

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ»

СТЕПАНЯН САМВЕЛ ХАЧИКОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ МЕТАЛЛОВ С ПОМОЩЬЮ
ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ИХ АССОЦИАЦИЙ И
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КУЛЬТУР**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.14. "Биотехнология"

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Н.С. Варданян

ЕРЕВАН - 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	
1.1. Биогидрометаллургическое получение металлов	9
1.2. Механизм окисления сульфидных минералов	13
1.3. Микроорганизмы, участвующие в окислении сульфидных минералов	17
1.3.1. Микроорганизмы, встречающиеся в природных экосистемах	17
1.3.2. Микроорганизмы, участвующие в выщелачивании сульфидных минералов в технологических процессах	20
1.4. Факторы, влияющие на интенсивность выщелачивания сульфидных минералов в технологических процессах	22
1.4.1. Влияние состава микробных консорциумов	22
1.4.2. Влияние плотности пульпы	25
1.4.3. Влияние окислительно-восстановительного потенциала	26
1.4.4. Влияние ионов металлов	28
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	32
ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛЕЗО- И СЕРО- ОКИСЛЯЮЩИХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ	39
3.1. Выделение железо- и сероокисляющих хемолитотрофных бактерий	39
3.2. Активность выделенных бактерий в окислении сульфидных минералов и руд.....	41
ГЛАВА 4. ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ СУЛЬФИДНЫХ МИНЕРАЛОВ И РУД	
<i>ACIDITHIOBACILLUS</i> SP. 13Zn.....	46
4.1. Выщелачивание халькопирита	46
4.2. Выщелачивание Тандзутской упорной золотосодержащей руды	49
4.3. Выщелачивание пирита, халькопирита, Тандзутской руды и хвостов с использованием конструированных ассоциаций бактерий	53
4.3.1. Выщелачивание пирита	53
4.3.2. Выщелачивание халькопирита	56
4.3.3. Выщелачивание Тандзутской руды и Дрмбонских хвостов	61

4.4. Устойчивость бактерий к металлам	65
ГЛАВА 5. БАКТЕРИАЛЬНО-ХИМИЧЕСКОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ПИРИТА	
И ХАЛЬКОПИРИТА	69
5.1. Иммобилизация <i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn на твердых носителях	69
5.2. Химическое выщелачивание пирита и халькопирита	71
5.3. Биовыщелачивание пирита и халькопирита после обработки биогенным раствором Fe^{3+}	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	80
ВЫВОДЫ	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Биогидрометаллургия является современной стабильно развивающейся альтернативной технологией переработки минерального сырья. В основе биогидрометаллургии лежит применение микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности для извлечения металлов из концентратов, руд и отвалов. Возрастающий интерес к биогидрометаллургии и биовыщелачиванию (БВ) обусловлен их экономическим, техническим и что особенно важно, экологическим преимуществами по сравнению с традиционным обжигом и автоклавным окислением при высоких давлениях и температурах [39, 132, 135]. Особую важность приобретает биовыщелачивание некондиционных руд и отвалов в связи с проблемой истощения богатых сырьевых ресурсов.

Метод БВ для получения меди, урана, никеля, золота и других металлов широко используется во многих странах мира [17, 27, 28, 40, 41, 125, 132, 135]. Ведутся исследования по интенсификации процесса БВ и для эффективного извлечения других цветных и редких металлов.

Технология кучного выщелачивания меди главным образом основана на извлечении меди из вторичного минерала - халькозина (Cu_2S) [125]. Коммерческое применение выщелачивания первичного минерала меди - халькопирита часто ограничивается из-за низкой скорости процесса, вызванной пассивацией поверхности минерала продуктами его окисления [65, 96, 171]. В настоящее время ведутся исследования для преодоления пассивирующего эффекта [71, 163, 164,]. С этой точки зрения разработка новых технологий, в том числе основанной на использовании термофильных микроорганизмов для интенсификации кучного и чанового выщелачивания халькопирита, весьма актуальна [171].

Разработаны разные химические и физические методы для извлечения золота в зависимости от типа руд и концентратов. Однако ввиду минимального экологического воздействия на окружающую среду и ряда других преимуществ для удаления железа и мышьяка из золотоносных руд успешно применяется чановое биоокисление (БО).

Интенсивность процесса биоокисления сульфидных минералов зависит от температуры, pH, окислительно-восстановительного потенциала, а также природы используемых микроорганизмов. Среди указанных факторов наиболее важным являются микроорганизмы. БВ металлов осуществляется микроорганизмами разных систематических групп, в том числе архебактериями. Важным этапом в получении

высокоактивных культур ХБ является их адаптация к высоким плотностям пульпы и концентрациям ионов металлов [23, 43, 44, 77, 92, 101, 113, 124, 180].

Ряд исследований показывает, что смешанные культуры и консорциумы микроорганизмов более эффективны и стабильны в окислении сульфидных минералов, чем чистые культуры [23, 31, 63, 65, 95]. Установлено также, что в биовыщелачивании халькопирита более эффективны культуры, содержащие автотрофные и миксотрофные виды бактерий, чем смешанные культуры, содержащие три или четыре вида, таких как *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Sulfobacillus* sp. и *Ferroplasma thermophilum* [173, 174]. С этой точки зрения разработка и оптимизация микробных консорциумов для использования в коммерческих системах выщелачивания остается важной проблемой. Для создания высокоэффективных, устойчивых консорциумов решающими факторами являются температура, pH, концентрация металлов, токсичные ионы и тд. [23, 43, 92, 101, 124, 113].

В Армении имеются огромные массы медьсодержащих некондиционных руд и отвалов, упорных золотоносных руд, а также хвостов обогатительных фабрик, эффективная переработка которых возможна только с применением метода БВ. Проблема имеет также экологический аспект, поскольку применение более природооберегающей технологии может способствовать улучшению общего экологического состояния в республике.

Цель и задачи. Основной целью работы было изучение процессов извлечения ценных металлов из сульфидных минералов, руд и хвостов с применением высокоактивных штаммов ХБ, их консорциумов и иммобилизованными клетками.

Для достижения основной цели были поставлены следующие задачи:

- выделение и скрининг ХБ, обладающих высокой активностью в окислении сульфидных минералов и руд для использования в биогидрометаллургии;
- исследовать влияние физико-химических и других факторов на процессы выщелачивания сульфидных минералов и руд;
- разработать консорциумы выделенных ХБ для повышения эффективности выщелачивания пирита и халькопирита;
- изучить перспективы применения разработанных консорциумов бактерий для выщелачивания ценных металлов из руд и хвостов;
- в лабораторных условиях изучить возможности применения иммобилизованных бактерий с целью интенсификации процессов биовыщелачивания и биоокисления.

Научная новизна: На основании выделенных в лаборатории наиболее активных штаммов *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *L.ferriphilum* CC, *At.albertensis* SO-2 и ацидофильных гетеротрофных бактерий разработаны ассоциации и консорциумы бактерий, которые по эффективности биовыщелачивания пирита, халькопирита и Тандзутской золотоносной руды значительно превосходят соответствующие чистые культуры. Впервые показана важная роль выделенной нами сероокисляющей бактерии *At.albertensis* SO-2 в интенсификации выщелачивания халькопирита в ассоциации с железокисляющими бактериями.

Впервые в состав консорциумов включены ацидофильные гетеротрофные бактерии, что позволило значительно повысить активность автотрофных консорциумов в окислении пирита и халькопирита.

Установлены оптимальные параметры выщелачивания халькопирита и биоокисления Тандзутской золотоносной руды чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и его ассоциациями с другими серо- и железокисляющими бактериями.

Впервые исследованы возможности биовыщелачивания Дрмбонских хвостов. Показано, что применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с природным консорциумом выщелачивающих бактерий рудничной воды приводит к значительной интенсификации извлечения ценных металлов из хвостов.

Показано, что предобработка пирита и халькопирита трехвалентным железом, полученным иммобилизованными на шунгите и активированном угле клетками *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, значительно повышает скорость выщелачивания и степень экстракции меди и железа консорциумом *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железокисляющими бактериями.

Практическая значимость: Изученный штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn благодаря высокой активности окисления пирита, халькопирита, сульфидных руд и концентратов является перспективным для применения в процессах БВ цветных металлов и БО золотоносных руд и хвостов. Штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn депонирован в Центре депонирования микроорганизмов НППЦ «Армбиотехнология» под номером MDC 7055.

Разработанные экспериментальным путем консорциумы *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железокисляющими и гетеротрофными бактериями, позволяют осуществить выщелачивание халькопирита, Тандзутской упорной золотоносной руды и Дрмбонских хвостов значительно эффективнее, чем ассоциация автотрофных бактерий. Указанные консорциумы могут успешно применяться в биогидрометаллургии для получения цветных и драгоценных металлов из руд, концентратов и хвостов.

Предложенный метод биовыщелачивания сульфидных минералов с интегрированной предобработкой биогенным железом позволяет значительно ускорить процесс извлечения меди и железа из руд, концентратов и хвостов.

Основные положения выносимые на защиту.

- Наибольшую активность в окислении пирита и халькопирита Шамлугского месторождения среди изученных железо – и сероокисляющих бактерий проявляет штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn., выделенный из Тандзутского месторождения Армении,
- оптимальными для выщелачивания халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn являются плотность пульпы 10%, pH 2.0, и размеры частиц + 43 мкм;
- ассоциация *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железоокисляющими бактериями по эффективности окисления пирита и халькопирита значительно превосходит чистую культуру. Наибольшую активность в выщелачивании халькопирита проявляет консорциум, состоящий из железо- и сероокисляющих бактерий и гетеротрофных бактерий;
- культивированием в условиях возрастающих плотностей и концентраций ионов металлов можно повысить устойчивость *Acidithiobacillus* sp 13Zn *L.ferriphilum* CC к меди и цинку.
- предобработка пирита и халькопирита биогенным железом, полученным иммобилизованными клетками *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, значительно ускоряет экстракцию меди и железа при их последующем биовыщелачивании.

Связь с научными темами, планами и программами. Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы базового финансирования НПЦ «Армбиотехнология» в период с 2013 по 2016гг. Ряд работ проводился по гранту MES-BMBF – 2012 - 2014 «Isolation and characterization of novel metal leaching microorganisms and perspectives of intensification of biohydrometallurgical processes».

Личный вклад автора Автором осуществлены обобщение и анализ литературных данных, реализация поставленных задач. Автор активно участвовал в обобщении и интерпретации полученных результатов, оформлении научных статей и диссертации.

Апробация работы. Основные результаты работ были доложены на: заседаниях ученого совета НПЦ «Армбиотехнология», Международном научном семинаре «Тенденции в микробиологии и микробной биотехнологии», Ереван, Армения, 5 - 8 октября, 2014;

Международной конференции молодых ученых «Инновационные подходы в области науки», Цахкадзор, Армения, 5-7 декабря, 2014, III Международной конференции молодых ученых «Dialogues on Science», Yerevan, Armenia, 23 - 26 июня, 2015; XII Международной конференции минералогической ассоциации Польши «Contemporary challenges in the mineralogical sciences», Сандомирж, Польша, 8-11 октября, 2015.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 6 печатных работах, включая 3 статьи и 3 тезиса.

Место выполнения работы. Основная часть работы выполнена в лаборатории геомикробиологии Института микробиологии НПО «Армбиотехнология». Органические кислоты в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ на базе «Стандарт диалог» ООО.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 5 глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 102 страницах, содержит 22 таблицы, 42 рисунка. Цитированная литература включает 181 работы на русском и английском языках.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биогидрометаллургическое получение металлов

Биоминеральная промышленность является современной стабильно развивающейся альтернативной технологией получения металлов. Биоминеральная промышленность - это использование биогидрометаллургических процессов для переработки минерального сырья. В основе биогидрометаллургии лежит применение микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, таких как трехвалентное железо, серная кислота и т.д. для извлечения металлов из руд. Микробиологическая переработка руд и концентратов имеет экономическое, техническое и что особенно важно, экологическое преимущества по сравнению с традиционным обжигом и автоклавным окислением в кислой среде при высоких давлениях и температурах [132, 135].

Биогидрометаллургические процессы в биоминеральной промышленности реализуются в реакторах непрерывного чанового выщелачивания и кучного выщелачивания. Выщелачивание использовали для извлечения меди из руд с давних времен [62]. Однако развитие современных коммерческих процессов биовыщелачивания было связано с открытием первой серо- и железooksисляющей бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* в середине XIX в. [162] и выявлением роли микроорганизмов в формировании кислых дренажных вод в сульфидных месторождениях.

Кучное биовыщелачивание в коммерческих целях впервые было реализовано на медном руднике Bingham Canyon (штат Юта, США) для извлечения меди из некондиционных руд. Впоследствии начиная с 1980г. многочисленные установки кучного биовыщелачивания меди были введены в эксплуатацию во многих странах мира и в конце прошлого века мировая продукция меди методом биовыщелачивания возросла от 10 и достигала 25% [41] (рис.1). Вслед за медью кучное выщелачивание было коммерциализовано на урановом руднике Elliot Lake Mine (Онтарио, Канада) для получения урана.



Рис.1. Кучное выщелачивание меди

Чановое выщелачивание широко применяется в биоминеральной промышленности благодаря ряду преимуществ. Чановое выщелачивание - высоко контролируемый процесс и в отличие от кучного выщелачивания, обеспечивает высокую эффективность биовыщелачивания с точки зрения скорости и степени извлечения металлов. Постоянно осуществляемый контроль за аэрацией, pH и температурой позволяет оптимизировать рост и активность микроорганизмов, функционирующих в чанах. Кроме того, чановое выщелачивание приводит к продолжительной селекции и доминированию тех микроорганизмов, которые более эффективно могут расти и функционировать в условиях чана.

Чановые реакторы используются как для осуществления процессов биовыщелачивания, так и процессов биоокисления.

Чановое биовыщелачивание используется для извлечения базовых металлов, таких как кобальт, цинк, медь и никель из соответствующих сульфидов и урана из оксида урана.

Биовыщелачивание - это растворение нерастворимых сульфидов металлов в растворимые соединения с дальнейшей экстракцией металлов из выщелачивающих растворов.

В отличие от биовыщелачивания, при биоокислении целевой продукт переходит в твердую фазу (в осадок). Биоокисление часто используется для извлечения золота и серебра. В основе процесса лежит окисление пирита и арсенипирита с использованием микроорганизмов с целью высвобождения золота, находящегося в кристаллической решетке минералов с последующей его экстракцией традиционным цианированием. Первая установка биоокисления для предобработки золотоносных руд была коммерциализована в 1986 году фирмой Gencor в руднике Fairview в Южной Африке [28]. Процесс BIOX, разработанный Gencor функционирует при 40 - 45°C (рис.2).



Рис.2. Чановая установка для биоокисления

Возрастающая потребность в драгоценных металлах требует недорогих методов для их эффективной экстракции. В зависимости от типа руд и концентратов разработаны разные химические и физические методы для извлечения золота. Так, для богатых окисленных руд применяется химическое выщелачивание. Руды, содержащие значительное количество углерода, подвергаются обжигу при 500°C для удаления углерода и серы (SO_2). Для упорных сульфидных руд применяется автоклавирование с целью окисления сульфидных минералов и высвобождения золота с последующим его извлечением цианированием. Однако ввиду минимального экологического воздействия на окружающую среду и ряда других преимуществ, чановое биоокисление успешно

применяется для удаления железа и мышьяка из золотоносных руд, постепенно вытесняя указанные физико-химические и пирометаллургические технологии [68].

В настоящее время функционируют около десяти установок непрерывного чанового биоокисления с использованием двух разных технологий. Одна из них - это басох технология, разработанная Канадской фирмой BasTech [28, 41, 125, 135]. В настоящее время функционируют три установки с использованием басох процесса в Китае (Liazhou). BasTech технология биовыщелачивания разработана совместно bateman и Mintek в Австралии и Уганде. BasTech планирует построить установку биовыщелачивания Co, Ni и Ag из хвостов в Онтарио.

Кучное выщелачивание меди широко используется в биоминеральной промышленности, однако все существующие технологии основаны на извлечении меди из вторичного минерала - халькозина (Cu_2S) [68, 125].

Халькозин легко выщелачивается под действием протонов с образованием ковеллина (CuS) (уравн.1) и с помощью Fe (III) (уравн.2), образованного в результате бактериального окисления Fe (II).



Ковеллин впоследствии тоже подвергается выщелачиванию ионами Fe (III) (уравн.3)



Однако основной первичный минерал меди – халькопирит (CuFeS_2) по разработанной для халькозина технологии выщелачивается очень медленно. Исследования по выщелачиванию халькопирита продолжаются для преодоления образования пассивирующего слоя из-за осаждения ярозита ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), что ингибирует извлечение меди при кучном биовыщелачивании халькопирита. С этой точки зрения в настоящее время разрабатывается новая технология, основанная на использовании термофильных микроорганизмов для интенсификации кучного и чанового выщелачивания халькопирита [171].

Биовыщелачивание сульфидов цинка в лабораторных условиях хорошо изучено многими исследователями [54, 129, 155, 140a]. Однако до сих пор нет промышленной установки для извлечения цинка и никеля, несмотря на то, что проведенные пилотные испытания указывают на перспективность технологии биовыщелачивания для этих

металлов. BHP Billiton Ltd. эксплуатирует пока пилотные процессы извлечения основных металлов цинка, меди и никеля из соответствующих сульфидов с помощью чанового биовыщелачивания.

1.2. Механизм окисления сульфидных минералов

В настоящее время различают три основных механизма в биовыщелачивании сульфидных минералов [166] (Рис.3):

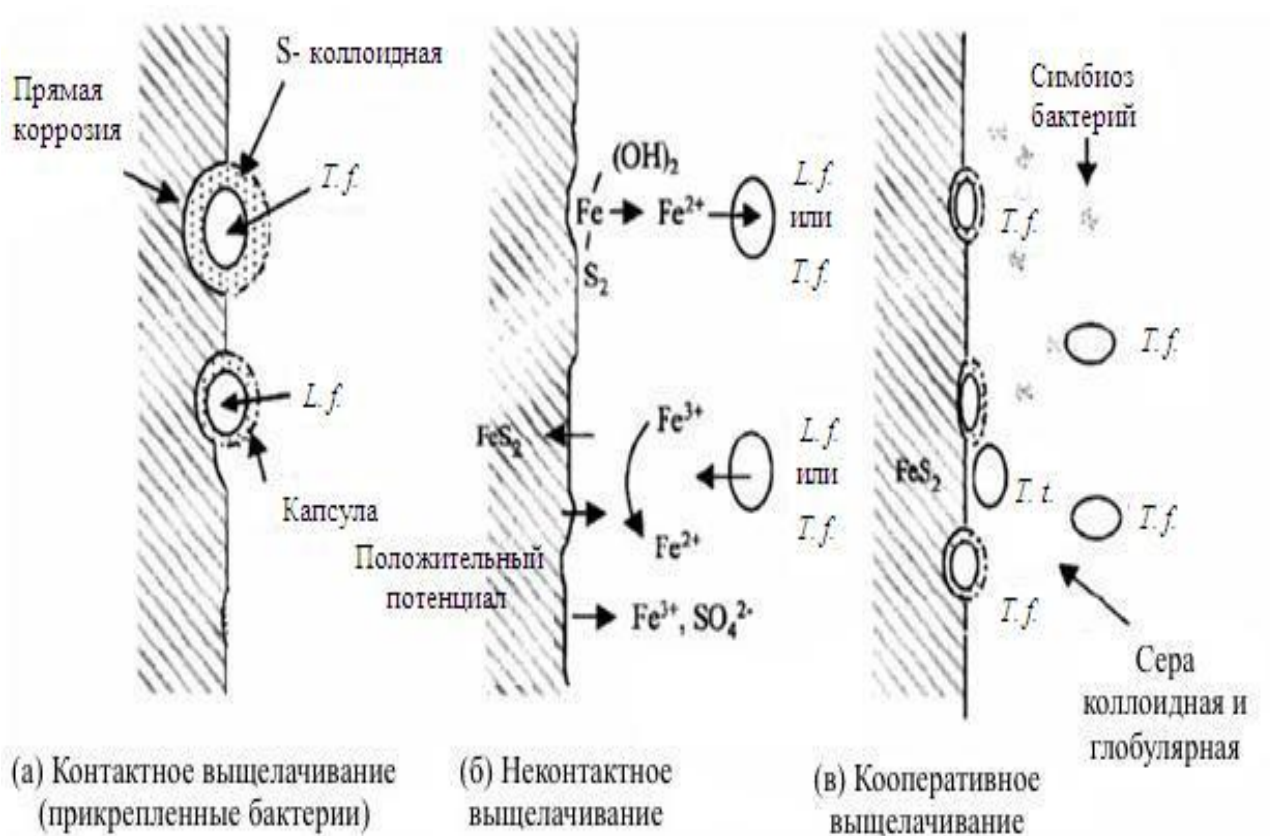


Рис. 3. Основные механизмы биовыщелачивания сульфидных минералов (по Tributsch, 1999):

1. Непрямое выщелачивание, когда деятельность микроорганизмов ограничивается регенерацией выщелачивающего агента - Fe(III), (рис. 3 а, б)

2. Контактное выщелачивание, что предполагает прикрепление микроорганизмов на поверхности минерала, которые создают среду и облегчают выщелачивание минерала через электрохимическое растворение с помощью ионов Fe(III), содержащихся в EPS (рис. 3а).

3.Кооперативное выщелачивание, что предполагает кооперацию между прикрепленными на поверхности минерала и свободными микроорганизмами в растворе. Прикрепленные клетки с помощью контактного выщелачивания высвобождают и переводят в раствор химические вещества, которые служат энергетическим субстратом для свободных микроорганизмов (рис. 3 в).

В зависимости от типа минерала различают два разных пути непрямого окисления минералов [146, 154, 161]. Сульфиды металлов, валентные связи которых получаются исключительно из орбиталей металлов, окисляются с помощью Fe(III) и не могут подвергаться протонной атаке (FeS_2 , MoS_2 и WS_2). Растворение указанных минералов согласно работам Стеуделя [157] протекает через образование тиосульфата (рис.4).

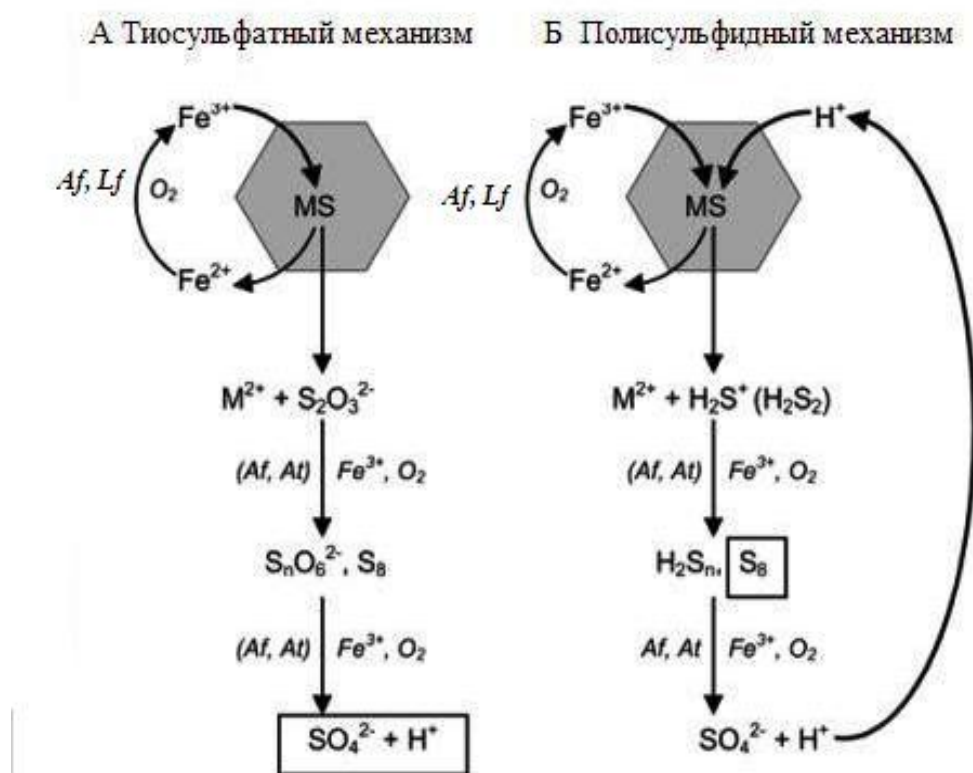
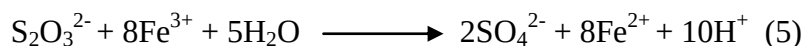


Рис. 4. Схема тиосульфатного (А) и полисульфидного (Б) механизмов непрямого окисления сульфидных минералов (по Schippers, Sand, 1999)

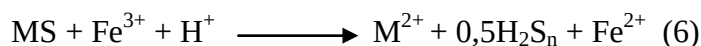
Другие сульфиды в образовании валентных связей которых участвуют орбитали металлов и серы, растворимы в кислоте и подвергаются атаке как со стороны протонов, так и ионов Fe(III) (ZnS , CdS , NiS , CoS , CuS и CuS_2). Растворение этих сульфидов протекает по другому механизму – через образование полисульфидов (рис.4).

Вышеуказанные два механизма можно представить следующими уравнениями:

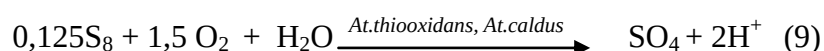
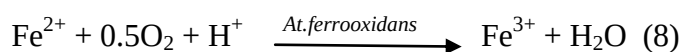
Тиосульфатный механизм:



Полисульфидный механизм:



Образовавшиеся двухвалентное железо (Fe^{2+}) и сера (S_8) далее окисляются хемолитотрофными железо- и сероокисляющими бактериями (уравн. 8, 9):



Следовательно, роль бактерий в процессах непрямого окисления минералов заключается в снабжении ионов Fe(III) (для окислительной атаки) и /или протонов (для гидролитической атаки).

В основе контактного выщелачивания лежит прикрепление клеток на поверхности минералов. Прикрепление осуществляется с помощью внеклеточных полимерных соединений (ВПС- EPS). Прикрепление происходит главным образом в результате электростатических взаимодействий между положительно заряженными клетками и отрицательно заряженным минералом (пирит) при pH 2.0 [70, 142]. Согласно литературным данным прикрепление клеток к минералу происходит не произвольно, а предпочтительно к дефектным участкам сульфидного минерала [60, 61, 69, 70, 121, 139, 148]. Показано, что культуры *At.ferrooxidans* и *L.ferrooxidans* обладают хемосенсорной системой – хемотаксисом, который представляет позитивную реакцию к градиенту $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}$, тиосульфату и т.д [18, 114].

Показано, что скорость и интенсивность выщелачивания пирита увеличиваются при прямом контакте бактериальных клеток с минералом. Это объясняется увеличением концентрации ионов Fe(III) в пространстве, находящимся между бактериальными клетками и поверхностью пирита (рис.5). Данное пространство служит в качестве реакционной среды, наполненной ВПС [139, 143, 144, 146, 147, 175, 176]. ВПС содержат

комплексные ионы Fe(III) в концентрациях, во много раз превышающих его концентрацию в окружающей среде. Герке с соавторами [70] показали важную роль ВПС в процессе выщелачивания пирита, поскольку лишенные ими клетки *A.ferrooxidans* не способны выщелачивать пирит.

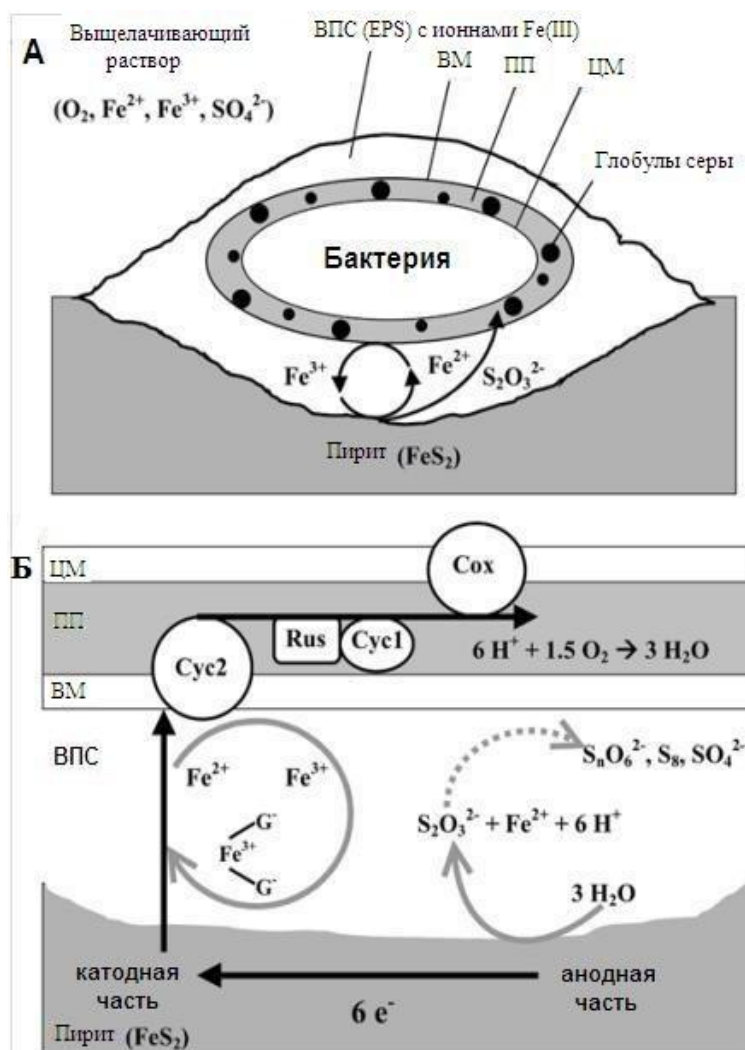


Рис. 5. Модел контактного непрямого механизма выщелачивания пирита *At.ferrooxidans* (Rohwerder et al., 2003)

ВПС – внеклеточные полимерные соединения, ВМ – внешняя мембрана, ЦМ – цитоплазматическая мембрана, ПП – периплазматическое пространство

Согласно неконтактному механизму основным окисляющим фактором для сульфидных минералов является Fe(III) , образованное неприкрепленными клетками, функционирующими в жидкой фазе. В этом случае эффективность выщелачивания сульфидных минералов определяется скоростью окисления Fe(II) . Иммобилизация обеспечивает концентрирование бактериальных клеток на поверхности или внутри твердых носителей, позволяющее значительно повысить интенсивность окислительных процессов. Иммобилизация *At.ferrooxidans* осуществлялась методом адгезии. В качестве

адгезивных носителей применяли неорганические матриксы, такие как стеклянные бусины, песок, никелевые фибры и т.д [72, 75, 76, 109, 174]. Исследования показали, что процесс иммобилизации зависит от свойств поверхности адсорбента [16], зета потенциала, поверхностного натяжения [30], а также состава питательной среды [25].

Установлено, что повышение температуры стимулирует рост иммобилизованных клеток и окисление ими Fe (II) [117, 179]. Процесс иммобилизации зависит также от pH среды. Показано, что процесс иммобилизации *At.ferrooxidans* при pH 2.0 в 2 - 8 раз протекает более эффективно, чем при pH 1.7 и 1.4, соответственно [75]. Предполагается, что при низких pH резко снижается образование ярозита и поскольку биопленка состоит из клеток бактерий, прикрепленных к пористой поверхности ярозита, то неизбежно уменьшается и биомасса иммобилизованных клеток.

Иммобилизованные клетки железоокисляющих бактерий могут использоваться как в процессах выщелачивания концентратов цветных металлов, так и для обработки кислых дренажных вод.

1.3. Микроорганизмы, участвующие в окислении сульфидных минералов

1.3.1. Микроорганизмы, встречающиеся в природных экосистемах

Изучение микробного разнообразия сульфидных руд особенно важно для усовершенствования биогидрометаллургических технологий получения металлов. Исследование микробных ассоциаций в отвалах сульфидных руд даст информацию, важную для понимания какой организм за какими процессами ответственен, а также для определения зон высокой и низкой активности, кинетики отдельных процессов, например окисления пирита и т.д.

По данным ряда авторов природные ниши биовыщелачивания характеризуются большим разнообразием микроорганизмов. В них обнаружены более 33 видов бактерий, принадлежащих к 14 родам и трем доменам [2, 31, 32, 37, 60, 99].

Микробное разнообразие отвалов сульфидных руд представлено аэробными и анаэробными видами, которые являются автотрофами, способными фиксировать CO₂ или гетеротрофами, использующими C_{орг} как источник углерода, а также литотрофами, использующими неорганические субстраты как источники энергии или органотрофами (C_{орг} как источник энергии). Список микроорганизмов на уровне родов из трех доменов *Bacteria*, *Archaea* и *Eukaryota*, обнаруживаемых в отвалах с помощью методов культивирования и молекулярно биологическими методами представлен в таблице 1.

Таблица 1

Биоразнообразие микроорганизмов в природных биотопах сульфидных руд (по Schippers et al., 2010)

Домены, Роды	Доноры электронов					Акцепторы электронов	
	Пирит	Другие сульфиды металлов	Fe (II)	Сера	C _{орг}	Fe (III)	Сульфат
Бактерии							
<i>Acidimicrobium</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>Acidiphilium</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>Acidisphaera</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Acidithiobacillus</i>	+	+	+	+		+	-
<i>Acinetobacter</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Alicyclobacillus</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>Desulfobacter</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Desulfobacterium</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Desulfococcus</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>Desulfovibrio</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Ferribacterium</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>Gallionella</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leptospirillum</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sulfobacillus</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Thiobacillus</i>	-	+	-	+	+	-	-
<i>Thiomonas</i>	-	+	-	+	+	-	-
Археи							
<i>Acidianus</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Ferroplasma</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>Metallosphaera</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Sulfolobus</i>	+	+	+	+	+	-	-

Из данных таблицы следует, что наиболее часто встречающиеся виды принадлежат к домену *Bacteria*. Представители *Archaea* – это в основном термофилы. *Eukaryota*, обнаруженные в этих средах обитания, включают водоросли, грибы, дрожжи и простейшие [94]. На уровне видов обнаружены *Acidiphilium cryptum*, *At.ferrooxidans*, *At.thiooxidans*, *Ferroplasma acidiphilum*, *F.cupricumulans*, *Gallionella ferruginera*, *L.ferrooxidans*, *L.ferriphilum*, *Sulfobacillus thermotolerans*, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus thioparus* и *Thiomonas intermedia* (табл.1).

Среди указанных выше бактерий за окисление сульфидных минералов ответственны железо - и серо-окисляющие бактерии и археи. Эти микроорганизмы широко встречаются в отвалах руд, находящихся в разных климатических зонах [106, 150, 153].

Конечные продукты жизнедеятельности железо- и сероокисляющих бактерий и архей - Fe(III) и сульфат утилизируются анаэробными микробами. Так, сульфат-восстанавливающие бактерии и археи могут осаждать металлы в виде сульфидов металлов [34, 153].

Нейтрофильные сероокисляющие бактерии окисляют восстановленные серные соединения, образуемые в результате химического окисления сульфидных минералов при нейтральных pH. Во многих случаях эти бактерии встречаются в несколько раз больших количествах, чем ацидофильные бактерии.

Следующая группа бактерий, встречающихся в отвалах – это ацидофильные гетеротрофы, которые утилизируют органические соединения и тем самым обеспечивают непрерывный рост автотрофов.

Следует отметить, что молекулярно-биологические методы, такие как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), CARD - FISH, полимеразная цепная реакция (PCR) комбинированная с клонированием, денатурирующий градиентный гель электрофорез (DGGE), широко используемые в последние годы для изучения биоазнообразия и количественного учета отдельных микроорганизмов. позволяют обнаружить потенциально все микроорганизмы [82, 99, 151]. В то время как методом культивирования можно обнаружить только культивируемую часть микробных ассоциаций. Именно благодаря этим методам были описаны новые неизвестные ранее микроорганизмы, такие как *L.ferriphilum*, *At.ferrivorans*, *Ferimicrobium acidiphilum* [97, 178]

1.3.2. Микроорганизмы, участвующие в выщелачивании сульфидных минералов в технологических процессах

Биовыщелачивание с помощью микроорганизмов широко используется для получения меди, других цветных и благородных металлов во всем мире [55, 136]. Однако только в последние годы была установлена роль микроорганизмов, вовлеченных в этот процесс.

Реакторы непрерывного выщелачивания с перемешиванием характеризуются постоянными параметрами - температурой, pH и аэрацией. Постоянство условий в реакторах обуславливает небольшое число доминирующих видов микроорганизмов. В целом биоразнообразие в реакторах лимитировано 2 - 4 видами [101, 137, 147]. При этом установлено, что состав микробных консорциумов во многом зависит от природы минералов и концентратов, подвергающихся выщелачиванию (табл.2).

Таблица 2

Ацидофильные бактерии, обнаруженные в реакторах биовыщелачивания и биоокисления (по Rawlings, Johnson, 2007)

Концентраты	T (°C)	Обнаруженные прокариоты	Авторы
Цинк/ Свинец	35 - 40	<i>L.ferrooxidans</i> , <i>At. thiooxidans</i> , <i>Acidiphilium cryptum</i> , <i>At.ferrooxidans</i> ,	[73]
Пирит/ арсенопирит (золото)	40	<i>L. ferrooxidans</i> , <i>At.thiooxidans</i> , <i>At. ferrooxidans</i>	[52]
Кобальто-железный пирит	35	<i>L. ferrooxidans</i> , <i>At.thiooxidans</i> , <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	[33]
Полиметаллический (сульфиды меди, цинка и железа)	45	<i>L.ferriphilum</i> , <i>At.caldus</i> , <i>Sulfobacillus</i> <i>sp.</i> , <i>F. acidophilum</i>	[123]
Пирит, халькопирит	45	<i>At. Caldus</i> , <i>Sulfobacillus</i> <i>thermosulfidooxidans</i> , " <i>Sulfobacillus</i> <i>montserratensis</i> ",	[58]
Халькопирит	78	(<i>Sulfolobus shibitae</i>), <i>Metallosphaera</i> , <i>Acidianus infernus</i>	[115]

При кучном выщелачивании условия неодинаковые с точки зрения интенсивности ирригации, (орошения), температуры, pH, аэрации, редокс потенциала, доступности питательных веществ и т.д., что предполагает большое разнообразие минерал-окисляющих микроорганизмов. Например, температура при кучном выщелачивании может определяться климатическими условиями. Поэтому в отличие от реакторов, кучи выщелачивания характеризуются значительно большим биоразнообразием. При этом доминирующие виды могут варьировать случайным образом, а также в зависимости от стадии функционирования кучи (табл. 3)

Таблица 3

Ацидофильные бактерии, обнаруженные в реакторах кучного выщелачивания

Тип кучи и местонахождение	Обнаруженные микроорганизмы	Источники
Халькопирит (Австралия)	<i>At. ferrooxidans</i> , <i>At.thiooxidans</i> , <i>Ac.cryptum</i>	[73]
Медная сульфидная/окисленная куча	<i>Acidithiobacillus</i> spp., <i>L. ferrooxidans</i> , <i>Acidiphilium</i> spp., , <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	[42]
Медная сульфидная/окисленная куча (США)	<i>Sulfobacillus</i> spp., и другие <i>Firmicutes</i> , <i>F.acidiphilum</i> , <i>Acidisphaera</i> spp., <i>At. ferrooxidans</i> , <i>At.thiooxidans</i> ,	[136]
Халькозитная куча (Австралия)	<i>L. ferriphilum</i> , <i>At. caldus</i> , <i>Ferroplasma</i> spp.	[81]
Медная куча (Чили)	<i>At. ferrooxidans</i> , <i>L.ferriphilum</i> , <i>F.acidiphilum</i> , <i>Firmicutes</i>	[51]

Таким образом, основные выщелачивающие бактерии принадлежат к роду *Acidithiobacillus* (= *Thiobacillus*) [104, 105]. Первые представители этого рода экстремально ацидофильные железо- и/или сероокисляющие мезофильные бактерии *At.ferrooxidans*, *At.thiooxidans*, которые с недавно выделенной и описанной умеренно термофильной *At.caldus* относятся к грамотрейцательным γ – протеобактериям. Другие выщелачивающие

протеобактерии принадлежат к родам *Acidiphilium* и *Leptospirillum* [46, 83, 147, 168]. Представители родов *Acidimicrobium*, *Ferroomicrobium* и *Sulfobacillus* - умеренно термофильные грамположительные бактерии [45, 102, 120]. Выщелачивающие архебактерии - это экстремальные термофилы, принадлежащие к родам *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* [66, 67, 108, 119], и недавно выделенные мезофильные представители рода *Ferroplasma* - *F.acidiphilum* [74], *F.acidarmanus* [59].

L.ferrooxidans, *L.ferriphilum* и *Acidimicrobium ferrooxidans* характеризуются узкой специализацией – способны окислять только Fe (II), тогда как *At.ferrooxidans*, может расти за счет окисления восстановленных соединений серы, водорода, Fe (II) и других ионов металлов. *Acidiphilium spp.* and *Acidisphaera rubrifaciens* имеют пигменты, что может свидетельствовать об их фотосинтетической активности [45, 85, 86, 89]. *F.acidophilus* [102], *Sulfobacillus spp.* бактерии, а также термофильные архебактерии являются миксотрофами и не могут расти облигатно автотрофно [94].

1.4. Факторы, влияющие на интенсивность выщелачивания сульфидных минералов в технологических процессах

1.4.1. Влияние состава микробных консорциумов

Интенсивность процесса биоокисления сульфидных минералов зависит от температуры, pH, окислительно-восстановительного потенциала, а также природы используемых микроорганизмов. Среди указанных факторов наиболее важным являются микроорганизмы. Ряд исследований показывает, что смешанные культуры и консорциумы микроорганизмов более эффективны и стабильны в окислении сульфидных минералов, чем чистые культуры [23, 31, 63, 65, 95].

С этой точки зрения разработка и оптимизация микробных консорциумов для использования в коммерческих системах выщелачивания остается важной проблемой. В настоящее время для разработки оптимальных микробных консорций для чанового выщелачивания предложено два разных подхода “сверху вниз” и “снизу вверх” [136].

При подходе “сверху вниз” в качестве инокулята для выщелачивания сульфидных руд используется смешанная культура, полученная из природных проб и характеризующаяся большим видовым разнообразием. При этом подходе основываются на предположении, что в процессе выщелачивания может образовываться стабильный и эффективный консорциум, состоящий из ограниченного числа бактерий, а другие исчезнут. Используя этот подход, многим исследователям удалось создать эффективные и

устойчивые консорциумы культуры для биовыщелачивания при плотностях пульпы не превосходящих 12% [91, 172, 180].

Исследование структур сообществ, сформированных при выщелачивании халькопирита, показало, что их биоразнообразие невысокое [136]. При этом отмечено, что физиологические свойства и функции членов сообщества взаимодополняют. Так, показано, что указанное сообщество может включать не только железо-окисляющие бактерии (*L.ferriphilum*, *S.acidophilus*, *F.thermoplasma*) и бактерии, окисляющие восстановленные неорганические соединения серы (RISCs) (*At.caldus*, *S.acidophilus*), но и миксотрофы (*S.acidophilus*, *F.thermoplasma*). Железо-окисляющие бактерии окисляют сульфидные минералы с помощью продуцируемого ими трехвалентного железа. Сероокисляющие бактерии ускоряют окисление минералов, удаляя пассивирующий слой элементной серы. Миксотрофы могут утилизировать органические вещества, содержащиеся в эксудате или в лизате клеток, и таким образом уменьшать токсичный эффект органических веществ для автотрофных бактерий, например *L.ferriphilum*. Кроме того, возможно, миксотрофы поставляют CO₂ для автотрофов. Указанные синергические взаимодействия между различными видами повышают стабильность консорциума и увеличивают экстракцию металлов [29, 94].

В отличие от этого подход “снизу вверх” заключается в создании высокоэффективных, устойчивых консорциумов для выщелачивания конкретных минералов. В таких консорциумах составные виды дополняют друг друга с точки зрения физиологических свойств, таких как способность к окислению серы и/или железа, к автотрофному или гетеротрофному росту и тд. Для создания таких конструированных консорциумов (определяющими) решающими факторами являются температура, pH, концентрация металлов, токсичные ионы и тд. Ряд исследователей показал, что культуры, полученные этим методом, наиболее эффективны в ускорении окисления конкретных минералов [23, 43, 92, 101, 113, 124].

Исследования показали, что смешанные культуры, состоящие из железо- и серо-окисляющих бактерий *At.ferrooxidans* и *At.thiooxidans* более эффективны в выщелачивании халькопирита, чем соответствующие чистые культуры. Присутствие серо-окисляющей бактерии *At.thiooxidans* увеличивает скорость растворения минерала и процент извлечения меди. Однако смешанная культура, состоящая из умеренно термофильных бактерий *L.ferrooxidans* и *At.caldus*, выщелачивает халькопирит с большей эффективностью, чем мезофильная бактерия *At.ferrooxidans* в чистой и смешанной культуре [65]. С другой стороны отмечено, что после 12 - 16 суток выщелачивания уменьшается скорость

растворения халькопирита *At.ferrooxidans*, что совпадает с образованием ярозита как пассивирующего слоя на поверхности минерала в процессе биовыщелачивания. Применение смешанной культуры, состоящей из *L.ferriphilum* и *At.caldus* приводит к резкому снижению pH среды в результате интенсивного окисления серы, что в свою очередь препятствует образованию ярозита и способствует выщелачиванию халькопирита [65]. Кроме того *L.ferriphilum* и *At.caldus*, будучи термофильными бактериями, по сравнению с мезофилами более интенсивно выщелачивают халькопирит, поскольку с повышением температуры увеличивается скорость реакций окисления.

Установлено, что культуры, содержащие автотрофные и миксотрофные виды бактерий, более эффективны в стимулировании биовыщелачивания халькопирита, чем смешанные культуры, содержащие три или четыре вида, таких как *At.caldus*, *L.ferriphilum*, *Sulfobacillus* sp. и *Ferroplasma thermophilum* [173].

В процессе окисления пирита участвуют также гетеротрофные железоокисляющие бактерии [29, 103]. Большинство этих штаммов окисляет пирит в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта. Для окисления пирита гетеротрофные железоокисляющие бактерии нуждаются в наличии в среде ионов Fe (II), что свидетельствует о непрямом механизме окисления ими пирита. Несмотря на то, что ни гетеротрофные железоокисляющие бактерии, ни *At.thiooxidans* в монокультуре не способны окислять пирит в автотрофных условиях, однако при совместном выращивании этих бактерий ускоряется выщелачивание пирита в отсутствие дрожжевого экстракта [29]. Окисление пирита стимулирует также смешанная культура гетеротрофных железоокисляющих бактерий и миксотрофной бактерии *Acidiphilium acidophilum* (= *Thiobacillus acidophilus*). Однако наблюдаемый при этом сравнительно низкий эффект ассоциации гетеротрофных бактерий и *Ac.acidophilum* объясняется тем, что последняя может конкурировать с гетеротрофными железоокисляющими бактериями за органические источники углерода, тем самым ограничивать рост гетеротрофов и окисление Fe (II). Взаимоотношения между бактериями в данном случае рассматривается как новый тип бактериального синергизма, что существенно отличается от таковых, описанных у ацидофилов. Дело в том, что подобно другим автотрофным ацидофилам, *At.thiooxidans* выделяет в среду органические вещества, которые могут использоваться гетеротрофными ацидофилами [38]. Нижеприведенная гипотетическая схема объясняет механизм окисления пирита смешанной культурой *At.thiooxidans* и гетеротрофных железоокисляющих бактерий (рис. 6.).

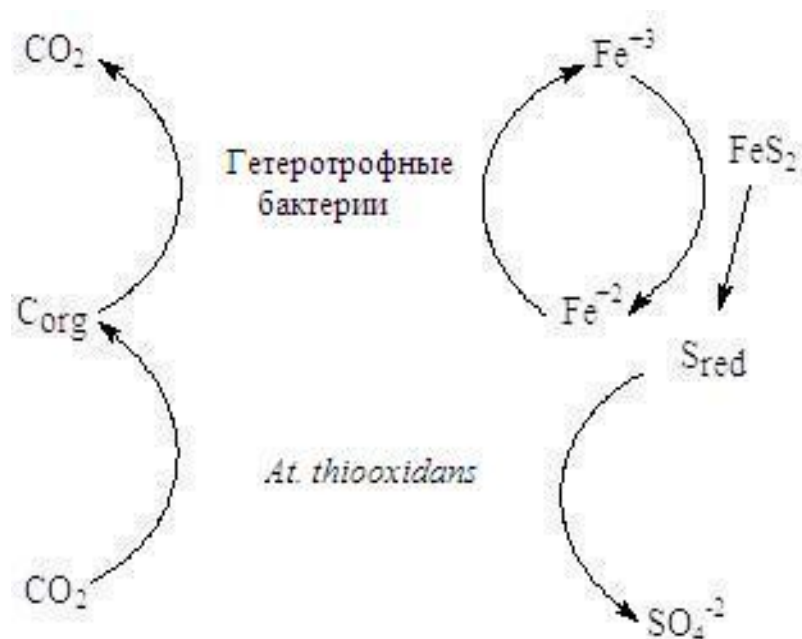


Рис.6. Гипотетическая схема ускорения окисления пирита смешанной культурой *At. thiooxidans* и гетеротрофных железоокисляющих бактерий (Согласно Bacelar-Nikolau, Johnson, 1999)

В основе этого механизма лежит окисление гетеротрофными бактериями Fe (II) в Fe(III), которое реагирует с пиритом, образуя тиосульфат. В кислой среде тиосульфат гидролизуется в элементную серу, разные политионаты и сульфаты. Эти восстановленные соединения серы являются субстратами для *At.thiooxidans*. *At.thiooxidans* в свою очередь в процессе роста в среду выделяет органический углерод. Последний полностью или частично потребляется гетеротрофными бактериями и цикл повторяется.

1.4.2. Влияние плотности пульпы

Важным этапом в получении высокоактивных культур выщелачивающих бактерий является их адаптация к высоким плотностям пульпы и высоким концентрациям ионов металлов. Культивирование в условиях постепенно возрастающих плотностей пульпы или ионов металлов является известным методом для увеличения биовыщелачивающих свойств бактерий и широко используется многими исследователями [26, 44, 77, 133, 180].

Влияние высоких концентраций халькопирита на состав бактериальных консорциумов в процессе адаптации культур изучали с помощью клон библиотек гена 16S р РНК и DGGE анализов. Анализы показали, что при увеличении плотности пульпы количество *L.ferriphilum* в консорциуме уменьшается и вовсе не обнаруживается, когда

плотность пульпы превышает 4% (6 или 8%). *At.caldus* и *S.acidophilus* обнаруживаются во всех плотностях пульпы и стадиях адаптации. Количество *F.thermoplasma* резко меняется в процессе адаптации. Так, в начальных стадиях бактерия с трудом обнаруживается, а в конце составляет 30 % консорциума. Процентное отношение *At.caldus* в консорциуме при 20% плотности пульпы постепенно снижается от 60% в начале до 16% в конце процесса. *S.acidophilus* становится доминирующим в средних стадиях (66%). Несмотря на то, что процентное соотношение *F.thermoplasma* в начальной и средних стадиях была очень низкой, в конце эта цифра достигала 66% [173].

В выщелачивающих системах, функционирующих в умеренно термофильных условиях доминирующей бактерией в конечных стадиях является *F.thermoplasma* [81, 177, 181].

Считают, что увеличение плотности пульпы вызывает высокое парциальное давление, лимитирует транспорт кислорода и углекислого газа, что приводит к ингибированию роста бактерий [180].

1.4.3. Влияние окислительно-восстановительного потенциала

Показано, что ионы Fe (II) и Fe (III) в зависимости от концентрации по разному влияют на рост и активность железоокисляющих бактерий. Дас с соавторами [50] сообщают, что ионы Fe (III) при низких концентрациях стимулируют потребление кислорода бактериями, однако при высоких концентрациях ингибируют окисление Fe (II). О снижении скорости выщелачивания халькопирита при высоких концентрациях Fe (III) сообщается также другими авторами [88, 90, 130, 141, 164].

Кардоба и др. [48] изучали влияние ионов железа на растворение халькопирита при низком и высоком потенциале и установили, что несмотря на то, что ионы Fe (III) ответственны за окисление халькопирита, Fe (II) имеет важную роль в контролировании образования и осаждения ярозиата [19].

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) выщелачивающего раствора зависит от соотношения Fe (III) / Fe (II) и определяется уравнением Нернста (уравн. 10):

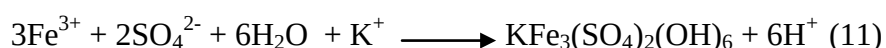
$$E_h = E_h^0 + (R.T/n.F) \times \ln [Fe(III)/Fe(II)] \quad (10)$$

ОВП в выщелачивающих системах повышается в результате деятельности железо-окисляющих микроорганизмов. Повышение ОВП способствует разложению таких минералов как халькозин (Cu_2S), ковеллин (CuS) и пирит (FeS_2). Однако в случае

халькопирита по данным ряда авторов максимальная скорость растворения минерала имеет место при низких ОВП [20, 21, 47, 71, 87, 88, 89, 149, 164].

Таким образом, ОВП является одним из наиболее важных параметров окружающей среды, влияющих на выщелачивание халькопирита и медных концентратов.

Окисление халькопирита мезофильной бактерией *At.ferrooxidans* со временем затрудняется из-за пассивации поверхности минерала. Исследования показали, что замедление выщелачивания меди часто сопровождается снижением pH среды. Исходя из этого предполагалось, что причиной уменьшения выщелачивания меди скорее всего является образование ярозита. Ионы трехвалентного железа в зависимости от реакции выщелачивающей среды могут осаждаться в виде ярозита (уравн.11).



Ярозит образует пассивирующий слой на поверхности минерала, что препятствует диффузии и следовательно снижает скорость выщелачивания халькопирита [122, 159, 176].

По мнению других исследователей причиной пассивации халькопирита является высокий ОВП выщелачивающей среды, который определяется отношением ионов Fe (III)/Fe(II) [71, 164,]. Поэтому одним из подходов преодоления данного эффекта - это поддержание низкого уровня окислительно-восстановительного потенциала в выщелачивающем растворе. О влиянии низких ОВП на биовыщелачивание халькопирита сообщается в ранних работах Аонен и Туовинен. С целью снижения ОВП раствора авторы предлагают подавлять аэрацию и тем самым ингибировать окисление железа [22].

Показано, что растворение меди из халькопирита линейно увеличивается при ОВП от 320 до 370 мВ. В этих условиях ингибируется окисление Fe(II) бактериями [35]. Кордоба и др [48] изучали влияние ОВП на химическое выщелачивание халькопирита при 68°C. Было показано, что при ОВП 300-400 мВ за 6 суток выщелачивалось почти 90% меди, а при ОВП 500- 600мВ- всего 30% за 13 дней. На основании полученных данных авторы заключают, что значения ОВП от 400 до 450 мВ являются пороговыми или предельными, выше которых окислительное растворение халькопирита постепенно тормозится из-за пассивирующего эффекта [47]. Выделение двухвалентного железа из халькопирита и осаждение трехвалентного железа обуславливает низкий ОВП. Эти же авторы сообщают, что ОВП резко увеличивается до 650 мВ в бактериальных культурах и улучшает растворение меди, тогда как эти условия не влияют на химическое выщелачивание.

Другие исследователи сообщают, что в присутствии 40 мМ Fe(II) выщелачивается в два раза больше меди, чем при использовании *At.ferrooxidans*, что объясняется низким ОВП в отсутствие *At.ferrooxidans* [89]. Авторы предложили модель выщелачивания халькопирита, приводящую к образованию халькозита (Cu₂S), который значительно быстро и легко окисляется кислородом и Fe (III). В качестве химически восстанавливающего агента для подавления ОВП может использоваться SO₂.



Скорость выщелачивания халькопирита увеличивается с увеличением ОВП раствора и достигает максимального значения при оптимальном ОВП. При более высоких ОВП скорость выщелачивания снижается.

Подобные результаты получили [163], которые изучали влияние стимулирования или ингибирования окислительной активности железоокисляющих бактерий в выщелачивании халькопирита. Проведенные исследования позволили им заключить, что образование Fe (III) в результате бактериального окисления Fe (II), подавляет растворение халькопирита. Авторы предлагают контролировать ОВП с помощью лимитации кислородом. С контролируемым ОВП бактериальное окисление Fe (II) лимитировалось, но при этом снабжалось достаточное количество Fe (III) для окисления халькопирита, и в итоге экстракция меди увеличилась в 2 раза. При этом пассивация была задержана, но не устранена полностью [164].

Присутствие сероокисляющих бактерий *At.thiooxidans* и *At.caldus* увеличивает скорость выщелачивания и экстракцию меди из халькопирита. Эти бактерии окисляют серу до серной кислоты и препятствуют ее аккумуляции в среде [57]. Сера может накапливаться на поверхности минерала и негативно влиять на кинетику выщелачивания [64].

1.4.4. Влияние ионов металлов

Ацидофильные выщелачивающие микроорганизмы занимают наиболее богатые металлами природные и антропогенные экосистемы, такие как кислые дренажные воды, хвосты и другие отходы обогатительных фабрик. Изучение устойчивости и адаптации этих микроорганизмов к высоким концентрациям металлов представляет большой научный и практический интерес. Этот интерес в первую очередь вызван проблемой получения

штаммов выщелачивающих микроорганизмов, устойчивых к высоким концентрациям меди для применения в биогеотехнологических процессах. Исследованиями установлено, что когда концентрация меди внутри бактериальной клетки превышает допустимый уровень, активизируются механизмы резистентности бактерий [111, 138]. Так, у грамотрицательных бактерий это активное выведение меди из цитоплазмы в периплазматическое пространство с помощью р-типа АТФ-аз, локализованных во внутренней мембране [138]. Некоторые микроорганизмы могут выкачивать или выбрасывать медь из цитоплазмы непосредственно во внеклеточное пространство с помощью системы резистентного клубенькового деления клеток (RND). Этот тип детоксикации хорошо известен и описан у *E.coli* [128]. Сообщается также о способности некоторых бактерий связывать медь в периплазматическом пространстве с помощью медных шаперонов [56, 131] (рис.7).

Изучение резистентности ацидофильных бактерий к меди ограничивается только грамотрицательной бактерией *At.ferrooxidans*. *At.ferrooxidans* устойчив к высоким концентрациям меди (вплоть до 800 мМ CuSO_4) и других металлов [53, 126]. *L.ferrooxidans* способен расти в присутствии 5 мМ меди в среде [98]. Устойчивость бактерий к меди очень важна с точки зрения их применения в биотехнологических процессах, где концентрация ионов меди может варьировать в диапазоне от 15 до 100 мМ CuSO_4 [171].

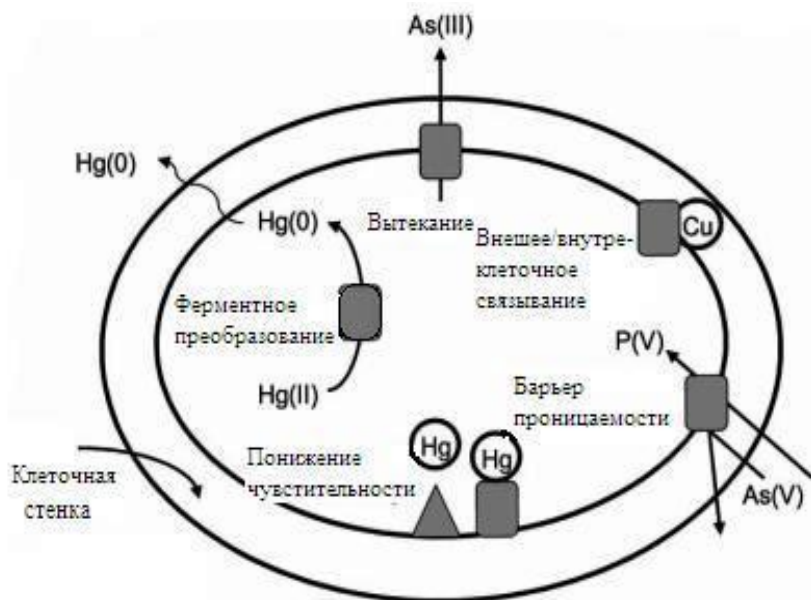


Рис.7. Схема механизмов резистентности ацидофильных микроорганизмов к металлам [по Dopson et al., 2003]

Показано, что *At.ferrooxidans* ATCC 23270 может функционировать при высоких концентрациях меди благодаря примерно 10 генам в хромосоме, имеющим прямое отношение к его резистентности к меди. Они включают три гена, кодирующие АТФ-азы р типа, имеющие отношение к транспорту меди (*copA1Af*, *copA2Af*, and *copBAf*), три гена, относящиеся к RND, ответственные за выведение меди из клетки (*cusAAf*, *cusBAf*, *cusCAf*) и два гена, кодирующие периплазматические шапероны для меди (*cusFAf* and *copCAf*) [116].

Недавно установлено, что высокая резистентность некоторых штаммов *At.ferrooxidans* обусловлена наличием в их геноме дополнительных медь- резистентных генов в виде генетических островков (GI) [127].

Экспрессия большинства этих генов установлена у *At.ferrooxidans*, выращенных в присутствии высоких концентраций меди с использованием real-time RT-PCR [127].

Некоторые из указанных генов, связанных с устойчивостью меди, обнаружены также у *Leptospirillum* spp. бактерий с использованием метагеномных анализов нуклеотидных последовательностей [156]. Из клеток *L.ferriphilum* выделены также два гена, ответственные за резистентность бактерий к ионам мышьяка. Один из них идентичен гену, идентифицированному ранее в клетках мышьякоустойчивых штаммов *At.caldus* [167]. Высказывается предположение о горизонтальном переносе генов между выщелачивающими и другими бактериями, что является важным фактором для передачи резистентности к металлам, а также адаптивных и других преимущественных свойств этих ацидофилов [56].

Данные о резистентности ацидофильных архей к меди отсутствуют. Известно, что *Metallosphaera sedula* устойчива к 16 мМ Cu(II) в среде [93].

Токсичность цинка связана с его способностью образовывать комплексы с клеточными компонентами [118]. Показано, что ионы цинка конкурентно ингибируют окисление Fe (II) у *S.thermosulfidooxidans* [4]. Токсичность цинка для *At.ferrooxidans* зависит от используемого субстрата. При росте на Fe(II) *At.ferrooxidans* устойчив к 153 мМ Zn(II), тогда как на тиосульфате эта цифра составляет 92мМ [165]. Кондратева и соав. [107] сообщили об адаптации *At.ferrooxidans* к 1000 мМ Zn (II).

Примером высокой толерантности к Fe (III) является конкуренция между железом-окисляющими бактериями в выщелачивающих растворах, которая согласно Ролингс и соав. др. [134] протекает в пользу *L.ferrooxidans* и *S.themosulfidooxidans* [4, 36].

Показано, что ионы Fe(III) конкурентно ингибируют окисление Fe(II) у *At.ferrooxidans*, *L.ferrooxidans* и *S.themosulfidooxidans* [4, 36].

Следует отметить, что при росте бактерий в виде биопленки значительно увеличивается устойчивость бактерий к металлам [49, 79, 144, 160].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение хемолитотрофных бактерий. Для выделения железо- и сероокисляющих бактерий использовали среду Сильвермана, Люндгрена (9К) [1], для железоокисляющих бактерий - среду Макинтоша [110]. Вышеуказанные среды инокулировали пробами отвалов и рудничных вод и инкубировали 30°C для выделения мезофильных и 37 - 50° С для термотолерантных и умеренно термофильных бактерий в течение 7- 10 суток. Для получения чистых культур накопительные культуры ХБ высевали на плотные среды Маннинга [1] и FeTSB₀ [100], содержащие 0,6% агарозы (agarose Type I: Low EEO, Sigma). Полученные желто-коричневые колонии перенесли в вышеуказанные жидкие среды. Процедуру повторяли 2-3 раза до получения чистых культур бактерий. Для выделения ацидофильных гетеротрофных бактерий использовали Среду Сильвермана, Люндгрена, в качестве источника энергии вместо двухвалентного использовали глюкозу в концентрации 0.05 - 0.1%.

1. Среда Сильвермана, Люндгрена (9К) для мезофильных бактерий [1]:

а) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.0г,

KCl – 0.1г,

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5г,

K_2HPO_4 – 0.5г,

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.01г,

700 мл дистиллированной воды.

Среду стерилизовали при 1,5 атм (121° С) 20 мин.

б) 44.2 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ растворили в 300 мл дистиллированной воды, установили pH 2.0 с помощью 10N H_2SO_4 , стерилизовали при 0.5 атм 20 мин.

Растворы а и б смешивали непосредственно перед употреблением.

2. Среда 9К для сероокисляющих бактерий [1]

Для выделения сероокисляющих бактерий использовали среду Сильвермана, Люндгрена (9К). Однако вместо $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в качестве источника энергии к среде добавляли элементную серу (S^0) в количестве 10 г/л. Серу стерилизовали текучим паром в течение 2 часов. Установили pH 3.0 - 3.5 с помощью 10 N H_2SO_4 , стерилизовали при 1.0 атм 20 мин.

3. Среда Макинтоша для железooksисляющих бактерий [110]:

а) Основной солевой состав:

Раствор А:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 6.61 г,
 H_2SO_4 - 26.65 мл,
100 мл дистиллированной воды.

Раствор Б:

KH_2PO_4 - 1.361 г,
100 мл дистиллированной воды.

Раствор В:

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 1.27 г,
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 7.35 г,
100 мл дистиллированной воды.

Растворы А, Б, В смешивали, объем довели до 1000 мл дистиллированной водой и стерилизовали при 110° С в течение 90 мин.

Раствор Г:

40 мл смеси растворов А, Б, В довели до 2000 мл дистиллированной водой. Раствор стерилизовали при 121° С в течение 1.5 часа.

Раствор Д:

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 200 г, концентрированная серная кислота (H_2SO_4) - 10 мл,
дистиллированная вода - 1000 мл. Раствор стерилизовали при 110° С 20 мин.
Перед использованием к 45 мл раствора Г добавляли 5 мл раствора Д.

4. Среда Маннинга [112], г/л:

а) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 6.0;

KCl – 0.2;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0;

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.02;

H_2O - 550 мл

pH 3.0: Среду стерилизовали при 1.5 атм (121° С) 20 мин.

б) 7.0 г агарозы растворили в 150 мл дистиллированной воды и стерилизовали при 1.0 в течение 20 мин.

в) 33.4 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ растворили в 300 мл дистиллированной воды, подкисляли до pH 2.0 с помощью 10 N H_2SO_4 и стерилизовали при 0.5 атм 20 мин.

Растворы **а** и **б** охлаждали до комнатной температуры, смешивали, добавляли раствор **в**. Готовую среду разливали в чашки Петри.

Для выявления хемолитотрофных бактерий вышеуказанные среды инокулировали пробами отвалов, рудничных вод и пульпы и инкубировали при 28 - 30°C для выделения мезофильных бактерий и 37 - 50° С для умеренно термофильных бактерий в течение 7 - 10 суток. Для получения чистых культур накопительные культуры хемолитотрофных бактерий высевали на плотные среды Маннинга [1] и FeTSB₀ [100], содержащие 0.6% агарозы (agarose Type I: Low EEO, Sigma). Полученные желто-коричневые колонии перенесли в вышеуказанные жидкие среды. Процедуру повторяли 2 - 3 раза до получения чистых культур бактерий.

Морфологические и цитологические исследования. Для окраски клеток по Граму применяли метод Хукера [5]. Морфологию клеток изучали с помощью светового микроскопа ОПТИКА В – 190ТВ.

Идентификация выделенных бактерий: Идентификация выделенных бактерий осуществлялась на основании морфо-физиологических свойств согласно определителю Берджи [12] и соответствующим оригинальным работам [8, 9, 10, 45, 46, 78, 80, 97, 104, 105].

Культивирование бактерий. Для автотрофного роста выделенных бактерий использовали среду Сильвермана, Лундгрена 9К [1] и среду Макинтоша [110] с FeSO₄·7H₂O в качестве источника энергии. Миксотрофные условия роста обеспечивали добавлением в указанные среды 0.02% дрожжевого экстракта. Органотрофный рост бактерий оценивали на среде с 0.05 и 0.1% дрожжевым экстрактом или глюкозой в отсутствие неорганических источников энергии.

Биохимические методы исследования. Органические кислоты в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ. Метод основан на применении обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Массовая концентрация (массовая доля) органических кислот в пробе определялась спектрофотометрическим или диодноматричным детектором при длине волны 210 нм. Анализ проводился на жидкостном хроматографе с диодноматричным детектором (рабочий диапазон длин волн поглощения от 200 до 600 нм), хроматографической колонкой длиной 250 мм, размером внутреннего диаметра 4.6 мм, размером частиц 5 мкм RP - Zorbax- elit C18 и программно-аппаратным комплексом сбора и обработки результатов Shimadzu LC solution. Процедуры построения градуировочной зависимости выполняли в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя программным обеспечением.

Регистрировались площади пиков соответствующих кислот и площади пиков рассматриваемых кислот стандартных растворов. Элюент: фосфатный буферный раствор молярной концентрации 0.1 моль/дм³, рН 2.2 - 2.6, температура колонки- 30 °С, температура окружающего воздуха -22±1 °С. Измерения проводились при диапазоне длины волн диодноматричного детектора: 200-600 нм. Скорость потока подачи элюента: 1 мл /мин , объем вводимой пробы - 5-10 мкл.

Перед анализом проводилось концентрирование проб под струей азота в азотном концентрате NER- 13, концентрированные пробы пропускали через мембранный фильтр диаметром пор 0.95мкм, затем через очистительную колонку C18.

Время выхода органических кислот при ВЭЖХ характеризуется коэффициентом емкости, который не зависит от скорости подачи элюента. Коэффициенты емкости рассчитывали по формуле

$$K^i = (t_R - t_0) / t_0$$

где t_R - время удерживания анализируемого вещества, мин,

t_0 - мертвый объем колонки, мин.

Хроматографический анализ проводили на двух параллельных пробах при соблюдении всех условий повторяемости. Регистрировали площадь пиков органических кислот. Для предотвращения взаимного влияния отдельных кислот друг на друга и более эффективного разделения применили последовательное соединение двух колонок для хроматографического разделения всего перечня органических кислот.

Массовую концентрацию (массовую долю) органических кислот рассчитывали по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения пробы. Обработку хроматограмм и определение массовой концентрации (массовой доли) определяемой органической кислоты $C(x)$, г/дм³, проводили с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных с использованием градуировочной зависимости.

$$C(x) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1}$$

где S_x - площадь пика органической кислоты, mAU·с или U·с;

V_2 - вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, см³ ;

k - градуировочный коэффициент, г/дм /mAU·с ;

V_1 - объем пробы, отобранной для анализа, см³

Расхождение результатов между двумя параллельными определениями (в процентах от среднего значения), выполненными в условиях повторяемости, не превышало предела повторяемости, при вероятности 0.95.

При соблюдении этого условия за окончательный результат определения принимали среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

Биовыщелачивание пирита, халькопирита, руд и хвостов. Бактериальному выщелачиванию подвергали пирит (FeS_2), содержащий Fe – 43.8 %, S – 49 % и халькопирит (CuFeS_2), содержащий Cu - 30.2 % Fe - 29.7 % и S – 38 % Шамлугского месторождения Армении, а также руды Тандзутского золото-полиметаллического, Дрмбонского медного золотоносного месторождений, Дрмбонские хвосты и медный концентрат Зангезурского медно-молибденового комбината (ЗММК). Химический анализ руд и концентратов приведен ниже в таблицах 4, 5 и 6.

Таблица 4

Химический анализ образца медного концентрата (ЗММК)

Содержание, в % (Ag, Au в г/т)												
Si	Al	Mg	Ca	Fe	Mn	Co	Mo	Zn	Cu	Ag	Au	Cd
0.32	0.18	0.1	0.0	26.0	0.02	$4 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	12.5	22.2	102	46.2	0.06

Таблица 5

Химический состав руд Тандзутского месторождения

Содержание, %										
Au, г/т	Ag, г/т	Cu	Mo	As	Pb	Zn	Fe	S	Sb	
1.97	5.73	0.16	0.0026	0.0	0.01	0.0	33.40	26.04	0.0054	

Таблица 6

Химический состав проб обогащенных Дрмбонских хвостов

Пробы	Содержание, %						
	Au, г/т	Cu	Pb	Zn	Fe	Cd	S
N1	4.45	0.201	0.04	0.7	40.49	49.26	37.4
N2	5.42	0.408	0.074	1.157	41.62	78.43	38.64

Для биовыщелачивания минералов, руд и концентратов использовали отмытые клетки *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *L.ferriphilum* CC, [169], а также сероокисляющие бактерии *At.caldus* и *At.albertensis* [170]. Бактерии выращивали на среде Макинтоша, содержащей Fe(II) в качестве источника энергии [110]. Клетки собирали центрифугированием при 6000 g в логарифмической фазе роста, промывали и ресуспендировали в той же среде без железа. Для выщелачивания проб хвостов использовали *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, а также рудничную воду (Дрмбон). Перед использованием pH рудничной воды устанавливали pH 2.0 с помощью 10 N H₂SO₄. При использовании рудничной воды выщелачивающим агентом являлся природный консорциум выщелачивающих бактерий.

Измельченные до - 63, - + 45 мкм минералы, концентраты и руды в количестве от 2 до 10 г (плотность пульпы (ПП) - 4 - 20%) помещали в 250 мл колбы, смачивали водой и стерилизовали при 0.5 атм 20 мин. После стерилизации в колбы добавляли по 50 мл среды Макинтоша без железа, подкисленной 10 N H₂SO₄ до pH 1.7 - 1.8 и бактериальную суспензию (10⁷ - 10⁸ кл/мл).

Плотность пульпы (ПП) рассчитывали как соотношение массы минерала к объему выщелачивающего раствора.

Опыты проводили в периодическом режиме культивирования на качалке (180 - 240 об/мин) при 30, 37°C в зависимости от используемых бактерий.

Об интенсивности выщелачивания пирита, халькопирита, руд, концентратов и хвостов судили по количеству металлов, перешедших в раствор, а также по снижению pH раствора (образованию серной кислоты) и повышению окислительно-восстановительного потенциала. Периодически с интервалом 24 или 48 часов брали пробы для физико-химических и микробиологических анализов.

Химическое выщелачивание пирита и халькопирита. Для химического выщелачивания пирита и халькопирита использовали раствор соли трехвалентного железа - Fe₂(SO₄)₃ и биогенное Fe₂(SO₄)₃, полученное путем окисления двухвалентного железа иммобилизованными клетками *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Концентрация ионов Fe³⁺ в растворе составляла 5 г/л. Выщелачивание осуществляли в колбах на качалке при 35°C в течение 7 часов. Об интенсивности химического выщелачивания судили по накоплению в среде ионов Fe²⁺ и убыли Fe³⁺.

Иммобилизация бактерий. Для иммобилизации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn использовали блестящий шунгит (Карельский регион, Россия) и березовый активированный уголь БАУ-А.

Иммобилизацию осуществляли путем непосредственного контакта культуры в среде с двухвалентным железом с носителями. Процесс иммобилизации осуществляли в течение 2 - 3 недель с периодической заменой отработанной (окисленной) среды свежей питательной средой с двухвалентным железом до достижения максимальной скорости окисления железа.

Микробиологические исследования. Титр бактерий определяли прямым подсчетом под микроскопом OPTICA B-190 используя камеру Тома (Toma chamber). Количественный учет жизнеспособных клеток проводили методом предельных десятикратных разведений. Наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблицам Мак-Креди [5].

Физико-химические методы исследования.

Количество окисного (Fe(III)) и закисного железа (Fe(II)) определяли комплексометрическим методом с помощью ЭДТА, закисное железо (Fe(II)) - бихроматным методом [13]. Концентрацию меди и общего железа определяли с помощью атомо-абсорбционного спектрофотометра AAS 1N (Германия).

pH и окислительно-восстановительный потенциал измеряли pH-метр-милливольтметром "pH - 121". При определении окислительно-восстановительного потенциала вносили поправку на хлорсеребряный электрод для приведения отсчета к нормальному водородному электроду. При 18° она равна 249 мВ.

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные экспериментов обработаны статистически.

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛЕЗО- И СЕРООКИСЛЯЮЩИХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

3. 1. Выделение железо- и сероокисляющих хемолитотрофных бактерий

Изучено распространение хемолитотрофных бактерий в биотопах Ахтальского и Тандзутского полиметаллических, Алавердского и Дрмбонского медных месторождений. Физико-химические характеристики биотопов руд и состав природных консорциумов хемолитотрофных бактерий представлены в таблице 7.

Таблица 7

**Физико-химические и микробиологические анализы рудничных вод и отвалов
Алавердского, Тандзутского и Дрмбонского месторождений**

N	Характеристика проб	pH	T, °C	Cu, мг/л	Fe, г/л		Количество клеток, кл / мл (мг)			
					Fe(III)	Fe(II)	<i>At.ferrooxidans</i>	<i>At.thiooxidans</i>	<i>S.thermosulfidooxidans</i>	<i>Leptospirillum spp.</i>
1	Тандзут, рудничная вода	2.5	8-10°C	7,5	0.084	0.280	10 ⁴	10 ³	0	10 ¹
2	Ахтала, отвал 37	0.7	20-25°C	90.0	69.44	23.80	10 ¹	10 ³	0	10 ³
3	Алаверди, обнажение 43, проба воды N47	3.35	10-15°C	3.0	0.028	0.364	10 ⁶	10 ⁵	0	10 ⁴
4	Дрмбон, рудничная вода 1	8.15	10-15°C	0	0	0	10 ²	0	0	0
5	Дрмбон, рудничная вода 2	6.7	10-15°C	0.3	0.168	0.084	10 ³	10 ¹	0	10 ¹

Согласно приведенным данным в пробах рудничных вод доминируют *At.ferrooxidans* и *At.thiooxidans*. *Leptospirillum* spp. бактерии встречаются преимущественно в пробах отвалов, где их количество достигает 10^4 кл/мл. Численность *Leptospirillum* spp. бактерий в рудничных водах не превышает 10^1 кл/мл. Примечательно, что ни в одной пробе не обнаружены термофильные бактерии рода *Sulfobacillus*.

Методом накопительных культур с применением селективных сред и двухслойного агара из природных биотопов полиметаллических (Ахтала, Тандзут), медного золотоносных (Алаверди, Дрмбон) месторождений, а также экспериментальных систем биовыщелачивания выделены и изучены пять оригинальных штаммов хемолитотрофных бактерий. Ниже приведены основные физиологические характеристики выделенных штаммов (табл. 8).

Таблица 8

Основные физиологические характеристики выделенных штаммов ХБ

Выделенные штаммы	Месторождение выделения штамма	Доноры электронов	Пределы рН, оптимум	Т, °С, Пределы, оптимум	Форма клеток
<i>Acidithiobacillus</i> sp. A-15	Ахтальское полиметаллическое м-е	Fe(II), S, FeS ₂ и сульфиды других металлов	1.7- 2.5 2.0	20 - 35°C 30°C	Палочки
<i>Acidithiobacillus</i> sp. T-2	Тандзутское золото-полиметаллическое м-е	Fe (II), S, FeS ₂ и сульфиды других металлов	1.5 - 2.5 1.8	20 - 35°C 30°C	Палочки
<i>Acidithiobacillus</i> sp. D-5	Дрмбонское золото-медное м-е (Нагорный Карабах)	Fe (II), S, FeS ₂	2.0 - 2.5 2.2	20 - 35°C 30°C	Палочки
<i>Leptospirillum</i> sp. T - 3	Тандзутское золото-полиметаллическое м-е	Fe (II), FeS ₂ и сульфиды других металлов	1.5 - 2.5 2.0	20 - 40°C 35°C	Изогнутые палочки
<i>Leptospirillum</i> sp. A - 1	Ахтальское полиметаллическое м-е	Fe (II), FeS ₂	1.4 - 2.5 2.0	20 - 40°C 37°C	Изогнутые палочки

Выделенные бактерии - грамотрицательные строгие автотрофы, способны окислять двухвалентное железо Fe (II), элементную серу и сульфидные минералы. *Leptospirillum* sp. штаммы Т-3 и А-1 окисляют только двухвалентное железо и пирит, но не способны окислять серу. Оптимальная температура роста для штаммов *Acidithiobacillus* А-15, Т-2, D-5 - 30°C, для *Leptospirillum* sp. Т - 3 - 35°C и для *Leptospirillum* sp. А-1 - 37°C (табл. 8).

3. 2. Активность выделенных бактерий в окислении сульфидных минералов и руд

Окисление пирита. Предварительный скрининг выделенных штаммов проводили по интенсивности окисления пирита (FeS_2) и халькопирита (CuFeS_2). С этой целью использовали минералы Шамлугского месторождения Армении.

Сравнительные активности штаммов *Acidithiobacillus* sp. 15, *Acidithiobacillus* sp. Т-2, *Acidithiobacillus* sp. D-5 и ранее выделенного *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении пирита представлены на рисунке 1. Как видно из рисунка, наивысшую активность в окислении пирита проявлял *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Активность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении пирита превосходила таковой у *Acidithiobacillus* sp. Т-2, *Acidithiobacillus* sp. D-5 и *Acidithiobacillus* sp. А-15 примерно в 2, 4 и 10 раз, соответственно (рис. 8).

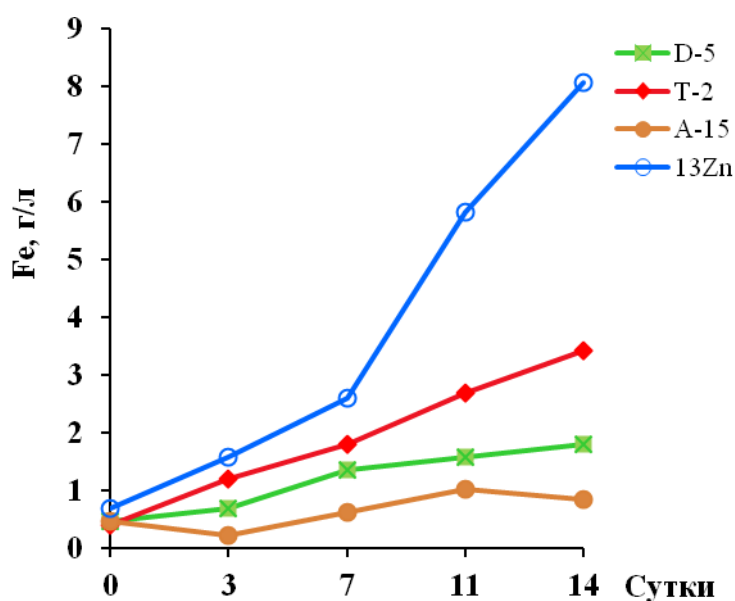


Рис. 8. Выщелачивание пирита (FeS_2) выделенными штаммами *Acidithiobacillus* sp. А-15, Т-2, D-5 и 13Zn (ПП - 4%, Т - 30°C, pH 2.0)

Окисление халькопирита. Исследования показали, что *Acidithiobacillus* sp. 13Zn способен также окислять минерал меди - халькопирит (CuFeS_2) (рис. 9, 10). При этом активность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении халькопирита сравнивалась с активностью железooksисляющей бактерии *L.ferriphilum* CC и сероooksисляющей *At.caldus*. Как видно из рисунков 9 и 10, по скорости выщелачивания меди и железа из халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn значительно превосходит *Leptospirillum* CC и *At.caldus* (рис. 9, 10).

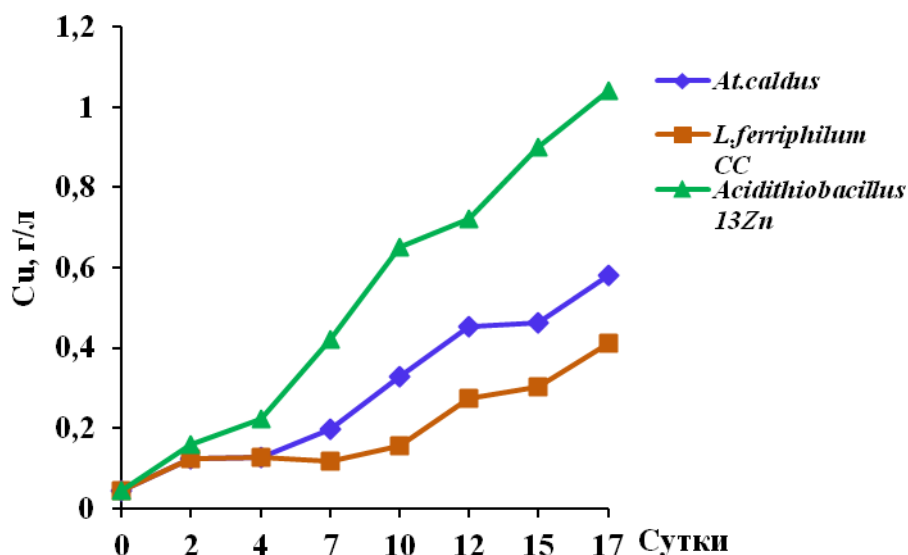
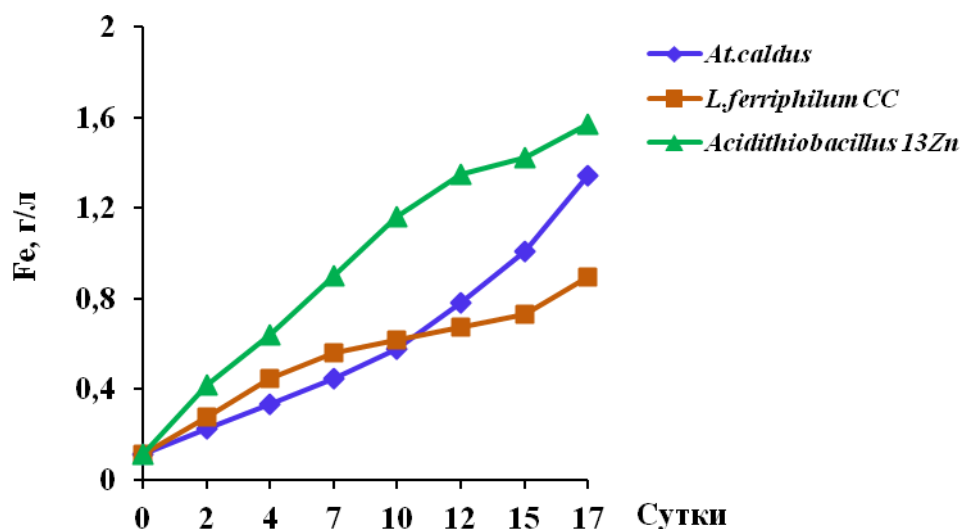


Рис. 9. Извлечение меди при выщелачивании халькопирита (CuFeS_2) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и другими железо- и сероooksисляющими бактериями (CuFeS_2 - 4%, pH 1,8, T-35°C, 180 об/мин)



**Рис. 10. Извлечение железа при выщелачивании халькопирита *Acidithiobacillus* sp.
 ^{13}Zn и железо- и сероокисляющими бактериями
 (CuFeS_2 - 4%, pH 1.8, T-35°C, 180 об/мин)**

Выщелачивание медной золотоносной руды и медного концентрата. *Acidithiobacillus* sp. ^{13}Zn испытывался также по отношению окисления Дрмбонской медной золотоносной руды (рис.11).

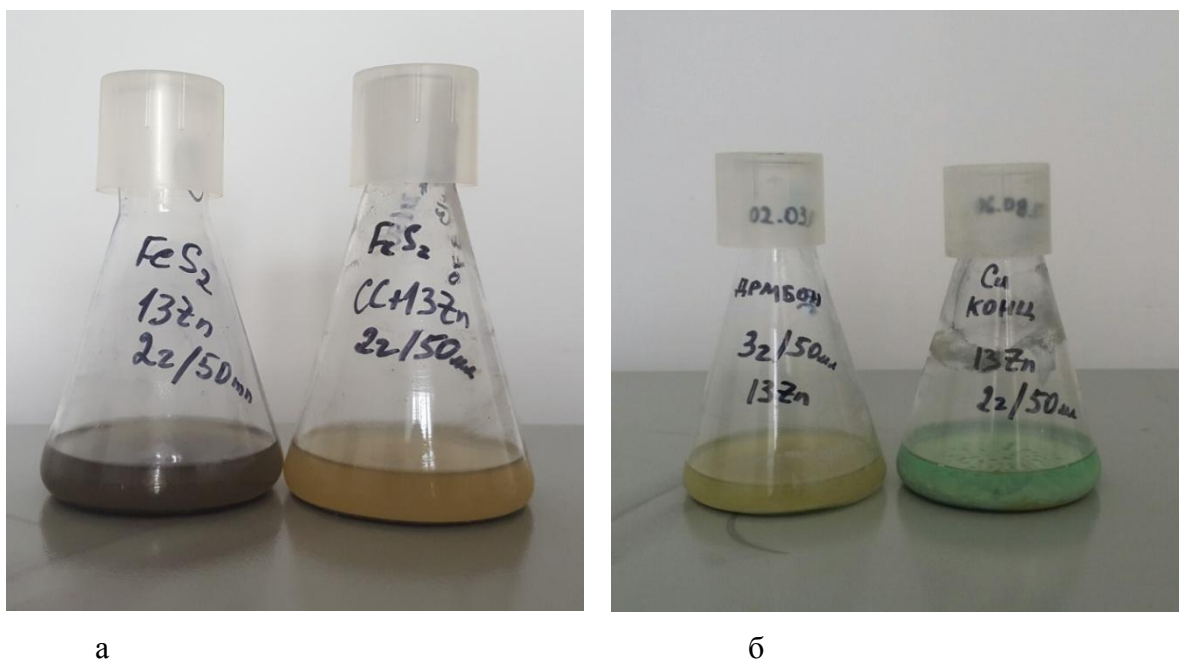


Рис. 11. Эксперименты по выщелачиванию пирита (а) и Дрмбонской золотоносной руды и медного концентрата (ЗМК) (б)

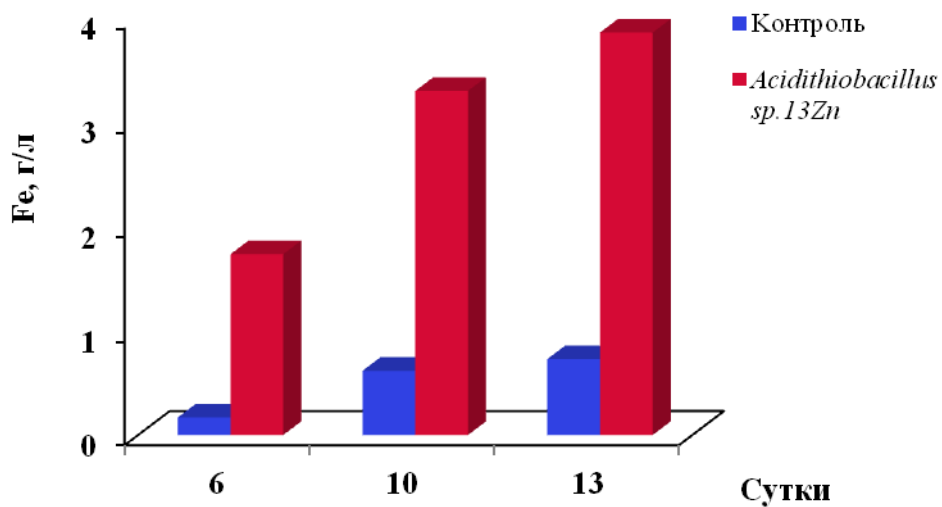


Рис. 12. Экстракция железа при выщелачивании Дрмбонской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (ПП - 10%, pH 2.0, T - 37°C)

Как показано на рисунке 12, *Acidithiobacillus* sp. 13Zn ускоряет выщелачивание вышеуказанной руды приблизительно в 5 раз по сравнению с неинокулированным контролем.

Результаты выщелачивания медного концентрата штаммом *Acidithiobacillus* sp. 13Zn представлены на рисунке 13. Согласно приведенным данным экстракция меди и железа из медного концентрата *Acidithiobacillus* sp. 13Zn увеличивается примерно в 7 - 8 и 3 раза соответственно по сравнению с неинокулированным контролем (рис. 13).

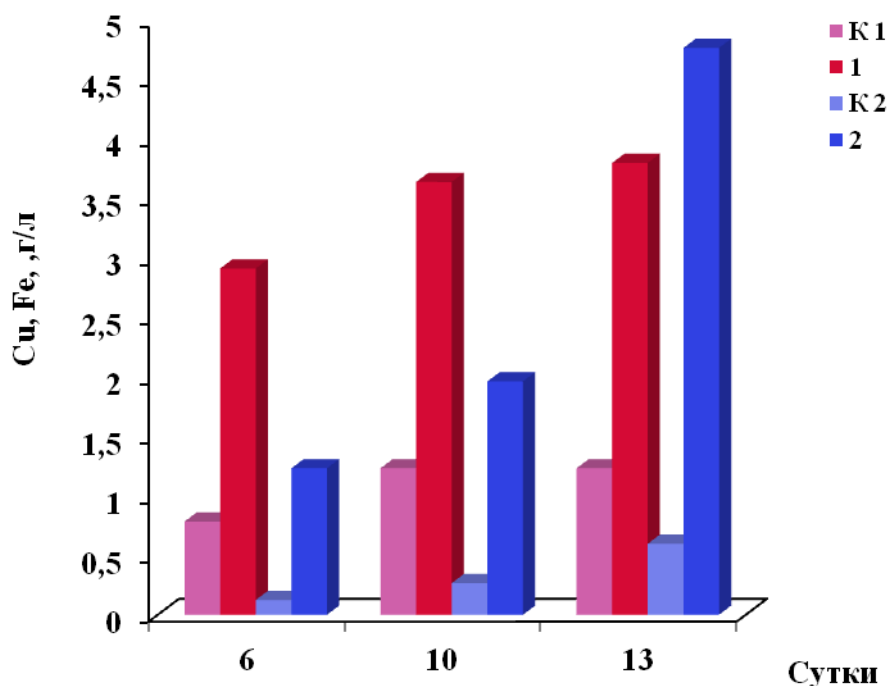


Рис. 13. Выщелачивание железа (1) и меди (2) из медного концентрата *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (ПП -10%, pH 2.0, T -37°C), K1, K2 - контроль без бактерий

В целом степень экстракции меди и железа при выщелачивании медного концентрата *Acidithiobacillus* sp. 13Zn за 13 суток составляла 21.7 и 15.8%.

Исходя из приведенных данных можно заключить, что штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn может служить эффективным кандидатом для разработки и реализации высокоэффективного процесса биоокисления и биовыщелачивания медной золотоносной руды, а также медного концентрата.

Учитывая вышесказанное, для проведения дальнейших исследований был выбран штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. *Acidithiobacillus* sp. 13Zn - строгий автотроф, способен получать энергию за счет окисления двухвалентного железа, восстановленных соединений серы и сульфидных минералов. Оптимальная температура роста *Acidithiobacillus* sp. 13Zn - 35°C. Рост штамма возможен в пределах pH 1.4 - 2.6 с оптимальным значением pH 2.0. На основании проведенного ранее филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК был идентифицирован как новый, отличный от *At.ferrooxidans* вид рода *Acidithiobacillus* [169].

ГЛАВА 4. ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ СУЛЬФИДНЫХ МИНЕРАЛОВ И РУД

ACIDITHIOBACILLUS SP. 13Zn

4.1. Выщелачивание халькопирита

Изучено влияние внешних факторов, таких как pH, концентрация минералов, трехвалентного железа (Fe(III)) и размер частиц на выщелачивание халькопирита культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn.

Влияние pH. Влияние кислотности на биовыщелачивание халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn изучалось в пределах pH от 1.4 до 2.2. В начале эксперимента наблюдалось повышение pH выщелачивающего раствора. Согласно механизму окисления сульфидных минералов повышение pH связано с потреблением кислоты при атаке халькопирита протонами (уравн.12):



Начиная с 4 - 5 суток pH раствора начал снижаться в результате окисления выделенной при растворении халькопирита элементарной серы *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (уравн. 9):

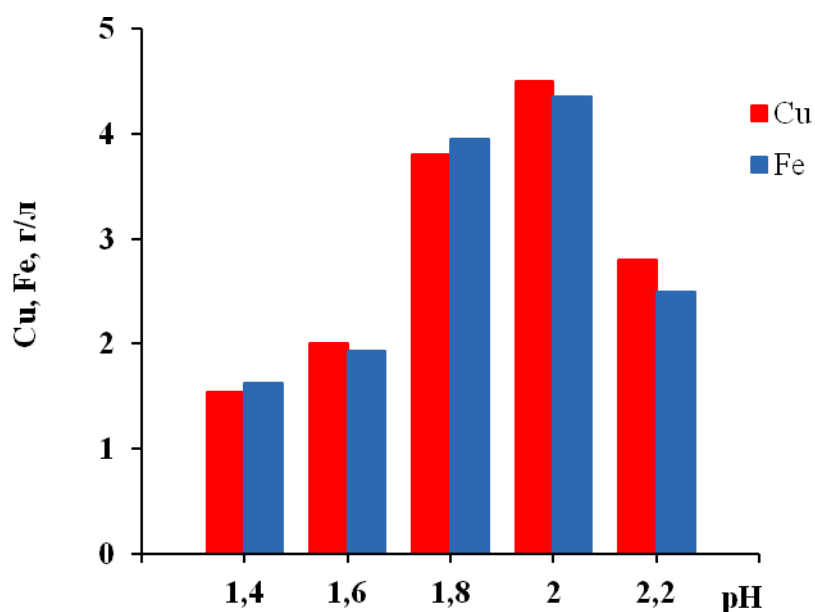


Рис. 14. Влияние исходных значений pH на экстракцию меди и железа при выщелачивании халькопирита *Acidithiobacillus* sp.13Zn (ПП - 4%, Т - 35°C, 180 об/ мин, продолжительность -16 суток)

Одновременно со снижением pH выщелачивающего раствора увеличивалась экстракция меди из халькопирита. Как показано на рисунке 17, оптимальное значение исходного pH для роста бактерии и биовыщелачивания меди и железа составляло pH 2.0 (рис. 14). Полученные результаты совпадают с литературными данными [15].

Влияние концентрации халькопирита. Проведенные исследования показали, что выщелачивание меди и железа возрастает с увеличением концентрации халькопирита от 2 до 10 %. Однако при 15% халькопирита количество меди и железа, выщелоченных *Acidithiobacillus* sp. 13Zn уменьшается. Максимальная экстракция меди и железа наблюдается при содержании в среде 10% халькопирита (10 % пульпы) (рис. 15, 16).

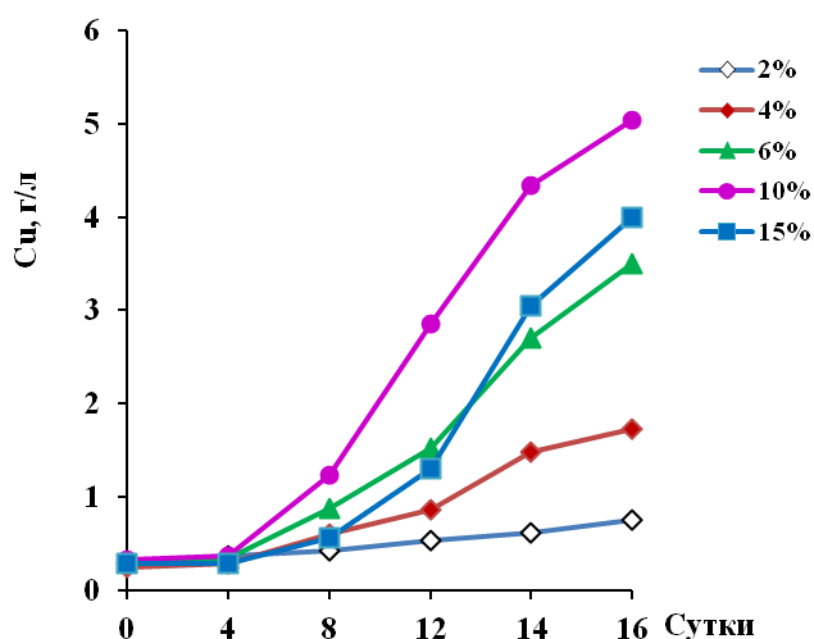


Рис. 15. Влияние концентрации халькопирита на выщелачивание меди *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (pH 1.7, T - 35°C)

Предполагается, что увеличение плотности пульпы вызывает высокое парциальное давление, лимитирует транспорт кислорода и углекислого газа, что приводит к ингибированию роста бактерий.

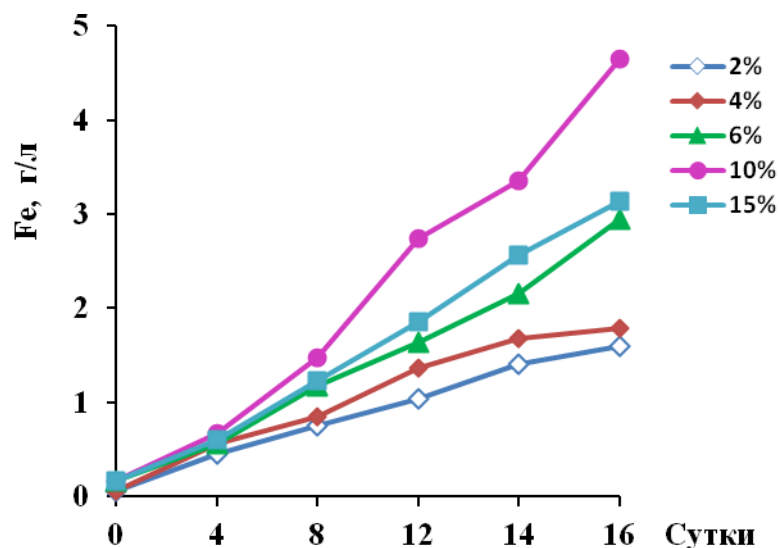


Рис. 16. Влияние концентрации халькопирита на выщелачивание железа *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (pH 1.7, T - 35°C)

По данным ряда авторов неадаптированный штамм *At.ferrooxidans* показал наилучший результат выщелачивания халькопирита при 5% плотности пульпы. При увеличении плотности пульпы от 5 до 20% наблюдалось уменьшение экстракции меди неадаптированным штаммом *At.ferrooxidans*. [15, 81, 173, 180].

Влияние размеров частиц. Изучено также влияние размеров частиц халькопирита на выщелачивание минерала *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (рис.17).

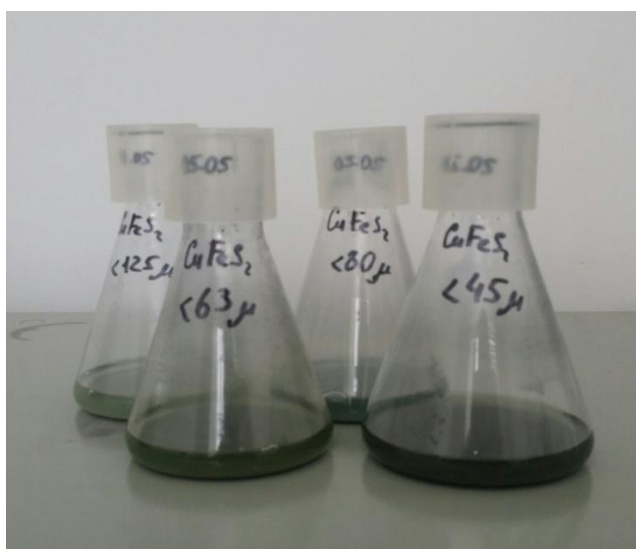


Рис. 17. Эксперимент по выщелачиванию халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в зависимости от размеров частиц

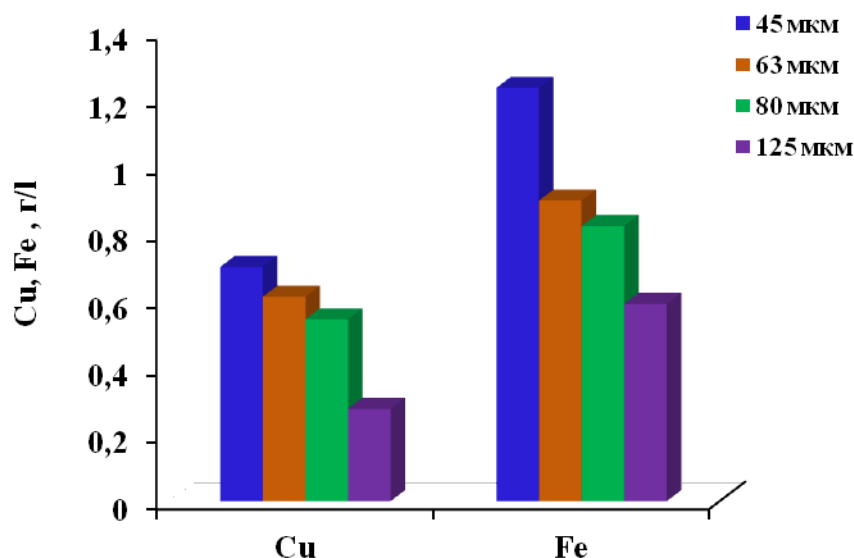


Рис. 18. Влияние размеров частиц на биовыщелачивание меди и железа из CuFeS_2 *Acidithiobacillus* sp.13Zn (ПП - 4%, pH 1.8, T - 35°C, 180 об/ мин, 16 суток)

Как показано на рисунке 18, скорость выщелачивания меди и железа *Acidithiobacillus* sp. 13Zn возрастает с уменьшением размера частиц от + 125 мкм до + 45 мкм. Максимальное количество выщелоченных *Acidithiobacillus* 13Zn меди (0.7 г/л) и общего железа (1.23 г/л) достигало при размере частиц + 45 мкм (рис.18).

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, приведенными в литературе относительно *At.ferrooxidans* [15].

Это можно объяснить тем, что с уменьшением размера частиц, увеличивается их поверхность, что в свою очередь приводит к возрастанию растворения металлов.

4.2. Выщелачивание Тандзутской упорной золотосодержащей руды

Выщелачивание Тандзутской руды. Минералогический состав Тандзутской руды приведен в таблице 9. Руда характеризуется высоким содержанием железа, серы и отсутствием мышьяка, в небольших количествах присутствуют медь, свинец, молибден, сурьма. Содержание золота в руде составляет от 1.0 до 2.0 г/т. Результаты фазового анализа показывают низкую степень окисления руды. Примерно 98 % общего содержания в руде железа и серы находятся в сульфидной форме (табл. 9).

Таблица 9

Фазовый состав руд Тандзутского месторождения

Содержание, %								
Cu			Fe			S		
общая	Окис- ленная	Суль- фидная	общее	Окис- ленное	Суль- фидное	общая	Суль- фатная	Суль- фидная
0.16	0.0	0.16	33.4	0.66	32.74	26.04	0.37	25.67

Для окисления Тандзутской руды использовали выделенные нами железобактерии *Acidithiobacillus* sp. A-15, *Acidithiobacillus* sp. T-3 и *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Как показано на рисунке 22, наибольшую активность в окислении Тандзутской руды проявляла культура *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (рис.19).

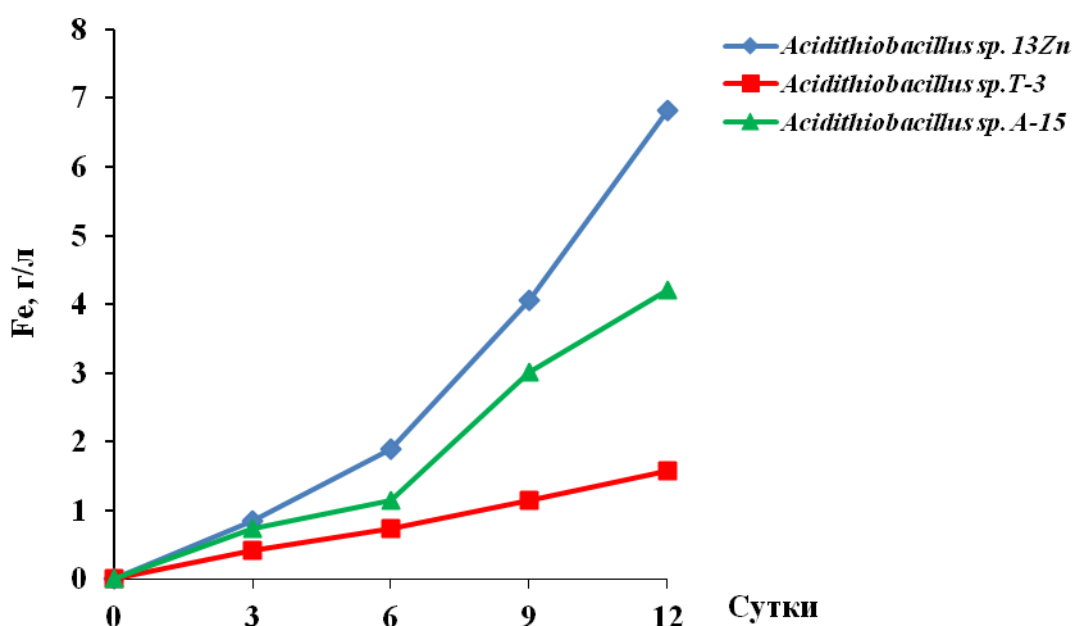


Рис. 19. Выщелачивание Тандзутской руды выделенными бактериями
(ПП - 8%; pH 2.0)

Установлено, что оптимальной плотностью пульпы для выщелачивания Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn является 10 %. При плотности пульпы 15% и выше наблюдалось снижение скорости роста бактерий и выщелачивания железа (рис. 20).

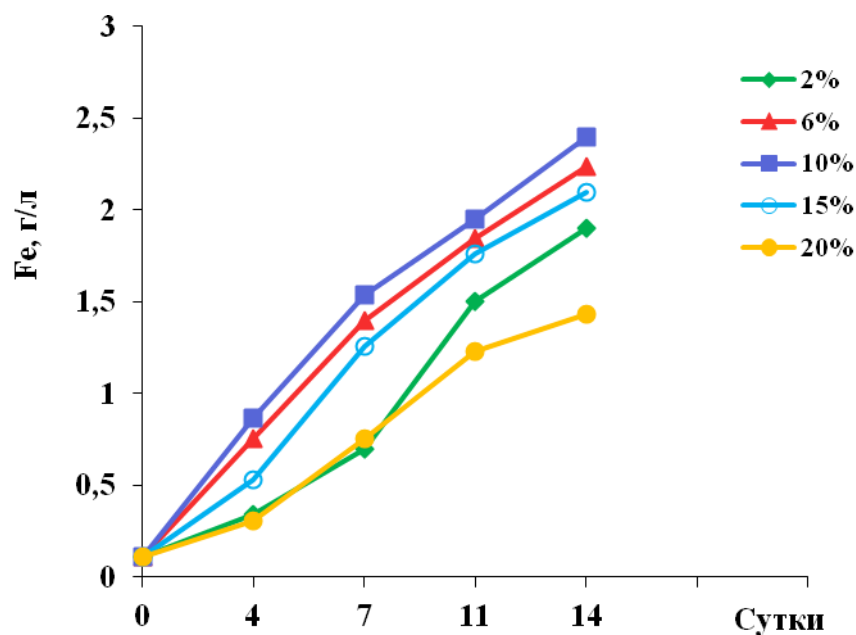


Рис. 20. Выщелачивание Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в зависимости от плотности пульпы (pH 1.9)

Оптимальное значение pH для роста *Acidithiobacillus* sp. 13Zn выщелачивания руды составляло pH 1.8 (рис. 21).

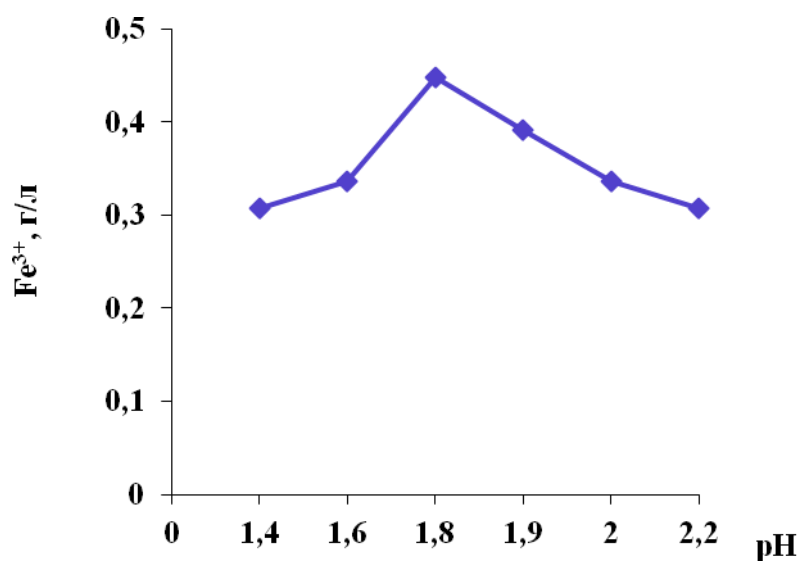


Рис. 21. Выщелачивание Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в зависимости от pH (ПП - 5%)

Влияние трехвалентного железа. Изучение влияния трехвалентного железа показало, что наибольшее количество железа (24.9 %) выщелачивалось при исходной концентрации трехвалентного железа в среде 1.29 г/л (табл. 10, рис. 22). При этой концентрации наблюдалось максимальное значение окислительно-восстановительного потенциала и наиболее интенсивное образование серной кислоты, в результате чего pH раствора снижался до pH 0.85.

Таблица 10

Влияние Fe (III) на выщелачивание железа при окислении Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (продолжительность - 17 суток, ПП -10 %, Т - 37°C)

Исходные концентрации Fe(III), г/л	Выщелочено Fe		pH, исх/конеч	Eh, мВ исх/конеч
	г/л	%		
0.476	3.696	11.5	1.95/1.15	650/740
0.952	5.796	18.1	1.95/1.1	660/780
1.288	7.980	24.9	1.95/0.85	660/855
1.4	6.888	21.5	1.9/0.95	655/790
1.932	6.384	19.95	1.95/0.85	660/755

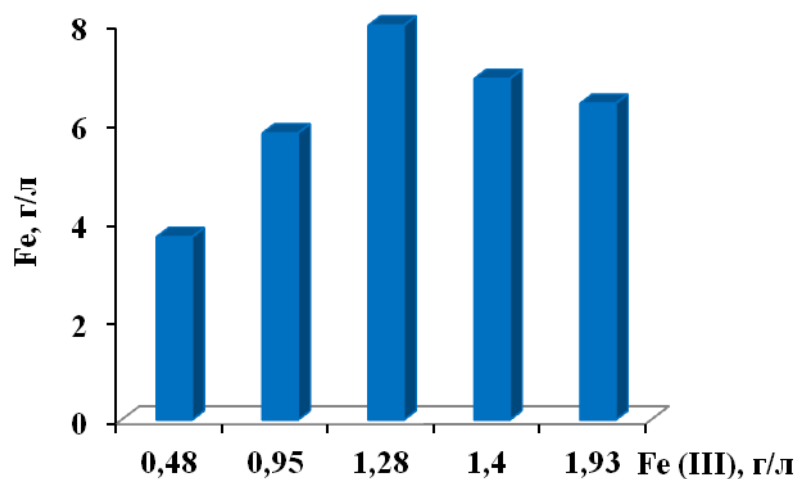


Рис. 22. Влияние исходных концентраций Fe(III) на выщелачивание железа из Тандзутской руды *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (ПП - 10%, pH 2.0, продолжительность - 17 суток)

Влияние концентрации посевного материала. При исследовании влияния концентрации посевного материала на выщелачивание и окисление железа использовали культуру *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. При концентрации посевного 20 и 40 % (от объема пульпы) за 18 суток выщелачивалось примерно одинаковое количество железа (6.5 - 7.0%). При проведении выщелачивания руды только культуральной жидкостью с бактериями (100% посевного материала) эффективность выщелачивания железа возрастала примерно в 5 -10 раз и составляла 17.6 и 26.9 % за 11 и 18 сут соответственно (рис. 23).

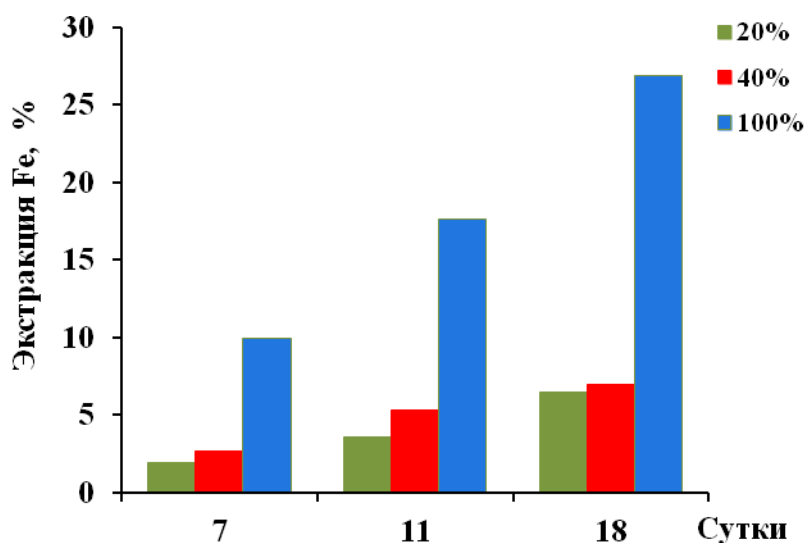


Рис. 23. Влияние количества посевного материала на выщелачивание руды Тандзутского месторождения *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (pH 2.05, ПП – 8 %, Т - 37°C)

Таким образом, максимальное количество выщелоченного из руды железа (6.0 г/л- 26.9 %) наблюдалось при осуществлении процесса выщелачивания только культуральной жидкостью *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в логарифмической фазе роста на среде с железом. При этом концентрация Fe (III) в пульпе составляла 1.96 г/л.

4.3. Выщелачивание пирита, халькопирита, Тандзутской руды и хвостов с использованием конструированных ассоциаций бактерий

4.3.1. Выщелачивание пирита

Интенсивность процессов биовыщелачивания и биоокисления во многом определяется природой используемых микроорганизмов. Показано, что ассоциации и

консорциумы микроорганизмов более эффективно и стабильно функционируют в коммерческих установках биовыщелачивания, чем соответствующие чистые культуры [23, 63, 65, 95]. Следовательно, разработка и создание высокоактивных устойчивых микробных консорциумов для использования в коммерческих системах выщелачивания цветных и драгоценных металлов остается важной проблемой.

Проведенные ранее исследования показали, что окисление пирита железooksисляющими *Leptospirillum* spp. бактериями сопровождается аккумуляцией серы на поверхности минерала, что в свою очередь препятствует дальнейшему окислению пирита [168]. Вместе с тем установлено, что штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn железо- и сероокисляющих бактерий значительно превосходит выделенный нами *L.ferriphilum* CC по активности окисления пирита.

Исходя из вышеуказанного, мы изучали ассоциации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с железooksисляющей бактерией *L.ferriphilum* CC и сероокисляющей бактерией *At.albertensis* SO-2, выделенными из пульпы выщелачивания медного концентрата [158].

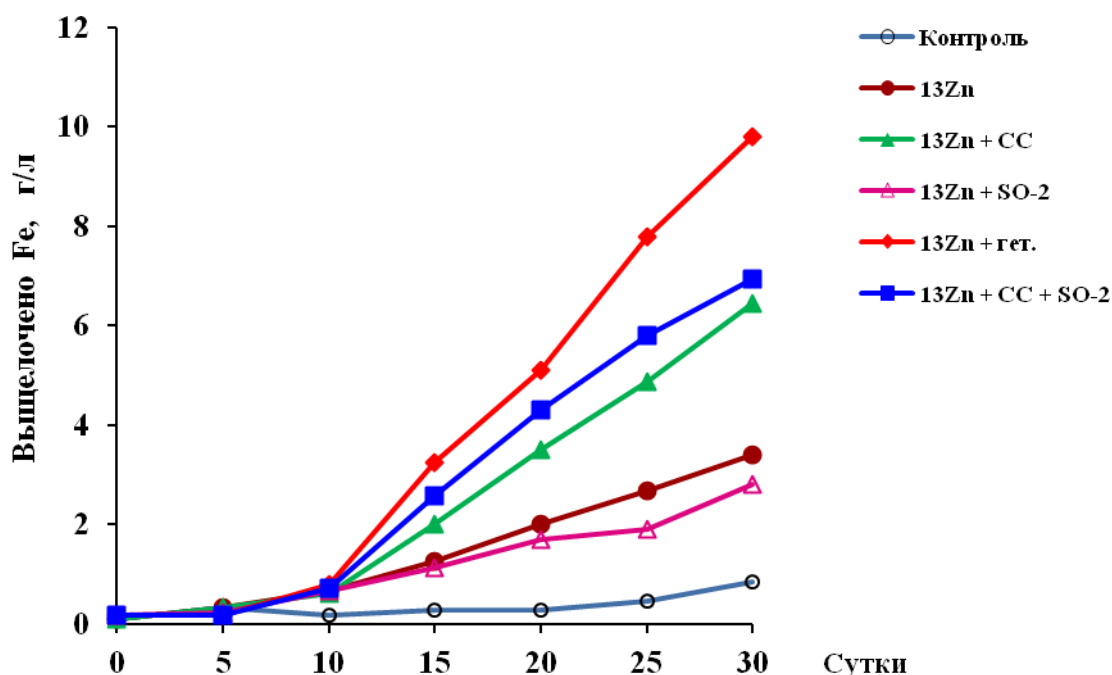


Рис. 24. Окисление пирита чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с железooksисляющей и сероокисляющей бактериями *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO- 2 (FeS₂ – 4 %, pH 1.8, T - 30°C)

Данные, приведенные на рисунке 24 показывают, что эффективность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении пирита увеличивается в 1.8 раза при совместном культивировании с

L.ferriphilum CC. *At.albertensis* SO- 2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание пирита. Однако ассоциация, конструированная на основе *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *At.albertensis* SO- 2 и *L.ferriphilum* CC позволяла в 2 раза увеличить количество выщелоченного из пирита общего железа (рис. 24). Тем не менее, наивысшей активности в окислении пирита показала ассоциация *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с гетеротрофными бактериями (рис. 24).

Следует отметить, что при использовании чистой культуры *Acidithiobacillus* 13Zn выщелоченное железо было представлено в виде трехвалентного и двухвалентного железа примерно в равных количествах. В соответствии с этим окислительно-восстановительный потенциал выщелачивающего раствора незначительно отличался от такового неинокулированного контроля (табл. 11). Низкий ОВП наблюдался и при использовании ассоциации *Acidithiobacillus* 13Zn с сероокисляющей бактерией *At.albertensis* SO- 2 (625мВ). При использовании ассоциаций *Acidithiobacillus* 13Zn с *L.ferriphilum* CC благодаря высокой железоокисляющей активности *L.ferriphilum* CC, выщелоченное железо находилось исключительно в виде трехвалентного железа, что обеспечило наивысшее значение ОВП и следовательно высокое окислительное свойство выщелачивающего раствора. Несмотря на то, что при использовании *Acidithiobacillus* 13Zn с гетеротрофными бактериями наблюдалось наивысшее количество выщелоченного железа, однако ОВП раствора был значительно ниже – 715 мВ (табл. 11).

Таблица 11

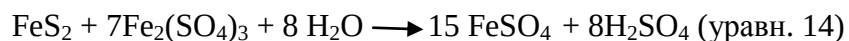
Выщелачивание железа чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с другими железо- и сероокисляющими бактериями

Бактерии и их ассоциации	Выщелочено железа за 30 дней				рН, нач/ конеч.	Конеч. ОВП, мВ
	г/л			%		
	Fe ³⁺	Fe ²⁺	Fe _{общее}			
Контроль	0	840	840	4.8	1.7/1.6	600
<i>Acidithiobacillus</i> sp.13Zn	1624	1792	3416	19.5	1.7/1.22	635
13Zn+ <i>L.ferriphilum</i> CC	5824	616	6440	36.8	1.7/1.25	775
13Zn+ <i>At.albertensis</i> SO-2	784	1456	2240	12.8	1.7/1.3	625
13Zn+ гетеротрофы	9296	504	9800	56.0	1.7/1.18	715
13Zn + <i>L.ferriphilum</i> + <i>At. albertensis</i>	6832	112	6944	39.7	1.7/1.1	850

Таким образом, ОВП, следовательно и окислительные свойства выщелачивающего раствора зависят от железоокисляющей активности используемой бактерии или их ассоциаций.

Степень извлечения железа ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn и гетеротрофных бактерий достигала 56 %, тогда как в случае монокультуры *Acidithiobacillus* 13Zn этот показатель не превышал 20 %.

Пирит относится к минералам, не растворимым в кислоте и, следовательно, согласно механизму окисления сульфидных минералов растворяться только под действием трехвалентного железа. Таким образом, присутствие *L.ferriphilum* CC в ассоциации приводит к интенсивному окислению ионов Fe (II) и регенерации трехвалентного железа (Fe (III)), что в свою очередь ускоряет окисление пирита согласно уравнению (уравн.14):



4.3.2. Выщелачивание халькопирита

Проводили сравнительное исследование выщелачивания халькопирита чистой культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 при 30°C (рис. 25).

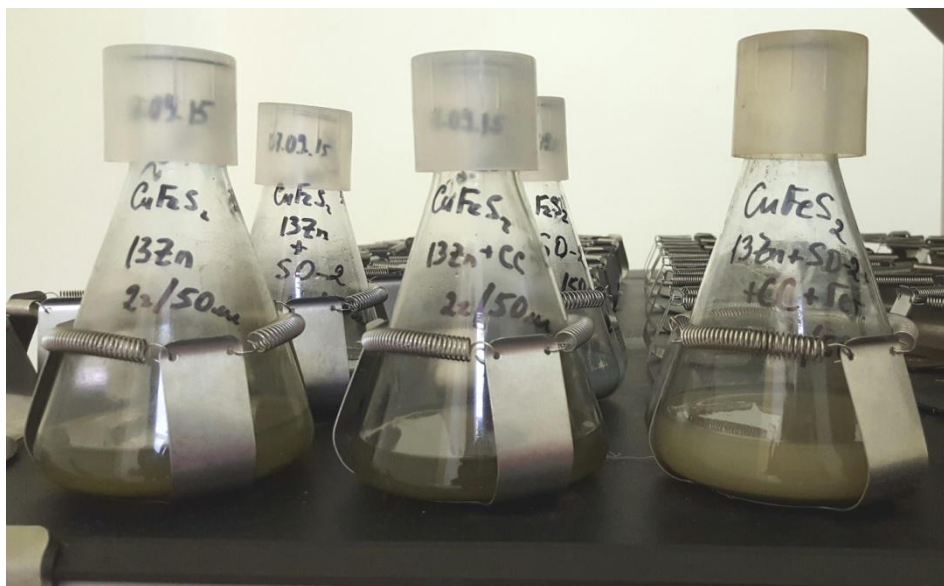


Рис. 25. Опыты по выщелачиванию халькопирита с помощью чистых культур и ассоциаций бактерий

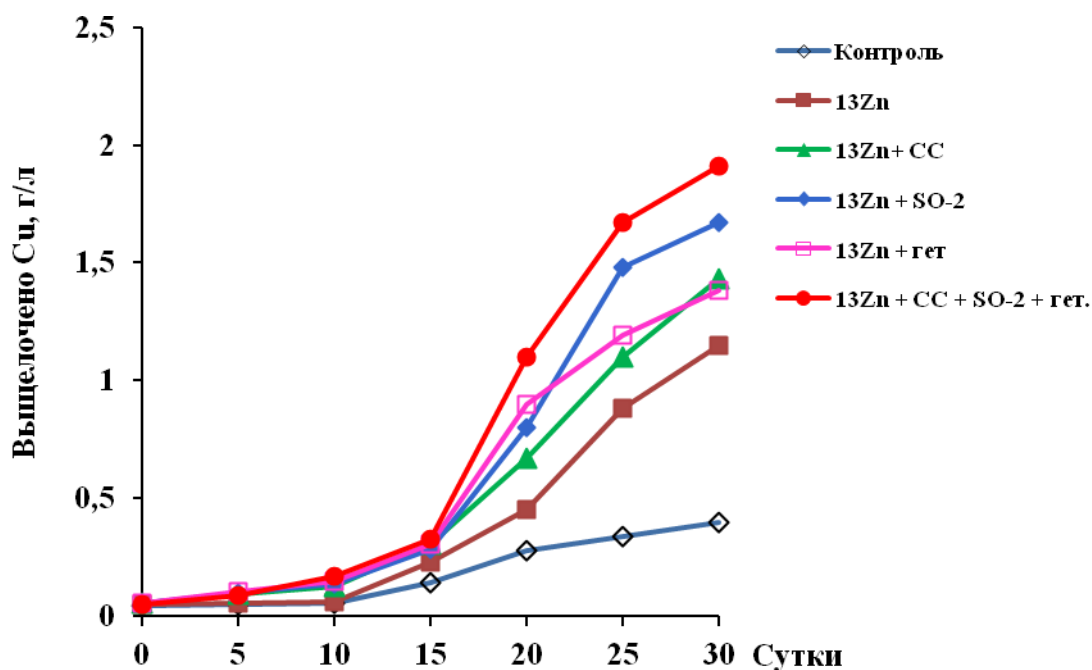


Рис. 26. Выщелачивание меди из халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с железooksисляющей *L.ferriphilum* CC, серooksисляющей *At.albertensis* SO- 2 и гетеротрофными бактериями (CuFeS_2 – 4 %, pH 1.8, T - 30°C, 240 об/мин)

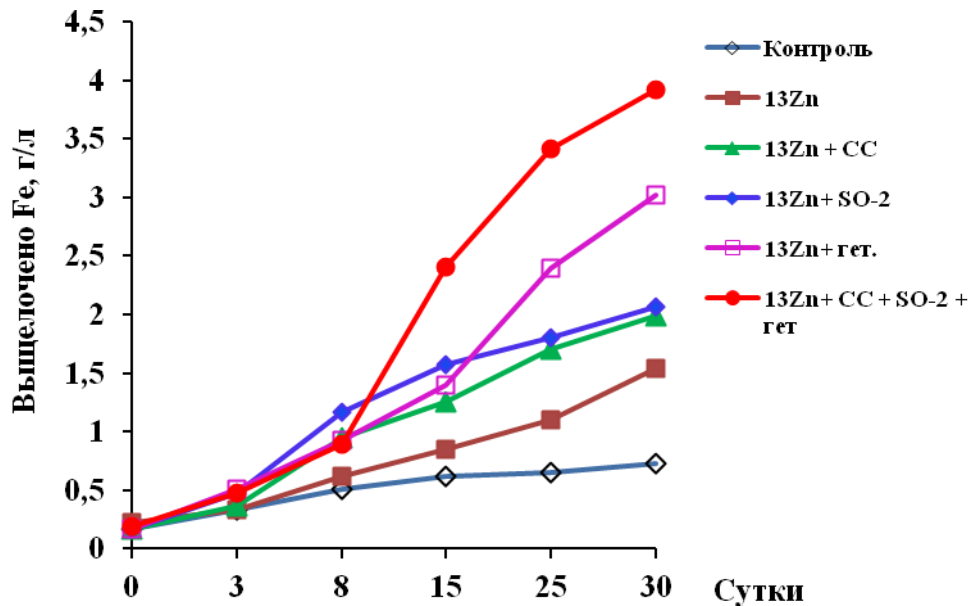


Рис. 27. Выщелачивание железа из халькопирита *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциацией с другими железooksисляющими и гетеротрофными бактериями (CuFeS_2 – 4 %, pH 1.8, T - 30°C, 240 об/мин)

Данные, приведенные на рисунках 26 и 27, показывают, что ассоциации выделенного *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с железooksисляющим *L.ferriphilum* CC и серooksисляющим

At.albertensis окисляют халькопирит значительно активнее, чем чистая культура *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Так, в присутствии *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn выщелачивание железа из халькопирита увеличивается примерно в 1.5 и 1.8 раз, соответственно (рис. 27). При этом экстракция меди из халькопирита возрастает в 1.3 и 1.6 раза соответственно (рис. 26). Примечательно, что в выщелачивании меди и железа из халькопирита более эффективной (1.7 - 2 раза) оказалась ассоциация *Acidithiobacillus* 13Zn и гетеротрофных бактерий. Однако наивысшую эффективность в выщелачивании халькопирита показала ассоциация, состоящая из *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, железоокисляющей бактерии *L.ferriphilum* CC, сероокисляющей бактерии *At.albertensis* SO-2 и гетеротрофных бактерий (рис. 26, 27). Так, за 30 дней выщелачивания халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn, *L.ferriphilum* CC, *At.albertensis* SO-2 и гетеротрофных бактерий экстракция меди достигала 15%, экстракция железа - 33% (табл.12).

Таблица 12

Выщелачивание железа и меди из халькопирита *Acidithiobacillus* 13Zn и ассоциацией с железо-, сероокисляющими и гетеротрофными бактериями

Бактерии и ассоциации	Выщелочено, железа за 30 дней				Выщелочено меди		Конечный	
	г/л			%	г/л	%	pH	ОВП, мВ
	Fe ³⁺	Fe ²⁺	Fe _{общ}	Fe _{общ}				
Контроль	0	0.672	0.672	5.6	0.52	4.1	1.8	520
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	1.096	0.448	1.544	12.8	0.884	6.9	1.7	600
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + <i>L.ferriphilum</i> CC	2.632	0.112	2.632	22.1	1.543	12.1	1.75	680
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + <i>At.albertensis</i> SO-2	2.016	0.616	2.744	23.0	1.67	13.4	1.6	720
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + гетеротрофы	0.336	3.024	3.360	28.2	1.37	10.7	1.6	615
<i>Acidithiobacillus</i> sp.13Zn+ <i>L.ferriphilum</i> CC+ <i>At.albertensis</i> SO-2 + гетеротрофы	3.960	0	3.960	33.3	1.91	14.9	1.5	810

Данные, приведенные в таблице 12, показывают, что выщелачивание халькопирита коррелируется с pH и ОВП раствора. При использовании *Acidithiobacillus* 13Zn в

монокультуре конечный pH составлял 1.7, а ОВП – 600 мВ, тогда как в варианте *Acidithiobacillus* 13Zn с *At.albertensis* SO-2 значение pH было сравнительно ниже (1.6), а ОВП - значительно выше (720 мВ). Наименьшее значение pH (1.5) и наивысшее значение ОВП (810) наблюдались в варианте с использованием консорциума, состоящего из *Acidithiobacillus* 13Zn, *At.albertensis* SO-2, *L.ferriphilum* CC и гетеротрофных бактерий (табл. 12).

Халькопирит относится к растворимым в кислоте сульфидным минералам и следовательно подвергается атакам как со стороны трехвалентного железа (Fe^{3+}), так и протонов (H^+) (уравн. 12, 15) [154, 171].



Ионы трехвалентного железа окисляют халькопирит с высвобождением меди и железа, а также элементарной серы в раствор (уравн. 15). Роль *L.ferriphilum* CC сводится к регенерации окислителя - Fe(III) (уравн. 8). То есть железоокисляющие бактерии ускоряют выщелачивание халькопирита с помощью продуцируемого ими трехвалентного железа. *At.albertensis* в смешанной культуре окисляет сульфидную серу до серной кислоты и тем самым предотвращает образование ярозита и гидрофобного слоя серы на поверхности халькопирита (уравн. 9), снимает эффект пассивации минерала и способствует интенсивному окислению халькопирита.

Таблица 13

Анализ органических кислот в культуральной жидкости
***Acidithiobacillus* sp. 13 Zn методом ВЭЖХ**

N	Органические кислоты	Время выхода	Площадь	Высота	Концентрация, мг/л	Конечная концентрация, мг/л
1	Винная кислота	4.538	6309607	232851	4612.673	230.6
2	Яблочная кислота	5.657	562506	42482	475.027	23.75
3	Молочная кислота	7.070	-26250	-81	0.000	0.000
4	Уксусная кислота	8.481	5645	312	7.677	0.384
5	Лимонная кислота	10.363	51123	1937	18.569	0.928

Анализ органических кислот в культуральной жидкости

L.ferrooxidans СС методом ВЭЖХ

N	Органические кислоты	Время выхода	Площадь пика	Высота	Концентрация, мг/л	Конечная концентрация, мг/л
1	Винная кислота	4.523	2664847	80296	1948.151	160.078
2	Яблочная кислота	5.630	374937	20535	316.628	26.017
3	Молочная кислота	7.200	-506	-7	0.000	0.000
4	Уксусная кислота	7.940	-825	-1	0.000	0.000
5	Лимонная кислота	10.358	6377	394	2.316	0.19

Ацидофильные гетеротрофы могут утилизировать органические вещества, содержащиеся в экссудате или в лизате клеток и таким образом уменьшать токсичный эффект органических веществ для автотрофных бактерий *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* СС.

Анализ культуральной жидкости *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* СС после удаления клеток с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показал наличие винной, яблочной, уксусной и лимонной кислот. Результаты анализа органических кислот в пробах культуральной жидкости *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* СС представлены в таблицах 13 и 14.

Кроме того возможно, что гетеротрофы поставляют CO₂ для автотрофов. В процессе дыхания они выделяют CO₂, который фиксируется автотрофными бактериями.

Таким образом, синергические взаимодействия между различными видами ацидофильных автотрофных и миксотрофных или гетеротрофных бактерий в ассоциации увеличивают экстракцию металлов.

Ряд исследователей показал, что смешанная культура, состоящая из умеренно термофильных бактерий *L.ferrooxidans* и *At.caldus*, выщелачивает халькопирит с большей эффективностью, чем мезофильная бактерия *At.ferrooxidans* в чистой и смешанной культуре. Кроме того отмечено, что при использовании *At.ferrooxidans* быстро наступает пассивация поверхности халькопирита и ингибирование выщелачивания минерала [23, 65, 101, 124, 173].

4.3.3. Выщелачивание Тандзутской руды и Дрмбонских хвостов

Выщелачивание Тандзутской руды. Выщелачивание золотосодержащей пиритной руды Тандзутского золото-полиметаллического месторождения Армении осуществляли с применением чистых культур *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, *L.ferriphilum* CC, *At.albertensis* SO-2 и ассоциациями. Исследования показали, что *L.ferriphilum* CC окислял руду в 1,5 раза активнее, чем *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. В результате за 20 суток культивирования *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и *L.ferriphilum* CC выщелачилось 52.3 и 33.8 % железа, соответственно (табл. 15).

Таблица 15

Выщелачивание руды Тандзутского месторождения *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и ассоциациями с серо- или железоокисляющими бактериями (ПП – 3 %, pH 2.0, продолжительность - 20 суток,)

Бактерии, их ассоциации	Выщелочено Fe, г/л	Извлечение Fe, %	pH нач/конеч.	Eh конеч., мВ
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	3.7	33.8	2.0 / 1.2	710
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + <i>At.albertensis</i> SO-2	3.9	35.9	2.0 / 1.1	720
<i>L.ferriphilum</i> CC	5.7	52.3	2.0 / 1.1	775
<i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn + <i>L.ferriphilum</i> CC	10.5	96.4	2.0 / 0.9	825

Применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в ассоциации с *L.ferriphilum* CC приводило к увеличению скорости окисления и степени выщелачивания Тандзутской руды до 96,4%. Сероокисляющая *At.albertensis* SO- 2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание Тандзутской руды (табл. 15).

Биовыщелачивание хвостов. Динамика выщелачивания проб Дрмбонских хвостов N1 и N2 с использованием питательной среды 9К и культуры *Acidithiobacillus* sp.13Zn приведена на рисунке 28. Как показывают представленные данные, применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn позволило увеличить выщелачивание железа из проб N1 и N2 в

15 - 16 и 5 - 7 раз, соответственно, по сравнению с химическим контролем (рис. 31). Извлечение меди при выщелачивании пробы N1 с использованием *Acidithiobacillus* sp. 13Zn возрастало в 4 - 5 раз, а в случае пробы N2 в 17 - 23 раз (рис. 29).

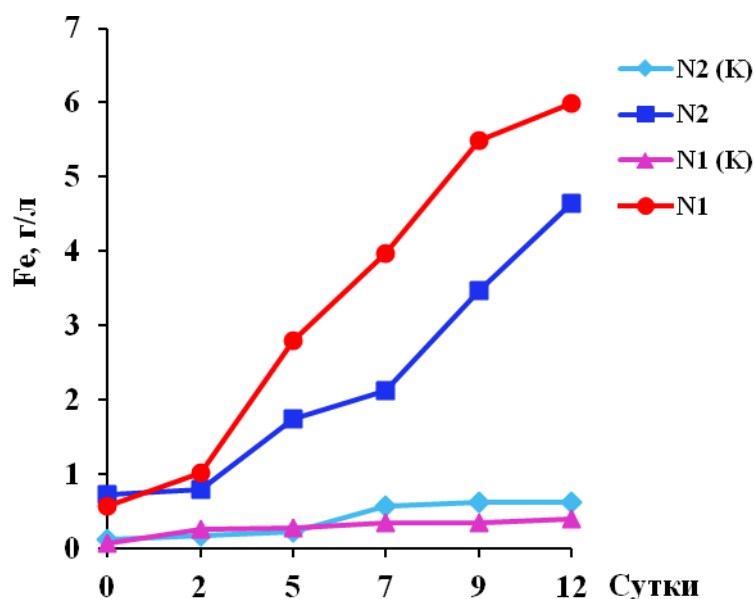


Рис. 28. Динамика выщелачивания железа из проб хвостов N1 и N2 культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (среда 9К, ПП -10 %, pH 2.0, T - 35°C, 180 об/ мин) N1 (K) и N2 (K) - контроль без бактерий

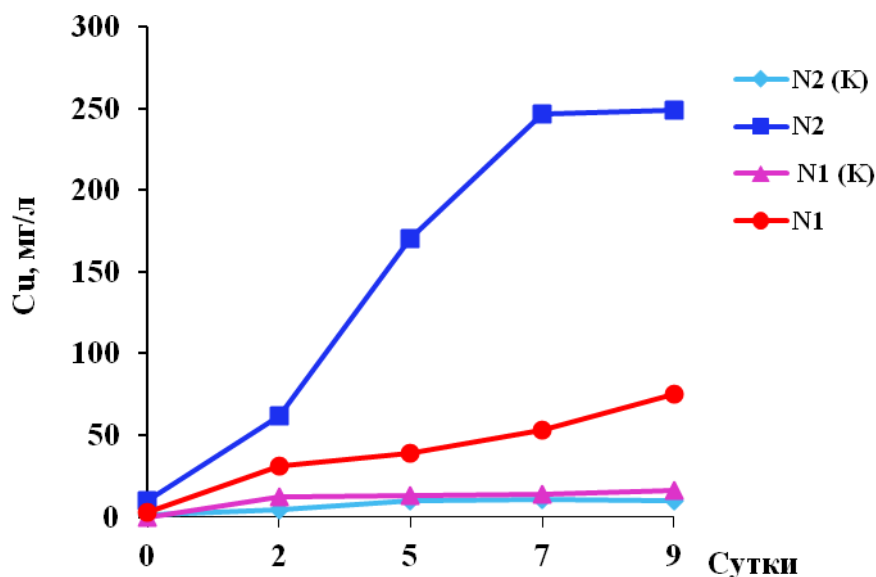


Рис. 29. Динамика выщелачивания меди из проб хвостов N1и N2 культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (среда 9К, ПП – 10 %, pH 2.0, T - 35°C, 180 об/ мин) N1 (K) и N2 (K) - контроль без бактерий)

Ниже представлены результаты выщелачивания железа и меди из проб хвостов с использованием рудничной воды (рис. 30, 31).

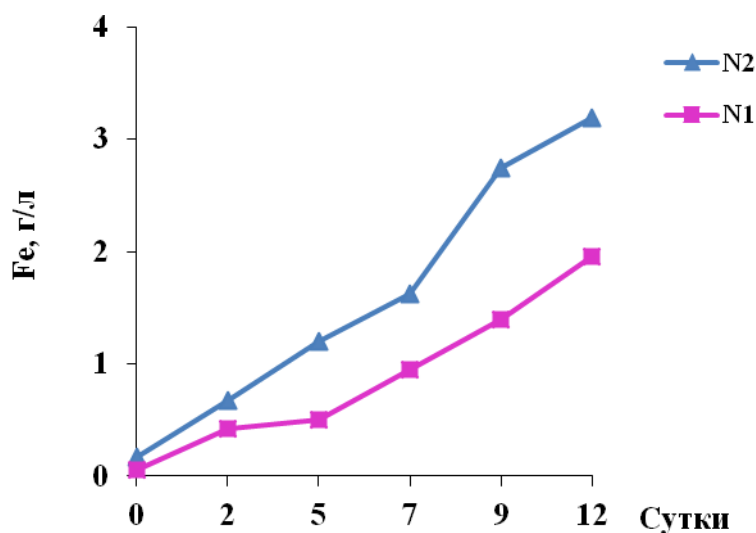


Рис. 30. Динамика выщелачивания железа из проб хвостов N1 и N2 с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий (рудничная вода, pH 2.0, ПП – 10%, T - 35°C, 180 об/ мин)

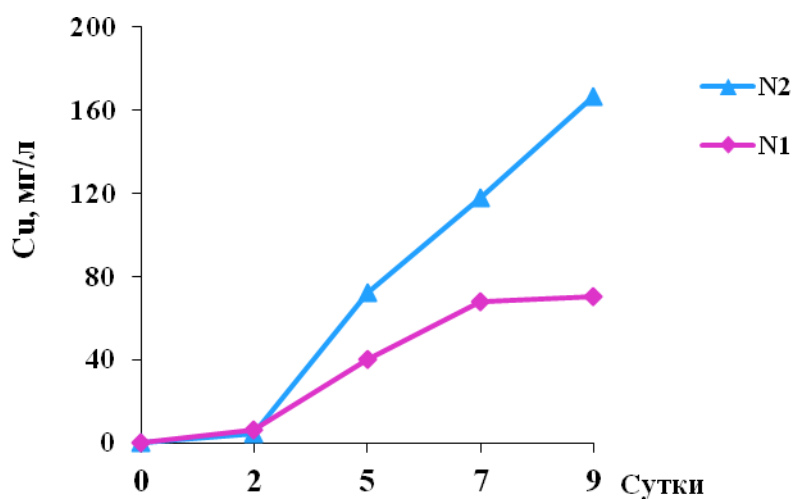


Рис. 31. Динамика выщелачивания меди из проб концентратов N1 и N2 с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий (рудничная вода, pH 2.0, ПП – 10 %, T - 35°C, 180 об/ мин)

Согласно представленным данным, количество выщелоченных железа и меди с помощью рудничной воды, соответственно, в 2 - 2.5 и 1.5 раза уступает таковым на эксперименте с использованием *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Это можно объяснить низким титром выщелачивающих бактерий в рудничной воде (10^4 кл/мл) из-за недостаточного количества в ней элементов, необходимых для роста бактерий.

На рисунках 32 и 33 представлены результаты биовыщелачивания пробы N1 при 15 и 20% плотностях пульпы. Как видно из рисунка 32, выщелачивание железа из пробы N1 за 12 суток составляло 11.5 - 12 % и 10 %, соответственно, при 15 % плотности пульпы. При 20% ПП степень выщелачивания железа значительно ниже - 7 – 8 %. При этом извлечение меди из пробы N1 составляло 33.3 % и 34 – 40 %, соответственно (рис. 33).

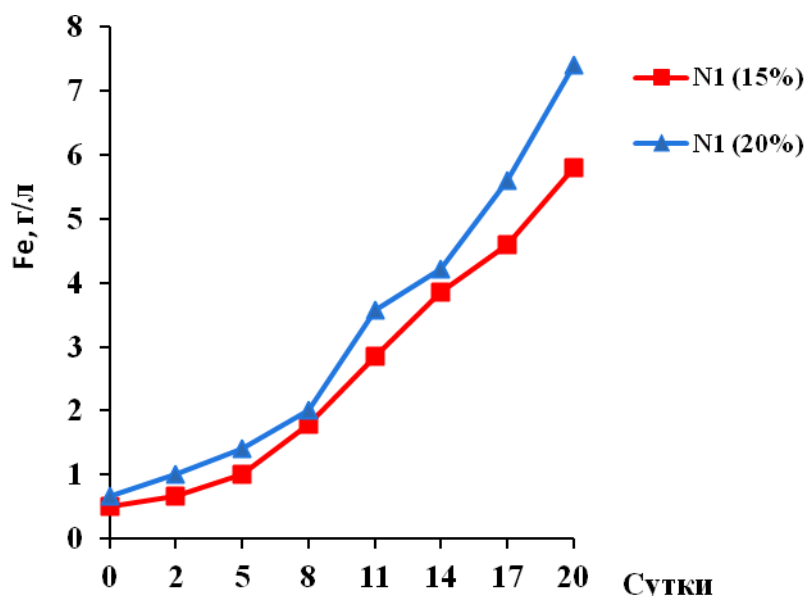


Рис. 32. Динамика экстракции железа из пробы N1 с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий в зависимости от плотности пульпы (рудничная вода, рН 2.0, Т - 35°C, 180 об/ мин)

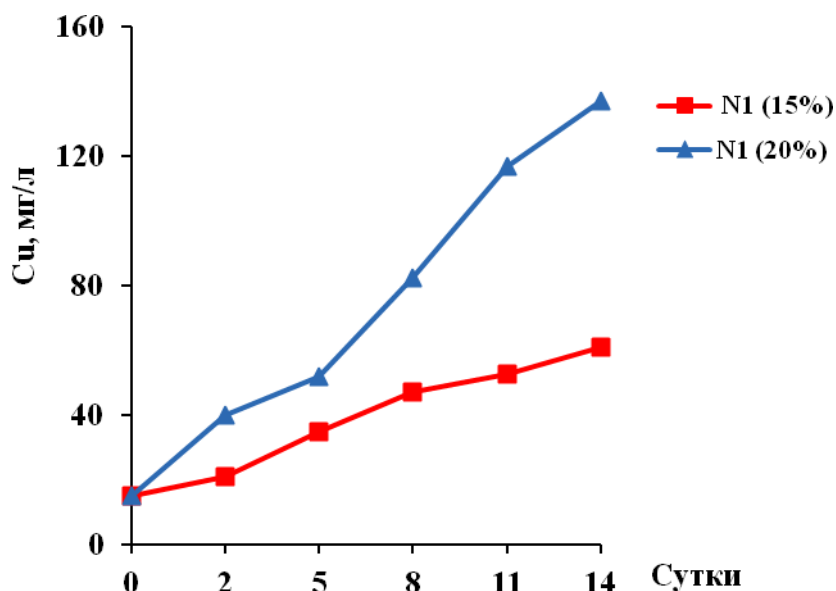


Рис. 33. Динамика экстракции меди из пробы N1 с помощью природной ассоциации выщелачивающих бактерий в зависимости от плотности пульпы (рудничная вода, pH 2.0, T - 35°C, 180 об/ мин)

Таким образом, можно заключить, что испытанные пробы Дрмбонских хвостов являются удобными объектами для биовыщелачивания. При этом биовыщелачивание можно осуществить природной ассоциацией выщелачивающих бактерий с использованием рудничной воды. Для интенсификации процесса биовыщелачивания хвостов можно применять консорциум *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и природной ассоциации выщелачивающих бактерий.

4.4. Устойчивость бактерий к металлам

Влияние меди и цинка на окисление Fe(II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и *L.ferriphilum* CC изучалось в пределах концентраций от 10 до 250 мМ. Показано, что окисление Fe(II) *L.ferriphilum* CC в присутствии 10 мМ меди и цинка ингибируется на 50% (табл. 15), тогда как ингибирование окисления Fe(II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn составит всего 45% при содержании в среде 100 мМ меди (табл.16).

Таблица 16

Влияние ионов меди и цинка на окисление Fe (II) *L.ferriphilum* CC
(содержание Fe (II) – 4 г/л, pH 1.8, время культивирования 48 час.)

В присутствии Cu (II)				В присутствии Zn (II)			
CuSO ₄ , мМ	Окисление Fe (II) <i>L.ferriphilum</i> CC		Ингиби- рование, %	ZnSO ₄ , мМ	Окисление Fe (II) <i>L.ferriphilum</i> CC		Ингиби- рование, %
	г/л	%			г/л	%	
0	2.44	100	0	0	2.44	100	0
10	1.29	52.9	47.1	10	1.23	50.6	49.4
25	0.95	39.1	60.9	20	1.12	46.0	54.0
50	0.95	39.1	60.9	50	1.0	41.4	58.6
100	0.87	35.7	64.3	100	0.95	49.1	60.9
150	0.82	33.7	66.3	150	0.89	46.8	63.2
200	0.67	27.6	72.4	200	0.84	44.5	65.5
250	0.62	25.3	74.7	250	-	-	-

Таблица 17

Влияние ионов меди и цинка на окисление Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn
(содержание Fe (II)- 4 г/л, pH 1.8, время культивирования 48 час)

В присутствии Cu (II)				В присутствии Zn (II)			
CuSO ₄ , мМ	Окисление Fe (II) <i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn		Ингиби- рование, %	ZnSO ₄ , мМ	Окисление Fe (II) <i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn		Ингиби- рование, %
	г/л	%			г/л	%	
0	2.95	100	0	0	1.4	100	0
10	2.53	85.8	14.2	10	1.87	133.6	0
20	2.5	84.7	15.3	25	1.87	133.6	0
50	2.44	82.7	17.3	50	1.82	130.0	0
100	1.62	54.9	45.1	100	1.62	115.7	0
150	-	-	-	150	1.57	112.1	0
200	0.73	24.7	75.3	200	0.25	17.9	82.1
250	0.59	19.9	80.1	250	0.22	15.7	84.3

При содержании в среде Zn (II) вплоть до 150 мМ окисление Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn стимулировалось на 10-30 %. Ингибирование окисления Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn наблюдалось при концентрации меди 200 мМ и больше (табл.17).

Таким образом, устойчивость *Acidithiobacillus* sp. 13Zn к ионам меди значительно больше, чем *L.ferriphilum* CC. Ионы цинка ингибируют окисление Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn при концентрации 200 мМ и выше.

Таблица 18

Окисление Fe (II) исходными и адаптированными культурами

***Acidithiobacillus* sp. 13Zn в присутствии 150 мМ Cu (II)**

Культура бактерии	CuSO ₄ × 5H ₂ O, мМ	Скорость окисления Fe (II)	
		мг/л час	%
Исходная культура <i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	-	113.7	100
Исходная культура <i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	150	32.4	28.5
Адаптированная культура <i>Acidithiobacillus</i> sp. 13Zn	150	72.3	63.6

Выращивание *Acidithiobacillus* sp. 13Zn на среде Fe(II) с постепенно увеличивающимися концентрациями меди от 20 до 150 мМ позволило повысить скорость окисления Fe (II) исходной культуры от 32.4 до 63.6 мг/л час (табл .18).

Таблица 19

Окисление Fe (II) исходными и адаптированными культурами

***L.ferriphilum* CC в присутствии 75 мМ Cu (II)**

Культура бактерии	CuSO ₄ .5H ₂ O, мМ	Скорость окисления Fe (II)	
		мг/л час	%
Исходная культура <i>L.ferriphilum</i> CC	-	81.7	100
Исходная культура <i>L.ferriphilum</i> CC	75	12.5	15.3
Адаптированная культура <i>L.ferriphilum</i> CC	75	61.8	75.6

Этим же методом удалось адаптировать культуру *L.ferriphilum* СС к 75 мМ меди и примерно в два раза увеличить скорость окисления Fe (II) по сравнению с исходной культурой (табл. 19).

Таким образом, при выращивании *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и *L.ferriphilum* в условиях с постепенно увеличивающимися концентрациями меди, можно получить адаптированные к 150 мМ и 75 мМ меди культуры, соответственно.

ГЛАВА 5. БАКТЕРИАЛЬНО - ХИМИЧЕСКОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ПИРИТА И ХАЛЬКОПИРИТА

5.1. Иммобилизация *Acidithiobacillus* sp. 13Zn на твердых носителях

Основным ограничивающим фактором для бактериального выщелачивания сульфидных минералов является низкая скорость регенерации окислителя – Fe (III) ввиду недостаточной концентрации бактериальных клеток. С целью увеличения интенсивности регенерации Fe (III) мы использовали метод адсорбционной иммобилизации бактериальных клеток на пористых твердых носителях. Иммобилизация железоокисляющих бактерий на твердых носителях позволяет значительно повысить скорость окисления двухвалентного железа за счет концентрирования бактериальных клеток.

Ранее была успешно осуществлена иммобилизация выделенных нами *L.ferriphilum* СС и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 6 на неорганических носителях: цеолите и шунгите [3]. Показано, что иммобилизованные на цеолите и шунгите бактерии могут быть перспективными для применения в процессах выщелачивания ценных металлов с целью их интенсификации.

Нами для иммобилизации *Acidithiobacillus* sp.13Zn использовали шунгит и активированный уголь, основные свойства которых приведены ниже.

Блестящий шунгит (Карелский регион, Россия):

Содержание углерода - 94 %, плотность - 2.25 - 2.84 г/см³, пористость - 0.5 – 5 %. прочность на сжатие 100 - 276 МПа; модуль упругости (Е) - 0.31×10^5 МПа. электропроводность - $(1-3) \times 10^3$ См/м; теплопроводность - 3.8 Вт/м. (ООО «Прицери-П» Россия)

Березовый активированный уголь БАУ-А:

Зерна черного цвета без механических примесей. Адсорбционная активность по йоду – 60 %, суммарный объем по воде – не менее 1.6 см³/г, насыпная плотность – не более 240 г/дм³, массовая доля золы – не более 6.0%, массовая доля влаги – не более 10 %.

Иммобилизацию выделенных нами *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* СС осуществляли путем непосредственного контакта культур в среде с двухвалентным железом и носителями. Процесс иммобилизации осуществлялся при 37° С в режиме перемешивания в течение 10 -15 дней до достижения максимальной активности окисления железа (рис. 34).



Рис. 34. Иммобилизация *Acidithiobacillus* sp. 13 Zn на шунгите (Т - 37°C, перемешивание через продувания)

Проведенные исследования показали, что наиболее эффективным носителем является активированный уголь. Так, скорость окисления железа иммобилизованными клетками *Acidithiobacillus* sp. 13Zn на шунгите и угле по сравнению с свободноживущими клетками увеличивается примерно в 2 и 4 раза соответственно (табл. 20).

Таблица 20

Окисление двухвалентного железа свободноживущими и иммобилизованными клетками *Acidithiobacillus* sp.13Zn

Клетки	Окислено Fe^{2+} , г/л за 48 ч	Скорость окисления Fe^{2+} , г/л ч
Свободноживущие клетки	1.96	0.133 - 0.137
Клетки, иммобилизованные на шунгите	3.36	0.240 - 0.254
Клетки, иммобилизованные на активированном угле	4.480	0.520 - 0.6

Для *L.ferriphilum* СС тоже уголь был более эффективным носителем, чем шунгит (рис. 35).

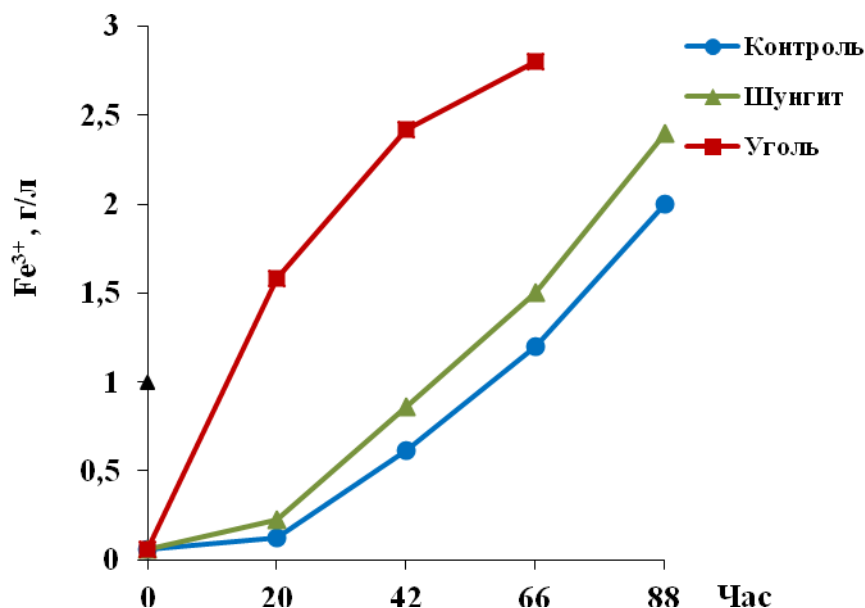


Рис. 35. Окисление Fe^{2+} *L.ferriphilum* СС, иммобилизованный на твердых носителях (pH 2.0, T - 37°C)

5.2. Химическое выщелачивание пирита и халькопирита

Для химического выщелачивания пирита использовали раствор соли $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, полученный иммобилизованными на активированном угле культурой *Acidithiobacillus* sp. 13Zn (биогенное). Начальная концентрация Fe^{3+} составляла 5г/л. Процесс химического выщелачивания осуществляли в режиме перемешивания при плотностях пульпы 5 и 10% при 40°C. Об интенсивности процесса судили по убыли ионов Fe^{3+} или по увеличению концентрации Fe^{2+} в растворе. Полученные результаты представлены на рисунке 36. Как видно из рисунка, количество выщелоченного из пирита железа при использовании биогенного трехвалентного железа больше, чем в случае химического реагента. Причем эта закономерность наблюдалась при 5 и 10% тестированных плотностях пульпы (рис. 36).

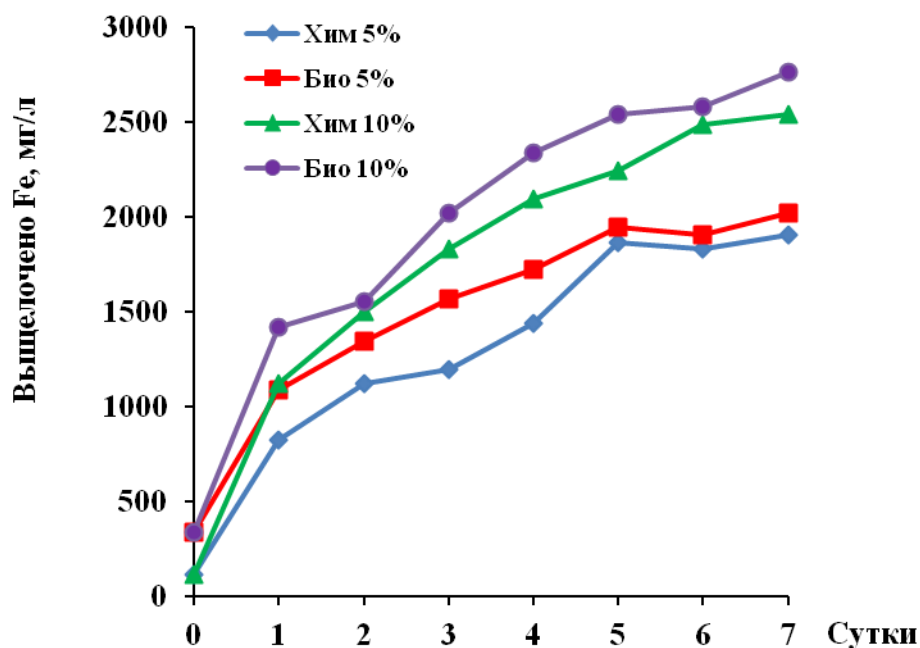


Рис. 36. Экстракции железа при химическом выщелачивании пирита (исходная концентрация Fe^{3+} - 5 г/л, рН 1.8, Т - 40°C)

В результате степень извлечения железа составляла 8.7 и 5.8 % при выщелачивании химическим и 9.3 и 6.3 % биогенным растворами $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ при 5 и 10 % плотности пульпы, соответственно. Следует отметить, что при этом интенсивная экстракция железа наблюдалась в первые 4 часа, далее процесс постепенно замедлялся.

Как видно из рисунка 37, наибольшая скорость выщелачивания железа при химическом окислении пирита наблюдалась в начале эксперимента в первый час – 2.4 - 2.5 г/л ч и постепенно снижалась до 0.2 - 0.3 г/л ч несмотря на наличие в среде достаточного количества нереагированного Fe^{3+} (рис.37). Наблюдалась также прямая зависимость скорости извлечения железа от плотности пульпы. Так, максимальная скорость выщелачивания железа при 10% плотности пульпы составляла 2.52 г/л ч и в 1.6 раз превышала таковую, наблюдаемую при 5 % ПП (1.4 г/л ч) (рис. 37).

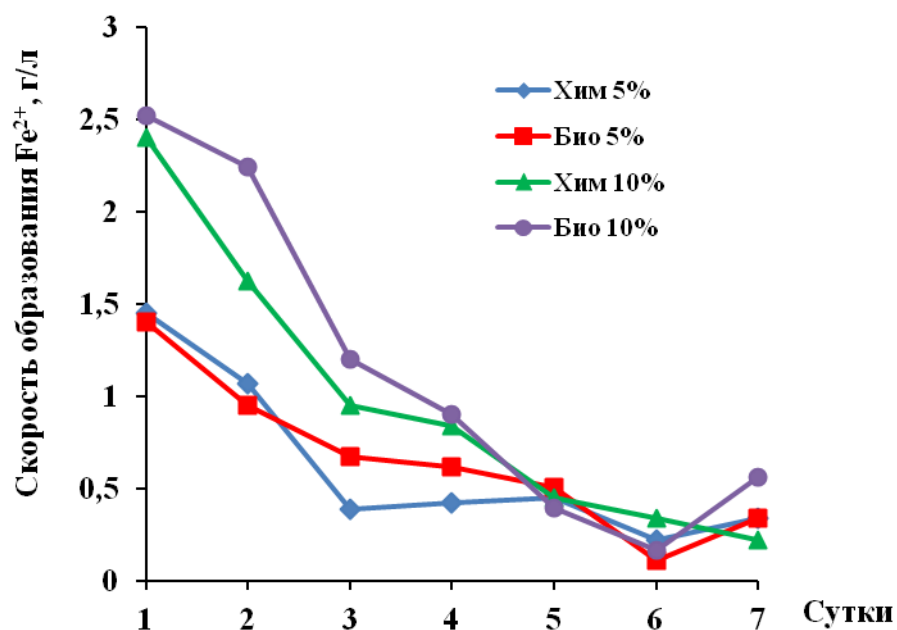


Рис. 37. Скорость извлечения железа при химическом выщелачивании пирита при различных плотностях пульпы

(исходная концентрация Fe^{3+} - 5 г/л, pH 1.8, T - 40°C)

Результаты химического выщелачивания халькопирита представлены в таблице 21 и на рисунке 38.

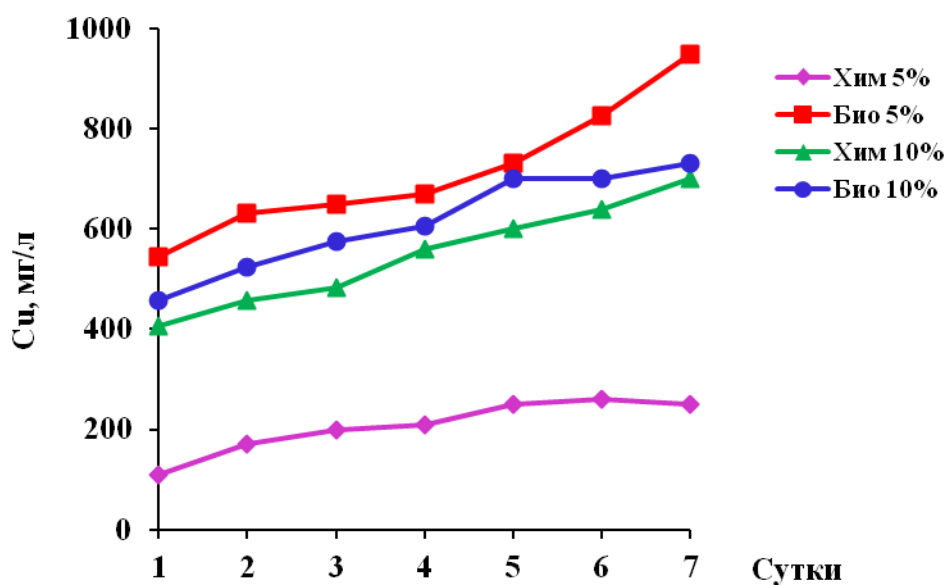


Рис. 38. Экстракция меди при выщелачивании CuFeS_2 химическим и биогенным растворами Fe^{3+} (исходная концентрация Fe^{3+} - 5 г/л, pH 1.8, T - 40°C)

Таблица 21

Выщелачивание меди и железа при химическом окислении халькопирита

ПП, %	Fe^{3+}	Выщелочено Fe						Выщелочено Cu					
		нач		4ч		7ч		нач		4ч		7ч	
		г/л	%	г/л	%	г/л	%	мг/л	%	мг/л	%	мг/л	%
5	Хим.	112	0.76	780	5.3	780	5.3	108	0.75	210	1.4	260	1.7
5	Био.	768	5.1	1232	8.3	1440	9.7	545	3.6	650	4.3	950	6.3
10	Хим.	202	0.68	628	2.1	762	2.5	407	1.3	560	1.8	700	2.3
10	Био.	784	2.6	1434	4.8	1792	6.0	457	1.5	607	2.0	750	2.5

Согласно приведенным данным подобно пириту выщелачивание халькопирита с Fe^{3+} бактериального происхождения по сравнению с химическим раствором Fe^{3+} протекает более эффективно, независимо от плотности пульпы.

Так, при выщелачивании халькопирита раствором Fe^{3+} бактериального происхождения в среду переходит в 3- 3.5 раза больше меди, чем при использовании химического раствора Fe^{3+} при плотности пульпы 5 %. Количество экстрагированного железа при выщелачивании халькопирита раствором Fe^{3+} бактериального происхождения в 2 раза больше, чем при использовании химического раствора Fe^{3+} (табл. 21. рис. 39).

Такая же закономерность наблюдается при плотности пульпы 10 %, однако количество выщелоченной меди сравнительно ниже. В результате за 7 часов из халькопирита выщелачивается 6.3 и 2.5 % меди при использовании Fe^{3+} бактериального происхождения и 1.7 и 2.3 % при использовании химического раствора Fe^{3+} , соответственно, при 5 и 10% плотности пульпы (рис. 38, табл. 21).

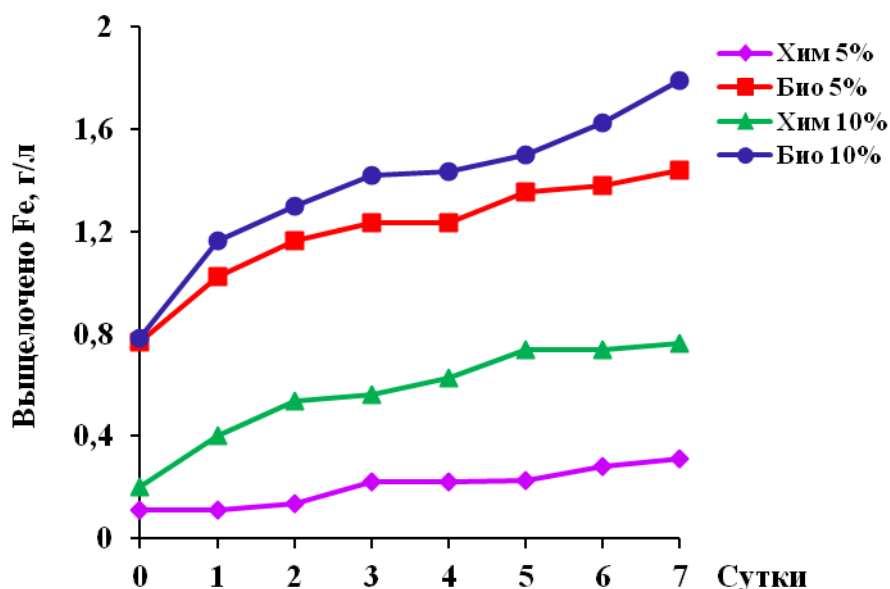


Рис. 39. Выщелачивание железа при окислении CuFeS_2 химическим и биогенным растворами Fe^{3+} (исходная концентрация Fe^{3+} - 5 г/л, pH 1,8, T - 40°C)

Исследованиями ряда авторов установлено, что культуральная жидкость, содержащая соединения трехвалентного железа, полученная при биоокислении соединений двухвалентного железа, является более активным окислителем, чем раствор соли $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$, полученный химическим путем [11, 14]. Показано также, что предварительное химическое выщелачивание арсенопиритных и пиритного концентратов культуральной жидкостью, содержащей соединения трехвалентного железа, при повышенной температуре (50 - 80°C) увеличивает скорость и глубину последующего биоокисления сульфидных минералов [11, 14].

Согласно данным исследователей растворы сернокислого окисного железа и биогенного трехвалентного железа бактериального происхождения значительно отличаются по ионному составу. Установлено, что в отличие от химического в биогенном растворе трехвалентное железо (Fe (III)) связано с высокомолекулярными органическими соединениями, такие как полисахариды, способные к комплексообразованию с катионами металлов, в том числе железом. Показано также, что в условиях проведения выщелачивания химическим раствором Fe (III) выпадает в осадок и концентрация железа резко снижается, вследствие чего окислительная активность раствора снижается. В растворе Fe (III) бактериального происхождения образование осадка не происходит, в результате чего окислительная активность сохраняется на высоком уровне [6, 7].

5.3. Биовыщелачивание пирита и халькопирита после обработки биогенным раствором Fe^{3+}

Проведено сравнительное исследование выщелачивания пирита и халькопирита без предварительной обработки и после обработки раствором Fe^{3+} , полученного иммобилизованными клетками *Acidithiobacillus* sp. 13Zn. Для выщелачивания пирита использовали ассоциацию *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC, для халькопирита - ассоциацию *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO- 2. Результаты биовыщелачивания пирита представлены на рисунке 40.

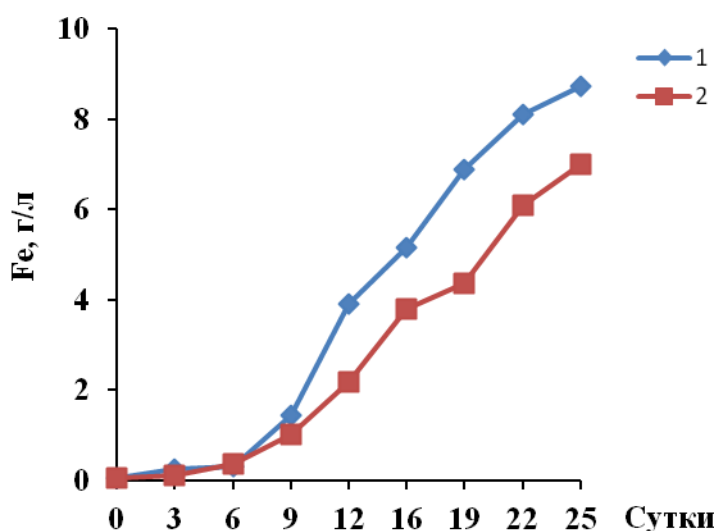


Рис. 40. Выщелачивание железа из обработанного (1) и необработанного биогенным Fe (III) (2) пирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC (ПП - 5%, pH 1.8, T - 30 °C)

Как видно из приведенных данных, количество выщелоченного железа из обработанного биогенным Fe^{3+} пирита примерно в 1.3 раза больше, чем из необработанного минерала. Степень извлечения общего железа использованной ассоциацией бактерий составляла 38.9 и 31.9 % из обработанного и необработанного пирита, соответственно (табл. 22). В целом после химического выщелачивания и последующего бактериального выщелачивания извлекается приблизительно 50 % железа из пирита.

Результаты бактериального выщелачивания халькопирита без предварительной обработки и после обработки раствором биогенного Fe (III), представлены на рисунках 41 и 42.

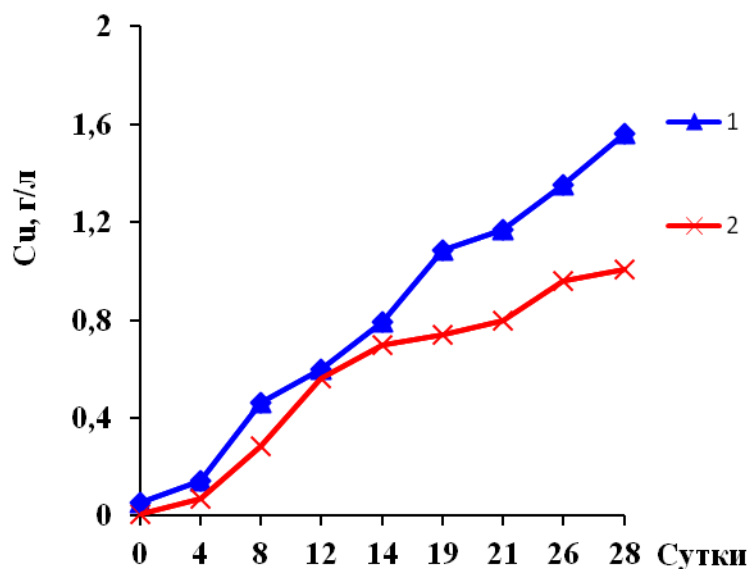


Рис. 41. Выщелачивание меди из обработанного (1) и необработанного биогенным Fe^{3+} (2) халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO- 2 (ПП – 5 %, pH 1.8, T - 30 °C)

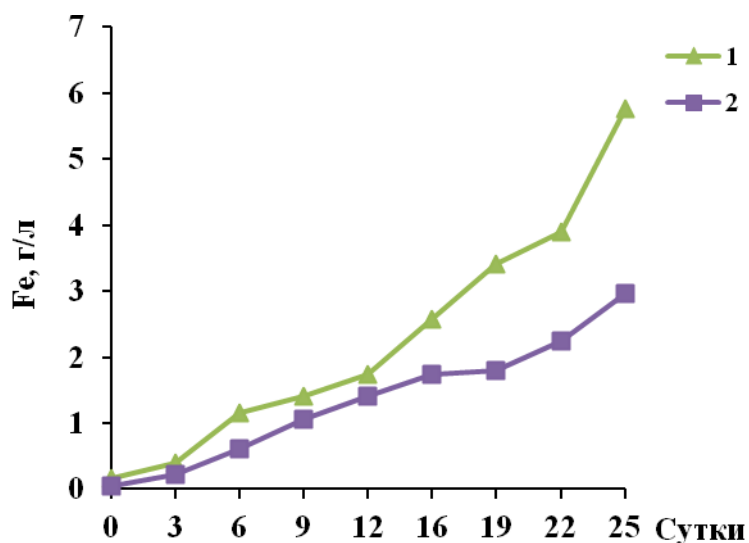


Рис. 42. Выщелачивание железа из обработанного (1) и необработанного биогенным Fe (III) (2) халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO- 2 (ПП - 5 %, pH 1.8, T - 30 °C)

Как видно из приведенных данных, в отличие от необработанного, обработанный халькопирит выщелачивается более интенсивно. Так, за 25 суток эксперимента из обработанного биогенным железом халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 выщелачивается примерно в 1.5 раза больше меди

(1.56 г/л), чем из необработанного минерала (1.01 г/л) (рис. 41). В этот же период количество выщелоченного железа составляло 5.77 г/л и 2.97 г/л из обработанного и необработанного халькопирита, соответственно (рис.42). В результате после предварительной обработки за 25 суток ассоциацией *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 из обработанного халькопирита извлекается 10.4 % меди и 38.9 % железа, тогда как из необработанного минерала эти значения составляют 6.3% и 31.9 %, соответственно (табл. 22).

Таблица 22

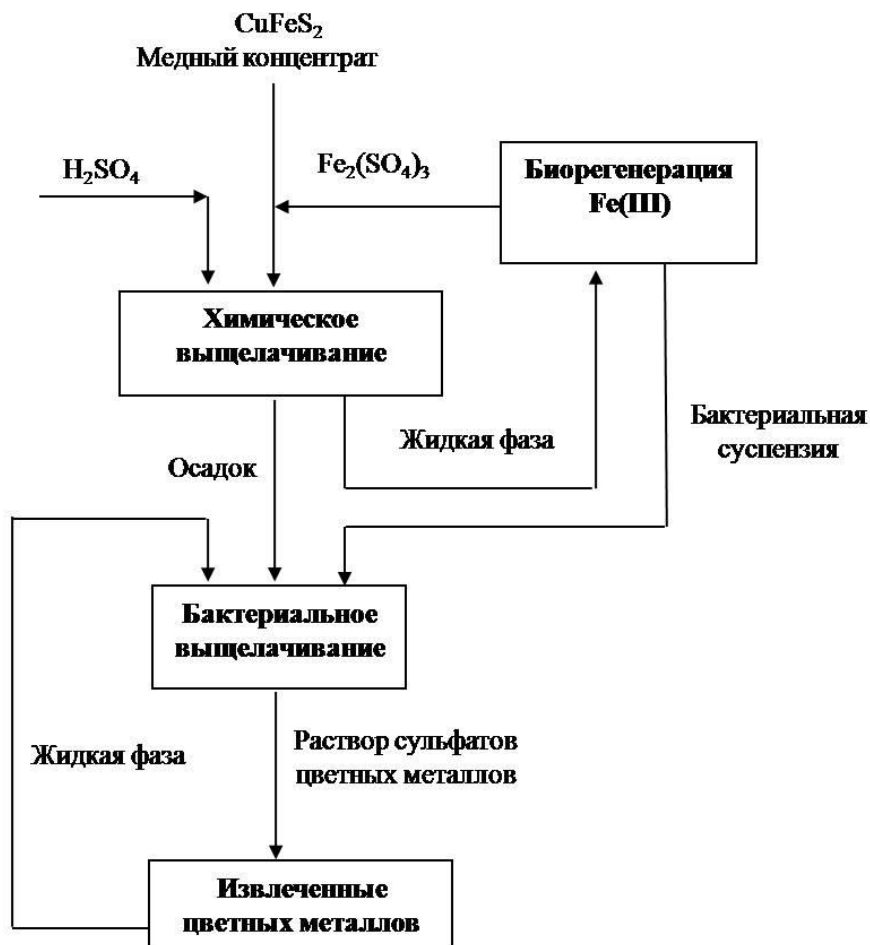
Извлечение меди и железа из необработанного и обработанного биогенным железом пирита и халькопирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO- 2 (25 суток)

Минерал	Выщелочено Cu, г/л	Извлечение Cu, %	Выщелочено Fe, г/л	Извлечение Fe, %	Исх/ конеч. pH	Конеч. ОВП, мВ
FeS ₂ , необработанный	-	-	7.0	31.9	1.8/1.6	780
FeS ₂ , обработанный биогенным Fe (III)	-	-	8.74	39.9	1.8/1.35	830
CuFeS ₂ , необработанный	1.01	6.7	2.97	19.9	1.8/1.8	450
CuFeS ₂ , обработанный биогенным Fe (III)	1.56	10.4	5.78	38.9	1.8/1.6	625

Об интенсивности выщелачивания халькопирита свидетельствуют также изменения значения pH и ОВП выщелачивающей среды. Чем интенсивнее выщелачивается минерал, тем ниже конечные значения pH и ОВП выщелачивающего раствора (табл. 22).

Таким образом, можно заключить, что предварительная обработка пирита и халькопирита раствором Fe (III), полученным с помощью иммобилизованных клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn позволяет в среднем в 1.5 - 2 раза увеличить экстракцию железа из пирита меди и железа из халькопирита.

На основании полученных данных можно предложить принципиальную схему бактериально-химического выщелачивания халькопиритной руды или медного концентрата.



Принципиальная схема бактериально-химического выщелачивания халькопиритной руды

Полученные нами результаты согласуются с исследованиями других авторов [11, 14]. Согласно этим исследованиям предварительное химическое выщелачивание арсенопиритного и пиритного концентратов культуральной жидкостью, содержащей соединения трехвалентного железа, при повышенной температуре (50 - 80°C) увеличивает скорость и глубину последующего биоокисления сульфидных минералов умеренно термofilными бактериями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение распространения ХБ показало, что в пробах рудничных вод доминируют *At.ferrooxidans* и *At.thiooxidans*. *Leptospirillum* spp. бактерии встречаются преимущественно в пробах отвалов. Термофильные бактерии рода *Sulfobacillus* не обнаружены в тестированных пробах рудничных вод и отвалов. Методом накопительных культур с применением селективных сред и двухслойного агара из природных биотопов Ахтальского полиметаллического, Тандзутского золото-полиметаллического, а также Алавердского и Дрмбонского медных месторождений выделены и изучены пять штаммов ацидофильных ХБ: *Acidithiobacillus* sp. 15, *Acidithiobacillus* sp.Т - 2, *Acidithiobacillus* sp. D-3, *Leptospirillum* sp. А-1 и *Leptospirillum* sp. Т-3. Выделенные штаммы - строгие автотрофы, способны окислять двухвалентное железо Fe (II), элементную серу и сульфидные минералы. *Leptospirillum* sp. А - 1 и *Leptospirillum* sp. Т - 3 окисляют двухвалентное железо и пирит, но не способны окислять восстановленные соединения серы. Предварительный скрининг выделенных и коллекционных штаммов ХБ показал, что наибольшую активность в окислении пирита и халькопирита проявляет штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, выделенный ранее из Тандзутского золото-полиметаллического месторождения. *Aacidithiobacillus* sp. 13Zn также проявлял активность в окислении Дрмбонской медной золотоносной руды, медного концентрата и Дрмбонских хвостов.

На основании филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, штамм *Acidithiobacillus* sp. 13Zn был ранее идентифицирован как новый, отличный от *At.ferrooxidans* вид рода *Aacidithiobacillus* (3). Рост штамма *Acidithiobacillus* sp. 13Zn на среде с двухвалентным железом возможен в пределах pH 1.4 - 2.6 с оптимальным значением pH 2.0 и оптимальной температурой 37°C. Штамм депонирован в Центре депонирования микроорганизмов (ЦДМ) и получил номер MDC 7055.

Изучение влияния внешних факторов, таких как pH, плотность пульпы и размер частиц минералов показало, что биовыщелачивание халькопирита и Тандзутской руды штаммом *Acidithiobacillus* sp. 13Zn более эффективно протекает при плотности пульпы 10% и pH 2.0. Предполагается, что увеличение плотности пульпы вызывает высокое парциальное давление, лимитирует транспорт кислорода и углекислого газа, что приводит к ингибированию роста бактерий [81, 173, 180].

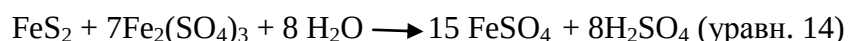
Максимальный выход меди и общего железа из халькопирита наблюдался при размерах частиц + 45 мкм. Это можно объяснить тем, что с уменьшением размера частиц,

увеличивается их поверхность, что в свою очередь приводит к возрастанию растворения металлов [15].

Наибольшее количество железа (24.9 %) из Тандзутской руды штаммом *Acidithiobacillus* sp. 13Zn выщелачивалось при 1.29 г/л исходной концентрации трехвалентного железа в среде. При этой концентрации наблюдалось максимальное значение ОВП и наиболее интенсивное образование серной кислоты, в результате чего pH раствора снижался до 0.85. Максимальное количество выщелоченного железа (6.0 г/л или 26.9 %) из Тандзутской руды наблюдалось при осуществлении процесса выщелачивания только культуральной жидкостью *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в логарифмической фазе роста на среде с железом. При этом концентрация Fe (III) в пульпе составляла 1.96 г/л.

Исследования показали, что эффективность *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в окислении пирита увеличивается в 1.8 раза при совместном культивировании с *L.ferriphilum* CC. Применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в ассоциации с *L.ferriphilum* CC приводило также к увеличению степени выщелачивания Тандзутской руды до 96.4 %. Сероокисляющая *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание пирита и Тандзутской руды.

Пирит относится к минералам, не растворимым в кислоте, и, следовательно, согласно механизму окисления сульфидных минералов растворяется только под действием трехвалентного железа. Таким образом, присутствие *L.ferriphilum* CC в ассоциации приводит к интенсивному окислению ионов Fe (II) и регенерации трехвалентного железа (Fe (III)), что в свою очередь ускоряет окисление пирита согласно уравнению (уравн.14):



Наивысшую активность в окислении пирита показала ассоциация *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с гетеротрофными бактериями. Степень извлечения железа ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn и гетеротрофных бактерий достигала 56 %, тогда как в случае монокультуры *Acidithiobacillus* 13Zn этот показатель не превышал 20 %.

В присутствии *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn экстракция меди из халькопирита возрастает в 1.3 и 1.5 раза. При этом выщелачивание железа увеличивается примерно в 1.5 и 1.8 раза.

Это можно объяснить тем, что халькопирит относится к растворимым в кислоте сульфидным минералам и, следовательно, подвергается атакам как со стороны трехвалентного железа (Fe (III)), так и протонов (H⁺) (уравн. 12, 15) [154, 171].



Ионы трехвалентного железа окисляют халькопирит с высвобождением меди и железа, а также элементарной серы в раствор (уравн. 15). Роль *L.ferriphilum* CC сводится к регенерации окислителя – Fe (III) (уравн.8). То есть железоокисляющие бактерии ускоряют выщелачивание халькопирита с помощью продуцируемого ими трехвалентного железа. *At.albertensis* SO-2 в смешанной культуре окисляет сульфидную серу до серной кислоты и тем самым предотвращает образование ярозита и гидрофобного слоя серы на поверхности халькопирита, снимает эффект пассивации минерала и способствует интенсивному окислению халькопирита.

Примечательно, что в выщелачивании меди и железа из халькопирита более эффективной (1,7 - 2 раза) оказалась ассоциация *Acidithiobacillus* 13Zn, *L.ferriphilum* CC, *At.albertensis* SO-2 и гетеротрофных бактерий. Такие результаты установлены также другими авторами, изучавшими ассоциации ацидофильных автотрофных и миксотрофных бактерий в выщелачивании минералов [23, 24, 29, 94, 173].

Анализ культуральной жидкости *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* CC после удаления клеток с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), показал наличие винной, яблочной, уксусной и лимонной кислот. Предполагается, что ацидофильные гетротрофы могут утилизировать органические вещества, содержащиеся в культуральной жидкости и таким образом уменьшать токсичный эффект органических веществ для автотрофных бактерий *Acidithiobacillus* sp.13Zn и *L.ferriphilum* CC. Кроме того возможно, что гетеротрофы поставляют CO₂ для автотрофов. В процессе дыхания они выделяют CO₂, который фиксируется автотрофными бактериями.

Таким образом, синергические взаимодействия между различными видами ацидофильных автотрофных и гетеротрофных бактерий в ассоциации увеличивают экстракцию металлов из пирита и халькопирита.

Ряд исследователей показал, что смешанные культуры, полученные этим методом, наиболее эффективны в ускорении окисления конкретных минералов. В таких консорциумах составные виды дополняют друг друга с точки зрения физиологических свойств, таких как способность к окислению серы и/ или железа, к автотрофному или гетеротрофному росту и т.д. [23, 43, 92, 101, 113, 124].

Исследования показали, что испытанные пробы Дрмбонских хвостов являются удобными объектами для биовыщелачивания. При этом биовыщелачивание можно осуществить природным консорциумом выщелачивающих бактерий рудничной воды.

Однако для интенсификации процесса биовыщелачивания хвостов можно применять культуру *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с природным консорциумом выщелачивающих бактерий.

Показано, что устойчивость *Acidithiobacillus* sp. 13Zn к ионам меди значительно больше, чем *L.ferriphilum* СС. Ионы цинка ингибируют окисление Fe (II) *Acidithiobacillus* sp. 13Zn при концентрации 200 мМ и выше. Установлено, что выращивание *Acidithiobacillus* sp. 13Zn на среде Fe (II) с постепенно увеличивающимися концентрациями меди от 20 до 150 мМ позволило повысить скорость окисления Fe (II) исходной культуры от 32.4 до 63.6 мг/л час. Таким образом, при выращивании *Acidithiobacillus* sp. 13Zn и *L.ferriphilum* в условиях с постепенно увеличивающимися концентрациями меди можно получить адаптированные к 150 и 75 мМ меди культуры, соответственно.

Установлено, что выщелачивание пирита и халькопирита с биогенным железом (Fe^{3+}), полученным с помощью иммобилизованных на шунгите клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn протекает более эффективно, чем химическим раствором Fe^{3+} , независимо от плотности пульпы. При выщелачивании халькопирита биогенным раствором Fe^{3+} в среду переходит в 3 - 3.5 раза больше меди, чем при использовании химического раствора Fe^{3+} при плотности пульпы 5%. При этом количество экстрагированного железа было в 2 раза больше, чем при использовании химического раствора Fe (III).

Исследованиями ряда авторов установлено, что культуральная жидкость, содержащая соединения трехвалентного железа, полученная при бактериальном окислении соединений двухвалентного железа, является более активным окислителем, чем раствор соли $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$, полученный химическим путем [11, 14]. Согласно данным исследователей растворы сернокислого окисного железа и биогенного трехвалентного железа бактериального происхождения значительно отличаются по ионному составу. В отличие от химического в биогенном растворе трехвалентное железо (Fe (III)) связано с высокомолекулярными органическими соединениями, такие как полисахариды, способные к комплексообразованию с катионами металлов, в том числе железом. Показано также, что в условиях проведения выщелачивания химическим раствором Fe (III) выпадает в осадок и концентрация железа резко снижается, вследствие чего окислительная активность раствора снижается. Образование осадка в растворе Fe(III) бактериального происхождения не происходит, в результате чего окислительная активность сохраняется на высоком уровне [6, 7].

Проведенные сравнительные исследования показали, что количество выщелоченного железа из обработанного биогенным Fe (III) пирита ассоциацией *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с *L.ferriphilum* CC примерно в 1.3 раза больше, чем из необработанного минерала. При этом степень извлечения общего железа использованной ассоциацией бактерий составляла 38.9 и 31.9 % из обработанного и необработанного пирита, соответственно.

Установлено, что в отличие от необработанного, обработанный биогенным Fe³⁺ халькопирит выщелачивается в 1.5 - 2.0 раза интенсивнее. В результате после предобработки за 25 суток ассоциацией *Acidithiobacillus* sp.13Zn с *L.ferriphilum* CC и *At.albertensis* SO-2 и гетеротрофных бактерий из обработанного биогенным Fe³⁺ халькопирита извлекалось 10.4 % меди и 38.9 % железа, тогда как из необработанного минерала эти значения составляли 6.3 % и 31.9 %, соответственно.

Таким образом проведенные исследования позволяют заключить, что предварительная обработка пирита и халькопирита раствором Fe (III), полученным с помощью иммобилизованных клеток, позволяет в среднем в 1.3 - 2.0 раза увеличить экстракцию меди и железа из минералов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что наивысшую эффективность в выщелачивании сульфидных минералов и руд проявляет термотолерантный штамм железо- и сероокисляющих бактерий *Acidithiobacillus* 13Zn.

2. Установлено, что максимальная экстракция меди и общего железа при биовыщелачивании халькопирита *Aacidithiobacillus* sp. 13Zn наблюдается при плотности пульпы 10 %, размеров частиц + 45 мкм и pH 2.0. При выращивании в условиях с постепенно увеличивающимися концентрациями меди можно получить адаптированные к 150 и 75 мМ меди культуры бактерии.

3. Разработанные ассоциации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с сероокисляющей *At.albertensis* SO-2 или железоокисляющей *L.ferriphilum* CC позволяют значительно увеличить экстракцию меди из халькопирита. Наивысшую эффективность в выщелачивании меди показала ассоциация, состоящая из указанных автотрофных и гетеротрофных бактерий. Наивысшее количество извлеченного железа наблюдалось при выщелачивании пирита ассоциацией *Acidithiobacillus* 13Zn с гетеротрофными бактериями.

4. Применение *Acidithiobacillus* sp. 13Zn в ассоциации с *L.ferriphilum* CC приводило к увеличению степени выщелачивания железа из Тандзутской руды до 96.4 %. *At.albertensis* SO-2 в ассоциации с *Acidithiobacillus* sp. 13Zn не оказывала существенного влияния на выщелачивание Тандзутской руды.

5. Установлено, что экстракция меди и железа при химическом выщелачивании халькопирита биогенным Fe(III), полученным с помощью иммобилизованных клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, соответственно в 3 и 2 раза больше, чем при использовании раствора Fe (III).

6. Предобработка пирита и халькопирита раствором Fe (III), полученным с помощью иммобилизованных клеток *Acidithiobacillus* sp. 13Zn, позволяет в среднем в 1.5 - 2.0 раза увеличить экстракцию железа из пирита, меди и железа из халькопирита.

7. Конструированные ассоциации *Acidithiobacillus* sp. 13Zn с другими серо- и железоокисляющими и гетеротрофными бактериями могут служить эффективными кандидатами для разработки высокоэффективного процесса БВ и биоокисления пиритсодержащих золотоносных руд, хвостов, а также медного концентрата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биогeотeхнология металлов // Под ред. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агате А., Грудева С., Авакян З.А. - М.: Центр Международных проектов ГКНТ, 1989. 375с.
2. Вайнштейн М.Б., Вацурина А.Б., Соколов С.Л., Филанов А.Е., Адамов Э.В., Крылова Л.Н. Состав бактериальных сообществ в отвалах сульфидных никелевых руд. // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – С. 560 – 567.
3. Варданыан А.К. Выделение и изучение новых хемолитотрофных бактерий в процессах биовыщелачивания сульфидных минералов: Автореф. дис. к-та биол. Наук: 03.00.07 / НППЦ «Армбиотeхнология» НАН РА. – Ереван, 2015. – 24 с.
4. Вартанян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А., Дорофеев А.Г. Устойчивость *Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* к ионам Cu, Zn, Ni // Микробиология. – 1990. – Т. 59. № 4. – С. 587 - 594.
5. Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии // в 3т. – М.: Мир, 1983. – Т. 1, - С. 97.
6. Гусаков М.С., Крылова Л.Н., Адамов Э.В. Выщелачивание никеля из пирротиновых концентратов железом, окисленным иммобилизованной биомассой. // Цветные металлы. – 2011 - №4. - С.15-19.
7. Гусаков М.С. Разработка способа выщелачивания сульфидных концентратов серноокислыми растворами трехвалентного железа, полученными иммобилизированной биомассой. // Автореферат дис. К-та тех. наук: 05.16.02 / «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС» . – М., 2012. - 22с.
8. Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. - 2006. - Т. 715. № 5. - С. 593 – 629.
9. Маркосян Г.Е. Новая железоокисляющая бактерия *Leptospirillum ferrooxidans* gen. nov., sp. nov. // Биолог. журн. Армении. - 1972. - Т. 25. № 2. - С. 26 - 29.
10. Маркосян Г.Е. Новая миксотрофная тионовая бактерия, развивающаяся в кислой среде, *Thiobacillus organoparus* sp. nov. // Докл. АН СССР. - 1973. - Т. 211. № 5. - С. 1205 - 1208.
11. Муравьев М.И., Фомченко Н.В., Кондратьева Т.Ф. Влияние стадии химического выщелачивания золотомышьяковых концентратов на их последующее биоокисление

- умеренно термофильными микроорганизмами и извлечение золота из золотомышьякового концентрата. // Биотехнология. – 2009. – № 3. – С. 60–66.
12. Определитель бактерий Берджи // Под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снита П., Стейли Дж., Уилльямс С. – М.: Мир. – 1997. – Т. 2. – С. 447 – 457.
 13. Резников А.А. Муликовская Е.П.. Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. – М.: Недра, 1970. 140с.
 14. Фомченко Н.В., Бирюков В.В. Двустадийная технология бактериально-химического выщелачивания медно-цинкового сырья ионами Fe^{3+} с последующей их регенерацией хемолитотрофными бактериями. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – № 1. – С. 64–69.
 15. Abhilash, Mehta K.D., Pandey B.D. Efficacy of Bacterial Adaptation on Copper Biodissolution from a Low Grade Chalcopyrite Ore by *A. ferrooxidans* // International Journal of Nonferrous Metallurgy. – 2012. – Vol. 1. – P. 1 – 7.
 16. Absolom D.R., Lamberti F.V., Policova Z., Zingg W., van Oss C.J., Neumann, A.W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – Vol. 46, № 1. – P. 90 – 97.
 17. Acevedo F. Present and Future of bioleaching in developing countries // EJB Electronic Journal of Biotechnology. – 2002. – Vol. 5. № 2.
 18. Acuña J., Rojas J., Amaro A.M., Toledo H., Jerez C.A. Chemotaxis of *Leptospirillum ferrooxidans* and other acidophilic chemolithotrophs: comparison with the *Escherichia coli* chemosensory system // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – Vol. 75. № 1. – P. 37 – 42.
 19. Ahmadi A. Influence of Ferric and Ferrous Iron on Chemical and Bacterial Leaching of Copper Flotation Concentrates // International Journal of Nonferrous Metallurgy. – 2012. – Vol. 1. – P. 42 – 48.
 20. Ahmadi A., Schaffie M., Petersen J., Schippers A., Ranjbar M. Conventional and electrochemical bioleaching of chalcopyrite concentrates by moderately thermophilic bacteria at high pulp density. // Hydrometallurgy. – 2011. – Vol. 106. – P. 84 – 92.
 21. Ahmadi A., Schaffie M., Manafi Z., Ranjbar M. Electrochemical Bioleaching of High Grade Chalcopyrite Flotation Concentrate in a Stirred Tank Reactor. // Hydrometallurgy. – 2010. – Vol. 104. № 1. – P. 99 – 105.
 22. Ahonen, L., Tuovinen, O.H. Redox potential-controlled bacterial leaching of chalcopyrite ores. // Torma, A.E., Wey, J.E., Lakshmanan, V.I. (Eds.),

- Biohydrometallurgical Technologies, Bioleaching Processes. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, PA. 1993. – Vol. 1. – P. 571 – 578.
23. Akcil A, Ciftci H, Deveci H. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Miner. Eng.* – 2007. – Vol. 20. – P. 310 – 318.
 24. Alexander B., Leach S., Ingledew W.J. The relationship between chemiosmotic parameters and 10 sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. // *J. Gen. Microbiol.* - 1987. – Vol. 133. – 1171 -1179.
 25. An Y.H., Freidman R.J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces // *J. Biomed. Material Research.* – 1998. – Vol. 43. – P. 338 – 348.
 26. Astudillo C., Acevedo F. Adaptation of *Sulfolobus metallicus* to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate. // *Hydrometallurgy.* – 2008. – Vol. 92. – P. 11 – 15.
 27. van Aswegen P.C., van Niekerk J., Olivier W. The BIOX™ process for the treatment of refractory gold concentrates. //D.E. Rawlings and D.B. Johnson, (Eds.), *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007. – P.1–33.
 28. van Aswegen P.C., Godfrey M.W., Miller D.M., Haines A.K. Developments and innovations in bacterial oxidation of refractory ores. // *Miner. Metall. Process.* – 1991.- P.188. – 191.
 29. Bacelar-Nicolau P., Johnson D.B. Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. –Vol. 65. – № 2. – P. 585 – 590.
 30. Backer K. Detachment studies on microfouling in natural biofilms on substrata with different surface tensions // *Int. Biodeter. Biodegr.* – 1998. – Vol. 41. – P. 93 – 100.
 31. Baker B.J., Banfield J.F. Microbial communities in acid mine drainage. // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2003. – Vol. 44. – P. 139 – 152.
 32. Barron J.L., Lueking D.R. Growth and Maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* Cells. // *Appl. Environ. Microbiology.* – 1990. – Vol. 56. – P. 2801 – 2806.
 33. Battaglia-Brunet F., Clarens M., d'Hugues P., Godon J.J., Foucher S., Morin D. Monitoring of a pyrite-oxidizing bacterial population using DNA single strand conformation polymorphism and microscopic techniques. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 60. – P. 206 – 211.

34. Benner S.G., Gould W.D., Blowes D.W. Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. // Chem. Geol. – 2000. – Vol. 169. – P. 435 – 448.
35. Bevilaqua D., Lahti-Tommila H., Garcia O.Jr., Puhakka J.A., Tuovinen O.H. Bacterial and chemical leaching of chalcopyrite concentrates as affected by the redox potential and ferric / ferrous iron ratio at 22° C. // Int. J. Mineral Processing. – 2014. – Vol. 132. – P. 1 – 7.
36. Boon M., Ras C., Heijnen J.J. The ferrous iron oxidation kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* in batch cultures // Appl. Microbiol. Biotech. – 1999. – Vol. 51. – P. 813 – 819.
37. Bond P.L., Druschel G.K., Banfield J.F. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems // Appl. Environ. Microbiology. – 2000. – Vol. – 66. – P. 4962 – 4972.
38. Borchowski K.M. Keto acids as growth-limiting factors in autotrophic growth of *Thiobacillus thiooxidans* // J. Bacteriol. – 1967. – Vol. 93. – P. 597 – 599.
39. Brierley J. A. Expanding role of microbiology in metallurgical processes // Miner. Eng. – 2000. – Vol. 52. – P. 49 – 53.
40. Brierley J.A., Brierley C.L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. // Hydrometallurgy. – 2001. – Vol. 59. – P. 233 – 239.
41. Brombacher C., Bachofen R., Brandl H. Biohydrometallurgical processing of solids: a patent review. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – 48. – P. 577 – 587.
42. Bruhn D.F., Thompson D.N., Naoh K.S. // Microbial ecology assessment of a mixed copper oxide/sulfide dump leach operation. In Biohydrometallurgy and the Environment. Toward the Mining of the 21st Century, Process Metallurgy. Edited by R. Amils, A. Ballester. Amsterdam. Elsevier, 1999. – Vol. 9A. – P. 799 – 808.
43. Bryan C., Joulain C., Spolaore P., El Achbouni H., Challan-Belval S., Morin D., d'Hugues P. The efficiency of indigenous and designed consortia in bioleaching stirred tank reactors. // Miner. Eng. – 2011. – Vol. 24. – P. 1149 – 1156.
44. Cameron R.A., Yeung C.W., Greer C.W., Gould W.D., Mortazavi S., Bédard P.L., Morin L., Lortie L., Dinardo O., Kennedy K.J. The bacterial community structure during bioleaching of a low - grade nickel sulphide ore in stirred - tank reactors at different combinations of temperature and pH. // Hydrometallurgy. – 2010. – Vol. 104. – P. 207 – 215.

45. Clark D.A., Norris P.R. *Acidomicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species // Microbiology (UK). – 1996. – Vol. 142. – P. 785 – 790.
46. Coram, N.J., Rawlings, D.E., Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. // Appl. Environ. Microbiology. – 2002. – Vol. 68. № 2. – P. 838 – 845.
47. Córdoba E.M., Muñoz J.A., Blázquez M.L., González F., Ballester A., Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: general aspects. // Hydrometallurgy. – 2008a. – Vol. 93. – P. 81 – 87.
48. Córdoba E.M., Muñoz J.A., Blázquez M.L., González F., Ballester A., Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: effect of redox potential. // Hydrometallurgy. – 2008b. – Vol. 93. – P. 88 – 96.
49. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms // Ann. Rev. Microbiol. – 1995. – Vol. 49. – P. 711 – 745.
50. Das T., Ayyappan S., Chaudhury G. R. Factors Affecting Bioleaching Kinetics of Sulfide Ores Using Acidophilic Microorganisms. // BioMetals. – 1999. - Vol. 12. – № 1. – P. 1 – 10.
51. Demergasso C.S., G aleguillos P.A., Escudero L.V., Zepeda V.J., Castillo D., Casamayor E.O. Molecular characterization of microbial population in a low-grade copper ore bioleaching test heap// Hydrometallurgy. – 2005. – Vol. 80. – P. 241 – 253.
52. Dew D.W., Lawson E.M., Broadhurst J.L. The BIOX process for biooxidation of gold-bearing ores or concentrates. // Rawlings D.E. (ed) Biomining: Theory, microbes and industrial processes. – Springer, Berlin Heidelberg New York; Londer, Berlin, 1997. – P. 45 – 80.
53. Dew D.W., Muehlbauer R. van Buuren C. Bioleaching of copper sulphide concentrates with mesophiles and thermophiles. // Alta Copper 99. – Brisbane, Australia, 1999.
54. Deveci H., Akcil A. and Alp I. Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. // Hydrometallurgy. – 2004. – Vol. 73. – P. 293 – 303.
55. Donati E.R., Sand W., Microbial Processing of Metal Sulphides. Springer, 2007.
56. Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P.R., Bond Ph.L. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. // Microbiology. - 2003. –Vol. 149. – P. 1959 – 1970.

57. Dopson M., Lindstrom E.B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. // Appl. Environ. Microbiology. – 1999. – Vol. 65. № 1. – P. 36 – 40.
58. Dopson M., Lindstrom E.B. Analysis of Community Composition during Moderately Thermophilic Bioleaching of Pyrite, Arsenical Pyrite and Chalcopyrite // Microbial Ecology. – 2004. – Vol. 48. № 1. – P. 19 – 28.
59. Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. // Science. – 2000. – Vol. 279. – P. 1796 – 1799.
60. Edwards K.J., Goebel B.M., Rodgers T.M., Schrenk M.O., Gihring T.M., Cardona M.M., McGuire M.M., Hamers R.J., Pace N.R., Banfield J.F. Geomicrobiology of pyrite (FeS₂) dissolution: case study at Iron Mountain, California. // Geomicrobiol. J. – 1999. – Vol. 16. – P. 155 – 179.
61. Edwards K., Schrenk M., Hamers R., Banfield, J. Microbial oxidation of pyrite: Experiments using microorganisms from an extreme acidic environment // Am. Mineral. – 1998. – Vol. 83. – P. 1444 – 1453.
62. Ehrlich H.L. Past, present and future of biohydrometallurgy. // Amils R, Ballester A (eds.), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, IBS99. Amsterdam, Elsevier, 1999. – P. 3–12.
63. Falco L., Pogliani C., Curutchet G., Donati E. A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. // Hydrometallurgy. – 2003. – Vol. 71. – P. 31 – 36.
64. Fowler T.A., Crundwell F.K. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. // Appl. Environ. Microbiology. – 1999. – Vol. 65. – P. 5285 – 5292.
65. Fu B., Zhou H., Zhang R., Qiu G. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. and *Leptospirillum ferriphilum*. // Intern. Biodet. Biodegradation. – 2008. – Vol. 62. – P. 109 – 115.
66. Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S., Stetter K.O. *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a uranium mine in Germany // Syst. Appl. Microbiol. – 1995. – Vol. 18. – P. 560 – 566.
67. Fuchs T., Huber H., Burggraf S., Stetter K.O. 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order Sulfolobales and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as

- Acidianus ambivalens* comb. nov. Syst // Appl. Microbiol. – 1996. – Vol. 19. – P. 56 – 60.
68. Gahan C.S., Srichandan¹ H., Kim¹ D.-J., Akci A. Biohydrometallurgy and Biomineral Processing Technology: A Review on its Past, Present and Future // Research Journal of Recent Sciences. – 2012. – Vol. 1. № 10. – P. 85 – 99.
 69. Gehrke T., Hallmann R., Kinzler K., Sand W. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* - a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology // Water. Sci. Technol. – 2001. – Vol. 43. – P. 159 – 167.
 70. Gehrke T., Telegdi J., Thierry D., Sand W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – P. 2743 – 2747.
 71. Gericke M., Govender Y., Pinches A., Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. // Hydrometallurgy. – 2010. – Vol. 104. – P. 414 – 419.
 72. Ginsburg M.A., Panev K., Karamanev D. Immobilization and ferrous ion bio-oxidation studies of a *Leptospirillum* sp. Mixed-cell culture // Miner. Eng. – 2009. – Vol. 22. – P. 140 – 148.
 73. Goebel B.M., Stackebrandt E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – P. 1614 – 1621.
 74. Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrateva T.F., Moore E.R., Abraham W.R., Lunsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. – P. 997 – 1006.
 75. Gomez J.M., Cantero D. Modelling of ferrous sulphate oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* in discontinuous culture: influence of temperature, pH and agitation rate // J. Ferment. Bioeng. – 1998. – Vol. 86. – P. 79 – 83.
 76. Gomez J.M., Canter D., Webb C. Immobilization of *T.ferrooxidans* cells on nickel alloy fibre for ferrous sulfate oxidation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 54. – P. 335 – 340.

77. Haghshenas D., Alamdari E.K., Torkmahalleh M.A., Bonakdarpour B., Nasernejad B. Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. // Miner. Eng. – 2009. – Vol. 22. – P. 1299 – 1306.
78. Hallberg K.B., Gonzalez-Toril E., Johnson B.D. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments // Extremophiles. – 2010. – Vol. 14. № 1. – P. 9 – 19.
79. Harneit K., Goksel A., Kock D., Klock J-H., Gehrke T., Sand W. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* // Hydrometallurgy. – 2006. – Vol. 83. – P. 245 – 254.
80. Harrison A.P. Jr., Norris P.R. *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: some characteristics and genomic diversity // FEMS Microbiol. Lett. – 1985. – Vol. 33. – P. 99 – 102.
81. Hawkes R.B., Franzmann P.D., Plumb J.J. Moderate thermophiles including “*Ferroplasma cuprexacervatum*” sp. Nov., dominate an industrial scale chalcocite heap bioleaching operation. // Hydrometallurgy. – 2006. – Vol. 83. – P. 229 – 236.
82. Hedrich S., Johnson D.B. *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. // Int. J. Syst. Evol. Microbiology. – 2013. – Vol. 63. – P. 4018 – 4025.
83. Hippe H. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992). // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. – P. 501 – 503.
84. Hiraishi A., Matsuzawa Y., Kanbe T., Wakao N. *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. – P. 1539 – 1546.
85. Hiraishi A., Nagashima K.V., Matsuura K., Shimada K., Takaichi S., Wakao N., Katayama Y. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – Vol. 48. – P. 1389 – 1398.
86. Hiraishi A., Shimada K. Aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria with zinc-bacteriochlorophyll // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 47. – P. 161 – 180.

87. Hiroyoshi N., Hirota M., Hirajima T., Tsunekawa M., Inhibitory effect of ironoxidizing bacteria on ferrous-promoted chalcopyrite leaching. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – Vol. 64. – P. 478 – 483.
88. Hiroyoshi N., Kuroiwa S., Miki H., Tsunekawa M., Hirajima T. Effects of coexisting metal ions on the redox potential dependence of chalcopyrite leaching in sulfuric acid solutions. // *Hydrometallurgy.* – 2007. – Vol. 87. – P. 1 – 10.
89. Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., A model for ferrous-promoted chalcopyrite leaching. // *Hydrometallurgy.* – 2000. – Vol. 57. – P. 31 – 38.
90. Howard D., Crundwell F.K. A Kinetic Study of the Leaching of Chalcopyrite with *Sulfolobus Metallicus*. // *Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century.* Elsevier, 1999. – P. 209 – 217.
91. d'Hugues P., Foucher S., Galle-Cavalloni P., Morin D. Continuous bioleaching of chalcopyrite using a novel extremely thermophilic mixed culture. // *Int. J. Miner. Process.* – 2002. – Vol. 66. – P. 107 – 119.
92. d'Hugues P., Jouliau C., Spolaore P., Morin D.H., Bryan C.G., Challan-Belval S., El Achbouni H. Adaptation and evolution of microbial consortia in a stirred tank reactor bioleaching system: indigenous population versus a defined consortium. // *Adv. Mater. Res.* – 2009. – Vol. 71. – P. 79 – 82.
93. Huber G., Spinnler C., Gambacorta A., Stetter K.O. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1989. – Vol. 12. – P. 38 – 47.
94. Johnson D.B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1998. – Vol. 27. – P. 307 – 317.
95. Johnson D.B. Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. // *Hydrometallurgy.* – 2001. – Vol. 59. – P. 147 – 157.
96. Johnson D.B. Biomining - biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. // *Current opinion in biotechnology.* – 2014. – Vol. 30. – P. 24 – 31.
97. Johnson D.B., Bacelar-Nicolau P., Okibe N., Thomas A., Hallberg K.B. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59. – P. 1082 – 1089.

98. Johnson D.B., Ghauri M.A., Said M.F. Isolation and characterization of an acidophilic, heterotrophic bacterium capable of oxidizing ferrous iron. // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58. – P. 1423 – 1428.
99. Johnson D.B., Hallberg K.B. The microbiology of acidic mine waters. // Res. Microbiol. – 2003. – Vol. 154. – P. 466 – 473.
100. Johnson D.B., Okibe N., Hallberg K.B. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. // Journal Microbiol. Methods. – 2005. – Vol. 60. № 3. – P. 299 – 313.
101. Johnson D.B., Okibe N., Wakeman K., Yajie L. Effect of temperature on the bioleaching of chalcopyrite concentrates containing different concentrations of silver. // Hydrometallurgy. – 2008. – Vol. 94. – P. 42 – 47.
102. Johnson D.B., Roberto F.F. Biodiversity of acidophilic bacteria in mineral leaching and related environments. // Proc. IBS Biomine' 97 Conf., Australian Mineral Foundation, Glenside, Australia, 1997a. Part 3. – P. 1 – 10.
103. Johnson D.B., Roberto F.F. Heterotrophic acidophiles and their roles in the bioleaching of sulfide minerals. // D.E. Rawlings (ed.), Biomining: theory microbes and industrial processes, Berlin, Springer Verlag. 1997b. – P. 259 – 279.
104. Kelly D.P., Wood A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov., and *Thermithiobacillus* gen. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. – P. 511 – 516.
105. Kelly D.P., Wood A.P. Genus I. *Acidothiobacillus* // Bergey's Manual of Syst. Bacteriol. 2nd ed. // Brenner D.J., Krieg N.R., Staley .R. (Eds.) - New York: Springer, 2005. – Vol. 2. Part B. – P. 60 – 62.
106. Kock D., Schippers A. Quantitative microbial community analysis of three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – P. 5211 – 5219.
107. Kondratyeva T.F., Muntyan L.N., Karavaiko G.I. Zinc and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. // Microbiology. – 1995. – Vol. 141. – P. 1157 – 1162.
108. Kurosawa N., Itoh Y.H., Iwai T., Sugai A., Uda I., Kimura N., Horiuchi T., Itoh T. *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic

- acidophile of the order *Sulfolobales*. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – Vol. – 48. – P. 451 – 456.
109. Li B., Logan B.E. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. // Colloids and surfaces. B: Biointerfaces. – 2004. – Vol. 36. – P. 81 – 90.
 110. Mackintosh M.E., Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. // J. Gen. Microbiology. – 1978. – Vol. 105. – P. 215 – 218.
 111. Magnani D., Solioz M. How bacteria handle copper. // Nies DH, Silver S (eds) Bacterial transition metal homeostasis. // Springer, Heidelberg, 2007. – P. 259 – 285.
 112. Manning H.L. New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acid mine drainage. // Appl. Microbiol. – 1975. – Vol. 30. № 6. – P. 1010.
 113. Mejia E., Ospina J., Marquez M., Morales A. Oxidation of chalcopryrite (CuFeS₂) by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* like bacterium in shake flasks. // Adv. Mater. Res. – 2009. – Vol. 71. – P. 385 – 388.
 114. Meyer G., Schneider-Merck T., Böhme S., Sand W. A simple method for investigations on the chemotaxis of *A. ferrooxidans* and *D. vulgaris*. // Acta Biotechnol. – 2002. – Vol. 22. – P. 391 – 399.
 115. Mikkelsen D., Kappler U., McEwan A.G., Sly L.I. Archaeal diversity in two thermophilic chalcopryrite bioleaching reactors. // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – P. 2050 – 2055.
 116. Navarro C.A., Orellana L.H., Mauriaca C., Jerez C.A. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 6102 – 6109.
 117. Nemat M., Webb C. Does immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* really decrease the effect of temperature on its activity? // Biotech. Letters. – 1997. – Vol. 19. № 1. – P. 39 – 43.
 118. Nikolov L.N., Karamanev D.G. Kinetics of the Ferrous Iron Oxidation by Resuspended Cells of *Thiobacillus ferrooxidans* // Biotechnol. Prog. – 1992. – Vol. 8. № 3. – P. 252 – 255.
 119. Norris P.R., Burton N.P., Foulis N.A.M. Acidophiles in bioreactor mineral processing // Extremophiles. – 2000. – Vol. 4. № 2. – P. 71 – 76.

120. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. // Microbiology. – 1996. – Vol. 142. – P. 775 – 783.
121. Ohmura N., Kitamura K., Saiki H. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59. – P. 4044 – 4050.
122. Okamoto H., Nakayama R., Kuroiwa S., Hiroyoshi N., Tsunekawa M. Normalized redox potential used to assess chalcopyrite column leaching. // Journal of MMIJ. – 2005. – Vol. 121. – P. 246 – 254.
123. Okibe N., Gericke M., Hallberg K.B., Johnson D.B., Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. // Appl. Environ. Microbiology. – 2003. – Vol. 69. № 4. – P. 1936 – 1943.
124. Okibe N., Johnson D. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions. // Biotechnol. Bioeng. – 2004. – Vol. 87. – P. 574 – 583.
125. Olson G.J., Brierley J.A., Brierley C.L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 63. – P. 249 – 257.
126. Orell A., Navarro C.A, Arancibia R., Mobarec J.C, Jerez C.A. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. // Biotechnol. Adv. – 2010. – Vol. 28. – P. 839 – 848.
127. Orellana L.H., Jerez C.A. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. // Appl Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 92. – P. 761 – 767.
128. Outten F.W., Huffman D.L., Hale J.A., Ó Halloran T.V. The independent cue and cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. // J. Biol. Chem. - 2001. - Vol. 276. - P. 30670 - 30677.
129. Pani C.K., Swain S., Kar R.N., Chaudhury G.R., Sukla L.B. and Misra V.N., Bio-dissolution of zinc sulfide concentrate in 160 l 4- stage continuous bioreactor. // Miner. Eng. – 2003. – Vol. 16. – P. 1019 – 1021.
130. Petersen J., Dixon D.G. Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. // Hydrometallurgy. – 2006. – Vol. 83. – P. 40 – 49.
131. Puig S., Thiele D.J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. // Current Opinion in Chemical Biology. – 2002. – Vol. 6 № 2. – P. 171 – 180.

132. Rawlings D.E. Heavy Metal Mining Using Microbes. // Ann. Rev. Microbiol. – 2002. – Vol. 56. – P. 65 – 91.
133. Rawlings D.E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfuroxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. // Microb. Cell Fact. – 2005. – Vol. 4. – P. 13.
134. Rawlings D.E., Coram N.J., Gardner M.N., Deane S.M. *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous-flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal-containing ores and concentrates // Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century, Part A. Amsterdam: Elsevier, 1999. – P. 773 – 778.
135. Rawlings D.E., Dew D., du Plessis C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. // Trend. Biotechnol. – 2003. – Vol. 21. – P. 38 – 44.
136. Rawlings D.E., Johnson D.B. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. // Microbiology. – 2007. – Vol. 153. – P. 315 – 324.
137. Rawlings D.E., Tributsch H., Hansford G.S. Reasons why ‘*Leptospirillum*’-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores // Microbiology. – 1999. – Vol. 145. – P. 5 – 13.
138. Rensing C., Grass G. Escherichia coli mechanism of copper homeostasis in a changing environment. // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 27. – P. 197 – 213.
139. Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 63. – P. 239 – 248.
140. Rodríguez Y., Ballester A., Blázquez M.L., González F. and Muñoz J.A. New information on the sphalerite bioleaching mechanism at low and high temperature. // Hydrometallurgy. – 2003a. – Vol. 71. – P. 57 – 66.
141. Rodríguez Y., Ballester A., Blázquez M.L., González F., Muñoz J.A. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature // Hydrometallurgy. – 2003b. – Vol. 71. – P. 47 – 56.
142. Sampson M. I., Phillips C. V., Blake II R. C. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. // Miner. Eng. – 2000. – Vol. 13. – P. 373 – 389.

143. Sand W., Florian B. M., Noël N. Mechanisms of Bioleaching and the Visualization of these by Combined AFM & EFM. // Adv. Mater. Res. – 2009. -Vol. 71-73. -P. 297-302.
144. Sand W., Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria // Res. Microbiol. – 2006. – Vol. 157. – P. 49 – 56.
145. Sand W., Gehrke T., Jozsa P.G., Schippers A. Biochemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching // Hydrometallurgy. – 2001. – Vol. 59. – P. 159 – 175.
146. Sand W., Gehrke T., Hellmann R., Schippers A. Sulfur chemistry, biofilm and the indirect attack mechanism a critical evaluation of bacterial leaching // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 43. – P. 961 – 966.
147. Sand W., Rohde K., Sobotke B., Zenneck C. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. // Appl. Environ. Microbiology. – 1992. – Vol. 58. № 1. – P. 85 – 92.
148. Sanhueza A., Ferrer I.J., Vargas T., Amils R., Jerez C. Attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite of varying structural and electronic properties // Hydrometallurgy. – 1999. – Vol. 51. – P. 115 – 129.
149. Sandström A., Shchukarev A., Paul J. XPS Characterisation of Chalcopyrite Chemically and BioLeached at High and Low Redox Potential. // Miner. Eng. – 2005. – Vol. 18. № 5. – P. 505 – 515.
150. Schippers A. Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediments and soils. // Amend, J.P., Edwards, K.J., Lyons, T.W. (Eds.) Sulfur Biogeochemistry — Past and Present.: Special Paper, 379. Geological Society of America, Boulder, Colorado, USA, 2004. – P. 49 – 62.
151. Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. // Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), Microbial Processing of Metal Sulfides. Springer, 2007. – P. 3 – 33.
152. Schippers A., Breuker A., Blazejak A., Bosecker K., Kock D., Wright T.L. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria // Hydrometallurgy. – 2010. – Vol. 104. – P. 342 – 350.
153. Schippers A., Hallmann R., Wentzien S., Sand W. Microbial diversity in uranium mine waste heaps. // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 2930 – 2935.

154. Schippers A., Sand W. Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms with Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol.65. № 1. – P. 319 – 321.
155. Shi S., Fang Z., Ni J. Bioleaching of marmatite flotation concentrate with a moderately thermoacidophilic iron-oxidizing bacterial strain. // *Miner. Eng.* – 2005. – Vol. 18. – P. 1127 – 1129.
156. Simmons S.L., DiBartolo G., Denef V.J., Goltsman D.S.A., Thelen M.P., Banfield J.F. Population genomic analysis of strain variation in *Leptospirillum* group II bacteria involved in acid mine drainage formation. // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6. № 7. – P.1427 – 1442.
157. Steudel R. Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 1996. – Vol. 35. – P. 1417 – 1423.
158. Stepanyan S., Vardanyan N.S. Biooxidation of pyrite by sulfur and / or iron oxidizing bacteria and their communities. // “Trends in microbiology and microbial biotechnology” Intern Scientific Workshop, October 5-8, Yerevan, Armenia, 2014, p. 92.
159. Stott M.B., Walting H.R., Fransmann P.D., Sutton D. The role of iron-hydroxy precipitates in the passivation of chalcopyrite during bioleaching // *Miner. Eng.* – 2000. – Vol. 13. – P. 1117 – 1127.
160. Sutherland I.W. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment // *Trends Microbiol.* – 2001. – Vol. 9. – P. 222 – 227.
161. Suzuki I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. // *Biotechnology Advances.* – 2001. – Vol. 19. – P. 119 – 132.
162. Temple K.L., Colmer A.R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*. // *J. Bacteriol.* – 1951. – Vol. 62. – P. 605 – 611.
163. Third K.A., Cord-Ruwisch R., Watling H. The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. // *Hydrometallurgy.* – 2000. – Vol. 57. – P. 225 – 233.
164. Third K.A., Cord-Ruwisch R., Watling H. Control of the redox potential by oxygen limitation improves bacterial leaching of chalcopyrite. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2002. – Vol. 78. – P. 433 – 441.
165. Trevors J.T., Oddie K.M., Belliveau B.H. Metal resistance in bacteria. // *FEMS Microbiol Rev.* – 1985. – Vol. 32. – P. 39 – 54.

166. Tributsch H. Direct versus indirect bioleaching. // Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99, Amsterdam, Elsevier, 1999. – P. 51– 60.
167. Tuffin I.M, Hector S.B., Deane S.M., Rawlings D.E. Resistance determinants of highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial Biooxidation Tank. // Appl. Environ. Microbiology. – 2006. – Vol. 72. № 3. – P. 2247 – 2253.
168. Vardanyan N., Akopyan V. *Leptospirillum*-like bacteria and evaluation of their role in pyrite oxidation. // Microbiology. – 2003. – Vol. 72. № 4. – P. 438 – 442.
169. Vardanyan A., Stepanyan S., Vardanyan N., Markosyan L., Sand W., Vera M., Zhang R. Study and assessment of microbial communities in natural and commercial bioleaching systems. // Miner. Eng. – 2015. – Vol. 81. – P. 167 – 172.
170. Vardanyan N.S., Vardanyan A.K. New Sulphur Oxidizing Bacteria Isolated from Bioleaching Pulp of Zinc and Copper Concentrates // Universal Journal of Microbiology Research. – 2014. – Vol. 2. – P. 27 – 31.
171. Watling H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphids – a review. // Hydrometallurgy. – 2006. – Vol. 84. – P. 81 – 108.
172. Watling H.R., Collinson D.M., Shiers D.W., Bryan C.G., Watkin E.L.J. Effects of pH, temperature and solids loading on microbial community structure during batch culture on a polymetallic ore. // Miner. Eng. – 2013. – Vol. 48. – P. 68 – 76.
173. Wang Y., Zeng W., Qiu G., Chen X., Zhou H. A moderately Thermophilic Mixed Microbial Culture for Bioleaching of chalcopyrite at high pulp density. //Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – Vol. 80. № 2. – P. 741 – 750.
174. Wood T.A., Murray K.R., Burges J.G. Ferrous sulfate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilized on sand for purpose of treating acid mine drainage //Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 56. – P. 560 – 565.
175. Yu. R.L., Tan J.X, Yang P., Sun J., Ouyang X.J., Dai Y.J. EPS-contact-leaching mechanism of chalcopyrite concentrates by *A. ferrooxidans* // Trans. Nonferrous Met. Soc. China. – 2008. – Vol. 18. № 6. – P. 1427 – 1432.
176. Yu R-l, Zhong D-l, Miao L., Wu F.-d, Qiu G.-zh., Gu G.-h. Relationship and effect of redox potential, jarosites and extracellular polymeric substances in bioleaching chalcopyrite by acidithiobacillus ferrooxidans. // Trans. Nonferrous Met.Soc. China. – 2011. – Vol. 21. – P. 1634 – 1640.
177. Zhang R., Wei M., Ji H., Chen X., Qiu G., Zhou H. Application of real-time PCR to monitor population dynamics of defined mixed cultures of moderate thermophiles

- involved in bioleaching of chalcopyrite. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 81. – P. 1161 – 1168.
178. Zhang R., Xia J., Peng J., Zhang Q., Zhang Ch., Nie Zh., Qiu G. A new strain *Leptospirillum ferriphilum* YTW315 for bioleaching of metal sulfides ores // Trans.Nonferrous Met. Soc. China. – 2010. – Vol. 20. – P. 135 – 141.
179. Zhong-Er L., Huang Y., Cai Z., Cong W., Ouyang F. Kinetics of continuous ferrous ion oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* immobilized in poly (vinyl alcohol) cryogel carries // Hydrometallurgy. – 2004. – Vol. 74. – P. 181 – 187.
180. Zhou H.B., Zeng W.M., Yang Z.F., Xie Y.J., Qiu G.Z. Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor. // Bioresour. Technol. – 2009. – Vol. 100. – P. 515 – 520.
181. Zhou H., Zhang R., Hu P., Zeng W., Xie Y., Wu C., Qiu G. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite. // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105. – P. 591 – 601.