-ի անջատումը կատարվել է Macherey-Nagel™ (NucleoSpin™) պրոտոկոլի համաձայն:

16S ռՌՆԹ-ի գենի ՊՇՆ-ն և ամպլիֆիկացիան: 16S ռՌՆԹ-ի ֆրագմենտների ՊՇՆ ամպլիֆիկացիան իրականացվել է "Biometra" T 3000 Thermocycler (Labreco) ամպլիֆիկատորում՝ Macherey-Nagel™ (NucleoSpin™) պրոտոկոլի համաձայն: ՊՇՆ-պրոդուկտների անջատումը և մաքրումը իրականացվել է Macherey-Nagel Extract II

Bioanalysis™ NucleoSpin™ 96 Gel և PCR Clean-Up Kit պրոտոկոլի համաձայն: ՊՇՌ պրոդուկտները փորձարկվել են հել-էլեկտրաֆորեզով՝ 1.5%-ng ազարոզում օգտագործելով հետևյալ պրայմերները՝ fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) և rP2 (ACGGCTACCTTGTACGAG), 908 fwd (16S fwd) (GTGCCAGCAGCCGCG) և 796 rev (16Srev) (GGGTTGCGCTCGTTG) AG Microsynth-ով (Balgach, Switzerland): ՊՇՌ ֆրագմենտների սեքվենացումը իրականացվել է կիրառելով Մանգերի եղանակը (Sanger et al., 1977): Հետազոտվող շտամների 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության առաջնային անալիզը կատարվել է BLAST ծրագրային ապահովման վայրեթի միջոցով (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>): Ֆիլոգենետիկական ծառերի կառուցումն իրականացվել է MEGA 11 ծրագրային վայրեթի միջոցով «neighbor-joining» ծրագրի bootstrap մեթոդով՝ 10000 այլընտրանքային ծառերի համեմատության հիման վրա:

Fe²⁺, Fe³⁺ և այլ մետաղների իոնների ազդեցությունը: *L. ferriphilum* CC-ի և *At. ferrooxidans* ZnC-ի կողմից Fe²⁺-ի օքսիդացման կինետիկական ուսումնասիրվել է MAC սննդամիջավայրում Fe²⁺-ի 50-400 մՄ կոնցենտրացիաների միջակայքում: Մետաղների իոնների ազդեցությունը բակտերիաների կողմից երկաթի օքսիդացման վրա ուսումնասիրվել է 10-150 մՄ կոնցենտրացիաների միջակայքում: Աճի տեսակարար արագությունը հաշվարկվել է լոգարիթմական փուլում $\mu = 2.3x (\lg N - \lg N_0) / (t - t_0)$ բանաձևով, գեներացիայի տևողությունը (g) $g = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$ բանաձևով: Բակտերիաների աճի առավելագույն տեսակարար արագության (μ_{max}) արժեքները որոշվել են ըստ Մոնոյի և հավասարման՝ $\mu = \mu_{max} S / (K_s + S)$: Km և V_{max} արժեքները որոշելու համար օգտագործվել է Լայնուվեր-Բերկի գրաֆիկը: Ճնշման հաստատունի (Ki) արժեքը որոշվել է $K_i = i / (K_p / K_m - 1)$ բանաձևով (Pirt, 1975):

Միներալների տարրալուծումը: Տարրալուծման են ենթարկվել Շամլուրի հանքավայրի (ՀՀ) պիրիտը (FeS₂) (Fe-43.8 %, S-49 %) և խալկոպիրիտը (CuFeS₂) (Fe-29.7%, Cu-30.2%, S-38 %) մանրացված մինչև 43-63 մկմ մեծության մասնիկների: Ապարների ԿՏ նպատակով օգտագործվել է մեկուսացված երկաթ օքսիդացնող *L. ferriphilum* CC, *At. ferrooxidans* Ksh և *Sb. thermosulfidooxidans* 6 կուլտուրաները: Տարրալուծման ինտենսիվությունը գնահատվել է միջավայր անցած Fe²⁺, Fe³⁺, ինչպես նաև Cu²⁺ իոնների քանակությամբ:

Բակտերիաների արհեստագործական: Բակտերիաների տիրույթը որոշվել է ուղղակի հաշվմամբ՝ օգտագործելով Թոմայի խցիկը (Thoma counting chamber) և ֆազակոնտրաստային մանրադիտակը (Leica DMLS, Wetzler GmbH): Արհեստագործական բջիջների քանակությունը որոշվել է որպես սկզբնական և պլանկտոնային բջիջների քանակության տարբերություն:

Կենսաթաղանթի առաջացումը: Կենսաթաղանթի ուսումնասիրության համար օգտագործվել է ատոմաուժային մանրադիտակը (AFM) (JPK Instruments, Germany) և JPK Image Processing ծրագիրը: Բջիջների արտացոլման նպատակով օգտագործվել է էպիֆլուորեսցենտային մանրադիտակը (EFM) (Zeiss® AxioImagerTM A1m) և AxioVision 4 ծրագիրը:

ԱՊՄ-ի քիմիական կազմի որոշումը: Կուոդրային և պատիճային ԱՊՄ-ները ստացվել են ըստ Castro et al (2014): Ածխաջրերը որոշվել են Դուբոյսի մեթոդով (Dubois et al., 1956): Սպիտակուցի պարունակությունը որոշվել է Բրեդֆորդի մեթոդով (Bradford, 1976): Ուրոնաթթուների առկայությունը որոշվել է Բլումենկրանցի և Ասբոե-Հանսենի մեթոդով (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973): Բջջիների լիզիսը իրականացվել է 3-դեոքսի-D-մաննո-օկտ-2-ուլյուսոսիկ թթվի միջոցով (Karkhanis et al., 1978):

Քաջարանի հանքանյութերի կենսատարրալուծումը: Տարրալուծման համար օգտագործվել են Քաջարանի սուլֆիդային 2000-800, 800-90, 90-70 և <45 մկմ և օքսիդային հանքաքարի 3000-1600, 1600-800, 800-160, 160-45 և <45 մկմ չափերի ֆրակցիաները: Հանքաքարի սկզբնական նմուշների և կենսատարրալուծման արդյունքում ստացված պինդ մնացորդի քիմիական և ապարային կազմի անալիզը իրականացվել է ինդուկտիվորեն զուգակցված պլազմային մասսպեկտրոմետրի միջոցով (Inductively coupled plasma mass spectrometry-ICP-MS): Հանքաքարի կազմի վերլուծություններն, ինչպես նաև ազատ մասնիկների չափի վերաբերյալ տվյալները ստացվել են օգտագործելով Bruker XFlash 630H դեդեկտորով համալրված Hitachi TM4000+ սկանավորող մանրադիտակի (Scanning electron microscope (SEM)) և Advanced Mineral Identification և Characterization System-ը (AMICS) համակարգի միջոցով:

Ֆիզիկաքիմիական անալիզներ: Fe^{3+} և Fe^{2+} իոնների քանակական անալիզն իրականացվել է կոմպլեքսոմետրիկ տիտրմամբ EDTA-ով (Samchuk and Pilipenko, 1987): Օքսիդավերականգնման պոտենցիալը (ՕՎՊ) չափվել է պլատինե էլեկտրոդով, pH-ը՝ ջրածնական էլեկտրոդով՝ Ag/AgCl համեմատական էլեկտրոդի (հազեցած KCl) նկատմամբ օգտագործելով Hi2211-01 Benchtop pH/mV pH մետր-միլիվոլտմետրը (Hanna Instruments, Germany):

ԳԼՈՒԽ 3. ՔԵՄՈՒԻՅՈՒՄՆԵՐԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄԵԿՈՒՍԱՑՈՒՄԸ ԵՎ

ՆՈՒՑՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ: ԿԱՑՈՒՆՈՒՅՑՈՒՄԸ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ՆԿԱՏԱՍԵ

3.1 Երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների բնական համակեցությունները

Աշխատանքում օգտագործված երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների (Ksh) և (Kv) համակեցությունները մեկուսացվել են Կաշենի (ԼՂ, Մարտակերտի շրջան) շահագործվող պղնձի հանքավայրի և Կավարտի (ՀՀ, Մունիքի մարզ) լքված պղնձի հանքավայրի թթու դրենաժային ջրերի (ԹՉԴ-AMD) նմուշներից: Այդ նպատակով 9K սննդամիջավայրը (Silverman and Lundgren 1959) վարակվել է ԹՉԴ-ի համապատասխան նմուշներով և ինկուբացվել 30 և 37°C-ի պայմաներում 5 - 7 օրվա ընթացքում:

Յույց է տրվել, որ ԹՉԴ նմուշներում առկա են *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* և *Sulfobacillus* ցեղերին պատկանող բակտերիաներ: Կավարտի հոսքաջրերի նմուշներում (pH-2.55) երկաթ օքսիդացնող *Leptospirillum* spp. բակտերիաների քանակը կազմել է 10^1 բջիջ/մլ, երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող *Sulfobacillus* spp. և *Acidithiobacillus* spp. բակտերիաներինը՝ 10^2 բջիջ/մլ: Նստվածքից վերցրած ավելի ցածր pH (pH-1.9) ունեցող նմուշում *Leptospirillum* spp. և *Sulfobacillus* spp. բակտերիաների քանակը 1-3 կարգով բարձր է եղել՝ 10^3 և 10^4 բջիջ/մլ: Կաշենի ԹՉԴ նմուշներում (pH-2.52) *Sulfobacillus* spp. բակտերիաների թիվը կազմել է 10^2 բջիջ/մլ, մինչդեռ *Acidithiobacillus* spp. և *Leptospirillum*

spp. բակտերիաների թիվը կազմել է 10^3 բջիջ/մլ: Նստվածքի նմուշում ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների քանակությունը հասնել է 10^5 բջիջ/մլ: Կաշենի ԹՀԴ նստվածքից վերցված ավելի ցածր pH-ի արժեքով (pH-1.9) նմուշում *Sulfobacillus* spp. և *Leptospirillum* spp. բակտերիաների թիվը կազմել է 10^3 և 10^5 բջիջ/մլ, համապատասխանաբար, այսինքն կրկին 1-2 կարգով ավելի մեծ՝ համեմատած հոսքաջրից վերցրած նմուշի հետ: Ստացված արդյունքները համընկնում են այլ հեղինակների բացահայտումների հետ կապված սուլֆիդային հանքավայրերի տարբեր էկոխորշերում մանրէների տարածվածության հետ (García-Moyano et al., 2012):

3.2 Երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների մեկուսացումը

Երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների մաքուր կուլտուրաների ստացման նպատակով վերը նշված Կաշենի պղնձային հանքավայրերի ԹՀԴ-ից մեկուսացված «Ksh» և պղնձի ու ցինկի խտանյութերի տարրալուծման համակարգերից մեկուսացված համակեցությունները ցանվել են մոդիֆիկացված Մաննինգի պինդ սննդամիջավայրի վրա՝ որպես էներգիայի աղբյուր օտգագործելով երկարժեք երկաթը ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Биогеотехнология металлов, 1989):

3.2.1 Մեկուսացված բակտերիաների մորֆո-ֆիզիոլոգիական առանձնահատկությունները

Մեկուսացված Ksh-L շտամն իրենցից ներկայացրել է զրամ բացասական ծոված ձողիկներ՝ ունակ օքսիդացնելու երկարժեք երկաթը (Vardanyan et al., 2019, Markosyan et al., 2019; Khachatryan et al., 2021): Ksh-L շտամների աճը և Fe^{2+} -ի օքսիդացումը դիտվել է 35-45 °C ջերմաստիճանային միջակայքում, աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը կազմել է 40°C և 35 °C, համապատասխանաբար: *Acidithiobacillus* sp. ZnC բակտերիայի աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը կազմել է 35°C: Բակտերիաների աճը առավել ակտիվ է եղել pH 1.6 և 1.8 արժեքների դեպքում:

3.2.2 Մեկուսացված բակտերիաների նույնականացումը

Մեկուսացված բակտերիաների նույնականացումը կատարվել է մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական առանձնահատկությունների հիման վրա ըստ Բերգիի որոշիչի, ինչպես նաև 16S ռԲՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզի հիման վրա: Ուսումնասիրվող բակտերիաների ֆիլոգենետիկորեն մոտ ազգակից տեսակների բացահայտման համար 16S ռԲՆԹ գենի մշակված և մասնակի նուկլեոտիդային հաջորդականությունները մուտքագրվել են NCBI BLASTn (National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) անցանց հասանելի որոնման համակարգ և համադրվել է GenBank տվյալների բազայում առկա նմանատիպ հաջորդականությունների հետ: Կատարվել է նախնական սկրինինգ, որի դեպքում նախկինում մեկուսացված և ավանդադրված *Leptospirillum ferriphilum* CC և *Leptospirillum* sp. Ksh-L շտամների նուկլեոտիդային հաջորդականությունները համեմատվել են ֆիլոգենետիկորեն առավել մոտ *Leptospirillum* ցեղին պատկանող

տեսակների հետ (աղ. 1): Ուսումնասիրվող շտամների տեսակային պատկանելության ճշգրտման նպատակով կառուցվել են ֆիլոգենետիկական ծառեր:



Նկ.1 *Leptospirillum ferriphilum* CC և Ksh-L շտամների ֆիլոգենետիկական ծառը

Ինչպես երևում է դենդրոգրամից, մեկուսացված *Leptospirillum* sp. Ksh-L շտամը առանձին կլաստերում է՝ մոտ *Leptospirillum ferrodiazotrophum* 5C և *Leptospirillum* sp. E4-L9 միասնական կլաստերին: Համապատասխան նուկլեոտիդային հաջորդականությունների նմանության մակարդակը կազմել է 96.60 % և 96.94% (աղ. 1, նկ. 1): Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ *Leptospirillum ferriphilum* CC և *Leptospirillum* sp. Ksh-L շտամների հաջորդականության նմանության մակարդակը կազմել է 91.03 %, միևնույն ժամանակ *Leptospirillum* sp. Ksh-L շտամի նմանությունը *Leptospirillum ferrodiazotrophum* 5C և *Leptospirillum* sp. E4-L9 չկուլտիվացվող տեսակի հետ կազմել է 96.60 և 96.94% համապատասխանաբար, կարելի է եզրակացնել, որ *Leptospirillum* sp. Ksh-L շտամը կարող է ներկայացնել լինել *L. ferrodiazotrophum* տեսակին պատկանող նոր շտամ կամ հանդիսանալ *Leptospirillum* ցեղին պատկանող նոր տեսակ:

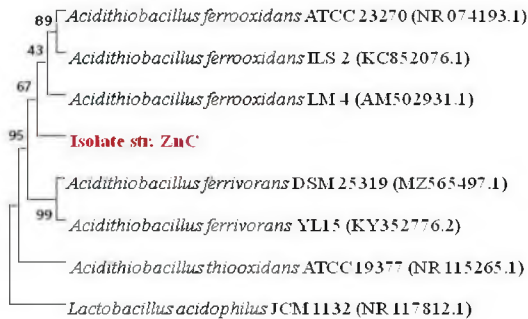
Համաձայն նկար 2-ում ներկայացված դենդրոգրամի մեկուսացված *Acidithiobacillus* sp. ZnC շտամը առաջացրել է միասնական կլաստեր *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 (NR_074193.1), *Acidithiobacillus ferrooxidans* ILS2 (KC852076.1) և *Acidithiobacillus ferrooxidans* LM4 (AM502931.1) շտամների հետ: Համապատասխան նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը կազմել է 99.25%, 99.25% և 99.24%, համապատասխանաբար:

Այսպիսով, Կաշենի ԹՃԴ նմուշից և պղնձի ու ցինկի տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացվել և նույնականացվել են երկաթ օքսիդացնող *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L և երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող *Acidithiobacillus ferrooxidans* ZnC շտամները:

Շտամները ավանդադրվել են ՄՄԿ-ում, իսկ նուկլեոտիդային հաջորդականությունները մուտքագրվել են GenBank՝ ստանալով համապատասխան համարներ *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L (MDC 7057, ON226845), *At. ferrooxidans* ZnC (MDC 7058, MN 539150), *L. ferriphilum* CC (OM272948):

Leptospirillum ferriphilum CC և Ksh-L շտամների և NCBI-ում ֆիլոգենետիկորեն մոտ տեսակների 16S ռԻՆՔ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների նմանության մակարդակները

Բակտերիալ շտամը, համարը NCBI-ում	Գենի երկարությունը, նգ	Նմանությունը (%)	
		<i>Leptospirillum ferriphilum</i> CC	<i>Leptospirillum</i> sp. Ksh-L
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> MP1 (MN 780596.1)	1516	99.73	91.09
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> OL12-2 (KF 356024.1)	1501	99.80	91.16
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> P1(MG386692.1)	1504	99.60	91.03
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> P3a (NR028818.1)	1516	98.27	91.02
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> L15 (NR027216.1)	1484	92.87	89.73
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> C2-3 (NR-074963.1)	1550	93.02	89.76
<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> 5C (JN007036.1)	1479	90.27	96.60
<i>Leptospirillum</i> sp. E4-L9 (HM769767.1)	1549	90.64	96.94
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> CC (OM272948)	1499	100	91.03



Նկ. 2. *Acidithiobacillus* sp. ZnC շտամի ֆիլոգենետիկական ծառը

3.3 Մեկուսացված բակտերիաների կայունությունը մետաղների իոնների նկատմամբ

3.3.1 Սուրսոտրասի կոնցենտրացիայի ազդեցությունը

Ուսումնասիրվել է Fe^{2+} և Fe^{3+} , ինչպես նաև պղնձի, ցինկի, նիկելի, կոբալտի և մոլիբդենի իոնների ազդեցությունը մեկուսացված *L. ferriphilum* CC-ի և *At. ferrooxidans* ZnC -ի կողմից երկարժեք երկաթի օքսիդացման կինետիկայի վրա:

L. ferriphilum CC շտամի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման կինետիկան ուսումնասիրվել է 50-400 մՄ կոնցենտրացիաների միջակայքում: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ բակտերիաների աճի և երկաթի օքսիդացման կինետիկան կարելի է նկարագրել է Մոնոյի և Միխաելիս-Մենթենի հավասարումների միջոցով: Կիրառելով Մոնոյի հավասարումը, որոշվել են աճի և երկաթի օքսիդացման կինետիկական պարամետրերի՝ μ_{max} -ի և V_{max} -ի արժեքները՝ կախված միջավայրում Fe^{2+} -ի սկզբնական կոնցենտրացիայից (աղ. 2):

Աղյուսակ 2

***L. ferriphilum* CC-ի աճի և Fe^{2+} -ի օքսիդացման քանակական բնութագրերը Fe^{2+} -ի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում**

Fe^{2+} կոնցենտրացիա (մՄ)	μ_{max} (1/ժ)	V_{max} (մՄ/ժ)
50	0.31 ± 0.024	1.7
100	0.48 ± 0.018	6.2
200	0.41 ± 0.017	6.0
300	0.28 ± 0.026	4.6

L. ferriphilum CC-ի աճի առավելագույն տեսակար արագությունը և Fe^{2+} -ի օքսիդացման առավելագույն արագությունը դիտվել է Fe^{2+} -ի 100 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում և կազմել են 0.42 ժամ⁻¹ և 0.83 մՄ, համապատասխանաբար: Ավելի բարձր կոնցենտրացիաների (200 մՄ-ից բարձր) դեպքում դիտվել է բակտերիաների աճի և Fe^{2+} -ի օքսիդացման ճնշում: 50 մՄ Fe^{2+} կոնցենտրացիայի դեպքում դիտվել է սուբստրատային սահմանափակում:

3.3.2 Fe^{3+} -ի ազդեցությունը

Բակտերիաների կայունությունը Fe^{3+} իոնների նկատմամբ շատ կարևոր է մետաղների չանային ԿՏ տեխնոլոգիայի կիրառման դեպքում: Ինչպես ցույց են տալիս աղյուսակ 3-ում ներկայացված տվյալները, Fe^{3+} -ի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում դիտվել է *L. ferriphilum* CC-ի աճի և Fe^{2+} -ի օքսիդացման ճնշում, որն արտահայտվել է աճի տեսակարար արագության և Fe^{2+} -ի օքսիդացման արագության նվազմամբ: Fe^{2+} -ի օքսիդացման կինետիկական պարամետրերի ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ միջավայրում Fe^{3+} իոնների առկայության պայմաններում *L. ferriphilum* CC-ի խնամակցությունը Fe^{2+} -ի նկատմամբ նվազում է:

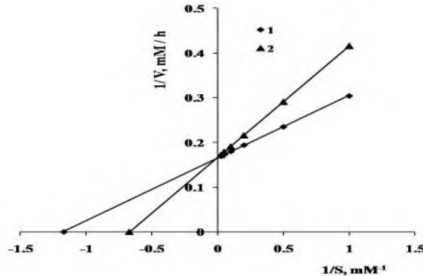
Աղյուսակ 3

***L. ferriphilum* CC-ի աճը և Fe^{2+} -ի օքսիդացումը Fe^{3+} -ի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում (Fe^{2+} -100 մՄ)**

Fe^{3+} -ը, (մՄ)	μ_{max} (1/ժ)	V_{max} (մՄ/ժ)
2.0	0.35 ± 0.025	6.5
20.0	0.32 ± 0.026	6.1
20.0	0.26 ± 0.014	5.5
50.0	0.19 ± 0.010	3.2
75.0	0.16 ± 0.0011	1.9

Այսպես, եթե Fe^{3+} բացակայության պայմաններում *L. ferriphilum* CC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման համար հագեցման հաստատունը (Km) կազմում է 0.83 մՄ, ապա սննդամիջավայրում 50.0 մՄ Fe^{3+} ավելացնելիս Km-ի արժեքը մեծանում է 0.83-ից դառնալով 1.5 մՄ $FeSO_4$ (Kp) (նկ. 3):

Այսպիսով, Fe^{3+} -ը, ինչպես *S. thermosulfidooxidans*-ի և *At. ferrooxidans*-ի դեպքում (Boon et al., 1999; Penev, Karamanev, 2010) մրցակցորեն ճնշում են երկայթի օքսիդացումը *L. ferriphilum* CC-ի մոտ:



Նկ.3 Ks-ի որոշումը ըստ Լայնուիվեր-Բերկի (Lainuver-Berk) Fe^{3+} -ի բացակայության և 2-50 մՄ Fe^{3+} -ի առկայության դեպքում

Ճնշման հաստատունի արժեքը (Ki) կազմել է 61.95 մՄ $Fe_2(SO_4)_3$: *L. ferriphilum* CC շտամի մոտ հագեցման հաստատունի՝ Ks-ի արժեքը ըստ Fe^{2+} -ի ավելի ցածր է, քան *Sb. thermosulfidooxidans asporogenes* 41-ի մոտ (3.4–4.1 մՄ Fe^{2+}) [Vartanyan et al., 1990] և *At. ferrooxidans*-ի մոտ (1.34 մՄ Fe^{2+}) [Norris et al., 1988]:

3.3.3 Պղնձի և ցինկի ու այլ մետաղների իոնների ազդեցությունը

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ *L. ferriphilum* CC շտամի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման աստիճանը միջավայրում 20 մՄ Cu-ի, Zn-ի, Ni-ի և Co-ի իոնների ներկայությամբ կազմել է 58.4, 42.8, 53.3 և 31.3%, համապատասխանաբար (աղ.4): Նվազագույն ճնշող կոնցետրացիան (ՆՃԽ) Zn²⁺-ի և Co²⁺-ի դեպքում կազմել է 10 մՄ, իսկ Cu²⁺-ի և Ni²⁺-ի դեպքում 20 մՄ:

Աղյուսակ 4

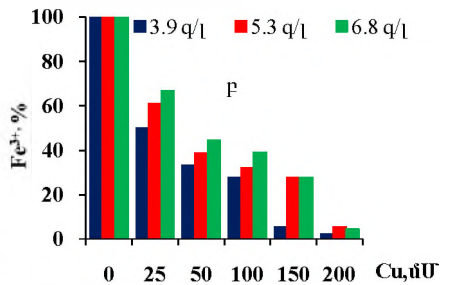
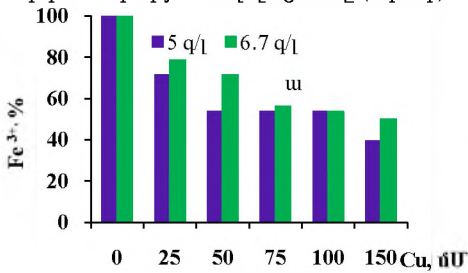
Մետաղների իոնների ազդեցությունը *L. ferriphilum* CC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա (pH 1.8, t 37 °C, 200 պտ/րոպ, սևողությունը՝ 46-48 ժամ)

Մետաղներ ի իոնները, մՄ	Օքսիդացված Fe-ը							
	Cu ²⁺		Zn ²⁺		Ni ²⁺		Co ²⁺	
	q/լ	%	q/լ	%	q/լ	%	q/լ	%
0	3.2±0.19	100	1.6±0.023	100	3.4±0.028	100	3.8±0.024	100
10	Չն	Չն	1.0±0.036	64.3	Չն	Չն	1.5±0.0048	38.8
20	1.9±0.049	58.4	0.67±0.015	42.8	1.8±0.0036	53.3	1.2±0.0017	31.3
50	1.6±0.014	50.0	0.56±0.013	35.7	1.5±0.018	43.3	0.85±0.013	22.6
100	1.3±0.0049	39.6	0.50±0.005	17.6	1.1±0.049	31.7	0.78±0.0086	20.9
150	1.2±0.0080	36.9	Չն	Չն	0.84±0.011	25.0	0.74±0.0029	19.7

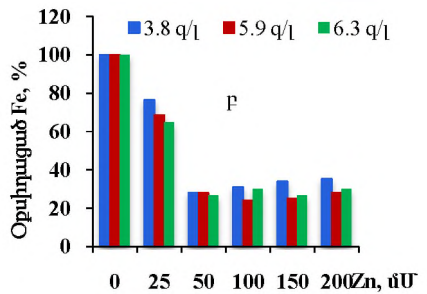
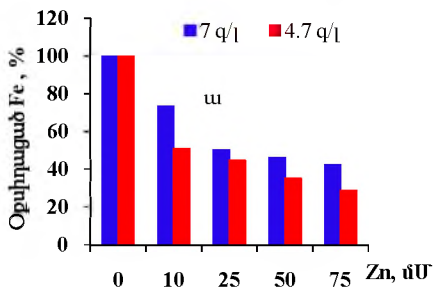
Չն- չի որոշվել

Մետաղները ըստ թունավորության աստիճանի աճման կարելի է դասավորել հետևյալ կարգով $Mo > Co > Zn > Ni > Cu$: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ *L. ferriphilum* CC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացումը կազմել է 71.4 և 53.6%՝ սննդամիջավայրում համապատասխանաբար 25 և 50 մՄ պղնձի առկայության և 5.0 գ/լ Fe^{2+} -ի պարունակության դեպքում (նկ. 4ա): Սննդամիջավայրում 6.7 գ/լ Fe^{2+} -ի պարունակության դեպքում *L. ferriphilum* CC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման աստիճանը պղնձի նույն քանակությունների դեպքում զգալիորեն ավելացել է կազմելով 78.6 և 71.5% (նկ. 4 ա): Սակայն սննդամիջավայրում պղնձի 75մՄ և ավելի կոնցենտրացիաների դեպքում Fe^{2+} -ի օքսիդացման աստիճանը գրեթե կախված չէ սուբստրատի կոնցենտրացիայից (նկ. 4ա): Fe^{2+} -ի օքսիդացումը *At. ferrooxidans* ZnC-ի կողմից պղնձի 25, 50 և 100 մՄ կոնցենտրացիաների դեպքում կազմել է համապատասխանաբար 50.0, 33.3 և 27.8%՝ սննդամիջավայրում 3.9 գ/լ Fe^{2+} -ի պարունակության դեպքում:

Պարզվել է, որ ցինկի իոններով *L. ferriphilum* CC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման ճնշման աստիճանը նույնպես նվազում է սուբստրատի կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց (նկ. 4ա): Սակայն ի տարբերություն *L. ferriphilum* CC-ի, *At. ferrooxidans* ZnC-ի դեպքում սուբստրատի կոնցենտրացիայի բարձրացումը չի հանգեցնում օքսիդացված Fe^{2+} -ի քանակության ավելացմանը (նկ. 4 բ):

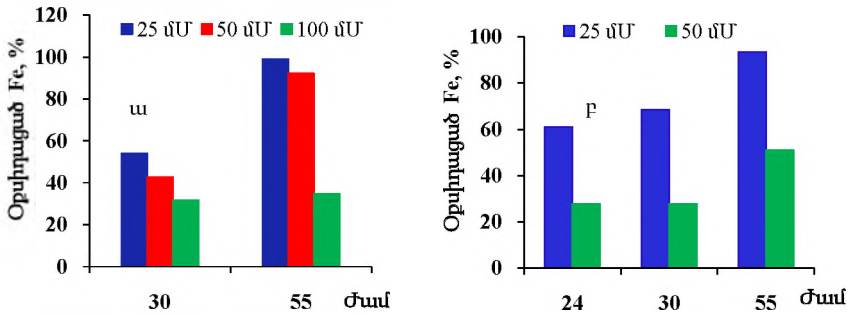


Նկ. 4 Պղնձի իոնների ազդեցությունը *L. ferriphilum* CC-ի (ա) և *At. ferrooxidans* ZnC-ի (բ) կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա՝ կախված սուբստրատի կոնցենտրացիայից



Նկ. 5 Zn-ի իոնների ազդեցությունը *L. ferriphilum* CC-ի (ա) և *At. ferrooxidans* ZnC-ի (բ) կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա՝ կախված միջավայրում Fe^{2+} -ի պարունակությունից

Միաժամանակ Fe^{2+} -ի օքսիդացման դինամիկայի ուսումնասիրությունը թույլ է տվել հաստատել, որ *L. ferriphilum* CC-ի բակտերիաների աճին զուգընթաց նվազում է պղնձի և ցինկի իոնների ճնշող ազդեցությունը (նկ. 6):



Նկ. 6 Cu^{2+} -ի ազդեցությունը *L. ferriphilum* CC-ի (ա) և *At. ferrooxidans* ZnC (բ) կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա կախված աճի տևողությունից

Ցույց է տրվել, որ Mo^{6+} -ը 0.5 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում ճնշում է *At. ferrooxidans* ZnC-ի կողմից Fe^{2+} -ի օքսիդացումը, մինչդեռ նվազագույն ճնշող կոնցենտրացիան *L. ferriphilum* CC-ի համար կազմել է 1մՄ:

Պարզվել է, որ ԱՊՄ-ից զուրկ *L. ferriphilum* CC բջիջները ընդունակ չեն եղել օքսիդացնելու Fe^{2+} -ը պղնձի նույնիսկ ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում: Ենթադրվում է, որ աճի ընթացքում բակտերիալ բջիջները առաջացնում են կենսաթաղանթ՝ կազմված ԱՊՄ-ների, որոնք զգալիորեն մեծացնում են բակտերիաների կայունությունը ծանր մետաղների նկատմամբ:

Միջավայրում պղնձի աստիճանաբար բարձրացվող կոնցենտրացիայի պայմաններում 4-5 հաջորդական ցանքսերի ընթացքում հաջողվել է ստանալ *L. ferriphilum* CC-ի *At. ferrooxidans* ZnC-ի ադապտացված կուլտուրաներ, որոնք ընդունակ են աճելու միջավայրում մինչև 400 մՄ Cu^{2+} -ի ներկայությամբ:

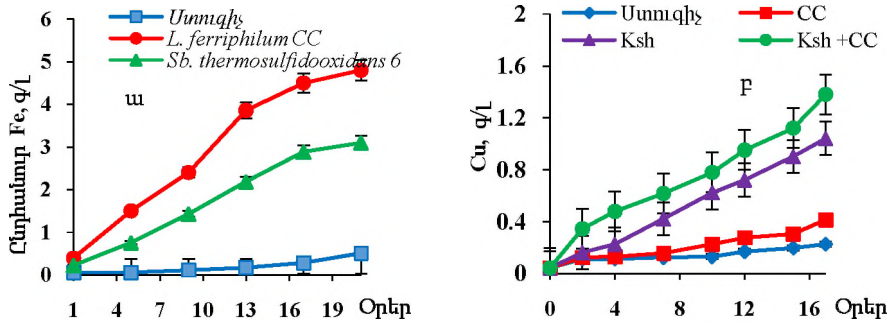
ԳԼՈՒԽ 4. ՍՈՒԼՖԻՍԻՆ ՄԻՆԵՐԱԼՆԵՐԻ ԵՎ ՔՍՋԱՐԱՆԻ ՀԱՆՔԱՎԱՏՐԻ ՀԱՆՔԱՆՍՈՒՇՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՏԱՐՐԱԼՈՒԹՅՈՒՄԸ

4.1 Սուլֆիդային միներալների կենսատարրալուծումը

4.1.1 Միներալների կենսատարրալուծումը և բակտերիաների ադեզիան

Ուսումնասիրվել է Շամլուղի հանքավայրի (ՀՀ) պիրիտի (FeS_2) ԿՏ-ը մեկուսացված *L. ferriphilum* CC և *Sb. thomosulfidooxidans* 6-ի միջոցով: Ներկայացված տվյալները վկայում են, որ *L. ferriphilum* CC-ի կողմից տարրալուծված ընդհանուր երկաթը զգալիորեն գերազանցում է *Sb. thomosulfidooxidans* 6-ի կողմից տարրալուծված երկաթի քանակությանը (նկ.7ա): Ինչպես ցույց է տրված նկար 7բ-ում, խալկոպիրիտի ($CuFeS_2$) օքսիդացման ակտիվությամբ *At. ferrooxidans* Ksh-ը զգալիորեն գերազանցում է *L. ferriphilum* CC-ին: Սակայն շտամների համատեղ աճի դեպքում պղնձի և երկաթի

տարրալուծման ինտենսիվությունը մեծանում է 1.3 և 1.2 անգամ: Ենթադրվում է, որ համակեցության մեջ *L. ferriphilum* CC-ը նշանակալիորեն արագացնում է Fe^{2+} -ի օքսիդացումը և Fe^{3+} -ի ռեգեներացիան, որն էլ իր հերթին խթանում է $CuFeS_2$ -ի օքսիդացումը:



Նկ. 7 Պիրիտի (FeS_2) (ա) և Խալկոպիրիտի ($CuFeS_2$) (բ) ԿՏ-ը *L. ferriphilum* CC-ի և այլ երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների կողմից

Աղյուսակ 5

***L. ferriphilum* CC-ի, *At. ferrooxidans* 61-ի և *Sb. thermosulfidooxidans* 6-ի ադիեզիան պիրիտի մակերեսին**

Ժամանակ, րոպ.	<i>L. ferriphilum</i> CC		<i>At. ferrooxidans</i> 61		<i>S. thermosulfidooxidans</i> 6	
	Պլանկտոնային բջիջների թիվ, բջիջ/մլ	Ադիեզիայի աստիճան, %	Պլանկտոնային բջիջների թիվ, բջիջ/մլ	Ադիեզիայի աստիճան, %	Պլանկտոնային բջիջների թիվ, բջիջ/մլ	Ադիեզիայի աստիճան, %
0	5×10^6	0	3.0×10^7	0	2.0×10^6	0
30	1×10^5	98.0	1.14×10^6	62	1.0×10^6	50
60	1×10^4	99.99	5.1×10^6	83	7.8×10^5	61
120	0.98×10^4	100	2.8×10^6	93	2.4×10^5	88

Համեմատական ուսումնասիրության արդյունքների համաձայն *L. ferriphilum* CC-ն ցուցաբերում է պիրիտի վրա ադիեզիայի ավելի մեծ ունակություն, քան *At. ferrooxidans* 61-ը և *Sb. thermosulfidooxidans* 6-ը: Ըստ պիրիտի վրա ադիեզիայի ունակության նվազման կուլտուրաները կարելի է դասավորել հետևյալ կարգով *L. ferriphilum* CC > *At. ferrooxidans* 61 > *Sb. thermosulfidooxidans* 6 (աղ. 5):

4.1.2 Կենսաթաղանթի առաջացումը

L. ferrooxidans CC-ին *At. ferrooxidans*-ի և *S. thermosulfidooxidans*-ի նման պիրիտի մակերեսին առաջացնում է միաշերտ կենսաթաղանթ: Մակայն եթե *At. ferrooxidans*-ի և *S. thermosulfidooxidans*-ի առաջացրած կենսաթաղանթը հիմնականում եղել է առանձին բջիջների տեսքով: *L. ferrooxidans* CC-ի դեպքում դիտվել է ինչպես առանձին բջիջների, այնպես էլ 25 մկմ տրամագծով մեծ բջջային կլաստերների ձևով կենսաթաղանթ:

Ագրեգատների ձևավորումը ցույց է տալիս, որ *L. ferrooxidans* CC-ն կարող է ունենալ ավելի մեծ քանակությամբ ԱՊՄ արտադրելու ունակություն:

ԱՊՄ-ների ուսումնասիրությունը: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ի տարբերություն Fe^{2+} -ի, պիրիտի վրա աճելիս *At. ferrooxidans* 61, *At. ferrooxidans* ZnC, *L. ferriphilum* CC և *Sb. thermosulfidooxidans* 6 կուլտուրաները, արտադրում են զգալիորեն ավելի մեծ քանակությամբ ԱՊՄ: Արտադրած ընդհանուր ԱՊՄ-ների քանակության աճման կարգով բակտերիաները կարելի է դասավորել հետևյալ հաջորդականությամբ. *Sb. thermosulfidooxidans* 6<*At. ferrooxidans* ZnC<*L. ferrooxidans* ZC<*At. ferrooxidans* 61<*L. ferriphilum* CC: Ինչպես ցույց են տալիս ներկայացված տվյալները, Fe^{2+} -ի վրա աճեցնելիս բակտերիաները ավելի շատ կործիդային ԱՊՄ են արտադրում, բացառությամբ *Sb. thermosulfidooxidans* 6 կուլտուրայի և ընդհակառակն, պիրիտի վրա աճելիս բակտերիաներն ավելի շատ պատիճային ԱՊՄ են առաջացնում, բացառությամբ *L. ferriphilum* CC-ի (աղ. 6):

Աղյուսակ 6

Fe^{2+} -ի և FeS_2 -ի վրա աճող բակտերիաների ԱՊՄ-ների կազմը ($\mu g/l$)

ԱՊՄ բաղադրությունը		Կուլտուրաները				
		<i>At. ferrooxidans</i> 61	<i>At. ferrooxidans</i> ZnC	<i>L. ferrooxidans</i> ZC	<i>L. ferriphilum</i> CC	<i>Sb. thermosulfidooxidans</i> 6
Մեծ Fe^{2+} -ի վրա աճելիս						
Կործիդային	Սպիտակուցներ	26	16	15	22	10
	Ածխաջրեր	5	5	4	3	3
	Ուրոնաթթու	չ.հ.	չ.հ.	1	2	չ.հ.
Պատիճային	Սպիտակուց	12	8	11	15	11
	Ածխաջրեր	6	5	5	6	4
	Ուրոնաթթու	չ.հ.	չ.հ.	1	1	չ.հ.
Պիրիտի վրա աճելիս						
Կործիդային	Սպիտակուցներ	468	591	568	1023	468
	Ածխաջրեր	408	286	475	1576	181
	Ուրոնաթթու	31	չ.հ.	չ.հ.	73	60
Պատիճային	Սպիտակուցներ	750	659	772	761	704
	Ածխաջրեր	307	341	446	744	399
	Ուրոնաթթու	44	չ.հ.	չ.հ.	60	չ.հ.

չ.հ.՝ չի հայտնաբերվել

Բոլոր կուլտուրաների մոտ ածխաջրերի քանակությունը պատիճային ԱՊՄ-ում ավելի բարձր է, քան կործիդային ԱՊՄ-ում: Մակայն կործիդային ԱՊՄ-ները պատիճայինի համեմատությամբ ավելի շատ սպիտակուցներ են պարունակում (աղ. 6): Որպես սուբստրատ պիրիտի օգտագործման դեպքում սպիտակուցների քանակությունը, ընհանուր առմամբ, ավելի բարձր է քան ածխաջրերինը ինչպես կործիդային, այնպես էլ պատիճային ԱՊՄ-ներում: Ուրոնային թթուների նշանակալի

քանակություն է հայտնաբերվել պիրիտի վրա աճող *At. ferrooxidans* 61-ի և Fe^{2+} -ի ու պիրիտի վրա աճող *L. ferriphillum* CC-ի բջիջների կողմից արտազատված ԱՊՄ-ներում:

4.2 Քաջարանի պղնձամոլիբդենային հանքավայրի հանքանմուշների մանրէաբանական տարրալուծումը

Քաջարանի հանքավայրի հանքաքարի նմուշներից պղնձի կենսակորզման նպատակով փորձարկվել են Կաշենի և Կավարտի հանքավայրերից մեկուսացված Ksh և Kv մանրէային համակեցությունները: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ Ksh և Kv մանրէային համակեցությունների միջոցով պղնձի կենսակորզման ամենաբարձր արդյունավետությունը սուլֆիդային և օքսիդացած հանքանմուշների դեպքում դիտվում է մասնիկների ≤ 45 մկմ չափսերի դեպքում: Ցույց է տրվել նաև, որ ԱԽ-ն 10-ից 20% ավելացնելու դեպքում պղնձի կորզումը փորձարկված մանրէային համակեցությունների կողմից աճում է մոտ 1.5-2 անգամ: Ksh աղապատացված կուլտուրաների օգտագործումը թույլ է տվել 15 օրվա ընթացքում ավելացնել սուլֆիդային հանքաքարից պղնձի կորզման աստիճանը մինչև 91-94% և 98%՝ ԱԽ-ի համապատասխանաբար 10 և 20%-ի դեպքում:

4.2.1 Հանքանմուշների և տարրալուծման մնացորդների ապարային կազմը

Հանքաքարի նմուշներում սուլֆիդային միներալների պարունակությունը ցածր է և հիմնականում ներկայացված է խալկոպիրիտով և պիրիտով, ինչպես նաև մոլիբդենիտով: Նախնական նմուշում հայտնաբերվել են նաև բորնիտի հետքեր: Նախնական նմուշի հետ համեմատած խալկոպիրիտի համեմատաբար ավելի փոքր կոնցենտրացիաներ են առկա ԿՏ-ի (2.9%) և ԿՏ-ի ստուգիչի (3.1%) մնացորդներում:

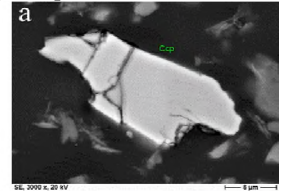
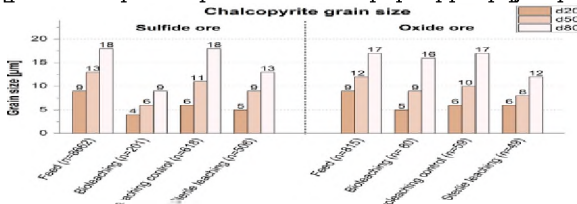
Քիմիական տարրալուծման մնացորդում նկատվել է խալկոպիրիտի կոնցենտրացիայի աննշան մեծացում՝ որոշ միներալների տարրալուծման արդյունքում (պիրոքսեններ, կարբոնատներ, մասամբ իլլիտ և կաոլինիտ), որոնք անկայուն են թթվային տարրավազման պայմաններում: Բացի այդ, կենսատարրալուծման նստվածքներում հայտնաբերվել են մանրահատիկ սուլֆատային ազրեզատներ, որոնք պարունակում են Al, Si, Fe-ի բարձր կոնցենտրացիաներ:

Օքսիդային հանքաքարում պղնձաբեր միներալները բաշխվել են խալկոպիրիտի և մալախիտի միջև 0.6% և 1.5% հարաբերակցությամբ, ինչը վկայում է խալկոպիրիտի փոխակերպման մասին օքսիդացման միջոցով: Տարրալուծման մնացորդներում դիտվել են թերթային սիլիկատների, մասնավորապես բիտոիտի և կարբոնատային ապարների քանակության մասնակի նվազում է: ԿՏ մնացորդներում դիտվել է Al-, Fe-, Si պարունակող սուլֆատների քանակության ավելացում, ինչը վկայում է թթվային տարրալուծման պայմանների, ինչպես նաև մանրէների ազդեցության ներքո տեղի ունեցած ակտիվ էրոզիայի մասին: Ալկնիայտ է, որ ընդհանուր առմամբ խալկոպիրիտի մասնաբաժինը ԿՏ մնացորդներում (0.7%) և տարրալուծման ստուգիչում (0.6%) ավելի ցածր է, քան քիմիական տարրալուծման մնացորդներում (0.9%): Այս արդյունքները համընկնում են ԿՏ փորձերի արդյունքների հետ, որոնք վկայում են թթվային

լուծույթում մալախիտի արագ տարրալուծման մասին, որին հաջորդում է մնացած խալկոպիրիտի ավելի դանդաղ տարրալուծումը:

4.2.2 Խալկոպիրիտի հատիկների առանձնահատկությունները

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ սուլֆիդային և օքսիդային հանքաքարերի մնացորդներում միներալների բաշխման վերլուծության արդյունքները լիովին համապատասխանում են ԿՏ փորձերի արդյունքներին (նկ. 8):



Նկ.9 CuFeS₂ մասնիկը սուլֆիդային հանքաքարի ԿՏ մնացորդում

Նկ. 8 CuFeS₂-ի մասնիկների բաշխումը ըստ չափային ֆրակցիաների (փոքր = 20%, միջին = 50%, առավելագույն = 80%):

Սուլֆիդային հանքաքարի ԿՏ փորձերում խալկոպիրիտը (CuFeS₂) գրոհի է ենթարկվել մանրեային արգասիքների կողմից, ինչը հանգեցրել է միներալի մակերեսի հետագա էրոզիային: Մեխանիկորեն անկայուն մասնիկները բաժանվել են ավելի փոքր մասնիկների, ինչը ապացուցվել է հատիկների չափսերի բաշխման տվյալների, միներալների բացազատման տվյալների վերլուծության և տարրալուծման մնացորդների SEM պատկերների միջոցով (նկ. 9): Օքսիդային հանքաքարի տարրալուծումը ընթանում է երկու փուլով. նախ՝ տեղի է ունենում կարբոնատային և հիդրօքսիդային ծածկող միներալների արագ թթվային տարրալուծում, ապա՝ CuFeS₂-ի մերկաբացված մակերեսները գրոհի են ենթարկվում մանրեային պրոդուկտների (H⁺, Fe³⁺) կողմից, CuFeS₂-ի մասնիկների բացազատմանը դատարկ ապարներից թույլ է տվել CuFeS₂-ի հետագա ավելի ակտիվ ԿՏ-ը:

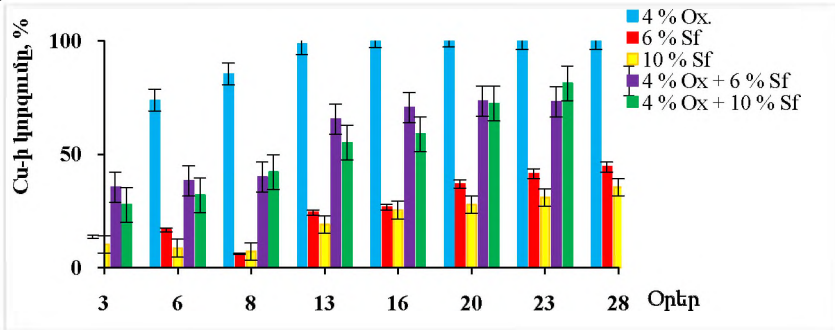
4.2.3 Քաջարանի հանքաքարի տարրալուծումը հանքանմուշների տարբեր հարաբերակցությունների դեպքում

Ուսումնասիրվել է Քաջարանի հանքաքարի սուլֆիդային և օքսիդացված հանքանմուշների հարաբերակցության և ԱԽ ազդեցությունը ԿՏ գործընթացի վրա՝ պղնձի կորզման արդյունավետությունը բարձրացնելու նպատակով: Ինչպես ցույց է տրված նկար 10-ում 4% օքսիդային հանքաքարի ավելացումը խթանում է սուլֆիդային հանքաքարի ԿՏ և հանգեցնում է լուծույթում պղնձի քանակության ավելացմանը:

Հարկ է նշել, որ օքսիդացված և սուլֆիդային հանքաքարերի խառնուրդի դեպքում պղնձի կորզումը կազմել է 82.3 և 84.2%, որից սուլֆիդային հանքաքարին բաժին ընկած քանակությունը հաշվարկների համաձայն կազմել է 67% և 76.5%: Հարկ է նշել, որ 4% օքսիդացված հանքաքարի ավելացման դեպքում 20 օրվա ընթացքում ընդհանուր առմամբ տարրալուծվել է ընդհանուր երկաթի միայն 52.7 և 57.6%-ը սուլֆիդային հանքաքարի 6% և 10% պարունակության դեպքում,

համապատասխանաբար: Կատարված ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ԱՄ-ում 4% օքսիդային հանքանմուշի պարունակության դեպքում սուլֆիդային հանքանմուշի կոնցենտրացիան 4-ից մինչև 16% բարձրացնելիս օրինաչափորեն մեծանում է տարրալուծված պղնձի բացարձակ քանակությունը 0.506-ից կազմելով 0.850 գ/լ Cu: Սակայն պղնձի ընդհանուր կորզման աստիճանի նվազում 90.3-ից՝ 4 %-ի դեպքում մինչև 76% 10%-ի դեպքում:

Պղնձի կորզման ամենացածր աստիճանը 65.7 և 64.6% դիտվել է ԱՄ-ում, համապատասխանաբար, սուլֆիդային հանքանմուշի 15 և 16% կոնցենտրացիայի դեպքում:



Նկ.10 Օքսիդային և սուլֆիդային հանքաքարի նմուշներից և դրանց խառնուրդից պղնձի կենսակորզումը «Ksh» համակեցության միջոցով

Այդուհանդերձ, ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ԱՄ օքսիդային հանքանմուշի հաշվին 14.0-ից մինչև 24% բարձրացնելիս մոտ 2 անգամ մեծանում է պղնձի կորզման աստիճանը 37.7-ից մինչև 75.9%:

Այսպիսով պղնձի կորզման աստիճանը կարելի է բարձրացնել՝ մեծացնելով ԱՄ օքսիդային հանքանմուշի հաշվին: Պղնձի կորզման տեսակետից սուլֆիդային և օքսիդային հանքանմուշների օպտիմալ սոկոսային հարաբերակցությունը ԱՄ-ում կազմում է 10:14:

ԵԶՐԱԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

- Կավարտի (ՀՀ) Կաշենի (ԼՂ) պղնձային հանքավայրերի ԹՇԴ նմուշներից և պղնձի ու ցինկի տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացվել և նույնականացվել են թթվա- և մետաղակայուն երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների մաքուր կուլտուրաներ՝ *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L և *Acidithiobacillus ferrooxidans* ZnC: Մեկուսացված *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L և *At. ferrooxidans* ZnC բակտերիաները ավանդադրվել են «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի ՄԱԿ-ում՝ ստանալով համապատասխան համարներ՝ MDC 7057 և MDC 7058: *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L և նախկինում մեկուսացված և ավանդադրված *L. ferriphilum* CC-ի (MDC 7047) [214] նուկլեոտիդային հաջորդականությունները մուտքագրվել են GenBank՝ ստանալով համապատասխան համարներ՝ ON226845 և OM272948 [191]:
- Ուսումնասիրվել է *L. ferriphilum* CC-ի աճի և Fe^{2+} -ի օքսիդացման կինետիկական կախված Fe^{2+} և Fe^{3+} իոնների կոնցենտրացիայից: Բակտերիայի աճի առավելագույն

տեսակար արագությունը (μ_{max})՝ 0.42 ժամ⁻¹ և Fe^{2+} -ի օքսիդացման առավելագույն արագությունը (V_{max})՝ 0.62գ/լ ժամ դիտվել է Fe^{2+} -ի 100 մՄ կոնցենտրացիայի դեպքում: Fe^{2+} -ի 200 մՄ և ավելի կոնցենտրացիաների դեպքում դիտվել է բակտերիաների աճի և Fe^{2+} -ի օքսիդացման ճնշում:

3. Հագեցման հաստատունի (Km) արժեքը *L. ferriphilum* CC-ի համար կազմել է 0.83 մՄ $FeSO_4$: Այսինքն *L. ferriphilum* CC-ի ինամակցությունը սուբստրատի նկատմամբ ավելի բարձր է, քան *Sb. thermosulfidooxidans*-ինը և *At. ferrooxidans*-ինը: Fe^{3+} -իոնների ներկայությամբ մեծանում է Km-ի արժեքը մինչև 1.5 մՄ $FeSO_4$: Fe^{3+} -ի իոնները մրցակցորեն ճնշում են երկաթի օքսիդացումը *L. ferriphilum*-ի մոտ: Ճնշման հաստատունի (Ki) արժեքը կազմել է 61.95 մՄ $Fe_2(SO_4)_3$:
4. Մետաղների իոնների ՆՃԽ եղել են 10 մՄ՝ Zn-ի, Co-ի համար և 20 մՄ՝ Cu-ի և Ni-ի համար: Պարզվել է, որ ըստ թունավորության աստիճանի մետաղների իոնները կարելի է դասավորել հետևյալ շարքով՝ $Mo > Co > Zn > Ni > Cu$: Ստացված արդյունքները համեմատելով գրականության տվյալների հետ, կարելի է եզրակացնել, որ ուսումնասիրված *L. ferriphilum* CC շտամը Cu-ի Zn-ի և Ni-ի իոնների նկատմամբ կայունությամբ չի զիջում մետաղներ տարրալուծող այլ բակտերիաներին: Պարզվել է նաև, որ սուբստրատի կոնցենտրացիան մեծացնելիս կարելի է բարձրացնել մեկուսացված բակտերիաների կայունությունը մետաղների նկատմամբ:
5. Բակտերիաների աճին զուգընթաց դիտվել է մետաղների իոնների արգելակիչ ազդեցության նվազում: Ենթադրվում է, որ աճի ընթացքում բակտերիաները սինթեզում են ԱՊՄ և առաջացնում են կենսաթաղանթ, որը պաշտպանում է բակտերիալ բջիջները միջավայրի անբարենպաստ գործոններից, այդ թվում նաև ծանր մետաղների ազդեցությունից: Մեկուսացված բակտերիաները ցուցաբերել են ԱՊՄ գերարտադրելու և կենսաթաղանթներ ձևավորելու ունակություն: Ըստ արտադրած ընդհանուր ԱՊՄ-ների քանակությունների աճման բակտերիաները կարելի է դասավորել հետևյալ կարգով *Sb. thermosulfidooxidans* 6 <*At. ferrooxidans* ZnC <*At. ferrooxidans* 61 <*L. ferriphilum* CC:
6. Քաջարանի պղնձի պորֆիրային հանքաքարի ԿՏ ամենաբարձր արդյունավետությունը մեկուսացված բակտերիաներ համակեցությունների միջոցով դիտվել է 45մկմ ՄՉ-ի և 20% ԱԽ-ի դեպքում: Համեմատական ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ Ksh կուլտուրան ավելի արդյունավետ է սուլֆիդային հանքաքարի ԿՏ համար: Ադապտացված կուլտուրաների օգտագործումը թույլ է տվել 15 օրվա ընթացքում ավելացնել սուլֆիդային հանքաքարից պղնձի կորզման աստիճանը մինչև 91-94% և 98%՝ ԱԽ-ի համապատասխանաբար 10 և 20%-ի դեպքում:
7. Սուլֆիդային և օքսիդային հանքաքարերի մնացորդներում միներալների բաշխման վերլուծության արդյունքները լիովին համապատասխանում են ԿՏ փորձերի արդյունքներին: Սուլֆիդային հանքաքարի ԿՏ փորձերում խալկոպիրիտը գրոհի է ենթարկվել մանրէային արգասիքների կողմից, ինչը հանգեցրել է միներալի մակերեսի հետագա էրոզիային: Մեխանիկորեն անկայուն մասնիկները բաժանվել

են ավելի փոքր մասնիկների, ինչը կարելի է ապացուցել հատիկների չափսերի բաշխման, միներալների բացազատման սովյալների վերլուծության և տարրալուծման մնացորդների SEM պատկերների միջոցով:

8. Օքսիդային հանքաքարի տարրալուծումն ընթանում է երկու փուլով. նախ՝ տեղի է ունենում կարբոնատային և հիդրօքսիդային ծածկող միներալների արագ թթվային տարրալուծում, ապա խալկոպիրիտի մերկաբացված մակերեսները գրոհի են ենթարկվում մանրեային արգասիքների (H^+ , Fe^{3+} իոններ) կողմից:
9. Սուլֆիդային հանքանմուշից պղնձի կորզման աստիճանը կարելի է բարձրացնել՝ մեծացնելով ԱԽ խտությունը օքսիդային հանքանմուշի հաշվին: Պղնձի կորզման տեսակետից սուլֆիդային և օքսիդային հանքանմուշների օպտիմալ սոկոսային հարաբերակցությունը ԱԽ-ում կազմում է 10:14: Օքսիդային հանքաքարի ավելացումը խթանում է պղնձի ԿՏ սուլֆիդային հանքաքարից և ձևում պիրիտի օքսիդացումը:

ԱՏԵՆԱՆՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՑԱԿ

1. Vardanyan A., Vardanyan N., **Khachatryan A.**, Melkonyan Z. Chemical oxidation integrated into bioleaching of pyrite and chalcopyrite using immobilized biomass //Environment Engineering and Management Journal, 2018, Vol.17, No.4, p. 897 - 904. <http://eemj.eu/index.php/EEMJ/article/view/3554>. **Web of Science (IF-1.33)**
2. Vardanyan A., Vardanyan N., **Khachatryan A.**, Zhang R., Sand W. Adhesion to Mineral Surfaces by Cells of *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* from Armenian Sulfide Ores. Minerals. 2019, 9, 69, p.1-13. <https://doi.org/10.3390/min9020069>, **Web of Science (IF-2.25)**
3. **Khachatryan A. S.** Influence of F^{e2+} and F^{e3+} on the growth of *Leptospirillum ferriphilum* CC and oxidation of F^{e2+} . // Biolog. Journal of Armenia, 3 (71), 2019, p. 83-88.
4. **Khachatryan A.S.**, Melkonyan Z. S., Abrahamyan N. M., Vardanyan, N. S. Biohydrometallurgical processing of low-grade copper-molybdenum ore. // Biolog. Journal of Armenia, 3 (72), 2020, p. 29-36.
5. **Khachatryan A.S.**, Vardanyan N.S., Vardanyan A.K., Zhang R. Y., Castro L. The effect of metal ions on the growth and ferrous iron oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* CC isolated from Armenia mine sites. //Metals, 2021, 11, 425, p.1-13 <https://doi.org/10.3390/met11030425>, **Web of Science (IF-2.117)**
6. Vardanyan N.S., **Khachatryan A.S.**, Kamradt A., Willscher S., Vardanyan A.K. Microbiological Processing of a Porphyry Copper Ore and Mineralogical Analysis of Solid Residues. // GEOMICROBIOLOGY JOURNAL 2022, VOL. 39, NO. 7, p. 606–618 <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2060385>. **Web of Science (IF-2.4)**
7. Vardanyan A., **Khachatryan A.**, Castro L. Willscher S, Gaydardzhiev S., Zhang R., Vardanyan N. Bioleaching of Sulfide Minerals by *Leptospirillum ferriphilum* CC from Polymetallic Mine (Armenia). Minerals 2023, 13, p.1-15; <https://doi.org/10.3390/min13020243>, **Web of Science (IF-2.69)**
8. Варданян Н.С., Варданян А. К., **Хачатрян А.С.** Окисление пирита и халькопирита чистыми и смешанными культурами новых железо- и сероокисляющих бактерий //Материалы 5-ого Всероссийский симпозиум с международным участием" Автотрофные микроорганизмы"-М.,МАКС Пресс, 2015 г.,с.87. ISBN 978-5-317-051419

9. Варданян Н.С., **Хачатрян А.**, Варданян А.К., Мелконян З.С. Разработка эффективных консорциумов бактерий для выщелачивания халькопирита. Материалы. Международной научно-практической конференции «Микробное биоразнообразие: актуальные проблемы и решения», посвященной 25-летию Независимости Республики Казахстан, Астана, 2016, с. 136- 140.
10. Варданян А.К., **Хачатрян А.**, Мелконян З.С., Варданян Н.С. Биоразнообразие хемолитотрофных железо- и серо-окисляющих бактерий в сульфидных месторождениях Армении. Материалы. Международной научно-практической конференции «Микробное биоразнообразие: актуальные проблемы и решения», посвященной 25-летию Независимости Республики Казахстан, Астана, 2016, с. 64-67.
11. Vardanyan N., Sevoyan G., Vardanyan A., Melqonyan Z., **Khachatryan A.** The prevalence and biodiversity of microorganisms relevant to AMD generation in metallurgical wastes and tailings. Book of Abstracts, IV International Scientific Conference of Young Researches, Biotechnology: Science and Practice, September 28-30, 2017, Yerevan, Armenia, p.7.
12. **Khachatryan A.**, Vardanyan N., Melqonyan Z., Vardanyan A. Study of resistance of isolated *Leptospirillum ferriphilum* CC and *Acidithiobacillus* sp. 13Zn to copper and zinc. Book of Abstracts, IV International Scientific Conference of Young Researches, Biotechnology: Science and Practice, September 28-30, 2017, Yerevan, Armenia, p.20-21.
13. **Khachatryan A. S.**, Vardanyan N.S., Melkonyan Z.S., Vardanyan A.K. The influence of metal ions on ferrous ion oxidation kinetics by *Letospirillum ferriphilum*, 23rd International Biohydrometallurgy Symposium, IBS 2019 Fukuoka, Japan, 20-23 October, p.166.
14. **Khachatryan A.S.**, Vardanyan N., Tolerance of isolated metal leaching bacteria to Mo⁶⁺, Book of Abstracts. International Conference “MICROBES: Biology & Application”, October 9-11, 2019, Yerevan, Armenia, p.37-38. ISBN 978-9939-1-1010-3.
15. **Khachatryan A.S.**, Melkonyan Z., Vardanyan A., Vardanyan N., Biohydrometallurgical processing of Kajaran low-grade copper-molybdenum ores, Book of Abstracts. International Conference “MICROBES: Biology & Application”, October 9-11, 2019, Yerevan, Armenia, p.39-40. ISBN 978-9939-1-1010-3.
16. Vardanyan N., **Khachatryan A.**, Melkonyan Z., Abrahamyan N., Vardanyan A. Processing of low-grade copper-molybdenum ores by indigenous microbial cultures// FEMS Online Conference on Microbiology//, 28-31 October 2020, Belgrade, Serbia, Electronic Abstract Book, p.5. <https://fems2020.belgrade.com/Presentation>
17. **Khachatryan A.**, Vardanyan A., Abrahamyan N., Vardanyan N., Z. Melkonyan Bioleaching of sulfide and oxide ores. International Scientific and Practical Conference “Biotechnology: Science and Practice, Innovation and Business” dedicated to the 10th Anniversary of the SPC “Armbiotechnology” NAS RA, October 20-22, 2021, Yerevan, Armenia, Articles Part II, p. 65-68. ISBN 978-9939-1-1354-8. <http://biotechnology-spib-2021.com>
18. **Khachatryan A.**, Vardanyan A., Kamradt A., Willcher S., Vardanyan N. Efficient extraction approaches for the bioleaching of copper from Kajaran porphyry ore and mineralogical investigation. //24th International Biohydrometallurgy Symposium (IBS) 2022 | Perth, Australia & online | 20-23 November 2022, p.63

ISOLATION, STUDY OF NEW CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA RESISTANT TO HEAVY METALS AND PERSPECTIVES FOR APPLICATION IN BIOLEACHING

SUMMARY

Key words: Chemolithotrophic bacteria *Leptospirillum ferriphilum*, iron oxidation kinetics, pH and metalresistance, biofilm, bioleaching of porphyry ores, copper extraction, analysis of dissolved residues, minerals distribution and grain size.

The distribution of acidophilic CB in Acid Mine Drainage (AMD) of the Kavart (RA) and Kashen (NK) copper deposits was studied. It was revealed that AMD is mainly represented by CB belonging to the genera *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* and *Sulfobacillus*. From the mentined deposits, as well as experimental bioleaching systems, acid- and metal-resistant CB were isolated, which, using modern molecular biological methods, were identified as *Acidithiobacillus ferrooxidans* ZnC and *Leptospirillum ferrodiazotrophum* Ksh-L. Moreover, the latter species was isolated and described for the first time in Armenia. The isolated bacteria were deposited at the Microbial Depository Center (MDC) of the SPC "Armbiotechnology", and their nucleotide sequences are included in GenBank, having received the corresponding accession numbers: *L. ferriphilum* CC (OM272948), *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L (MDC 7057, ON226845), *At. ferrooxidans* ZnC (MDC 7058).

The growth kinetics of isolated *L. ferriphilum* CC and Fe^{2+} oxidation depending on the concentration of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions have been studied. The maximum rate of Fe^{2+} oxidation by bacteria (6.2 mM/L h) was observed at a concentration of 100 mM $\text{FeSO}_4 \cdot x7\text{H}_2\text{O}$. At concentrations of $\text{FeSO}_4 \cdot x7\text{H}_2\text{O}$ above 200 mM, inhibition of bacterial growth and Fe^{2+} oxidation was observed. The maximum specific growth rate (μ_{max}) and substrate saturation constant (Ks) were 0.48 h^{-1} and 0.83 mM FeSO_4 , respectively. Thus, *L. ferriphilum* CC significantly outperforms *At. ferrooxidans* and *Sb. thermosulfidooxidans* in terms of affinity for the substrate (Fe^{2+}) (Kovalenko et al., 1982; Norris et al., 1988; Vardanyan et al., 1990). It was also shown that Fe^{3+} ions competitively suppress Fe^{2+} oxidation. The inhibition constant (K_i) was 61.95 mM $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.

Minimal inhibitory concentrations of metal ions for isolated *L. ferriphilum* CC and *At. ferrooxidans* ZnC was 10 mM for Zn^{2+} and Co^{2+} and 20 mM for Cu^{2+} and Ni^{2+} . It has been established that, according to the degree of toxicity, metal ions can be arranged in the following order: $\text{Mo} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cu}$. Studies have shown that an increase in the concentration of the substrate leads to an increase in the resistance of isolated bacteria to metal ions. Comparing the obtained results with the literature data, we can conclude that the isolated *L. ferriphilum* CC and *At. ferrooxidans* ZnC in terms of resistance to copper, zinc, and nickel ions are generally not inferior to other bacteria used in metal bioleaching (Rawlings et al., 1999; Dew et al., 1999).

It is noteworthy that, as bacteria grew, a decrease in the inhibitory effect of metal ions was observed. It is assumed that during growth, bacteria synthesize extracellular polymeric compounds (EPS) and form a biofilm that protects bacterial cells from adverse environmental factors, including heavy metal ions. Studies have shown that *L. ferriphilum* CC, *At. ferrooxidans* 61, *Sb. thermosulfidooxidans* 6 form a monolayer biofilm on the pyrite surface. Bacteria can be arranged in the following order according to the increase in the number of produced EPS: *Sb. thermosulfidooxidans* 6 < *At. ferrooxidans* ZnC < *At. ferrooxidans* 61 < *L. ferriphilum* CC. The synthesis of a larger amount of *L. ferriphilum* CC EPS is evidenced by the formation of a large

cluster biofilm on the pyrite surface. It was shown that, in contrast to Fe^{2+} , when grown on pyrite, bacteria produce a greater amount of EPS. At the same time, when growing on pyrite, the bacteria produce mainly capsular EPS, and in the case of Fe^{2+} - colloidal EPS dominate. Studies have shown that when grown on Fe^{2+} , the amount of carbohydrates in the capsular EPS is greater than in the colloidal EPS. Instead, colloidal EPS contain a higher amount of protein. When pyrite is used as a substrate, the amount of proteins exceeds the amount of carbohydrates in both capsular and colloidal EPS. In colloidal EPS *Sb. thermosulfidooxidans* 6 when grown on pyrite, uronic acids were also revealed.

Associations of CB isolated from the AMD Kashen and Kavart copper deposits, were used to assess the possibility of copper bioleaching from the Kajaran porphyry ore. The results obtained showed that the highest efficiency of bioleaching of porphyry copper ore by the bacteria associations used was observed at a particle size of 45 μm and a pulp density (PD) of 20% for both sulfide and oxide ore samples. A comparative study of the microbial associations of Ksh and Kv showed that the Ksh culture was more effective for the bioleaching of sulfide ore. The use of adapted cultures made it possible to increase the degree of copper extraction from sulfide ore to 91-94% and 98% in 15 days at 10 and 20% PP, respectively.

Studies have shown that the extraction of copper from sulfide ore can be enhanced with an increase in PD at the expense of oxidized ore. From the point of view of copper extraction, the optimal ratio of sulfide and oxidized ores in the pulp was 10:14. Notably, the addition of oxide ore promotes copper bioleaching from sulfide ore and inhibits pyrite oxidation.

The results of the analysis of the distribution of minerals in the residues of sulfide and oxidized ores are fully consistent with the results of experiments on bioleaching. An analysis of the distribution of minerals in the dissolution residues of the sulfide ore sample showed that the bioleaching residue had the smallest amount of chalcopyrite compared to the abiotic control. Analysis of the grain size of chalcopyrite showed that chalcopyrite in the bioleaching residues of sulfide ore is much finer-grained compared to chemical leaching residues. This may indicate more active dissolution of chalcopyrite due to biodegradation, which contributed to a significant increase in copper extraction. In experiments on bioleaching of sulfide ore, chalcopyrite was attacked by microbes, which led to further erosion of the surface of the mineral. Mechanically unstable particles were broken down into smaller particles as evidenced by particle size distribution data, analysis of mineral release data and SEM images of leachate residues. The leaching of oxidized ore proceeds in two stages. first, there is a rapid acid dissolution of the carbonate and hydroxide coating minerals, then the exposed surfaces of chalcopyrite are attacked by microbial products (H^+ , Fe^{3+} ions).

АННА СЕРЖИКОВНА ХАЧАТРЯН

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
УСТОЙЧИВЫХ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В
ПРОЦЕССАХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ**

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: Хемолитотрофные бактерии *Leptospirillum ferriphilum*, кинетика окисления железа, pH и металлоустойчивость, биофильм, биовыщелачивание порфировых руд, извлечение меди, анализ остатков выщелачивания, распределение минералов и размер зерен

Изучено распространение ацидофильных хемолитотрофных бактерий (ХБ) в кислых дренажных водах (КДВ) Кавартского (Республики Армения) и Капенского (Нагорный Карабах) медных месторождений. Выявлено, что КДВ в основном представлены ХБ, принадлежащими к родам *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* и *Sulfobacillus*. Из указанных месторождений, а также экспериментальных систем биовыщелачивания, выделены кислото- и металлоустойчивые ХБ, которые с использованием современных молекулярно-биологических методов идентифицированы как *Acidithiobacillus ferrooxidans* ZnC, *Leptospirillum ferriphilum* CC и *Leptospirillum ferrodiazotrophum* Ksh-L. Причем последний вид впервые выделен и описан в Армении. Выделенные бактерии были депонированы в Центре Депонирования Микроорганизмов (MDC) ИПЦ "Армбиотехнология", а их нуклеотидные последовательности внесены в GenBank, получив соответствующие номера: *L. ferriphilum* CC (OM272948), *L. ferrodiazotrophum* Ksh-L (MDC 7057, ON226845), *At. ferrooxidans* ZnC (MDC 7058).

Изучена кинетика роста выделенной *L. ferriphilum* CC и окисления Fe^{2+} в зависимости от концентрации ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} . Максимальная скорость окисления Fe^{2+} бактериями (6.2 мМ/л час) наблюдалась при концентрации 100 мМ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. При концентрациях железа выше 200 мМ наблюдалось подавление роста бактерий и окисления Fe^{2+} . Значения максимальной удельной скорости роста (μ_{max}) и константы насыщения субстратом (K_s) составили 0.48 ч⁻¹ и 0.83 мМ $FeSO_4$ соответственно. Таким образом *L. ferriphilum* CC значительно превосходит *At.ferrooxidans* и *Sb.thermosulfidooxidans* по сродству к субстрату (Fe^{2+}) (Коваленко и др., 1982; Norris et al., 1988; Варданян и др., 1990). Показано также, что ионы Fe^{3+} конкурентно подавляют окисление Fe^{2+} . Константа ингибирования (K_i) составила 61.95 мМ $Fe_2(SO_4)_3$.

Минимальные ингибирующие концентрации ионов металлов у выделенных *L. ferriphilum* CC и *At. ferrooxidans* ZnC составляли 10 мМ для Zn^{2+} и Co^{2+} и 20 мМ для Cu^{2+} и Ni^{2+} . Установлено, что по степени токсичности ионы металлов могут располагаться в следующем порядке: $Mo > Co > Zn > Ni > Cu$. Исследования показали, что увеличение концентрации субстрата приводит к повышению устойчивости выделенных бактерий к ионам металлов. Сопоставляя полученные результаты с литературными данными, можно сделать вывод, что выделенные *L. ferriphilum* CC и *At. ferrooxidans* ZnC по устойчивости к ионам меди, цинка, никеля в целом не уступают другим бактериям, используемым в процессах биовыщелачивания металлов. (Rawlings et al., 1999; Dew et al., 1999).

Примечательно, что по мере роста бактерий наблюдалось снижение ингибирующего действия ионов металлов. Предполагается, что в процессе роста бактерии синтезируют внеклеточные полимерные соединения (ВПС) и образуют биопленку, защищающую бактериальные клетки от неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе от ионов тяжелых металлов. Исследования показали, что *L. ferriphilum* CC, *At.ferrooxidans* 61, *Sb. thermosulfidooxidans* 6 образуют монослойную биопленку на поверхности пирита. По нарастанию количества продуцируемых ВПС бактерии можно расположить в следующем порядке: *Sb. thermosulfidooxidans* 6 < *At. ferrooxidans* ZnC < *At. ferrooxidans* 61 < *L. ferriphilum* CC. О синтезе большего количества ВПС *L. ferriphilum* CC свидетельствует также образование крупной кластерной биопленки на поверхности пирита. Показано, что в отличие от Fe^{2+} , при выращивании на пирите бактерии продуцируют большее количество ВПС. В то же время при росте на пирите бактерии продуцируют в основном капсульные ВПС, а в случае Fe^{2+} - коллоидные ВПС.

Исследования показали, что при выращивании на Fe^{2+} количество углеводов в капсульном ВПС больше, чем в коллоидном ВПС. Вместо этого коллоидные ВПС содержат

большее количество белка. При использовании пирита в качестве субстрата количество белков превышает количество углеводов как в капсульных, так и в коллоидных ВПС. В коллоидных ВПС *Sb. thermosulfidoxidans* 6 при росте на пирите обнаружены также уроновые кислоты.

Ассоциации ХБ, выделенные из КДВ Капенского и Кавартского медных месторождений, были использованы для оценки возможности биовыщелачивания меди из Каджаранской порфириновой руды. Полученные результаты показали, что наибольшая эффективность биовыщелачивания медно-порфириновой руды используемыми ассоциациями бактерий наблюдалась при размере частиц 45 мкм и плотности пульпы (ПП) 20% как для образцов сульфидной, так и для оксидной руды. Сравнительное изучение микробных ассоциаций Ksh и Kv показало, что культура Ksh была более эффективной для биовыщелачивания сульфидной руды. Использование адаптированных культур позволило повысить степень извлечения меди из сульфидной руды до 91-94 % и 98 % за 15 суток при 10 и 20 % ПП соответственно. Исследования показали, что степень извлечения меди из сульфидной руды можно повысить с увеличением ПП за счет окисленной руды. С точки зрения извлечения меди оптимальным соотношением сульфидных и окисленных руд в пульпе было 10:14. Примечательно, что добавление оксидной руды способствует биовыщелачиванию меди из сульфидной руды, но подавляет окисление пирита.

Результаты анализа распределения минералов в остатках сульфидных и окисленных руд полностью соответствуют результатам экспериментов по биовыщелачиванию. Анализ распределения минералов в остатках растворения образца сульфидной руды показал, что в остатке биовыщелачивания осталось наименьшее количество халькопирита по сравнению с абиотическим контролем. Анализ размеров зерен халькопирита показал, что халькопирит в остатках биовыщелачивания сульфидной руды значительно более мелкозернистый по сравнению с остатками химического выщелачивания. Это может свидетельствовать о более активном растворении халькопирита за счет биодеградации, что способствовало значительному увеличению извлечения меди. В экспериментах по биовыщелачиванию сульфидной руды халькопирит подвергался атаке микробов, что приводило к дальнейшей эрозии поверхности минерала. Механически нестабильные частицы были разбиты на более мелкие частицы, о чем свидетельствуют данные о гранулометрическом составе, анализ данных о высвобождении минералов и SEM-изображения остатков фильтрата. Выщелачивание окисленной руды протекает в две стадии. сначала происходит быстрое кислотное растворение карбонатных и гидроксидных покрывающих минералов, затем открытые поверхности халькопирита атакуют микробные продукты (ионы H^+ , Fe^{3+}).