

УДК 579.66:550.72

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУРЫ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРИНИМАЮЩЕЙ УЧАСТИЕ В БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИИ СУЛЬФИДНОЙ РУДЫ МЕСТОРОЖДЕНИЯ ШАНУЧ

Хайнасова Т.С., Пашкевич Р.И.

*ФГБУН «Научно-исследовательский геотехнологический центр» Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Петропавловск-Камчатский, e-mail: nigtc@nigtc.ru*

В области исследований по бактериально-химическим процессам переработки сульфидных руд актуальна задача определения биоразнообразия ацидофильных хемолитотрофов, принимающих участие в окислении двухвалентного железа, элементарной серы и сульфидов металлов в природных и техногенных условиях. Изучение видового состава выщелачивающих микроорганизмов является важным аспектом в формировании эффективной комбинации микробного компонента и решает проблему оптимизации и стабильности кинетических показателей окисления для различных руд или концентратов в ходе проведения процессов в условиях общей нестерильности. При этом идентификация с помощью молекулярно-биологических методов позволяет оперативно и более информативно определять биоразнообразие ацидофильных хемолитотрофов. В настоящей работе приведены результаты изучения качественного состава культуры ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенной из сульфидной руды кобальт-медно-никелевого месторождения Шануч (Камчатский край), при использовании метагеномного секвенирования маркерного гена 16S рРНК. Проанализировано таксономическое богатство и разнообразие объекта исследования. Оценка индексов Chao1, Маргалефа, Шеннона и Симпсона показала, что обилие и биоразнообразие было незначительным в сравнении с полученными ранее результатами по определению таксономического состава выделенных накопительных культур из различных руд месторождения Шануч. В исследуемой микробной ассоциации обнаружено присутствие ацидофильной железо- и сероокисляющей бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans*, являющейся ключевым участником бактериально-химического выщелачивания, а также представителей *Acidiphilium* spp. и некультивируемых микроорганизмов.

Ключевые слова: метагеномное секвенирование 16S рРНК, хемолитотрофные ацидофильные микроорганизмы, бактериально-химическое выщелачивание, сульфидная кобальт-медно-никелевая руда, месторождение Шануч

TAXONOMIC ANALYSIS OF THE ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHIC MICROORGANISM CULTURE TAKING PART IN BIOLEACHING OF SULPHIDE ORE OF THE SHANUCH DEPOSIT

Khaynasova T.S., Pashkevich R.I.

*Research Geotechnological Center, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
Petropavlovsk-Kamchatskiy, e-mail: nigtc@nigtc.ru*

In the field of research on the bacterial-chemical processing sulphide ores the objective of determining the biodiversity of acidophilic chemolithotrophs participating in the oxidation of ferrous iron, elemental sulfur and metal sulphides in natural and industrial conditions is relevant. The study of the species composition of leaching microorganisms is an important aspect in the formation of an effective combination of the microbial component. It solves the problem of optimization and stability of kinetic indices of oxidation for various ores or concentrates during the non-sterility processes. At the same time, identification using molecular biological methods makes it possible to quickly and more informatively determine the biodiversity of acidophilic chemolithotrophs. This work presents the results of studying the qualitative composition of the acidophilic chemolithotrophic microorganism culture isolated from the sulphide ore of the cobalt-copper-nickel Shanuch deposit (Kamchatka Krai) using metagenomic sequencing of the marker gene 16S rRNA. The taxonomic richness and diversity of the culture was analyzed. An assessment of the indices of Chao1, Margalef, Shannon, and Simpson showed that the abundance and biodiversity were insignificant in comparison with the results obtained previously for determining the taxonomic composition of the enrichment cultures from various ores of the Shanuch deposit. The presence of acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* which is a key participant in bacterial-chemical leaching was found in the microbial association. As well as representatives of *Acidiphilium* spp. and uncultured microorganisms was shown in the culture.

Keywords: 16S rRNA metagenomic sequencing, chemolithotrophic acidophilic microorganisms, bacterial-chemical leaching, sulphide cobalt-copper-nickel ore, Shanuch deposit

Извлечение ценных компонентов из минерального сырья с помощью микроорганизмов служит признанным биотехнологическим методом, сочетающим в себе ряд преимуществ над традиционными способами. В эксплуатации микробно-

го материала в бактериально-химических процессах переработки сульфидных руд (биовыщелачивание, биоокисление) существует два различных подхода. Первый включает применение эффективного сообщества, которое получают в результате

продолжительного культивирования и адаптации. Первичный скрининг ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов проводят в колбах или лабораторных реакторах. Сообществами, пригодными к процессу, считают микробные консорции, стабильно окисляющие минералы и сохраняющие свой состав. Второй подход предполагает использование принудительно сформированного сообщества микроорганизмов, в которое входят по крайней мере один железо- и один сероокислитель. Дополнительно в него вводят гетеротрофные и/или миксотрофные организмы с целью утилизации метаболитов ключевых участников процесса. Как правило, они также способны к окислению двухвалентного железа и восстановленным соединений серы, тем самым обеспечивают растворение ценных металлов. Таким образом, формируют эффективную комбинацию микроорганизмов, состоящую из 2–4 видов [1, 2].

Применение микроорганизмов в биовыщелачивании уже продолжительное время ориентируется на смешанные и стабильно окисляющие культуры в противоположность ранее практикуемым при изучении кинетики процессов монокультурам. Из табл. 1 с литературными данными о качественном составе культур, используемых в бактериально-химических процессах переработки различных руд и концентратов, видно, что роды и виды консорциумов не отличаются богатым разнообразием и приблизительно похожи между собой (присутствуют железоокислитель и сероокислитель). Основными участниками являются мезофильные, умеренно и экстремально термофильные железо- и сероокисляющие бактерии и археи родов *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Ferroplasma*, *Acidiphilium*, *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Sulfolobus*. Несмотря на общую скудность микроорганизмов, можно наблюдать различия в комбинациях их применения. Необходимо также учитывать факт нестерильности проведения бактериально-химических процессов, который может приводить к изменению качественного состава микробных ассоциаций.

Вопросы идентификации микроорганизмов с помощью молекулярно-биологических методов актуальны в области рудной микробиологии, поскольку позволяют оперативно и более информативно определять биоразнообразие ацидофильных хемолитотрофов в ходе биовыщелачивающих процессов.

Таким образом, состав микробного компонента следует рассматривать как один из факторов, определяющих успешность про-

текания процесса и стабильность кинетических показателей окисления для различных руд или концентратов.

В Научно-исследовательском геотехнологическом центре Дальневосточного отделения Российской академии наук (Камчатский край) проводятся исследования бактериально-химических процессов переработки сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения Шануч в периодическом и непрерывном режимах [20, 21]. В качестве микробного компонента в работах используется культура аборигенных ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенная из руды месторождения Шануч и культивируемая в лабораторных условиях, качественный состав которой подробно так и не был изучен.

Цель исследования заключалась в определении таксономического состава культуры микроорганизмов, ранее выделенной из сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения Шануч и используемой в лабораторных экспериментах по бактериально-химическому выщелачиванию, с применением высокопроизводительного секвенирования (метагеномного секвенирования 16S рРНК).

Материалы и методы исследования

Культура микроорганизмов и условия ее выделения. Исследуемая культура ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов была выделена из предварительно измельченного образца окисленной руды сульфидного кобальт-медно-никелевого месторождения Шануч (отвалный участок с интенсивными окислительными процессами). Накопление производили стационарно в колбе Эрленмейера объемом 500 мл при температуре 28 °С в термостате. В качестве питательной среды использовали 300 мл раствора минеральных солей Сильвермана и Лjungдгрена (9К) без FeSO₄·7H₂O. Масса образца руды составляла 25 г. Соотношение Т:Ж – 1:12. Культуру подвергали адаптации [20] и поддерживали на сульфидной руде месторождения, которую использовали в экспериментальных работах по биовыщелачиванию.

Выделение ДНК, ПЦР-амплификация, высокопроизводительное секвенирование на Illumina MiSeq, биоинформатическая обработка данных. Выделение ДНК, приготовление ДНК-библиотек, секвенирование, а также биоинформатическая обработка данных были проведены в Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук сотрудниками центра коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» (г. Оренбург, Россия); дальнейшая обработка и интерпретация результатов – в Научно-исследовательском геотехнологическом центре Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Выделение тотальной ДНК проводили с помощью механической гомогенизации в сочетании с методом ферментативного лизиса [22]. Для этого к 50 мкл осадка биомассы анализируемого образца добавляли 200 мкл ТСБ (20 ммоль/л ЭДТА, 750 ммоль/л NaCl,

100 ммоль/л Трис-НСl, рН 8,0). Клеточный лизис производили путем внесения 50 мкл ТСБ с лизоцимом в концентрации 10 мг/мл, после чего пробы инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. Дальнейшее разрушение клеток осуществляли путем добавления лизирующего матрикса (Lysing matrix E, MP Biomedicals, США) в объеме ¼ от объема пробирок и гомогенизацией содержимого в гомогенизаторе TissueLyser LT (Qiagen, Германия) в течение 1 мин при частоте 50 Гц. В составе матрикса находились: кремниевые шарики 0,1 мм, керамические шарики 1,4 мм и 1 стеклянный шарик 4 мм. Полученный раствор прогревали при 95 °С в течение 10 мин на твердотельном термостате Термит (ДНК-технология, Россия). Разрушение плазматических мембран клеток и гидролиз пептидных связей осуществляли добавлением 50 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия (итоговая концентрация 1%) и 2 мкл раствора протеиназы К (10 мг/мл). Полученный раствор инкубировали при 60 °С в течение 60 мин. С целью денатурации и отделения белков вносили фенол-хлороформную смесь (1:1) в равном объеме (300 мкл) и встряхивали вручную 5 мин. Далее, центрифугировали при 14500 об/мин

на высокоскоростной мини-центрифуге Microspin 12 с ротором MSR-12 (Bio-San, Латвия) в течение 5 мин при комнатной температуре. В отобранный объем водной фазы (250–300 мкл) добавляли равный объем хлороформ-изоамилового спирта (24:1), встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали при 14500 об/мин при комнатной температуре 5 мин. В отделенный центрифугат добавляли 40 мкл 10 М ацетата аммония (10:1) и 800 мкл ледяного спирта (–20 °С). После выдержки нуклеиновых кислот при отрицательных температурах их центрифугировали. Полученную массу промывали холодным 80% этиловым спиртом и центрифугировали на центрифуге с охлаждением для пробирок типа эппендорф до 2 мл (Universal 320 R с ротором 1689-A, Hettich, Германия) при 14000 об/мин сначала в течение 30 мин, а затем 10 мин при 4 °С. Осадок подсушивали. К полученному осадку приливали 30 мкл MQ воды, перемешивали на вортексе FV-2400 и встряхивали трижды. Чистоту ДНК контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и фотометрии Quantus (Promega, США) с применением набора Quanti Fluor dsDNA (Promega, США).

Таблица 1

Качественный состав культур микроорганизмов, используемых в бактериально-химическом выщелачивании (чановое и реакторное биовыщелачивание)

№ п/п	Состав культур микроорганизмов	Субстрат для биовыщелачивания	Литература
1	<i>Acidithiobacillus</i> spp., <i>Leptospirillum</i> spp., <i>Acidiphilium</i> spp.	Никельсодержащая сульфидная руда	[3]
2	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i> , <i>S. thermosulfidooxidans</i> , <i>Acidithiobacillus caldus</i> , <i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Медьсодержащий сульфидный флотоконцентрат	[4]
3	Мезофильная культура (<i>Acidithiobacillus caldus</i> , <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , <i>Sulfobacillus</i> spp., <i>Ferroplasma</i> spp.) и экстремально термофильная культура (<i>Acidianus brierleyi</i> , <i>Metallosphaera sedula</i> , <i>Sulfolobus</i> spp.)	Никель- и медьсодержащий концентрат	[5]
4	<i>Acidithiobacillus caldus</i> , <i>Leptospirillum</i> spp., <i>Sulfobacillus</i> spp., <i>Ferroplasma</i> spp.	Медьсодержащие полиметаллические концентраты	[6]
5	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> , <i>L. ferriphilum</i>	Пирротиновые золотосодержащие концентраты (BIOX™)	[7]
6	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Никельсодержащие сульфидные концентраты (BioNIC®)	[7]
7	<i>Leptospirillum</i> spp., <i>Acidithiobacillus</i> spp., <i>Sulfobacillus</i> spp.	Кобальт- и железосодержащий пиритовый концентрат	[8]
8	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Дымовая пыль медеплавильного завода Sarcheshmeh	[9]
9	<i>Acidithiobacillus caldus</i> , <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , <i>Sulfobacillus</i> spp., <i>Ferroplasma</i> spp.	Халькопиритовый концентрат	[10]
10	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> , <i>Acidiphilium</i> spp.	Низкосортная никельсодержащая сульфидная руда	[11, 12, 13]
11	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Урановая руда	[14, 15]
12	<i>Acidithiobacillus caldus</i> , <i>Leptospirillum ferriphilum</i> , <i>Sulfobacillus benefaciens</i> , <i>S. thermosulfidooxidans</i>	Медный концентрат сланцевой руды	[16]
13	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Сульфидные руды, содержащие сидерит, халькопирит, галенит и кварц	[17]
14	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (DSMZ, штамм 9293)	Сульфидный концентрат, содержащий пентландит, пирротин и халькопирит	[18]
15	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> и умеренно термофильная железозоксилирующая бактерия (штамм MLY)	Сульфид цинка	[19]

ДНК-библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу Illumina (http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с праймерами к варибельному участку V3-V4 гена 16S рРНК S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 [23]. В ходе приготовления ДНК-библиотек использовали стерильную ПЦР-воду (Евроген, Россия), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, США), смесь dNTP (Синтол, Россия). ПЦР фрагментов ДНК проводили с помощью термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот T100 (Bio-Rad Laboratories, США) в режиме: 95°C (3 мин), 25 циклов (95°C – 30 с, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с), 72°C (5 мин).

Секвенирование производили с помощью системы для автоматического секвенирования марки MiSeq (Illumina, США). Для этого использовали набор реактивов MiSeq Reagent Kit V3 для парно-концевого чтения 2×300 bp.

В ходе биоинформатической обработки производили оценку качества чтения ридов с помощью программы FastQC v0.11.5. На следующем этапе объединяли парно-концевые риды в контиги, используя программу PEAR. С помощью программы USEARCH 10.0.240_win32 осуществляли фильтрацию объединенных ридов по качеству и длине, используя команду `fastq_filter`. Формирование операционных таксономических единиц (ОТЕ) проводили путем последовательной дерепликации и кластеризации на уровне 97%. Для оценки количественной представленности полученных ОТЕ применяли глобальное выравнивание последовательностей ОТЕ на первоначальные объединенные риды. Из полученных данных исключали последовательности, встречающиеся однократно (синглтоны) или дважды (даблтоны). Таксономическую классификацию ОТЕ проводили с использованием базы данных RDP. Обилие и разнообразие микроорганизмов оценивали по количеству выделенных ОТЕ, индексам Chao1, Маргалефа, Шеннона и Симпсона.

Результаты исследования и их обсуждение

На этапе выделения нуклеиновых кислот из исследуемого образца культуры получили оптимальную ДНК для приготовления ДНК-библиотеки высокого качества.

В результате секвенирования было получено 18600 последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, включающие 5580000 пар оснований. Средняя длина каждого фрагмента составляла 300 н.п. После последовательной дерепликации и кластеризации, удаления химерных последовательностей,

глобального выравнивания последовательностей ОТЕ на первоначальные объединенные риды, удаления синглтонов и даблтонов риды были кластеризованы в 4 ОТЕ с 95% сходством последовательностей.

Анализ значений операционных таксономических единиц показал, что выделенная культура, используемая в различных экспериментальных работах по биовыщелачиванию, характеризовалась маленьким количеством ОТЕ, что ожидаемо для полученных и культивируемых в лабораторных условиях ассоциаций микроорганизмов. Максимальное таксономическое богатство, оцениваемое по индексу Chao1, составляло 9. Оценка индексов Маргалефа, Шеннона и Симпсона показала, что разнообразие было незначительным в сравнении, например, с полученными ранее результатами [24] по определению таксономического состава накопительных культур из различных руд месторождения Шануч (табл. 2). Это указывает на факт сформированного состава биовыщелачивающего консорциума.

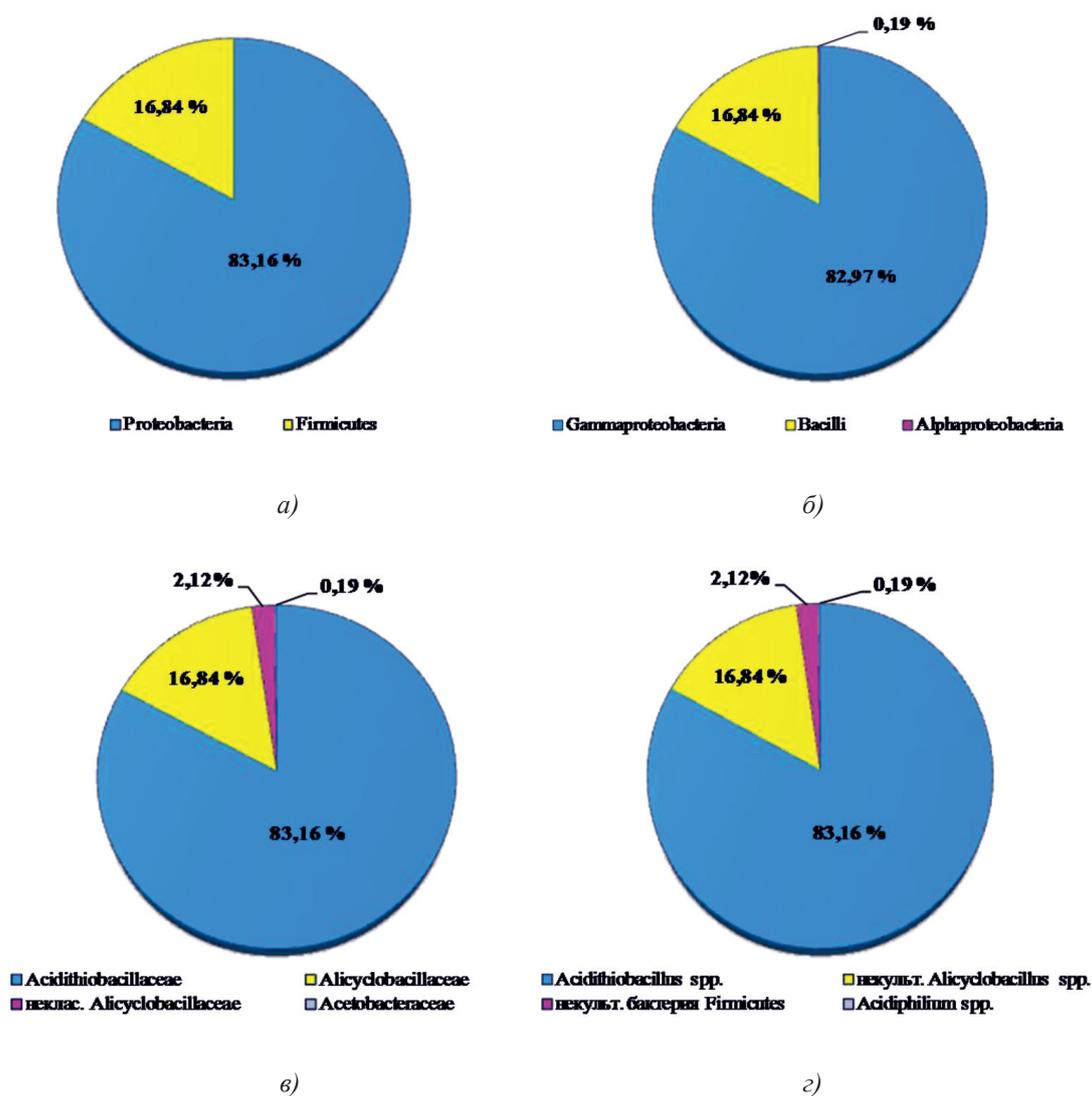
Оценивая микробный состав на основе данных с платформы Illumina, важным фактом являлось отсутствие в культуре архей на уровне домена; разнообразие было представлено исключительно бактериями. Структура культуры на уровнях филлов, классов, семейств и родов приведена на рисунке.

В таксономическом отношении разнообразие было представлено бактериями филумов Proteobacteria и Firmicutes. Анализ обнаружил, что в составе микробной ассоциации имеются 3 класса (*Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*), 4 семейства, включая 1 неклассифицированное (*Acidithiobacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Acetobacteraceae*, неклассиф. *Alicyclobacillaceae*), 4 рода, в том числе некультивируемые (*Acidithiobacillus* spp., *Acidiphilium* spp., некульт. *Alicyclobacillus* spp., некульт. бактерия Firmicutes). До вида в культуре удалось определить ацидофильную железо- и сероокисляющую бактерию *Acidithiobacillus ferrooxidans*, являющуюся ключевым участником в бактериально-химических процессах окисления сульфидных руд.

Таблица 2

Индексы обилия и разнообразия культур микроорганизмов, выделенных из сульфидной руды кобальт-медно-никелевого месторождения Шануч

Культура	Chao1	Маргалефа	Шеннона	Симпсона	Литература
Исследуемая культура	9	0,34	0,23	0,71	–
5	13,1	–	1,01	0,39	[24]
6	23	–	0,49	0,80	
35	7,13	–	0	1,00	
36	12,13	–	1,27	0,33	
49	9,25	–	0,59	0,64	



Структура бактериальной культуры, выделенной из сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения Шануч и используемой в лабораторных экспериментах по бактериально-химическому выщелачиванию, на уровне филум (а), классов (б), семейств (в) и родов (г)

Заключение

Определение качественного и количественного составов сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, наряду с их активностью, — неотъемлемая часть исследований, касающихся бактериально-химического выщелачивания. Очевидно, что информация о видовом составе микрофлоры важна для обеспечения эффективности процесса.

В настоящей работе на основании результатов метагеномного секвенирования 16S рРНК изучен таксономический состав культуры, выделенной из сульфидной кобальт-медно-никелевой руды месторождения Шануч и используемой в лабораторных

экспериментах по бактериально-химическому выщелачиванию одноименного месторождения. Показано присутствие ацидофильных железисто- и сероокисляющих бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilium* spp., а также некультивируемых микроорганизмов.

Список литературы

1. Rawlings D.E., Johnson D.B. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*. 2007. Vol. 153. P. 315-324. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001206-0.
2. Хайнасова Т.С., Левенец О.О., Балыков А.А. Бактериально-химические процессы переработки руд и их исследование в Камчатском крае // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). № S 31. С. 223–234.

3. Cameron R.A., Lastra R., Gould W.D., Mortazavi S., Thibault Y., Bedard P.L., Morin L., Koren D.W., Kennedy K.J. Bioleaching of six nickel sulphide ores with differing mineralogies in stirred-tank reactors at 30 °C. *Minerals Engineering*. 2013. vol. 49. P. 172–183. DOI: 10.1016/j.mineng.2011.03.016.
4. Vakylabad A.B., Ranjbar M., Manafi Z., Bakhtiari F. Tank bioleaching of copper from combined flotation concentrate and smelter dust. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2011. Vol. 65. P. 1208–1214. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.09.006.
5. Gericke M., Govender Y. Bioleaching strategies for the treatment of nickel–copper sulphide concentrates. *Minerals Engineering*. 2011. Vol. 24. P. 1106–1112. DOI: 10.1016/j.mineng.2011.02.006.
6. Gericke M., Muller H.H., van Staden P.J., Pinches A. Development of a tank bioleaching process for the treatment of complex Cu-polymetallic concentrates. *Hydrometallurgy*. 2008. Vol. 94. P. 23–28. DOI: 10.1016/j.hydromet.2008.05.018.
7. Watling H.R. The bioleaching of nickel-copper sulfides. *Hydrometallurgy*. 2008. Vol. 91. P. 70–88. DOI: 10.1016/j.hydromet.2007.11.012.
8. d’Hugues P., Jouliau C., Spolaore P., Michel C., Garrido F., Morin D. Continuous bioleaching of a pyrite concentrate in stirred reactors: Population dynamics and exopolysaccharide production vs. bioleaching performance. *Hydrometallurgy*. 2008. Vol. 94. P. 34–41. DOI: 10.1016/j.hydromet.2008.05.045.
9. Bakhtiari F., Zivdar M., Atashi H., Seyed Bagheri S.A. Bioleaching of copper from smelter dust in a series of airlift bioreactors. *Hydrometallurgy*. 2008. Vol. 90. P. 40–45. DOI: 10.1016/j.hydromet.2007.09.010.
10. Gericke M., Govender Y., Pinches A. Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. *Hydrometallurgy*. 2010. Vol. 104. P. 414–419. DOI: 10.1016/j.hydromet.2010.02.024.
11. Cameron R.A., Lastra R., Mortazavi S., Bedard P.L., Morin L., Gould W.D., Kennedy K.J. Bioleaching of a low-grade ultramafic nickel sulphide ore in stirred-tank reactors at elevated pH. *Hydrometallurgy*. 2009. Vol. 97. P. 213–220. DOI: 10.1016/j.hydromet.2009.03.002.
12. Cameron R.A., Lastra R., Mortazavi S., Gould W.D., Thibault Y., Bedard P.L., Morin L., Kennedy K.J. Elevated-pH bioleaching of a low-grade ultramafic nickel sulphide ore in stirred-tank reactors at 5 to 45 °C. *Hydrometallurgy*. 2009. Vol. 99. P. 77–83. DOI: 10.1016/j.hydromet.2009.07.001.
13. Cameron R.A., Yeung C.W., Greer C.W., Gould W.D., Mortazavi S., Bédard P.L., Morin L., Lortie L., Dinardo O., Kennedy K.J. The bacterial community structure during bioleaching of a low-grade nickel sulphide ore in stirred-tank reactors at different combinations of temperature and pH. *Hydrometallurgy*. 2010. Vol. 104. P. 207–215. DOI: 10.1016/j.hydromet.2010.06.005.
14. Eisapour M., Keshtkar A., Moosavian M.A., Rashidi A. Bioleaching of uranium in batch stirred tank reactor: Process optimization using Box–Behnken design. *Annals of Nuclear Energy*. 2013. Vol. 54. P. 245–250. DOI: 10.1016/j.anucene.2012.11.006.
15. Zokaei-Kadjani S., Safdari J., Mousavian M.A., Rashidi A. Study of oxygen mass transfer coefficient and oxygen uptake rate in a stirred tank reactor for uranium ore bioleaching. *Annals of Nuclear Energy*. 2013. Vol. 53. P. 280–287. DOI: 10.1016/j.anucene.2012.07.036.
16. Spolaore P., Jouliau C., Gouin J., Morin D., d’Hugues P. Relationship between bioleaching performance, bacterial community structure and mineralogy in the bioleaching of a copper concentrate in stirred tank reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011. Vol. 89. no 2. P. 441–448. DOI: 10.1007/s00253-010-2888-5.
17. Olubambi P.A., Ndlovu S., Potgieter J.H., Borode J.O. Effects of ore mineralogy on the microbial leaching of low grade complex sulphide ores. *Hydrometallurgy*. 2007. Vol. 86. P. 96–104. DOI: 10.1016/j.hydromet.2006.10.008.
18. Cruz F.L.S., Oliveira V.A., Guimarães D., Souza A.D., Leão V.A. High-temperature bioleaching of nickel sulfides: thermodynamic and kinetic implications. *Hydrometallurgy*. 2010. Vol. 105. P. 103–109. DOI: 10.1016/j.hydromet.2010.08.006.
19. Shi S.-Y., Fang Z.-H., Ni J.-R. Comparative study on the bioleaching of zinc sulphides. *Process Biochemistry*. 2006. Vol. 41. P. 438–446. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.07.008.
20. Хайнасова Т.С., Левенец О.О. Влияние последовательной адаптации сообществ хемолитотрофных микроорганизмов к плотности пульпы на их окислительную активность // Актуальные аспекты современной микробиологии: материалы V-й молодежной школы-конференции с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (Москва, 26–27 октября 2009 г.). М.: МАКС Пресс, 2009. С. 139–140.
21. Хайнасова Т.С., Левенец О.О. Бактериально-химическое выщелачивание как экологически безопасный способ переработки сульфидной кобальт-медно-никелевой руды // Разведка и охрана недр (научно-технический журнал). 2015. № 1. С. 49–54.
22. Белькова Н.Л. Модифицированная методика выделения суммарной ДНК из водных проб и грунтовых вытяжек методом ферментативного лизиса // Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ. Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: учебно-методическое пособие. Ярославль: Изд-во ООО «Принт-хаус», 2009. С. 53–63.
23. Klindworth A., Priesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. no 1. P. 1–11. DOI: 10.1093/nar/gks808.
24. Хайнасова Т.С., Пашкевич Р.И. Таксономический анализ накопительных культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из руд месторождения Шануч (Камчатский край) // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). Камчатка-7. Специальный выпуск 57. 2018. № 12. С. 267–275. DOI: 10.25018/0236-1493-2018-12-57-267-275.