

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ ԱՐԵՎԻԿ ԿԱՐԵՆԻ

ՆՈՐ ՔԵՍՈՒԽԹՈՏՐՈՖ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄԵԿՈՒՍԱՑՈՒՄԸ ԵՎ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒԼՖԻԴԱՑԻՆ ՄԻՆԵՐԱԼՆԵՐԻ
ԿԵՆՍԱՏԱՐՐԱԼՈՒԾՄԱՆ ԳՈՐԾԸՆԹԱՑՆԵՐՈՒՄ

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

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան – 2015

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ВАРДАНЯН АРЕВИК КАРЕНОВНА

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В
ПРОЦЕССАХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ СУЛЬФИДНЫХ МИНЕРАЛОВ

АВТОРЕФЕРАТ

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

Ереван - 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Լ.Ս. Մարկոսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս Է.Գ. Աֆրիկյան
կ.գ.թ. Ա.Ա. Համբարձումյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015թ. հուլիսի 10-ին, ժամը 15⁰⁰ -ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

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

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

Սեղմագիրն առաքված է 2015թ. հունիսի 10-ին

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ.՝ Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель: к.б.н. Л.С. Маркосян

Официальные оппоненты: Академик НАН РА Э.Г. Африкян

к.б.н. А.А. Амбарцумян

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 10 июля 2015 г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

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

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

Автореферат разослан 10 июня 2015г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н. Г.Е. Аветисова

Աշխատանքի ընդհանուր բնութագիրը

Արդիականությունը: Քենոլիթոտրոֆ բակտերիաների (ՔԲ) և նրանց կենսագործունեությամբ պայմանավորված գործընթացների ուսումնասիրությունը հանդիսանում է երկրամանրէաբանության հիմնական խնդիրներից մեկը, որի պարզաբանումը ունի ոչ միայն գիտական, այլև գործնական մեծ նշանակություն՝ կապված տարբեր հանքային հումքից մետաղների մանրէաբանական կորզման հետ: ՔԲ հանդիսանում են մանրէների յուրահատուկ խումբ, որոնք իրենց կենսագործունեության համար անհրաժեշտ էներգիան ստանում են երկարժեք երկաթի, ծծմբի վերականգնված միացությունների (RISCs) և սուլֆիդային միներալների օքսիդացման գործընթացներում (Johnson, 2014; Shippers 2007; Rohwerder, Sand, 2003): Ժամանակակից մոլեկուլային կենսաբանական մեթոդների կիրառումը թույլ է տվել բացահայտել ՔԲ զգալի բազմազանություն սուլֆիդային հանքավայրերում (Johnson, 1998, Hallberg, Johnson, 2001; Baker, Banfield, 2003): Իսկ վերջերս *Acidithiobacillus ferrooxidans*-ի շտամների մուլտիլոկուսային նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը թույլ տվեց հայտնաբերել նոր ցեղ՝ *Acidiferrobacter thiooxidans* և մեկ նոր տեսակ՝ *Acidithiobacillus* (Amouric et al., 2010; Hallberg et al., 2011): Ներկայումս հաշվում են բակտերիաների մեկ տասնյակից ավելի խմբեր, որոնք բնակեցնում են սուլֆիդային հանքավայրերի բիոտոպերը՝ թթու հանքահոսքաջրերը և հանքաթափոնները: Այդուհանդերձ, տարբեր սուլֆիդային հանքավայրերի բնական և տեխնագեն բիոտոպերի ներուժը ՔԲ բազմազանության տեսակետից դեռևս լիովին բացահայտված չէ:

Միաժամանակ պարզվել է, որ հանքային հումքից արժեքավոր մետաղների կորզման արդյունավետությունը մեծապես պայմանավորված է բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկություններով, այդ թվում Fe(II)-ը, RISCs-ը և մետաղների սուլֆիդները օքսիդացնելու ակտիվությամբ: Իսկ վերջինս ուղղակիորեն առնչվում է միներալի մակերեսին բակտերիաների ադհեզիայի, կենսաթաղանթ առաջացնելու և օքսիդացման գործընթացներում ներագրավված ֆերմենտների ակտիվության հետ: Բակտերիաների ամրացումը միներալի մակերեսին զգալիորեն ավելացնում է մետաղների տարրալուծումը (Sand et al., 1995; Rohwerder et al., 2003): Հարկ է նշել, որ այս տվյալները ստացվել են հիմնականում *At.ferrooxidans*-ի ուսումնասիրությունների արդյունքում (Olson et al., 2003): Մինչդեռ *Leptospirillum*, *Acidimicrobium* և *Sulfobacillus* ցեղերին պատկանող բակտերիաները, որոնք օժտված են սուլֆիդային միներալների օքսիդացման առավել բարձր ակտիվությամբ (Olson et al., 2003; Rawlings et al., 2003; Ваднян, Нагдалян, 2009), թերի կամ բոլորովին ուսումնասիրված չեն:

Հայաստանը հարուստ է տարբեր տիպի մետաղական հանքավայրերով և չնայած իրականացված ծավալուն էկոլոգիական հետազոտությունների, դրանց մեծ ներուժը ՔԲ բազմազանության իմաստով լիովին բացահայտված չէ: Այս առումով առաջնահերթ խնդիրներից է նաև սուլֆիդային միներալների՝ պիրիտի, խալկոպիրիտի, սֆալերիտի տարրալուծման բարձր ակտիվությամբ օժտված

մանրէների հայտնաբերումը, նրանց կենսաբանական առանձնահատկությունների, մասնավորապես տարրալուծման գործընթացների ուսումնասիրությունը:

Այսպիսով ակնհայտ է, որ նոր արդյունավետ ՔԲ հայտնաբերումն ու նրանց կենսաբանական առանձնահատկությունների՝ այդ թվում միներալների մակերեսին ադիեզվելու, կենսաթաղանթ առաջացնելու և մետաղների տարրալուծման ակտիվության և այդ գործընթացներում ներգրավված ֆերմենտների ուսումնասիրությունները միանգամայն արդիական են ինչպես մանրէաբանության հիմնարար խնդիրների պարզաբանման, այնպես էլ մետաղների կորզման գործընթացի արդյունավետության բարձրացման համար:

Նպատակը և խնդիրները: Աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել ՔԲ տարածվածությունը Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերում, բնական բիոտոպերից և փորձարարական համակարգերից մեկուսացնել երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող ՔԲ առավել արդյունավետ շտամներ, ուսումնասիրել նրանց ադիեզիայի և կենսաթաղանթ առաջացնելու ունակությունները՝ կապված սուլֆիդային միներալների տարրալուծման և մետաղների կորզման գործընթացի հետ: Այդ նպատակի իրականացման համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- ուսումնասիրել Հայաստանի տարբեր սուլֆիդային հանքավայրերում ՔԲ բազմազանությունը, բնական բիոտոպերից, ինչպես նաև տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացնել բարձրակտիվ ՔԲ,
- մեկուսացված ՔԲ կենսաբանական առանձնահատկությունների ուսումնասիրություն և նրանց նույնականացում,
- ուսումնասիրել միներալի մակերեսին մեկուսացված բակտերիաների ադիեզիայի և կենսաթաղանթ առաջացնելու յուրահատկությունները՝ կապված պիրիտի կենսաօքսիդացման գործընթացի հետ,
- իրականացնել մեկուսացված բակտերիաների իմոբիլիզացումը բնական կրիչների՝ ցեոլիտ, շունգիտ վրա,
- ուսումնասիրել մետաղների ընտրողական կորզման հնարավորությունները մեկուսացված բակտերիաների և նրանց համակեցությունների կիրառմամբ:

Գիտական նորույթը: Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերից և տարրալուծման համակարգերից մեկուսացվել են ՔԲ, որոնք ժամանակակից մոլեկուլային կենսաբանական մեթոդների կիրառմամբ նույնականացվել են որպես *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus albertensis* և *Sulfobacillus thermosulfidoxidans*: Ընդ որում, *At.ferrivorans*, *L.ferriphilum*, *At.albertensis* տեսակները Հայաստանում մեկուսացվել են առաջին անգամ: Մեկուսացված 13Յո և SO-2 շտամները կարող են ներկայացնել *Acidithiobacillus* ցեղի նոր տեսակներ: Մեկուսացված բակտերիաները ավանդադրվել են Մանրէների ավանդադրման կենտրոնում (ՄԱԿ) և ստացել են համապատասխան շիֆր և համարներ (MDC 7040, MDC 7041, MDC 7042, MDC 7043, MDC 7044, MDC 7045, MDC 7046, MDC 7047, MDC 7048): Բակտերիաների 16S ռԲՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունները ընդգրկվել են Gen Bank-ում (KM819691, KM819192, KM819693, KP455985, KP455986): AFM և EFM

մանրադիտակների կիրառմամբ բացահայտվել են մեկուսացված բակտերիաների պիրիտի մակերեսին ադիեզվելու և կենսաթաղանթ առաջացնելու առանձնահատկությունները: Բացահայտվել է ուղղակի կապ պիրիտի տարրալուծման ինտենսիվության և բակտերիաների ադիեզիայի, կենսաթաղանթ առաջացնելու առանձնահատկությունների միջև: Առաջին անգամ իրականացվել է մեկուսացված *Leptospirillum* spp. և *Sulfobacillus* spp. բակտերիաների իմոբիլիզացում բնական անօրգանական կրիչների՝ ցեոլիտի և շունգիտի վրա: Յույց է տրվել, որ ՔԲ իմոբիլիզացված համակարգերի կիրառումը զգալիորեն բարձրացնում է Fe (II)-ի օքսիդացման ինտենսիվությունը:

Գործնական նշանակությունը: Ստեղծվել է լավ ուսումնասիրված, ժամանակակից մոլեկուլային կենսաբանական մեթոդների հիման վրա նույնականացված ՔԲ հավաքածու: Հավաքածուն ունի ոչ միայն կարևոր նշանակություն մանրէաբանության հիմնարար խնդիրների պարզաբանման, այլև մեծ գործնական նշանակություն՝ կիրառելու համար մետաղների մանրէաբանական տարրալուծման գործընթացներում: Ադիեզիայի և կենսաթաղանթի առաջացման տեսակային առանձնահատկությունների բացահայտումը կարող է ունենալ կարևոր գործնական նշանակություն՝ կարգավորելու համար միներալների տարրալուծման գործընթացները: Շունգիտի և ցեոլիտի վրա իմոբիլիզացված բակտերիաները կարող են հեռանկարային լինել բարձրացնելու համար արժեքավոր մետաղների կորզման տեխնոլոգիական գործընթացների արդյունավետությունը: Տարրալուծող բակտերիաների համակեցության (ՏԲՀ) կիրառումը հնարավորություն է ընձեռում զգալիորեն ավելացնել արժեքավոր մետաղների կորզումը ցինկի խտանյութից, ինչպես նաև իրականացնել պղնձի, ցինկի և այլ մետաղների ընտրողական կորզում:

Առնչությունը գիտական թեմաների հետ: Աշխատանքը կատարվել է բազային ֆինանսավորման թեմայի, ինչպես նաև Գիտության և կրթության աջակցության հայկական հիմնադրամի (ANSEF) NS 2091 «Նոր արդյունավետ կենսատարրավացման գործընթաց՝ բազմամետաղային հանքաքարերից գունավոր և այլ արժեքավոր մետաղների կորզման համար» (2010թ.), Հայ-Գերմանական «ՀՀ ԿԳՆ ԳՊԿ-ԳԿՀԴՆ-2012» (SCS-BMBF) N 12GE-005 «Նոր մետաղ տարրավացող միկրոօրգանիզմների մեկուսացումը, բնութագրումը և հիդրոմետալուրգիական գործընթացների ինտենսիվացման հեռանկարները» (2012թ.) դրամաշնորհների շրջանակներում:

Հեղինակի անձնական ներդրումը: Հեղինակը ակտիվ մասնակցել է հետազոտությունների, նպատակների և խնդիրների մշակմանը: Ամփոփել է գրականության տվյալները, անձամբ իրականացրել է փորձարարական աշխատանքները: Ակտիվորեն մասնակցել է ղեկավարի և կ.գ.դ. Ն. Վարդանյանի հետ ստացված արդյունքների քննարկմանը, ատենախոսության և գիտական հոդվածների ձևակերպմանը:

Աշխատանքի ապրոքացիան: Աշխատանքի արդյունքները զեկուցվել են “Biotech Key to unlock Mineral Resources Value” խորագրով

Կենսահիդրոմետալուրգիայի 19-րդ միջազգային համաժողովում (IBS 2011)» (Չանգզա, Չինաստան, 2011թ.), ՀՀ Անկախության 20 ամյակին նվիրված «Երիտասարդ գիտնականների ձեռքբերումներն ու հեռանկարները» (Օադկաձոր, 2012թ.), “New aspects in Molecular biotechnology and biochemistry” խորագրերով գիտաժողովներում (Երևան, 2013թ.), “Modern State of Biotechnological Developments and Ways of Commercialization” խորագրով միջազգային գիտական սեմինարում (Երևան, 2012թ.), “Contribution of Young Generation in the Development of Biotechnology” խորագրով երիտասարդ գիտնականների 2-րդ միջազգային գիտաժողովում (Երևան, 2013թ.), “Biohydromet '14” խորագրով Կենսահիդրոմետալուրգիայի 7-րդ Միջազգային համաժողովում (Ֆալմուր, Անգլիա, 2014թ.) և “Innovation Approaches in Science” խորագրով միջազգային երիտասարդական գիտաժողովում (Օադկաձոր, 2014թ.):

Աշխատանքի կատարման վայրը: Հետազոտություններն իրականացվել են ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի և մանրէների ավանդադրման կենտրոնում, ապա ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում: Մոլեկուլային կենսաբանական հետազոտությունները և կենսաթաղանթի ուսումնասիրություններն իրականացվել են Դիսբուրգ-Եսսեն համալսարանում (Գերմանիա):

Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը: Ատենախոսությունը կազմված է հապավումների ցանկից, ներածությունից, գրական ակնարկից և փորձարարական մասից՝ ներառյալ հետազոտության նյութը և մեթոդները, հետազոտության արդյունքները և դրանց քննարկումը, ամփոփումը, եզրակացությունները, գրականության ցանկը՝ 200 անուն: Աշխատանքը ձևակերպված է 110 էջի վրա հայերեն լեզվով՝ լուսաբանված 37 նկարներով և 13 աղյուսակներով:

Հրատարակումները: Ատենախոսության հիմնական արդյունքները ներկայացված են տեղական և միջազգային ամսագրերում հրատարակված 10 գիտական հոդվածներում և 3 միջազգային գիտաժողովների թեզիսներում:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱՎՆԱՐԿ

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

ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Քենոտիքոտրոֆ երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների մեկուսացումը:

ՔՔ մեկուսացման համար նյութ են ծառայել Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերի բնական և տեխնոգեն բիոտոպերի և տարրալուծման փորձարարական համակարգերի նմուշները: Նմուշներում երկաթ և/կամ ծծումբ օքսիդացնող ՔՔ հայտնաբերման նպատակով օգտագործվել են Լետենի, Միլվերման, Լյունդգրենի (9K), Մաննինգի (Биогеотехнология металлов, 1989),

Մակինտոշի (Mackintosh, 1978), Բրայերլիի (Варданын, 1998), ինչպես նաև Ջոնսոնի (Johnson et al. 1987) սննդամիջավայրերը: Որպես էներգիայի աղբյուր օգտագործվել է $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 10-22 գ/լ, S° - 10գ/լ կամ տետրաթիոնատ ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \times 2\text{H}_2\text{O}$) - 5 մՄ:

Բջջաբանական հետազոտություններ: Բակտերիաների ներկումը ըստ Գրամի իրականացվել է Հուկերի եղանակով (Герхард и др., 1983): Բջիջների մորֆոլոգիան ուսումնասիրվել է Leica DM500 trinocular ($\times 1000$) մանրադիտակով:

Մեկուսացված բակտերիաների նույնականացումը կատարվել է մորֆոֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունների հիման վրա ըստ Բերգիի որոշիչի (Определитель бактерий Берджи, 1997), ինչպես նաև 16S ռՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզի հիման վրա:

16S ռՌՆԹ-ի գենի ՊՇՌ-ն և ստացված պրոդուկտների սեքվինացիան: ԴՆԹ-ի անջատումը կատարվել է Ալջանաբի և Մարտինեզի մեթոդով (Aljanabi, Martinez, 1997): Պոլիմերային շղթայական ռեակցիան (ՊՇՌ) իրականացվել է «ppndorf Mastercycle® personal» սարքով՝ արտադրողի պրոտոկոլի համաձայն: ՊՇՌ-պրոդուկտների անջատումը և մաքրումը իրականացվել է դյուրահալ ազարոզայի վրա՝ Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit-ի կիրառմամբ, 16S ռՌՆԹ-ի ՊՇՌ-ֆրագմենտների սեքվինացումը՝ Սենգերի եղանակով (Sanger et al., 1977) ավտոմատ սեքվինատորի (Applied BioSystems, USA) և Big Dye Terminator (Applied BioSystems, USA) ռեակտիվների հավաքածուի կիրառմամբ՝ համաձայն պրոտոկոլի:

16S ռՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզը: Հետազոտվող շտամների 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության առաջնային անալիզը կատարվել է BLAST ծրագրային ապահովման փաթեթի միջոցով (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>): Ֆիլոգենետիկական ծառերի կառուցումն իրականացվել է MEGA 6.06 ծրագրային փաթեթի միջոցով «neighbor-joining» ծրագրի bootstrap մեթոդով:

Ֆերմենտային ակտիվությունների որոշումը: Երկարժեք երկաթի և RISCs-ի օքսիդացման գործընթացներում ներգրավված ֆերմենտների ակտիվությունները որոշվել են ոչ բջջային էքստրակտներում:

Երկաթ օքսիդազի ակտիվությունը որոշվել է ըստ ռեակցիոն խառնուրդում երկարժեք երկաթի (Fe (II)) քանակության նվազման (Blaylock, Nason, 1963): Fe(II)-ի քանակությունը որոշվել է α, α' - դիպիրիդիլի մեթոդով:

Թիոսուլֆատը օքսիդացնող ֆերմենտի (թիոսուլֆատդեհիդրոգենազ, EC 1.8.2.2.) և սուլֆիտօքսիդազի (սուլֆիտ-ցիտոքրոմ c օքսիդառեդուկտազ, EC 1.8.3.1.) ակտիվությունները որոշվել են ըստ ֆերրիցիանիդի ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) վերականգնման, համապատասխանաբար, թիոսուլֆատի և սուլֆիտի ներկայությամբ (Schook, Berk, 1978):

Ուղղանազը (թիոսուլֆատ-ցիանիդսուլֆոտրանսֆերազ, EC 2.8.1.1.) որոշվել է ըստ թիոսուլֆատից և ցիանիդից (KCN) թիոցիանատի (KCNS) առաջացման արագության (Bowen et al., 1965):

Սուլֆիտ: Fe(III) օքսիդոռեդուկտազը որոշվել է թաղանթային ֆրակցիայում: Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշվել է ըստ Fe(III)-ի վերականգնման սպեկտրաչափական եղանակով (Sugio et al., 1988; 1992):

Որպես ակտիվության միավոր ընդունվել է ֆերմենտի այն քանակությունը, որը կատալիզում է 1 մոլ սուբստրատի փոխարկումը 1 թրպեում:

Միներալների տարրալուծումը: Տարրալուծման են ենթարկվել Հայաստանի Շամլուղի հանքավայրի պիրիտը (FeS₂) (Fe-43.8 %, S-49 %) և ցինկի խտանյութը (Zn-58.75, S-23.56, Fe-6.8, Cu-2.64%)՝ մանրացված մինչև 43-63 մկմ մեծության մասնիկների: Տարրալուծման ինտենսիվությունը գնահատվել է ըստ միջավայր անցած Fe (III), Fe (II), ինչպես նաև Zn (II) և Cu (II) իոնների քանակության:

Բակտերիաների ադեզիան: Ադեզիայի ուսումնասիրման նպատակով օգտագործվել է Շամլուղի հանքավայրի պիրիտը (45-63 մկմ): Բակտերիաների տիրը որոշվել է ուղղակի հաշվամամբ՝ օգտագործելով Թոմայի խցիկը (Thoma counting chamber) և ֆազակոնտրաստային մանրադիտակը (Leica DMLS, Wetzler GmbH)՝ 400 խոշորացմամբ: Ադեզիվ բջիջների քանակությունը որոշվել է որպես սկզբնական և պլանկտոնային բջիջների քանակության տարբերություն:

Կենսաթաղանթի առաջացումը ուսումնասիրվել է պիրիտի կուպոնների վրա (10x10x1մմ): Ինկուբացումից հետո կուպոնները մշակվել են TRITC-ConA-ով՝ կենսաթաղանթը, Syto 9-ով՝ բջիջները ներկելու համար: Կենսաթաղանթի ուսումնասիրության համար օգտագործվել է ստոմատոլային 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: BioMaterialTM Workstation ծրագիրը թույլ է տվել համակցել AFM և EFM պատկերները:

Բակտերիաների իմոբիլիզացումը բնական կոնյունքի վրա: Բակտերիաների իմոբիլիզացման նպատակով օգտագործվել են բնական ցեոլիտը և շունգիտը: Իմոբիլիզացված բջիջների քանակը հաշվարկվել է որպես ներմուծված բջիջների նկատմամբ ադեզիվ բջիջների քանակության տոկոսային հարաբերություն:

Մետաղների իոնների քանակական անալիզը: Fe(II) և Fe(III) իոնները որոշվել են կոմպլեքսոմետրիկ եղանակով, ընդհանուր երկաթը, ցինկի, պղնձի իոնները՝ AAS IN ատոմաբառքցիոն սպեկտրոֆոտոմետրով:

Վիճակագրական անալիզ: Փորձերը դրվել են 3 կրկնություններով: Ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումն իրականացվել է Excel ծրագրի միջոցով:

**ԳԼՈՒԽ 3. ԵՐԿԱԾ ԵՎ ԾՕՈՒՄԲ ՕՔՍԻԴԱՑՆՈՂ ՔԵՍՈՒԼԻԹՈՏՐՈՑ
ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԲԱԶՄԱԶԱՆՈՒԹՅՈՒՆ ԵՎ ԿԵՆՍԱԹԱՆԱԿԱՆ
ԱՌԱՆՁԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

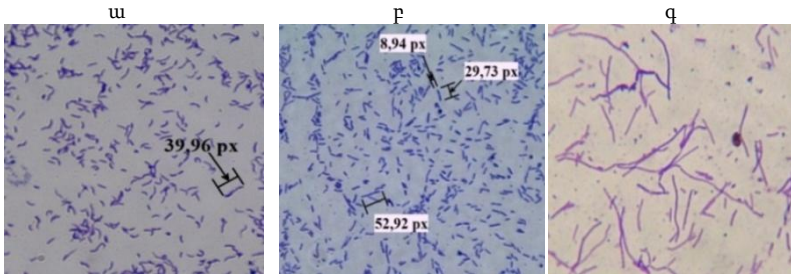
**3.1. Քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների բազմազանությունը և տարածվածությունը
սուլֆիդային հանքավայրերում**

Ուսումնասիրվել է ՔԲ տարածվածությունը և բազմազանությունը Հայաստանի տարբեր երկրակազմավորումների սուլֆիդային հանքավայրերում:

Պարզվել է, որ հանքավայրերի բնական և տեխնոգեն բիոտոպերը հիմնականում ներկայացված են *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* և *Sulfobacillus* ցեղերին պատկանող երկաթ օքսիդացնող ՔԲ: Ընդ որում, հանքավայրի տիպից կախված փոխվում է նրանց քանակական հարաբերակցությունը: Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ բովանգքաջրերի նմուշներում գերակշռում են *Acidithiobacillus* ցեղի բակտերիաները: *Sulfobacillus* spp. բակտերիաները առավելապես հայտնաբերվել են հանքաթափոնակույտերի ջերմածին հատվածներում՝ *Acidithiobacillus* և *Leptospirillum* spp. բակտերիաների համեմատությամբ 2-3 կարգ փոքր քանակություններով: Տանձուտի ոսկի-բազմամետաղային հանքավայրի հանքաթափոններում երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների համակեցությունների գերակշիռ մասը կազմել են *Leptospirillum* spp. բակտերիաները, ինչը վկայում է նրանց նշանակալի դերի մասին հանքավայրերում երկաթի միներալների տարրալուծման գործընթացներում: Հարկ է նշել, որ երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների հետ կայուն համակեցություններ են կազմում ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաները:

3.1.1 Երկաթ և ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների մեկուսացումը տարրավազման փորձարարական համակարգերից

Leptospirillum spp. բակտերիաների մեկուսացումը: Ցինկի և պղնձի խտանյութերի տարրալուծման պուլպերից մեկուսացվել են *Leptospirillum* spp. բակտերիաների երկու շտամ՝ ZC և CC: Բջջիներն իրենցից ներկայացնում են վիբրիոններ՝ 0.12- 0.13 x 0.6 -1.0 մկմ չափերով (նկ. 1), աճի օպտիմալ ջերմասիճանը կազմել է 37° C, pH-ի օպտիմալ արժեքը կազմել է 2.0:



Նկ. 1. Գենցիան մանուշակագույնով ներկված *Leptospirillum* sp. ZC (ա) և ՄՕԲ SO-1 (բ) և SO-2 շտամների (գ) միկրոբուսանկարները (1 պիկսել (px) = 263,6մկմ)

Ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների մեկուսացումը: Խտանյութերի կենսատարրալուծման պուլպերից մեկուսացվել են նաև գրամ բացասական ՄՕԲ երկու շտամ՝ SO-1 և SO-2 (նկ. 1): Բակտերիաների աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը 35° C է, ծծմբի օքսիդացման առավելագույն արագությունը դիտվել է pH 2.7-3.0-ում:

Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերի բնական բիոտոպերի և տարրալուծման փորձարարական համակարգերի մանրէաբանական հետազոտությունների արդյունքում մեկուսացված շտամների հիմնական բնութագրերը ներկայացված աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1

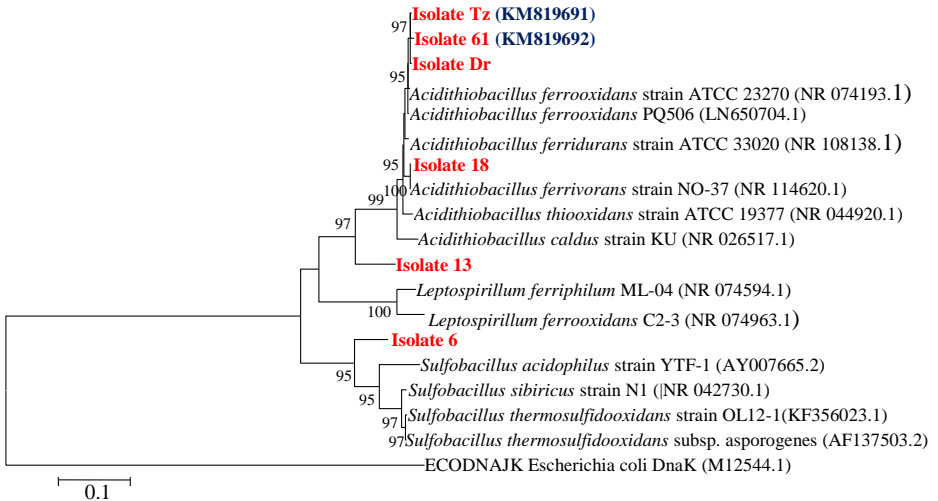
Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերից և խտանյութերի տարրալուծման համակարգերից մեկուսացված երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների բնութագրերը

Բակտերիաների շտամները	Մեկուսացման աղբյուրը	Էլեկտրոնների դոնորը	Աճի ջերմաստիճանը t, °C	Բջջիների ձևը
<i>Sulfobacillus</i> sp. 6	Դրբրոն (ոսկու հանքավայր)	Fe ²⁺ , S ⁰ , FeS ₂	37-50	Ուղիղ ձողիկներ
<i>Leptospirillum</i> sp. ZC	Ցինկի խտանույթ	Fe ²⁺ , FeS ₂	37	Ծոված ձողիկներ և սպիրիլներ
<i>Leptospirillum</i> sp. CC	Պղնձի խտանույթ	Fe ²⁺ , FeS ₂	37	Ծոված ձողիկներ և սպիրիլներ
<i>Leptospirillum</i> sp. Teg	Թեղուտ (Cu- Mo հանքավայր)	Fe ²⁺ , FeS ₂	37	Ծոված ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 61	Տանձուտի բազմամետաղային հանքավայր	Fe ²⁺ , S ⁰ , FeS ₂	30	Ուղիղ ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. Dr	Դրբրոնի (ոսկու հանքավայր)	Fe ²⁺ , S ⁰ , FeS ₂	37	Ուղիղ և ծոված ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. Tz	Տանձուտի հանքավայր	Fe ²⁺ , S ⁰ , FeS ₂	30	Ուղիղ ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	Ցինկի խտանույթ	Fe ²⁺ , S ⁰ , FeS ₂	30-35	Ուղիղ ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 18	Տանձուտի բազմամետաղային հանքավայր	Fe ²⁺ , S ⁰ , FeS ₂	30	Ուղիղ ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. SO-1	Ցինկի խտանյութ	RISCs	30-35	Ուղիղ ձողիկներ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. SO-2	Պղնձի խտանյութ	RISCs	30-35	Ուղիղ ձողիկներ

3.1.2. Մեկուսացված բակտերիաների նույնականացումը

Մեկուսացված բակտերիաների նախնական նույնականացումը կատարվել է մորֆոֆիզիոլոգիական հատկանիշների հիման վրա (Определитель бактерий Берджи, 1997): Տեսակային պատկանելիությունը որոշվել է 16S ռՌՆԹ-ի գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզի հիման վրա:

16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականությունը: Մեկուսացված բակտերիաների համար որոշվել է 16S ռՌՆԹ-ի գենի գործնականում ամբողջ հաջորդականությունը: 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության առաջնային անալիզը կատարվել է BLAST ծրագրային փաթեթի միջոցով (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>): Տվյալների GenBank- ում ներկայացված 16S ռՌՆԹ-ի գեների առավել մոտ հաջորդականությունների օգտագործմամբ իրականացվել է համեմատական ֆիլոգենետիկական անալիզ:



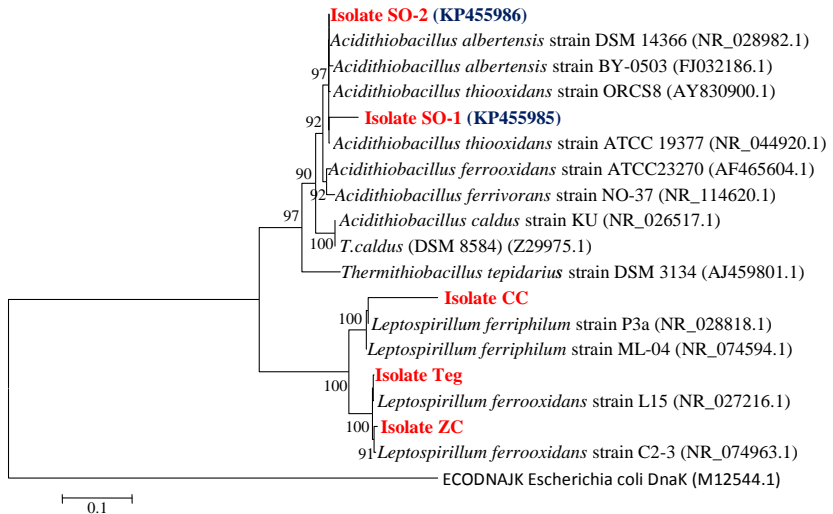
Նկ.2. *Acidithiobacillus* և *Sulfofobacillus* spp. բակտերիաների ֆիլոգենետիկական ծառը: Չախից նշված է էվոլյուցիոն հեռավորությունը:

Ստացված տվյալների համաձայն *Acidithiobacillus* sp. Dr, 61 և Tz շտամները ցուցաբերել են 99% նմանություն *At.ferrooxidans* ATCC 23270T տիպային շտամի նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ, իսկ 18 շտամը՝ 100% նմանություն *Acidithiobacillus ferrivorans* NO-37 շտամի նուկլեոտիդային հաջորդականության հետ և նույնականացվել են համապատասխանաբար որպես *At.ferrooxidans* և *At.ferrivorans* (նկ.2, աղ.2): *Acidithiobacillus* sp. 13Zn շտամը 97% ճշտությամբ առաջացրել է միասնական կլաստեր *At.ferrooxidans* ATCC 23270T շտամի հետ: Նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը կազմել է 91%: Կարելի է եզրակացնել, որ 13Zn շտամը կարող է հանդիսանալ *Acidithiobacillus* ցեղի նոր տեսակ: 6 շտամի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը *Sulfofobacillus thermosulfidooxidans* OL12-1 տիպային շտամի հետ կազմել է 94% (աղ.2, նկ.2):

Աղյուսակ 2

Acidithiobacillus spp. բակտերիաներ և ֆիլոգենետիկորեն մոտ տեսակների 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակները

Շտամները	Նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը, %	Տիպային շտամները
6	94	<i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i> OL12-1 (KF356023)
61	99	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270 (NR_074193)
Dr	99	
Tz	99	
13Zn	91	
18	100	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3 (NR_074660)



Նկ.3. *Leptospirillum* spp. բակտերիաների ֆիլոգենետիկական ծառը

Leptospirillum sp. ZC և Teg շտամների նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը *Leptospirillum ferrooxidans* L15 շտամի հետ կազմել է 99%: CC շտամը 66% ճշտությամբ առաջացրել է միասնական կլաստեր *Leptospirillum ferriphilum* ML-04 շտամի հետ՝ նմանության մակարդակը՝ 99% (նկ.3, աղ.3):

ԾՕԲ SO-1 և SO-2 շտամները ըստ 16S ռՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության անալիզի արդյունքների ֆիլոգենետիկորեն ավելի մոտ են *At. albertensis* DSM 14366 և *At. thiooxidans* ATCC19377 տիպային շտամներին (նկ.3, աղ.3):

Աղյուսակ 3

***Leptospirillum* spp. և *Acidithiobacillus* sp. SO-1, SO-2 շտամների ու ֆիլոգենետիկորեն մոտ տեսակների 16S ռՌՆԹ գենի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակները**

Շտամ-ները	Նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը, %	Տիպային շտամները (Accession numbers)
ZC	99	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> C2-3 (NR_074963)
Teg	99	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> L15 (NR_027216)
CC	93	<i>Leptospirillum ferriphilum</i> ML-04 (NR_074594)
SO-1	99	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377T (NR_044920)
SO-2	100	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> DSM 14366 (NR_028982)

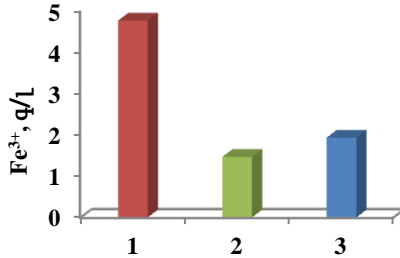
Հաշվի առնելով, որ *At.thiooxidans* և *At.albertensis* տիպային շտամերի նուկլեոտիդային հաջորդականության նմանության մակարդակը կազմում է 97%, կարելի է եզրակացնել, որ SO-1 շտամը կարող է հանդիսանալ *Acidithiobacillus* ցեղի նոր տեսակ, իսկ SO-2 շտամը՝ *A.albertensis*:

Այսպիսով, Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերից և տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացված բակտերիաները նույնականացվել են որպես *At.ferrooxidans*, *At.ferrivorans*, *S.thermosulfidooxidans*, *L.ferrooxidans*, *L.ferriphilum* և *At.albertensis*: Ընդ որում, *At.ferrivorans*, *L.ferriphilum* և *At.albertensis* տեսակները մեկուսացվել են առաջին անգամ: 13Zn և SO-1 շտամները կարող են ներկայացնել *Acidithiobacillus* ցեղի նոր տեսակներ:

3.2. Մեկուսացված բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկությունները

3.2.1. Պիրիտի օքսիդացումը

Մեկուսացված *At. ferrooxidans* 61 (MDC 7041), 18 (MDC 7040) և Tz (7043) շտամները ցուցաբերել են զրեթե միանման ակտիվություն պիրիտի (FeS₂) օքսիդացման գործընթացում և զգալիորեն զերագանցել են *Leptospirillum* spp. բակտերիաներին 30° C-ում: Սակայն աճի օպտիմալ ջերմաստիճանում *L.ferriphilum* CC (MDC 7047) շտամը 4.5 և 2.7 անգամ զերագանցել է *At.ferrooxidans* 61 և չափավոր ջերմասեր *S.themosulfidooxidans* 6 (MDC 7048) շտամների ակտիվությունները համապատասխանաբար (նկ. 4):



Նկ.4. Պիրիտի օքսիդացումը *L.ferriphilum* CC-ի (1), *At. ferrooxidans* 61-ի (2) և *S.themosulfidooxidans* 6-ի (3) կողմից (Պ:Խ - 4%, pH 2.0, t=37° C, 10 օր)

3.2.2. Երկաթի և ծծմբի փոխանակության ֆերմենտները

ՔԲ արդյունավետությունը ապարների տարրալուծման գործընթացներում պայմանավորված է նրանց կենսաքիմիական առանձնահատկություններով, մասնավորապես երկաթի, ծծմբի, սուլֆիդային ապարների օքսիդացումը կատալիզելու ունակությամբ: Մեկուսացված բակտերիաների մոտ ուսումնասիրվել են երկաթ օքսիդազի, սուլֆիտ-թթվածին օքսիդառեդուկտազի, թիոսուլֆատդեհիդրոգենազի և ռոդանազի համեմատական ակտիվությունները (աղ. 4):

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ առավել բարձր երկաթօքսիդազային ակտիվությամբ օժտված են *L.ferrooxidans* ZC (MDC 7046) և Teg (MDC 7044) շտամները, որոնք 3.5-3.6 և 1.7-1.8 անգամ գերազանցել են *S.themosulfidooxidans* 6-ի և *At.ferrooxidans* 61-ի համապատասխան ակտիվությունները: Չնայած բակտերիաներն աճեցվել են Fe(II)-ի վրա, նրանց մոտ հայտնաբերվել են սուլֆիտօքսիդազային և թիոսուլֆատդեհիդրոգենազային ակտիվություններ, ինչը վկայում է նշված ֆերմենտների կոնստիտուտիվ բնույթի մասին: Հատկանշական է, որ *L.ferrooxidans* ZC և Teg շտամների մոտ հայտնաբերվել են RISCs-ի փոխարկումն իրականացնող ֆերմենտներ (աղ.4): Գրականության տվյալների համաձայն լեպտոսպիրիլները ընդունակ չեն օքսիդացնելու RISCs-ը (Маркосян, 1972; Варданян, Акопян, 2003; Rawlings, Johnson, 2007), ուստի ներկայացված տվյալները կարիք ունեն հետազա ավելի մանրամասն հետազոտությունների:

Տարրավազման պուլպերում մանրէները մշտապես գտնվում են տարբեր մետաղների ազդեցության ներքո: Ելնելով վերը նշվածից ուսումնասիրվել է Fe(III), Cu(II), Zn (II) և Ni(II) իոնների ազդեցությունը երկաթի և ծծմբի փոխանակության ֆերմենտների ակտիվության վրա: Պարզվել է, որ Zn(II) իոնները ճնշում են երկաթօքսիդազի և սուլֆիտօքսիդազի ակտիվությունները բոլոր շտամների մոտ:

Fe(III) իոնները ճնշել են *S.thermosulfidooxidans* 6-ի, *L.ferrooxidans* ZC-ի և *At.ferrooxidans* 61-ի երկաթօքսիդազային ակտիվությունը:

Աղյուսակ 4

Մեկուսացված *Sulfobacillus* spp. *Leptospirillum* spp. և *Acidithiobacillus* spp. բակտերիաների ֆերմենտային ակտիվությունները

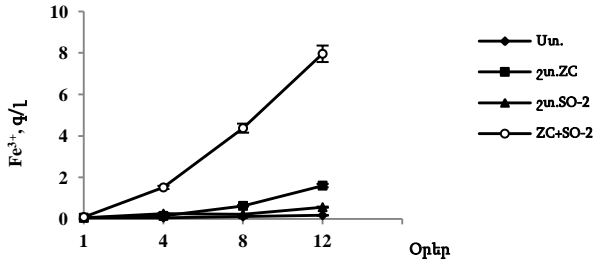
Ֆերմենտները	Ֆերմենտների սպեցիֆիկ ակտիվությունը, մկոյ/րոպ մգ սայխակուց							
	<i>S.thermosulfido-oxidans</i> 6		<i>Acidithiobacillus</i> 1 3Zn	<i>At. ferrooxidans</i> 61	<i>L.ferrooxidans</i> Teg		<i>L.ferrooxidans</i> ZC	
T, °C	30	37	30	30	30	37	30	37
Սուլֆիտօքսիդազ (սուլֆիտ-թթվածին օքսիդո-ռեդուկտազ)	5.55	7.95	8.13	6.87	12.14	15.0	19.0	26.9
Թիոսուլֆատ դեհիդրոգենազ	0	0.17	0.68	0.34	0.38	0.45	0.78	1.4
Ռոդանազ (թիոսուլֆատ: ցիանիդ սուլֆոտրանսֆերազ)	0	0	0	0	0	0	0	0
Սուլֆիտ:Fe (III) օքսիդոռեդուկտազ	0.006	-	0.006	0.007	0.042	-	0.07	-
Երկաթ օքսիդազ (մկոյ/րոպ մգ սայխակուց)	67.8	70.2	71.55	66.7	121.4	125	244.7	254

Cu(II) և Ni(II) իոնների ներկայությամբ ֆերմենտների ակտիվության էական փոփոխություն չի դիտվել: Ստացված արդյունքները համապատասխանում են գրականության տվյալներին (Варданян и др, 1990; Sampson, Phillips, 2001; Nies et al., 1999):

ԳԼՈՒԽ 4. ԵՐԿԱԹ ՕՔՍԻԴԱՑՆՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՂՇԵԶԻԱՆ ԵՎ ԿԵՆՍԱԹԱՂԱՆԹԻ ԱՌԱՋԱՑՈՒՄԸ

4.1. Բակտերիաների ադիեզիան պիրիտի մակերեսին

Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ *L.ferriphilum* CC շտամի միջոցով պիրիտի տարրալուծման ընթացքում ինոկուլյացիայից 30, 60 և 120 րոպե հետո ադիեզիայի աստիճանը կազմել է 97.7, 99.77 և 99.97%, *S.thermosulfidooxidans* 6 շտամի մոտ՝ 50.0 և 88.0% համապատասխանաբար 30 և 120 րոպե հետո:

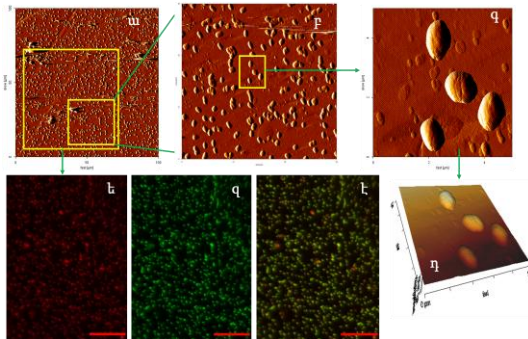


Նկ.5. Պիրիտի (FeS₂) տարրալուծումը *L.ferrooxidans* ZC և *A.albertensis* SO-2 շտամների և նրանց խառը կուլտուրայի կողմից

Այսպիսով, *L.ferriphilum* CC շտամը ցուցաբերել է ավելի բարձր ինամակցություն պիրիտի նկատմամբ և համապատասխանաբար միներալի տարրալուծման ավելի բարձր ակտիվություն, քան *S.themosulfidooxidans* 6-ը: *L.ferrooxidans* ZC շտամի պիրիտի օքսիդացման ակտիվությունը զգալիորեն բարձրացել է ՕՕԲ *At.albertensis* SO-2-ի (MDC 7045) հետ համատեղ աճեցնելիս (նկ.5): Խառը կուլտուրայի դեպքում պիրիտը նախապես զաղույթացվել է ՕՕԲ *At.albertensis* SO-2-ի կողմից, որից հետո միայն դիտվել է *L.ferrooxidans* ZC շտամի ադիեզիան պիրիտի մակերեսին:

4.2. Կենսաթաղանթի առաջացումը և նրա վիզուալացումը

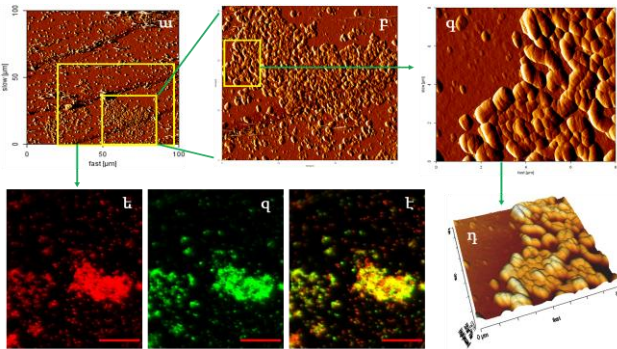
Մեկուսացված բակտերիաների մոտ կենսաթաղանթի առաջացումը պիրիտի կուպոնների վրա ուսումնասիրվել է AFM և EFM մանրադիտակներով և նրանց համակցմամբ:



Նկ.6. *S.thermosulfidooxidans* 6 շտամի կենսաթաղանթը պիրիտի կուպոնի վրա ինկուբացումից 3 օր հետո AFM (ա, բ, գ, դ) և EFM (ե, զ, է) մանրադիտակներով: AFM նկարների տվյալները՝ 100x100 մկմ (ա), 15x35 մկմ (բ), 5x5 մկմ (գ), գ նկարի եռաչափ պատկերը 3D՝ 14 x14 մկմ (դ)

Յույց է տրվել, որ ինկուբացումից հետո 3-րդ օրը պիրիտի կուպոնի գրեթե ամբողջ մակերեսը ծածկվել է *S.thermosulfidooxidans* 6 շտամի առանձին բջիջներով(նկ. 6 դ, ե, գ), իսկ 7-րդ օրը դիտվել է միաշերտ կենսաթաղանթը: EFM նկարներում երևում են *S.thermosulfidooxidans* 6 շտամի բջիջները՝ ներկված SytoTM9-ով (նկ. 6 ե) և ԱՊՄ-ը՝ ներկված TRIRIC-ConA-ով (նկ. 6 գ):

Պիրիտի կուպոնի մակերեսին *L.ferrooxidans* ZC շտամի առանձին բջիջները և նրանց գաղութները հայտնաբերվել են ինկուբացումից հետո 3-րդ օրը (նկ.7): EFM պատկերներում երևում են բջիջները և ԱՊՄ-ը (նկ. 7 ե): Եռաչափ նկարում (3D) ներկայացված է միաշերտ կենսաթաղանթը (նկ. 7 դ):



Նկ.7. *L.ferrooxidans* ZC-ի կենսաթաղանթը ինկուբացիայի 3-րդ օրը AFM (ա, բ, գ, դ) և EFM (ե, գ, է) մանրադիտակներով: AFM նկարների տվյալները՝ 100 x100 մկմ (ա), 30 x 30 մկմ (բ), 8 x 8 մկմ (գ), գ նկարի եռաչափ պատկերը 3D՝ 8 x 8 մկմ (դ)

Այսպիսով, ուսումնասիրված բոլոր բակտերիաների մոտ դիտվել է պիրիտի վրա ձևավորված միաշերտ կենսաթաղանթ: *At.ferrooxidans* 61 և *S.thermosulfidooxidans* 6 շտամների մոտ կենսաթաղանթը ձևավորվել է գլխավորապես առանձին բջիջների ձևով: *At. ferrooxidans* 61-ի բջիջներն առաջացրել են շղթայանման 4.5 մկմ երկարությամբ, իսկ *S.thermosulfidooxidans* 6-ը՝ ձողաձև կենսաթաղանթ (0.5-0.8մկմ x 1.0-1.7մկմ): *L.ferrooxidans* ZC-ի մոտ կենսաթաղանթն արտահայտվել է առանձին բջիջների և 25 մկմ տրամագծով կլաստերների ձևով, ինչը վկայում է նրանց ավելի մեծ քանակությամբ ԱՊՄ առաջացնելու մասին:

4.3. Բակտերիաների ինոբիոգենոմը բնական կրիչների վրա

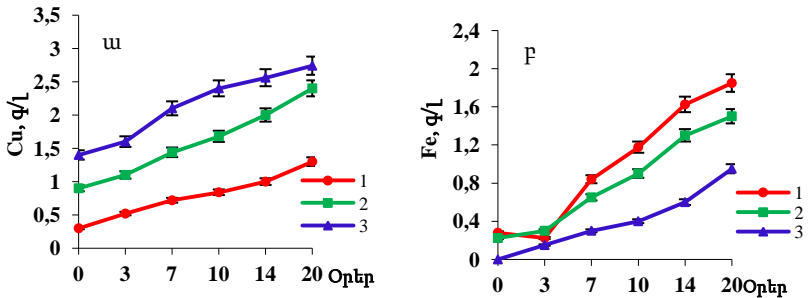
Սուլֆիդային միներալների կենսատարրալուծումը երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների կողմից իրականացվում է գլխավորապես անուղղակի մեխանիզմով: Անուղղակի մեխանիզմի համաձայն, տարրալուծող գործոնը Fe(III) իոններն են, որոնք առաջանում են Fe(II)-ի օքսիդացման արդյունքում: Ուստի հետազոտություններ են իրականացվել մեկուսացված բակտերիաների

խմորիլիզացված համակարգերի միջոցով տարրալուծման գործընթացի արդյունավետության բարձրացման նպատակով: Առաջին անգամ իրականացվել է *L.ferriphilum* CC-ի և *S.thermosulfidooxidans* 6-ի խմորիլիզացումն անօրգանական բնական կրիչների՝ շունգիտի և ցեոլիտի վրա: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ շունգիտի և ցեոլիտի վրա խմորիլիզացված բակտերիաները զգալիորեն բարձրացնում են երկաթի օքսիդացման արագությունը և նրանց կիրառումը կարող է հեռանկարային լինել խտանյութերից արժեքավոր մետաղների կորզման գործընթացների արդյունավետության բարձրացման համար:

ԳԼՈՒԽ 5. ՑԻՆԿԻ ԽՏԱՆՅՈՒԹԻ ՄԱՆՐԵԱԲԱՆԱԿԱՆ ՏԱՐՐԱԼՈՒԾՈՒՄԸ

Ցին տարրալուծման նպատակով կիրառվել է Հայաստանի Տանձուտի հանքավայրից մեկուսացված տարրալուծող բակտերիաների համակեցությունը (ՏԲՀ): Պարզվել է, որ ՏԲՀ կիրառումը թույլ է տալիս ավելացնել ցինկի տարրալուծումը 3.3, պղնձինը՝ 4.5 և երկաթինը՝ 2.0 անգամ: Ընդ որում, առավել մեծ արագությամբ տարրալուծվել է ցինկը, ապա պղնձը և երկաթը: Ստացված արդյունքները կարելի է բացատրել Ցին կազմի մեջ մտնող սուլֆիդային միներալների էլեկտրաքիմիական հատկություններով (Варданян, Варданян, 2011):

pH-ի և Fe³⁺ իոնների ազդեցությունը: Բակտերիաների աճի առավելագույն արագությունը և մետաղների առավելագույն կորզումը դիտվել է միջավայրի pH 2.0 արժեքի պայմաններում: Միջավայրի pH-ը մինչև 1.4 իջեցնելիս տարրալուծված երկաթի և ցինկի քանակությունը նվազել է 1.7, պղնձինը՝ 1.4 անգամ:



Նկ.8. Պղնձի (ա) և երկաթի (բ) տարրալուծումը ՏԲՀ կողմից Ցին օքսիդացման ընթացքում Fe³⁺-ի բացակայության (1), 1.0 (2) և 2.0 գ/լ (3), Fe³⁺-ի պայմաններում

Տարրալուծման միջավայրին 2 գ/լ Fe (III) ավելացնելիս պղնձի կորզման արագությունը մեծացել է 3 անգամ, ցինկինը նվազել 1.2, իսկ երկաթինը ճնշվել է 2-3 անգամ (նկ.8): Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ ՏԲՀ կողմից ցինկի խտանյութի տարրալուծման ժամանակ Fe (III) իոնների ավելացումը հանգեցնում է պղնձի միներալի՝ խակոպիրիտի տարրալուծման արագացմանը:

Այսպիսով, հաշվի առնելով խտանյութի կազմի մեջ մտնող սուլֆիդային միներալների տարրալուծման տարբեր արագությունները՝ պայմանավորված էլեկտրաքիմիական պոտենցիալների մեծությամբ, ինչպես նաև բակտերիաների կողմից դրանց ընտրողական օքսիդացումը, փոփոխելով պրոցեսի ֆիզիկաքիմիական պարամետրերը, կարելի է իրականացնել ցինկի կամ պղնձի ընտրողական կորզում ցինկի խտանյութից:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերի բնական և տեխնոգեն բիոտոպերում տարածված են հիմնականում *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* և *Sulfobacillus* ցեղերի բակտերիաները, որոնց քանակական հարաբերակցությունը փոխվում է կախված հանքավայրի տիպից: Հանքահոսքաջրերում գերակշռել են *Acidithiobacillus* ցեղի բակտերիաները: Հանքակույտերի երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների համակեցությունների գերակշիռ մասը կազմել են *Leptospirillum* spp. բակտերիաները:
2. Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերից և ցինկի ու պղնձի տարրալուծման փորձարարական համակարգերից մեկուսացվել են ՔԲ, որոնք ըստ կենսաբանական առանձնահատկությունների և 16S ռՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականության նույնականացվել են որպես *At.ferrooxidans*, *At.ferrivorans*, *S.thermosulfidooxidans*, *L.ferrooxidans*, *L.ferriphilum* և *At.albertensis*: Մեկուսացված 13Zn և SO-1 շտամները կարող են ներկայացնել *Acidithiobacillus* ցեղի նոր տեսակներ:
3. Բացահայտվել է համահարաբերակցություն պիրիտի տարրալուծման և մեկուսացված բակտերիաների երկաթօքսիդազային ակտիվության միջև: *Leptospirillum* spp. բակտերիաները երկաթօքսիդազային ակտիվությամբ գերազանցել են *At.ferrooxidans* 61-ին և *S.thermosulfidooxidans* 6-ին՝ միաժամանակ ցուցաբերելով պիրիտի տարրալուծման առավել բարձր արդյունավետություն: Հատկանշական է, որ *Leptospirillum* spp. բակտերիաների մոտ հայտնաբերվել են RISCs-ի օքսիդացումն իրականացնող ֆերմենտներ:
4. Բացահայտվել է ուղղակի կապ մեկուսացված բակտերիաների կողմից պիրիտի տարրալուծման ակտիվության և միներալի մակերեսին նրանց ադիզիայի ինտենսիվության միջև: *Leptospirillum* spp. բակտերիաները ցուցաբերել են ավելի մեծ ինամակցություն և պիրիտի օքսիդացման առավել բարձր արդյունավետություն: Խառը կուլտուրայի դեպքում պիրիտի մակերեսը նախապես գաղութացվել է *At.albertensis* SO-2-ի կողմից, որից հետո միայն դիտվել է *L.ferrooxidans* ZC-ի ադիզիան:
5. AFM և EFM մանրադիտակների կիրառմամբ պարզվել է, որ *At.ferrooxidans* շտ.61-ը և *S.thermosulfidooxidans* 6-ը պիրիտի մակերեսին առաջացնում են առանձին բջիջներից կազմված միաշերտ կենսաթաղանթ: *L. ferrooxidans* CC-ի կենսաթաղանթն արտահայտվել է ինչպես առանձին բջիջների, այնպես էլ

կլաստերների ձևով, ինչը վկայում է նրանց՝ ավելի մեծ քանակությամբ ԱՊՄ առաջացնելու մասին:

6. Բնական կրիչների՝ շունգիտի և ցեոլիտի վրա ՔՔ իմոբիլիզացված համակարգը թույլ է տալիս զգալիորեն բարձրացնել Fe(II)-ի օքսիդացման ինտենսիվությունը: Ընդ որում, *L.ferriphilum* CC-ի համար առավել արդյունավետ կրիչը ցեոլիտն է, իսկ *S.thermosulfidooxidans* 6-ի համար՝ շունգիտը: Ցեոլիտի և շունգիտի վրա ՔՔ իմոբիլիզացված համակարգերը կարող են հեռանկարային լինել մետաղների տարրալուծման գործընթացի ինտենսիվացման համար:
7. ՏԲՀ կիրառմամբ կարելի է իրականացնել պղնձի և ցինկի ընտրողական կորզում ցինկի խտանյութից՝ փոփոխելով կենսատարրալուծման գործընթացի ֆիզիկաքիմիական պարամետրերը:

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցանկը

1. Варданын Н.С., Маркосян Л.С., **Варданын А.К.** Селективное извлечение меди, цинка и других ценных металлов из цинкового концентрата ассоциацией хемолитотрофных бактерий // Биолог. журн. Армении, 2 (62), 2010, с. 90-94.
2. Варданын Н.С., **Варданын А.К.** Биохимическое окисление сульфидных минералов и селективное извлечение ценных металлов // “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии”. IV Сисакяновские чтения. Труды. Алушта-Дубна, 5-9 сентября, 2010, с. 35-37.
3. Vardanyan N.S., **Vardanyan A.K.** Selective Extraction of Metals from Zinc Concentrate by Association of Chemolithotrophic Bacteria // Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, Vol. 47, No. 5, P. 515- 519.
4. Vardanyan N.S., Markosyan L.S., **Vardanyan A.K.** Biooxidation of refractory gold bearing ores by moderately thermophilic chemolithotrophic bacteria and their association // Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgy Symposium “Biohydrometallurgy: Biotech key to unlock mineral resources value” (IBS2011), September 18-22, 2011, Changsha, China, Vol. 2, P. 597-600.
5. **Vardanyan A.K.** Dissemination and biodiversity of chemolithotrophic bacteria in sulfide ore deposits of Armenia // Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgy Symposium “Biohydrometallurgy: Biotech key to unlock mineral resources value” (IBS2011), September 18-22, 2011, Changsha, China, Vol. 2, P. 1010.
6. Vardanyan N.S., **Vardanyan A.K.** Highly Efficient Communities of Chemolithotrophic Bacteria for Extraction of Valuable Metals from Non-conditioned Concentrates // Book of abstracts of Scientific Seminar “Modern State of Biotechnological Developments and Ways of Commercialization”, September 11-12, 2012, Yerevan, Armenia, P. 35.
7. **Vardanyan A.K.** Immobilization of new isolated bacteria *Leptospirillum* spp. on natural supporters // Book of articles and abstracts of 2nd International Scientific Conference of Young Researchers. “Contribution of Young Generation in the Development of Biotechnology”, Yerevan, Armenia, 1-4 October, 2013, P. 75.
8. **Варданын А.К.**, Хачатрян А.Н., Маркосян Л.С., Варданын Н.С. Сероокисляющая бактерия, выделенная из пульпы биовыщелачивания цинкового концентрата // Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013, с. 56-62.

9. Վարդանյան Ա.Կ. Նոր մեկուսացված ջերմակայուն *Leptospirillum spp.* բակտերիաների ադհեզիան և պիրիտի կենսատարրավազումը // Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3 (65), 2013, էջ 93-98:
10. Vardanyan A.K., Markosyan L.S., Vardanyan N.S. Immobilization of new isolated iron oxidizing bacteria on natural carriers // Advanced Materials Research, Vol. 825 (2013) P. 388-391.
11. Vardanyan A.K., Vardanyan N.S., Markosyan L.M. Peculiarities of Adhesion and Bioleaching of Pyrite by New Isolated *Leptospirillum spp.* Bacteria // Universal Journal of Microbiology Research 1(2), 2013, P. 22-25.
12. Vardanyan N.S., Vardanyan A.K. New Sulphur Oxidizing Bacteria Isolated from Bioleaching Pulp of Zinc and Copper Concentrates // Universal Journal of Microbiology Research 2(2), 2014, P. 27-31.
13. A.K. Vardanyan, Attachment and biofilm formation of *Leptospirillum sp.* strain ZC on pyrite coupons // Proceedings of International Youth Conference “Innovation Approaches in Science”, Tsaghkadzor, 5-7 December, 2014, P. 3-7.

Аревик Кареновна Варданян

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В ПРОЦЕССАХ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ СУЛЬФИДНЫХ МИНЕРАЛОВ

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: железо- и сероокисляющие бактерии, адгезия, образование биофильма, иммобилизация, выщелачивание пирита, селективное извлечение металлов

Изучено разнообразие и распространение железо- и сероокисляющих хемолитотрофных бактерий в сульфидных месторождениях Армении разных геотформаций. Показано, что природные и техногенные биотопы сульфидных руд в основном представлены родами *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* и *Sulfobacillus*. При этом *Acidithiobacillus spp.* бактерии доминировали в большинстве проб кислых дренажных вод. *Sulfobacillus spp.* бактерии были обнаружены в местах разогрева руд, однако их количество было на 2-3 порядка ниже, чем *Acidithiobacillus* and *Leptospirillum spp.* бактерии. Половину сообщества железоокисляющих бактерий в пробах отвалов руд составляли *Leptospirillum spp.* бактерии.

Из природных биотопов и экспериментальных систем выщелачивания выделены железо- и сероокисляющие бактерии, которые на основании изучения морфо-физиологических особенностей и нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК были идентифицированы как *At.ferrooxidans*, *At.ferrivorans*, *L.ferrooxidans*, *L.ferriphilum*, *S.thermosulfidoxidans* и *At.albertensis*. При этом *At.ferrivorans*, *L.ferriphilum* и

At.albertensis были обнаружены в Армении впервые. Штаммы 13Zn и SO-1 могут быть представлены как новые виды рода *Acidithiobacillus*.

Выделенные бактерии были депонированы в Центре Депонирования Микробов НППЦ “Армбиотехнология” и получили следующие номера: MDC 7040, MDC 7041, MDC 7042, MDC 7043, MDC 7044, MDC 7045, MDC 7046, MDC 7047, MDC 7048. Нуклеотидные последовательности гена *l6S* рРНК изолированных бактерий включены в GenBank (KM819691, KM819192, KM819693, KP455985, KP455986), которые доступны в EMBL в Европе и в базе данных ДНК Японии.

Изучена активность ферментов выделенных бактерий, участвующих в окислении Fe(II) и восстановленных соединений серы. Установлена корреляция между железооксидазной активностью выделенных бактерий и эффективностью выщелачивания пирита. *Leptospirillum* spp. бактерии по активности железооксидазы значительно превосходили *At.ferrooxidans* 61 и *S.thermosulfidooxidans* 6 и соответственно показали более высокую активность в окислении пирита. Впервые, у *Leptospirillum* spp. бактерий обнаружены тиосульфатдегидрогеназная и сульфитоксидазная активности. Наличие сульфит:Fe(III) оксидредуктазной активности у *Leptospirillum* spp. бактерий позволит им существовать при ограниченных количествах кислорода, всегда имеющихся в выщелачивающих системах при высоких температурах. Изучено влияние ионов металлов на ферментативную активность выделенных бактерий. Установлено, что цинк ингибирует железооксидазную и сульфитоксидазную активности у всех изученных бактерий. Ионы Fe(III) ингибировали железооксидазную активность у *S.thermosulfidooxidans* 6, *L.ferrooxidans* ZC и *At.ferrooxidans* 61. В присутствии ионов меди и никеля существенных изменений в активности ферментов у изученных бактерий не обнаружено. Выявлена корреляция между адгезией, образованием биофильма и интенсивностью процесса выщелачивания пирита изученными бактериями. *Leptospirillum* spp. бактерии проявляли более высокое сродство к пириту, чем *At.ferrooxidans* 61 and *S.thermosulfidooxidans* 6. С помощью AFM и EFM микроскопических исследований установлено, что все изученные бактерии образуют однослойная биопленку на поверхности пирита. Биопленка у *At.ferrooxidans* 61 и *S.thermosulfidooxidans* 6 была представлена отдельными клетками. *At.ferrooxidans* 61 образовывал цепочечные, а *S.thermosulfidooxidans* 6 - палочковидные биопленки. Биопленка *L.ferrooxidans* ZC была представлена как отдельными клетками, так и в виде кластеров. Таким образом, *L.ferrooxidans* ZC обладает способностью образовывать больше внеклеточных полимерных соединений. Впервые была осуществлена иммобилизация выделенных бактерий на природных неорганических носителях: шунгите и цеолите. Установлено, что наибольшую интенсивность окисления железа проявляет *L.ferriphilum* CC, иммобилизованный на природном и модифицированном цеолите. Эффективным носителем для

S.thermosulfidooxidans 6 был шунгит. Бактерии, иммобилизованные на шунгите и цеолите, могут быть перспективными для применения в процессах выщелачивания ценных металлов с целью их интенсификации. Применение ассоциации выщелачивающих бактерий позволило значительно увеличить извлечение меди, цинка и железа из цинкового концентрата. С наибольшей скоростью выщелачивался цинк, затем медь и железо. Изменяя физико-химические параметры процесса выщелачивания цинкового концентрата, можно осуществить селективное извлечение цинка и меди.

Vardanyan Arevik

ISOLATION AND STUDY OF NEW CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA IN PROCESSES OF BIOLEACHING OF SULFIDE MINERALS

SUMMARY

Key words: iron and sulfur oxidizing bacteria, adhesion, biofilm formation, immobilization, leaching of pyrite, selective extraction of metals

Diversity and dissemination of chemolithotrophic iron- and sulfur oxidizing bacteria in sulfide ore deposits of different geof ormations in Armenia have been studied. It has been shown that natural and technogenic biotopes of sulfide ores are mainly represented by the following genera: *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* and *Sulfobacillus*. Besides, *Acidithiobacillus* spp. bacteria dominated in the communities of the majority of acid drainage water samples. *Sulfobacillus* spp. bacteria were mainly found in thermophilic areas of ores in the quantity of 2-3 order lower in comparison with *Acidithiobacillus* and *Leptospirillum* spp. bacteria. About half of communities of iron oxidizing bacteria in ore dump samples was *Leptospirillum* spp. bacteria.

Iron- and sulfur oxidizing bacteria isolated from natural biotopes and experimental leaching systems were identified as *At.ferrooxidans*, *At.ferrivorans*, *L.ferrooxidans*, *L.ferriphilum*, *S.thermosulfidooxidans* and *At.albertensis* on the basis of morphophysiological properties and 16S rRNA nucleotide sequence analysis. Moreover, *L.ferriphilum*, *At.ferrivorans* and *At.albertensis* species have been isolated in Armenia for the first time. Strains 13Zn and SO-1 isolated from leaching systems can be represented as new species of genus *Acidithiobacillus*.

The isolated bacteria have been deponated in the Microbial Depository Center of the SPC "Armbiotechnology" and received the following numbers: MDC 7040, MDC 7041, MDC 7042, MDC 7043, MDC 7044, MDC 7045, MDC 7046, MDC

7047, MDC 7048. 16S rRNA sequences of isolated bacteria are included in the Gen Bank (KM819691, KM819192, KM819693, KP455985, KP455986) that are available to European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Europe and the DNA Data Bank of Japan.

Activity of enzymes of isolated bacteria involved in oxidation of Fe(II) and reduced sulfur compounds was studied. The correlation between iron oxidizing activity of isolated bacteria and efficiency of pyrite leaching was observed. *Leptospirillum* spp. bacteria considerably exceeded *At.ferrooxidans* strain 61 and *S.thermosulfidooxidans* strain 6 by their specific iron oxidase activity and consequently showed higher efficiency of pyrite leaching. Sulfite oxidase and thiosulfate dehydrogenase activities were revealed in *Leptospirillum* spp. bacteria for the first time. The presence of sulfite:Fe(III) oxidoreductase activity in *Leptospirillum* spp. bacteria will allow them to survive under oxygen limited conditions, which are always available in leaching systems at high temperature. Influence of ions of metals on enzymatic activity of isolated bacteria was studied. It was revealed that zinc ion inhibited specific iron oxidase and sulfite oxidase activities in all studied bacteria. Ferric ions suppressed iron oxidase activity of *S.thermosulfidooxidans* 6, *L.ferrooxidans* ZC and *At.ferrooxidans* 61. No significant changes of enzyme activities observed in the presence of copper and nickel. The correlation between adhesion, biofilm formation and the intensity of pyrite leaching by studied bacteria was revealed. *Leptospirillum* spp. bacteria showed more affinity to pyrite than *At.ferrooxidans* 61 and *S.thermosulfidooxidans* str. 6 and consequently the highest rate of pyrite oxidation. The single-layer biofilm formed on pyrite surface was observed in all studied bacteria by AFM and EFM microscopes and their combination. The biofilm formed by *At.ferrooxidans* 61, *S.thermosulfidooxidans* 6 was mainly in the form of separate cells. *S.thermosulfidooxidans* 6 formed rod-shaped and *At.ferrooxidans* 61 chain-shaped biofilms. The biofilm of *L.ferrooxidans* ZC was represented by both separate cells and clusters. Thus, *L.ferrooxidans* ZC is capable to generate a larger amount of extracellular polymeric substances (EPS). For the first time the immobilization of isolated bacteria on natural inorganic carriers such as shungite, zeolite has been implemented. It was revealed that *L.ferriphilum* CC immobilized on natural and modified zeolites had the highest iron oxidizing activity. The efficient carrier for *S.thermosulfidooxidans* 6 was shungite. The mentioned bacteria immobilized on shungite and zeolite may be perspective for application in processes of extraction of valuable metals from refractory concentrates to increase their effectiveness. The application of association of leaching bacteria allowed to significantly increase leaching of zinc, copper and iron from zinc concentrate. Zinc was leached more rapidly, then followed copper and iron. It was revealed that selective extraction of copper and zinc could be realized by changing physicochemical parameters of the process of zinc concentrate bioleaching.