

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

БЕЛЫХ МАРИНА ПЕТРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ
В ДЕТОКСИКАЦИИ ЦИАНИДСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ КУЧНОГО
ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩИХ РУД**

Специальность 03.02.08 – экология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук,
профессор Чикин А.Ю.

Научный консультант:
кандидат биологических наук,
доцент Белькова Н.Л.

Иркутск, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Экологические аспекты кучного выщелачивания золота.....	12
1.2 Основные методы обезвреживания цианидсодержащих отходов КВ.....	16
1.2.1 Химические и физические методы обезвреживания цианидсодержащих отходов.....	17
1.2.2 Использование микроорганизмов для детоксикации цианидсодержащих отходов.....	20
1.2.3 Пассивные методы обезвреживания цианидсодержащих отходов.....	32
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Геолого-географическая характеристика объектов исследования.....	39
2.2 Модельный эксперимент по детоксикации отходов КВ золота.....	44
2.3 Молекулярно-генетические методы.....	47
2.3.1 Выделение геномной ДНК.....	47
2.3.2 Полимеразная цепная реакция.....	48
2.3.3 Молекулярное клонирование ампликонов.....	50
2.3.4 Секвенирование по Сэнгеру.....	50
2.3.5 Метагеномное секвенирование ампликонов.....	51
2.4 Биоинформационная обработка молекулярных данных.....	51
2.5 Статистический анализ.....	53
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1 Исследование роли автохтонных бактериальных сообществ в пассивной детоксикации отходов КВ золота.....	54
3.1.1 Химический и минеральный состав технологических проб исследуемых месторождений.....	54
3.1.2 Детоксикация отходов КВ золота на примере месторождения «Подголецное».....	62

3.1.3 Изменение разнообразия бактериального сообщества при детоксикации складированных отходов КВ	76
3.1.4 Выявление бактерий, выступающих маркерами процессов деструкции цианидсодержащих соединений в складированных отходах КВ золота	94
3.2 Влияние экологических факторов на разнообразие автохтонных бактериальных сообществ природно-техногенных комплексов КВ золота	99
3.2.1 Разнообразие доминирующих представителей автохтонных бактериальных сообществ в природно-техногенных комплексах КВ	100
3.2.2 Влияние разнофазности природно-техногенных комплексов КВ на состав представителей бактериального сообщества	105
3.3 Разработка технологии биодетоксикации отходов КВ золота на примере месторождения «Подголецное»	109
3.3.1 Основные положения разрабатываемой технологии	109
3.3.2 Основные технологические параметры биодетоксикации отходов КВ золота на месторождении «Подголецное»	117
3.3.3 Оценка экономической эффективности разработанной технологии биодетоксикации отходов КВ	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЕ А	150
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ В	152
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	156
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	163

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АТР	Аденозинтрифосфат (adenosine triphosphate)
ДГГЭ	Денатурирующий градиентный гель-электрофорез
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	Дезоксинуклеотид трифосфаты
КВ	Кучное выщелачивание
КОЕ	Колониеобразующая единица
НДС	Нормативно допустимые сбросы
НК	Нуклеиновая кислота
ОТЕ	Операционная таксономическая единица
ПДК	Предельно допустимые концентрации
П.н.	Пара нуклеотидов
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
рРНК	Рибосомная рибонуклеиновая кислота
ТАЕ буфер	Трис-ацетатный буфер
ТЕ буфер	Буфер трис-ЭДТА
ЦРД	Цианидрезистентное дыхание
ЭДТА	Этилендиаминтетраацетат
ASTER	Activated Sludge Tailings Effluent Remediation
ENA	База данных EMBL EBI (European Nucleotide Archive)
HMC	Homestake Mining Company
NSY	Коммерческая среда: <u>N</u> utrient broth, <u>S</u> oya peptone, <u>Y</u> east extract
LB	Коммерческая среда Luna-Bertam
PBR	Реактор с уплотненным слоем (Packed Bed Reactors)
RBCs	Роторный аэробный биореактор (Rotating biological contactor)
SAD	Диссоциирующие только в сильных кислотах комплексные цианидные соединения кобальта, золота, железа и серебра (Strong Acid Dissociable)
SRA	База данных NCBI (Sequence Read Archives)
Taq ДНК-полимераза	Термофильная ДНК-полимераза из <i>Thermus aquaticus</i>
WAD	Диссоциирующие в слабокислой среде комплексные цианидные соединения цинка, кадмия, никеля и меди (Weak Acid Dissociable)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В технологическом процессе кучного выщелачивания (КВ) золота, реализуемом на открытых площадках промышленных объектов, образуются потенциально опасные цианидсодержащие отходы – отработанный рудный штабель и технологический раствор [1]. Они выступают как негативные факторы воздействия природно-техногенных комплексов на воздух, почву, поверхностные, подземные воды [2] и создают большую опасность для экосистемы в целом и для здоровья человека, в частности. Отработанный технологический раствор обезвреживается и сбрасывается в окружающую среду с учетом норм Нормативно допустимых сбросов (НДС), а рудный штабель промывается обратными растворами или водой и подвергается рекультивации.

На сегодняшний день в России мероприятия по детоксикации отходов КВ преимущественно основаны на химических методах, которые являются эффективными, но не исключают повторного загрязнения окружающей среды используемыми реагентами, а также требуют больших капитальных и эксплуатационных затрат. За рубежом большое внимание исследователей направлено на изоляцию активных бактериальных штаммов-деструкторов и использование их в биодетоксикации цианидсодержащих отходов. Применение подобных мероприятий для обезвреживания отходов КВ, расположенных на территории РФ, сталкивается с проблемами поддержания активности изолированных штаммов при резких сезонных колебаниях температур и преодоления ограниченности бактериальных штаммов в деструкции высоких концентраций цианидов.

Для решения экологических задач детоксикации отходов КВ золота, продолжительность обезвреживания которых не является лимитирующей, особый интерес представляют технологии пассивного обезвреживания (*passive treatment technologies*) или так называемые «системы пассивного обезвреживания» («*passive treatment systems*»). Они основаны на самопроизвольном разложении цианидов под действием природных факторов, включая деятельность всего автохтонного бактериального сообщества. Внедрение такой безреагентной технологий

биодетоксикации отработанных установок КВ позволит снизить экологическую нагрузку на районы размещения промышленных объектов и достичь значимого экономического эффекта.

Изучению вопросов биологической детоксикации, в том числе пассивного обезвреживания цианидсодержащих отходов посвящено большое количество работ, таких зарубежных ученых как: T. Mudder, A. Smith, C.A. Young, M. Botz, L. Simovic, S.A. Ndur, J. Declercq, N. Dwivedi, R. Alvarez, N. Gupta, D.A. Kunz, R. Harris, C.J. Knowles, A. Akcil, J. Baxter, M.M. Figueira, M.N. Maniyam, V. Kumar, V.M. Luque-Almagro, P.L. Younger, L. Mekuto, K.D. Chapatwala, R. Cipollone, K.I. Karamba, R. Huddy, S. Zyl, S.T.L. Harrison, M. Cornejo и др. Данными авторами изолированы и идентифицированы бактериальные штаммы, обладающие биотехнологическим потенциалом к деструкции цианидов и их производных; изучены ферментативные пути биодеструкции цианидов и тиоцианатов, а так же рассмотрены основные принципы пассивного обезвреживания отходов горнодобывающей промышленности и разработаны полупассивные системы обезвреживания (semi-passive systems) – ASTER, Homestake и Biopass, основанные на введении дополнительных источников энергии для активации представителей автохтонного сообщества.

Несмотря на большое количество работ иностранных ученых они преимущественно направлены на детоксикацию высоких концентраций тиоцианатов и мало применимы к деструкции высоких концентраций цианидов. В нашей стране работы по биообезвреживанию цианидсодержащих отходов немногочисленны и представлены в работах Г.И. Каравайко, Д.Ю. Сорокина, Г.В. Седельниковой, Н.В. Григорьевой, А.В. Белого, С.С. Тимофеевой и Н.Ю. Антониновой. Относительно недавно исследовательским центром ОАО «Полус Золото» (Красноярск) был предложен подход, который является аналогом технологии ASTER. Он позволяет обезвреживать высокие концентрации тиоцианатов (с 1800 до 0.02 мг/дм³) в жидких пульпах после биовыщелачивания золота и имеет ограничения в деструкции высоких концентраций цианидов (до 20–30 мг/дм³). Для стимуляции биотехнологической активности консорциума

микроорганизмов, осуществляющих детоксикацию, применяют дополнительные источники углерода, азота и фосфора. С.В. Петровым разработана технология (пассивного) обезвреживания отходов КВ золота под действием природных факторов. Однако роль автохтонного бактериального сообщества в данном процессе не изучена.

Цель исследования. изучить разнообразие, состав, структуру и функциональную роль автохтонных бактериальных сообществ в детоксикации цианидсодержащих отходов кучного выщелачивания золотосодержащих руд.

Для успешной реализации цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Исследовать основные закономерности пассивной детоксикации в условиях зонирования рудного штабеля КВ и определить роли биотического фактора в данном процессе.

2. Определить структуру и разнообразие бактериальных сообществ, развивающихся в естественных и модельных условиях рудного штабеля КВ.

3. Выявить основные функциональные группы бактерий, выступающих маркерами процесса деструкции цианидсодержащих соединений в отходах КВ, и определить влияние на их развитие таких экологических факторов как территориальное расположение месторождений, минерального и химического состава их руд, а также разнофазности объектов КВ.

4. Разработать технологию биодетоксикации отходов КВ золота с учетом региональных экологических условий и оценить ее экономическую эффективность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Автохтонные бактериальные консорциумы играют значительную роль в процессе пассивной детоксикации рудного штабеля КВ золота.

2. В условиях зонирования рудного штабеля КВ бактериальные сообщества имеют невысокое разнообразие. Доминирующие представители (род *Achromobacter* и род *Serratia*) адаптированы к широким диапазонам температур и могут выступать маркерами процессов деструкции цианидсодержащих соединений в отходах КВ золота.

3. Автохтонные бактериальные сообщества отходов КВ месторождений, расположенных на территории РФ, имеют большое сходство. Минеральный и химический состав руд не оказывает влияние на состав основных функциональных групп бактерий, осуществляющих детоксикацию цианидсодержащих соединений.

Научная новизна. Установлены основные закономерности протекания биодетоксикации токсичных соединений в основных слоях рудного штабеля КВ при сезонных вариациях температур (+20°C, +4°C и -18°C), в аэробных и анаэробных условиях. Подтверждено преимущественное влияние биотического фактора на интенсивность деструкции цианидов, включая цианидные комплексы меди и никеля, и тиоцианатов в штабеле КВ по сравнению с химическим окислением. С использованием молекулярно-генетических методов в единых методических условиях получены наиболее полные данные о структуре и разнообразии бактериальных сообществ, развивающихся *in situ* в естественных и модельных условиях штабеля КВ. С помощью непараметрического многомерного статистического анализа показано влияние экологических факторов (температуры и аэрации), а также степени утилизации токсичных соединений на изменение разнообразия, состава и структуры бактериальных консорциумов. Дополнены и расширены сведения об основных участниках деструкции цианидсодержащих соединений в отходах золотодобывающей промышленности, в том числе расположенных на территории РФ. Впервые проведено комплексное изучение доминирующих представителей автохтонных бактериальных сообществ различных месторождений, направленное на выявление особенностей развития основных функциональных групп бактерий, выступающих маркерами процессов деструкции цианидсодержащих соединений в отходах КВ. Определено влияние экологических факторов, таких, как территориальное расположение месторождения, минерального и химического состава его руд, а также разнофазности его природно-техногенных комплексов на состав и структуру микробиомов.

Практическая значимость полученных результатов. Установлены основные закономерности биодетоксикации цианидов, включая цианидные комплексы меди и никеля, и тиоцианатов в различных условиях зонирования

штабеля КВ. Рассчитаны аппроксимирующие уравнения и вычислены константы скорости биодegradации основных токсичных соединений при различных температурах и условиях аэрации, позволяющие прогнозировать продолжительность детоксикации реальных отходов КВ месторождения «Подгольное». Оптимизированы условия проведения молекулярно-генетических исследований на технологических растворах и рудной массе КВ золота. Выявлены основные функциональные группы бактерий, выступающие маркерами процессов деструкции цианидсодержащих соединений в рудном штабеле КВ. Проведено комплексное изучение доминирующих представителей бактериальных сообществ, развивающихся *in situ* в объектах КВ четырех различных месторождений. Определено влияние экологических факторов на состав и структуру микробиомов. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по геоэкологии, биотехнологии и молекулярной экологии, а также для инженерных расчетов технологии обезвреживания отходов КВ.

Реализация и внедрение результатов исследования. По результатам исследований для промышленного комплекса КВ разработана эффективная безреагентная технология биодетоксикации отходов КВ золота, которая позволяет существенно снизить экологическую нагрузку на район размещения предприятия, а также уменьшить эксплуатационные и капитальные затраты на проведение природоохранных мероприятий. Аппаратурная и технологическая схемы разработанной технологии рекомендованы в дополнение к технологическому регламенту о НИР «Разработка технологического регламента по извлечению золота из руд месторождения «Подгольное» методом КВ» Договор № 380/7-11.

Работа выполнена в рамках НИР АО «Иргиредмет» по теме «Исследование биохимической деструкции токсичных соединений в цианидсодержащих отходах кучного выщелачивания золота» Договор № 112 от 20.11.2012 (2012–2016 гг.).

Степень обоснованности и достоверности результатов исследования. Достоверность полученных результатов обеспечивается достаточной сходимостью результатов теоретических и экспериментальных исследований, а также применением комплекса современных физико-химических и молекулярно-

генетических методов, аттестованных методик и сертифицированного оборудования. При анализе данных использовали метод главных компонент (PCA) и непараметрический многомерный статистический анализ дисперсии (PERMANOVA, Bray-Curtis), онлайн сервисы FASTA, BLAST и пакеты программ Mothur 1.31.1, Mega v. 6.06, BioEdit, Pyrosequencing pipeline. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в базах данных EMBL EBI (European Nucleotide Archive (ENA)) и NCBI (Sequence Read Archives (SRA)). Объем проанализированных последовательностей превышал 150 тыс.

Апробация полученных результатов. Материалы диссертации были представлены на VI, VII Всероссийском с международным участием конгрессе «Симбиоз–России 2013, 2014» (Иркутск, 2013; Екатеринбург, 2014); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (Иркутск, 2013); IV Региональной научно-практической конференции «Экологические проблемы Байкальского региона» (Улан-Удэ, 2014); VIII Московском Международном Конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); Международном совещании «Современные процессы комплексной и глубокой переработки труднообогатительного минерального сырья (Плаксинские чтения 2015)» (Иркутск, 2015); The 21st, 22nd International Biohydrometallurgy Symposium (IBS 2015, 2017) (Indonesia, Bali, 2015; Germany, Freiberg, 2017); Международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (Москва, 2016); Международной конференции «Ресурсосбережение и охрана окружающей среды при обогащении и переработке минерального сырья (Плаксинские чтения 2016)» (Санкт-Петербург, 2016).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в определении цели и задач диссертации, анализе и обобщении имеющейся литературы по теме и обсуждении полученных результатов. Автор участвовал во всех экспедиционных работах, планировании и проведении экспериментальных

исследований. По результатам проведенных работ в соавторстве подготовлены материалы тезисов и статьи в рецензируемых изданиях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 5 статей в рецензируемых российских изданиях, входящих в список ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения. Список литературы включает 166 работ, из которых 118 – на английском языке. Работа иллюстрирована 27 рисунками, 29 таблицами и 5 приложениями.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность д.т.н., профессор Чикину А.Ю. (ФГБОУ ВО «ИГУ»), за руководство научной работой; научному консультанту к.б.н., доценту Бельковой Н.Л. (ЛИН СО РАН) за помощь при проведении молекулярно-генетических исследований, помощь в обсуждении результатов и рукописи; начальнику отдела ООС (АО «Иргиредмет») к.т.н. Петрову В.Ф. и заведующему лабораторией к.т.н. Петрову С.В. за возможность проведения исследований и помощь в обсуждении рукописи; коллективу Группы химического анализа природных и сточных вод отдела ООС за качественное и своевременное выполнение химико-аналитических исследований. Особую благодарность приношу своим родным и близким за моральную поддержку.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Экологические аспекты кучного выщелачивания золота

На сегодняшний день цианистый процесс является основой современной металлургии золота [1, 3]. Одним из методов извлечения золота с использованием цианистого процесса является технология кучного выщелачивания (КВ). Технология КВ имеет ряд преимуществ перед традиционными фабричными методами извлечения благородных металлов. Она позволяет извлекать золото и серебро из небольших рудных месторождений, которые экономически нецелесообразно обрабатывать фабричным методом, имеет низкие капитальные затраты на освоение, быструю окупаемость проектов и относительно малую себестоимость конечного продукта. Данная технология позволяет извлекать золото из бедных и забалансованных руд [3].

Впервые кучное выщелачивание золота цианированием было предложено в 1967 г. Горным Бюро США [1, 4]. Первое промышленное использование КВ было осуществлено компанией «Carlin Gold Mining» (штат Невада, США) в конце шестидесятых годов, а первое крупномасштабное КВ было проведено компанией «Cortez Gold Mine» в начале 1970 г. [1, 4]. В последние четыре десятилетия в сфере золотодобывающей промышленности технология КВ динамично развивается, в том числе и в России (рис. 1.1). К 2011 году доля извлеченного золота методом КВ от валовой добычи в США составила 35–40%, в РФ – 6.6%.

В настоящее время в России одним из новых крупных месторождений с планируемым круглогодичным КВ золота является месторождение «Гросс» Республика Саха (Якутия). В 2016 г. международной золотодобывающей компанией «Nordgold» запущено строительство рудника «Гросс», в 4 км от которого находится действующий рудник КВ ООО «Нерюнгри-Металлик» (входящий в «Nordgold»). По итогам 2014 года ООО «Нерюнгри-Металлик» добывал примерно 2.23 млн. т руды и ожидается, что при выходе на полную мощность будет извлекаться около 6.8 т золота в год в течение 17 лет [5]. Таким образом, на данных предприятиях имеются действующие и вышедшие из эксплуатации рудные штабеля КВ, а также штабеля, которые еще будут

запускаться в эксплуатацию.



Рисунок 1.1. Развитие кучного выщелачивания в золотодобыче России

Технологический процесс КВ проводится при естественных условиях на открытом воздухе в отсутствие фабричных корпусов. Процесс КВ включает в себя: пробоподготовку первичной руды, укладку минерального сырья в рудный штабель, орошение рудного штабеля технологическим раствором цианистого натрия и извлечение золота из циркулирующих растворов в товарную продукцию [1, 6, 7]. В результате работы таких природно-техногенных комплексов КВ образуются отходы – отработанный рудный штабель и технологический раствор (рис. 1.2). Образующиеся отходы содержат в своем составе такие токсичные соединения, как цианиды, тиоцианаты и тяжелые металлы. Данные отходы выступают негативными факторами техногенного воздействия на воздух, почву, поверхностные и подземные воды и требуют особых мероприятий по обезвреживанию и рекультивации для снижения нагрузки на окружающую среду в районе предприятий КВ.

После извлечения золота отработанный технологический раствор повторно используется в процессе КВ в качестве оборотных растворов, в дальнейшем обезвреживается различными методами и сбрасывается в окружающую среду с учетом норм НДС [1, 7]. Рудный штабель промывается водой или оборотными растворами и в дальнейшем подвергается рекультивации [1, 5, 7].



Рисунок 1.2. Схема технологического процесса извлечения золота методом КВ

Основная сложность обезвреживания отходов КВ золота возникает из-за значительных масштабов рудных штабелей на площадке КВ и инерционности всей системы КВ [8]. Любой подход требует большого количества времени и, следовательно, затрат. С другой стороны, длительность процесса обезвреживания позволяет применять методы, отличающиеся низкой скоростью деструкции.

В технологии КВ образуются отходы с высокими концентрациями токсичных соединений, среди которых наибольшую проблему представляют цианиды.

Цианиды в рудном штабеле, технологических растворах и сточных водах находятся в нескольких формах, включая: цианид-ион (CN^-), цианистый водород (синильная кислота – HCN), простые неорганические соли (NaCN и KCN), сложные цианидные комплексы металлов, тиоцианаты и нитрилы [9].

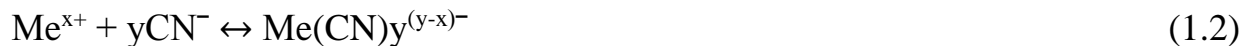
Цианистый водород в растворе образует слабую кислоту, при этом соотношение HCN и CN^- определяется реакцией гидролиза:



Соотношение этих форм цианида напрямую зависит от pH раствора [10]. При pH 9 в растворе преимущественно находится CN^- . При $\text{pH} < 7$ преобладает HCN , которая имеет высокие значения упругости пара и улетучивается в виде газа.

Улетучивание ускоряется с понижением pH, усилением аэрации и увеличением температуры [10].

HCN и CN^- могут вступать в реакцию с различными металлами, образуя устойчивые цианидные комплексы металлов [11] по следующему уравнению:



Таким образом, условно цианиды разделяют на пять групп [10, 12–14]:

1. свободные цианиды – CN^- , HCN (Free);
2. хорошо диссоциирующие в слабокислой среде комплексные цианидные соединения цинка, кадмия, никеля и меди (WAD);
3. диссоциирующие только в сильных кислотах комплексные цианидные соединения кобальта, золота, железа и серебра (SAD);
4. органические цианиды – нитрилы, в которых CN^- связан с органическим радикалами (RCH_2CN);
5. формы цианидов, полученные в результате его деградации или взаимодействия с другими соединениями – цианат (CNO^-), тиоцианат (SCN^-), а также его метаболиты – нитраты (NO_3^{2-}), нитриты (NO^{2-}) и аммиак (NH_3).

Иногда тиоцианаты (SCN^-) относят к WAD-цианидам [12]. Знание химической природы цианидов, содержащихся в рудном штабеле КВ, технологических растворах, оборотных и сточных водах, позволят разработать эффективную технологию их детоксикации.

Токсичность цианидов определяется группой, к которой они относятся. Свободный цианид является чрезвычайно мощным ядом. Цианидные комплексы металлов или нитрилы различаются по токсичности в зависимости от степени выделения свободного цианида по реакции (1.2) этими соединениями [15].

Цианид выступает в качестве метаболического ингибитора дыхания, а также связывается с различными металлическими кофакторами и ферментами, которые используются для осуществления жизненных функций [16]. В процессе дыхания цианид взаимодействует с ионом железа цитохрома-с-оксидазы (цитохром а + а3) и блокирует электрон-транспортную цепь. В результате ингибируется синтез аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях и быстро уменьшается норма дыхания.

Средняя летальная доза для человека (в пересчете на CN^-) составляет от 0.5 до 3.5 мг CN^- /кг веса тела [17, 18]. Вторыми по уровню токсичности являются тиоцианаты, так как в естественных условиях под действием солнечной радиации они могут разрушаться с образованием свободных цианидов.

На сегодняшний день в России установлены экологические нормативы предельно допустимых концентраций (ПДК) на присутствие цианидов и тиоцианатов в природных средах [19–21]. ПДК CN^- и SCN^- в атмосферном воздухе составляют 0.3 и 5.0 мг/м³ соответственно (рабочая зона) и 0.01 мг/м³ и полное его отсутствие соответственно (жилая зона). ПДК CN^- и SCN^- в воде составляют 0.07 и 0.1 мг/м³ соответственно (в водоемах хозяйственно-питьевого назначения) и 0.05 и 0.09 мг/м³ соответственно (в водоемах рыбохозяйственного назначения).

1.2 Основные методы обезвреживания цианидсодержащих отходов КВ

Учитывая, что в технологии КВ кроме отработанного технологического раствора, в качестве отхода образуется рудный штабель, схема детоксикации, как правило состоит из трех этапов. На первой стадии проводят отмывку рудного штабеля оборотными водами или чистой водой. На второй стадии осуществляют обезвреживание оборотных/промывных растворов и сточных вод, содержащих токсичные соединения – цианиды, тиоцианаты и тяжелые металлы. После обезвреживания, на третьем этапе, осуществляется складирование и/или рекультивацию продуктов обезвреживания.

Промывка рудного штабеля исследовалась в ряде работ Mudder и Botz [10, 13]. Авторами было определено, что для успешной отмывки штабеля КВ от токсичных соединений в большинстве случаев необходимо пропустить воду объемом, эквивалентном минимум трем объемам пор [10, 13]. Показано, что рН промывных вод в определенных пределах не оказывает значительного влияния на процесс отмывки [10, 13]. Следует отметить, что выявленные параметры не являются универсальными для всех рудных штабелей из-за различий в крупности и в вещественном составе руд, а также из-за особенностей применяемого метода извлечения золота из технологических растворов [8].

На сегодняшний день в мировой практике для решения экологических проблемы детоксикации цианидсодержащих отходов, в том числе отходов КВ используются химические, физические, биологические и так называемые пассивные (*passive treatment* [11]) методы обезвреживания. В ряде случаев проводится комбинирование этих методов для ускорения и удешевления технологий.

Складирование обезвреженных отходов осуществляют, как правило, по двум вариантам [8]. Первый способ предусматривает оставление рудного штабеля на промышленной площадке с последующей их естественной рекультивацией, второй – подразумевает складирование отходов на специальных хвостохранилищах.

1.2.1 Химические и физические методы обезвреживания цианидсодержащих отходов

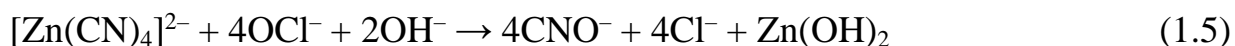
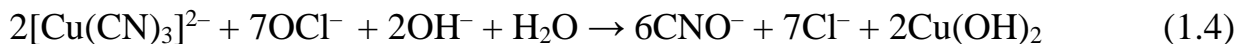
Наиболее применяемыми для детоксикации цианидсодержащих оборотных, промывных и сточных вод выступают *химические и физические методы* [1, 22–24 и др.]. Среди них выделяют: щелочное хлорирование; процесс INCO (окисление смесью диоксида серы (SO₂) и воздуха); окисление перекисью водорода, альдегидами, солями железа; озонирование в присутствии ультрафиолета; кавитация (окисление кислородом); адсорбция на гранулированном активированном углероде; ионный обмен; концентрирование на мембранах; гидролиз при высокой температуре и т. д. Основные из применяемых методов подробно описаны ниже.

Процесс *щелочного хлорирования* на сегодняшний день является традиционным методом, широко применяемым на территории РФ. Наиболее часто при щелочном хлорировании используют реагент – гипохлорит кальция или натрия [8]. Разрушение цианида протекает по следующей реакции:



Для предотвращения выделения токсичного хлорциана (CNCl) в процессе хлорирования pH поддерживают в пределах 11.0–11.5 [12, 22] с помощью

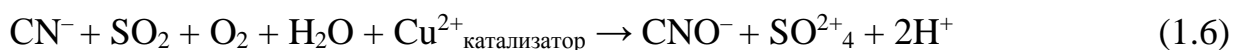
гидроксида натрия (NaOH). В результате щелочного хлорирования также происходит окисление WAD-цианидов, таких, например, как медь и цинк:



Для окисления SAD-цианидов, особенно, цианидных комплексов железа проводят доочистку с различными осадителями [8].

Несмотря на эффективность и высокую скорость обезвреживания с помощью щелочного хлорирования, данный метод имеет свои недостатки. Этот метод требует больших эксплуатационных затрат на реактивы, а также не исключает повторного загрязнения окружающей среды хлоридами. Кроме этого, щелочное хлорирование мало эффективно для деструкции SAD-цианидов [12, 24].

Процесс *INCO* (окисление смесью SO_2 и воздуха) является вторым способом по частоте применения в мировой практике [25]. Он заключается в окислении цианидов сернистым газом (SO_2) или растворенным метабисульфитом натрия в присутствии воздуха и ионов меди, которые выступают в качестве катализатора [22, 26]. Процесс протекает по следующей реакции:

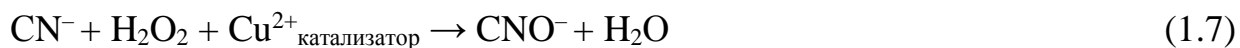


Оптимальный диапазон pH среды 8–10 [27, 28]. В процессе *INCO* образуется серная кислота, поэтому возникает необходимость в регулировании pH среды с помощью добавления извести (CaO) или NaOH [28], что, в свою очередь, приводит к образованию осадков гидроксидов металлов.

С помощью данного метода обезвреживается свободный цианид и WAD-цианиды, исключением являются тиоцианаты. Данный метод так же неэффективен для SAD-цианидов [12, 29]. Основным преимуществом метода *INCO* выступает небольшая стоимость применяемых реагентов. Главными недостатками – невозможность обезвреживания тиоцианатов, а также сложность технологических режимов и, как следствие, значительные капитальные затраты [24]. Из-за этого данный подход не получил широкое распространение в России.

Химический процесс с использованием *перекиси водорода* аналогичен описанному выше методу *INCO*. Вместо SO_2 и воздуха используется перекись

водорода. Процесс так же протекает в присутствии катализатора (Cu^{2+}), конечным продуктом реакции выступает цианат:



Окисление перекисью водорода происходит в широких диапазонах pH [12]. Недостатками этого метода является низкая эффективность при деструкции тиоцианатов и SAD-цианидов [22], а также необходимость использования специализированной тары для перевозки реагента.

Электрохимические и физические методы обезвреживания, такие как: прямое и косвенное анодное окисление, электродиализ (использование ионообменных мембран), озонирование, кавитация (окисление кислородом) и др. [8, 10, 18], имеют преимущества и характеризуются невысокой стоимостью реагентов или вообще их полным отсутствием. Недостатки имеют главным образом конструктивный характер. Данные методы отличает большое разнообразие применяемых аппаратурных схем, технологических параметров и условий, но они требуют большого расхода электроэнергии, что не всегда осуществимо из-за удаленности промышленных объектов от энергосетей и тем самым широкого их применения на практике.

Хотя химические и физические процессы могут быть использованы для разрушения свободного цианида и его WAD-, SAD- соединений, они относительно дороги и сложны в эксплуатации. Альтернативой этим процессам является биологическая обработка, которая обычно опирается на использование высшей водной растительности или микроорганизмов. Растения и микроорганизмы имеют резистентность к цианиду, так как они развили альтернативный путь для производства аденозинтрифосфата (АТФ) – цианидрезистентное дыхание (ЦРД) [17]. Изучение биодеструкции цианидсодержащих соединений открывает широкие возможности для развития новых экологически эффективных и экономически оправданных технологий обезвреживания отходов золотодобывающей промышленности, в том числе отходов КВ.

1.2.2 Использование микроорганизмов для детоксикации цианидсодержащих отходов

Биологическая деструкция – это процесс разрушения или преобразования токсичных соединений до простых нетоксичных веществ, с помощью биологической активности [23]. Основными биологическими агентами, осуществляющими деструкцию цианидов и тиоцианатов, являются высшие водные растения и микроорганизмы, для которых проведено большое количество исследований по изучению их биотехнологического потенциала.

Рядом авторов [7, 30–32] проведены работы по использованию метода фитотехнологии для глубокой или дополнительной очистки (доочистки) сточных вод. В качестве основных агентов фитотехнологии выступают высшие водные растения: *Elodea canadensis* (Элодея канадская), *Lemna minor* (Ряска малая) и др. Для реализации детоксикации данным методом необходимо поддерживать оптимальный режим эксплуатации. Дополнительным ограничением использования метода фитотехнологической детоксикации является воздействие отрицательных температур на жизнеспособность водных растений.

Микроорганизмы, обладающие биотехнологическим потенциалом к деструкции цианидсодержащих отходов золотодобывающей промышленности, можно разделить на две основные группы: **1.** микроскопические водоросли и грибы [23, 33–36 и др.]; **2.** бактерии [26, 37–43 и др.].

Наиболее изученными представителями микроскопических водорослей и грибов являются штаммы: *Scenedesmus obliquus* [35], *Rhizopus oryzae*, *Stemphylium loti* [34], *Fusarium solani* [33], *F. moniliforme*, *Gloeocercospora sorghi* [23, 42, 43], *Trichoderma* spp. [44], *Sordaria macrospora* [45], *Polyporus arcularius*, *Schizophyllum commune* и *Ganoderma lucidum* [46], *Cryptococcus humicolus* [47].

Микроскопические грибы и водоросли способны эффективно осуществлять деструкцию цианистых соединений, однако они более сложны в использовании по сравнению с представителями Bacteria (Эубактерии) и Archaea (Археи). На основании этого, наибольшее внимание уделяется бактериям, которые просты в использовании, обладают уникальной способностью адаптироваться к

экстремальным условиям обитания, к смене питательного субстрата и осуществляют перекрестную передачу генетической информации [48–50].

Изучение мирового опыта показало, что большое количество исследований направлено на получение изолированных культур и идентификацию активных штаммов-деструкторов цианидсодержащих соединений. Одна из первых попыток культивировать микроорганизмы, участвующие в деградации цианидсодержащих соединений, для исследования их метаболических реакций и в дальнейшем для усовершенствования методов детоксикации отходов горнодобывающей промышленности, была сделана еще в 1955 г. Ware и Painter [42]. В дальнейшем эти исследования получили большое развитие. К наиболее изученным бактериальным штаммам, которые используют цианиды и тиоцианаты для реализации своих метаболических функций и тем самым осуществляют их детоксикацию, относятся представители фил *Proteobacteria* (классы *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria* и *Firmicutes*, подробная характеристика которых представлена в таблице 1.1.

В серии экспериментов на различных модельных и реальных цианидсодержащих отходах показано, что к основным бактериальным штаммам, которые обладают биотехнологическим потенциалом к деструкции цианидов и тиоцианатов относятся представители родов: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Serratia* (табл. 1.1).

Кроме деструкции тиоцианатов, свободных цианидов и простых неорганических солей цианида для ряда штаммов была отмечена способность к деструкции WAD- и SAD-цианидных комплексов, а также органических цианидов. Так для штаммов *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, *P. putida* BCN3 и *P. paucimobilis mudlock* ATCC 39204 изучена способность утилизировать $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ и $\text{Cu}(\text{CN})_4^{2-}$ в непрерывных условиях культивирования при нейтральных значениях pH [23, 51, 52]. Для штаммов *Escherichia coli* BCN6 и *Rhodococcus* spp. отмечена способность использовать цианидные комплексы железа, цинка и меди в качестве источника углерода [53, 54].

Характеристика изолированных штаммов-деструкторов цианидов и тиоцианатов

Фила/класс	Штамм-деструктор	Место изоляции штамма	Биотехнологический потенциал	Источник
1	2	3	4	5
<i>Proteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> SUTS 1	Сточные воды производства маниокового крахмала	Деструкция цианида (150 мг/дм ³) на 97.9 %	[40]
<i>Proteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brucella</i> sp. <i>Ochrobactrum</i> sp.	Почва, из разных загрязненных участков промышленности	Деструкция CN ⁻ в питательной среде Бушналла-Хааса, содержащей 100 мг/дм ³ KCN, pH 8.5	[39]
<i>Proteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490	Почва	Деструкция тиоцианатов (50 мМ) с дополнительным источником углерода (глюкоза)	[37]
<i>Proteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> sp. (A-3) <i>Alcaligenes faecalis</i> (AF-5)	Сточные воды производства красителей	Способность к деструкции каждой культурой NaCN (с 40 мг/дм ³ до 1 мг/дм ³). При совместном использовании – детоксикация цианидсодержащих сточных вод до 0.05 мг/дм ³	[58]
<i>Proteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i> (ранее известный как <i>Th. thiocyanooxidans</i>)	Сточные воды горнодобывающей промышленности	Аэробная и анаэробная деструкция тиоцианата (250 мг/дм ³) при pH 10.0	[59]
<i>Proteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter nitriloclastes</i> ATCC 21697	Активный ил сточных вод, содержащих нитрилы и цианиды	Деструкция сточных вод, содержащих 50 мг/дм ³ цианидов	[60]
<i>Proteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> sp. RL2c	Почва ризосферы цианогенных растений, промышленные сточные воды (Индия)	Совместная деструкция с штаммами <i>Enterobacter</i> sp. RL2a и <i>Serratia marcescens</i> RL2b деструкция цианида (20 мМ) при 30°C, pH 6.0 в реакторе с уплотненным слоем (PBR)	[61]
<i>Proteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> C-3	Почва, сточные воды КВ	Способность к деструкции цианида при pH 10. Нуждается в дополнительном источнике углерода (глюкоза). Штамм чувствителен к ионам железа и меди	[62, 63]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Цианидсодержащие сточные воды металлургии	Деструкция цианида (0.58 мМ) при pH 7.0	[64]

<i>Продолжение табл. 1.1</i>				
1	2	3	4	5
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thioalkalivibrio</i> spp. ARh 1, ARh 2, ARh 4	Сильнощелочные содовые озерные отложения и содовые почвы	Деструкция тиоцианата (12 до 15 мМ)	[41]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIB 11764	Почва с загрязненных участков	Деструкция цианида до аммиака в присутствии дополнительных источников углерода (глюкоза или хлорид аммония)	[42]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> СЕСТ5344	Вода из реки Гвадалквивир (Кордова, Испания)	Деструкция цианида в питательной среде М9 (содержащей дополнительные источники углерода и азота – 50 мМ ацетата натрия и 2 мМ хлорида аммония) при 30°C, pH 11.5, с аэрацией (но исключением улетучивания CN ⁻)	[50, 65]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (UA7)	Шахтные воды рудника в Айдахо	Деструкция цианида, переживание условий отрицательных температур в рудном штабеле	[28, 66]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 18 <i>P. putida</i> 21	Оборотная вода после доменной газоочистки металлургического предприятия	Деструкция цианида (10 мг/дм ³), тиоцианата (2 г/дм ³) и удаление аммония (120 мг/дм ³) при pH 9.2–9.4	[67]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida</i> CD 3	Сточные воды производства маниоки	Деструкция 5 мМ цианидов на 61.0% в присутствии глюкозы	[68]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Загрязненные промышленные сточные воды и почвы	Деструкция иммобилизованными клетками штамма 100–400 мг/дм ³ NaCN в биореакторе	[69]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	хвостохранилище, содержащий 280 мг/л CN ⁻	Процесс Homestake	[12]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia marcescens</i> aq07	Почва	Деструкция 95.6% KCN (200 мг/дм ³) в присутствии в среде глюкозы (5.5 г/дм ³ , дрожжевого экстракта 0.55 г/дм ³), при 32.5°C и pH 6	[70, 71]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia odoriferra</i> MTCC 5700	Сточные воды завода по производству кокса	Деструкция фенола (1500 мг/дм ³) и цианида (150 мг/дм ³) в питательной среде с глюкозой на 88.26 и 99.85% соответственно.	[70, 73]

<i>Продолжение табл. 1.1</i>				
1	2	3	4	5
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia marcescens</i> RL2b	Почва	Деструкция иммобилизованными клетками цианида (1.2 г/дм ³) в реакторе с уплотненным слоем (PBR)	[57, 73–75]
<i>Proteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacter</i> sp. RL2a	Почва ризосферы цианогенных растений, промышленные сточные воды (Индия)	Совместная деструкция с штаммами <i>Achromobacter</i> sp. RL2a и <i>Serratia marcescens</i> RL2b деструкция цианида (20 мМ) при 30°C, pH 6.0 в реакторе с уплотненным слоем (PBR)	[75]
<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. UKMP-5M <i>Rhodococcus zopfii</i> <i>Rhodococcus</i> sp. NAM81	Коллекционные штаммы из Institute of Bio-IT Selangor, Малазия	Деструкция от 3 до 15 мМ KCN при 30°C и pH 7	[26, 54, 76]
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Гальванические сточные воды	Деструкция цианидсодержащих отходов (500 мг CN ⁻ /дм ³) консорциумом штаммов <i>Bacillus</i> в биореакторах при 33.6°C, pH 9.88	[77, 78]
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Почва, вокруг мельницы обрабатывающей маниоку	Деструкция 1.5 мг ⁻¹ KCN на 66.9%. Совместная деструкция со штаммом <i>Pseudomonas stutzeri</i> на 88.5%	[79]
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i> CD 6	Сточные воды производства маниоки	Деструкция 5 мМ цианидов на 63.0% в присутствии глюкозы	[68]
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus nealsonii</i> S ₁ , S ₂	Сточные воды производства стали	Деструкция цианида (100 мкг/дм ³) на 91.7% при 25–37°C, pH 6.0–7.5	[80]

Штамм *Acinetobacter* sp. RBPI, изолированный из сточных вод золотодобывающей промышленности, разрушал цианидные комплексы золота, серебра, кадмия, цинка, меди, кобальта и железа, а также нитрилы [55]. Wang с соавторами изучили способность штамма *Comamonas testosteroni* к деструкции акрилонитрила (до 1900 мг/дм³) в сточных водах производства смол [56]. Следует также отметить, что некоторые штаммы сохраняют способность к деструкции цианида в присутствии тяжелых металлов. Например, в работах [57] показано, что штамм *Serratia marcescens* AQ07 проводил деструкцию цианидов в присутствии таких тяжелых металлов, как Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb и Zn.

Процесс биодеструкции цианидсодержащих соединений с использованием изолированных штаммов преимущественно проводится в биореакторах и/или биофильтрах, как в аэробных, так и анаэробных условиях [54, 63, 69, 70]. Одной из проблем использования изолированных штаммов на практике является подготовка биологического материала для контакта с токсичной составляющей оборотных и сточных вод и закрепление биомассы на носителе с предотвращением ее быстрого вымывания из реактора. Для решения данной проблемы рядом авторов было предложено проводить иммобилизацию клеток микроорганизмов, а в качестве носителей использовать активированный уголь, природные цеолиты, смесь слюдяной и вулканической пород, коксовую пыль, песок, пористые полимеры (агар, альгинат и каррагинан) и др. [54, 63, 69, 70, 81–83].

Деструкция цианидов микроорганизмами осуществляется с помощью их специфических ферментативных систем. Выделяют аэробную и анаэробную деструкцию [34, 84]. **В аэробных условиях** в результате биодеструкции цианидов как правило образуется цианат, который в свою очередь гидролизуется до аммиака и углекислого газа:

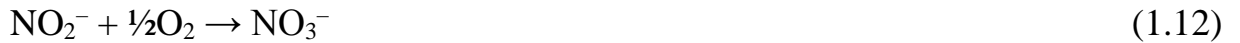


Тиоцианат в аэробных условиях превращается в аммиак, сульфат и бикарбонат:



В дальнейшем аммиак окисляется до нитратов (NO_3^-) в анаэробных биологических реакциях, которые протекают в аэробных условиях при низком уровне растворенного кислорода или вообще без его использования. К таким реакциям относятся нитрификация и денитрификация [10].

Нитрификация аммиака осуществляется автотрофными бактериями родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* в соответствии со следующими уравнениями:



Денитрификация включает преобразование нитратов и нитритов в газообразный азот. Процесс осуществляется факультативными бактериями родов *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Bacillus* и др. без использования кислорода, но в присутствии дополнительного источника углерода, как правило метанола [10]:



В анаэробных условиях биодеструкция цианидов ограничена условиями и может протекать только в присутствии серы (HS_2 или H_2S), вид которой зависит от pH среды. При $\text{pH} > 7$, в рудном штабеле КВ в большей степени присутствует HS_2 , при $\text{pH} < 7$ – H_2S . Деструкция цианидов в анаэробных условиях протекает в соответствии с реакциями:



Порог цианидрезистентности для анаэробных бактерий составляет примерно 2 мг/дм^3 , в то время как аэробные бактерии, способны выдерживать концентрации цианидов от 200 мг/дм^3 и выше [34, 84]. Исходя из этого, анаэробная биодеструкция протекает медленнее и является менее эффективной для детоксикации цианидов в отходах КВ.

Оптимальный температурный диапазон для аэробной и анаэробной деструкции составляет от 10 до 30°C и от 25 до 45°C соответственно. Оптимальный диапазон pH от 6.0 до 9.0 и 6.5 до 7.5 соответственно. Кислород должен

отсутствовать в анаэробных системах, в то время как в аэробных системах уровень растворенного кислорода должен поддерживаться не выше 1–2 мг/дм³. В некоторых случаях необходимо присутствие дополнительных источников азота и фосфора [10, 18].

В зависимости от механизма деструкции, формы цианида (субстрата), а также от ферментов, осуществляющих реакцию выделяют пять путей аэробной и анаэробной биодеструкции: гидролитический путь, окислительный путь, восстановительный путь, путь замещения/переноса и путь синтеза, основные характеристики которых представлены в таблице 1.2. Ферменты первых трех путей катализируют преобразование цианида в простые органические или неорганические соединения (аммиак, метан, CO₂, муравьиную кислоту и карбоксильную кислоту). По остальным двум путям в клетках микроорганизмов осуществляется ассимиляция цианида как единственного источника азота и углерода. Путь замещения/переноса и путь синтеза вовлекают образование аминокислот, β-цианоаланина и γ-циано-α-аминомасляной кислоты при использовании остатков аминокислот как предшественников, которые реагируют с цианидными компонентами [23, 85].

Следует отметить, что для одного штамма-деструктора может быть отмечено использование различных путей деструкции цианидов и тиоцианатов [25, 36, 67].

Хотя метод биодеструкции с использованием изолированных штаммов позволяет осуществить детоксикацию оборотных и сточных вод от цианидсодержащих соединений он имеет ряд недостатков.

Во-первых, в большинстве из представленных исследований с использованием изолированных штаммов-деструкторов (табл. 1.1) не были учтены химические свойства цианидов. Так, биодеструкцию цианидов изучали в модельных средах с использованием дополнительного источника углерода – глюкозы, при нейтральных и слабощелочных значениях pH (6.0–8.5). В экспериментах использовали интенсивную аэрацию. Известно, что при pH < 7 происходит улетучивание цианида в виде синильной кислоты по реакции (1.1) [12].

Пути деструкции цианидов и тиоцианатов

Ферментативный путь/фермент	Реакция	Субстрат	Микроорганизмы, из которых выделяли фермент	Источник
1	2	3	4	5
1. Гидролитический путь*				
1 – Цианидгидратаза 2 – Формамидгидратаза	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{1} \text{HCONH}_2 \xrightarrow{2} \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	HCN Цианидные комплексы металлов	Преимущественно грибы: <i>Gloeocercospora sorghi</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> N-10, <i>Stemphylium loti</i> Бактерии: <i>P. fluorescens</i> NCIMB11764	[26, 36, 43, 87, 88]
1 – Нитрилгидратаза 2 – Амидаза	$\text{RCH}_2\text{CN} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{1} \text{RCH}_2\text{CONH}_2 \xrightarrow{2} \text{RCH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$	Нитрилы (тетрацианоникелат (II) акрилонитрил метахлоронитрил хлоронитрил)	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8, <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Brevibacterium imperialis</i> , <i>Pseudonocardia thermophile</i> , <i>P. marginalis</i> MA32, <i>P. putida</i> MA113	[56, 89, 90]
Тиоцианатгидролаза (Карбонильный путь)**	$\text{SCN}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$	Тиоцианаты	<i>Th. thioparus</i> THI 115	[34, 41, 88, 91]
Цианидаза (цианиддегидратаза)	$\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{NH}_3$	Цианиды	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i> DF3, <i>B. pumilus</i> C1, <i>P. stutzeri</i> AK61, <i>P. fluorescens</i> NCIMB11764, <i>Alcaligenes denitrificans</i> DSM 4009	[43, 88, 92]
Нитрилаза	$\text{RCH}_2\text{CN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$	Нитрилы	<i>Streptomyces</i> sp. MTCC 7546 <i>Klebsiella oxytoca</i>	[34, 88, 91]
2. Окислительный путь				
Цианиддиоксигеназа	$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NAD(P)}^+$	HCN Цианидные комплексы металлов	Грибы: <i>Trametes versicolor</i> ATCC 200801, <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME 496 Бактерии: <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764, <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i>	[34, 36, 88, 91, 93]

Продолжение табл. 1.2				
1	2	3	4	5
1 – Цианидмонооксигеназа 2 – Цианаза	$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + \text{NAD(P)H} \xrightarrow{1} \text{HOCN} + \text{NAD(P)} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{HOCN} + 2\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{2} \text{NH}_4^+ + 2\text{CO}_2$	HCN Цианидные комплексы металлов	<i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. putida</i> , <i>Rhodococcus</i> spp., <i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764	[34, 88, 91, 94]
Цианаза (Цианатный путь)**	$\text{SCN}^- + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CNO}^- + \text{HS}^- \rightarrow \text{HS}^- + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+$ $\text{CNO}^- + 3\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{CO}_2$	Тиоцианаты	<i>Th. thioparus</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Methylobacterium thiocyanatum</i>	[34, 41, 43]
3. Восстановительный путь***				
Нитрогеназа	$\text{HCN} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_2=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2=\text{O}$ $\text{CH}_2=\text{NH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{-NH}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$	Цианиды	<i>Methanothrix</i> spp., <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i> , <i>Azospirillum</i> spp. <i>Rh. rubrum</i> , Смешанная метаногенная культура	[43, 88, 95]
4. Путь замещения/переноса				
Тиосульфат: цианид сульфотрансфераза (роданаза)	$\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$	Цианиды	<i>E. coli</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Thiobacillus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>	[96–99]
Меркаптопируват: цианид сульфотрансфераза	$\text{CN}^- + \text{HSCH}_2\text{COCOO}^- \rightarrow \text{SCN}^- + \text{CH}_2\text{COCOO}^-$	Цианиды	<i>E. coli</i>	[43, 88, 97, 99]
5. Путь синтеза				
Цианоаланин синтаза	Цистеин + $\text{CN}^- \rightarrow \beta$ -цианоаланин + H_2S О-ацетил серин + $\text{CN}^- \rightarrow \beta$ -цианоаланин + CH_3COO^-	Цианиды Аминокислоты (цистеин, О-ацетил серин, аспарагин и т. д.)	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>E. coli</i>	[43, 88, 93, 100]

Примечание: *- В реакциях с участием нитрилов, R представляет собой алифатические или ароматические группы; ** - некоторые авторы [25, 34, 91] деструкцию тиоцианатов выделяют в отдельные пути; *** - восстановительные пути деструкции цианидов в основном проходят в анаэробных условиях

Дополнительно, в работах М.С. Andrede и V.M. Luque-Almagro [101, 102] было показано, что цианид способен вступать в химическую реакцию с некоторыми кето-группами (реакция Kiliani), а также с редуцирующими сахарами в том числе с глюкозой. Таким образом, при использовании глюкозы, а также проведении экспериментального культивирования при нейтральных и слабощелочных значениях pH с аэрацией среды наиболее вероятно протекание простых химических реакций без участия микроорганизмов. Это ставит под сомнение достоверность подтверждения факта биохимической деструкции цианидов в ряде работ (табл. 1.1) [36, 68, 73, 103 и др.].

Во-вторых, изолированные и изученные штаммы-деструкторы рекомендованы для обезвреживания цианидсодержащих отходов в регионах с теплым климатом (табл. 1.1) [42, 74, 104]. Их использование для детоксикации отходов золотодобывающих предприятий, расположенных на территории РФ, сталкивается с проблемой поддержания их активного состояния при резких суточных и сезонных колебаниях температур [105]. Необходимо проведение дополнительных исследований для оценки возможности использования этих штаммов для биодеструкции отходов КВ золота предприятий, находящихся в регионах РФ.

В-третьих, в ряде работ было показано, что изолированные штаммы бактерий обладают узким спектром биогеохимических функций и не всегда способны к деструкции высоких концентраций цианидсодержащих соединений [25, 58, 106]. Для решения проблемы ограниченности использования штаммов-деструкторов были предложены комбинированные методы детоксикации цианидсодержащих отходов, наиболее интересным из которых является подход, представленный отечественными авторами.

Авторами [86] разработан комбинированный бактериально-химический способ детоксикации цианидов и их производных, который позволяет обезвреживать пульпы и растворы с высокими концентрациями цианида (200 мг/дм^3), тиоцианата (до 4.5 г/дм^3) и других их производных до ПДК. Способ включает две стадии обработки – химическую (процесс INCO с аэрацией в

щелочной среде) и микробиологическую (совместное применение штаммов *P. stutzeri* 18 и *P. putida* 21 в присутствии фосфата калия и органического источника углерода). Использование этой технологии для обезвреживания технологических растворов и плотных пульп показало, что химическая обработка занимала 30–90 мин, при этом остаточная концентрация цианида составляла 5.3–19.1 мг/дм³. Микробиологическая обработка обеспечивала дальнейшую детоксикацию токсичных соединений до значений ПДК [86].

Учитывая, что автохтонные микробные сообщества включают в себя представителей различных трофических уровней, они обладают более широким набором функций по сравнению с моно- и микс-культурами. Именно поэтому активно внедряемая в настоящее время в промышленности технология обезвреживания цианидов и тиоцианатов Activated Sludge Tailings Effluent Remediation (ASTER) основана на использовании не отдельных штаммов, а целого консорциума активного ила [107]. Технология ASTER была разработана в середине 1990-х гг. как проект Gold Fields и BHP Billiton для обработки технологической воды после операций BIOX® [107, 108]. В настоящее время она получила ряд модификаций и позволяет проводить детоксикацию сточных вод и разбавленных пульп, содержащих высокие концентрации тиоцианатов (более 1200 мг/дм³) и цианидов (10–30 мг/ дм³) до ≤ 0.1 мг/дм³ при 22–30°C и при введении органических биостимуляторов [109]. На сегодняшний день технология ASTER введена в промышленную эксплуатацию на фабрике Консорт (Южная Африка) с 2010 г., на руднике «Суздаль» (Казахстан) с 2013 г. и на фабрике Рунруно (Филиппины) с 2016 г. С помощью современных молекулярно-генетических методов проведена идентификация представителей микробного сообщества активного ила ASTER и выявлены основные представители, осуществляющие деструкцию цианидсодержащих соединений [110].

Таким образом, для детоксикации отходов КВ перспективными являются методы с использованием не отдельных представителей бактериальных сообществ (изолированных штаммов-деструкторов), а всего автохтонного консорциума. Наиболее удачным модельным объектом для проведения подобного рода

исследований выступает процесс пассивного обезвреживания (passive treatment) отходов КВ.

1.2.3 Пассивные методы обезвреживания цианидсодержащих отходов

Определение «пассивное обезвреживание» («passive treatment») было предложено P.L. Younger с соавторами в 2002 г. [11]. Под этим термином понимается преднамеренное улучшение качества сточных вод и отходов с использованием только естественно-доступных источников энергии (гравитационных, микробиологических, фотосинтетических и др.) в системах, не требующих частого технического обслуживания для эффективной работы [111].

По М. Botz ключевыми факторами, которые необходимо учитывать для эффективной детоксикации отходов КВ является оценка водного баланса и поведения цианидных соединений как в типичных, так и в экстремальных климатических условиях [13]. Это будет учтено в дальнейшей работе.

В основе пассивной детоксикации цианидсодержащих соединений лежат следующие механизмы: улетучивание синильной кислоты из растворов, биологическое окисление цианидов, гидролиз, биodeградация, сорбция токсичных соединений на минеральной поверхности руды и осаждение нерастворимых солей из растворов [10, 13]. Типовые реакции естественной деструкции цианидов в рудном штабеле и технологическом растворе КВ представлены в таблице 1.3 [84].

Таблица 1.3

Типовые реакции естественной деструкции цианидов в рудном штабеле и технологическом растворе КВ

Механизм деструкции CN ⁻	Типовая реакция
Гидролиз цианидов	$CN^- + H_2O \rightarrow HCN + OH^-$
Окисление цианидов	$2HCN + O_2 \rightarrow 2HOCN$ $2CN^- + O_2 \rightarrow 2OCN^-$
Гидролиз цианата	$HOCN + H_2O \rightarrow NH_3 + CO_2$
Гидролиз цианистого водорода	$HCN + 2H_2O \rightarrow NH_4COOH$ $HCN + 2H_2O \rightarrow NH_3 + HCOOH$
Аэробная деградация цианидов	$2CN^- + O_2 + \text{фермент} \rightarrow 2OCN^-$
Образование тиоцианатов	$S_x^{2-} + CN^- \rightarrow [S_{(x-1)}]^{2-} + SCN^-$ $S_2O_3^{2-} + CN^- \rightarrow SO_3^{2-} + SCN^-$

<i>Продолжение табл. 1.3</i>	
Диссоциация простых цианидных солей	$\text{NaCN} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{CN}^-$
Образование цианидных комплексов металлов	$\text{Zn} + 4\text{CN}^- \rightarrow \text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$
Анаэробная деградация цианидов	$\text{CN}^- + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{HSCN} + \text{H}^+$
	$\text{HCN} + \text{HS}^- \rightarrow \text{HSCN} + \text{H}^+$

На сегодняшний день помимо исследований по пассивной детоксикации цианидсодержащих отходов, проведенных зарубежными авторами [10, 13, 112, 113, 114], в России С.В. Петровым разработана технология обезвреживания отходов КВ золота под действием природных факторов [8]. Эта технология создана на основе длительных экспериментов по хранению отходов в условиях зонирования рудного штабеля КВ. Им изучены основные процессы деградации цианидов (гидролиз, окисление кислородом, испарение, фотодеструкция) в естественных условиях и определены их кинетические характеристики. Дополнительно проводилось регулирование водного баланса. При соблюдении разработанных технологических параметров обезвреживание отходов КВ с помощью данной технологии происходит в период от 3 до 5 лет [8]. Следует отметить, что в технологии, разработанной С.В. Петровым, роль бактериального фактора в пассивной детоксикации цианидсодержащих отходов КВ не учитывалась.

Для понимания протекания пассивной детоксикации цианидсодержащих отходов необходимо обратить внимание на основные принципы биологических процессов при аэробных и анаэробных условиях, которые подробно описаны в разделе 1.3.

Впервые роль автохтонного микробного сообщества в пассивной детоксикации была изучена не в руде, а в цианидсодержащей почве. В 1967 г. G.A. Strobel провел ряд исследований на стерильных и нестерильных цианидсодержащих почвенных образцах. Было показано, что в нестерильных условиях деструкция цианидов протекает значительно быстрее по сравнению со стерильными [115]. Дальнейшие исследования по определению разнообразия и структуры бактериальных сообществ, а также по выявлению основных функциональных групп бактерий в пассивных системах детоксикации не проводились.

Можно выделить несколько наиболее известных полупассивных систем (semi-passive systems [11]), разработанных зарубежными учеными. К ним относятся технология ASTER [108, 109] и технология, разработанная на руднике Homestake (Северная Дакота, США), с последующими ее модификациями [10, 116–118 и др.], в том числе Biopass [117, 119]. Данные технологии основаны на введение дополнительных источников энергии для жизнедеятельности микроорганизмов, поэтому их нельзя рассматривать как чисто пассивные системы обезвреживания («passive treatment systems») [11]. Технология ASTER была подробно рассмотрена в разделе 1.3, поэтому наибольшее внимание будет уделено остальным.

Технология, созданная компанией «Homestake Mining Company» («НМС») на руднике Homestake, введена в эксплуатацию в конце 1984 г. и является первой промышленной установкой по биодegradации цианидов и их производных (тиоцианатов, цианата, аммония, нитратов, цианидных комплексов металлов). Сточные воды, содержащие до 11.5 мг/дм³ цианидов и до 110 мг/дм³ тиоцианатов, обрабатываются в роторных аэробных биореакторах (RBCs) при участии бактерий рода *Pseudomonas* (по реакциям 1.8–1.10) и нитрифицирующих бактерий (по реакциям 1.10, 1.11), входящих в состав активного ила. В качестве дополнительного источника энергии используется фосфор в виде H₃PO₄ [13]. При попытке использовать аналогичный консорциум бактерий для обезвреживания высоких концентраций цианидов (100 мг/дм³) показана низкая степень обезвреживания (около 43%) [86].

В дальнейшем технология, разработанная компанией «НМС», была усовершенствована на заводе Nickel Plate Mine (Канада, США). Модификация представляла комбинированный аэробно-анаэробный многоступенчатый процесс обезвреживания сточных вод хвостохранилищ, содержащих остаточные тиоцианаты (более 1000 мг/дм³) (по реакции 1.10), аммиак и нитраты (по реакциям 1.11–1.14) [120]. В качестве дополнительных источников энергии вводили H₃PO₄ и CH₃OH. Обе технологии обеспечивали детоксикацию тиоцианатов в сточных водах до значений ниже 5 мг/дм³ [120]. Механизм обобщенного и усовершенствованного процесса Homestake представлен на рисунке 1.3.

В 1996 на фабрике KB Santa Fe Mine (штат Невада, США) компанией «НМС» разработан полупассивный анаэробный биологический процесс *in situ*, который был назван Biopass [116, 119]. Схема процесса Biopass приведена на рисунке 1.4 [8].

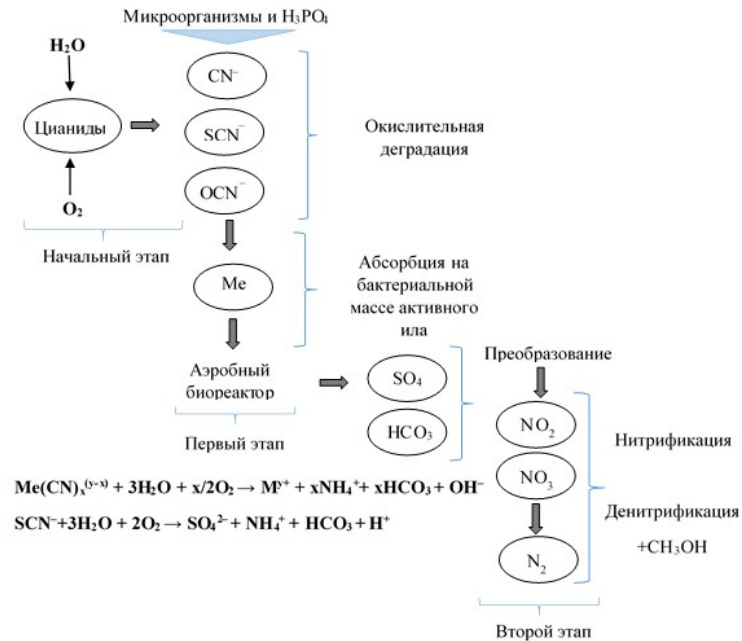


Рисунок 1.3. Обобщенная и усовершенствованная схема процесса Homestake [120]

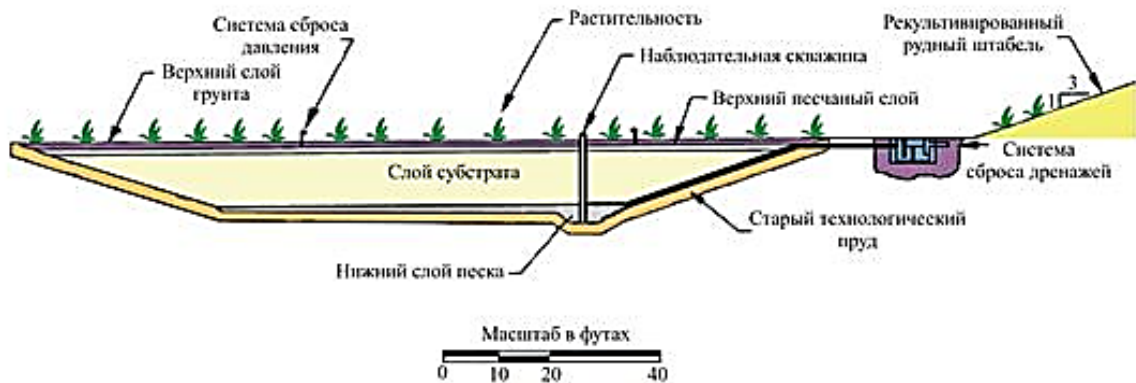


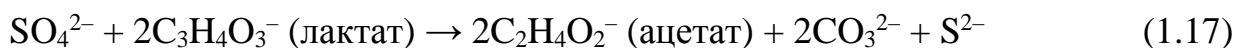
Рисунок 1.4. Схема процесса Biopass [8]

Технология Biopass была разработана для обезвреживания дренажных вод KB и их сброса в систему грунтовых вод [10, 120]. Она состояла из старого технологического пруда-накопителя и набора равномерно расположенных перфорированных труб (рис. 1.4). Поверхность пруда была покрыта несколькими слоями: двойным гидроизолирующим слоем, слоем песка и слоем субстрата — органического вещества, которое представляло из себя смесь компостного навоза

и соломы. Для ограничения аэрации сверху пруд был покрыт грунтом с растительным покровом.

К основным биохимическим процессам при детоксикации дренажных вод в системе Biopass относят анаэробное восстановление сульфатов, осаждение металлов в виде сульфидов и карбонатов, денитрификацию и анаэробную деструкцию цианидов. Все эти процессы были изучены в непрерывных лабораторных экспериментах и в полупромышленных исследованиях на природных и искусственных водно-болотных угодьях [117, 119].

Восстановление сульфатов в сульфид осуществляется анаэробными и хемогетеротрофными бактериями органического слоя. Основная реакция восстановления сульфата протекает в соответствии со следующим уравнением [117, 119]:



Далее происходит осаждение металлов в виде сульфидов и карбонатов:



Денитрификация протекает в соответствии с реакциями 1.13 и 1.14, а анаэробная деградация цианидов в соответствии с реакциями 1.15 и 1.16 или по следующим уравнениям [8]:



Следует отметить, что на сегодняшний день аналогом технологии ASTER в России является технология, разработанная исследовательским центром ОАО «Полюс Золото» (Красноярск). Данная технология позволяет обезвреживать тиоцианаты (с 1800 до 0.02 мг/дм³) и цианиды (с 20 до 0.01 мг/дм³) в жидких пульпах после биовыщелачивания золота. Детоксикация осуществляется под действием консорциума микроорганизмов (основные представители *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Enterobacter*), биотехнологическую активность которых стимулируют введением дополнительного источника углерода

(меласса –0.5 г/дм³), азота и фосфора (сульфат аммония – 1.0 г/дм³ и аммофос – 0.4 г/дм³). Процесс биодетоксикации осуществляют при рН 7.5 и при 33–34°С [165].

Механизмы полупассивного обезвреживания исключают применение токсичных реагентов и являются эффективными для детоксикации цианидсодержащих отходов. Однако представленные работы зарубежных и российских исследователей имеют некоторые недостатки – в основном они направлены на обезвреживание высоких концентраций тиоцианатов (технологии Homestake, ASTER и ее аналог) и имеют ограничения по деструкции высоких концентраций цианидов, а для их реализации применяют дополнительные источники энергии (органические и/или азот- и фосфорсодержащие соединения). Кроме того, объекты, на которых были проведены исследования по пассивной детоксикации, находятся преимущественно в других климатических условиях.

Таким образом, анализ литературных данных по решению экологической проблемы детоксикации отходов КВ золота показал, что в мировой практике в основном используют технологию промывки рудного штабеля КВ с последующим обезвреживанием промывных и/или оборотных вод химическими методами. Данные методы хоть и являются эффективными, но не исключают повторного загрязнения окружающей среды используемыми реагентами, а также требуют больших капитальных и эксплуатационных затрат. Решение проблемы детоксикации отходов КВ логично искать в самой природе, поскольку цианидсодержащие соединения образуются и разрушаются в ней постоянно. За счет ЦРД микроорганизмы и растения обладают устойчивостью к высоким концентрациям цианидов и могут их преобразовывать в менее ядовитые формы, используя для реализации своих физиологических функций. Однако наиболее изученные процессы биообезвреживания с применением высших водных растений и изолированных бактериальных штаммов-деструкторов имеют ограничения по использованию в регионах с резко-континентальным климатом. Кроме того, для многих штаммов-деструкторов показана неспособность в деструкции высоких концентраций цианидов. Наиболее удачным подходом для биодетоксикации отходов КВ выступает метод с использованием не отдельных представителей

бактериальных сообществ (изолированных штаммов-деструкторов), а всего автохтонного консорциума. Данным подходом выступает пассивная детоксикация, которая преимущественно изучалась зарубежными учеными на примере полупассивных технологий (Homestake, Biopass, ASTER и ее аналог) и на сегодняшний день в полном объеме не рассмотрена. Исследование закономерностей биодеструкции токсичных соединений позволит разработать экологически применимый и экономически выгодный подход детоксикации отходов КВ золота месторождений, расположенных на территории РФ, в том числе в регионах с резко-континентальным климатом.

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Геолого-географическая характеристика объектов исследования

На сегодняшний день на территории РФ эксплуатируется большое количество месторождений, на которых применяется технология КВ золота (рис. 2.1). Для определения влияния экологических факторов и разработки оптимальной технологии биодетоксикации отходов КВ, отбор проб осуществляли на месторождениях, отличающихся территориальной расположенностью (в пределах регионов с низкими среднегодовыми температурами), а также химическим и минеральным составом руд.



Рисунок 2.1. Карта территориального расположения месторождений РФ, на которых применяют технологию КВ золота (выделены красным цветом);

месторождения с КВ, на которых проводили отбор проб выделены

фиолетовым цветом: 1 – «Бабушкина Гора», 2 – «Чазы Гол», 3 –

«Подголючное», 4 – «Самолазовское»

Сбор материала для исследований проводили на четырех месторождениях золота, расположенных на территории Красноярского края («Бабушкина Гора»), Республики Хакасия («Чазы Гол») и Республики Саха (Якутия) («Самолазовское», «Подголючное») (рис. 2.1). Отбор проб технологического раствора и руды рудного

штабеля КВ золота осуществляли в 2012 и 2014 гг. в стерильные емкости, транспортировали и хранили при температуре 4°C до проведения дальнейших исследований.

Пробы технологического раствора и руды действующего рудного штабеля, отобранные на месторождениях КВ золота, использовали в исследованиях, схема которых приведена на рисунке 2.2. Объем используемых проб, места их сбора и применяемые методы исследований представлены в таблице 2.1.

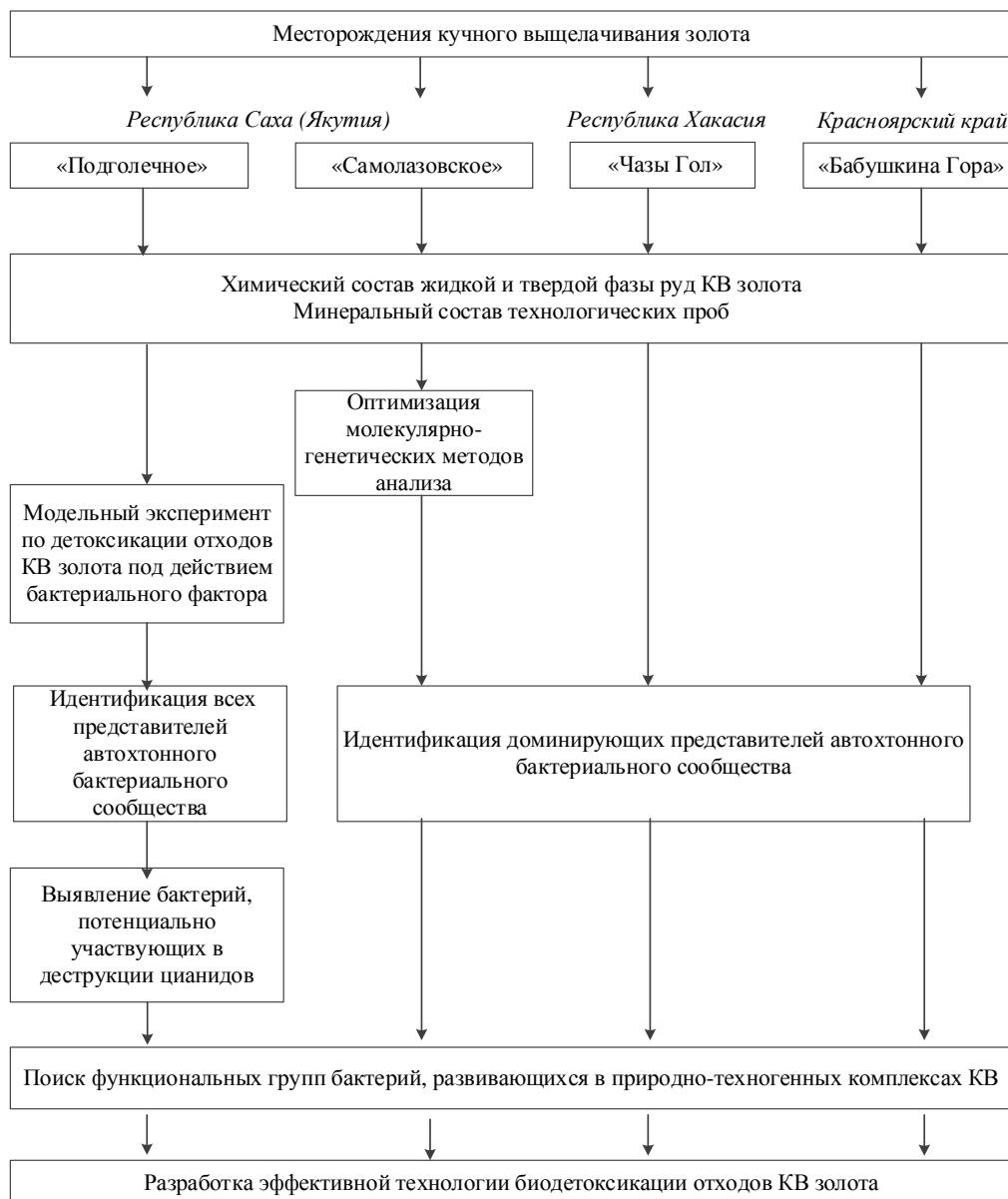


Рисунок 2.2. Схема исследований, использованных для разработки технологии биодетоксикации отходов КВ золота

Структура материала и методы исследований, использованные в работе

Место сбора образца	Объект исследования	Объем образца	Методы исследования
Республика Саха (Якутия) Месторождение «Подголецное»	руда действующего рудного штабеля КВ	20.0 кг	Химический анализ Модельный эксперимент по детоксикации отходов КВ Метагеномное секвенирование
	технологический раствор КВ	11.0 л	
Республика Саха (Якутия) Месторождение «Самолазовское»	руда действующего рудного штабеля КВ	3.0 кг	Химический анализ Групп-специфичная ПЦР Молекулярное клонирование Секвенирование по Сэнгеру
	технологический раствор КВ	1.0 л	
Красноярский край Месторождение «Бабушкина Гора»	руда действующего рудного штабеля КВ	3.0 кг	Химический анализ Молекулярное клонирование Секвенирование по Сэнгеру
	технологический раствор КВ	1.0 л	
Республика Хакасия Месторождение «Чазы Гол»	руда действующего рудного штабеля КВ	3.0 кг	Химический анализ Молекулярное клонирование Секвенирование по Сэнгеру
	технологический раствор КВ	1.0 л	

Золоторудное месторождение «Бабушкина Гора» расположено в Мотыгинском районе Красноярского края на водоразделе ручья Сохатинный (р. Мамон) и ручья Большая Пескина (рис. 2.1). Район месторождения имеет равнинный, расчлененный рельеф, типичный для Енисейского края, приравнен к условиям Крайнего Севера, с резко континентальным климатом – холодной (средняя месячная температура января составляет -22.9°C), продолжительной зимой (октябрь–апрель) и сравнительно жарким ($+18.3^{\circ}\text{C}$), коротким летом (июнь–август) (табл. 2.2). Среднегодовая температура по данным многолетних наблюдений отрицательная (от -2.0 до -5.0°C). Среднегодовое количество осадков составляет от 400 до 660 мм, большая часть которых (до 60%) выпадает в виде снега. Глубина сезонного промерзания грунта достигает 1.5–2.0 м, участками отмечается островная многолетняя мерзлота [121].

Характеристика золоторудных месторождений, на которых проводили отбор проб для исследования

Месторождение	Район размещения	Средняя сезонная температура, °С		Среднегодовая температура, °С	Осадки, мм	Глубина промерзания грунта, м
		зима	лето			
Бабушкина Гора	Красноярский край	-22.9	+18.5	от -2.0 до -5.0	400–660 (зима*)	1.5–2.0
Чазы Гол	Республика Хакасия	-20.0	+19.0	-8.0	250–780 (лето*)	2.0–3.5
Самолазовское	Республика Саха	-27.1	+16.6	-6.0	580 (лето*)	3.4–4.8
Подгольчатое	Республика Саха	-28.0	+19.0	от -7.0 до -9.0	550 (лето*)	3.4–4.8

Примечание: * – сезон, в котором отмечается преимущественное выпадение осадков

Золоторудное месторождение «Чазы Гол» находится в Аскизском районе Республики Хакасия в верховьях р. Чазы-Гол (рис. 2.1) в правом борту лога Кузнецовского, в пределах Немир-Чазыгольского рудного поля и в центральной части Сахсарской рудоносной зоны. Район месторождения расположен на холмистой равнине, в южной и юго-западной части находятся горы и плоскогорья. Климат района резко континентальный, характеризуется холодной малоснежной зимой и коротким летом, с большими амплитудами колебаний сезонных, месячных и суточных температур и количества осадков. Средняя месячная температура января составляет -20.0°C , июля – $+19.0^{\circ}\text{C}$ (табл. 2.2). Среднегодовая температура воздуха составляет -8.0°C . Среднегодовое количество осадков колеблется в пределах от 250 до 780 мм, около 75% которых выпадает в теплый период года. Глубина промерзания грунта достигает 2.0–3.5 м (табл. 2.2) [122].

Золоторудное месторождение «Самолазовское» расположено в Алданском районе Республики Саха (Якутия), в 56 км южнее г. Алдан (рис. 2.1), относится к области Алданского нагорья и характеризуется среднерасчлененным рельефом с относительными превышениями до 200-400 м. Климат района резко континентальный с продолжительной морозной зимой и умеренно теплым дождливым летом. Средняя годовая температура воздуха за многолетний период

наблюдений составляет -6.0°C . Самый холодный месяц – январь (средняя месячная температура -27.1°C). Самый теплый месяц – июль ($+16.6^{\circ}\text{C}$) (табл. 2.2) [123]. Среднегодовое количество осадков примерно составляет 580 мм. В геокриологическом отношении месторождение расположено в зоне развития островной многолетней мерзлоты, мощность которой достигает 100–200 м. Многолетнемерзлотные участки, встречающиеся под моховым покровом, обуславливают заболоченность элементов ландшафта. Нормативная глубина сезонного промерзания 3.4–4.8 м [123].

Золоторудное месторождение «Подголецное» расположено на правом склоне долины ручья Дорожный, левого притока р. Джеконда Алданского района Республики Саха (Якутия) в 45 км юго-восточнее г. Алдан (рис. 2.1). Формы рельефа – водораздельные пространства с крутыми склонами в $5-30^{\circ}$. Абсолютные отметки рельефа колеблются в пределах 1000–1200 м. Минимальная отметка составляет 580 м в долине р. Якокут. Климат района резко континентальный с отрицательной среднегодовой температурой (от -7 до -9°C). Среднемесячная температура января варьирует от -28 до -35°C , июля – от $+14$ до $+19^{\circ}\text{C}$. Среднегодовое количество осадков составляет 550 мм, из них 60% приходится на лето (табл. 2.2). В данном районе широкое развитие имеет многолетняя мерзлота, ее мощность может достигать 300 м. Средняя глубина промерзания грунта 3.4–4.8 м [4].

Таким образом, несмотря на то, что исследуемые месторождения имели разную географическую расположенность, районы их размещения характеризовались резко континентальным климатом с отрицательной среднегодовой температурой от -2 до -9°C . На основании этого, все четыре месторождения можно отнести к низкотемпературным местам обитания.

При проведении экспериментальных работ с отходами КВ золота (табл. 2.1, рис. 2.2) все химико-аналитические исследования проводила Группа химического анализа природных и сточных вод Отдела охраны окружающей среды АО «Иргиредмет», аттестованная в системе ГОСТ ИСО/МЭК на техническую компетентность (Приложение А). Для определения концентрации токсичных

соединений, содержащихся в технологических растворах (жидкая фаза руды) (рис. 2.2), применяли стандартные методики анализа. Содержание кальция, магния и хлоридов измеряли титриметрическими методами [124–126], сульфатов – турбидиметрическим [127]; общее солесодержание – гравиметрическим [128]. Концентрацию цианидов и тиоцианатов исследовали фотометрическим методом с пиридином и барбитуровой кислотой [129, 130]. Элементный состав металлов определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой [131]. Для определения химического состава твердой фазы руды использовали количественный рентгенофлуоресцентный анализ [по 132]. Минеральный состав технологических проб был взят из технологических регламентов по извлечению золота методом КВ из руд изучаемых месторождений [4, 133–135].

2.2 Модельный эксперимент по детоксикации отходов КВ золота

Исследования по биодетоксикации отходов КВ золота проводили в течение длительного хранения (593 суток) предварительно простерилизованных и нестерильных проб руды в модельных условиях зонирования рудного штабеля КВ.

Для комплексного анализа рудную массу, отобранную из общей валовой пробы месторождения «Подгольное» (табл. 2.1), усредняли методом квартования. Для выравнивания химического состава влаги рудной массы пробу руды промывали технологическим раствором и делили на две равные части, одну из которых использовали в качестве контроля биodeградации. Для подготовки *контрольного образца* пробу руды подвергали дробной стерилизации автоклавированием 3 раза в течение 1 ч при 121°C, с промежутком 24 ч [136, 137]. После остывания контрольный образец промывали технологическим раствором, простерилизованный через стерильные нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США). Для сохранения стерильности хранение проводили в стерильной таре со встроенным нитроцеллюлозным фильтром, исключая аэрацию нестерильным воздухом. Все работы по забору образцов в эксперименте осуществляли в стерильном боксе.

Условия хранения были подобраны с учетом неоднородности рудного штабеля в естественных условиях складирования (табл. 2.3).

Таблица 2.3

Характеристика слоев, присутствующих в рудном штабеле КВ золота в естественных условиях складирования

Слой	Колебания температуры*	Влажность	Аэрация	Наличие в рудном штабеле
1	сезонные колебания (лето +20°C; зима -18°C)	сезонные колебания	+	Обязательно присутствует
2	сезонные колебания (лето +20°C; зима -18°C)	практически постоянна	+	Обязательно присутствует
3	нет (0-4°C)	постоянна	+	Обязательно присутствует
4	нет (0-4°C)	постоянна	-	Наличие не обязательно

Примечание: * – сезонные колебания температур в слоях, присутствующих в складированном рудном штабеле КВ золота, представлены как средние температуры в летние и зимние месяцы [8].

Использовали разный температурный режим (+20°C, +4°C, -18°C) и наличие или отсутствие аэрации. Было проведено четыре эксперимента, в которых исходную рудную массу хранили в разных условиях зонирования штабеля КВ:

1. модельные условия слоя 2 (летний период) – рудную массу хранили с аэрацией при +20°C;
2. модельные условия слоя 2 (зимний период) – рудную массу хранили при -18°C, удаление кислорода (дегазацию) в исходной пробе не проводили;
3. модельные условия слоя 3 – рудную массу хранили с аэрацией при +4°C;
4. модельные условия слоя 4 – рудную массу хранили без аэрации при +4°C.

Эти условия соответствовали характеристикам слоев, присутствующих в складированном рудном штабеле КВ золота (табл. 2.3), за исключением первого, который не был изучен из-за незначительной его мощности и незначительного влияния на деструкцию цианидов [8]. Следует отметить, что пробы хранили в определенных модельных условиях независимо друг от друга, таким образом была исключена миграция токсичных соединений между слоями.

Забор образцов для комплексного анализа и контроль стерильности эксперимента проводили 1 раз в 2 месяца. Для *оценки стерильности* осуществляли высев водной вытяжки предварительно простерилизованных образцов на поверхность твердой среды NSY следующего состава (г/л): питательный бульон – 1.0, соевый пептон – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0 и агар – 15.0. Чашки инкубировали при 20–25°C. Учет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили на 3 и 7 сутки. Стерильными считали образцы, не дающие роста на 7 сутки культивирования.

Содержание токсичных веществ во влаге рудной массы оценивали методом водных и щелочных вытяжек [8]. Определение цианидов и тиоцианатов проводили в щелочной вытяжке, что позволило исключить потерю цианида в газовую фазу в виде синильной кислоты. Концентрацию нелетучих токсичных веществ исследовали в водной вытяжке. Для приготовления вытяжек к твердому образцу (Т) приливали стерильную воду $H_2O_{\text{дист.}}$ или NaOH (Ж), в соотношении Ж:Т=1:1 и агитировали на орбитальном шейкере (New Brunswick Scientific, США) в течение четырех часов в герметичной посуде. Полученную смесь фильтровали через бумажные фильтры, фильтрат использовали для определения концентрации токсичных веществ в вытяжке (C_{np}) с помощью описанных ранее стандартных методик (раздел 2.1). Пересчет содержания подвижных токсичных веществ во влаге рудной массы ($C_{вл}$) проводили по формуле:

$$C_{вл} = C_{np} \times \left(1 + \frac{V_{\text{воды}} \times 100}{W \times m_{np}} \right), \text{ где} \quad (2.1)$$

$C_{вл}$ – концентрация вещества во влаге рудной массы, мг/дм³;

C_{np} – концентрация вещества в водной/щелочной вытяжке, мг/дм³;

$V_{\text{воды}}$ – объем добавленной жидкой фазы, л;

m_{np} – масса пробы, взятой на анализ, кг;

W – влажность, %.

2.3 Молекулярно-генетические методы

2.3.1 Выделение геномной ДНК

Суммарную геномную ДНК выделяли из технологического раствора и руды рудного штабеля КВ. Бактериальный материал из технологического раствора концентрировали фильтрованием 50 мл на стерильных нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0.22 мкм. Биомассу смывали с фильтра лизирующим раствором из соответствующего набора и на следующих этапах лизат обрабатывали по протоколу фирмы-изготовителя. Для эффективного выделения суммарной ДНК из рудной массы все стадии лизиса клеток проводили в трёх повторностях, на этапе очистки ДНК от примесей нуклеотидный материал объединяли в одну пробирку.

Для адаптации методов выделение суммарной ДНК из проб руды месторождения «Самолазовское» (рис. 2.2) проводили с помощью коммерческих наборов AxyPrep Bacterial Genomic DNA kit (Axygen Biosciences, США), ДНК-сорб Б и РИБО-сорб (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

Выделение суммарной ДНК коммерческим набором AxyPrep Bacterial Genomic DNA kit проводили по инструкции фирмы-производителя. Ферментативный лизис осуществляли буфером S, содержащим ферменты РНКазу А и лизоцим. Экстракцию растворимых фракций белков и компонентов клеточной стенки осуществляли органическими буферами G-A, G-B и DV из набора. Осаждение и удаление нерастворимых компонентов проводили на пористом фильтре. Далее для селективной сорбции нуклеиновых кислот (НК) на колонках добавляли буфер BV, выдерживали в течение 3–5 мин при комнатной температуре. Отмывку обогащенной фракции НК осуществляли отмывочными буферами из набора. Элюцию НК вели TE буфером (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА; рН 7.5). ДНК хранили при температуре –20°С и использовали в качестве матрицы в ПЦР анализе.

Выделение суммарной ДНК коммерческими наборами ДНК-сорб Б и РИБО-сорб проводили по инструкции фирмы-производителя с небольшими модификациями. Лизис вели 300–450 мкл лизирующего буфера из соответствующего коммерческого набора в течение 30 мин при 65°С и

периодическом перемешивании. Клеточный дебрис удаляли из лизата после центрифугирования в течение 5 мин при 12000 об/мин, к надосадочной жидкости добавляли 25 мкл сорбента. Отмывки сорбента вели строго по прилагаемым к наборам инструкциям, затем его подсушивали 5–10 мин при 60°C. Элюцию НК проводили безбактериальной водой и/или TE буфером, ДНК хранили при температуре –20°C и использовали в качестве матрицы в ПЦР анализе.

В остальных экспериментах выделение ДНК из технологического раствора и руды рудного штабеля КВ разных месторождений (табл. 2.1), проводили коммерческим набором AxyPrep Bacterial Genomic DNA kit.

2.3.2 Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию на консервативных бактериальных праймерах использовали для изучения разнообразия представителей автохтонных бактериальных сообществ технологического раствора и руды рудного штабеля КВ всех месторождений. При адаптации молекулярно-генетических методов для оценки эффективности выделения суммарной ДНК проводили групп-специфичную амплификацию (табл. 2.1). Структуры праймеров, использованных в работе, представлены в Приложении Б. В качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с групп-специфичными праймерами (табл. 2.4) использовали суммарную геномную ДНК рудной массы месторождения «Самолазовское».

Для идентификации представителей автохтонных бактериальных сообществ разных месторождений проводили амплификацию с консервативными бактериальными праймерами 500L–1350R (табл. 2.4). Полученные ампликоны клонировали в компетентных клетках *Escherichia coli*. В состав реакционной смеси (объем 25 мкл) для проведения полимеразной цепной реакции входили следующие компоненты: 1×ПЦР буфер (рН 8.8), 2.5 мМ MgCl₂, 1 мМ дНТФ (суммарная концентрация), два праймера (по 10 пмоль каждого), *Taq* ДНК-полимераза (0.5 ед. акт./25 мкл реакционной смеси) и от 10 до 50 нг матричной ДНК.

Режим реакции включал 35 циклов и состоял из 3 стадий: денатурация при 94°C, 45 с; отжиг праймеров – температура и время варьировали в зависимости от

пары используемых праймеров (табл. 2.4); элонгация – 72°C, 1 мин. Первоначально реакционную смесь прогревали при 94°C в течение 3 мин; в последнем цикле время элонгации увеличивали до 3–10 мин.

Таблица 2.4

Пары праймеров, использованные при адаптации молекулярно-генетических методов исследований и идентификации представителей автохтонных бактериальных сообществ

Название праймера	Целевая филогенетическая группа/класс	Размер ампликона, п.н.	Температура отжига
Идентификация микроорганизмов			
EUB500L–EUB1350R	<i>Eubacteria</i>	850	52
Адаптация молекулярно-генетических методов исследований			
ARC344F–ARC915R	<i>Archaea</i>	571	58
CYA106L–CYA781R	<i>Cyanobacteria</i>	675	58
EUB338L–ALF685R	<i>Alphaproteobacteria</i>	347	58
ADF681L–EUB1350R	<i>Alpha- u Deltaproteobacteria</i>	668	58
nitAL–nitBR	<i>Proteobacteria</i>	450	58
BET680L–EUB1350R	<i>Betaproteobacteria</i>	670	58
EUB338L–BET663R	<i>Betaproteobacteria</i>	325	58
CF319L–EUB1350R	<i>Bacteroidetes</i>	1031	58
PLA46L–EUB1350R	<i>Planctomycetes</i>	1304	58
BLS342L–EUB1350R	<i>Firmicutes</i>	1008	58
LGC353L–EUB1350R	<i>Firmicutes</i>	997	58
EUB338L–ACT1159R	<i>Actinobacteria</i>	821	58
ACT235L–ACT1159R	<i>Actinobacteria</i>	821	58
TFV540L–EUB1350R	<i>Verrucomicrobia</i>	810	58
EUB338L–BCD708R	<i>Bacteroidetes</i>	370	58
TTG286L–EUB1350R	<i>Thermotogae</i>	1064	58

Анализ результатов амплификации вели в 1.5% агарозном геле (1×ТАЕ: 40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА, pH 7.6; 2 мкг/мл этидиум бромид). Продукты амплификации визуализировали на трансиллюминаторе (ЕСХ-26.МХ). Ампликоны нужной длины ДНК вырезали из геля, элюировали замораживанием-оттаиванием и использовали для клонирования.

Для анализа рекомбинантных клонов готовили лизат прокипяченных клеток. Для этого биомассу клеток переносили в 20 мкл безбактериальной воды, суспензию кипятили 5 мин, а затем замораживали. После разморозки лизат центрифугировали

(15 мин, 12000 об/мин) и использовали в качестве матрицы в ПЦР-анализе. Наличие вставки нужной длины определяли с помощью амплификации с плазмидными праймерами pJet 1.2 L/R (Приложение Б), поставляемыми с набором GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва). Для скрининга использовали ПЦР-набор (Евроген, Россия). Режим реакции включал: 94°C – 2 мин (1 цикл); 94°C – 45 сек, 55°C – 45 сек, 72°C – 60 сек (30 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл). Полученные ампликоны анализировали электрофорезом в 1.5% агарозном геле, фрагменты нужной длины вырезали, элюировали замораживанием-оттаиванием и использовали в качестве матрицы в сиквенсной реакции.

2.3.3 Молекулярное клонирование ампликонов

Клонирование ампликонов 16S рДНК проводили с использованием коммерческого набора GeneJET™ PCR Cloning Kit и компетентных клеток *E. coli* (штамм XL-1). Перед лигированием проводили затупление концов, для этого в 1×буфере к 7.0 мкл ампликона добавляли 1.0 мкл фермента DNA-blunting, инкубировали при температуре 70°C в течение 5 мин и охлаждали во льду. К смеси добавляли 1.0 мкл вектора pJET/blunt и 1.0 мкл фермента T4 ДНК-лигаза, общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Лигирование вели не менее 30 мин при комнатной температуре. Лигазную смесь (3–5 мкл) добавляли к 50 мкл CaCl₂-зависимых компетентных клеток *E. coli* и проводили трансформацию в стандартных условиях [138]. Скрининг колоний вели на среде LB (г/л): дрожжевой экстракт – 5.0, триптон – 10.0, NaCl – 10.0, агар – 15.0, содержащей 20 мкг/мл ампициллина. Анализ всех выросших рекомбинантных клонов на наличие вставки проводили амплификацией.

2.3.4 Секвенирование по Сэнгеру

Сиквенсную реакцию вели с набором BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя. В реакцию брали 10–20 нг ампликона и 3–5 пмоль праймера. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

2.3.5 Метагеномное секвенирование ампликонов

Фрагмент гена 16S рРНК, содержащий пять переменных районов V4–V8, амплифицировали на бактериальных праймерах:

5'–CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-XCCAGCAGCYGCGGTAAN–3'

5'–CSTATCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-GACGGGCGGTGTGTACAAG–3', где

X – 10-нуклеотидный бар-код, уникальный для каждого отдельного образца.

Для амплификации в состав реакционной смеси (50 мкл) входили следующие компоненты: 1× буфер High-Fidelity, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM каждого дНТФ, 0.2 мкМ прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК и 0.7 ед. акт. ДНК-полимеразы High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, США). Температурный режим амплификации был следующий: начальная денатурация матрицы при 95°C – 5 мин (1 цикл), 94°C – 15 сек, 58°C – 15 сек, 72°C – 15 сек (30 циклов), и постэлонгация при 72°C – 10 мин. Ампликоны визуализировали в 1% агарозном геле, реакционную смесь очищали от низкомолекулярных продуктов на магнитных частицах с помощью набора SeqCap EZ Pure Capture Beads Kit (Roche, США). Концентрацию ДНК измеряли спектрометрически на приборе NanoVue и флуориметрически – на флуориметре (Qubit® 2.0, Thermo Fisher Scientific, США) с помощью набора (Qubit dsDNA, Thermo Fisher Scientific, США). Готовили суммарный пул ампликонов, содержащий по 1.5 нг каждого, проводили двойную очистку на магнитных частицах и использовали для эмульсионной ПЦР на реактивах GS Junior+. Метагеномное секвенирование ампликонов 16S рДНК проводили на реактивах GS Junior+ и пиросеквенаторе 454 GS Junior System (Roche, США).

2.4 Биоинформационная обработка молекулярных данных

Редактирование последовательностей, полученных после *секвенирования по Сэнгеру*, проводили вручную с помощью редактора BioEdit. Последовательности анализировали с использованием онлайн сервисов FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>) и BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для идентификации полученных последовательностей проводили сравнительный анализ с ближайшими гомологами из международных баз данных (Genbank и EMBL). По рекомендации

Международного комитета по систематике бактерий для филогенетических таксонов установлены определенные уровни гомологии рибосомных генов (16S рРНК), которые позволяют провести их идентификацию. В данных рекомендациях гомология между таксонами от 82–88% позволяет определить принадлежность к классу одной филы, 88–93% принадлежность к порядку одного класса, от 93 до 95% – к семейству, от 95 до 98% – к роду, а выше 98% – к виду исследуемого таксона [139].

Филогенетические взаимоотношения с ближайшими гомологами оценивали с помощью пакета программ Mega v. 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>). Построение диаграммы Венна проводили с помощью программного пакета Mothur v. 1.32.1 (<http://www.mothur.org>). Нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных EMBL EBI (ENA) и им присвоены следующие номера: для представителей автохтонного бактериального сообщества технологического раствора и руды рудного штабеля КВ месторождения «Бабушкина гора» – LK392396–LK392456, месторождения «Чазы Гол» – LT854865–LT854880, месторождения «Самолазовское» – LT854838–LT854864.

Метагеномный анализ. Разнообразие и таксономический состав автохтонных бактериальных сообществ определяли с использованием онлайн сервиса RDP Pipeline (<https://pyro.cme.msu.edu>) [140]. Химерные последовательности и последовательности короче 300 нуклеотидов были исключены из анализа. Длина анализируемых последовательностей варьировала от 500 до 550 п. н. Всего было получено 119151 последовательностей, по 3894–6685 шт. для каждой пробы. Выделение филотипов (операционных таксономических единиц – ОТЕ) проводили при кластерном расстоянии 0.03. Для определения видового разнообразия, таксономического состава и сравнения сообществ применяли пакет программ Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu>). Результаты метагеномного анализа зарегистрированы в международной базе данных NCBI (SRA): BioProject № PRJNA420452.

2.5 Статистический анализ

Для оценки видового богатства были рассчитаны индексы разнообразия (Chao1 и Шеннона), построены кривые накопления видов (<https://pyro.cme.msu.edu>). Для определения различий между бактериальными сообществами строили диаграммы Венна, а также применяли метод главных компонент (PCA), результаты которого представлены в виде PCA графика. Для подтверждения влияния экологических факторов (температуры и аэрации), а также степени утилизации токсичных соединений на разнообразие бактериальных сообществ и представленность ОТЕ был проведен непараметрический многомерный статистический анализ дисперсии (PERMANOVA) с использованием индекса Брея–Кертиса (Bray-Curtis).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование роли автохтонных бактериальных сообществ в пассивной детоксикации отходов КВ золота

На сегодняшний день в нашей стране С.В. Петровым разработана технология пассивного обезвреживания отходов КВ золота под действием природных факторов [8]. Им изучены основные процессы экохимической детоксикации отходов КВ. Однако роль автохтонных бактериальных консорциумов в пассивной детоксикации цианидсодержащих отходов, расположенных на территории РФ, на сегодняшний день не оценивалась.

Процесс КВ золота проводится на открытых площадках производства в течение длительного времени в естественных условиях окружающей среды. Очевидно, что в штабеле КВ активно развиваются бактерии, с одной стороны устойчивые к цианидсодержащим соединениям и тяжелым металлам, с другой стороны способные использовать их в своих метаболических реакциях. Эти микроорганизмы могут обладать биотехнологическим потенциалом к деструкции различных токсичных соединений. Предполагается, что результат деятельности бактериальных сообществ в детоксикации отходов КВ золота может быть более значим по сравнению с простым химическим окислением. Моделирование пассивного обезвреживания и развернутая, полная характеристика развивающихся бактериальных сообществ позволит разработать экологически выгодный и экономически эффективный подход в биодетоксикации отходов КВ.

3.1.1 Химический и минеральный состав технологических проб исследуемых месторождений

Экологические факторы, такие как климатические условия, территориальное расположение месторождения и установки КВ, а также минеральный и химический состава рудного материала значительно влияют на применение возможных методов обезвреживания отходов. Для оценки их влияния на эффективность биодетоксикации отходов КВ золота, были исследованы четыре природно-техногенных комплекса КВ, отличающиеся территориальной расположенностью.

Учитывая, что мероприятия по обезвреживанию должны затрагивать как отработанный рудный штабель, так и технологический раствор, в работе проведен химический анализ жидкой (которой соответствует технологический раствор) и твердой фазы руды всех месторождений. Дополнительно к этому приведен минеральный состав исследуемых проб руды, согласно [4, 133–135].

Технологические растворы исследуемых месторождений имели от щелочных до слабощелочных значения pH, которые составили для месторождений «Бабушкина гора» и «Подгоlechное» – 12.1, «Самолазовское» – 11.6 и «Чазы Гол» – 7.8. Общим для всех четырех месторождений было наличие высоких концентраций цианидов, тиоцианатов и некоторых тяжелых металлов (табл. 3.1).

Максимальные показатели CN^- и SCN^- -ионов отмечены для месторождения «Бабушкина Гора» (132.0 и 19.0 мг/дм³ соответственно). Самые низкие – для месторождений «Чазы Гол» (6.4 и 13.3 мг/дм³) и «Самолазовское» (19.3 и 1.6 мг/дм³) (табл. 3.1). Среди тяжелых металлов в технологических растворах всех месторождений максимальные концентрации отмечены для меди (от 50 до 17200 ПДК) и никеля (от 18 до 710 ПДК). Дополнительно к вышеперечисленным металлам в месторождениях «Бабушкина гора», «Самолазовское» и «Подгоlechное» наблюдали присутствие алюминия (от 1.4 до 5.0 мг/дм³), содержание которого превышало значение ПДК.

Химический состав технологических растворов КВ исследуемых месторождений

Определяемые компоненты	Месторождения				ПДК****	Диапазон измерений
	«Бабушкина Гора»	«Чазы Гол»	«Самолазовское»	«Подголецное»**		
	Концентрация, мг/дм ³					
Общее солесодержание	1620.0	5332.0	608.0	960.0		10.0–2000.0
Кальций	375.0	516.0	88.0	160.0	180.0	1.0–500.0
Магний	н.о.*	34.0	н.о.	н.о.	40.0	1.0–50.0
Хлориды	11.0	87.0	51.0	18.0	300.0	10.0–300.0
Сульфаты	н.о.	2738.0	н.о.	37.0	100.0	2.0–3000.0
Цианиды	132.0	6.4	19.3	44.1/307.0***	0.05	0.005–500.0
Тиоцианаты	19.0	13.3	1.6	7.8/9.1***	0.1	0.02–200.0
Алюминий	2.12	н.о.	5.00	1.40	0.04	0.010–50.0
Мышьяк	н.о.	0.31	н.о.	0.01	0.05	0.0010–50.0
Висмут	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.1	0.010–10.0
Кадмий	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.005	0.00010–10.0
Кобальт	0.01	2.48	0.01	0.06	0.01	0.0010–10.0
Медь	0.05	1.76	0.40	17.20	0.001	0.0010–50.0
Железо	н.о.	0.31	н.о.	н.о.	0.10	0.050–50.0
Марганец	н.о.	0.61	н.о.	н.о.	0.01	0.0010–10.0
Никель	0.02	0.71	0.13	0.35	0.001	0.0010–10.0
Свинец	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.1	0.0010–10.0
Сурьма	н.о.	0.03	н.о.	н.о.	0.05	0.0050–50.0
Цинк	0.14	0.03	0.20	0.01	0.01	0.0050–50.0

Примечание:

н.о.* – не обнаружено

** Все компоненты технологического раствора месторождения «Подголецное», за исключением цианидов и тиоцианатов анализировали только до внесения концентрированных растворов NaCN и KSCN.

*** Содержание цианидов и тиоцианатов после внесения концентрированных растворов NaCN и KSCN.

**** ПДК даны для водных объектов рыбохозяйственного назначения.

Присутствие таких тяжелых металлов, как цинк и кобальт было отмечено в жидкой фазе руды всех месторождений. При этом превышали ПДК концентрации цинка в месторождениях «Бабушкина гора», «Самолазовское» и «Чазы Гол» и составляли от 0.03 до 0.2 мг/дм³, а кобальта – в месторождениях «Чазы Гол» и «Подгоlechное» (2.48 и 0.06 мг/дм³ соответственно) (табл. 3.1).

Наибольшие отличия от других месторождений определены для месторождения «Чазы Гол», где кроме вышеперечисленных металлов отмечены высокие концентрации марганца (61 ПДК), мышьяка (6.2 ПДК) и железа (3.1 ПДК) (табл. 3.1). Дополнительно, для данного месторождения наблюдали самое высокое содержание сульфатов (2738.0 мг/дм³).

Таким образом, природно-техногенные комплексы, расположенные в Красноярском Крае («Бабушкина гора») и в Республике Саха (Якутия) («Самолазовское» и «Подгоlechное») были сходны по химическому составу технологического раствора. Месторождение, локализованное в Республике Хакасия («Чазы Гол»), отличалось от вышеперечисленных по наличию в составе технологического раствора высоких концентраций сульфатов и таких тяжелых металлов как марганец, мышьяк и железо, значения которых превышали ПДК.

Главными компонентами *твёрдой фазы руд* всех месторождений выступали кремнезем (массовая доля от 53.7 до 72.1%) и глинозем (от 7.3 до 21.1%) (табл. 3.2) из-за присутствия кварца, полевых шпатов и глинисто-слюдистых минералов (табл. 3.3).

Максимальное содержание SiO₂ отмечено для руды месторождения «Самолазовское» – 72.1%, минимальное – для руды месторождения «Подгоlechное» – 53.7%. Наибольшая массовая доля Al₂O₃ определена в руде месторождения «Бабушкина гора» (21.1%), наименьшая – «Самолазовское» (7.3%) (табл. 3.2). Суммарное содержание щелочных и щелочноземельных металлов (в виде K₂O, Na₂O, CaO, MgO) варьировало от 5.5 до 22.7% (табл. 3.2).

Доля общего железа не превышала 5.14% и во всех месторождениях находилась практически на одинаковом уровне. Содержание общей серы в исследуемых месторождениях варьировало от 0.010 до 1.360%, максимальная

массовая доля была отмечена для месторождения «Чазы Гол» (табл. 3.2). Содержание общего мышьяка и марганца в исследуемых рудах четырех месторождений так же различалось. Наибольшая массовая доля $As_{\text{общ}}$ определена в руде месторождения «Чазы Гол» (0.330%), MnO – в руде месторождения «Самолазовское» (0.76%) (табл. 3.2). Максимальное содержание меди было отмечено в месторождение «Подголецное» (0.013%).

Таблица 3.2

Химический состав твердой фазы рудного штабеля КВ исследуемых месторождений

Определяемые компоненты	Месторождения			
	«Бабушкина Гора»	«Чазы Гол»	«Самолазовское»	«Подголецное»
	Массовая доля, %			
SiO_2	55.6	56.9	72.1	53.7
Al_2O_3	21.1	7.5	7.3	11.3
TiO_2	1.20	0.35	0.26	0.42
MgO	0.70	4.57	1.10	5.00
K_2O	3.80	1.60	1.40	4.10
Na_2O	1.0	1.2	0.3	2.7
CaO	0.04	8.62	8.30	10.90
$Fe_{\text{общ}}$	4.19	4.84	4.80	5.14
$S_{\text{общ}}$	0.035	1.360	0.010	0.371
$As_{\text{общ}}$	0.105	0.330	0.051	0.009
MnO	0.014	0.20	0.76	0.07
P_2O_5	0.03	0.35	0.04	0.26
Sb	<0.001	0.012	0.020	<0.001
Ni	0.005	0.010	0.005	н.д.*
Cu	0.002	<0.001	<0.001	0.013
Zn	0.004	0.006	0.110	н.д.
Pb	0.001	<0.001	0.090	н.д.

Примечание: н.д.* – не детектировали

В целом состав твердой фазы руды исследуемых месторождений различался. По содержанию основных компонентов таких, как SiO_2 , Al_2O_3 и щелочноземельных металлов, отличия варьировали от 1.5 до 4 раз, а по массовой доле серы, мышьяка, марганца и меди – более чем на один-два порядка величин.

Минеральный состав технологических проб руды исследуемых месторождений приведен в таблице 3.3. Характеристика руд представлена по данным технологических регламентов [4, 133–135].

Минеральный состав руд исследуемых месторождений

Минералы и группы минералов	Месторождение			
	«Бабушкина Гора»	«Чазы Гол»	«Самолазовское»	«Подгольное»
Массовая доля, %				
Кварц, халцедон, опал и др.	54.0	52.2	53.0	13.0
Карбонаты (кальцит, доломит, магнезит, переходные разности карбонатов)	<1.0	23.8	16.0	39.0
Полевые шпаты (альбит, амфибол, ортоклаз, турмалин и др. алюмосиликаты)	Редкие и единичные зерна	7.0	6.3	36.0
Глинисто-слюдистые минералы, новообразования (гидромусковит, серицит, коалинит, гидрокоалинит, иллит, аллофан, парагонит)	40.0	13.6	11.7	10.0
Оксиды железа и марганца (гематит, гетит, гидрогетит, магнетит, псиломела и др.)	4.0	0.2	13.0	Редкие и единичные зерна
Минералы из класса сульфидов (арсенопирит, галенит, пирит, марказит, антимонит, сфалерит)	0.03	3.2	Редкие и единичные зерна	1.0
Примеси (апатит, сфен, флюорит, циркон, гранат, рутил)	1.0	Редкие и единичные зерна	Редкие и единичные зерна	Редкие и единичные зерна
Итого	100	100	100	100
Источник	[133]	[134]	[135]	[4]

Породообразующие минералы руды *месторождения «Бабушкина гора»* составляли 94.0%, основными из которых выступали кварц (54.0%) и глинисто-слюдистые минералы (40.0%, где серицит составлял 33.0%, а парагонит – 7.0%). Оксиды железа преимущественно были представлены гетитом (4.0%), а минералы из класса сульфидов – арсенопиритом (0.03%) (табл. 3.3). В массе слюд были отмечены ксеноморфные выделения карбонатов (магнезит (<1.0%)), включения рутила (1.0%), а также редкие и единичные зерна полевых шпатов (турмалина) [133].

Руда *месторождения «Чазы Гол»* так же на 96.6% состояла из породообразующих минералов. По массе среди них преобладал кварц (52.2%), значительную долю составляли карбонаты (23.8%) и глинисто-слюдистые минералы (в основном серицит) (13.6%). В отличие от месторождения «Бабушкина гора», гидроксиды и оксиды железа в руде месторождения «Чазы Гол» составляли всего 0.2%. Доля сульфидов находилась в пределах 3.2%, при этом 2.5% было представлено пиритом и 0.7% – арсенопиритом (табл. 3.3). Такие минералы как апатит, рутил, гранат и сфен фиксировались в редких и единичных зернах. Массовая доля полевых шпатов составляла 7.0% [134].

Породообразующие минералы руды *месторождения «Самолазовское»* составляли 87.0%, основными из которых выступали кварц (53.0%) и глинисто-слюдистые минералы (гидрослюда, каолинит, гидрокаолинит и аллофан – 11.7%). Для данной руды было характерно наличие высокого содержания оксидов железа (преимущественно представленных гематитом – 13.0%) и карбонатов (доломитовые разности – 16.0%). В отличие от трех других изучаемых месторождений минералы класса сульфидов находились в редких и единичных зернах. Содержание минералов, относящихся к полевым шпатам, составило 6.3% [135] (табл. 3.3).

Руда *месторождения «Подголецное»* отличалась от других руд исследуемых месторождений повышенным содержанием карбонатов, представленных преимущественно доломитом – 39.0%. Дополнительно наблюдается присутствие высокой доли полевых шпатов (36.0%), 26.0% из которых представлены ортоклазом, 6.0% – альбитом и 4.0% – амфиболом (табл. 3.3). Кварц и глинисто-слюдистые минералы составляли всего 13.0 и 10.0% соответственно. С кварцем ассоциируются минералы класса сульфидов в виде пирита (1.0%) и арсенопирита (редкие и единичные зерна). Оксиды железа и марганца, в виде скопления мелкоагрегатного сидерита с анкеритом, флюорита формировали редкие и единичные зерна [4].

Таким образом, технологические пробы руды исследуемых месторождений отличались по минеральному составу. Породообразующие минералы руд

месторождений «Бабушкина гора», «Чазы Гол» и «Самолазовское» были преимущественно представлены кварцем и слюдами. В отличие от них для руды месторождения «Подгоlechное» было характерно присутствие высокой доли полевых шпатов и карбонатов. Все четыре технологические пробы руды отличались по содержанию групп минералов оксидов железа и марганца, а также минералов из класса сульфидов. Учитывая, что минеральный и химический состав всех месторождений различался, для выявления закономерностей все основные компоненты технологического раствора и рудной массы сведены в таблицу 3.4.

Таблица 3.4

Сравнительный анализ основных компонентов технологического раствора и рудной массы изучаемых месторождений

Определяемые компоненты	Месторождения			
	«Бабушкина Гора»	«Чазы Гол»	«Самолазовское»	«Подгоlechное»
Цианиды	132.0	6.4	19.3	44.1
Тиоцианаты	19.0	13.3	1.6	7.8
Медь	0.05	1.76	0.40	17.20
Никель	0.02	0.71	0.13	0.35
Кальций	375.0	516.0	88.0	160.0
СаО	0.04	8.62	8.30	10.9
Минералы класса карбонаты	<1.0	23.8	16.0	39.0
Сульфаты	н.о.*	2738.0	н.о.	37.0
Soбщ.	0.035	1.36	0.010	0.371
Минералы из класса сульфидов	0.03	3.2	р.е.з.**	1.0
Алюминий	2.12	н.о.	5.0	1.4
Al ₂ O ₃	21.1	7.5	7.3	11.3
Глинисто-слюдястые минералы	40.0	13.6	11.7	10.0
Железо	н.о.	0.61	н.о.	н.о.
Fe _{общ.}	4.19	4.84	4.80	5.14
Оксиды железа и марганца	4.0	0.2	13.0	р.е.з.
Марганец	н.о.	0.31	н.о.	н.о.
MnO	0.014	0.20	0.76	0.07

Примечание: * – не определяли, ** – редкие и единичные зерна

Сравнительный анализ исследуемых месторождений (табл. 3.4) показал, что месторождение «Подголецкое» характеризуется средним содержанием основных компонентов технологических растворов и рудных масс: цианидов, тиоцианатов, сульфатов, меди, никеля, кальция, алюминия, железа и марганца. Поэтому на первом этапе работы было целесообразно проведение модельного эксперимента по исследованию детоксикации отходов КВ золота под действием бактериального фактора с учетом зонирования и неоднородности температурного режима и аэрации рудного штабеля на примере именно этого месторождения. Этот эксперимент предусматривал длительное хранение рудной массы, поэтому технологический раствор подкрепляли концентрированными растворами NaCN и KSCN, в результате чего содержание цианидов увеличивалось с 44.1 до 307.0 мг/дм³, а тиоцианатов – с 7.8 до 9.1 мг/дм³ (табл. 3.1).

Анализ разнообразия доминирующих представителей бактериальных сообществ проводили на рудах всех четырех месторождений для учета влияния экологических факторов, таких как территориальное расположение месторождений, разнофазность объектов КВ, а также особенностей химического и минерального состава их руд.

3.1.2 Детоксикация отходов КВ золота на примере месторождения «Подголецкое»

В технологии КВ главным отходом является отработанный рудный штабель, содержащий в своей влаге цианиды, тиоцианаты и тяжелые металлы [8]. Условно выделяют четыре слоя складированного рудного штабеля КВ. Поверхностные слои подвержены сезонным колебаниям температур, остальные слои по глубине залегания различаются по температурному режиму и аэрации (табл. 2.3). Очевидно, что автохтонные бактериальные сообщества рудного штабеля КВ, адаптированы не только к высоким концентрациям токсичных веществ, но и к соответствующим экологическим условиям окружающей среды, формирующимся в каждом слое.

Динамику деструкции токсичных соединений исследовали в четырех экспериментах, моделируя условия, характерные для 2, 3 и 4 слоя рудного штабеля

КВ (раздел 2.2). Из-за незначительной мощности и не существенного влияния на деструкцию токсичных соединений [8] 1 слой был исключен из анализа. Для создания аналога пассивного обезвреживания рудную массу месторождения «Подголецное» хранили длительное время (593 суток) в модельных условиях зонирования рудного штабеля КВ (каждый слой отдельно друг от друга). Роль автохтонных бактериальных сообществ в детоксикации складированных отходов КВ оценивали в нестерильной рудной массе. Предварительно простерилизованные образцы использовали в качестве абиотического контроля. Контроль стерильности этих образцов показал отсутствие бактериального роста на протяжении всего эксперимента, следовательно, деструкция токсичных соединений была обусловлена только химическими процессами.

За время проведения исследования значения pH в предварительно простерилизованной и нестерильной рудной массе оставались в пределах 9.0–11.0 (рис. 3.1), это свидетельствовало о наличии высокой буферности рудной массы.

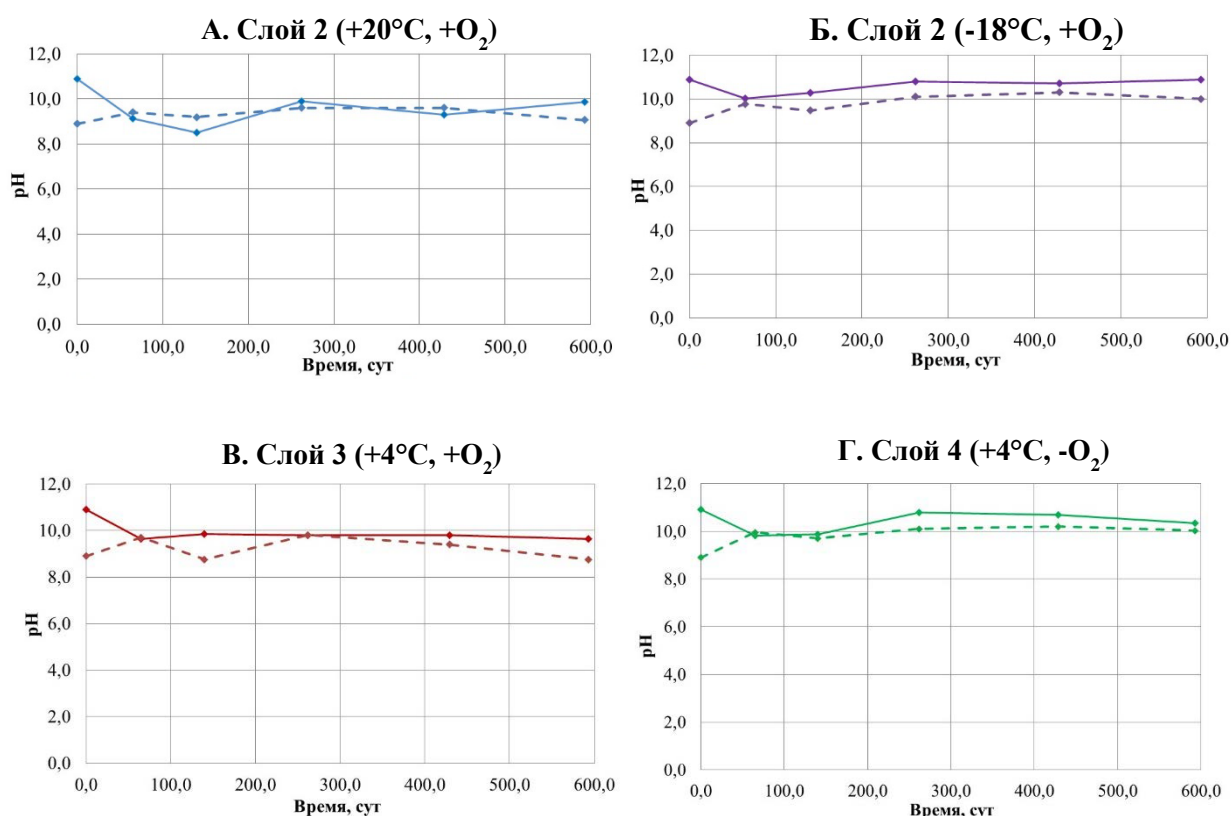


Рисунок 3.1. Изменение pH при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ золота в нестерильной (прямая линия) и предварительно простерилизованной рудной массе (прерывистая линия)

Значения в данном диапазоне рН позволили исключить улетучивание цианидов в виде синильной кислоты на протяжении всего эксперимента.

Влажность образцов во время исследования составляла от 7.0 до 15.0%. Ее учитывали при пересчете концентраций подвижных токсичных веществ, содержащихся во влаге рудной массы.

Концентрация **сульфатов** в нестерильной и предварительно простерилизованной рудной массе варьировала в диапазоне 304.8–2500.0 мг/дм³ (рис. 3.2). В модельных условиях стабильного увеличения концентраций SO_4^{2-} не наблюдали, за исключением слоя 2 (летний период) (рис. 3.2, А). Это свидетельствовало об окислении сульфидных минералов при +20°C, а также о том, что процесс окисления сульфидов не зависел от биотического фактора и наличия кислорода.

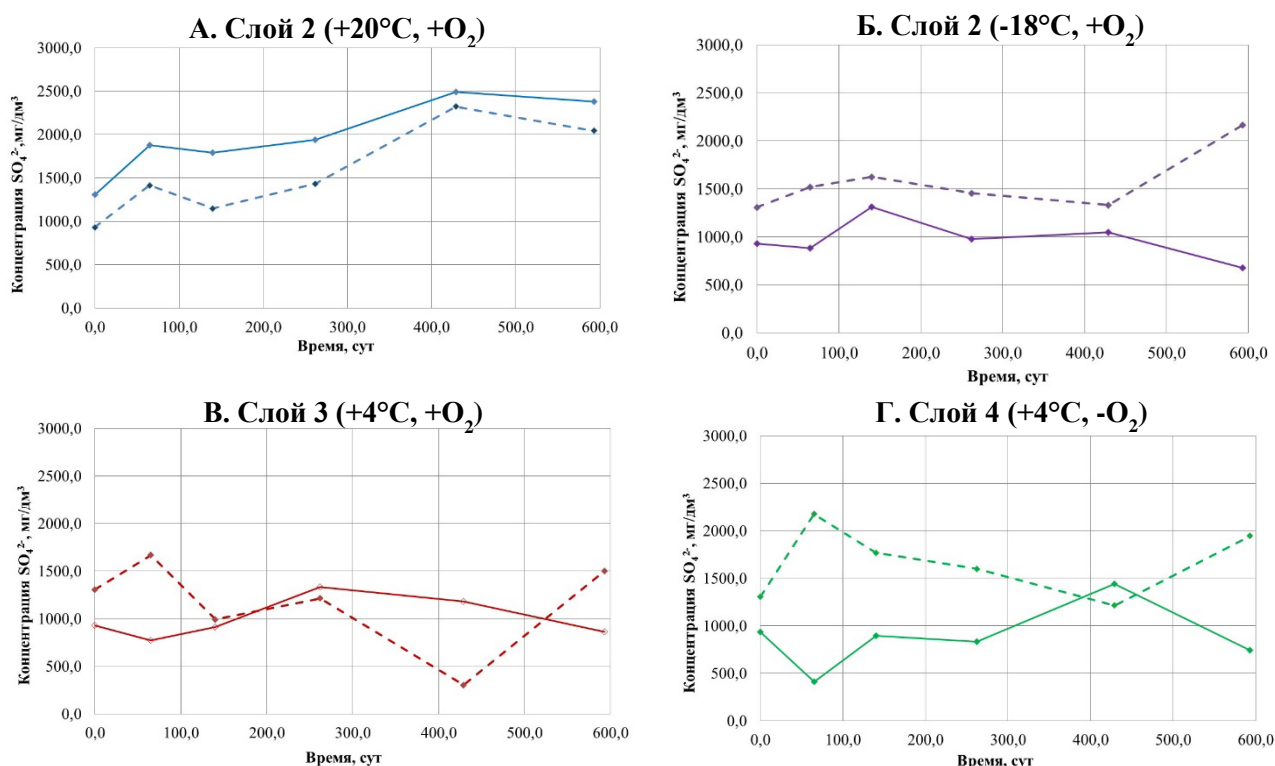


Рисунок 3.2. Изменение концентраций сульфатов при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ золота в нестерильной (прямая линия) и предварительно простерилизованной рудной массе (прерывистая линия)

Из-за высокой буферности рудного материала не происходило снижение рН (рис. 3.1, А) даже при наличии окислительных процессов в слое 2. Эти результаты

позволяют исключить образование кислых дренажных вод в процессе биодетоксикации отходов КВ.

В рудной массе месторождения «Подгоlechное» к основным токсичным соединениям были отнесены *цианиды, тиоцианаты, медь* и *никель*. Их исходные и остаточные концентрации в нестерильной и предварительно простерилизованной рудной массе за период проведения модельного эксперимента представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5

Исходные и остаточные концентрации основных токсичных соединений за период проведения модельного эксперимента

Определяемые компоненты	Исходная концентрация, мг/дм ³	Модельные условия рудного штабеля КВ			
		Слой 2–лето (+20°C; +O ₂)	Слой 2–зима (-18°C; +O ₂)	Слой 3 (+4°C; +O ₂)	Слой 4 (+4°C; -O ₂)
		Остаточная концентрация, мг/дм ³			
Нестерильная рудная масса					
Цианиды	81.6	0.05	54.1	0.05	3.1
Тиоцианаты	13.3	20.1	4.3	21.4	19.6
Медь	20.3	0.22	13.9	0.24	1.1
Никель	0.50	0.0	1.5	0.03	0.30
Предварительно простерилизованная рудная масса					
Цианиды	85.9	0.9	72.0	22.3	49.2
Тиоцианаты	15.6	37.2	14.2	25.9	30.2
Медь	16.9	0.36	20.5	18.1	19.3
Никель	0.35	0.0	0.41	0.95	0.41

Снижение концентраций *цианидов* происходило как в нестерильной, так и предварительно простерилизованной рудной массе (табл. 3.5 и 3.6, рис. 3.3). Самая интенсивная деструкция отмечена в условиях положительных температур и при аэрации – модельные условия слоя 2 (летний период) и слоя 3 (рис. 3.3). В данных условиях к концу проведения эксперимента деструкция цианидов составила 98.9 и 99.3% – в нестерильной и 98.0 и 74.1% – в предварительно простерилизованной рудной массе (табл. 3.6). При этом скорость деструкции в присутствии бактериальных сообществ значительно отличалась.

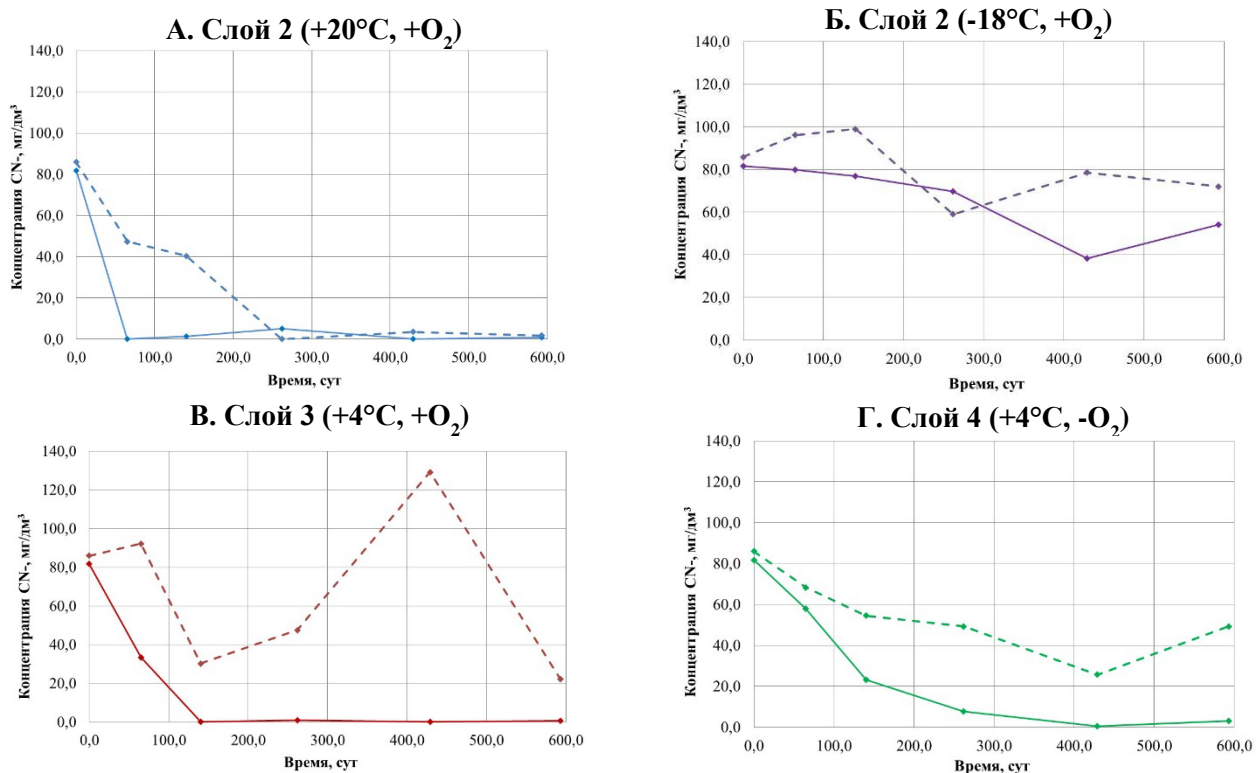


Рисунок 3.3. Изменение концентраций цианидов при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ золота в нестерильной (прямая линия) и предварительно простерилизованной рудной массе (прерывистая линия)

В слое 2 (летний период) в нестерильной рудной массе деградация CN^- происходила за 65 суток до $0,05 \text{ мг/дм}^3$ и в дальнейшем устанавливалась на данном уровне, в контроле – за 262 суток и только до $0,9 \text{ мг/дм}^3$ (рис. 3.3, А). Деструкция составила $1,26$ и $0,33 \text{ мг CN}^-/\text{дм}^3$ в сутки, соответственно (табл. 3.6), а скорость была в 4 раза выше в случае нестерильной рудной массы.

При моделировании условий 3 слоя ($+4^\circ\text{C}$) в присутствие бактерий деструкция цианидов до значений ниже ПДК происходила за 140 суток ($0,58 \text{ мг CN}^-/\text{дм}^3$ в сут), в то время как в контроле полная деградация не достигалась даже к концу исследования (рис. 3.3, В).

В анаэробных условиях 4-го слоя деградация цианидов шла менее интенсивно по сравнению с другими условиями (рис. 3.3, Г). За 593 суток концентрации CN^- в нестерильной рудной массе – снижались с $81,6$ до $3,1 \text{ мг/дм}^3$, в предварительно простерилизованной – с $85,9$ до $49,2 \text{ мг/дм}^3$ (табл. 3.5). Это составило $96,2$ и $42,8\%$ соответственно (табл. 3.6). В присутствие бактерий

скорость деструкции цианидов была в два раза интенсивнее, чем в стерильной рудной массе.

Самый низкий показатель деструкции отмечали в модельных условиях слоя 2 (зимний период) (рис. 3.3, В). Концентрация CN^- при $-18^\circ C$ уменьшалась на 33.7% – в нестерильной, и 16.2% – в предварительно простерилизованной рудной массе (табл. 3.6). При этом скорость деструкции в нестерильной рудной массе, так же была выше.

Полученные результаты подтверждают преимущественное участие автохтонных бактериальных сообществ в процессе деструкции цианидов по сравнению с простым химическим окислением, что может быть использовано в разработке технологии биодетоксикации складированных отходов КВ.

Ранее были проведены подобные исследования на нестерильной рудной массе штабеля КВ месторождения «Майское» [8]. Показано, что деградация цианида с 304.7 до 0.2–0.3 мг/дм³ происходила за 78 суток в модельных условиях слоя 2 (летний период), за 74 суток – слоя 3 и примерно за 400 суток – слоя 4 [8]. В отличие от представленных результатов, в наших исследованиях деструкция CN^- в модельных условиях слоя 3 шла менее интенсивно (за 140 суток) несмотря на то, что исходные концентрации цианида были ниже (81.6 мг/дм³). Это может быть связано с различием химического и минерального состава рудных масс, используемых в исследованиях. Остальные показания деструкции цианидов в модельных условиях слоя 2 (летний период) и слоя 4 практически совпадали.

В ходе лабораторных экспериментов было выявлено, что интенсивная биодетоксикация цианидов протекает в условиях положительных температур и аэрации с участием автохтонного бактериального сообщества. Предполагается, что в данных условиях механизм биодеструкции может протекать по реакциям окислительного и/или гидролитического путей (табл. 1.2) с участием ферментов цианидмонооксигеназы, цианазы, цианиддиоксигеназы, цианидгидратазы и формамидгидратазы.

Следует отметить, что при отрицательных температурах не отмечали значимую деструкцию цианидов, однако прослеживали детоксикация тиоцианатов. Сравнительный анализ изменения концентраций **тиоцианатов** показан на рисунке 3.4.

Показатели деструкция токсичных соединений при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ

Рудная масса	Модельные условия рудного штабеля КВ							
	Слой 2 (+20°C; +O ₂)		Слой 2 (-18°C; +O ₂)		Слой 3 (+4; +O ₂)		Слой 4 (+4°C; -O ₂)	
	Общая деструкция, %*	Скорость деструкции, мг/дм ³ в сут	Общая деструкция, %*	Скорость деструкции, мг/дм ³ в сут	Общая деструкция, %*	Скорость деструкции, мг/дм ³ в сут	Общая деструкция, %*	Скорость деструкции, мг/дм ³ в сут
Цианиды								
Нестерильная	98.9	1.26	33.7	0.05	99.3	0.58	96.2	0.13
Предварительно простерилизованная	98.0	0.33	16.2	0.02	74.1	0.11	42.8	0.06
Тиоцианаты								
Нестерильная	н.д.**	-	67.7	0.02	н.д.	-	н.д.	-
Предварительно простерилизованная	н.д.	-	9.2	0.002	н.д.	-	н.д.	-
Медь								
Нестерильная	98.9	0.31	31.7	0.01	98.8	0.03	94.4	0.03
Предварительно простерилизованная	97.9	0.03	н.д.	-	н.д.	-	н.д.	-
Никель								
Нестерильная	100	0.01	н.д.	-	94.2	0.001	39.6	<0.001
Предварительно простерилизованная	100	0.001	н.д.	-	н.д.	-	н.д.	-

Примечание: * – процент деструкции токсичного соединения за 593 суток культивирования; **н.д. – нет деструкции токсичного соединения (при культивировании в условиях зонирования рудного штабеля концентрация токсичного соединения увеличивалась)

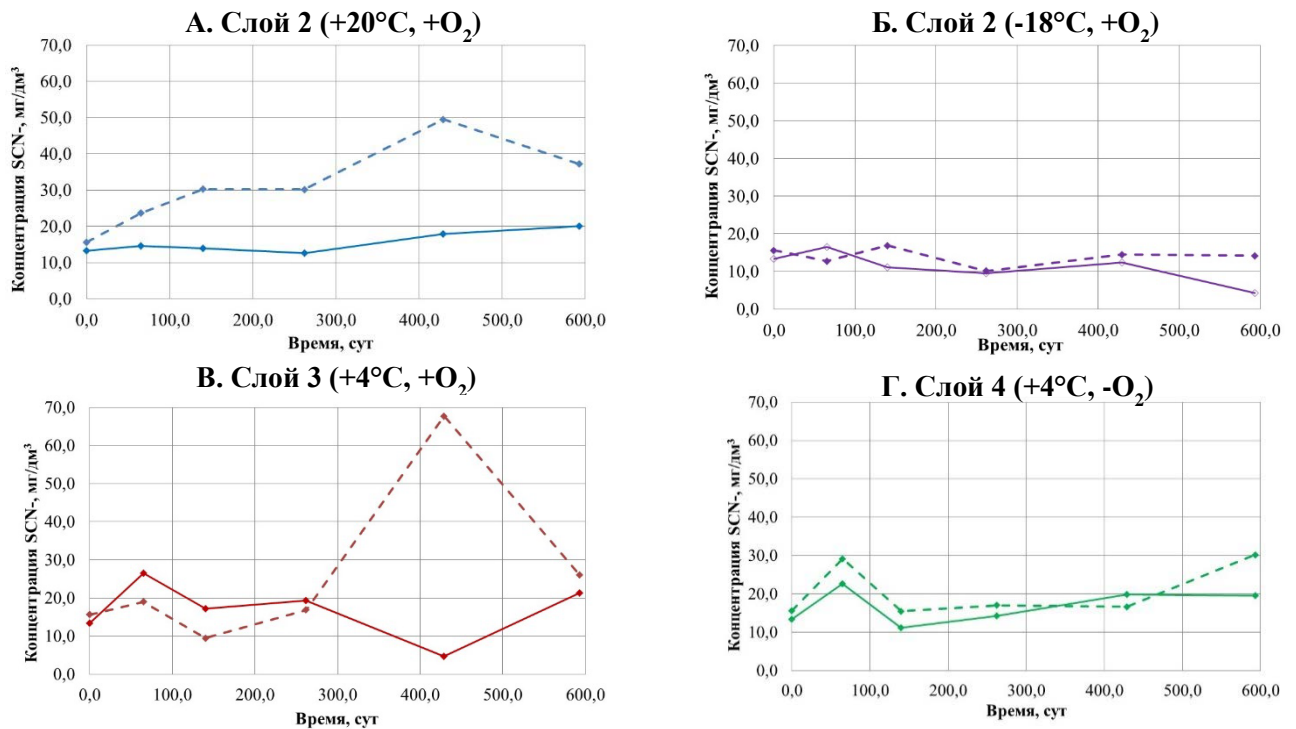


Рисунок 3.4. Изменение концентраций тиоцианатов при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ золота в нестерильной (прямая линия) и предварительно простерилизованной рудной массе (прерывистая линия)

Уменьшение концентраций тиоцианатов наблюдали только в условиях отрицательных температур слоя 2 (зимний период) (рис. 3.4, Б). При этом в нестерильной рудной массе интенсивность деструкции была выше (67.7%), чем в предварительно простерилизованной (9.2%) (табл. 3.6). Это свидетельствует о преимущественном влиянии автохтонных бактериальных сообществ на деградацию тиоцианатов в складированных отходах КВ.

При положительных температурах и аэрации в модельных условиях слоя 2 (летний период) и слоя 3 в нестерильной рудной массе концентрация тиоцианатов оставалась практически на исходном уровне, в то время как в контроле отмечали интенсивный рост концентрации SCN⁻ с 15.6 до 37.2 и 25.9 мг/дм³, соответственно (табл. 3.5, рис. 3.4, А, В). Это говорит о химическом преобразовании цианида в тиоцианат. Отсутствие значительного увеличения концентрации тиоцианатов в нестерильной рудной массе дополнительно подтверждает доминирование биохимических процессов над простым химическим окислением при деструкции цианидов.

В анаэробных условиях динамика тиоцианатов практически не изменялась и не зависела от присутствия бактерий (рис. 3.4, Г). В аэробных условиях биодеструкция тиоцианата протекает по реакции 1.10 (раздел 1.2.2).

В отличие от наших результатов в работе С.В. Петрова в модельных условиях слоя 2 (летний период) и слоя 3 концентрация тиоцианатов (27.2 мг/дм^3) падала и устанавливалась на уровне $0.07\text{--}0.17 \text{ мг/дм}^3$ за время проведения исследования (600 суток) [8]. Это так же может быть связано с отличием минерального и химического состава исследуемых рудных масс. Дополнительно, в исследованиях [8, 25] показано, что деструкция SCN^- в цианидсодержащих отходах происходит только после деструкции CN^- , даже при участии бактериальных сообществ [25]. Очевидно, что в нашем случае, для полной деструкции тиоцианатов не хватило времени хранения рудной массы в модельном эксперименте.

Снижение концентраций *меди* отмечали при положительной температуре в условиях 2, 3 и 4 слоев (рис. 3.5). В данных условиях деградация соединений меди варьировала от 94.4 до 98.9% (табл. 3.6). При отрицательных температурах снижение концентрации меди было незначительным (рис. 3.5, Б).

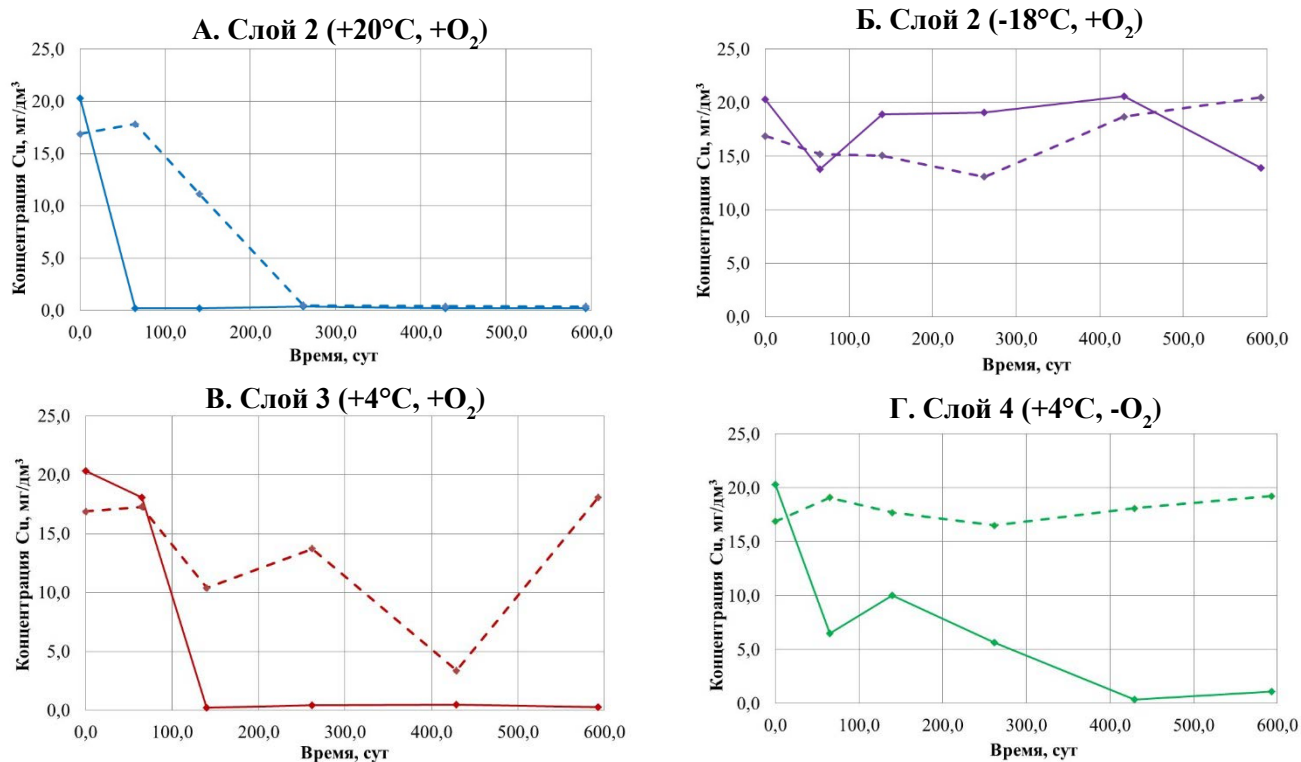


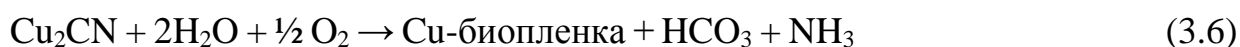
Рисунок 3.5. Изменение концентрации меди при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ золота в нестерильной (прямая линия) и предварительно простерилизованной рудной массе (прерывистая линия)

Так же, как и для цианидов, скорость деструкции соединений меди в присутствии бактерий отличалась. В слое 2 (летний период) скорость деструкции в нестерильной рудной массе была выше чем в контроле на порядок и составила 0.31 мг/дм³ в сутки, по сравнению с 0.03 мг/дм³ в сутки (табл. 3.6). В остальных условиях деструкция происходила только в присутствие автохтонных бактериальных сообществ (рис. 3.5, В, Г). В нестерильной рудной массе слоя 3 деструкция соединений меди происходила за 140 суток на 98.8%, слоя 4 – за 429 суток на 94.4% (табл. 3.6, рис. 3.5, В, Г).

Таким образом, показана прямая зависимость деструкции цианидов и соединений меди. Исходя из этого можно говорить, что в рудной массе медь преимущественно находится в виде цианидных комплексов. Удаление растворимых цианидных комплексов меди осуществляется по механизму перехода в менее координационно насыщенное состояние и образования, в конечном итоге, нерастворимых гидроксидов и карбонатов:



Предполагается, что более интенсивная деструкция цианидных комплексов меди в нестерильной рудной массе происходит за счет сдвига вправо равновесия в первых трех реакциях (3.1, 3.2, 3.3) и интенсивного разложения под действием автохтонного бактериального сообщества. Известно, что комплексные соединения цианидов с металлами (кадмия, цинка, меди, никеля, кобальта и железа) плохо разрушаются под действием химических и физических методов [120], но подвержены биологическому распаду с последующим поглощением металлов биопленкой по реакции 3.6, либо осаждением их из раствора.



В ряде работ [43, 46, 50, 88, 120] показана эффективная деструкция цианидных комплексов металлов, с участием следующих микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Fusarium*, *Trichoderma* и *Penicillium*. Для штаммов

Pseudomonas fluorescens ВКМ В-5040 и *Acinetobacter* sp. RBPI была отмечена способность к деструкции цианидных комплексов меди [23, 83]. Это говорит об возможности эффективного воздействия представителей бактериального сообщества на деструкцию этих токсичных комплексов.

Кроме того, в процессе дыхания цианидрезистентных бактерий образуется углекислый газ [17], что так же влияет на увеличение скорости реакции перехода цианидных комплексов меди в нерастворимые карбонаты (по реакции 3.5) в присутствии бактерий.

Таким образом, интенсивная деструкция соединений меди в виде цианидных комплексов происходила под действием автохтонного бактериального сообщества в условиях положительных температур. Отрицательные температуры замедляют метаболическую активность бактерий и тем самым уменьшают скорость деструкции.

Снижение концентраций **никеля** отмечали при положительной температуре в модельных условиях 2 и 3 слоев (рис. 3.6, А, В).

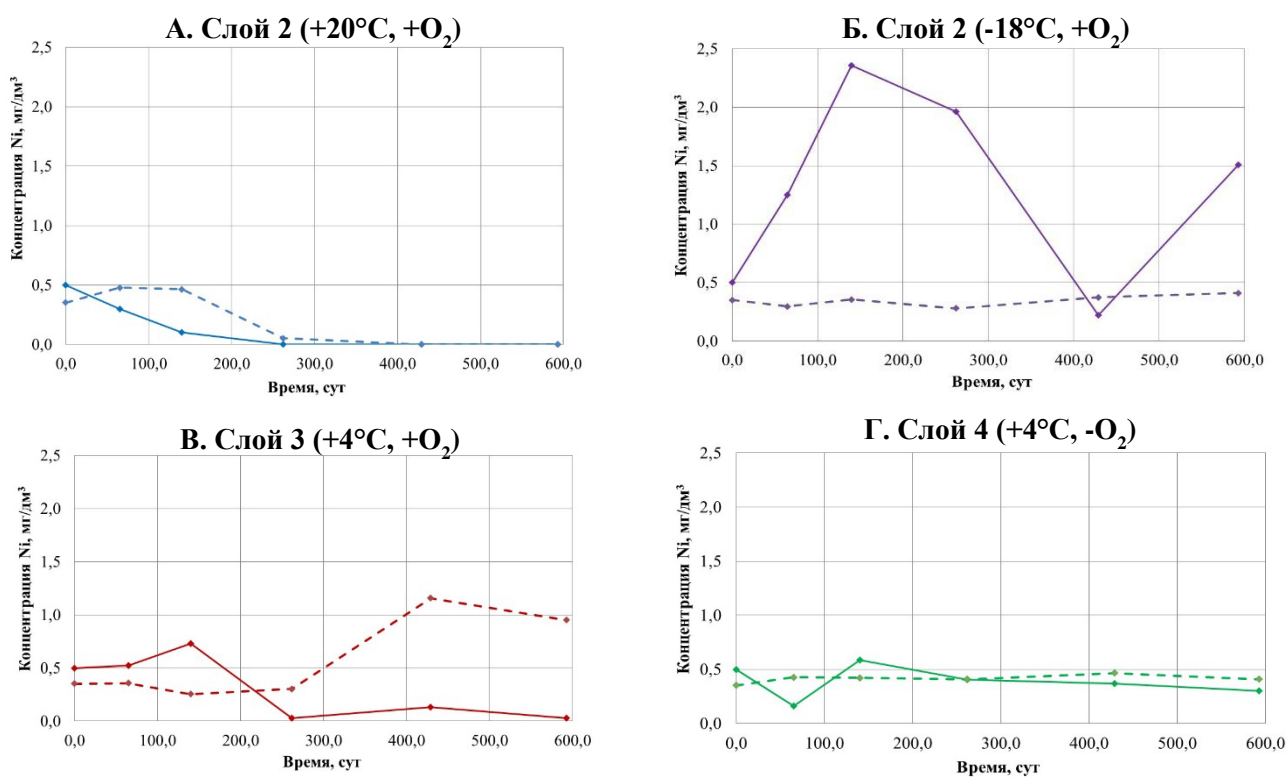


Рисунок 3.6. Изменение концентрации никеля при моделировании условий зонирования рудного штабеля КВ золота в нестерильной (прямая линия) и предварительно простерилизованной рудной массе (прерывистая линия)

Процент деструкции соединений никеля составил 100 и 94.2% соответственно (табл. 3.6).

Так же, как и для соединений меди скорость деструкции соединений никеля в нестерильной рудной массе была значительно выше, чем в предварительно простерилизованной (рис. 3.6, А, В). Самую интенсивную деструкцию отмечали в модельных условиях слоя 2 (летний период). При этом динамика концентраций никеля имела характер, сходный с динамикой концентраций меди и в присутствие бактериального фактора скорость деструкции была на порядок выше, чем в контроле (табл. 3.6 и рис. 3.6, А). В слое 3 деструкция соединений никеля происходила только в нестерильной рудной массе (рис. 3.6, В). Следует отметить, что в нестерильной рудной массе в анаэробных условиях концентрация никеля оставалась практически на исходном уровне, а при отрицательных температурах – наблюдали увеличение концентрации никеля (рис. 3.6, Б, Г).

Механизм вывода растворимых форм соединений никеля аналогичен механизму вывода цианидных комплексов меди и заключается в переходе комплексов данного металла в менее координационно насыщенное состояние и образовании, в конечном итоге, нерастворимых гидроксидов и карбонатов. В исследованиях Р.К. Dorr и С.Д. Knowles было показано, что штамм *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 17764 способен к разрушению $Ni(CN)_2$ [43]. Это предполагает возможность присутствия в автохтонных бактериальных сообществах представителей, осуществляющих деструкцию цианидных комплексов никеля. Таким образом, так же, как и для цианидных комплексов меди интенсивная деструкция цианидных комплексов никеля происходила под действием бактерий в условиях положительных температур.

Результаты показали, что основные токсичные соединения рудного штабеля КВ разрушаются более интенсивно в виде цианидных комплексов металлов при положительных температурах и в аэробных условиях, тоцианаты – при отрицательных температурах.

Ранее в работе С.В. Петрова [8] были проведены исследования процесса пассивной детоксикации цианидсодержащих отходов: изучено гидролитическое удаление цианидов, окисление растворенным кислородом, влияние солнечной радиации и испарения на процесс пассивной детоксикации. Им определены

основные кинетические параметры суммарной реакции деградации токсичных примесей. Показано, что их удаление может быть формально представлено уравнением первого порядка (описывается экспоненциальной зависимостью). На основании проведенных исследований им также разработана математическая модель, описывающая развитие процесса обезвреживания в отходах КВ. Укрупненные испытания в этих исследованиях проводили на рудах месторождения «Майское». Развитие этой работы отражено в диссертационном исследовании О.В. Мурашовой [166]. Ею разработан достоверный математический аппарат, позволяющий прогнозировать деградацию цианидов в рудном штабеле КВ с учетом влияния экологических условий (влажности, температуры, испарения, аэрации) и процессов фильтрации, диффузии и сорбции в рудном штабеле КВ. Математическая модель опробирована на месторождениях «Лопуховское» и «Самолазовское» [166]. Таким образом, в проведенных ранее исследованиях было показано, что деструкция токсичных соединений рудного штабеля КВ подчиняется экспоненциальной зависимости [8, 166]. Поэтому в настоящей работе не была предусмотрена разработка математической модели, а кинетические данные детоксикации общего цианида, тиоцианата, меди и никеля (рис. 3.3–3.6) были описаны на основании ранее проведенных исследований [8, 166] уравнениями первого порядка и рассчитаны константы скорости реакций при различных температурах и условиях аэрации (табл. 3.7).

Следует отметить, что при положительной температуре константы скорости реакции биодеструкции общего цианида составляли 0.013 и 0.012 1/сутки и были значительно выше констант скорости реакции химического окисления (0.007 и 0.002 1/сутки) (табл. 3.7). Аналогичная ситуация отмечена для детоксикации меди и никеля. В условиях отрицательных в присутствии бактериального сообщества константа скорости реакции равна 0.001 1/сутки (табл. 3.7). Для тиоцианатов константа скорости биодетоксикации была равна 0.002 1/сутки. Дополнительно отмечено, что в аэробных условиях обезвреживание токсичных соединений идет значительно интенсивнее, чем в анаэробных (табл. 3.7).

Аппроксимирующие уравнения и константы скорости реакции биодegradации
основных токсичных соединений влаги рудного штабеля КВ

Условия	Аппроксимирующее уравнение	Достоверность аппроксимации	k, 1/сутки Нестерильный образец/Контроль
Общий вид аппроксимирующего уравнения $C = C_0 \times e^{kt}$			
Общий цианид			
+20°C, +O ₂	$C = 81.63 \times e^{-0.013t}$	0.8033	0.013/0.007
+4°C, +O ₂	$C = 81.63 \times e^{-0.012t}$	0.7125	0.012/0.002
-18°C, +O ₂	$C = 81.63 \times e^{-0.001t}$	0.7729	0.001/-
+4°C, -O ₂	$C = 81.63 \times e^{-0.008t}$	0.7172	0.008/0.003
Тиоцианаты			
+20°C, +O ₂	Нет стабильной деструкции токсичного соединения		
+4°C, +O ₂	Нет стабильной деструкции токсичного соединения		
-18°C, +O ₂	$C = 13.3 \times e^{-0.002t}$	0.8673	0.002/-
+4°C, -O ₂	Нет стабильной деструкции токсичного соединения		
Медь			
+20°C, +O ₂	$C = 20.32 \times e^{-0.013t}$	0.9749	0.013/0.008
+4°C, +O ₂	$C = 20.32 \times e^{-0.009t}$	0.8196	0.009/0.003
-18°C, +O ₂	Нет стабильной деструкции токсичного соединения		
+4°C, -O ₂	$C = 20.32 \times e^{-0.006t}$	0.7226	0.006/0.0002
Никель			
+20°C, +O ₂	$C = 0.5 \times e^{-0.013t}$	0.7721	0.013/-
+4°C, +O ₂	$C = 0.5 \times e^{-0.006t}$	0.7319	0.006/0.0016
-18°C, +O ₂	Нет стабильной деструкции токсичного соединения		
+4°C, -O ₂	Нет стабильной деструкции токсичного соединения		

Примечание: C – концентрация цианидов или тиоцианатов в заданной точке, мг/дм³; C₀ – исходная концентрация цианидов или тиоцианатов, мг/дм³; k – константа скорости реакции при заданной температуре и аэрации, 1/сутки; t – скорость деструкции цианидов или тиоцианатов, сутки.

Таким образом, показан значимый вклад биотического фактора в пассивную деструкцию цианидов, в том числе цианидных комплексов меди и никеля, и тиоцианатов по сравнению с простым химическим окислением. Установлено, что изучаемый рудный материал обладает высокой буферностью даже при наличие окислительных процессов. Это позволит исключить образование кислых дренажных вод, а полученные аппроксимирующие уравнения позволят прогнозировать поведение токсичных соединений в рудном штабеле и будут

пригодны для расчета продолжительности обезвреживания при разработке технологии биодетоксикации отходов КВ.

3.1.3 Изменение разнообразия бактериального сообщества при детоксикации складированных отходов КВ

Разнообразие бактериальных сообществ, развивающихся в естественных и модельных условиях рудного штабеля КВ, определяли с помощью молекулярно-генетического анализа. На сегодняшний день метагеномный анализ ампликонов и/или суммарной ДНК является одним из активно используемых методов молекулярно-генетического анализа и наиболее перспективным в практическом применении в биотехнологических исследованиях. Относительно недавно (2015–2016 гг.) за рубежом метагеномный анализ суммарной ДНК стали применять для изучения структуры и динамики микробных сообществ – микробиомов цианидсодержащих отходов, в том числе отходов золотодобывающей промышленности [108, 110, 142–144]. Исследования по изучению разнообразия микробиомов цианидсодержащих отходов КВ, расположенных на территории РФ, до настоящего времени не проводились.

Для получения наиболее полной информации о разнообразии бактериальных сообществ дополнительно проводили адаптацию и подбор оптимальных условий проведения отдельных этапов работы на выбранном предмете исследования.

Для оптимизации молекулярно-генетических методов использовали рудную массу, отобранную из действующего рудного штабеля КВ месторождения «Самолазовское». Стадия выделения ДНК из исследуемого материала является лимитирующей. От качества ее проведения зависит чистота и количество получаемых нуклеиновых кислот, а впоследствии – качество дальнейших анализов. В работе апробированы несколько коммерческих наборов, используемых для выделения ДНК, и оптимизированы условия их использования. Наборы отличались реагентами, применяемыми для проведения клеточного лизиса и сорбции нуклеиновых кислот. Химический лизис клеток с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на не иммобилизованном сорбенте используется в

коммерческих наборах ДНК-сорб Б и РИБО-сорб. В наборе AxyPrep Bacterial Genomic DNA kit задействованы реагенты, осуществляющие ферментативный лизис, сорбция нуклеиновых кислот происходит на сорбенте, иммобилизованном на мембране в колонках. Представленность ампликонов в препаратах ДНК, выделенных разными способами, оценивали в групп-специфичной ПЦР. В ПЦР использовали праймеры на разные таксономические группы бактерий (табл. 2.4 и Приложение Б).

Групп-специфичная амплификация показала, что препараты ДНК, выделенные с использованием химического лизиса, характеризовались низким спектром представленности ампликонов по сравнению с препаратами ДНК, выделенными ферментативным лизисом клеток (рис. 3.7).

В первом случае получены ампликоны только на консервативных бактериальных праймерах (EUB) и праймерах, специфичных для целевой филы *Bacteroidetes*. При использовании ферментативного лизиса клеток в препаратах ДНК был получен более широкий спектр представленности целевых групп микроорганизмов. Дополнительно к ампликонам, определенным в препаратах ДНК, полученных химическим лизисом, отмечали ампликоны для фил *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*, а также классов *Alpha-*, *Beta-* и *Deltaproteobacteria* (рис. 3.7).

Таким образом, наиболее эффективным для выделения ДНК из рудной массы штабеля КВ был определен подход с использованием ферментативного лизиса, реализованный в коммерческом наборе AxyPrep Bacterial Genomic DNA kit, который был использован в дальнейших исследованиях.

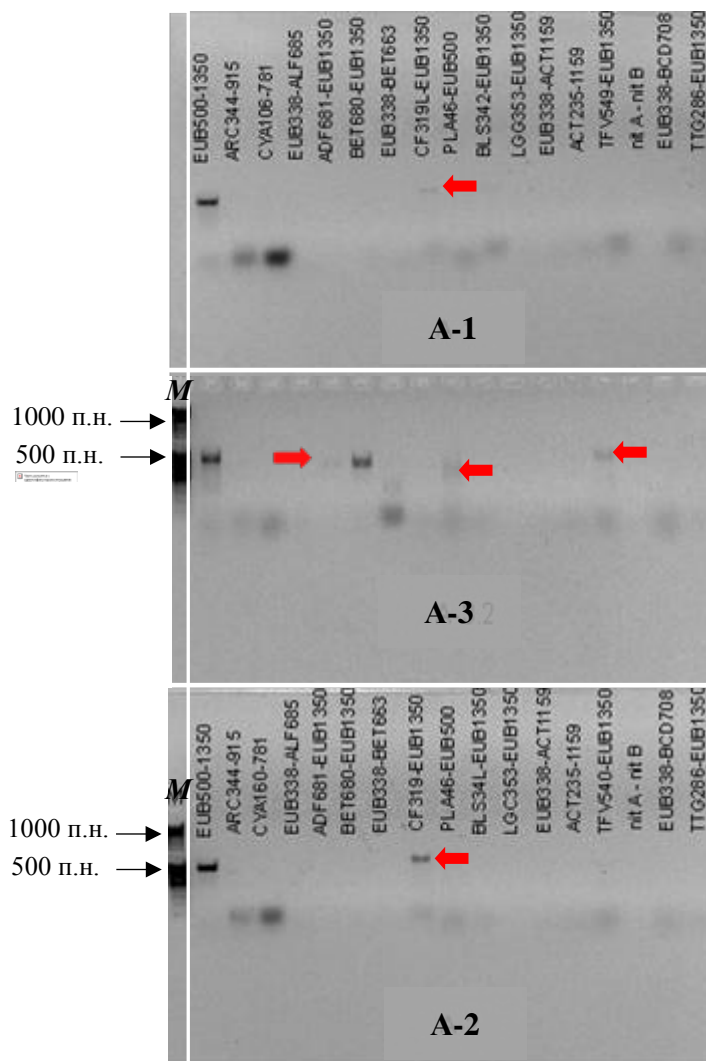


Рисунок 3.7. Электрофоретический анализ ампликонов в агарозном геле. ДНК выделена коммерческими наборами: А-1 – РИБО-сорб; А-2 – ДНК-сорб Б; А-3 – АхуPrep Bacterial Genomic DNA kit; М – маркер молекулярного веса.

Стрелками обозначены ампликоны низкой интенсивности

Структура и разнообразие бактериальных сообществ, развивающихся в естественных условиях рудного штабеля КВ и в модельном эксперименте. В результате метагеномного секвенирования ампликонов для каждого образца было получено 3894–6685 последовательностей (табл. 3.8), длина которых варьировала от 500 до 550 п. н.

Для оценки объема секвенирования и проверки достоверности результатов метагеномного анализа проводили анализ кривых накопления видов (рис. 3.8).

Таблица 3.8.

Основные показатели разнообразия бактериальных сообществ, развивающихся в естественных условиях рудного штабеля КВ золота и в модельном эксперименте

Время хранения	Количество последовательностей, шт.	ОТЕ, шт.	Индексы разнообразия	
			ChaoI	Шеннона
Естественные условия рудного штабеля КВ				
Исходная рудная масса	6685	51	79.9	1.5
Модельные условия зонирования рудного штабеля КВ				
Слой 2 (летний период: +20°C; +O₂)				
65 сут	5935	32	41.0	0.8
140 сут	5443	122	147.1	2.7
262 сут	4098	96	208.8	1.7
429 сут	5054	83	138.1	1.7
593 сут	6108	198	295.5	2.6
Слой 2 (зимний период: -18°C; +O₂)				
65 сут	6366	40	55.2	1.1
140 сут	5365	127	224.7	2.1
262 сут	6046	116	208.8	1.7
429 сут	3894	84	147.1	1.7
593 сут	5709	120	177.2	1.8
Слой 3 (+4°C; +O₂)				
65 сут	6352	41	56.0	1.3
140 сут	6368	134	182.8	2.6
262 сут	6269	89	126.7	2.1
429 сут	5895	77	92.1	2.1
593 сут	6417	93	134.2	2.0
Слой 4 (+4°C; -O₂)*				
65 сут	5807	29	45.5	1.0
262 сут	5015	89	117.3	1.8
593 сут	4231	92	178.8	1.9

Примечание: * - обезвреживание токсичных соединений в слое 4 было незначительным, поэтому отбор проб для молекулярно-генетических исследований проводили три раза

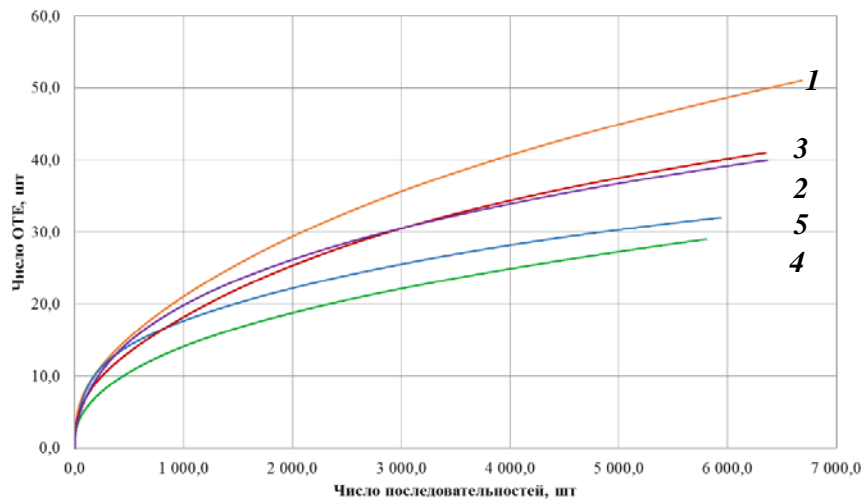


Рисунок 3.8. Анализ кривых накопления видов в естественных условиях и в модельном эксперименте. 1 – исходный микробиом; микробиомы, развивающиеся в модельных условиях: 2 – слоя 2 (летний период), 3 – слоя 2 (зимний период), 4 – слоя 3, 5 – слоя 4

На рисунке 3.8 видно, что кривые накопления видов имели достаточно крутой подъем и в конце анализа практически выходили на плато, что свидетельствует о достаточном количестве последовательностей для получения статистически достоверных результатов.

На основании метагеномного анализа были получены основные показатели ***α -разнообразия бактериальных сообществ***, развивающихся в естественных условиях рудного штабеля КВ и в модельном эксперименте, которые представлены в таблице 3.8.

Бактериальное сообщество, развивающееся в естественных условиях рудного штабеля, характеризовалось невысоким видовым разнообразием. Количество ОТЕ составило 51, видовое богатство по индексу обилия ChaoI – 79.9, а видовое разнообразие по индексу Шеннона – 1.5 (табл. 3.8).

После 65 суток хранения в модельных условиях отмечали уменьшение показателей видового обилия и разнообразия бактериальных сообществ по сравнению с исходным. Происходило снижение показателей ОТЕ до 29–41, индекса ChaoI до 41.0–56.0 и индекса Шеннона до 0.8–1.3 (табл. 3.8). В дальнейшем (с 65 по 593 сутки) показатели видового богатства и разнообразия микробиомов значительно увеличивались (табл. 3.8). На 593 сутки самые высокие показатели

отмечали при культивировании в модельных условиях слоя 2 (летний период). В данных условиях количество ОТЕ увеличивалось в 4 раза по сравнению с исходным, а индексы ChaoI и Шеннона составили 295.5 и 2.6 соответственно. Наименьшие показатели определены для бактериального сообщества, культивируемого в анаэробных условиях слоя 4, где определено 92 ОТЕ, индексы ChaoI и Шеннона – 178.8 и 1.9 соответственно (табл. 3.8).

Анализ литературных данных показал, что изучаемые нами бактериальные сообщества рудного штабеля КВ имели более низкие показатели видового богатства и разнообразия по сравнению с ранее изученными микробиомами незагрязненных почв, засоленных почв [145, 146] и активных илов цианидсодержащих сточных вод [142] (табл. 3.9).

Таблица 3.9

Основные показатели разнообразия микробиомов, развивающихся в природных почвах и почвах и илах подверженных антропогенному воздействию

Образец	Количество последовательностей, шт.	ОТЕ, шт.	Индексы разнообразия		Источник
			ChaoI	Шеннона	
Незагрязненная почва	1083–3406	411–1141	1272.1–2366.0	7.5–8.9	[145]
Засоленная почва	694–1890	268–469	647.9–1285.9	6.2–7.5	
Искусственно засоленная почва	2338	580	1302.1	6.9	
Анаэробный активный ил биореактора*	82400–104994	865.0–946.0	1518.0–1751.0	2.2–2.4	[142]
Аэробный активный ил биореактора*	74378–112778	924–1064	181.00–2230.0	2.6–4.2	
Рудный штабель КВ	6685	51	79.9	1.5	Наши данные
Штабель КВ модельный слой 2 (летний период)	4098–6108	32–198	41.0–295.5	0.8–2.7	
Штабель КВ модельный слой 2 (зимний период)	3894–6366	40–127	55.2–224.7	1.1–2.1	
Штабель КВ модельный слой 3	5895–6417	41–134	56.0–182.8	1.3–2.6	
Штабель КВ модельный слой 4	4231–5807	29–92	45.5–178.8	1.0–1.9	

<i>Продолжение табл.3.9</i>				
Рудный штабеля КВ, суммарные данные	3894–6685	29–198	41.0–295.5	0.8–2.7

Примечание: * - активный ил из сточных вод, содержащих цианиды и тиоцианаты

Однако, так же как для микробиомов активного ила [142] наблюдали более низкие показатели ОТЕ, индексов ChaoI и Шеннона в анаэробных условиях (табл. 3.9). Это свидетельствует о том, что в данных условиях недостаток кислорода обуславливает снижение видового разнообразия облигатно-аэробных бактерий и, как следствие, приводит к уменьшению метаболической активности сообщества.

Анализ разнообразия бактериальных сообществ методом главных компонент (РСА) показал, что значимые различия по составу и представленности флотипов существуют между двумя кластерами (рис. 3.9), первый из которых сформирован бактериальным сообществом исходной рудной массы и сообществами, формирующимися на начальных стадиях деструкции цианида. Второй кластер представлен бактериальными сообществами, которые формировались при более длительном инкубировании рудной массы. Интересно отметить, что бактериальные сообщества, развивающиеся при относительно высокой концентрации цианида при отрицательных температурах и в отсутствии аэрации также попали в этот кластер (рис. 3.9). Можно предположить, что на начальных этапах деструкция цианида связана с вовлечением углерода и азота из цианидных комплексов в круговорот этих элементов и развитием органогетеротрофных микроорганизмов, осуществляющих различные стадии метаболизма органических соединений.

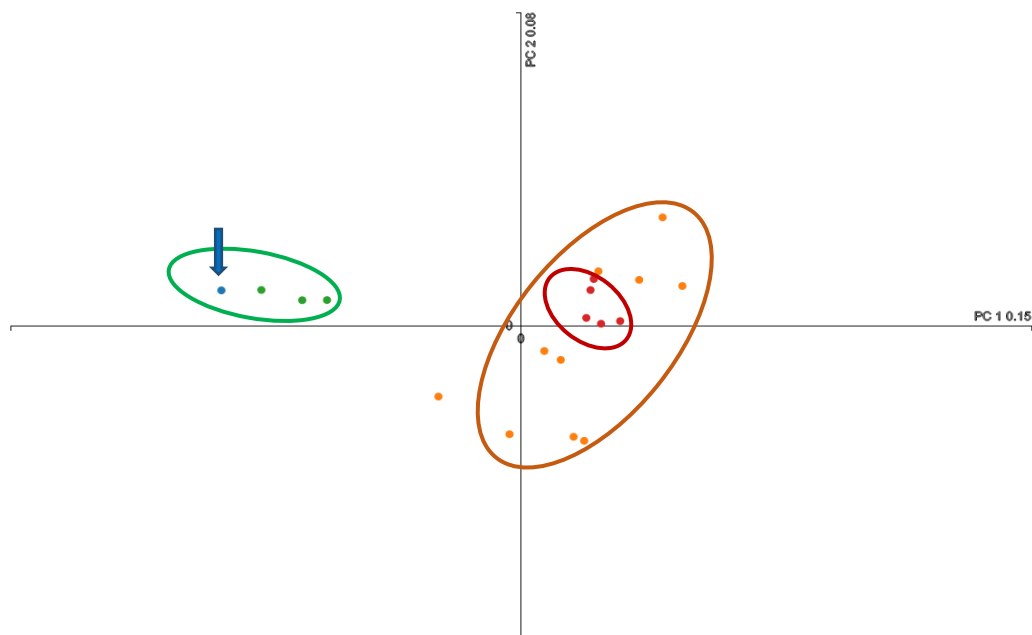


Рисунок 3.9. Сравнительный анализ автохтонных бактериальных сообществ исходной рудной массы и культивируемых в модельном эксперименте методом главных компонент. Синей стрелкой обозначен исходный образец, кластеры обозначены кругами разного цвета:

- образцы, в которых отмечали снижение концентраций цианидов до ПДК;
- образцы, в которых концентрация цианидов была выше ПДК при первом отборе проб; ● образцы, в которых концентрация цианидов была выше ПДК при длительном культивировании

Оценка значимости видового богатства по такому критерию как количество ОТЕ выявила низкую достоверность кластеризации автохтонных бактериальных сообществ (p -value = 0.12, PERMANOVA, Bray-Curtis). Из рисунка (рис. 3.10) видно, что сообщество, сформированное при культивировании в условиях 2 слоя (+20°C, +O₂) характеризующееся низким значением ОТЕ более близко к диспергированному кластеру, который сформирован сообществами с средними и высокими значениями ОТЕ (рис. 3.10). Следует отметить, что это сообщество отличается от других сообществ с низким значением ОТЕ высокой интенсивностью метаболизма цианида – по-видимому, развитие органогетеротрофных бактерий в этом случае происходит более интенсивно, поэтому не смотря на низкое разнообразие ОТЕ, их состав существенно изменился.

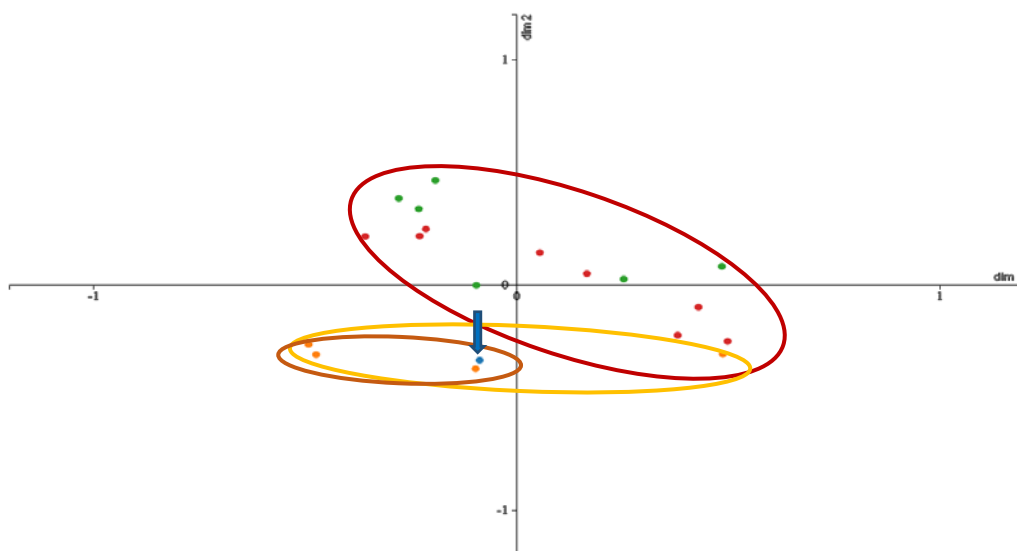


Рисунок 3.10. Сравнительный анализ автохтонных бактериальных сообществ исходной рудной массы и культивируемых в модельном эксперименте методом PERMANOVA. Синей стрелкой обозначен исходный образец, кластеры обозначены кругами разного цвета:

- образцы, характеризующиеся низким значением ОТЕ (<50); ● образцы, характеризующиеся средним значением ОТЕ (50–100); ● образцы, характеризующиеся высоким значением ОТЕ (>100).

Оценка влияния экологических факторов (температуры и аэрации), а также степени утилизации токсичных соединений на изменение разнообразия, состава и структуры бактериальных сообществ показала высокую достоверность ($p\text{-value} = 0.05$) формирования трех кластеров в зависимости от условий культивирования рудной массы (рис. 3.11). График, на котором визуализированы результаты непараметрического многомерного статистического анализа, показал, что основная ось, по которой отмечены различия бактериальных сообществ – это ось X. Первый кластер занимает среднее положение и в него вошли бактериальные сообщества, сформированные при $+4^{\circ}\text{C}$, так же, как и исходный образец. Бактериальные сообщества, инкубируемые при $+20^{\circ}\text{C}$ сформировали разреженный кластер в области положительных значений по этой оси (рис. 3.11). Сообщества, сформированные в более экстремальных условиях – отрицательные температуры и

отсутствие кислорода, образовали кластер в противоположном направлении по основной оси.

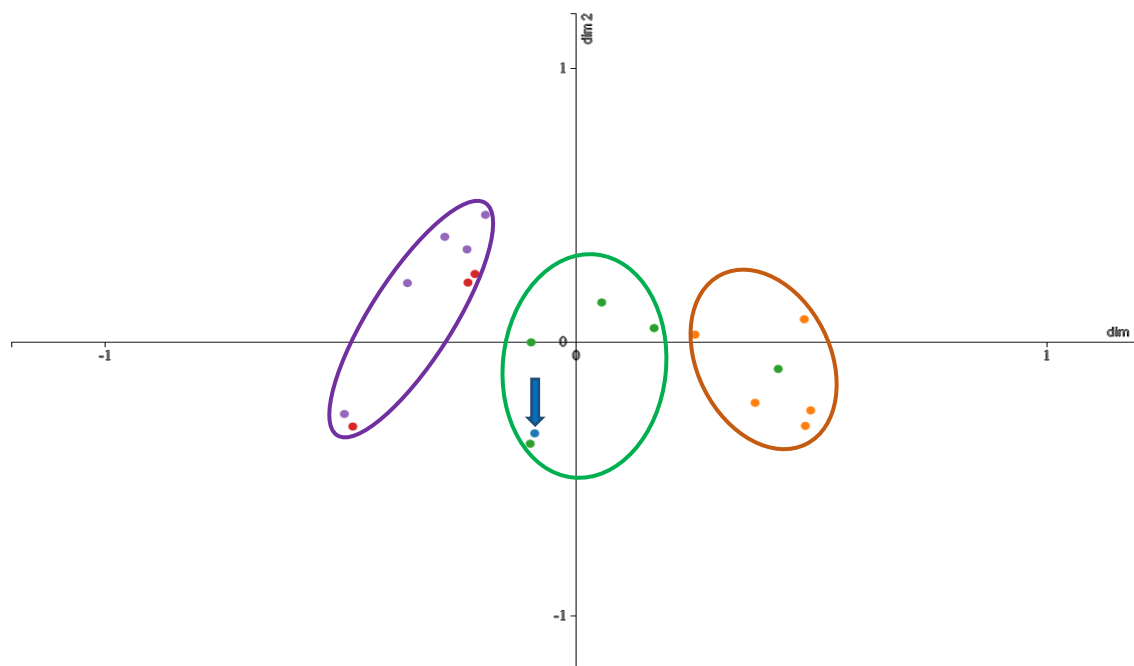


Рисунок 3.11. Сравнительный анализ автохтонных бактериальных сообществ исходной рудной массы и культивируемых в модельном эксперименте методом PERMANOVA. Синей стрелкой обозначен исходный образец, кластеры обозначены кругами разного цвета:

- образцы, инкубируемые при +20°C и аэрации; ● образцы, инкубируемые при +4°C и аэрации; ● образцы, инкубируемые при +4°C в анаэробных условиях; ● образцы, инкубируемые при –18°C и аэрации.

Таким образом, полученные результаты подтверждают влияние экологических условий, таких как температура и аэрация на состав и структуру бактериальных сообществ.

Структура бактериальных сообществ, развивающихся в естественных условиях рудного штабеля КВ и в модельном эксперименте, представлена в Приложение В. Филотипы, выявленные в бактериальном сообществе, развивающемся в естественных условиях рудного штабеля КВ, были отнесены к восьми филам. Четыре филы являлись доминирующими (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*) и четыре – минорными (*Cyanobacteria*,

Acidobacteria, *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes*). Самая крупная фила – *Proteobacteria* составляла 99.2% в сообществе, при этом основными классами выступали *Beta*- и *Gamma**proteobacteria* (Приложение В).

При хранении рудной массы в условиях модельного эксперимента в бактериальных сообществах идентифицированы флотипы, которые так же были отнесены к четырем доминирующим филам, самой крупной из которых выступала *Proteobacteria* (от 92.9 до 98.2% в суммарном микробиоме). Однако разнообразие минорных фил в микробиомах существенно увеличилось. Дополнительно идентифицировали представителей фил: *Nitrospirae*, *Elusimicrobia*, *Microgenomates*, *Fusobacteria*, *Chloroflexi*, *Candidatus Saccharibacteria* и *Deinococcus-Thermus* (Приложение В).

Структура микробиомов, развивающихся в естественных и модельных условиях рудного штабеля КВ, была сходна со структурой бактериальных сообществ активного ила цианидсодержащих сточных вод [142] и активного ила технологии ASTER [110]. В этих микробиомах доминирующими филами также выступали *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, при этом *Proteobacteria* показали максимальную представленность (табл. 3.10). Классы *Beta*- и *Gamma**proteobacteria* имели наибольшую долю в исследуемых микробиомах. Однако в незагрязненных почвах, как и в цианидсодержащих хвостах месторождений, расположенных в регионах с теплым климатом, основными доминирующими представителями отмечены неклассифицированные бактерии, а представители филы *Proteobacteria* показали относительно низкую долю в микробных сообществах (11.3 и 19.1%) [143, 144] (табл. 3.10).

Учитывая, что представители филы *Proteobacteria* не только составляют высокую долю в автохтонном бактериальном сообществе (исходный образец), но и сохраняют доминирующее положение при культивировании в модельном эксперименте, можно предположить, что в цианидсодержащих отходах КВ в условиях резко-континентального климата именно представители данной филы будут наиболее стабильными деструкторами токсичных соединений рудного

штабеля КВ. Это следует в дальнейшем учитывать при выявлении бактерий, выступающих маркерами процесса деструкции цианидсодержащих соединений.

Таблица 3.10

Представленность доминирующих фил в бактериальных сообществах, развивающихся в природных почвах и почвах и илах, подверженных антропогенному воздействию

Образец	Представленность доминирующих фил (% в микробиоме)	Источник
Незагрязненная почва	Неклассифицированные бактерии (47.4%) <i>Proteobacteria</i> (11.3%) <i>Actinobacteria</i> (10.9%) <i>Verrucomicrobia</i> (7.7%) <i>Acidobacteria</i> (5.7%) <i>Firmicutes</i> (5.6%) <i>Gemmatimonadetes</i> (4.5%) <i>Bacteroidetes</i> (2.9%)	[143]
Хвосты, загрязненные CN^- и SCN^-	Неклассифицированные бактерии (51.0%) <i>Proteobacteria</i> (19.1%) <i>Firmicutes</i> (16.8%) <i>Actinobacteria</i> (7.2%) <i>Bacteroidetes</i> (5.9%)	
Сточные воды, загрязненные CN^- и SCN^-	<i>Firmicutes</i> (61.1%) <i>Actinobacteria</i> (36.9%)	
Анаэробный активный ил сточных вод	<i>Proteobacteria</i> (>74.0% - преимущественно класс <i>Gammaproteobacteria</i>) <i>Firmicutes</i> (8.6%) <i>Bacteroidetes</i> (1.3%)	[142]
Аэробный активный ил сточных вод	<i>Proteobacteria</i> (>60.0% - преимущественно класс <i>Betaproteobacteria</i>) <i>Bacteroidetes</i> (11.8%) <i>Actinobacteria</i> (5.5%) <i>Firmicutes</i> (1.7%)	
Рудный штабель КВ золота	<i>Proteobacteria</i> (37.6–91.4% – преимущественно класс <i>Betaproteobacteria</i> , 5.5–61.8% – класс <i>Gammaproteobacteria</i>) <i>Actinobacteria</i> (0.08–16.4%) <i>Firmicutes</i> (0.06–1.87%) <i>Bacteroidetes</i> (0.016–1.03%)	Наши данные

Следует отметить, что сравнительный анализ минорных фил в микробиомах рудного штабеля КВ и микробиомах, развивающихся в сходных экологических местах обитания [142, 143], не выявил значимых закономерностей.

Таким образом, показано, что бактериальные сообщества, развивающиеся в естественных и модельных условиях рудного штабеля КВ золота, имеют невысокое видовое разнообразие. Несмотря на это, они осуществляют активную деструкцию цианидсодержащих соединений. На начальных этапах происходит адаптация бактериальных сообществ и снижение высоких концентраций токсичных соединений, в дальнейшем – активное развитие представителей микробиомов, которые способны выживать и проявлять свою активность при определенных условиях рудного штабеля и низких концентрациях токсичных соединений. Выявлено, что представители фил *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* являются доминирующими в бактериальных сообществах всех слоев штабеля КВ. Предполагается, что в условиях резко-континентального климата именно представители филы *Proteobacteria* будут наиболее стабильными деструкторами токсичных соединений в рудном штабеле КВ золота. Среди представителей данной филы возможен поиск бактерий, осуществляющих деструкцию цианидов, включающих цианидные комплексы меди и никеля.

Потенциальная активность представителей бактериальных сообществ в условиях зонирования рудного штабеля КВ. Складируемые отходы КВ, расположенные на территории РФ, постоянно подвержены сезонным и суточным колебаниям температур и не однородны с точки зрения температурного режима и аэрации. Исходя из этого, необходимо знать не только структуру и разнообразие бактериального сообщества, но и потенциальную активность его основных представителей в различных условиях, создаваемых в складированных отходах КВ золота (в слоях). Это позволит составить рекомендации по формированию консорциумов бактерий, обладающих широким адаптационным температурным диапазоном и способных проявлять свою метаболическую активность в условиях резко-континентального климата.

Доминирующие филотипы бактериального сообщества, развивающегося в естественных условиях рудного штабеля КВ и составляющие автохтонное сообщество, идентифицированы на уровне рода как представители *Serratia* (43.5%

в сообществе), *Hydrogenophaga* (25.6%), *Achromobacter* (24.3%), *Malikia* (1.8%), *Bordetella* (1.6%) и *Silanimonas* (1.4%) (рис. 3.12, А).

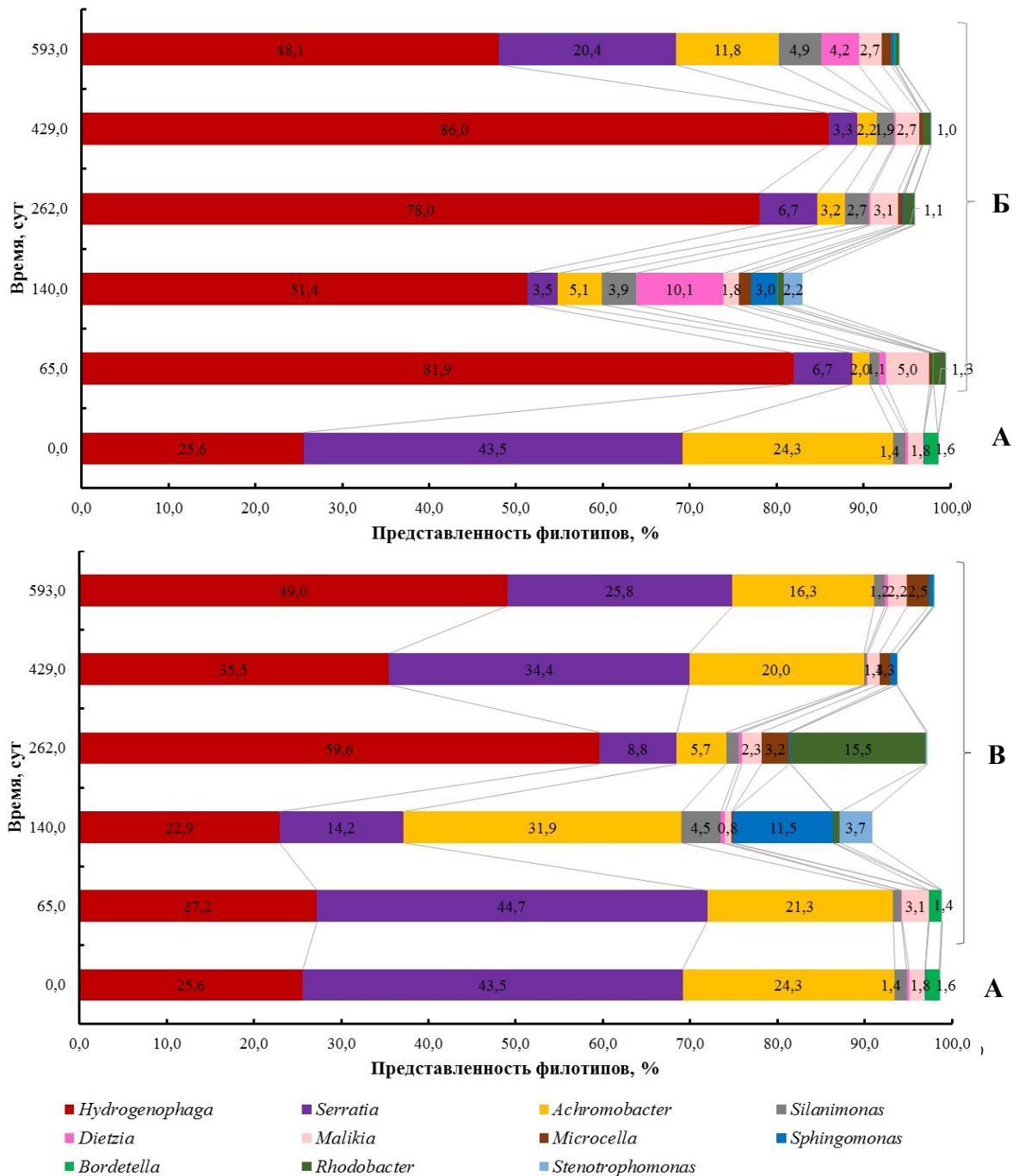


Рисунок 3.12. Представленность основных филоципов в бактериальных сообществах, развивающихся в естественных (А – исходная рудная масса) и модельных условиях рудного штабеля КВ (Б – слой 2 (летний период), В – слой 3)

Доля филоципов *Sphingomonas*, *Dietzia*, *Rhodobacter*, *Stenotrophomonas* и *Microcella* в бактериальном сообществе составляла от 0.9 до 0.01%, поэтому они

были отнесены к минорным формам. Филотипы, имеющие менее 0.01% представленности в микробиоме и не имеющие зависимости с токсичными соединениями, были исключены из дальнейшего анализа.

Большинство филотипов, идентифицированных в автохтонном бактериальном сообществе (представители семейства *Comamonadaceae* (в нашем случае рода *Hydrogenophaga* и *Malikia*) и родов *Bordetella*, *Rhodobacter*, *Sphingomonas*, *Serratia* и *Stenotrophomonas*), были так же идентифицированы как доминирующие и минорные филотипы в микробиомах активного ила ASTER [108, 110] и цианидсодержащих хвостов и сточных вод [142–144]. Предполагается, что данные представители выполняют важную функцию в процессе детоксикации цианидсодержащих отходов.

После хранения рудной массы в модельных условиях слоя 2 (летний период) и слоя 3 наблюдали изменения в представленности доминирующих филотипов и увеличение доли минорных форм (рис. 3.12, Б, В). Так, в бактериальном сообществе, развивающемся **в модельных условиях слоя 2 (летний период)**, доля филотипа *Hydrogenophaga* возрастала более, чем в 2 раза и составляла от 48.1 до 86.0% (рис. 3.12, А, Б). Для представителей родов *Malikia* и *Silanimonas* так же наблюдали увеличение представленности до 5.0 и 3.0%, соответственно на отдельных этапах хранения в модельных условиях. Дополнительно отмечали значительное увеличение филотипов *Sphingomonas*, *Dietzia*, *Rhodobacter* и *Microcella*, они становились доминирующими, и их доля была более 1.0% (рис. 3.11, Б). Доля *Serratia*, *Achromobacter* и *Bordetella* значительно снижалась и к концу исследования составила 20.4, 11.8 и 0.1% соответственно (рис. 3.12, Б).

В модельных условиях слоя 3 филотип *Hydrogenophaga* был доминирующим, его доля, как и в условиях слоя 2 (летний период) возрастала и к концу исследования составила 49.0%. Обратная ситуация отмечена для филотипа *Serratia*, доля которого уменьшалась и к концу исследования составила 25.8% (рис. 3.12, В). Отличительной особенностью данного слоя было то, что доля *Achromobacter* практически оставалась на исходном уровне. На некоторых этапах хранения, так же как для бактериального сообщества слоя 2 (летний период),

отмечали значимое увеличение представленности филотипов *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Microcella* и *Rhodobacter*, которые в исходном микробиоме были минорными (рис. 3.12, А, В).

В модельных условиях слоя 2 (зимний период) и слоя 4 представленность филотипов была сходной (рис. 3.13, Б, В). Доля *Serratia* в бактериальных сообществах варьировала незначительно и к концу исследования составляла 35.2 и 34.6% (рис. 3.13, Б, В).

К концу эксперимента представленность *Achromobacter* увеличивалась в два раза, а представленность *Sphingomonas* на два порядка. В отличие от исходного бактериального сообщества, доля филотипа *Hydrogenophaga* в модельных условиях слоя 2 (зимний период) снижалась до 4.0–6.7%, в модельных условиях слоя 4 – до 3.9–13.4% (рис. 3.13). Так же отмечали снижение представленности филотипа *Bordetella* после 65 суток хранения рудной массы при отрицательных температурах и в анаэробных условиях.

Развитие тех или иных доминирующих представителей микробиомов зависит от экологических условий, создаваемых в теле складированных отходов КВ. При положительных температурах и аэрации наибольшую представленность в бактериальном сообществе имели представители *Hydrogenophaga*. Это свидетельствует об их потенциальной активности в данных условиях. Дополнительно отмечено увеличение доли филотипов, которые в автохтонном бактериальном сообществе были минорными (*Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Dietzia*, *Rhodobacteraceae* и *Microcella*).

При отрицательных температурах и без аэрации представленность филотипов *Serratia*, *Achromobacter* и *Sphingomonas* в бактериальных сообществах возрастала, что может говорить о их потенциальной активности в данных условиях. Предполагается, что идентифицированные бактерии обладают широким адаптационным температурным диапазоном и способны проявлять свою метаболическую активность в условиях резко-континентального климата.

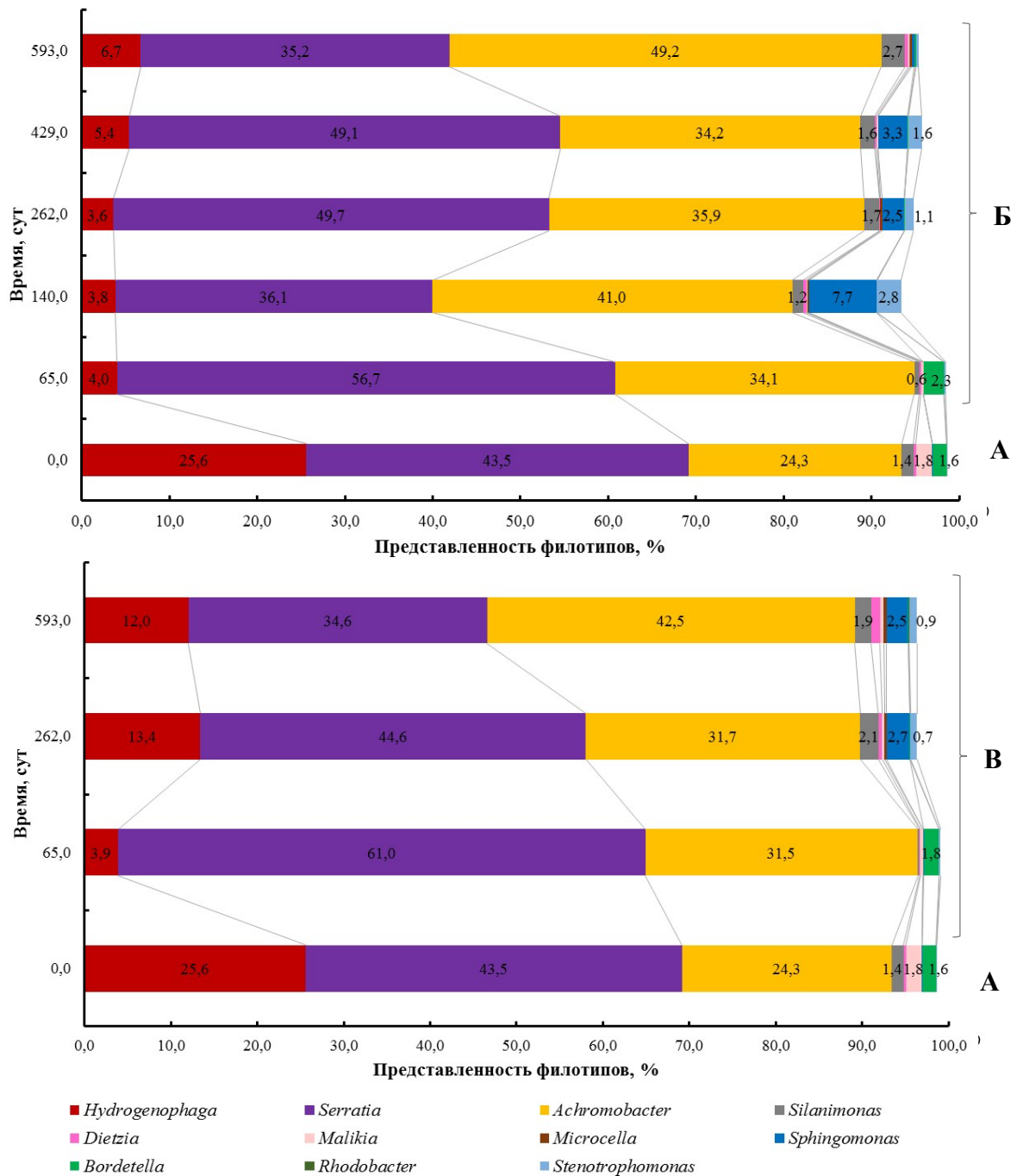


Рисунок 3.13. Представленность основных фило типов в бактериальных сообществах, развивающихся в естественных (А – исходная рудная масса) и модельных условиях рудного штабеля КВ (Б – слой 2 (зимний период), В – слой 4)

Следует отметить, что в данных условиях представленность фило типов *Hydrogenophaga* уменьшалась, но они оставались среди доминирующих, что может свидетельствовать о выживании бактерий рода *Hydrogenophaga* в анаэробных условиях и при отрицательных температурах.

Сравнительный анализ микробиомов, развивающихся в рудном штабеле КВ, с ранее изученными микробиомами [110, 142], показал принципиальные различия на уровне семейств (табл. 3.11). В активных илах, которые используются для детоксикации цинаидсодержащих сточных вод в регионах с теплым климатом, доминирующие представители отнесены к сем. *Pseudomonadaceae*, *Comamonadaceae* и *Hydrogenophilaceae* (табл. 3.11). Для представителей данных семейств отмечена потенциальная способность к деструкции органических соединений, цианидов и тиоцианатов [110, 142].

Таблица 3.11

Представленность доминирующих филотипов в бактериальных сообществах, развивающихся в почвах и илах, подверженных антропогенному воздействию

Образец	Представленность доминирующих филотипов (% в микробиоме)		Источник
Анаэробный активный ил сточных вод	<i>Proteobacteria</i> (>74.0% - преимущественно класс <i>Gammaproteobacteria</i>)	сем. <i>Pseudomonadaceae</i> род <i>Pseudomonas</i> (72.6%)	[142]
Аэробный активный ил сточных вод	<i>Proteobacteria</i> (>60.0% - преимущественно класс <i>Betaproteobacteria</i>)	сем. <i>Comamonadaceae</i> род <i>Comamonas</i> (56.8%) сем. <i>Hydrogenophilaceae</i> род <i>Thiobacillus</i> (27.8%)	
Активный ил технологии ASTER	<i>Proteobacteria</i> класс <i>Betaproteobacteria</i>	сем. <i>Hydrogenophilaceae</i> род <i>Thiobacillus</i> (27.2%)	[110]
Рудный штабеля КВ	<i>Proteobacteria</i> класс <i>Betaproteobacteria</i> (37.6–91.4%)	сем. <i>Comamonadaceae</i> род <i>Hydrogenophaga</i> (3.6–86.0%) сем. <i>Alcaligenaceae</i> род <i>Achromobacter</i> (2.0–49.2%)	Наши данные
	<i>Proteobacteria</i> класс <i>Gammaproteobacteria</i> (5.5–61.8%)	сем. <i>Yersiniaceae</i> род <i>Serratia</i> (3.3–61.0%)	

В рудном штабеле КВ, расположенном в регионе с резко-континентальным климатом, помимо представителей сем. *Comamonadaceae* (род *Hydrogenophaga*) к доминирующим отнесены бактерии сем. *Alcaligenaceae* и *Yersiniaceae* (табл. 3.11). Это свидетельствует об адаптации представителей сем. *Alcaligenaceae* (в том числе представители рода *Achromobacter*) и *Yersiniaceae* (в том числе представители рода

Serratia) к широким диапазонам температур и о перспективности их использования для детоксикации складированных отходов КВ, расположенных в регионах с резко-континентальным климатом.

Таким образом, определено, что при положительных температурах и аэрации наибольшую активность проявляют представители рода *Hydrogenophaga*, в анаэробных условиях и при отрицательных температурах – *Serratia*, *Achromobacter* и *Sphingomonas*. Установлено, что представители сем. *Alcaligenaceae* (род *Achromobacter*) и *Yersiniaceae* (род *Serratia*) адаптированы к широким диапазонам температур и могут являться перспективными в использовании для детоксикации складированных отходов КВ, расположенных в регионах с резко-континентальным климатом.

3.1.4 Выявление бактерий, выступающих маркерами процессов деструкции цианидсодержащих соединений в складированных отходах КВ золота

Для выявления групп бактерий, участвующих в деградации цианидов, в том числе цианидных комплексов меди и никеля, проводили анализ зависимости изменения концентрации цианидов и разнообразия основных доминирующих представителей бактериальных сообществ, развивающихся в рудном штабеле КВ. Результаты анализа приведены на рисунках 3.14–3.17.

При стабильной деструкции цианидов представленность флотипов *Serratia* (сем. *Yersiniaceae*) и *Achromobacter* (сем. *Alcaligenaceae*) падала в модельных условиях слоя 2 (летний период) и слоя 3 (рис. 3.14 А, В). В остальных вариантах модельного эксперимента, независимо от концентраций токсичных соединений, их представленность варьировала незначительно со слабым трендом к увеличению для *Achromobacter* и уменьшению для *Serratia* (рис. 3.14 Б, Г).

Ранее для некоторых видов этих родов, таких как *Achromobacter nitriloclastes* ATCC 21697, *Achromobacter* sp. RL2c, *Serratia marcescens* RL2b, *S. marcescens* aq07 и *S. odorifera* MTCC 5700, показана перспективность использования в детоксикации отходов, содержащих цианиды, тиоцианаты и тяжелые металлы как при совместном [61], так при отдельном культивировании [72, 73, 99 и 147].

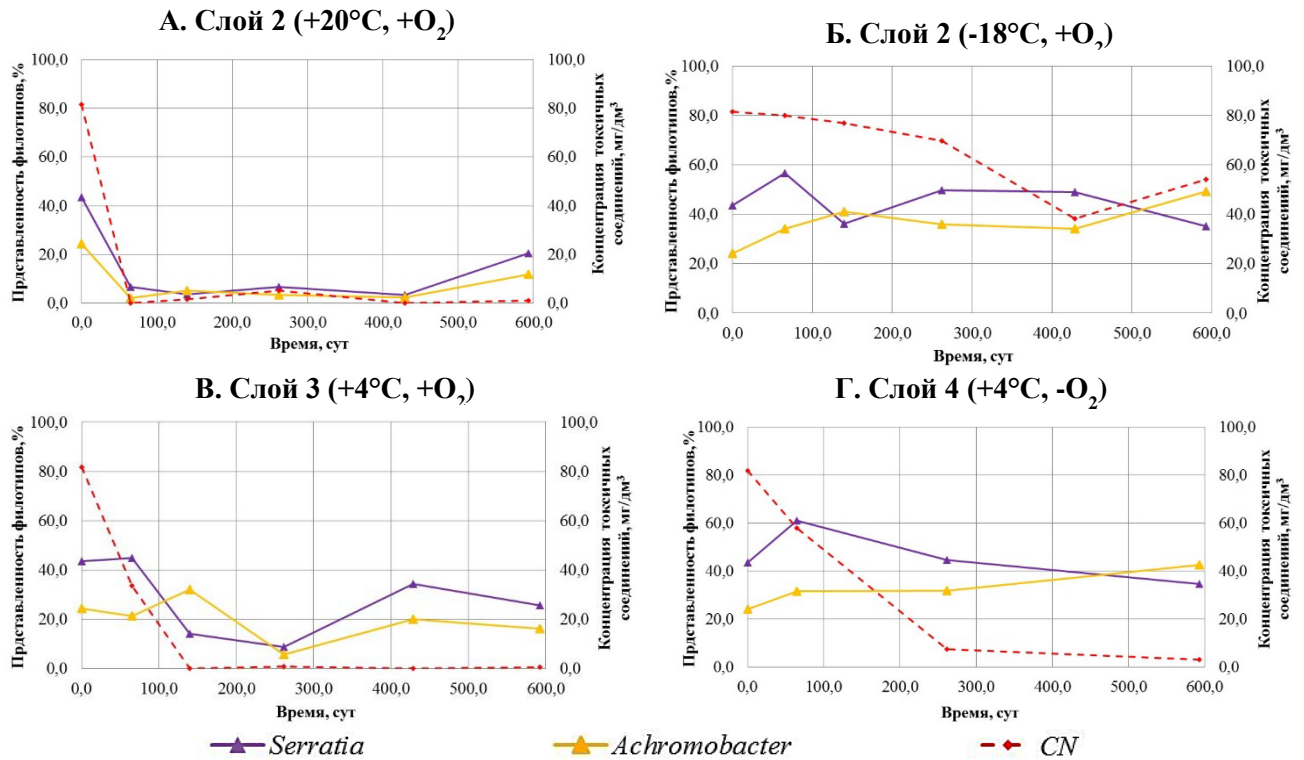


Рисунок 3.14. Зависимость изменения концентраций цианидов и представленности филотивов *Serratia* и *Achromobacter*, определенных в естественных условиях и развивающихся в модельном эксперименте

Учитывая, что в условиях слоя 2 (летний период) и слоя 3 деструкция цианидов происходила более эффективно при участии микроорганизмов (раздел 3.1.2), а также отмечена положительная корреляция уменьшения концентраций цианидов и снижение доли представленности родов *Achromobacter* и *Serratia* в бактериальном сообществе (рис. 3.14, А, В), можно предположить, что развитие этих представителей связано с присутствием цианидов в составе рудной массы. По-видимому, представители родов *Achromobacter* и *Serratia* способны использовать цианиды в своих метаболических и биохимических реакциях и с резким уменьшением концентраций CN^- в среде происходит существенное снижение доли этих бактерий в сообществе (рис. 3.14, А, В). Однако известно, что микроорганизмы способны адаптироваться к условиям окружающей среды, именно поэтому к концу эксперимента мы наблюдаем незначительное увеличение доли этих самых доминирующих представителей.

Исходя из литературных данных и полученных результатов, можно говорить, что представители родов *Serratia* и *Achromobacter* участвуют в биохимических реакциях деструкции цианидов, в том числе цианидных комплексов Cu и Ni в складированных отходах КВ золота.

Дополнительно в модельных условиях всех слоев рудного штабеля КВ отмечали снижение доли флотипа *Bordetella* (сем. *Alcaligenaceae*) при деструкции цианидов (рис. 3.15).

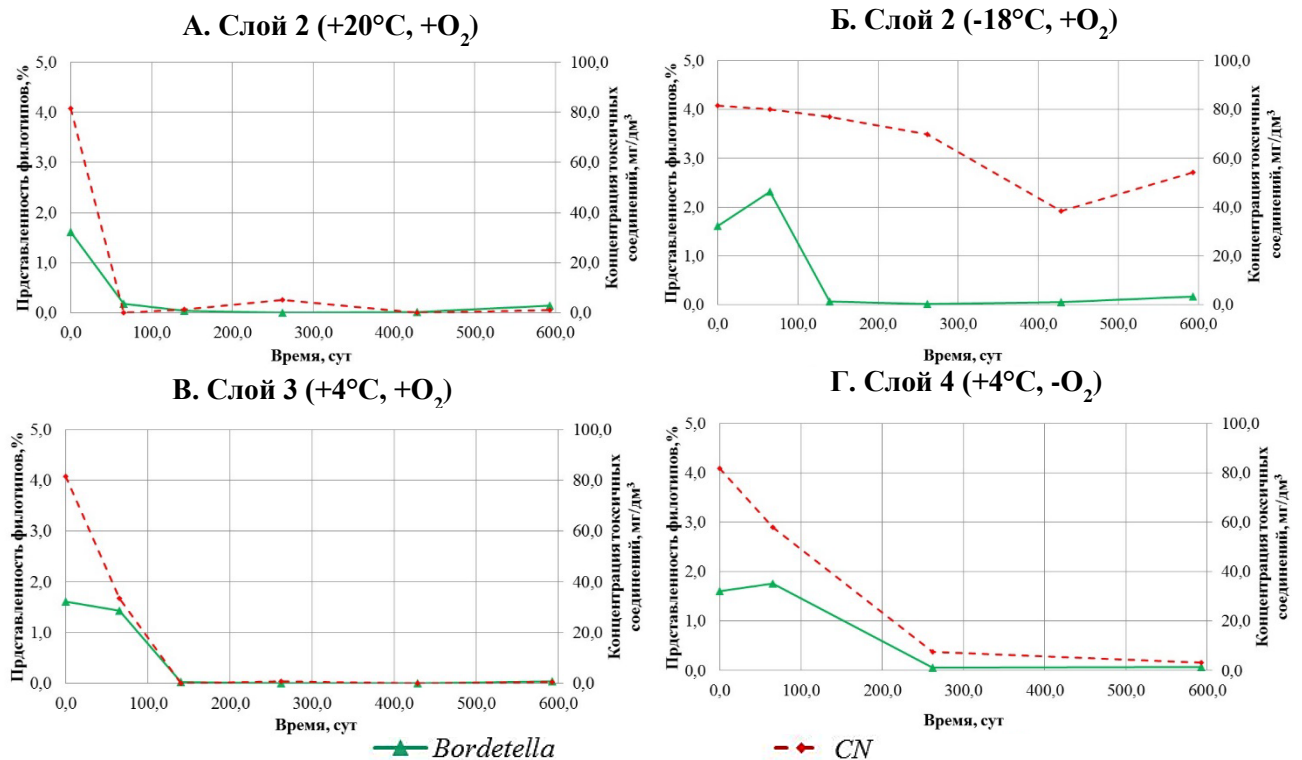


Рисунок 3.15. Зависимость изменения концентраций цианидов и представленности флотипа *Bordetella*, определенного в естественных условиях и развивающегося в модельном эксперименте

Предполагается, что уменьшение концентраций цианидов в среде обитания приводит к снижению источников углерода и азота для данных бактерий. Такие условия хранения не позволяют дальнейшему развитию представителей рода *Bordetella*, в результате чего их клетки переходят в неактивное состояние, а доля в общем микробиоме снижается (рис. 3.15).

Ранее молекулярно-генетическими методами исследования представители рода *Bordetella* были идентифицированы в активном иле технологии ASTER [108]. На основании этого предполагается, что представители рода *Bordetella* используют

токсичные соединения в качестве источников роста и развития и тем самым осуществляют их деструкцию.

Другой тип зависимости можно проследить на примере фило типа *Hydrogenophaga* (сем. *Comamonadaceae*). Его представленность возростала при интенсивной деструкции цианидов (модельные условия слоя 2 (летний период) и слоя 3) (рис. 3.16 А, В). В остальных вариантах модельного эксперимента независимо от концентраций токсичных соединений их представленность падала.

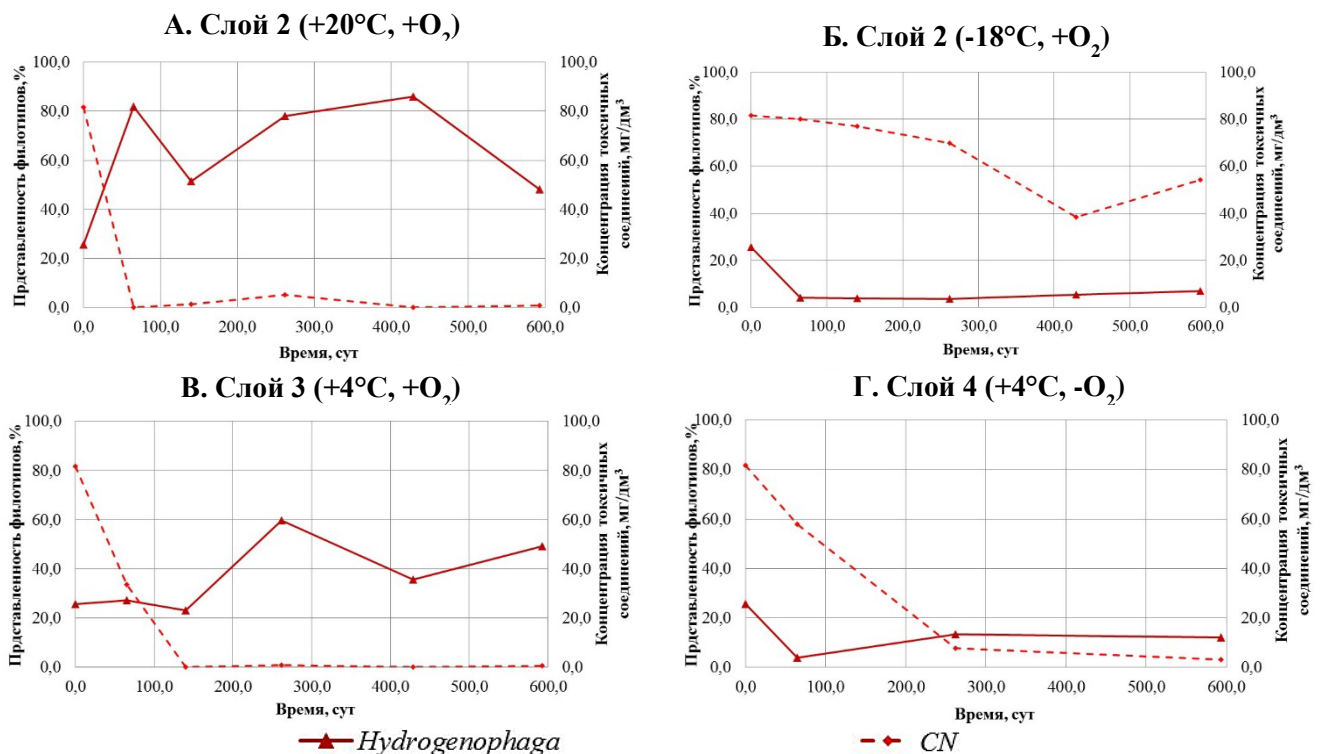


Рисунок 3.16. Зависимость изменения концентраций цианидов и представленности фило типа *Hydrogenophaga*, определенного в естественных условиях и развивающегося в модельном эксперименте

Интенсивный рост доли представителей *Hydrogenophaga* в сообществах может свидетельствовать о использовании данными бактериями для реализации своей жизнедеятельности не цианидов, а их метаболитов, образующихся в результате деструкции.

Известно, что цианиды биохимически могут преобразовываться в аммиак с последующим его окислением до нитратов и нитритов (раздел 1.2.3) [148]. В работах [108, 110] было показано, что представители сем. *Comamonadaceae* обладают потенциальной способностью к денитрификации нитритов.

На основании литературных данных и полученных результатов можно предположить, что представители рода *Hydrogenophaga*, относящиеся к сем. *Comamonadaceae*, устойчивы к цианидсодержащим соединениям, и разрушают их метаболиты. Данные доминирующие представители микробиома выступают в качестве вспомогательного звена для бактерий, удаляющих цианид.

Следует так же отметить, что в предыдущем разделе было предположено, что бактерии рода *Hydrogenophaga* неактивны в анаэробных условиях и при отрицательных температурах (гл. 3.1.3). Именно поэтому в модельных условиях слоя 2 (зимний период) и слоя 4 отмечали уменьшение доли изучаемых филоотипов (рис. 3.16 Б, Г).

Дополнительно для филоотипов *Microcella*, *Silanimonas* и *Sphingomonas* отмечали увеличение доли в бактериальных сообществах при снижении концентраций цианидов во всех модельных условиях (рис. 3.17 А, Б, В и Г). Исходя из этого бактерии данных родов отнесены к цианидрезистентным.

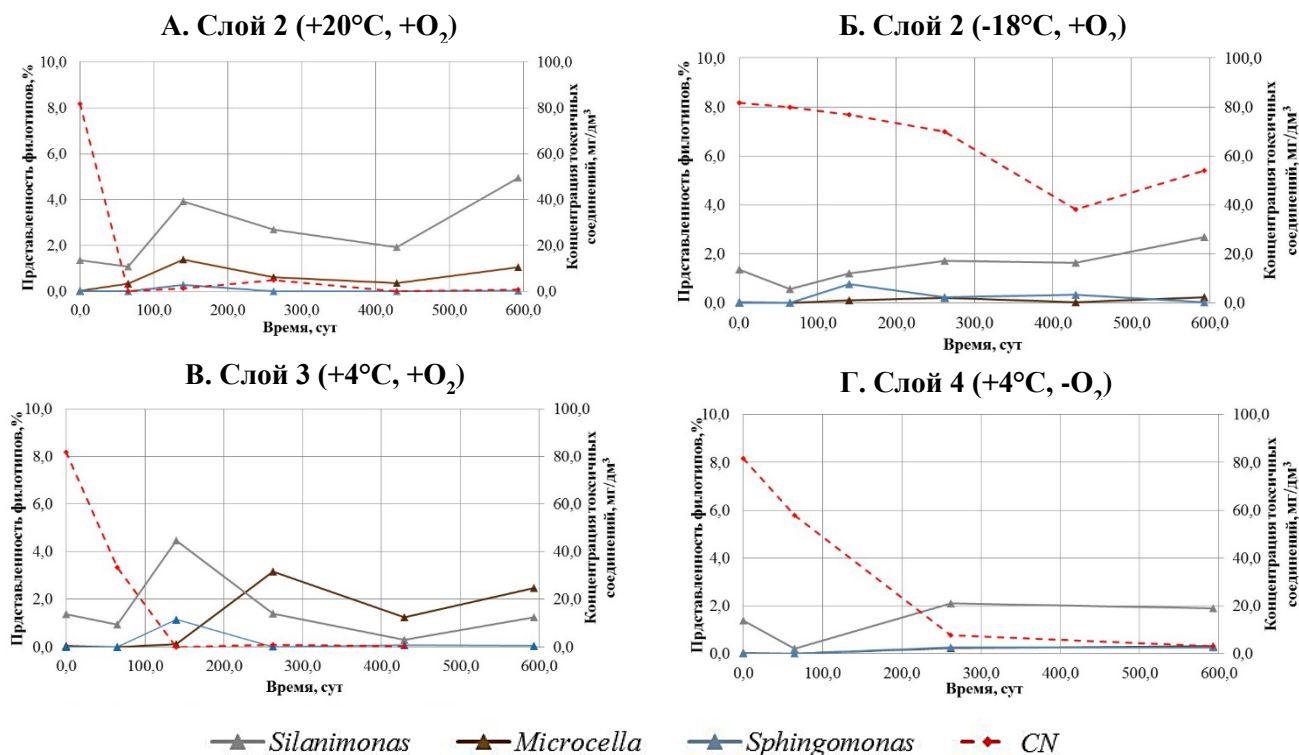


Рисунок 3.17. Зависимость изменения концентраций цианидов и представленности филоотипов *Microcella*, *Silanimonas* и *Sphingomonas*, определенных в естественных условиях и развивающихся в модельном эксперименте

Таким образом, выявлено, что потенциальными участниками деструкции цианидов, в том числе цианидных комплексов меди и никеля являются бактерии родов *Serratia*, *Achromobacter* и *Bordetella*. Данные бактерии могут использовать токсичные соединения в своих метаболических реакциях и тем самым осуществлять их детоксикацию в рудном штабеле КВ. Представители родов *Hydrogenophaga*, *Microcella*, *Silanimonas* и *Sphingomonas* отнесены к цианидрезистентным бактериям. При этом, бактерии рода *Hydrogenophaga* могут выступать в качестве вспомогательного звена для бактерий, деструктирующих цианиды, и потенциально способны к деструкции их метаболитов.

3.2 Влияние экологических факторов на разнообразие автохтонных бактериальных сообществ природно-техногенных комплексов КВ золота

Для расширения масштаба работы на другие месторождения, расположенные на территории РФ и определения влияния экологических факторов на их разнообразие автохтонных бактериальных сообществ были проведены дополнительные исследования.

В главе 3.1 показано, что основными участниками деструкции цианидсодержащих соединений являются доминирующие представители микробиома. На основании этого, с помощью молекулярного клонирования генов 16S рРНК проводили определение разнообразия доминирующих представителей автохтонных бактериальных сообществ в технологических растворах и рудном штабеле КВ, отобранных на месторождениях «Бабушкина гора» (Красноярский край), «Чазы Гол» (Республика Хакасия) и «Самолазовское» (Республика Саха (Якутия)). Это позволило выявить влияние таких экологических факторов, как территориальной расположенности, разнофазности природно-техногенных комплексов КВ, а также химического и минерального состава руд на развитие функциональных групп бактерий.

3.2.1 Разнообразие доминирующих представителей автохтонных бактериальных сообществ в природно-техногенных комплексах КВ

По результатам молекулярного клонирования получено 105 последовательностей. После первичного анализа данных, включающего выравнивание, удаление коротких и химерных последовательностей, а также кластеризацию, было оставлено 96 последовательностей со средней длиной 800 нуклеотидов. Последовательности, идентифицированные в технологическом растворе и рудном штабеле КВ, отнесены к четырём филам – *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria* (классы *Alpha-*, *Beta-* и *Gammaproteobacteria*). Всего при кластерном расстоянии 0.03 было выделено 18 филотипов, при этом число ОТЕ в каждом бактериальном сообществе варьировало от 6 до 10 (табл. 3.12). Сравнительный анализ полученных последовательностей с ближайшими гомологами из международных баз данных (Genbank и EMBL) выявил уровень сходства от 95.1 до 100% (Приложение Г). На основании этого, полученные результаты позволили определить родовую принадлежность (Приложение Г).

При сравнении доминирующих представителей суммарных бактериальных сообществ технологических растворов и рудного штабеля КВ всех месторождений было выявлено три общие ОТЕ (рис. 3.18), доля которых составила от 26.7 до 76.0% от полученных последовательностей. Эти филотипы были отнесены к филе *Proteobacteria* и идентифицированы как *Achromobacter*, *Pseudomonas* и *Serratia* (табл. 3.12). Уникальные ОТЕ выявлены только для месторождения «Чазы Гол» – 4 ОТЕ (рис. 3.18). Они отнесены к трём филам (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*), идентифицированы как *Acidovorax*, *Algoriphagus*, *Pseudonocardia* и *Pusillimonas*, и их доля в сообществе составила более 33.4% (табл. 3.12).

Краткая характеристика ОТЕ, идентифицированных в составе природно-техногенных комплексов КВ золота «Бабушкина гора», «Чазы Гол», «Самолазовское» и «Подгоlechное»

№ ОТЕ*	Фила/Класс	Филотип (ОТЕ)	Месторождение				
			«Бабушкина Гора»	«Чазы Гол»	«Самолазовское»	«Подгоlechное» Исходная рудная масса**	«Подгоlechное» Модельные условия***
			Доля в автохтонном бактериальном сообществе, %				
299	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i>	3.6	0	0	0	0.1-1.6
497	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacterium</i>	1.8	0	0	0	0.01–0.4
521	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardia</i>	0	13.3	0	0	0
692	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Algoriphagus</i>	0	6.7	0	0	0
917	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	0	6.7	0	0.03	0.01–0.4
1213	<i>Firmicutes</i>	<i>Exiguobacterium</i>	14.3	0	0	0	0.01–0.08
2083	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	0	0	12.0	0.02	0.01–11.5
2084	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingopyxis</i>	0	20.0	4.0	0	0
2099	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i>	8.9	13.3	24.0	24.3	2.0–49.2
2102	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Bordetella</i>	1.8	0	4.0	1.6	0.01–2.3
2114	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Pusillimonas</i>	0	6.7	0	0	0
2127	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Ralstonia</i>	0	0	4.0	0	0.01–1.1
2130	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Acidovorax</i>	0	6.7	0	0	0
2146	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	12.5	0	0	25.6	3.6–86.0
2627	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Serratia</i>	46.4	6.7	48.0	43.5	3.3–61.0
2768	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	9.0	0	0	0.01	0.01–0.4
2779	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	1.8	6.7	4.0	0.06	0.01–0.75
2852	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Silanimonas</i>	0	13.3	0	1.4	0.2–4.9

Примечание: * - номер ОТЕ по международной базе Silva;

** - Представители автохтонного бактериального сообщества рудного штабеля КВ;

*** - Представители бактериальных сообществ, развивающиеся в модельных условиях рудного штабеля КВ



Рисунок 3.18. Диаграмма Венна, демонстрирующая число общих и уникальных ОТЕ в бактериальных сообществах природно-техногенных комплексов КВ исследуемых месторождений (где 3 – общие ОТЕ для 4х месторождений; 1, 2, 5 – общие ОТЕ для 2х-3х месторождений; 4 – уникальные ОТЕ)

Среди доминирующих представителей бактериальных сообществ четырех месторождений были выявлены преобладающие флотипы *Achromobacter* и *Serratia*, которые в разделе 3.1.4 определены как маркеры процесса деструкции цианидов. Это свидетельствует о том, что территориальное расположение месторождений, а также химический и минеральный состав их руд не влияет на развитие основных деструкторов цианидов.

Следует отметить, что представители родов *Achromobacter* и *Serratia* ранее были охарактеризованы и в других сходных по экологическим характеристикам местам обитания. Так, анализ микробных сообществ, развивающихся в аэробном или цианидсодержащих сточных водах (Тэджон, Корея), с помощью амплификации консервативных фрагментов гена 16S рРНК, их разделения в денатурирующем градиентном гель-электрофорезе (ДГГЭ) и секвенирования индивидуальных полос, позволил идентифицировать представителей рода *Achromobacter*, которые были способны к деструкции свободного цианида [52]. В исследованиях [57, 61, 72, 73] была показана перспективность использования изолированных штаммов рода *Serratia* (*S. marcescens*, *S. odorifera*) в детоксикации отходов, содержащих цианиды, тиоцианаты и тяжелые металлы. Кроме того, для некоторых штаммов родов

Achromobacter и *Serratia* отмечена высокая устойчивость к тяжелым металлам. Так, для штаммов *Serratia marcescens* M6 и RL2b показана устойчивость к As, Co, Ni, Hg, Cu, Zn, Pb, Cd и Cr [57, 71, 149], *Achromobacter denitrificans* PQ-1 и *Achromobacter* sp. AO22 – к Cu и Cd [150]. Это подтверждает ранее полученные нами результаты об отсутствии зависимости развития основных доминирующих деструкторов цианидов (представителей родов *Achromobacter* и *Serratia*) от территориального расположения объекта и его минерального и химического состава.

Помимо общих фило типов для всех четырех месторождений, среди их бактериальных сообществ были выявлены следующие сходства. Бактериальное сообщество месторождений «Бабушкина гора» и «Подгоlechное» имели 5 общих фило типов, которые не были идентифицированы в других месторождениях, «Самолазовское» и «Подгоlechное» – 2 общих фило типа, а для «Чазы Гол» и «Подгоlechное» – 2 общих фило типа (рис. 3.17, табл. 3.12). Среди них отмечены представители *Hydrogenophaga*, *Silanimonas* и *Sphingomonas*. По результатам модельного эксперимента (раздел 3.1.4) представители данных родов отнесены к цианидрезистентным бактериям, которые могут выполнять сопутствующие биохимические реакции при деструкции цианидсодержащих соединений и являются значимыми в процессе детоксикации отходов КВ. Так как данные фило типы идентифицированы в бактериальных сообществах разных месторождений и не являются общими для всех четырех, предполагается, что на их развитие оказывает влияние химический и минеральный состав руд.

Дополнительно, лишь для одного месторождения («Чазы Гол») не было отмечено явно выраженного преобладания фило типов и наблюдалось наличие уникальных ОТЕ (*Acidovorax*, *Algoriphagus*, *Pseudonocardia* и *Pusillimonas*), которые отсутствовали в бактериальных сообществах других месторождений. По-видимому, их развитие в месторождении «Чазы Гол» так же связано с особенностью его химического и минерального состава.

Отличия в бактериальном сообществе данного месторождения может быть обусловлено содержанием высоких концентраций мышьяка (0.31 мг/дм^3), кобальта

(2.48 мг/дм³), марганца (0.61 мг/дм³), и железа (0.31 мг/дм³) в составе жидкой фазы руды (табл. 3.1), а также повышенным содержанием мышьяка (0.33%), серы (1.36%) в твердой фазе руды (табл. 3.2) и присутствия значительной доли (3.2%) минералов класса сульфидов – пирита и арсенопирита (табл. 3.3).

Так же как для месторождения «Чазы Гол», для месторождения «Подголецное» было отмечено высокое содержание в жидкой и твердой фазе руды кобальта (0.064 мг/дм³), серы (0.371%) и сульфидных минералов (1.0% – пирита и арсенопирита) (табл. 3.1–3.3). Это обусловило сходство бактериальных сообществ месторождений по представленности общих фило типов *Pedobacter* и *Silanimonas*.

Ранее в исследованиях [151, 152] представители родов *Pedobacter*, *Pseudonocardia* и *Pusillimonas* были культивированы из почв, загрязненных As, Fe, Cu, Ni, Zn, Cd, Pb и Cr, а также была показана их устойчивость к данным металлам. Для штамма *Acidovorax* sp. VoFeN1 отмечена способность к окислению Fe (II) [153]. На основании литературных данных и полученных результатов можно предположить, что уникальные представители месторождения «Чазы Гол» устойчивы к высоким концентрациям As, Co, Mn, Fe, Ni, Sb и высокому содержанию сульфидных минералов, поэтому они активно развиваются в технологическом растворе и рудном штабеле данного месторождения. Для остальных идентифицированных фило типов (*Hydrogenophaga*, *Silanimonas* и *Sphingomonas*) данные токсичные соединения выступают в качестве ингибиторов.

Ранее в исследованиях [154] с помощью метагеномного и статистического анализа было показано, что концентрации Fe, S, Ca, Mg, Zn, Cu и pH находятся в сильной корреляционной связи с бактериальным разнообразием и оказывают влияние как на филогенетическое и функциональное разнообразие, так и на состав и структуру микробных сообществ кислых шахтных вод. Эти исследования подтверждают выдвинутое предположение о существовании ключевых факторов окружающей среды, влияющих на состав бактериальных сообществ, развивающихся в природно-техногенных комплексах КВ.

Таким образом, определено, что бактериальные сообщества изучаемых природно-техногенных комплексов КВ имели большое сходство. Во всех четырех

месторождениях развивались представители родов *Achromobacter* и *Serratia*, которые выступают маркерами процессов деструкции цианидсодержащих соединений. Показано, что на их развитие не влияет территориальное расположение месторождений, а также химический и минеральный состав руды. Данные факторы оказывают воздействие на развитие уникальных представителей бактериального сообщества, а также на сопутствующих участников деструкции.

3.2.2 Влияние разнофазности природно-техногенных комплексов КВ на состав представителей бактериального сообщества

Отходы КВ золота представляют собой разнофазную систему: рудный штабель и технологический раствор. В данных экосистемах микроорганизмы развиваются как в жидкой фазе, так и адсорбируются на рудных частицах. Сравнительный анализ представленности флотипов в рудном штабеле и технологическом растворе осуществляли для учета влияния разнофазности отходов КВ на структуру бактериальных сообществ и состав основных функциональных групп бактерий, осуществляющих деструкцию цианидов.

Исследования проводили на примере автохтонных бактериальных сообществ природно-техногенного комплекса «Бабушкина гора». Всего была проанализирована 61 последовательность: 38 – из рудной массы штабеля КВ, 23 – из технологического раствора. Учитывая результаты молекулярно-генетического сравнительного анализа, который показал уровень сходства 95.1–100%, филогенетический анализ проведен с типовыми штаммами и ближайшими гомологами, изолированными или определенными в сходных по экологическим признакам экосистемах (Приложение Д). По результатам филогении преобладающих представителей автохтонных бактериальных сообществ идентифицировали только на уровне родов как *Serratia*, *Achromobacter*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter* и *Hydrogenophaga* [155].

Бактериальное сообщество рудного штабеля имело невысокое разнообразие, в его составе определены представители двух фил *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Преобладающими флотипами в составе суммарного микробиома

выступали представители *Proteobacteria* – *Serratia* (68.4%) и *Achromobacter* (21.1%) (рис. 3.19).

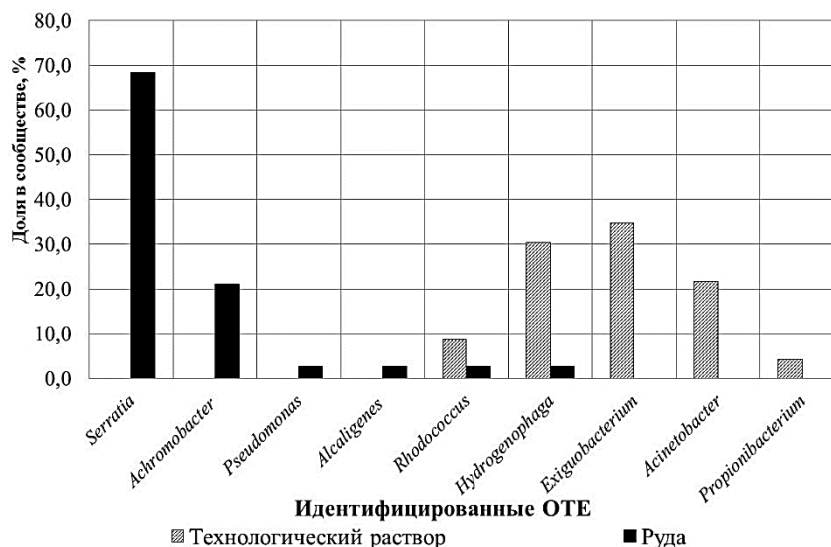


Рисунок 3.19. Разнообразие доминирующих представителей (ОТЕ) бактериальных сообществ, развивающихся в технологическом растворе и рудной массе штабеля КВ месторождения «Бабушкина Гора»

Характерной особенностью являлось наличие большого числа редких фило типов – *Bordetella*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Всего в бактериальном сообществе рудного штабеля КВ было идентифицировано 6 доминирующих фило типов.

Микробиоценоз технологического раствора отличался большим разнообразием, где кроме *Actinobacteria* и *Proteobacteria* была определена фила *Firmicutes*. Представленность доминирующих фило типов была меньше (5 ОТЕ). Преобладающими выступали *Exiguobacterium* (34.8%), *Hydrogenophaga* (30.4%) и *Acinetobacter* (21.7%), редкие формы были идентифицированы как *Propionibacterium* и *Rhodococcus* (рис. 3.19).

Общими для технологического раствора и рудного штабеля выступали фило типы *Hydrogenophaga* и *Rhodococcus*, которые отнесены к преобладающим и редким фило типам соответственно.

Несмотря на то, что в процессе КВ рудный штабель и технологический раствор между собой тесно связаны в системе непрерывного цикла кучного выщелачивания, структуры их бактериальных сообществ различались. В процессе

КВ при орошении технологическим раствором рудного штабеля происходит уменьшение разнообразия и изменение структуры сообществ.

Так как технологический раствор представляет из себя менее стабильную систему, его бактериальное сообщество имело большее разнообразие на уровне крупных таксонов (фил), чем сообщество рудного штабеля. Представители микробиома технологического раствора отнесены к 3 филам. Однако представленность филотипов было ниже (5 ОТЕ). Их доля варьировала от 5.0 до 34.8%, и не было выявлено явно выраженных преобладающих филотипов (рис. 3.19).

В отличие от технологического раствора, рудная масса штабеля КВ представляет из себя более стабильную систему, поэтому ее бактериальное сообщество имело меньшее разнообразие – представители отнесены к 2 филам. При этом представленность филотипов увеличивалась до 6 ОТЕ и отмечалось явно выраженное преобладание представителей рода *Serratia*, доля которых составляла 68.4% (рис. 3.19).

Полученные нами результаты согласуются с проведенными ранее работами китайских ученых, которые с помощью молекулярного клонирования генов 16S рРНК и метагеномного анализа изучали разнообразие бактериальных сообществ, развивающихся в системе биовыщелачивания медного рудника Dexing (провинция Цзянси, Китай) [156]. Исследования основывались на выявлении различий в разнообразии бактериальных сообществ, развивающихся в кислых дренажных водах и рудном штабеле КВ при бактериальном выщелачивании. Аналогично нашим результатам было показано, что структуры изучаемых сообществ различались. Разнообразие в бактериальном сообществе рудного штабеля КВ было более стабильное с явно выраженным преобладанием филотипа *Acidiphilium* (91.7%), по сравнению с разнообразием дренажных вод [156].

Преобладание отдельных филотипов в структуре бактериального сообщества может свидетельствовать о создании благоприятных условий для развития этих представителей в определенной фазе природно-техногенного комплекса КВ. В рудном штабеле поверхностный грунт оказывает влияние на формирование

определенных условий внутри его, таких как температурный режим, проницаемость, аэрация, поступление питательных компонентов, которые благоприятно влияют на развитие преобладающих представителей рода *Serratia*. В предыдущих разделах было показано (гл. 3.1.4 и 3.2.1), что представители данного рода являются общими для четырех разных месторождений и выступают потенциальными участниками в деструкции цианидов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основные функциональные группы бактерий (*Serratia* и *Achromobacter*) преимущественно развиваются в рудном штабеле КВ.

Однако, несмотря на то, что структура и разнообразие бактериальных сообществ рудного штабеля КВ и технологического раствора отличались, для их представителей прослеживалась экологическая обособленность. В результате филогенетического анализа показано, что на филогенетических деревьях полученные последовательности *из рудного штабеля КВ* формировали отдельные кластеры с типовыми штаммами и ближайшими гомологами, изолированными или определенными в активном иле [157], почвах, загрязненных тяжелыми металлами и в промышленных сточных водах (Приложение Д) [158]. Для представителей бактериального сообщества *технологического раствора* было характерно наличие в кластерах типовых штаммов и ближайших гомологов, выделенных из сходных по экологическим признакам экосистемах. К таким экосистемам относились почвы [159], сточные воды [160] и холодные места обитания (ледник Гималайского хребта (Индия)) (Приложение. Д). На основании этого можно сделать вывод, что преобладающие представители автохтонных бактериальных сообществ технологического раствора и рудного штабеля КВ имеют экологическую обособленность. Эта особенность заключается не только в их резистентности к определенному экологическому фактору среды, но и в генетическом сходстве географически отдаленных штаммов микроорганизмов.

Таким образом, показано, что разнофазность природно-техногенных комплексов КВ влияет на структуру бактериальных сообществ. В технологическом растворе развивается большее разнообразие микроорганизмов на уровне крупных таксонов, без явно выраженных преобладающих форм. Бактериальное сообщество

рудного штабеля имеет невысокое разнообразие с явным преобладанием фило типа – *Serratia*. Установлено, что основные функциональные группы бактерий (*Serratia* и *Achromobacter*) преимущественно развиваются в рудном штабеле КВ. Выявлено, что, не смотря на разницу в структуре бактериальных сообществ рудного штабеля КВ и технологического раствора, их преобладающие представители имеют экологическую обособленность.

3.3 Разработка технологии биодетоксикации отходов КВ золота на примере месторождения «Подголечное»

При проведении исследований по детоксикации отходов КВ золота под воздействием автохтонных бактериальных сообществ и по определению влияния экологических факторов на их разнообразие, состав и структуру на примере разных месторождений были изучены основные закономерности биодетоксикации (гл. 3.1 и 3.2). Выявлены основные группы бактерий, осуществляющие деструкцию цианидов и их метаболитов, рассчитаны соответствующие кинетические зависимости, позволяющие прогнозировать поведение цианидсодержащих соединений в рудном штабеле КВ и обезвреживание отходов в целом. Полученные данные стали базой для разработки технологии биодетоксикации отходов КВ золота.

3.3.1 Основные положения разрабатываемой технологии

На первом этапе разработки технологии биодетоксикации цианидсодержащих отходов КВ золота месторождения «Подголечное» проводили расчет водного баланса установки КВ для определения способа утилизации излишек вод отработанных технологических растворов. Вторым важным вопросом является продолжительность операции обезвреживания основной массы рудного штабеля КВ.

Наиболее привлекательным и экологичным для утилизации излишек вод является способ испарения технологических растворов и дренажей на испарительных площадках. Он исключает операцию реагентного обезвреживания.

Однако осуществление этого способа возможно только в случае наличия отрицательного водного баланса установки КВ [8].

По данным технологического регламента *рудный штабель установки КВ* месторождения «Подголецное» [4], подлежащий сезонному обезвреживанию, содержал 200000 т руды. Насыпная плотность руды составляла 1.63 т/м³. Угол естественного откоса рудного штабеля КВ – 36°, а высота штабеля – 8 м. Рудный штабель имел форму усеченной пирамиды, соотношение сторон (площадки орошения), которого было равно 1.5:1. Для составления водного баланса необходимо было определить основные размеры рудного штабеля. Объем рудного штабеля в соответствии с работой [8] можно определить, применяя следующее уравнение [161]:

$$V = \frac{h}{6} [(2a + a_1)b + (2a_1 + a)b_1], \text{ где} \quad (3.1)$$

V – объем рудного штабеля, м³;

h – высота рудного штабеля, м;

a – длина основания, м;

b – ширина основания, м;

a_1 – длина площадки орошения, м;

b_1 – ширина площадки орошения, м.

Длину и ширину основания (a и b) можно высчитать с использованием формул:

$$a = a_1 + 2h \operatorname{ctg} \frac{\pi\alpha}{180} \quad (3.2)$$

$$b = b_1 + 2h \operatorname{ctg} \frac{\pi\alpha}{180}, \text{ где} \quad (3.3)$$

α – естественный откос установки кучного выщелачивания, град.

После сокращения 3.1 с учетом 3.2 и 3.3 получали:

$$V = ha_1b_1 + h^2b_1 \operatorname{ctg} \frac{\pi\alpha}{180} + h^2a_1 \operatorname{ctg} \frac{\pi\alpha}{180} + \frac{8}{6}h^3 \operatorname{ctg}^2 \frac{\pi\alpha}{180} \quad (3.4)$$

С учетом соотношения $a_1/b_1 = 1.5$, получали:

$$V = 1,5hb_1^2 + h^2b_1 \operatorname{ctg} \frac{\pi\alpha}{180} + 1,5h^2b_1 \operatorname{ctg} \frac{\pi\alpha}{180} + \frac{8}{6}h^3 \operatorname{ctg}^2 \frac{\pi\alpha}{180} \quad (3.5)$$

В результате решения уравнения 3.5 b_1 составляло 91.8 м, a_1 – 137.7 м, a – 152,3 м и b – 113.9 м. На основании определенных размеров рудного штабеля проводили расчет площади установки КВ, соприкасающейся с атмосферой по уравнению:

$$S = \frac{h}{\sin \frac{\pi\alpha}{180}} * (a_1 + a) + \frac{h}{\sin \frac{\pi\alpha}{180}} * (b_1 + b) + a_1 * b_1, \text{ где} \quad (3.6)$$

S – площадь установки КВ, соприкасающаяся с атмосферой (площадь испарения), м².

В результате искомая площадь, соприкасающаяся с атмосферой (площадь испарения одного рудного штабеля КВ в 200000 т.), составила 19362.26 м², а площадь основания – 17346.97 м².

Помимо рудного штабеля в водный баланс установки КВ свою долю вносит **система накопительных прудов**. На площадке КВ размещено два технологических пруда-накопителя – обеззолоченного раствора и золотосодержащего раствора. Пруды имели прямоугольную форму. Средняя глубина прудов составляла около 2.5 м [4]. Объем пруда-накопителя обеззолоченного раствора составлял около 3700 м³, объем пруда-накопителя золотосодержащего раствора – 7500 м³. Общая площадь прудов равна 4485.9 м².

Таким образом, на площадке КВ можно выделить следующие объекты, участвующие в формировании водного баланса технологического процесса: рудный штабель и пруды-накопителя. Их основные характеристики приведены в таблице 3.13. Метеорологические условия площадки КВ, необходимые для составления водного баланса, представлены в таблице 3.14.

Для ликвидации излишек вод следует проводить мероприятия по уборке и вывозу снега за пределы промышленной площадки КВ в зимний период. В летний период рекомендуется провести модернизацию отделения орошения с использованием оросительной системы с вращающимися эмиттерами типа Wobbler (Senninger Irrigation Inc., США) для интенсификации испарения воды. Разность между испарением с открытой поверхности воды и поверхности установки КВ с

предполагаемым орошением характеризуется эмпирическим коэффициентом равным 1.2 [162].

Таблица 3.13

Основные характеристики объектов площадки КВ, задействованных в водном балансе

Объект	Площадь испарения, м ²	Примечания
Установка КВ	19362.26	Площадь основания 17346.97 м ²
Пруд-накопитель обеззолоченного раствора	1495.3	Общая площадь 4485.9 м ²
Пруд-накопитель золотосодержащего раствора	2990.6	

Таблица 3.14

Характеристика осадков и испарения с открытой водной поверхности в районе расположения площадки КВ (по данным метеостанции «Алдан»)

Месяц	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Σза год
Осадки*, мм	30	24	27	40	61	82	95	114	79	58	42	30	682.0
Испарение с открытой водной поверхности*, мм	-	-	-	-	53	93	95	66	40	-	-	-	311.0

Примечание: * - среднемесячные показатели осадков и испарения

На основании представленных данных был рассчитан водный баланс основных объектов площадки КВ месторождения «Подгоlechное» (табл. 3.15). Система «рудный штабель–пруды-накопители» месторождения «Подгоlechное» имела отрицательный водный баланс – испарение из системы превышает осадки на 209.1 м³ за теплый период (май – сентябрь) (табл. 3.15). При орошении штабеля КВ обратными дренажными водами возникает возможность полностью ликвидировать технологические растворы в течение одного сезона (150 суток). Талые воды не будут образовываться за счет мероприятий по вывозу снега с площадки КВ.

Несмотря на то, что данные параметры были рассчитаны для одного рудного штабеля КВ (200000 т), полученные результаты можно перенести на весь комплекс установок КВ.

Таким образом, создавшийся дефицит технологических растворов позволяет применить импульсный режим промывки, который заключается в периодическом орошении рудного штабеля КВ дренажными водами, накапливающимися при обезвоживании рудной массы. Применение импульсного режима позволит уменьшить объем анаэробных зон за счет принудительной вентиляции каналов рудного штабеля и, в последствии, позволит усилить активность автохтонного бактериального сообщества. Периодичность подачи растворов будет определяться интенсивностью накопления дренажных вод в пруде-накопителе.

Ранее [8] было показано, что рудный штабель характеризуется неоднородностью с точки зрения температурного режима и аэрации и условно включает в себя четыре слоя (табл. 2.3). Проведенные лабораторные исследования по детоксикации отходов КВ под действием бактериального фактора позволили определить, что наиболее интенсивная деструкция цианидов протекает при положительных температурах и в аэробных условия. Деструкция тиоцианатов – при отрицательных температурах. Для получения достоверных технологических параметров биодетоксикации рудного штабеля КВ в качестве основы были взяты данные, полученные для слоя 3 (+4°C, +O₂). Дополнительно, для расчетов продолжительности деструкции токсичных соединений в зимний период использовали данные, полученные для слоя 2 (-18°C, +O₂). Расчет продолжительности детоксикации цианидов (включая цианидные комплексы меди и никеля) в летний период проводили по полученному в главе 3.1.2 аппроксимирующему уравнению, характерному для слоя 3, в зимний период – уравнению, характерному для слоя 2 (зимний период) (табл. 3.16).

Таблица 3.16

Аппроксимирующе уравнения биодеструкции основных токсичных соединений

Токсичные соединения	Период	k, 1/сутки	Аппроксимирующее уравнение биодеструкции	Достоверность аппроксимации
Цианиды (включая цианидные комплексы Cu и Ni)	Летний период	0.012	$C_0 = 81.63 \times e^{-0.012t}$	0.7125
Цианиды (включая цианидные комплексы Cu и Ni)	Зимний период	0.001	$C_0 = 81.63 \times e^{-0.001t}$	0.7729
Тиоцианаты	Зимний период	0.002	$C_0 = 13.3 \times e^{-0.002t}$	0.8673

Примечание: C_0 – исходная концентрация цианидов или тиоцианатов, мг/дм³; C – концентрация цианидов или тиоцианатов в заданной точке, мг/дм³; k – константа скорости реакции при заданной температуре и аэрации, 1/сутки; t – скорость деструкции цианидов или тиоцианатов, сутки.

При проведении модельного эксперимента концентрация тиоцианатов в слое 3 в присутствие микроорганизмов была нестабильна. Отмечали рост содержания SCN⁻ до 21.4 мг/дм³. В слое 2 (зимний период) отмечали деструкцию тиоцианатов

до 4.3 мг/дм³ (см. раздел 3.1.2), поэтому использовали аппроксимирующее уравнение, полученное для этого слоя (табл. 3.16).

Как было отмечено ранее [25], деструкция тиоцианатов происходит только после деструкции цианидов, даже при биодетоксикации. Полученные результаты модельного эксперимента свидетельствовали о нехватке времени, для деструкции SCN⁻ в его условиях. По данным С.В. Петрова в условиях реального рудного штабеля КВ в аэробных слоях содержание тиоцианатов будет снижаться до 0.17 мг/дм³ за счет орошения штабеля КВ [8].

На основании полученных результатов по расчету продолжительности биообезвреживания цианидов, включая цианидные комплексы меди и никеля, уже за 2.5 года можно наблюдать обезвреживание цианидов до ПДК (0.05 мг/дм³) (табл. 3.17).

Таблица 3.17

Результаты расчетов продолжительности биообезвреживания цианидов, включая цианидные комплексы меди и никеля

Продолжительность	Исходная концентрация, мг/дм ³	Периоды/конечные концентрации, мг/дм ³	
		Летний период	Зимний период
Первый год	81.63	13.49	10.88
Второй год	10.88	1.8	0.32
Третий год	0.32	0.05	0.01

Учитывая длительность процесса деструкции тиоцианатов, рекомендовано продлить продолжительность биодетоксикации рудного штабеля КВ до 3-х лет. Это позволит снизить концентрации SCN⁻ до значений НДС. После трех лет биодетоксикации оставшиеся соединения в рудном штабеле КВ не будут оказывать влияния на экологическую обстановку района размещения предприятия. После завершения операции биодетоксикации необходимо провести рекультивацию рудного штабеля.

3.3.2 Основные технологические параметры биодетоксикации отходов КВ золота на месторождении «Подгоlechное»

На основании полученных результатов, обезвреживание отходов КВ золота на месторождение «Подгоlechное» предлагается проводить способом биодетоксикации. Суть метода заключается в использовании самопроизвольного разрушения токсичных соединений под действием природных факторов, в том числе деятельности автохтонного бактериального сообщества. Так как в анаэробных условиях отмечали низкий уровень биодетоксикации, для исключения анаэробных зон в рудном штабеле КВ, создания благоприятных условий и интенсификации процесса биодеструкции рекомендовано проводить орошение рудного штабеля технологическими растворами и образующими дренажными водами при обезвоживании рудной массы. Дополнительно следует проводить мероприятия по уборке и вывозу снега за пределы промышленной площадки КВ в зимний период. В летний период предполагается провести модернизацию отделения орошения и промывку рудного штабеля КВ осуществлять с помощью вращающихся эмиттеров типа Wobbler.

В таблице 3.18 представлен состав основных токсичных соединений рудного штабеля КВ до и после биодетоксикации. Технологическая и аппаратная схемы процесса приведены на рисунках 3.20 и 3.21. Состав отходов после трех лет биодетоксикации (табл. 3.18) является экологически безопасным и удовлетворяет нормам НДС для района расположения предприятия месторождения «Подгоlechное».

Таблица 3.18

Состав основных токсичных соединений во влаге рудного штабеля КВ до и после биодетоксикации

Компонент	Содержание, мг/дм ³	
	до биодетоксикации	после биодетоксикации
pH	10.0	9.0–10.0
CN ⁻	81.63	0.05
SCN ⁻	13.3	0.17
Cu	20.3	<0.05
Ni	0.5	<0.03

Основные технологические параметры предлагаемой технологии следующие:

1. Плотность орошения 1 м² поверхности рудного штабеля – 190 л/сут;
2. Тип орошения рудного штабеля – с помощью вращающихся эмиттеров типа Wobbler;
3. Периодичность орошения при импульсном режиме– 1–6 суток (по мере накопления растворов);
4. Продолжительность обезвреживания – 1095.0 суток;
5. Количество теплых сезонов на обезвреживание – 3.0;
6. Количество холодных сезонов на обезвреживание – 3.0;
7. Продолжительность операции испарения технологических растворов и дренажных вод за первый теплый сезон проведения обезвреживания – 150 суток;
8. Мероприятия по уборке и вывозу снега – 3 сезона.

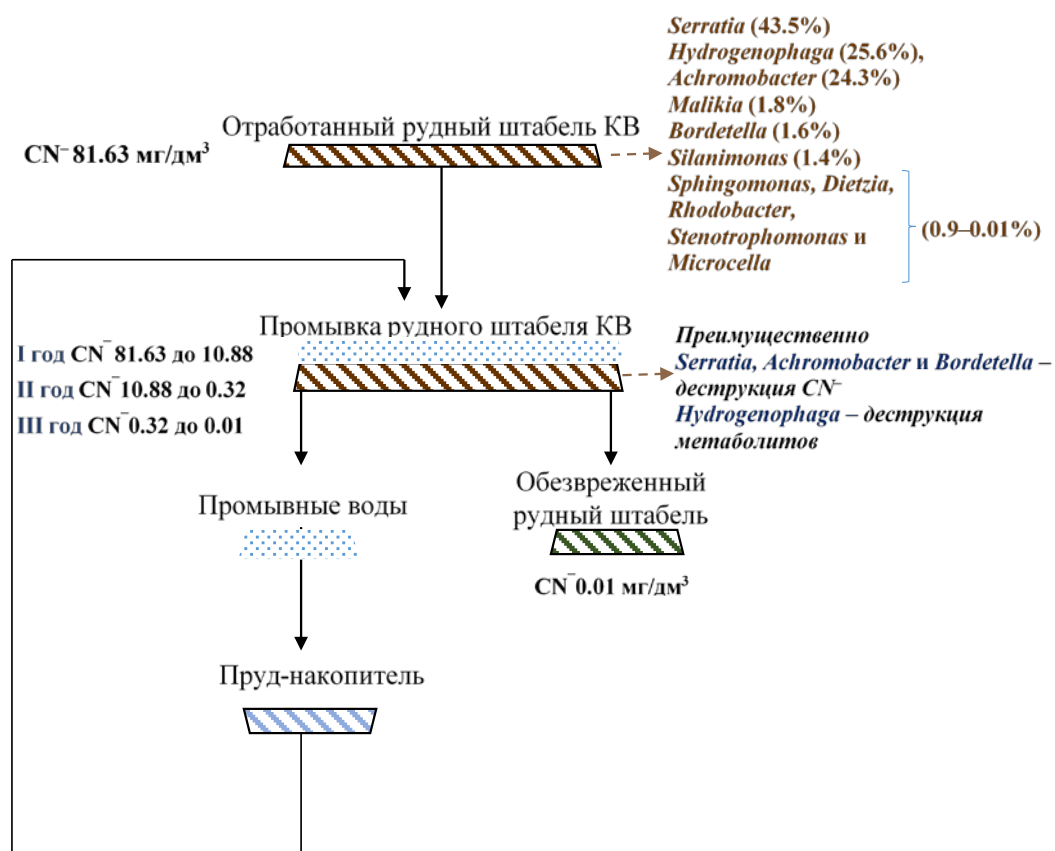


Рисунок 3.20. Технологическая схема процесса биодетоксикации рудного штабеля КВ с модернизированным отделением орошения

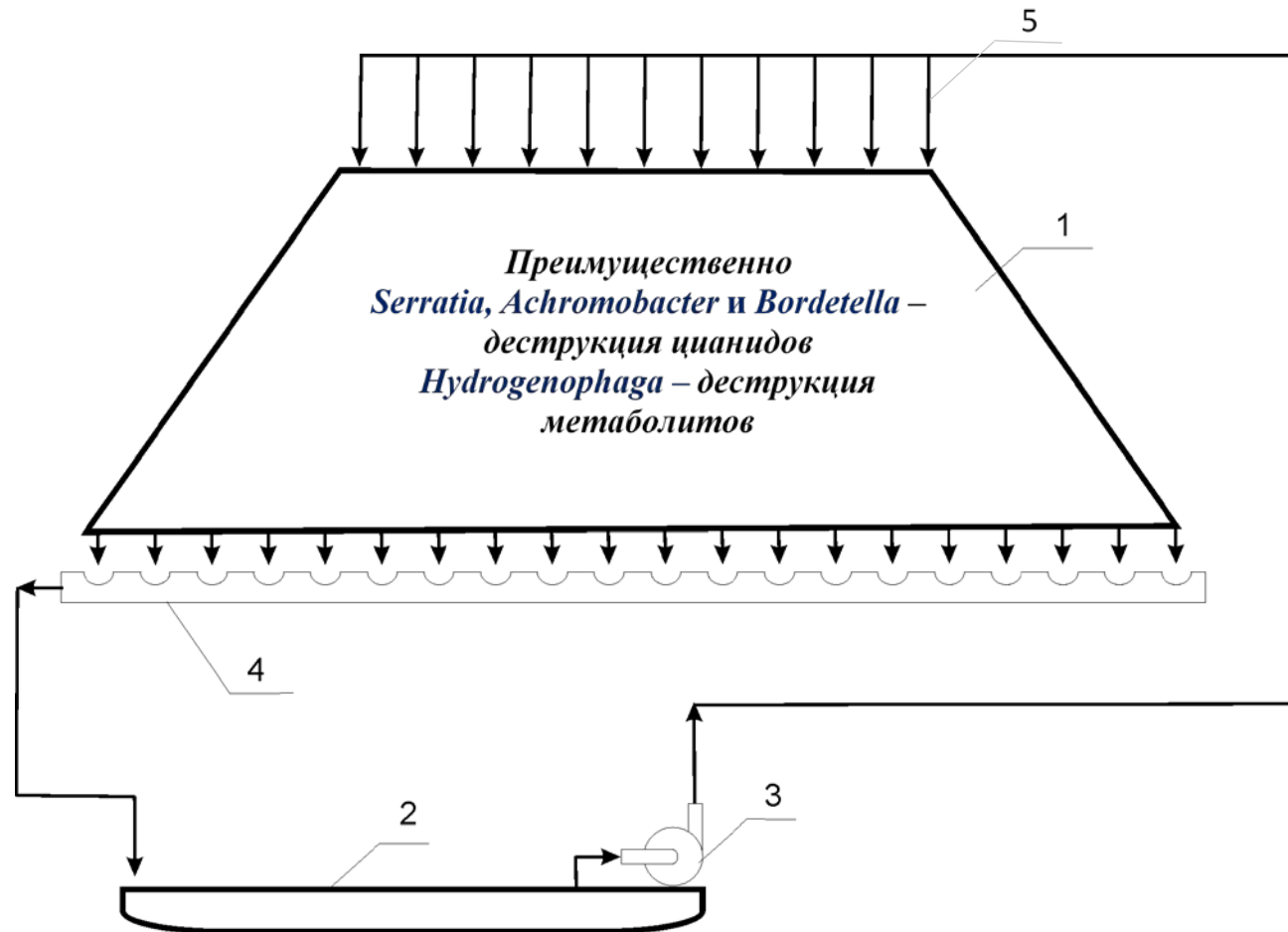


Рисунок 3.2. Аппаратурная схема процесса биодетоксикации рудного штабеля КВ золота с модернизированным отделением орошения. 1 – рудный штабель; 2 – пруд-накопитель; 3 – насос; 4– система сбора дренажа; 5 – оросительная система с эмиттерами типа Wobbler

Процесс биодетоксикации предлагается начинать в теплый период на следующий год после прекращения операции выщелачивания золота. В соответствии с представленной аппаратурной схемой, технологические растворы и дренажные воды испаряются в системе, состоящей из рудного штабеля и прудов-накопителей (рис. 3.21, позиция 1 и 2). Подача промывных вод на рудный штабель осуществляется насосом (рис. 3.21, позиция 3). Орошение рудного штабеля происходит с помощью системы с эмиттерами типа Wobbler (рис. 3.21, позиция 5). Сбор дренажных вод проводится дренажной системой (рис. 3.21, позиция 4), по которой воды поступают в пруд-накопитель. В процессе проводимых мероприятий необходимо обеспечить мероприятия по уборке и вывозу снега, контроль за ходом процесса биодетоксикации и проводить мониторинг состояния окружающей среды. Биодетоксикация рудного штабеля КВ обеспечивает снижение концентраций цианидов с 81.63 до 0.05 мг/дм³, тиоцианатов – с 13.3 до 0.17 мг/дм³, меди и никеля – с 20.3 и 0.5 мг/дм³ до менее 0.05 и менее 0.03 мг/дм³ соответственно. Основные представители автохтонного бактериального сообщества, осуществляющие деструкцию цианидсодержащих соединений и выявленные в ходе лабораторных исследований, представлены на рисунках 3.20 и 3.21. После завершения биодетоксикации на четвертый год рекомендуется провести рекультивацию рудного штабеля КВ.

3.3.3 Оценка экономической эффективности разработанной технологии биодетоксикации отходов КВ

Разработанная технология биодетоксикации отходов КВ базируется на высокой экологической и экономической эффективности, по сравнению с традиционной химической технологией, применяемой на месторождении «Подгольное». Биодетоксикация не требует затрат на обезвреживание реагентов, для ее реализации можно применять оборудование (пруды-накопители, насосы, трубопроводы) уже существующее на территории комплекса КВ. Введение дополнительных мероприятий по модернизации отделения орошения, а также по

уборке и вывозу снега будут проводиться при минимальных капитальных и эксплуатационных затратах.

В соответствии с технологическим регламентом [4], обезвреживание отработанного рудного штабеля КВ на месторождении «Подгольное» предлагалось проводить методом хлорирования с последующей обработкой сульфатом двухвалентного железа (железным купоросом). По проектной схеме для обезвреживания одного штабеля массой 200000 т потребуется 260 т гипохлорита кальция (100 % активности), 840 т железного купороса (100% по $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) и 120 т гидроксида натрия (100% по NaOH). Расчет эксплуатационных затрат на реагенты, применяемые для обезвреживания одного рудного штабеля КВ в течение 1 года (1 сезона), представлен в таблице 3.19. Стоимость реактивов приведена с учетом современных рыночных цен.

Таблица 3.19

Расчет эксплуатационных затрат на реагенты, применяемые для обезвреживания одного рудного штабеля КВ методом хлорирования с последующей купоросной обработкой

Применяемые реагенты	Стоимость реактивов*, руб/т	Расход реактивов, т/200000т	Стоимость реактивов, тыс. руб./200000т
Гипохлорит кальция (100%)	122681.6	260.0	31897.2
Железный купорос (100%)	56539.4	840.0	20580.0
Гидроксид натрия (100%)	24500.0	120.0	6787.7
Итого:	-	-	59261.9 в том числе НДС

Примечание:* – стоимость реактивов представлено с учетом НДС

В результате, эксплуатационные затраты на обезвреживание одного рудного штабеля КВ месторождения «Подгольное» составляют 59261.9 тыс. рублей в том числе НДС. Весь комплекс КВ на месторождении «Подгольное» включает в себя четыре штабеля с суммарной массой 800000 т. Соответственно для обезвреживания всего комплекса КВ потребуется 237047.6 тыс. рублей в том числе НДС.

Технология биодетоксикации является безреагентной. Для реализации разработанной технологии предполагается использовать оросительные системы с

вращающимися эмиттерами типа Wobbler. Данные эмиттеры можно устанавливать непосредственно на существующую капельную систему орошения комплекса КВ. Для обработки одного рудного штабеля КВ (200000 т), имеющего площадь орошения 19362.26 м², потребуется 477 эмиттеров типа Wobbler. На сегодняшний день цена одного эмиттера с насадкой №8 составляет 684.0 руб. В результате расходы на модернизацию существующего отделения орошения, включающие новые капитальные вложения на приобретение эмиттеров и их монтаж (10% от стоимости), будут составлять 1435.6 тыс. руб (на четыре рудных штабеля).

Согласно разработанной технологии, дополнительно в зимний период необходимо проводить мероприятия по уборке и вывозу снега с площадки КВ. Расходы на дополнительные эксплуатационные затраты на мероприятия по уборке и вывозу снега представлены в таблице 3.20.

Таблица 3.20

Расчет эксплуатационных затрат на мероприятия по уборке и вывозу снега за 1 сезон

Операция	Оборудование	Объем снега, м ³	Затраты времени, маш. час	Стоимость маш.час, руб	Затраты, тыс.руб.
Расчистка площадки от снега	Бульдозер Т-11	16200	122	1933	236.7
Погрузка снега в автосамосвалы	Экскаватор РС-400	16200	151	2773	419.8
Транспортирование снега	Автосамосвалы БелАЗ-7540А	16200	675	2049	1383.5
Итого:	-	-	-	-	2039.6

В результате проведенных расчетов определено, что эксплуатационные затраты на уборку и вывоз снега с рудного штабеля (массой 200000 т) за 1 сезон будут составлять 2039.6 тыс. руб. Учитывая, что весь комплекс КВ на месторождении «Подголецное» включает в себе четыре штабеля, а продолжительность обезвреживания по предлагаемой технологии составляет 3 года, эксплуатационные затраты составят 24475.2 тыс. руб.

Экономическую эффективность оценивали по укрупненным показателям путем сопоставления капитальных и эксплуатационных затрат. В

эксплуатационные затраты так же входили расходы на электроэнергию и заработную плату персонала. Расчеты эксплуатационных затрат на потребляемую электроэнергию и заработную плату для комплекса КВ двух схем обезвреживания, приведены в таблицах 3.21 и 3.22.

Таблица 3.21

Расчет эксплуатационных затрат на потребляемую электроэнергию для двух схем обезвреживания

Оборудование	Кол-во, шт	Мощность оборудования, кВт	Время работы, ч	Итого на комплекс КВ, тыс.кВ	Итого на комплекс КВ, тыс.руб
Существующая схема обезвреживания					
Центробежный насос Warman EVR-100R	1	75	3600	918	5251.0
Предлагаемая схема обезвреживания					
Центробежный насос Warman EVR-100R	1	75	14400	3672	21003.8

Таблица 3.22

Расчет эксплуатационных затрат на заработную плату персонала для двух схем обезвреживания

Наименование	Среднемесячная заработная плата, руб	Численность трудящихся, чел	Кол-во рабочих месяцев	Фонд заработной платы, тыс.руб
Существующая схема обезвреживания				
Рабочие	48666.0	4	5	681.3
Социальные отчисления	-	-	-	292.0
Итого:	-	-	-	973.3
Предлагаемая схема обезвреживания				
Рабочие	48666.0	4	15	2044.0
Социальные отчисления	-	-	-	876.0
Итого:	-	-	-	2920.0

Расход электроэнергии, потребляемой электродвигателями центробежного насоса Warman EVR-100R, вычисляли с учетом тарифа (5.72 руб/кВ), который соответствовал региону размещения комплекса КВ. Расход на электроэнергию для разработанной схемы биодетоксикации составил 21003.8 тыс. руб. в год (табл.

3.21). Учитывая, что продолжительность орошения по технологическим параметрам – 3 сезона, общий расход составит 63011.4 тыс. руб.

Определение эксплуатационных затрат на заработную плату проводили исходя из двенадцатичасового графика работы отделения обезвреживания, на основании штатных норм по обслуживанию оборудования, а также сменной и явочной численностью персонала, которая составляет в среднем 4 человека. Расчет годового фонда заработной платы персонала и отчислений на социальные нужды осуществили в соответствии с расценками среднемесячной заработной платы предприятия.

Для оценки экономического эффекта предложенной технологии биодетоксикации отходов КВ золота эксплуатационные и капитальные затраты сведены в таблицу 3.23.

Таблица 3.23

Эксплуатационные и капитальные затраты на обезвреживание рудных штабелей КВ месторождения «Подгольное»

Наименование статей	Щелочное хлорирование с последующей купоросной обработкой	Разработанная технология биодетоксикации
	Затраты, тыс. руб.	
Реагенты и оборудование	237047.6	1435.6
Мероприятия по уборке и вывозу снега	0	24475.2
Электроэнергия	5251.0	63011.4
Заработная плата	681.3	2044.0
Отчисления на социальные нужды	292.0	876.0
Итого:	243271.9	91842.2

Оценка экономической эффективности предлагаемой технологии производилась по изменению суммарных эксплуатационных и капитальных затрат на обезвреживание площадки КВ двух схем [163, 164], которые включали в себя затраты на мероприятия по уборке и вывозу снега, реагенты и оборудования, электроэнергию, фонд оплаты труда и отчисления на социальные нужды. Все прочие расходы, относящиеся к обезвреживанию отходов КВ при внедрение новой

технологии, практически не изменялись, поэтому при проведении расчетов экономической эффективности не рассматривались.

Удельный экономический эффект применения технологии биодетоксикации на 1 тонну руды составил 189.3 руб, что в пересчете на всю площадку КВ (800000 т) месторождения «Подголецное» – 151429.7 тыс. руб.

Таким образом, рассмотрены основные положения разрабатываемой технологии биодетоксикации площадки КВ золота, которая позволяет исключить применение химических реактивов. В целях модернизации отделения орошения рекомендуется введение мероприятий по уборке и вывозу снега за пределы промышленной площадки КВ, а также использование оросительной системы с вращающимися эмиттерами типа Wobbler. Предлагаемая технология позволяет использовать метод испарения излишек отработанных технологических растворов без сброса их в окружающую среду. При проведении исследования на примере месторождения «Подголецное» определена продолжительность биодетоксикации рудного штабеля КВ и выявлены основные технологические параметры разработанной технологии, которая позволяет снизить концентрации цианидов с 81.63 до 0.05 мг/дм³, тиоцианатов – с 13.3 до 0.17 мг/дм³, меди и никеля – с 20.3 и 0.5 мг/дм³ до менее 0.05 и менее 0.03 мг/дм³ соответственно. Разработаны технологическая и аппаратурная схемы процесса биодетоксикации рудного штабеля с использованием существующей инфраструктуры предприятия КВ, что позволяет минимизировать эксплуатационные и капитальные затраты на проведение природоохранных мероприятий. Ожидаемый экономический эффект применения технологии биодетоксикации площадки КВ золота месторождения «Подголецное» составляет 151429.7 тыс. руб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование разнообразия, состава, структуры и функциональных особенностей автохтонных бактериальных сообществ, развивающихся в цианидсодержащих отходах КВ золота как в естественных условиях разных природно-техногенных комплексов, так и в модельных экспериментах. Комплексное использование физико-химических, современных молекулярно-генетических, а также статистических методов позволило выявить основные функциональные группы в составе автохтонных бактериальных сообществ и определить их потенциальное участие в детоксикации токсичных соединений.

Впервые изучена роль автохтонного бактериального сообщества в процессе пассивной детоксикации рудного штабеля КВ с учетом его зонирования и неоднородности с точки зрения температурного режима и условий аэрации. Показано, что биотический фактор играет преимущественную роль в деструкции цианидов, включая цианидные комплексы меди и никеля, и тиоцианатов по сравнению с химическим окислением. Выявленные закономерности пассивной детоксикации отходов КВ золота на примере месторождения «Подгольное» позволили рассчитать кинетические параметры биодетоксикации.

Впервые показано, что в модельных условиях складированных отходов КВ золота экологические факторы (температура и аэрация), а также степень утилизации токсичных соединений влияют на изменение разнообразия, состава и структуры бактериальных консорциумов. Доминирующие представители бактериального сообщества – представители родов *Achromobacter* и *Serratia* выступают как маркеры деструктивных процессов. При этом данные представители идентифицированы в естественных условиях в складированных отходах различных объектов КВ золота независимо от территориального расположения, а также минерального и химического состава руд.

По результатам проведенных исследований была разработана технология биодетоксикации промышленного комплекса КВ месторождения «Подгольное», которая базируется на самопроизвольном разложении цианидов под действием

природных факторов, включая деятельность автохтонного бактериального сообщества. Данная технология исключает применение химических реагентов. Модернизация отделения орошения и рекомендуемые мероприятия по уборке и вывозу снега с площадки КВ позволяют использовать метод испарения излишек вод из отработанных технологических растворов без сброса их в окружающую среду. Для создания оптимальных условий (исключения анаэробных зон) и интенсификации процесса биодетоксикации токсичных соединений, рудный штабель КВ рекомендовано орошать технологическими растворами и образующимися при обезвоживании рудной массы дренажными водами. На основании технологических параметров состав отходов после трех лет биодетоксикации будет экологически безопасным и будет удовлетворять нормам НДС для района расположения предприятия месторождения «Подголецное». Разработанные технологическая и аппаратная схемы процесса биодетоксикации рудного штабеля с использованием существующей инфраструктуры предприятия КВ позволяют минимизировать эксплуатационные и капитальные затраты на проведение природоохранных мероприятий.

Таким образом, настоящее диссертационное исследование является законченной научно-квалификационной работой, в которой определена роль автохтонных бактериальных сообществ в детоксикации цианидсодержащих отходов КВ золота и решена актуальная экологическая проблема по их обезвреживанию.

ВЫВОДЫ

1. В модельных экспериментах показано, что интенсивная биодеструкция цианидов происходит при положительных температурах и аэрации, тиоцианатов – при отрицательных температурах. В присутствии биотического фактора скорость деструкции цианидов в 4 и 6 раз превышает химическое окисление, цианидных комплексов меди и никеля – в 10 раз. Для прогноза поведения токсичных соединений в реальных отходах КВ рассчитаны аппроксимирующие уравнения первого порядка и константы скорости реакции детоксикации при различных температурах и условиях аэрации. Установлено, что в присутствии биотического фактора рудный материал обладает высокой буферностью, что в дальнейшем исключает образование кислых дренажных вод.

2. Непараметрическим многомерным статистическим анализом показана достоверность влияния таких экологических факторов как температура и аэрация, а также степени утилизации токсичных соединений на разнообразие, состав и структуру бактериальных сообществ, развивающихся в рудной массе в условиях модельного эксперимента.

3. Установлено, что в рудном штабеле КВ бактериальные сообщества имеют невысокое видовое разнообразие с доминированием представителей фило *Proteobacteria*. Представители данной фило – рода *Achromobacter* и *Serratia* адаптированы к широким диапазонам температур и выступают маркерами процессов деструкции цианидов, в том числе цианидных комплексов меди и никеля. Бактерии рода *Hydrogenophaga* потенциально способны к деструкции метаболитов, образующихся при деградации цианидов.

4. Определено, что автохтонные бактериальные сообщества месторождений, расположенных на территории Красноярского края («Бабушкина Гора»), Республики Хакасия («Чазы Гол») и Республики Саха (Якутия) («Самолазовское», «Подголочное») имеют большое сходство. Во всех развиваются представители родов *Achromobacter* и *Serratia*, которые являются маркерами деструкции цианидсодержащих соединений. На их развитие не влияет

территориальная расположенность месторождений, а также химический и минеральный состав их руд.

5. Показано, что разнофазность природно-техногенных комплексов КВ влияет на структуру бактериальных сообществ. Бактерии родов *Serratia* и *Achromobacter* преимущественно развиваются в рудном штабеле КВ. Представители автохтонных бактериальных сообществ рудного штабеля КВ и технологического раствора имеют экологическую обособленность, которая заключается не только в их резистентности к определенному фактору среды, но и в генетическом сходстве географически отдаленных штаммов микроорганизмов.

6. Разработана технология биодетоксикации площадки КВ золота, которая исключает применение химических реагентов и обеспечивает снижение концентраций цианидов с 81.63 до 0.05 мг/дм³, тиоцианатов – с 13.3 до 0.17 мг/ дм³, меди и никеля – с 20.3 и 0.5 мг/ дм³ до менее 0.05 и менее 0.03 мг/ дм³ соответственно. Она позволяет оптимизировать водный баланс и использовать метод испарения излишек вод из отработанных технологических растворов без сброса их в окружающую среду. Ожидаемый экономический эффект применения разработанной технологии биодетоксикации площадки КВ месторождения «Подгольное» составляет 151429.7 тыс. руб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дементьев, Е.В. Кучное выщелачивание золота и серебра / Е.В. Дементьев, Г.Я. Дружинина, С.С. Гудков. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2004. – 352 с.
2. Караганов, В.В. Кучное выщелачивание золота – зарубежный опыт и перспективы развития / В.В. Караганов, Б.С. Ужкенов. – Москва-Алматы : ТОО «Геоинцентр», 2002. – 288 с.
3. Минеев, Г.Г. Кучное выщелачивание золотосодержащих руд / Г.Г. Минеев, С.Б. Леонов. – Иркутск : ИРГТУ, 1997. – 214 с.
4. Разработка технологического регламента по извлечению золота из руд месторождения «Подголецное» методом кучного выщелачивания : технологический регламент о НИР / рук. Татаринов А.П. ; исполн.: Мусин Е.Д. [и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2012. – 154 с.
5. Кавчик, Б.К. Некоторые итоги работы золотодобывающей отрасли в 2013 году и надежды на будущее [Электронный ресурс] / Б.К. Кравчик // Золотодобыча. – 2014. – №186. – Режим доступа: <http://zolotodb.ru/articles/other/gold/11057>.
6. Плаксин, И.Н. Металлургия благородных металлов / И.Н. Плаксин. – М. : «Металлургиздат», 1958. – 366 с.
7. Антонинова, Н.Ю. Экологическая реабилитация установок кучного выщелачивания (на примере Сафьяновского месторождения) : дис. ... канд. тех. наук : 25.00.36 / Антонинова Наталья Юрьевна. – Пермь, 2007. – 135 с.
8. Петров, С.В. Исследование и разработка технологии обезвреживания отходов кучного выщелачивания золота под действием природных факторов : дис. ... канд. тех. наук : 25.00.36 / Петров Сергей Владимирович. – Иркутск, 2003. – 172 с.
9. Kjeldsen, P. Behaviour of cyanides in soil and ground-water: a review / P. Kjeldsen // Water, Air, and Soil Pollution. –1999. – Vol. 115, №1–4. – P. 279–307.
10. Mudder, T.I. The Chemistry and treatment of cyanidation wastes / T.I. Mudder, M.M. Botz, A. Smith. – the 2nd edition. – London : Mining Journal Books Ltd.,

2001. – 345 p.

11. Alvarez, R. State of the art of passive treatment technologies for the abatement of cyanides from the mining industry: Experiences in Asturias (Spain) / R. Alvarez, A. Ordóñez, J. Loredó, F. Pendás // *Mine Water* 2005. – 2005. – P. 177–183.

12. Young, C.A. Cyanide remediation: Current and Past Technologies / C.A. Young, T.S. Jordan // *Proc. of the Annual Conf. on Hazardous Waste Research*. – Kansas, 1995. – P. 104–129.

13. Botz, M. Modeling of natural cyanide attenuation in tailing impoundments / M. Botz, T. Mudder // *Mineral and Metallurgical Processing*. – 2000. – Vol. 17, №4. – P. 228–233.

14. Miltzarek, G.L. Cyanide recovery in hydrometallurgical plants: use of synthetic solutions constituted by metallic cyanide complexes / G.L. Miltzarek, C.H. Sampaio, J.L. Cortina // *Minerals Engineering*. – 2002. – №15. – P. 75–82.

15. Figueira, M.M. Bacterial degradation of metal cyanide complexes / M.M. Figueira, V.S.T. Ciminelli, V.R. Linardi // *Biohydrometallurgical Processing* / C.A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo, J.V. Wiertz. – Chile, 1995. – P. 333–339.

16. Wagner, A.M. The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation / A.M. Wagner, K. Krab // *Physiologia Plantarum*. – 1995. – Vol. 95, №2. – P. 318–325.

17. Акименко, В.К. Цианидрезистентное дыхание микроорганизмов / В.К. Акименко // *Успехи микробиологии*. – 1981. – Т. 16. – С. 3–30.

18. Mudder, T.I. Cyanide and society: a critical review / T.I. Mudder, M.M. Botz // *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*. – 2004. – Vol. 4, №1. – P. 62–74.

19. Приказ Федерального агентства по рыбхозу № 16326 от 18 января 2010 г. «Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов ПДК вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения». – М. : Изд-во ВНИРО, 2010.

20. ГН 2.1.5.2280–07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования» Дополнения и изменения N 1 к ГН 2.1.5.1315–03 (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28 сентября 2007 г. N 75).

21. ГН 2.2.5.1313–03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 30 апреля 2003 года N 76 (с изменениями на 16 сентября 2013 года).

22. Akcil, A. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments / A. Akcil // *Biotechnol. Adv.* – 2003. – Vol. 21, №6 – P. 501–511.

23. Baxter, J. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination / J. Baxter, S.P. Cummings // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2006. – №1. – P. 1–17.

24. Петров, В.Ф. Сравнение технологий и стоимости обезвреживания отходов гидрометаллургических процессов извлечения золота [Электронный ресурс] / В.Ф. Петров, С.В. Петров // *Золотодобыча.* – 2012. – №164. – Режим доступа: <https://zolotodb.ru/articles/technical/10699>.

25. Григорьева Н.В. Деструкция цианидов и тиоцианатов ассоциацией гетеротрофных бактерий и ее применение в биотехнологии : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Григорьева Надежда Викторовна. – Москва, 2006. – 159 с.

26. Baxter, J. The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure / J. Baxter, S.P. Cummings // *Biodegradation.* – 2006. – Vol. 17, №3. – P. 207–217.

27. Branch, S.W. Cyanide detoxification: INCO sulfur dioxide/air process [Электронный ресурс] / S.W. Branch. – 1993. – Режим доступа: <http://infohouse.p2ric.org/ref/19/18789.pdf>.

28. Nelson, M.G. Chemical and biological destruction of cyanide: comparative costs in a cold climate / M.G. Nelson, E.N. Kroeger, P.J. Arps // *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review.* – 1998. – Vol. 19. – P. 217–226.

29. Demopoulos, G.P. A case study of CIP tails slurry treatment: comparison of cyanide recovery to cyanide destruction / G.P. Demopoulos, T.C. Cheng // *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*. – 2004. – Vol. 4, №1. – P. 1–9.
30. Тимофеева, С.С. Роль фитотехнологий в улучшении среды обитания человека / С.С. Тимофеева, С.С. Тимофеев, Е.А. Мишенькина // *Известия Иркутского Государственного Университета. Серия «Биология. Экология»*. – 2013. – Т. 6, № 3(1). – С. 73–77.
31. Тимофеева, С.С. Сточные воды предприятий по добыче и переработке рудного золота и комбинированные технологии их обезвреживания / С.С. Тимофеева, А.А. Батоева // *Вестник Иркутского государственного технического университета*. – 2013. – № 11. – С. 134–142.
32. Гула, К.Е. Использование Ряски малой (*Lemna minor*) в процессе очистки промышленных стоков золоторудных предприятий в бассейне р. Амур [Электронный ресурс] / К.Е. Гула // *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Экономика и экологический менеджмент»*. – 2012. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/v/ispolzovanie-ryaski-maloy-lemna-minor-v-protssesse-ochistki-promyshlennyh-stokov-zolotorudnyh-predpriyatiy-v-basseyne-r-amur>.
33. Dumestre, A. Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils / A. Dumestre, T. Chone, J. Portal, M. Gerard, J. Berthelin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63. – P. 2729–2734.
34. Dwivedi, N. Biological treatment of cyanide containing wastewater / N. Dwivedi, C.B. Majumder, P. Mondal, S. Dwivedi // *Res. J. Chem. Sci.* – 2011. – Vol. 1, №7. – P. 15–21.
35. Gurbuz, F. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus* / F. Gurbuz, H. Ciftci, A. Akcil // *J. Hazard. Mater.* – 2009. – Vol. 162, №1. – P. 74–79.
36. Kunz, D.A. Alternative routes of enzymic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 / D.A. Kunz, C.S. Wang, J.L. Chen // *Microbiology*. – 1994. – №140. – P. 1705–1712.

37. Wood, A.P. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources / A.P. Wood, D.P. Kelly, I.R. McDonald, S.L. Jordan, T.D. Morgan, S. Khan, J.C. Murrell, E. Borodina // Arch. Microbiol. – 1998. – Vol. 169, №2. – P. 148–158.
38. Cipollone, R. Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese / R. Cipollone, P. Ascenzi, P. Tomao, F. Imperi, P. Visca // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 15, №2–3. – P. 199–211.
39. Parmar, P. Isolation and characterization of cyanide degrading bacterial strains from contaminated soil / P. Parmar, A. Soni, K. Vyas, P.V. Desai // International Journal of Environmental Sciences. – 2012. – Vol. 2, №4. – P. 2006–2014.
40. Potivichayanon, S. Biodegradation of cyanide by a novel cyanide degrading bacterium / S. Potivichayanon, R. Kitleartpornpaioat // World Academy of Science Engineering and Technology. – 2010. – №42. – P. 1362–1365.
41. Sorokin, D.Y. Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions / D.Y. Sorokin, T.P. Tourova, A.M. Lysenko, J.G. Kuenen // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, №2. – P. 528–538.
42. Harris, R. Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen / R. Harris, C.J. Knowles // J. Gen. Microbiol. – 1983. – №129. – P. 1005–1011.
43. Knowles, J. Microorganisms and Cyanide / J. Knowles // Bacteriol. Rev. – 1976. – Vol. 40, №3. – P. 652–680.
44. Ezzi, M.I. Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. / M.I. Ezzi, J.M. Lynch // Enzyme. Microb. Technol. – 2005. – Vol. 36, №7. – P. 849–854.
45. Elleuche, S. A cyanase is transcriptionally regulated by arginine and involved in cyanate decomposition in *Sordaria macrospora* / S. Elleuche, S. Pöggeler // Fungal. Genet. Biol. – 2008. – Vol. 45, №11. – P. 1458–1469.

46. Ozel, Y.K. New fungal biomasses for cyanide biodegradation / Y.K. Ozel, S. Gedikli, P. Aytar, A. Unal, M. Yamaç, A. Cabuk, N. Kolankaya // J. Biosci. Bioeng. – 2010. – Vol. 110, №4. – P. 431–435.
47. Park, D. Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility / D. Park, D.S. Lee, Y.M. Kim, J.M. Park // Bioresour. Technol. – 2008. – №99. – P. 2092–2096.
48. Кондратьева, Т.Ф. Штаммовая генотипическая гетерогенность ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов / Т.Ф. Кондратьева, С.Н. Агеева // Юбилейный сборник к 70-летию Института / Ред. В.Ф. Гальченко. – М. : Наука, 2004. – Вып. 12. – С. 197–212.
49. Нетрусов, А.И. Экология микроорганизмов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко, М.В. Иванов. – М. : Академия, 2004. – 272 с.
50. Huertas, M.J. Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores / M.J. Huertas, V.M. Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco, C. Moreno-Vivián, F. Castillo, M.D. Roldán // Biochem. Soc. Trans. – 2006. – Vol. 34, №1. – P. 152–155.
51. Silvos-Aviles, J. Degradation of metal-cyanide complex tetracyanonickelate (II) by cyanide utilising bacterial isolates / J. Silvos-Aviles, M.G. Richmond, O. Nagappan, D.A. Kuntz // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – Vol. 56, №12. – P. 3664 – 3670.
52. Quan, Z.X. Bacterial community structure in activated sludge reactors treating free or metal-complexed cyanides / Z.X. Quan, S.K. Rhee, J.W. Bae, J.H. Baek, Y.H. Park, S.T. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 16, №2. – P. 232–239.
53. Figueira, M.M. Bacterial degradation of metal cyanide complexes / M.M. Figueira, V.S.T. Ciminelli, V.R. Linardi // Biohydrometallurgical Processing University of Chile / C.A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo, J.V. Wiertz. – Chile, 1995. – P. 333–339.
54. Maniyam, M.N. Bioremediation of cyanide by optimized resting cells of *Rhodococcus* strains isolated from Peninsular Malaysia / M.N. Maniyam, F. Sjahrir, A.L. Ibrahim // Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma. – 2011. – Vol. 1, №2. – P. 98–101.

55. Finnegan, I. Identification and characterisation of an *Acinetobacter* sp. capable of assimilation of a range of cyano-metal complexes, free cyanide ions and simple organic nitriles / I. Finnegan, S. Toerien, L. Abbot, F. Smit, H.G. Raubenheimer // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1991. – Vol. 36, №1. – P. 142–144.
56. Wang, C.C. Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing bacteria / C.C. Wang, C.M. Lee, L.J. Chen // *J. Environ. Sci. Health, Part A.* – 2004. – Vol. 39, №7. – P. 1767–1779.
57. Karamba, K.I. Effect of heavy metals on cyanide biodegradation by resting cells of *Serratia marcescens* strain AQ07 / K.I. Karamba, M.A. Syed, M.Y. Shukor, S.A. Ahmad // *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology.* – 2014. – Vol. 2, №2. – P. 58–60.
58. Andhale, M.S. Microbial degradation of cyanide containing effluent from a dye industry / Andhale M. S. // *Biodeteriorat. 7* / D. R. Houghton et al. (eds.). – London: Elsevier Science Publishers Ltd, 1988. – P. 213–218.
59. Happold, F.C. Utilization of thiocyanate by *Thiobacillus thioparus* and *T. thiocyanooxidans* / F.C. Happold, G.L. Jones, D.B. Pratt // *Nature.* – 1958. – Vol. 182. – P. 266–267.
60. Pat. 3756947A United States, Int. Cl. C02c/10 US. Cl. 210-11 7. Process for treating waste water containing nitriles latex composition / Fujii Y., Oshimi T., Buchheim W., Bonds W.; assignee Sumitomo Shipbuilding & Machinery Co., Ltd., Tokyo, Japan. – № 180,081; filed Dec. 9, 1970; date of patent Sept. 13, 1971 – 8 p.
61. Kumar, V. Statistical enhancement of cyanide degradation using microbial consortium / V. Kumar, V. Kumar, T.C. Bhalla // *Microbial and Biochemical Technology.* – 2015. – Vol. 7, №6. – P. 344–350.
62. Adjei, M.D. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain / M.D. Adjei, Y. Ohta // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 15, №6. – P. 699–704.
63. Bosecker, K. Microbial treatment of cyanide and heavy metals containing waste water from gold mining / K. Bosecker, P. Blumenroth // 17 International Mining Congress and Exhibition of Turkey – IMCET 2001, ISBN 975-395-417-4.

64. Kao, C.M. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca* / C.M. Kao, J.K. Liu, H.R. Lou, C.S. Lin, S.C. Chen // *Chemosphere*. – 2003. – №50. – P. 1055–1061.
65. Luque-Almagro, V.M. Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions / V.M. Luque-Almagro, M.J. Huertas, M. Martínez-Luque, C. Moreno-Vivián, M.D. Roldán, L.J. García-Gil, F. Castillo, R. Blasco // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, №2. – P. 940–947.
66. Arps, P.J. *Pseudomonas psuedoalcaligenes* (UA7): isolation and preliminary characterization of a cyanide degrading strain / P.J. Arps, M.J. Nelson, L.E. Sporleder // *Bioleaching Processes. Biohydrometallurgical Technologies* / A.E. Torma, J.E. Wey, V.I. Lakshmanan. – Warrendale, 1993. – Vol. 1. – P. 531–543.
67. Григорьева, Н.В. Выделение аборигенного сообщества бактерий, способного к утилизации цианида, тиоцианата и аммония, из стоков металлургического завода / Н.В. Григорьева, Ю.В. Смирнова, С.В. Терехова, Г.И. Каравайко // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 2008. – Т. 44, № 5. – С. 554–558.
68. Kandasamy, S. Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater / S. Kandasamy, B. Dananjeyan, K. Krishnamurthy, G. Benckiser // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 46, №3. – P. 659–666.
69. Chapatwala, K.D. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida* / K.D. Chapatwala, G.R. Babu, O.K. Vijaya, K.P. Kumar, J.H. Wolfram // *J. Ind. Microbiol. Biotech.* – 1998. – Vol. 20. – P. 28–33.
70. Karamba, K.I. Isolation, screening and characterization of cyanide-degrading *Serratia marcescens* strain aq07 / K.I. Karamba, M.Y. Shukor, M.A. Syed, A. Zulkharnain, N.A. Yasid, A. Khalid, S.A. Ahmad // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences.* – 2015. – Vol. 8, №2. – P. 401–406.
71. Karamba, K.I. Optimisation of biodegradation conditions for cyanide removal by *Serratia marcescens* strain AQ07 using one-factor-at-a-time technique and response surface methodology / K.I. Karamba, S.A. Ahmad, A. Zulkharnain, M.A. Syed,

K.A. Khalil, N.A. Shamaan, F.A. Dahalan, M.Y. Shukor // Rend. Fis. Acc. Lincei. – 2016. – Vol. 27, №3. – P. 533–545.

72. Singh, N. Comparative studies on simultaneous biodegradation of phenol and cyanide using different strains / N. Singh, B. Agarwal, C.B. Majumder // Journal of Engineering Research and Applications. – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 827–831.

73. Kumar, V. In vitro cyanide degradation by *Serretia marcescens* RL2b / V. Kumar, V. Kumar, T.C. Bhalla // Int. J. Environ. Sci. – 2013. – Vol. 3, №6. – P. 1969–1979.

74. Kumar, V. Packed bed reactor for degradation of simulated cyanide containing waste water / V. Kumar, V. Kumar, T.C. Bhalla // 3 Biotech. – 2015. – Vol. 5, №5. – P. 641–646.

75. Kumar, V. Statistical enhancement of cyanide degradation using microbial consortium / V. Kumar, V. Kumar, T.C. Bhalla // Microbial and Biochemical Technology. – 2015. – Vol. 7, №6. – P. 344–350.

76. Maniyam, M.N. Biodegradation of cyanide-containing industrial wastewaters by *Rhodococcus* UKMP-5M / M.N. Maniyam, F. Sjahrir, A.L. Ibrahim, A.E.G. Cass // Biologia. – 2014. – Vol. 69, №12. – P. 1635–1643.

77. Mekuto, L. Biodegradation of free cyanide and subsequent utilization of biodegradation by-products by *Bacillus consortia*: optimization using response surface methodology / L. Mekuto, S.K.O. Ntwampe, V.A. Jackson // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2015. – Vol. 22, №14. – P. 10434–10443.

78. Mekuto, L. Biodegradation of free cyanide using *Bacillus* sp. consortium dominated by *Bacillus safensis*, *licheniformis* and *tequilensis* strains: A bioprocess supported solely with whey / L. Mekuto, V.A. Jackson, S.K.O. Ntwampe // J. Bioremediat. Biodegrad. – 2013. – P. 1–7.

79. Nwokoro, O. Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis* / O. Nwokoro, M.E.U. Dibua // Arh. Hig. Rada. Toksikol. – 2014. – Vol. 65, №1. – P. 113–119.

80. Perumal, M. Isolation and characterization of potential cyanide degrading *Bacillus nealsonii* from different industrial effluents / M. Perumal, P.J. John, M. Kamaraj // International Journal of ChemTech Research. – 2013. – Vol. 5, №5. – P. 2357 – 2364.
81. Dictor, M.C. Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors / M.C. Dictora, F. Battaglia-Brunet, D. Morina, A. Boriesb, M. Clarensb // Environ. Pollut. – 1997. – Vol. 97, № 3. – P. 287–284.
82. Suh, Y.J. Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite / Y.J. Suh, J.M. Park, J.W. Yang // Enzyme. Microb. Technol. – 1994. – Vol. 16, №6. – P. 529–533.
83. Dursun, A.Y. Biodegradation kinetics of ferrous(II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor / A.Y. Dursun, Z. Aksu // Process Biochemistry. – 2000. – Vol. 35, №6. – P. 615–622.
84. Smith, A. Cyanide geochemistry in an abandoned heap leach system and regulations for cyanide detoxification / A. Smith, D.W. Struhsacker // Introduction to evaluation, design and operation of precious metal heap leaching projects / D.J.A. van Zyl, I.P.G. Hutchison, J.E. Kiel. – Colorado, 1988.
85. Urbanska, A. Cyanide detoxifying enzymes of bird cherry oat aphid [Электронный ресурс] / A. Urbanska, B. Leszczyński, H. Matok, A.F.G. Dixon // Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. – 2002. – Vol. 5, №2. – Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/262950748>.
86. Пат. 2245850 Российская Федерация, МПК⁷ C02F 3/34, C12N. Способ очистки промышленных стоков от цианидов и тиоцианатов / Каравайко Г.И., Кондратьева Т.Ф., Савари Е.Е., Седельникова Г.В., Григорьева Н.В.; заявитель и патентообладатель Институт микробиологии РАН, Федеральное государственное унитарное предприятие «Центральный научно-исследовательский геологоразведочный институт цветных и благородных металлов». – №2002135478/13; заявл. 31.12.2002; опубл. 10.02.2005, Бюл. № 4.
87. Fry, W.E. Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti* / W.E. Fry, R.L. Millar // Arch. Biochem. Biophys. – 1972. – №151. – P. 468–474.
88. Gupta, N. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation:

A review / N. Gupta, C. Balomajumder, V.K. Agarwal // J. Hazard. Mater. – 2010. – №176. – P. 1–13.

89. Астаурова, О.Б. Адаптация продуцента акриламида *Rhodococcus rhodochrous* М8 к изменению концентрации аммония в среде / О.Б. Астаурова, Т.Е. Леонова, И.Н. Поляков и др. // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2000. – Т. 36, №1. – С. 21–25.

90. Nawaz, S.M. Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida* / S.M. Nawaz, D.K. Chapatwala, H.J. Wolfram // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – Vol. 55, №9. – P. 2267–2274.

91. Ubalua, A.O. Cyanogenic Glycosides and the fate of cyanide in soil / A.O. Ubalua // Australian Journal of Crop Science. – 2010. – Vol. 4, №4. – P. 223–237.

92. Pat. 5116744 United States, Int. Cl.⁵ C12P 13/00. Microbial cyanide converting enzymes, their production and use / Ingvorsen K., Godtfredsen S.E., Hojer-Pedersen B.; assignee Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark. – № 595,684; filed Sep. 19, 1990; date of patent May 26, 1992 – 8 p.

93. Raybuck, S. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation / S. Raybuck // Biodegradation. – 1992. – Vol. 3, №1. – P. 3–18.

94. Fernández, R.F. Bacterial cyanide oxygenase is a suite of enzymes catalyzing the scavenging and adventitious utilization of cyanide as a nitrogenous growth substrate / R.F. Fernández, D.A. Kunz // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, №18. – P. 6396–6402.

95. Fallon, R.D. Anaerobic biodegradation of cyanide under methanogenic conditions / R.D. Fallon, D.A. Cooper, R. Speece, M. Henson // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57, №6. – P. 1656–1662.

96. Cipollone, R. Common themes and variations in the rhodanese superfamily / R. Cipollone, P. Ascenzi, P. Visca // IUBMB Life. – 2007. – Vol. 59, №2. – P. 51–59.

97. Cipollone, R. Enzymatic detoxification of cyanide: Clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese / R. Cipollone, P. Ascenzi, P. Tomao, F. Imperi, P. Visca // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 15. – P.199–211.

98. Bowen, T.J. Some properties of the rhodanese system of *Thiobacillus*

denitrificans / T.J. Bowen, P.J. Butler, F.C. Happold // J. Biochem. – 1965. – Vol. 97, №3. – P. 651–657.

99. Karamba, K.I. Biological remediation of cyanide: A review / K.I. Karamba, M.A. Syed, M.Y. Shukor, S.A. Ahmad // Biotropia. – 2015. – Vol. 22, №2. – P. 151–163.

100. Nesbitt, J. B. Aerobic metabolism of potassium cyanide / J.B. Nesbitt, H.R. Kohl, E.L. Wagner // J. Sanit. Eng. Div. Proc. Am. Soc. Civ. Eng. SA – 1960. – №1. – P. 1–14.

101. Andrade, M.C. Utilization of ammonia, generated from abiotic cyanide degradation, by *Rhodotorula rubra* / M.C. Andrade, M.M. Figueira, V.R. Linardi // Wld. J. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 11, №3. – P. 343–344.

102. Luque-Almagro, V.M. Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 / V.M. Luque-Almagro, R. Blasco, M.J. Huertas, M. Martínez-Luque, C. Moreno-Vivián, F. Castillo, M.D. Roldán // Biochem. Soc. Trans. – 2005. – №33. – P. 168–169.

103. White, D.M. Biological treatment of cyanide containing wastewater / D.M. White, T.A. Pilon, C. Woolard // Wat. Res. – 2000. – Vol. 34, №7. – P. 2105–2109.

104. Mirizadeh, S. Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM) / S. Mirizadeh, S. Yaghmaei, N.Z. Ghobadi // J. Environ. Health. Sci. Eng. – 2014. – Vol. 12, №85. – P. 1–9.

105. Белых, М.П. Автохтонные микробные сообщества из отходов кучного выщелачивания золотосодержащих руд: путь к решению проблемы загрязнения окружающей среды / М.П. Белых, С.В. Петров, А.Ю. Чикин, И.Н. Стоянов, Н.Л. Белькова // Известия Иркутского государственного университета. Серия: «Биология. Экология» – 2014. – Т. 9. – С. 55–67.

106. Pat. 5169532 United States, Int. Cl.⁵ C02F 3/34 Method for biological removal of cyanides, thiocyanate and toxic heavy metals from highly alkaline environments / Whitlock J.L.; assignee Homestake Mining Company, San Francisco, California. – № 5,169,532; filed Jul. 8, 1991; date of patent Dec. 8, 1992 – 6 p.

107. Huddy, R.J. Analysis of the microbial community associated with a

bioprocess system for bioremediation of thiocyanate- and cyanide-laden mine water effluents / R. Huddy, R. Kantor, W. van Zyl, R.P. van Hille, J. Banfield, S.T.L. Harrison // *Advanced Materials Research*. – 2015. – Vol. 1130. – P. 614–617.

108. Huddy, R.J. Characterisation of the complex microbial community associated with the ASTER™ thiocyanate biodegradation system / R.J. Huddy, A.W. van Zyl, R.P. van Hille, S.T.L. Harrison // *Minerals Engineering*. – 2015. – Vol. 76. – P. 65–71.

109. Zyl, A.W. Biodegradation of thiocyanate by a mixed microbial population / A.W. van Zyl, S.T.L. Harrison, R.P. van Hille // *Mine Water – Managing the Challenges (IMWA 2011)*, Aachen, Germany. – 2011. – P. 119–124.

110. Kantor, R.S. Bioreactor microbial ecosystems for thiocyanate and cyanide degradation unravelled with genome-resolved metagenomics / R.S. Kantor, A.W. van Zyl, R.P. van Hille, B.C. Thomas, S.T.L. Harrison, J. Banfield // *Environ. Microbiol.* – 2015. – Vol. 17, №12. P. 4929–4941

111. Younger, P.L. *Mine Water, Hydrology, Pollution, Remediation* / P.L. Younger, S.T. Banwart, R.S. Hedin. – Kluwer Academic Publishers, 2002. – 442 p.

112. Simovic, L. Development of a model to describe the natural degradation of cyanide in gold mill effluents / L. Simovic, W.J. Snodgrass, K.L. Murphy, J.W. Schmidth // *Proceedings of the Conference on Cyanide and the Environment*. – Tucson, Ariz, 1985. – P. 413–432.

113. Ndur, S.A. Natural cyanide attenuation in a tailings dam in South-Western Ghana / S.A. Ndur, J.M. Doe, E.K. Asiam // *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*. – 2015. – Vol. 7, №2. – P. 24–28.

114. Declercq, J. Modeling cyanide degradation in heap leach systems: from laboratory to reality / J. Declercq, D. Tait, R. Bowell // *Proceedings IMWA 2016*. – Freiberg, Germany, 2016. – P. 417–424.

115. Strobel, G.L. Cyanide utilization in soil / G.L. Strobel // *Soil science*. – 1967. – Vol. 103, №4. – P. 299–302.

116. Mudder, T. Introduction to the biopass system an alternative treatment process for closure of spent heap leach pads / T. Mudder, S. Miller, L. Russell, A. Cox,

D. McWharter // Northwest mining association annual meeting Spokane. – Washington, 1995. – P. 236–248.

117. Mudder, T. The biopass system phase I. Laboratory evaluation / T. Mudder, S. Miller, A. Cox, D. McWharter, L. Russell // AIME/SME Mining journal. –1995. – P. 523–648.

118. Whitlock, J.L. Biological detoxification of precious metal processing wastewaters / J.L. Whitlock // Geomicrobiology Journal. – 1990. – Vol. 8, №3–4. – P. 241–249.

119. Cellan, R. The Biopass system phase II: full scale design and construction of an in situ anaerobic biochemical system / R. Cellan, A. Cox, R. Uhle, D. Jenevein, S. Miller, T. Mudder // The 14th Annual Meeting, American Society of Surface Mining & Reclamation (ASSMR). Austin, 1997.

120. Akcil, A. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review / A. Akcil, T. Mudder // Biotechnology Letters. – 2003. – Vol. 25, №6. – P. 445–450.

121. Оценка влияния на окружающую среду опытно-промышленной эксплуатации установки кучного выщелачивания золота из руд месторождения «Бабушкина Гора» (результаты наблюдений 2002-2010 гг.) : Экологический мониторинг / рук. Петров В.Ф. ; исполн.: Стоянов И.Н. [и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2010. – 179 с.

122. Декларация о намерениях (с заявлением о воздействии на окружающую среду - ЗВОС). – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2013. – 70 с.

123. Экологический мониторинг района расположения объектов расположения объектов установки кучного выщелачивания золота из руд месторождений «Самолазовское» и «Гарбузовское» (результаты наблюдений 2002-2013 гг.) : Экологический мониторинг / рук. Петров В.Ф. ; исполн.: Стоянов И.Н. [и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2013 г. – 105 с.

124. ПНД Ф 14.1:2:3.95–97. Методика измерений массовой концентрации кальция в пробах природных и сточных вод титриметрическим методом. – М. : ООО НПП «АКВАТЕСТ». 2016. – 25 с.

125. ПНД Ф 14.1:2:3.98–97. Методика измерений общей жесткости в пробах природных и сточных вод титриметрическим методом. – М. : ООО НПП «АКВАТЕСТ». 2016. – 24 с.

126. ПНД Ф 14.1:2:3.96–97. Методика измерений массовой концентрации хлоридов в пробах природных и сточных вод аргентометрическим методом. – М. : ООО НПП «АКВАТЕСТ». 2016. – 22 с.

127. ПНД Ф 14.1:2.159–2000. Методика выполнения измерений массовой концентрации сульфат-ионов в пробах природных и сточных вод турбидиметрическим методом. – М. : ФБУ «ФЦАО». 2005. – 13 с.

128. ПНД Ф 14.1:2:4.114–97. Методика измерений массовой концентрации сухого остатка в питьевых, поверхностных и сточных водах гравиметрическим методом. – М. : ФБУ «ФЦАО». 2011. – 12 с.

129. ПНД Ф 14.1:2.56–96. Методика измерений массовой концентрации цианидов в природных и сточных водах фотометрическим методом пиридином и барбитуровой кислотой. – М. : ФБУ «ФЦАО». 2015. – 25 с.

130. ПНД Ф 14.1:2:4.156–99. Методика измерений массовой концентрации роданид-ионов в пробах питьевых, природных и сточных вод фотометрическим методом. – М. : ЗАО «РОСА». 2015. – 15 с.

131. ПНД Ф 14.1:2:4.135–98. Методика выполнения измерений массовой концентрации элементов в пробах питьевой, природных, сточных вод и атмосферных осадков методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. – М. : ЗАО «ЦИКВ». 2008. – 27 с.

132. МА ИАЦ-53–2004 (ФР.1.31.2014.18483). Методика измерений массовых долей элементов: Na, Mg, Al, Si, P, S, Ca, K, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Pb, Sb, Ni, Cr, Co, Cd, Sn, Mo, Nb, Ta, Zr, Y, Sr, Rb, U, Th, Bi, Hg, W, V, Ba, La и Ce в пробах руд золотосодержащих и продуктов их переработки рентгенофлуоресцентным методом. – Иркутск. : ОАО «Иргиредмет». 2015. – 15 с.

133. Технологический регламент по переработке золотосодержащих руд месторождения «Бабушкина Гора» по технологии кучного выщелачивания : Технологический регламент о НИР / рук. Татаринев А.П. ; исполн.: Рязанова И.И.

[и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2010. – 137 с.

134. Технологический регламент для разработки рабочего проекта опытно-промышленной установки кучного выщелачивания золота из руды месторождения «Чазы-Гол» с окомкованием и укладкой рудного штабеля при отрицательных температурах : Технологический регламент о НИР / рук. Дементьев В.Е. ; исполн.: Гудков С.С. [и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 1999. – 59 с.

135. Проведение полупромышленных испытаний технологии извлечения золота из руд месторождения «Самолазовское» с выдачей исходных данных для проектирования промышленного производства : Информационная записка по НИР / рук. Татаринов А.П. ; исполн.: Емельянов Ю.Е. [и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 1998. – 22 с.

136. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук, Н.Н. Колотилова [и др.]. – М. : Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

137. Wang, Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy / Q. Wang, G.M. Garrity, J.M. Tiedje, J.R. Cole / Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73, №16. – P. 5261–5267.

138. Sambrook, J. Molecular Cloning. A laboratory Manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – Vol. 2. – 345 p.

139. Пиневиц, А.В. Микробиология. Биология прокариот. 2-е изд. / А.В. Пиневиц. – СПб. : Изд-во Санкт – Петербургского университета, 2007. – Т.1 –347 с.

140. Cole, J.R. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis / J.R. Cole, Q. Wang, J.A. Fish, B. Chai, D.M. Mc Garrell, Y. Sun [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2014. 42 (Database issue): D633–D642.

141. Huertas, M.J. Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH / M.J. Huertas, L.P. Sáez, M.D. Roldán, V.M. Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco, F. Castillo, C. Moreno-Vivián, I. García-García // J. Hazard. Mater. – 2010. –Vol. 179, №1–3. – P. 72–78.

142. Zhu, S. Contrasting microbial community composition and function perspective in sections of a full-scale coking wastewater treatment system / S. Zhu, H. Wu, C. Wei, L. Zhou, J. Xie // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* –2016. – Vol. 100, №2. P. 949–960.

143. Cornejo, M. Culture/Co-Culture dependent and independent identification of bacterial communities along a chronosequence of spontaneous reclamation on gold mine spoils in Peru / M. Cornejo, K. Pretell, A. Arévalo, Y. Sernaqué, E. Mialhe // *Advanced Materials Research.* – 2015. – Vol. 1130. – P. 589–593.

144. Cornejo, L. Biorremediación de relaves mineros con un consorcio microbiano nativo caracterizado molecularmente y productor de enzimas degradadoras de cianuro y derivados / L. Cornejo, M. Lourdes. – Tumbes, Peru : Lima, 2016. – 112 p.

145. Першина, Е.В. Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования / Е.В. Першина, Г.С. Тамазян, А.С. Дольник, А.Г. Пинаев, Н.Х. Сергалиев, Е.Е. Андронов // *Экологическая генетика.* – 2012. – №2. – P. 32–39.

146. Першина Е. В. Новые методы анализа динамики почвенного микробиома, изученной с использованием метагеномных технологий : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Першина Елизавета Владимировна. – Санкт-Петербург, 2013. – 117 с.

147. Pat. 3756947 United States, Int. Cl.⁵ C02c 5/10 Process for treating waster containing nitriles / Fujii Y., Oshimi T., Buchheim W., Bonds W.; assignee Sumitomo Shipbuild Machinery, Gaf Corp, Tokyo, Japan. – № 180,081; filed Sept. 13, 1971; date of patent Sept. 4, 1973 – 4 p.

148. Luque-Almagro, V.M. Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate: quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain / V.M. Luque-Almagro, F. Merchán, R. Blasco, M.I. Igeño, M. Martínez-Luque, C. Moreno-Vivián, F. Castillo, M.D. Roldán // *Microbiology.* – 2011. – Vol. 157, №3. – P. 739–746.

149. Ji, L.Y. Effect of heavy metal-solubilizing microorganisms on zinc and cadmium extractions from heavy metal contaminated soil with *Tricholoma lobynsis* / L.Y.

Ji, W.W. Zhang, D. Yu, Y.R. Cao, H. Xu // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 28, №1. – P. 293–301.

150. Ng, S.P. The heavy metal tolerant soil bacterium *Achromobacter* sp. AO22 contains a unique copper homeostasis locus and two mer operons / S.P. Ng, E.A. Palombo, M. Bhave // J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 22, №6. – P. 742-753.

151. Tláskal, V. Bacterial succession on decomposing leaf litter exhibits a specific occurrence pattern of cellulolytic taxa and potential decomposers of fungal mycelia / V. Tláskal, J. Voříšková, P. Baldrian // FEMS Microbiol Ecol. – 2016. – Vol. 92, №11. – P. 1–29.

152. Garau G. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil / G. Garau, P. Castaldi, L. Santona, P. Melis, L. P. Meli // Geoderma. – 2007. – Vol. 142, №1–2. – P. 47–57.

153. Pantke, C. Green Rust formation during Fe (II) oxidation by the nitrate-reducing *Acidovorax* sp. Strain BoFeN1 / C. Pantke, M. Obst, K. Benzerara, G. Morin, G. Ona-Nguema, U. Dippon, A. Kappler // Environ. Sci. Technol. – 2012. – Vol. 46, №3. – P. 1439–1446.

154. Shen, L. Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity associated with acid mine drainages / L. Shen, H.Q. Yin, Q. Hu, X.D. Liu, G.Z. Qiu // Advanced Materials Research. – 2015. – Vol. 1130. – P. 40–44.

155. Белых, М.П. Генетическое разнообразие бактерий, адаптированных к цианидсодержащим соединениям в техногенных экосистемах, выделенное по последовательностям 16S рДНК / М.П. Белых, С.В. Петров, А.Ю. Чикин, Н.Л. Белькова // Сибирский экологический журнал. – 2016. – Т. 5. – С. 684–696.

156. Hu, Q. Metagenomic insights into the microbial community diversity between leaching heap and acid mine drainage / Q. Hu, Y. Liang, H. Yin, X. Guo, X. Hao, X. Liu, G. Qiu // Advanced Materials Research. – 2013. – Vol. 825. – P. 141–144.

157. Ajithkumar, B. Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank / B. Ajithkumar, V.P.

Ajithkumar, R. Iriye, Y. Doi, T. Sakai // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – Vol. 53. – P. 253–258.

158. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria / Ed. Don J. Brenner, Noel R. Krieg. – USA : Springer Science and Business Media, 2005. – Ed. 2. –Vol. 2. – 1388 p.

159. Nishimura, Y. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil / Y. Nishimura, T. Ino, H. Iizuka // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1988. –Vol. 38. – P. 209–211.

160. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes / Ed. P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. Whitman. – USA : Springer, 2009. – Ed. 2. – Vol. 3. – 1450 p.

161. Бронштейн, И.Н. Справочник по математике для инженеров и учащихся втузов / И.Н. Бронштейн, К.А. Семендяев. – М. : Наука, 1964. – 608 с.

162. Опытнo-промышленный комплекс Чульбаткан. Раздел 5. «Сведения об инженерном оборудовании, о сетях инженерно-технического обеспечения, перечень инженерно-технических мероприятий, содержание технологических решений» Подраздел 7. «Технологические решения» Часть 3. Плошадка кучного выщелачивания. : Проектная документация / рук. Дементьев В.Е. ; исполн.: Косов В.М. [и др.]. – Иркутск : ОАО «Иргиредмет», 2007. – 578 с.

163. Кудрявский, Ю.П. Анализ экономической эффективности технологии обезвреживания и дезактивации сточных вод редкометаллического производства, фундаментальные исследования / Ю.П. Кудрявский, С.А. Черный, О.В. Рахимова, В.И. Зеленин, С.А. Онорин // Экономические науки. – 2005. – №10. – С. 19–22.

164. Глухов, В.В. Экономические основы экологии. 3-е изд./ В.В. Глухов, Т.П. Некрасова. – С-Пб. : Питер, 2003. – 385 с.

165. Belyi, A. Biodegradation of thiocyanate and cyanide in CIL Leaching waste's liquid phase / A. Belyi, A. Teleutov, A. Revenko, N. Solopova, V. Sekachev, A. Malashonok, G. Krasilnikov // Solid State Phenomena. – 2017. – Vol. 262. – P. 626–629.

166. Мурашова, О.Н. Математическое моделирование процесса экохимического обезвреживания цианида в рудном штабеле после кучного

выщелачивания золота : дис. ... канд. тех. наук : 25.00.36 / Мурашова Олеся Николаевна. – Иркутск, 2006. – 207 с.

Аттестат аккредитации испытательной лаборатории (центра) ОАО «Иргиредмет»

		Федеральная служба по аккредитации	
		0001301	
АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ (ЦЕНТРА)			
№ РОСС RU.0001.515008 <small>номер аттестата аккредитации</small>			
НАСТОЯЩИЙ АТТЕСТАТ ВЫДАН		Открытому акционерному обществу "Иркутский <small>наименование и ОГРН (ОГРНИП) заявителя</small>	
научно-исследовательский институт благородных и редких металлов и алмазов"		ОГРН 1023801008505	
664025, г. Иркутск, бульвар Гагарина, д. 38 <small>адрес заявителя</small>			
И УДОСТОВЕРЯЕТ, ЧТО группа химического анализа природных и сточных вод отдела охраны окружающей среды <small>наименование испытательной лаборатории (центра)</small>			
664025, г. Иркутск, бульвар Гагарина, д. 38 <small>адрес испытательной лаборатории (центра)</small>			
СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ		ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009	
АККРЕДИТОВАН (А) НА		техническую компетентность <small>техническую компетентность/ техническую компетентность и независимость</small>	
для проведения работ по испытаниям в соответствии с областью аккредитации. ОБЛАСТЬ АККРЕДИТАЦИИ ОПРЕДЕЛЕНА В ПРИЛОЖЕНИИ К НАСТОЯЩЕМУ АТТЕСТАТУ И ЯВЛЯЕТСЯ ЕГО НЕОТЪЕМЛЕМОЙ ЧАСТЬЮ.			
М. П.		СРОК ДЕЙСТВИЯ АТТЕСТАТА АККРЕДИТАЦИИ с 24 сентября 2012 г. по 24 сентября 2017 г.	
Руководитель (заместитель Руководителя) органа по аккредитации		С.В. Мигин <small>инициалы, фамилия</small>	

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Структуры праймеров, использованных в работе

Название праймера	Структура праймеров (5'-3')	Источник
Консервативные бактериальные праймеры		
EUB500L	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAА	[Денисова и др., 1999; Белькова, 2008 Fierer et al., 2005]
EUB338L	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	
EUB1350R	GACGGGCGGTGTGTACAAG	
Плазмидные праймеры		
pJet1.2L	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	[Набор GeneJET™ PCR Cloning Kit]
pJet1.2R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
Групп-специфичные бактериальные праймеры		
ARC344L	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	[Baker, 2003]
ARC915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	
CYA106L	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	[Nubel et al. 1997]
CYA781R	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT	[Muhling et al., 2008]
ADF681L	AGTGTAGAGGTGAAATT	[Bacchetti, 2011]
ALF685R	TCTACGRATTTACCYCTAC	[Lane, 1991; Fierer et al., 2005]
ALF908R	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT	[Bacchetti, 2011]
BET680L	CRCGTGTAGCAGTGA	[Fierer et al., 2005]
BET663R	GAATTCATCCCCCTCT	[Fierer et al., 2005]
nitA	CTTAAGTGGGAATAACGCATCG	[Bano N, 2000]
nitB	TTACGTGTGAAGCCCTACCCA	
CF319L	GTA CTGAGACACGGACCA	[Manz et al., 1996]
PLA46L	GGATTAGGCATGCAAGTC	[Neef A, 1998]
BLS342L	CAGCAGTAGGGAATCTTC	[Muhling et al., 2008]
LGC353L	GCAGTAGGGAATCTTCCG	[Meier, 1999]
ACT1159R	TCCGAGTTRACCCCGGC	[Blackwood CB, 2005]
ACT235L	CGCGGCCTATCAGCTTGTG	[Stach, J. E. 2003]
TFV540L	ATCACTGGGCGTAAAGGGAG	[Nesbø et al., 2010]
BCD708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	[Ballesté E, 2010]
TTG286L	CGGCCACAAGGAYACTGAGA	[Nesbø et al., 2010]

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Представленность фил и классов в бактериальных сообществах, развивающихся в естественных условиях рудного штабеля КВ и в модельном эксперименте

Фила/Класс	Исходный образец	Модельные условия Слоя 2 (+20°C,+O ₂) / время хранения				
		65 сут	140 сут	262 сут	429 сут	593 сут
<i>Proteobacteria</i>	99.22	98.63	79.68	96.24	98.05	91.83
<i>Betaproteobacteria</i>	53.38	89.20	59.93	84.90	91.40	63.78
<i>Gammaproteobacteria</i>	45.44	7.96	11.74	9.76	5.51	26.75
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.36	1.33	7.99	1.37	1.02	0.81
<i>Deltaproteobacteria</i>	<0.01%	н.о.	0.02	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Actinobacteria</i>	0.36	1.34	16.44	3.14	1.53	7.58
<i>Firmicutes</i>	0.25	н.о.	2.35	0.22	0.19	0.06
<i>Bacteroidetes</i>	0.10	н.о.	1.03	0.89	0.016	0.06
<i>Fusobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.01
<i>Cyanobacteria</i>	<0.01%	0.01	н.о.	н.о.	н.о.	0.01
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	н.о.	н.о.	0.07	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Acidobacteria</i>	<0.01%	н.о.	0.07	н.о.	н.о.	0.03
<i>Deinococcus-Thermus</i>	н.о.	н.о.	0.05	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Chloroflexi</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Nitrospirae</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Verrucomicrobia</i>	<0.01%	н.о.	0.02	0.02	н.о.	н.о.
<i>Elusimicrobia</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Planctomycetes</i>	<0.01%	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Microgenomates</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание: н.о.* - представители данной филы не обнаружены <0.01%

Фила/Класс	Исходный образец	Модельные условия Слая 3 (+4°C,+O ₂) / время хранения				
		65 сут	140 сут	262 сут	429 сут	593 сут
<i>Proteobacteria</i>	99.22	99.56	95.51	95.03	95.37	96.17
<i>Betaproteobacteria</i>	53.38	53.01	57.42	67.99	57.33	67.89
<i>Gamma</i> proteobacteria	45.44	46.35	24.27	11.26	36.75	27.67
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.36	0.16	13.77	15.78	1.21	0.56
<i>Deltaproteobacteria</i>	н.о.	н.о.	0.04	н.о.	н.о.	0.01
<i>Actinobacteria</i>	0.36	0.16	2.39	4.16	2.07	3.04
<i>Firmicutes</i>	0.25	0.17	0.62	0.29	1.78	0.37
<i>Bacteroidetes</i>	0.10	0.03	1.04	0.32	0.38	0.12
<i>Fusobacteria</i>	н.о.	н.о.	0.04	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Cyanobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	0.01	н.о.	н.о.
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Acidobacteria</i>	н.о.	0.02	0.03	н.о.	0.09	0.03
<i>Deinococcus-Thermus</i>	н.о.	н.о.	0.18	0.01	0.05	н.о.
<i>Chloroflexi</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Nitrospirae</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.01
<i>Verrucomicrobia</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Elusimicrobia</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Planctomycetes</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Microgenomates</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание: н.о.* - представители данной филы не обнаружены <0.01%

Фила/Класс	Исходный образец	Модельные условия Слой 4 (+4°C, -O ₂) / время хранения		
		65 сут	262 сут	593 сут
<i>Proteobacteria</i>	99.22	99.68	97.76	96.91
<i>Betaproteobacteria</i>	53.38	37.55	45.94	55.52
<i>Gammaproteobacteria</i>	45.44	61.79	48.82	38.48
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.36	0.30	2.95	2.83
<i>Deltaproteobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	0.02
<i>Actinobacteria</i>	0.36	0.08	1.29	1.69
<i>Firmicutes</i>	0.25	0.08	0.41	0.60
<i>Bacteroidetes</i>	0.10	0.02	0.32	0.19
<i>Fusobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Cyanobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Acidobacteria</i>	н.о.	0.02	0.06	н.о.
<i>Deinococcus-Thermus</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Chloroflexi</i>	н.о.	н.о.	0.04	н.о.
<i>Nitrospirae</i>	н.о.	н.о.	н.о.	0.02
<i>Verrucomicrobia</i>	н.о.	0.02	н.о.	н.о.
<i>Elusimicrobia</i>	н.о.	н.о.	н.о.	0.02
<i>Planctomycetes</i>	н.о.	0.02	н.о.	н.о.
<i>Microgenomates</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание: н.о.* - представители данной филы не обнаружены <0.01%

Фила/Класс	Исходный образец	Модельные условия Слой 2 (-18°C,+O ₂) / время хранения				
		65 сут	140 сут	262 сут	429 сут	593 сут
<i>Proteobacteria</i>	99.22	99.31	96.24	97.27	97.80	97.27
<i>Betaproteobacteria</i>	53.38	40.82	46.24	40.02	40.33	56.80
<i>Gamma</i> proteobacteria	45.44	57.79	41.81	54.37	53.81	39.52
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.36	0.46	8.10	2.88	3.64	0.79
<i>Deltaproteobacteria</i>	н.о.	0.02	0.03	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Actinobacteria</i>	0.36	0.26	1.39	0.91	0.73	1.20
<i>Firmicutes</i>	0.25	0.18	0.99	1.06	0.59	0.97
<i>Bacteroidetes</i>	0.10	0.09	1.12	0.42	0.46	0.26
<i>Fusobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Cyanobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	0.04	н.о.	н.о.
<i>Candidatus Saccharibacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Acidobacteria</i>	н.о.	н.о.	н.о.	0.01	0.05	0.03
<i>Deinococcus-Thermus</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.02	0.02
<i>Chloroflexi</i>	н.о.	н.о.	0.02	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Nitrospirae</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Verrucomicrobia</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.07	0.03
<i>Elusimicrobia</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Planctomycetes</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.05	н.о.
<i>Microgenomates</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0.02

Примечание: н.о.* - представители данной филы не обнаружены <0.01%

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Идентификация доминирующих представителей бактериальных сообществ технологического раствора и рудного штабеля КВ и результаты сравнительного анализа полученных последовательностей с ближайшими родственниками из международных баз данных (Genbank и EMBL) (Месторождения «Бабушкина гора», «Самолазовское», «Чазы Гол»)

Количество последовательностей	Номер в базе данных	Название последовательности (% гомологии)	Идентификация последовательности	Характеристика ближайшего гомолога / Экосистема в которой детектирован гомолог
«Бабушкина гора» Технологический раствор КВ				
Firmicutes				
8	LK392416	H8_Bg1-7f (95.8)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	Бактерии, устойчивые к свинцу/ руда хвостохранилища Активный ил Толуол-устойчивые бактерии / почва Бактерии, деградирующие красители / промышленные сточные воды Сточные воды очистных сооружений
	LK392417	D9_Bg1-13 r (96.0)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	
	LK392418	D8_Bg1-2r (96.6)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	
	LK392419	E8_Bg1-3r (96.6)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	
	LK392420	B10_Bg1-20 r (95.8)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	
	LK392421	C8_Bg1-1f (96.3)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	
	LK392422	E9_Bg1-14 r (96.2)	<i>Exiguobacterium sp.</i>	
LK392423	A11_Bg2-15_r (95.9)	<i>Exiguobacterium sp.</i>		
Gamma proteobacteria				
5	LK392424	A9_Bg1-8 r (95.9)	<i>Acinetobacter sp.</i>	Бактерии, деградирующие длинноцепочечные алкилфенолы Бактерии, участвующие в выветривании горных пород Бактерии, деградирующие хлорфенолы и н-гексадеканы Ассоцианты из ризосферы растений, растущих на почвах, загрязненных тяжелыми металлами
	LK392425	B9_Bg1-11 r (95.8)	<i>Acinetobacter sp.</i>	
	LK392426	F9_Bg1-15 r (96.3)	<i>Acinetobacter sp.</i>	
	LK392427	H9_Bg1-18 f (96.3)	<i>Acinetobacter sp.</i>	
	LK392428	C12_Bg2-40 f (96.1)	<i>Acinetobacter sp.</i>	
Beta proteobacteria				
7	LK392429	F10_Bg1-26 r (96.4)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	Сточные воды текстильной промышленности Бензол-разрушающие бактерии
	LK392430	G10_Bg2-4 r (96.4)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	
	LK392396	H10_Bg2-5 r (97.5)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	Очистка сточных вод активным илом в реакторе при низкой температуре Активный ил
	LK392397	B11_Bg2-21 r (95.3)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	
	LK392398	A12_Bg2-36 r (97.0)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	

	LK392399	D12 Bg2-43 r (97.8)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	
	LK392400	C11 Bg2-26 r (95.7)	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	
Actinobacteria				
2	LK392401	D10 Bg1-22 r (98.7)	<i>Rhodococcus sp.</i>	Бактерии, деградирующие нефть / сточные воды Углекислот-разлагающие бактерии / почва Арктики Биообрастания в биореакторе для очистки сточных вод
	LK392402	B12 Bg2-37 r (98.7)	<i>Rhodococcus sp.</i>	
Actinobacteria				
1	LK392403	E10 Bg1-24 r (99.3)	<i>Propionibacterium sp.</i>	Почва, загрязненная тяжелыми металлами Бактерии, деградирующие нефть / сточные воды
Σ последовательностей 23				
«Бабушкина гора» Руда действующего рудного штабеля КВ				
Gamma proteobacteria				
26	LK392404	C1 Bg3-3 f (100)	<i>Serratia sp.</i>	Почва, загрязненная тяжелыми металлами Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / почва полей вокруг свинцово-цинкового завода Бактерии, устойчивые к кислотам / почва, загрязненная коксом Почва, загрязненная мышьяком
	LK392405	D1 z(Σ)Bg3-1 f (99.7)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392406	F1 zBg3-4 f (100)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392407	G1 zBg3-5 f (100)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392408	B2 zBg3-7 r (100)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392409	C2 zBg3-8 r (99.8)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392410	D2 zBg3-10 r (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392411	F2 zBg3-12 f (99.8)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392412	G2 zBg3-13 f (99.7)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392413	C3 zBg3-16 (99.7)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392414	D3 zBg3-17 f (100)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392415	H3 zBg4-2 r (99.6)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392431	D4 zBg4-5 r (99.6)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392432	H4 zBg4-9 f (99.5)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392433	B5 zBg4-10 f (100)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392434	C5 zBg4-11 f (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392435	D5 zBg4-12 f (99.7)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392436	E5 zBg4-13 f (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
LK392437	F5 zBg4-14 f (99.7)	<i>Serratia sp.</i>		
LK392438	G5 zBg4-15 r (100)	<i>Serratia sp.</i>		

	LK392439	H5 zBg4-16 r (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392440	B6 zBg4-17 f (99.8)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392441	C6 zBg4-18 f (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392442	D6 zBg4-19 f (99.7)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392443	E6 zBg4-20 f (99.7)	<i>Serratia sp.</i>	
	LK392444	E3 zBg3-18f (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
1	LK392445	F4 zBg4-7 f (99.5)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Бактерии, участвующие в процессе удаления азота и фосфора Бактерии, деградирующие нефть Бактерии, устойчивые к сурьме и меди Сточные воды
8	LK392446	B1 Bg3-2 f (100)	<i>Achromobacter sp.</i>	Бактерии, разрушающие полициклические ароматические углеводороды / почва
	LK392447	H1 zBg3-6 f (100)	<i>Achromobacter sp.</i>	Метилотрофные и нитратредуцирующие бактерии / вода
	LK392448	H2 zBg3-14 r (100)	<i>Achromobacter sp.</i>	промышленных отходов
	LK392449	B3 zBg3-15 r (100)	<i>Achromobacter sp.</i>	
	LK392450	G3 zBg4-1 f (100)	<i>Achromobacter sp.</i>	
	LK392451	C4 zBg4-4 f (98.0)	<i>Achromobacter sp.</i>	
	LK392452	E4 zBg4-6 f (98.0)	<i>Achromobacter sp.</i>	
	LK392453	G4 zBg4-8 f (98.0)	<i>Achromobacter sp.</i>	
	LK392454	E2 zBg3-11 f (96.4)	<i>Hydrogenophaga sp</i>	Сточные воды текстильной промышленности Бензол-разрушающие бактерии Очистка сточных вод активным илом в реакторе при низкой температуре
Betaproteobacteria				
1	LK392455	F3 zBg3-19 f (95.0)	<i>Alcaligenes sp.</i>	Бактерии, окисляющие серу / сульфид-извлекающий биореактор Бактерии, участвующие в денитрификации / гранулированный шлам Бактерии, обезвреживающие отходы целлюлозно-бумажной промышленности Бактерии, деградирующие фенол / сточные воды кожевенных заводов / фарм-промышленные стоки
Actinobacteria				
1	LK392456	B4 zBg4-3 f (99.2)	<i>Rhodococcus sp.</i>	Бактерии, деградирующие нефть / сточные воды

				Углерод-разлагающие бактерии / почва Арктики Биообращения в мембранном биореакторе для очистки сточных вод
Σ последовательностей 38				
«Самозасекое»				
Руда, действующего рудного штабеля KB				
Gamma proteobacteria				
13	LT854838	2sv2-11 L (99.6)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / медные руды
	LT854839	2sv2-4 R (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, деградирующие цианид
	LT854840	2sv2-6R (99.6)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / поле вокруг свинцово-цинкового завода
	LT854841	2sv2-17R (99.4)	<i>Serratia sp.</i>	Почва
	LT854842	2sv2-23L (99.4)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, деградирующие хитин
	LT854843	2sv2-24L (98.7)	<i>Serratia sp.</i>	Филосфера
	LT854844	2sv2-33R (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / медные руды
	LT854845	2sv2-29R (99.6)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / Co-содержащие руды / As-содержащие руды
	LT854846	2sv2-32L (99.9)	<i>Serratia sp.</i>	
	LT854847	2sv2-26L (99.4)	<i>Serratia sp.</i>	
	LT854848	2sv2-28R (99.5)	<i>Serratia sp.</i>	
	LT854849	2sv2-31R (99.3)	<i>Serratia sp.</i>	
		LT854850	2sv2-15R (99.3)	<i>Pseudomonas sp.</i>
1	LT854851	2sv2-37R (99.8)	<i>Bordetella sp.</i>	Ризосфера Активный ил
Alphaproteobacteria				
3	LT854852	2sv2-1 R (99.8)	<i>Sphingomonas sp.</i>	Заброшенное свинцово-цинковое хвостохранилище
	LT854853	2sv2-2 R (99.8)	<i>Sphingomonas sp.</i>	Шахтные отвалы мышьяковых руд
	LT854854	2sv2-16R (99.4)	<i>Sphingomonas sp.</i>	Бактерии, деградирующие метанол / водно-болотные почвы

				Бактерии, деградирующие полициклические ароматические соединения / коксовый завод, почва Биофильтр Шахтные отвалы мышьяковых руд Бактерии, обнаруженные в грунтовых водах и кислотных сливах из заброшенной угольной шахты Загрязненная почва со станций очистки сточных вод нефтехимической промышленности и нефтеперерабатывающего завода
1	LT854855	2sv2-18L (99.4)	<i>Sphingopyxis</i> sp.	Твердые отходы сланцехимической промышленности Грунтовые воды Бактерии, деградирующие полициклические ароматические соединения
Betaproteobacteria				
1	LT854856	2sv2-7L (99.8)	<i>Ralstonia</i> sp.	Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / почва вокруг свинцово-цинкового завода Ризосферная почва Бактерии, способные разлагать аэробно гидроксिलированные и метоксилированные моноциклические ароматические соединения
7	LT854857	2sv2-10L (99.5)	<i>Achromobacter</i> sp.	Бактерии, деградирующие полициклические ароматические соединения
	LT854858	2sv2-13L (98.1)	<i>Achromobacter</i> sp.	
	LT854859	2sv2-14L (99.2)	<i>Achromobacter</i> sp.	Почва
	LT854860	2sv2-20R (99.4)	<i>Achromobacter</i> sp.	Метилотрофные и нитратредуцирующие протеобактерии из фильтрованных вод свалок
	LT854861	2sv2-25R (98.9)	<i>Achromobacter</i> sp.	Бактерии, фиксирующие азот
	LT854862	2sv2-34L (99.8)	<i>Achromobacter</i> sp.	Бактерии из холодных мест обитаний
	LT854863	2sv2-27R (99.6)	<i>Achromobacter</i> sp.	Почва с химического завода
1	LT854864	2sv2-37R (98.6)	Uncultured bacterium	Отходы с низким уровнем радиоактивности полукокс, твердые отходы из сланцехимической промышленности Микробные маты из золото-шахтных вод, содержащих мышьяк свинцово-цинковые хвостохранилища
Σ последовательностей 27				

«Чазы Гол» Технологический раствор КВ				
Alphaproteobacteria				
3	LT854865	2chr-1R (99.8)	<i>Sphingopyxis</i> sp.	Полукокк, твердых отходов сланцехимической промышленности
	LT854866	2gr-1L (99.8)	<i>Sphingopyxis</i> sp.	Почва
	LT854867	2gr-29R (99.3)	<i>Sphingopyxis</i> sp.	Грунтовые воды и кислотный поток из заброшенной угольной шахты Бактерии, деградирующие полициклические ароматические углеводороды
Betaproteobacteria				
1	LT854868	1chr1-26L (99.8)	<i>Acidovorax</i> sp.	Бактерии, деградирующие мышьяк / грунтовые воды
1	LT854869	2gr-24L (99.2)	<i>Achromobacter</i> sp.	Коксовый химический завод Метилотрофные и нитратредуцирующие протеобактерии из фильтрованных вод свалок
Bacteroidetes/Chlorobi				
1	LT854871	2gr-3R (98.2)	<i>Algoriphagus</i> sp.	Почва Почвы, загрязненные гексахлорциклогексаном / свалки Ризосфера Микробный мат из антарктических озер Солевой раствор из щелочной почвы, Китай
1	LT854870	2gr-20R (98.4)	<i>Pedobacter</i> sp.	Почва, загрязненная углеводородами Заброшенное свинцово-цинковое хвостохранилище Почва Антарктида Ризосфера почвы Сточные воды Бактерии, устойчивые к тяжелым металлам / почва вокруг свинцово-цинкового завода
Actinobacteria				
2	LT854872	2gr-18R (97.8)	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Лишайники
	LT854873	2gr-26R (98.4)	<i>Pseudonocardia</i> sp.	Мелководные отложения Бактерии, деградирующие толуол в компостном биофилтре Бактерии, деградирующие тетрагидрофуран

Gamma proteobacteria				
1	LT854874	2gr-21R (99.0)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Почва Бактерии, окисляющие мышьяк Бактерии, окисляющие нафталин Активный ил
1	LT854875	2gr-46L (98.2)	<i>Serratia sp.</i>	Бактерии, деградирующие фенол / промышленные сточные воды Почва Бактерии, окисляющие мышьяк / шахты Сточные воды Бактерии, окисляющие кадмий Zn / Cd загрязненная почва
2	LT854876	1chr1-28R (97.4)	<i>Silanimonas sp.</i>	Горячий источник / вода и донные отложения
	LT854877	1chr1-46R (97.0)	<i>Silanimonas sp.</i>	Почва Активный ил Почва химического завода
Σ последовательностей 13				
«Чазы Гол»				
Руда, действующего рудного штабеля KB				
Beta proteobacteria				
1	LT854878	3gK-45L (98.4)	<i>Achromobacter sp.</i>	Бактерии, разлагающие полициклические ароматические углеводороды / коксовый химический завод Вода свалок
1	LT854880	3gK-8L (99.3)	<i>Bordetella sp.</i>	Почвы, загрязненные углеводородами Водоносный горизонт Шлам, загрязненный хромом Бактерии, устойчивые к Cr (VI) / ил очистных сооружений Бактерии, разлагающие углеводороды Биореактор очистки сточных вод Бактерии, продуцирующие биосурфактанты / биоэмульгаторы /
1	LT854879	4chv-4R l (98.8)	<i>Achromobacter sp.</i>	Бактерии, деградирующие дихлорметан
1		4chv-4R r (100)	<i>Arthrobacter sp.</i>	Бактерии, деградирующие нефть Бактерии, деградирующие тиофосфат
Σ последовательностей 4				

Филогенетический анализ доминирующих представителей автохтонных бактериальных сообществ технологического раствора и руды рудного штабеля КВ месторождения «Бабушкина гора»

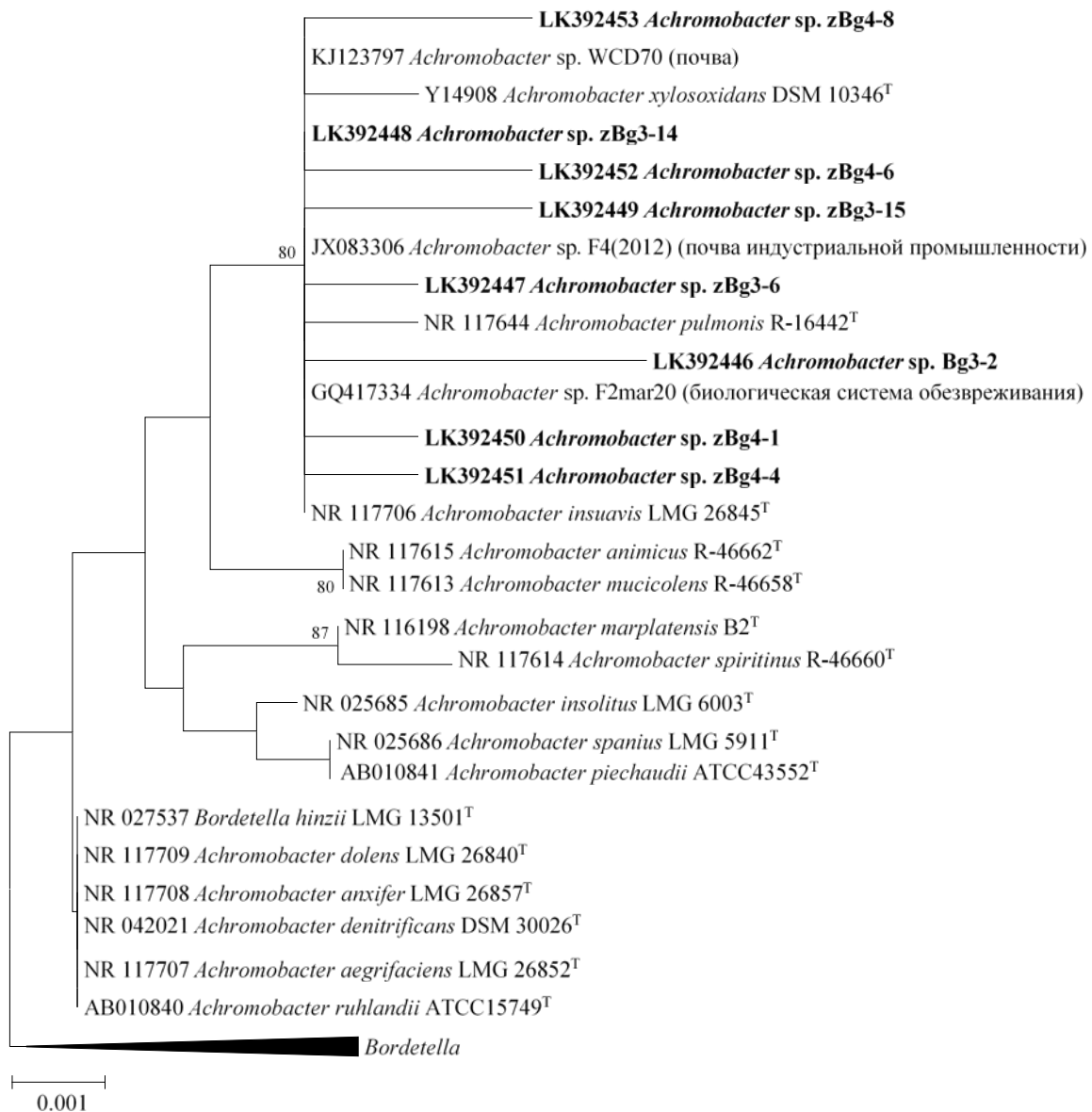


Рисунок 1. – Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей родов *Achromobacter* и *Bordetella*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75% не указаны

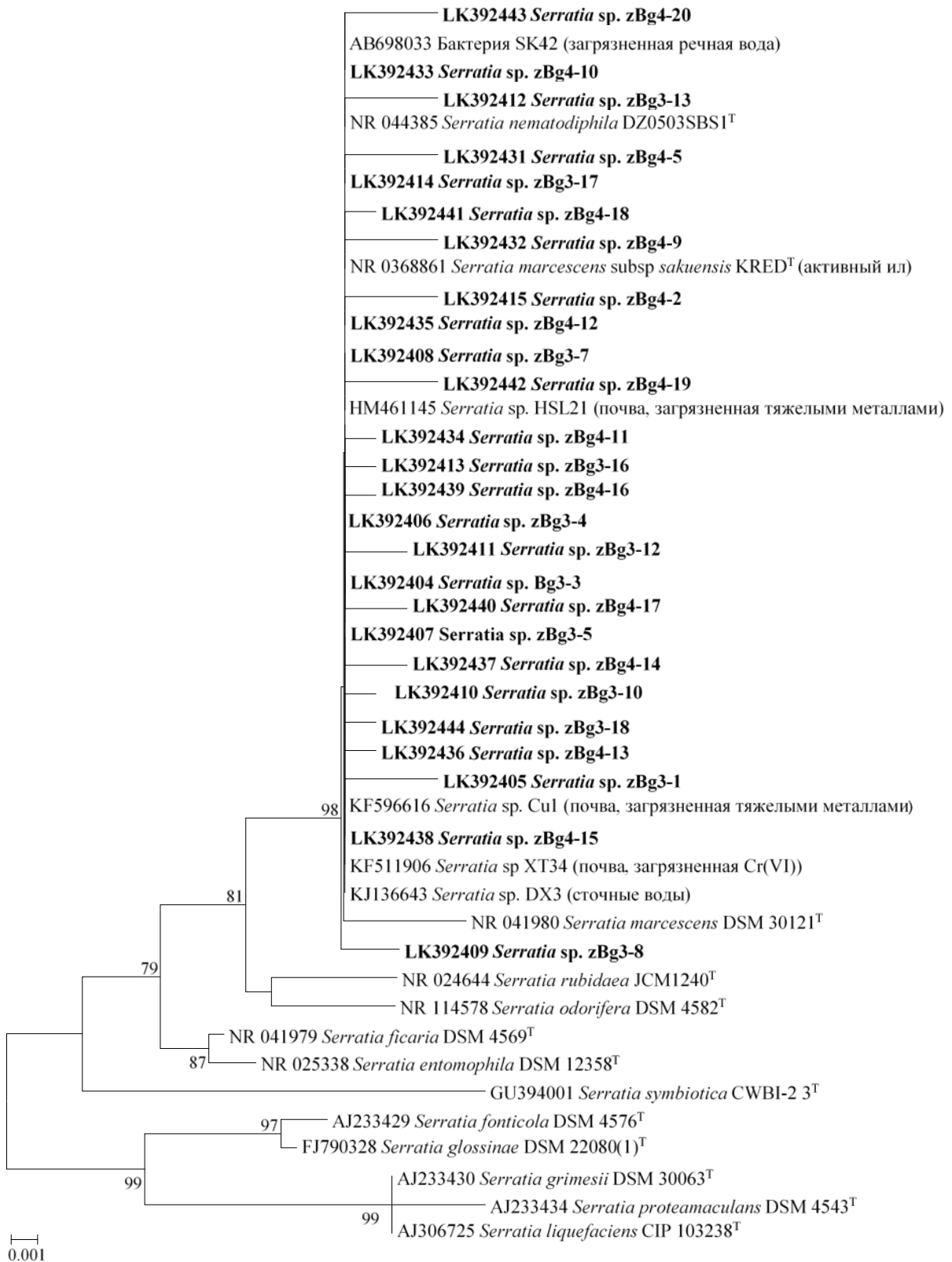


Рисунок 2. – Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рНК для представителей рода *Serratia*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75% не указаны

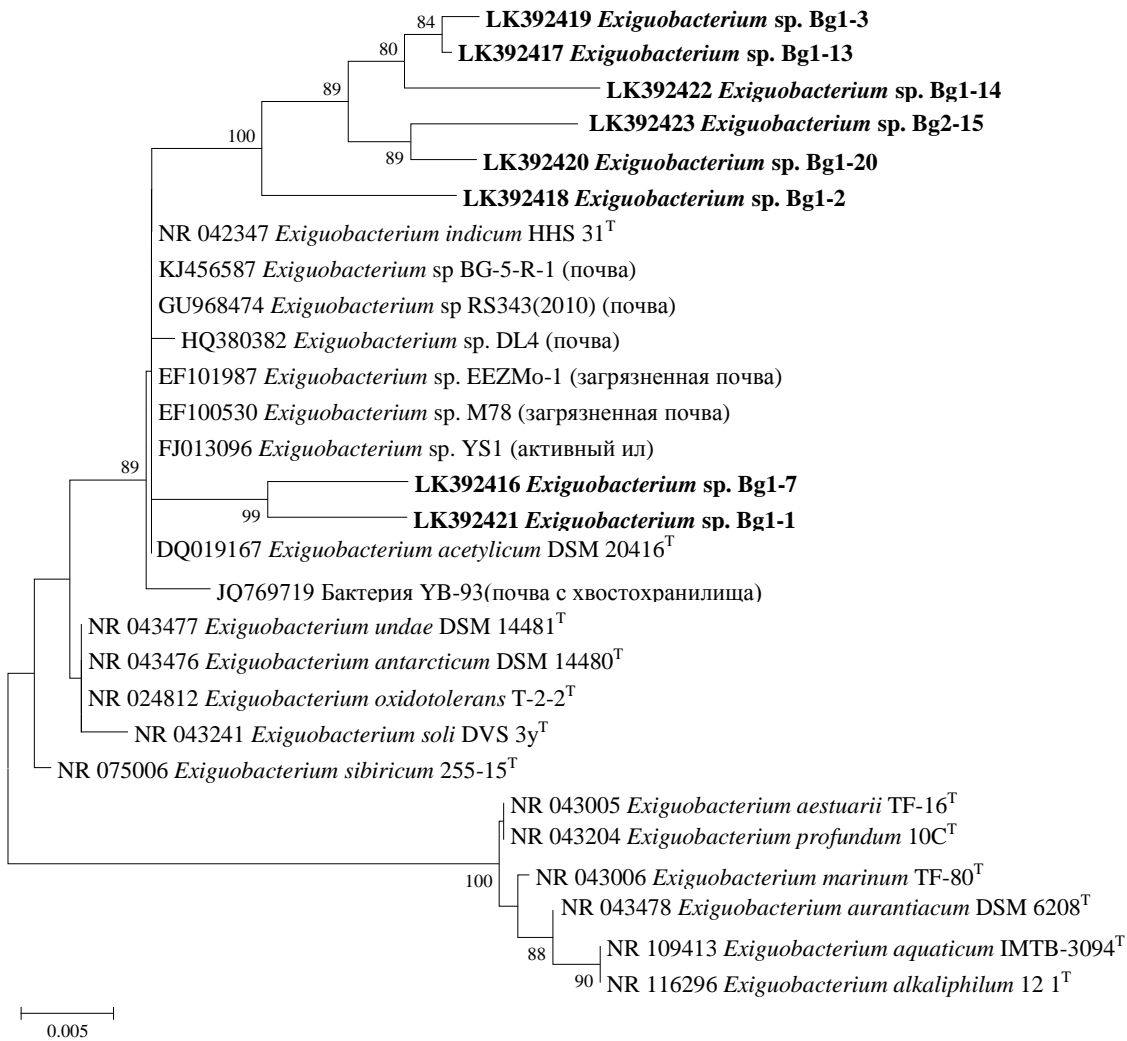


Рисунок 3. – Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Exiguobacterium*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75% не указаны

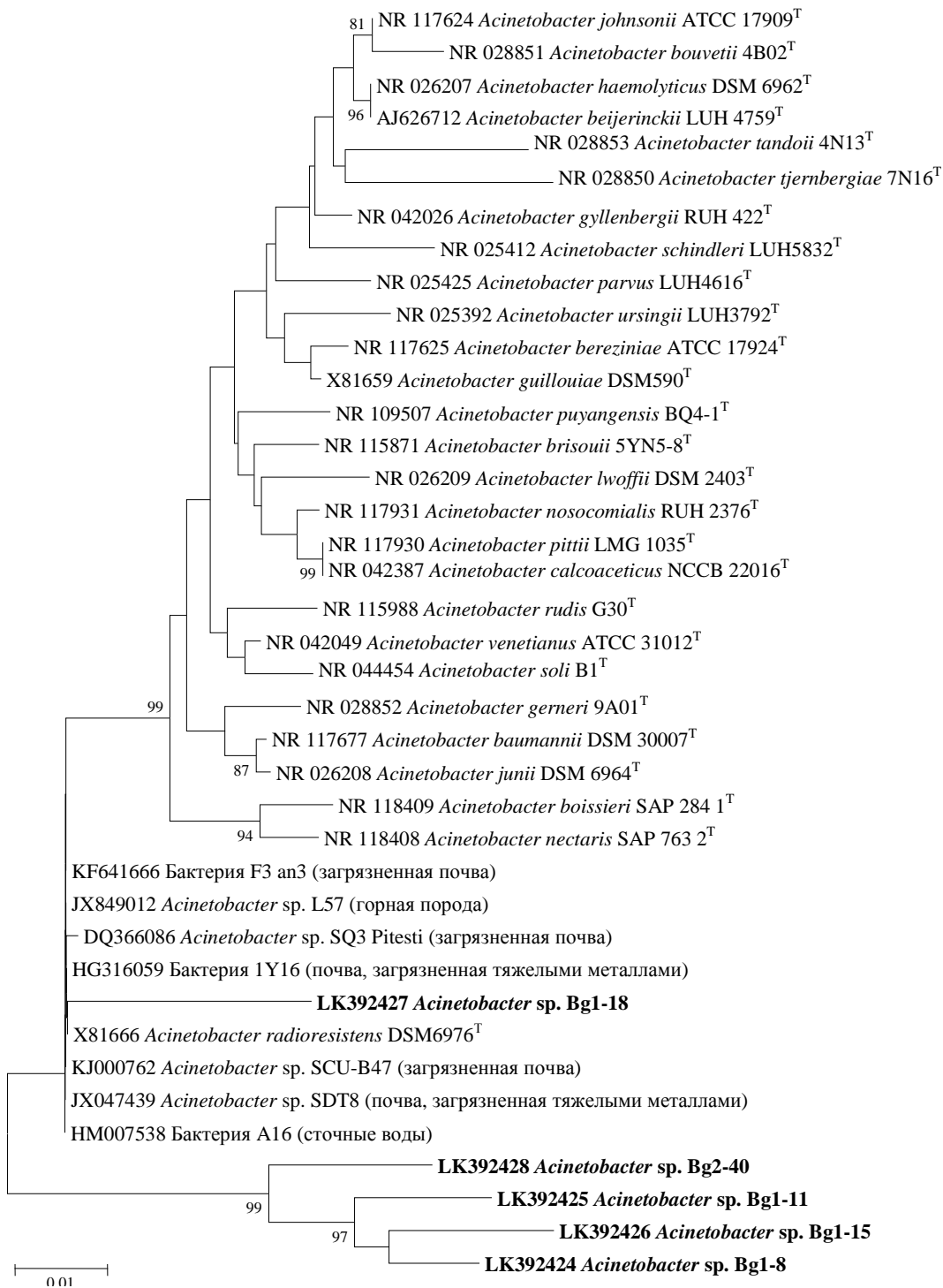


Рисунок 4. – Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рНК для представителей рода *Acinetobacter*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75% не указаны

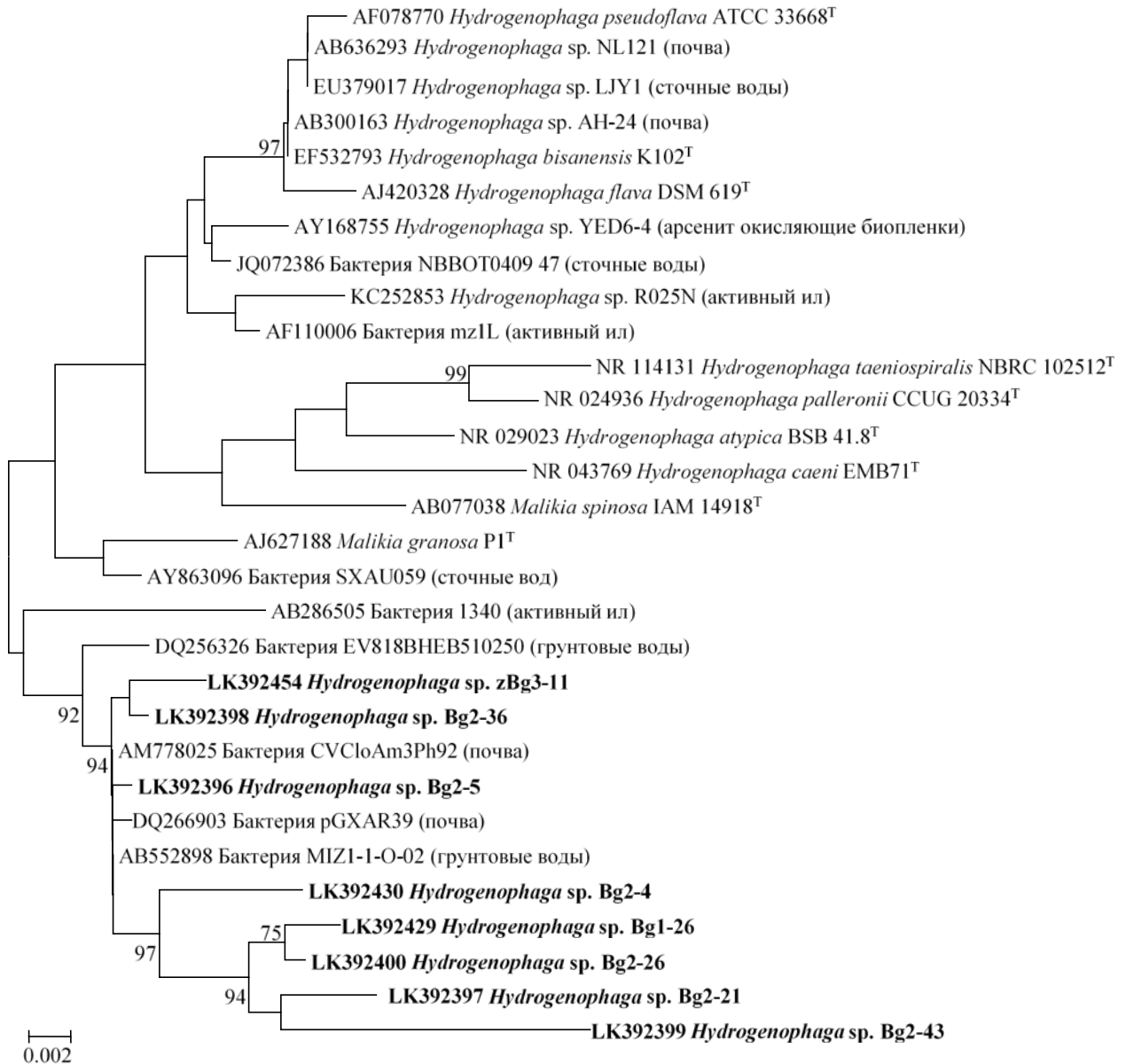


Рисунок 5. – Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Hydrogenophaga*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом: черным цветом – последовательности, выделенные из технологического раствора; серым цветом – из руды. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75% не указаны