

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

эксперта диссертационного совета Д 03.24.693 Доолоткелдиевой Тинатин, доктора биологических наук, профессора при Институте биологии Национальной Академии наук Кыргызской Республики, соучредитель Иссык-Кульский государственный университет им. К.Тыныстанова по диссертации Бекебаевой Мадины Омирхановны на тему: «**Микробоценозы золотоносных месторождений Казахстана и повышение эффективности технологии выщелачивания руд микробиологическим методом**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология, 03.02.03 – микробиология.

Рассмотрев представленную диссертацию соискателем Бекебаевой Мадины Омирхановны пришла к следующему заключению:

1. Соответствие работы специальности, по которой дано право диссертационному совету принимать диссертации к защите

Представленная кандидатская диссертация Бекебаевой Мадины Омирхановны на тему: Микробоценозы золотоносных месторождений Казахстана и повышение эффективности технологии выщелачивания руд микробиологическим методом соответствует профилю диссертационного совета.

В работе проводилось исследование по изучению экологии микроорганизмов в месторождениях сульфидных руд разных географических зон и их геохимической деятельности, что в полной мере отвечает паспорту специальностям: 03.02.08 – экология 03.02.03 – микробиология

2. Целью диссертации является:

Оценка влияния антропогенных факторов на структуру и динамику численности микробоценозов в техногенных экосистемах Восточного Казахстана и повышение эффективности технологии выщелачивания руд микробиологическим методом.

Поставленная цель достигнута решением в диссертации следующих задач:

1. Изучить частоту встречаемости *A.ferrooxidans* и количественная оценка значимости физико-химических факторов, влияющих на состав микроорганизмов характерных для рудных месторождений Восточного Казахстана;
2. Установить сезонную динамику и зависимость к температуре микробоценозов золотоносных месторождений Восточного Казахстана;
3. Разработать способ получения ассоциативных и умеренно термофильных культур, выделенных из ряда месторождений Восточного Казахстана;
4. Установить закономерность активизаций культур бактериальных клеток, который является ключевым процессом биоокисления сульфидных руд;
5. Определить количественный состав видов бактериальной клетки и целесообразность применения проведенного молекулярно-биологического исследования структуры сообщества в прикладных биотехнологических и микробиологических исследованиях.

Предмет исследования – экологические особенности аборигенных штаммов хемолитотрофных микроорганизмов месторождения Восточного Казахстана.

Для реализации настоящей работы использовались общеприятные микробиологические и экологические методы исследования.

Численность микроорганизмов изучали общепринятыми экологическими методами, путем высева на соответствующие каждой группе микроорганизмов питательные среды.

Анализ филогенетического положения микроорганизмов с помощью секвенирования гена *16S rPHK*. Секвенирование проводилось на фирменном приборе марки «EvoGen» по

методу Сэнгера. Первичный анализ сходства полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с помощью сервера BLAST. Выравнивание последовательностей и построение филогенетического дерева исследуемых бактерий осуществляли с помощью пакета программ MEGA 6.

Химический состав руды, растворов и кеков после выщелачивания определяли в испытательной химико-технологической лаборатории ионообменных материалов ТОО «КАЗАТОМПРОМ-СОРБЕНТ». Рентгенодифрактометрических анализов проведен на автоматизированном дифрактометре ДРОН-3 с $Si_{K\alpha}$ – излучением, β -фильтр. Условия съемки дифрактограмм: $U=35$ кВ; $I=20$ мА; шкала: 2000 имп.; постоянная времени 2 с; съемка $\theta-2\theta$; детектор 2 град/мин.

Статистическая обработка материала проводилась с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, графические иллюстрации построены с использованием программных пакетов Microsoft Excel, карта-схема – программ «Surfer -15».

Соответствие объекта исследования диссертации цели и задачам диссертации:

Объектом исследования являются микробценозы золотоносных месторождений Восточного Казахстана и экологические особенности аборигенных штаммов хемолитотрофных микроорганизмов, что полностью соответствует цели и задачам диссертации.

Соответствие методов исследования задачам диссертации (использование современной аппаратуры, наличие сертификатов у лабораторий и вивария, адекватной стат. обработки) - по каждой задаче:

1. Синэкологические методы исследования (Определение численности микроорганизмов в золотоносных месторождениях Казахстана, получение накопительной культуры, выделение чистой культуры) осуществлялись с применением классических микробиологических оборудований: автоклав, термостаты, ламинар бокс, микроскопы, рН метры, спектрофотометр, центрифуги и т.д.

2. Физико-химические методы исследования. Измельчение руд. Пробы руды измельчали в шаровой мельнице. Уменьшение размеров частиц рудного тела достигалось путём механического воздействия в барабанной мельнице из серии VBM со стальными шарами, которые наполовину заполняли мельницу и перекачивались в барабане при его вращении вокруг продольной оси. Крупность частиц руды после помола на мельницах мельниц контролировали на классификаторе .

3. Химический состав руды, растворов и кеков после выщелачивания определяли в испытательной химико-технологической лаборатории ионообменных материалов ТОО «КАЗАТОМПРОМ-СОРБЕНТ». Пробы руды предварительно разлагали в микроволновом, пробоподготовщике Miles tone Ethoz EZ с использованием концентрированных соляной и азотной кислот при 300°C и 1500 Вт. Разложенные пробы анализировали на содержание элементов в аппарате ICP-OES Perkin Elmer Optima 8000. Способность бактерий окислять Fe^{2+} определяли по изменению в среде количества Fe^{2+} и Fe^{3+} . Количество Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексометрическим методом [205], с использованием в качестве титранта ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль). Метод основан на реакции образования комплексных соединений ионов металлов с органическими соединениями. рН и окислительно-восстановительный потенциал среды измеряли на рН- метре ЭВ-74.

Актуальность темы диссертации

Одной из центральных проблем геохимической экологии является изучение геохимической деятельности микроорганизмов месторождений. Геохимические функции микроорганизмов в природе настолько разнообразны, что выделяют 9 категорий биогеохимических процессов, протекающих в экосистемах с помощью микроорганизмов.

Среди них особое значение имеют окислительные процессы превращения трудно растворимых минералов, осуществляемые хемолитоавтотрофными бактериями, которые используют элементы с переменной валентностью в энергетических целях в качестве доноров электронов. С их деятельностью в природе связано образование и разрушение полезных ископаемых, они осуществляют важнейшие этапы круговорота минеральных элементов и являются связующим звеном между геохимическими и биологическими процессами.

Рассматривая геохимические превращения минералов в экосистеме, В.И.Вернадский указывал на участие в этих процессах тионовых бактерий. Но, в его время не были достаточно хорошо изучены ни распространение, ни экология хемолитотрофных бактерий, поэтому он невольно переоценивал значение пурпурных и нитчатых серобактерий в биогеохимии минералов. Исследования деятельности хемолитотрофных бактерий в природе дали возможность внести поправки и дополнить схему биогеохимических превращений минералов В.И.Вернадского. Рассматривая геохимические превращения металлов, академик С.С. Смирнов разработал теорию окисления верхних слоев сульфидных месторождений. Однако его теория не учитывает роль микроорганизмов, в частности *T.ferrooxidans*, в присутствии которых окисление сульфидов металлов протекает гораздо быстрее, чем только кислородом воздуха.

Сейчас взгляд на первичную кору окисления сульфидных пород иной – кислород имеет значение, но, на каком-то этапе выветривания подключаются микроорганизмы, образующие серную кислоту, тем самым окисление и разрушение пород ускоряется.

Способность хемолитотрофных бактерий преобразовывать минералы, содержащие элементы с переменной валентностью, нашла широкое практическое применение и составила основу самостоятельного раздела экологической биотехнологии - биогеометаллургии. Поэтому уже более 50 лет проводится изучение биохимии и физиологии тионовых бактерий. К настоящему времени хорошо изучены пути метаболизма этих бактерий и способы повышения их устойчивости к металлам. По сравнению с этими вопросами менее изучена их экология.

Железоокисляющие тионовые бактерии в экологическом отношении являются ярко выраженными специалистами. Экологической нишей для них служат месторождения сульфидных минералов, кислые рудничные воды. Многие месторождения сульфидных руд изучены в отношении распространения в них тионовых и сопутствующих микроорганизмов. Однако почти нет исследований по сопоставлению микробценозов месторождений отдаленных друг от друга географических районов.

В связи с вышеизложенным материалом, изучение экологии микроорганизмов в месторождениях сульфидных руд разных географических зон и их геохимической деятельности представляется весьма актуальным.

3. Научные результаты

В работе представлены следующие новые научно-обоснованные теоретические результаты.

Определен химический состав золотоносных руд месторождения Риддер-Сокольное. Проводились исследования по распределению золота по классам крупности руды месторождения Риддер-Сокольное, установлено, что с уменьшением класса крупности руды, увеличивается выход золота в процентах. В медноколчеданных рудах халькопирит, развивается между зерен пирита. В колчеданно-медно-цинковых и колчеданно-полиметаллических рудах галенит, сфалерит и блеклая, выделяются в промежутках зерен пирита; халькопирит и галенит выполняет межзерновые пространства в клейофане. Золото в данной ассоциации было обнаружено с пиритом в кварц-хлоритовой жиле с редкой вкрапленностью халькопирита и сфалерита. Отмечаются крупные выделения золота (до 0,5 мм) в сростании халькопиритом, галенитом и сфалеритом в кварц-7 серицитовой массе.

Полученные новые данные термобарогеохимических исследований показывают, что минералообразование и на глубоких горизонтах Риддер-Сокольного месторождения происходило в близком температурном интервале 425°C до 110°C. Гомогенизация всех типов микровключений в жидкую фазу указывает на гидротермальный характер минералообразования. Размеры микровключений в кварце являются рядовыми (от нескольких до 20-30 мкм). Следовательно, при кристаллизации минералов рудолокализирующие и рудообразующие гидротермальные системы находились в равновесных термодинамических условиях.

Получены результаты изучения биоразнообразия азотфиксирующих бактерий золото-мышьяковистого месторождения Риддер-Сокольное. В шахтных водах выбранных горизонтов было исследовано распределение аммонифицирующих бактерий. Среди аммонификаторов встречаются как, спорообразующие формы (*Bacillus*), так и микроорганизмы, не образующие спор (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*). Процесс биовыщелачивания нуждается в интенсификации, в том числе за счет поиска наиболее эффективных микроорганизмов и повышения активности уже применяемых культур. В этой связи особую важность приобретает селекция наиболее активных смешанных культур и одиночных штаммов, адаптированных к условиям протекания бактериально-химического выщелачивания.

Численность аммонифицирующих бактерий колебалась в пределах $10^1 - 10^4$ кл/мл (рис. 3.5). Наименьшая численность бактерий была отмечена в шахтной воде горизонтов 50 и 290, где вода имеет слабокислую (pH 5,8) среду. На этом горизонте трещинные воды Риддер-Сокольного рудника относятся к грунтовым водам зоны выщелачивания.

Изучена сравнительная оценка влияния антропогенных факторов на структуру и динамику численности микробоценозов месторождений Риддер-Сокольное. Был сделан вывод, что геохимические процессы в рудах и шахтных водах вследствие недостаточного количества тионовых бактерий осуществляются за счет жизнедеятельности гетеротрофных микроорганизмов. В зависимости от конкретной обстановки право преимущественного развития может получить две-три группы тионовых бактерий, которые осуществляют этот процесс. В связи с этим нами был исследован широкий спектр хемолитотрофных бактерий, присутствующих в руде месторождений. Были определены численность и активность окисления двухвалентного железа бактериями *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A.thiooxidans*, *Sulfolobus*, *Leptospirillum* и *Acidiplasma*. Численность бактериальных клеток учитывали на селективных средах.

Изучено влияние различных физико-химических факторов на биовыщелачивания руды золотоносного месторождения Большевик. Как видно из данных, приведенных в работе, повышение температуры примерно на 20-30°C положительно влияет на процесс биовыщелачивания золота. Помимо этого, указанные уровни температуры значительно интенсифицирует как биохимические, так и химические процессы извлечения золота из руды месторождения Большевик. Оптимальным для биохимического тиосульфатного выщелачивания следует считать 20-30°C. При этом продолжительность процесса может быть сокращена до 8-12 часов.

Изучено рентгенофазовые свойства золото-мышьяковистой руды месторождения Большевик после биовыщелачивания *Acidithiobacillus ferrooxidans*. С применением бактериально-химического метода выщелачивания образцов впервые полуколичественным рентгенофазовым анализом обнаружены минералы, встречающиеся в образцах золотосодержащих руд коры выветривания месторождения Большевик, такие как галлузит-10Å $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot 2H_2O$ и иллит $K_{0.75}(H_3O)_{0.25}Al_2(Si_3Al)O_{10}((H_2O)_{0.75}(OH)_{0.25})_2$. По результатам химического анализа проб исследуемой руды выявлены высокое содержание кварца; наличие больших количеств глинозема, оксидов калия и магния, что также указывает на присутствие слюдистых минералов или глинистых компонентов.

Изучено влияние температуры на окисление двухвалентной железа культурой

бактерий *A.ferrooxidans* TFV и TFBK.

Так как *A.ferrooxidans* является облигатным автотрофом, может использовать в качестве единственного источника энергии двухвалентное железо, то о влиянии температуры на физиологическую активность штаммов *A.ferrooxidans* TFV и TFBK судили по скорости окисления ими двухвалентного железа. В целом, полученные данные демонстрируют, что изученные штаммы несколько более устойчивы к NaCl, чем некоторые изученные ранее представители вида, например рост типового штамма *A.ferrooxidans* DSM 14882^T значительно ингибировался 3,5 г/л NaCl и полностью подавлялся при концентрации 7 г/л NaCl. В работе показано, что штаммы рода *Acidithiobacillus* могут различаться особенностями компонентов ЭТЦ несмотря на филогенетическую близость. Идентификация 3-х культур бактерий была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента *16SrRNA* гена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GeneBank, а также построением филогенетических деревьев с нуклеотидными последовательностями референтных культуры бактерии.

Был разработан способ получения ассоциативных культур, выделенных из ряда месторождений Казахстана и получена устойчивая популяция умеренно термофильных *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidiplasma sp.*, характеризующаяся повышенной скоростью роста и окисления двухвалентного железа.

3.1. Научная новизна полученных результатов в рамках современной науки.

- Впервые получены данные о численности и составе микробоценозов руд и шахтных вод золотоносного, техногенного месторождений Казахстана.
- Показана зависимость численности тионовых бактерий от сезонных и техногенных стадий.
- Определены условия интенсификации процесса извлечения золота с использованием хемолитотрофных бактерий для последующего тиосульфатного выщелачивания с помощью тионовых бактерий.
- Определены оптимальные экоусловия биовыщелачивания золотоносных руд с помощью тионовых бактерий, обеспечивающих максимальное извлечение золота.
- Установлено влияние различных концентраций химических соединений на рост и развитие железобактерий.
- Определены условия активизации процессов выщелачивания бедных золотомышьяковых концентратов.
- На основе результатов исследования микробоценозов золотосодержащих руд, кинетических параметров реакций бактериального извлечения золота из бедных, золотосодержащих руд установлен механизм протекания процессов бактериально-химического вскрытия руд.

3.2. Обоснование достоверности научных результатов (способы сбора материала и аргументация научных выводов):

Научная работа проведена в рамках Подпрограмма 102 «Грантовое финансирование научных исследований», Приоритет: «Рациональное использование природных ресурсов, переработка сырья и продукции», «Разработка биохимической технологии извлечения благородных металлов из упорных руд казахстанских месторождений с использованием активных ассоциаций хемолитотрофных бактерий», УДК 581.52;550.72; МРНТИ 62.13.27; № госрегистрации 0115РК00277; Инв. № 0217РК01522.

Методология выполнения исследования велась в строгом соответствии с нормативными документами, утвержденными Министерством экологии. Отбор проб для выделения литотрофных бактерий, был осуществлен, в местах скопления шахтных вод, а также из

верхних горизонтов руд, расположенных в непосредственной близости от подземных вод по общепринятым методом геохимической экологии и почвенной микробиологии. Исследуемый материал брали с соблюдением правил стерильности в лабораторию с соблюдением холодого режима. Все применяемые методы и интерпретация всех полученных результатов соответствуют разработанным инструкциям и рекомендациям, утвержденным Министерством экологии Республики Казахстан.

3.3. Теоретическое значение работы (новая теория или обогащение существующей научной теории, или концепции):

Совокупность полученных результатов данной диссертации имеют немаловажное значение для обогащения новыми знаниями таких наук, как биогеохимия, синэкология микроорганизмов, экология микроорганизмов, биохимическая технология, биотехнология микроорганизмов и др.

3.4 Соответствие квалификационному признаку

Данная диссертация соответствует квалификационным признакам, так как в исследовании имеется научная новизна, наличие единой идеи; целостность исследования; логичность изложения; завершенность и композиционность, оформление в соответствии с требованиями НАК ПКР.

4. Практическая значимость полученных результатов (в гидрометаллургии с целью интенсификации процессов выщелачивания металлов из руд и продуктов их обогащения, Казахстан и другие страны мира, где занимаются разработкой месторождений и добычей цветных металлов и минералов).

Данные, полученные при изучении геохимической деятельности микроорганизмов рудных месторождений, имеют значение для практики выщелачивания цветных металлов. Эти микроорганизмы перспективны как биоэкологический и биотехнологический объект для использования в гидрометаллургии с целью интенсификации процессов выщелачивания металлов из руд и продуктов их обогащения.

Исследования по изучению и выявлению различных способов повышения активности железоокисляющих бактерий, которые имеют важное практическое значение, так как позволяют длительное время поддерживать культуры в активном состоянии в техногенных экосистемах, что отвечает требованиям эко-технологического процесса, основанного на деятельности этих микроорганизмов.

Материалы диссертационной работы внедрены и используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий на кафедрах химии и биологии естественно-технического факультета Жетысуского государственного университета им. И.Жансугурова по курсам: «Основы микробиологических исследований».

Реализация (внедрение) материалов диссертации Бекебаевой Мадины Омирхановна позволит:

- Предложить рекомендацию по внедрению бактериально-химического способа выщелачивания золотосодержащих руд в качестве эталона обычно применяются производственные технологические процессы, в которых нашли применение результаты научно-исследовательской работы.
- «Разработать биохимической технологии извлечения благородных металлов из упорных руд казахстанских месторождений с использованием активных ассоциаций хемолитотрофных бактерий.

5. Соответствие автореферата содержанию диссертации

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, поставленной в ней цели и задачам исследования.

6. Замечания:

1. В диссертационной работе имеются стилистические неточности и грамматические ошибки, что нуждается в коррекции.
2. При внимательном изучении диссертационной работы возникли следующие вопросы:
Некоторые таблицы необходимо представить в более эффектно формате, чтобы усилить значимость полученных данных, а некоторые из них можно было бы представить в виде диаграмм.

7. Предложения:

- в качестве ведущей организации кафедру биологии Южно-Казахстанского государственного университета им. М. О. Ауэзова.

- первым официальным оппонентом: доктора биологических наук, доцента **Алымкулову Анару Абдыкуловну** (специальность по автореферату 03.02.08 – экология), которая имеет труды, близкие к проблеме исследования:

1. Эген кызы О., Алымкулова А. А., Эргешбаев М. Б. К изучению амфибий в Алайской долине на юге Кыргызской Республики. Вестник филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный социальный университет» в г. Ош Киргизской Республики. 2023. № 1 (27). С. 267-274.

2. Эргешбаев М. Б., Алымкулова А. А. Современные представления о госпитальности природных очагов чумы в Кыргызской Республике. Вестник филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный социальный университет» в г. Ош Киргизской Республики. 2023. № 2 (28). С. 195-201.

Атабеков У. А., Сарымсакова А. Т., Кудайберди к. З., Алымкулова А. А.
3. Түштүк Кыргызстандагы чычкан сымал кемирүүчүлөрдүн зоогеографиялык мүнөздөмөсү. Исследование живой природы Кыргызстана. 2023. № 2. С. 131-134.

- вторым официальным оппонентом: кандидата биологических наук **Бержанову Рамзу Жаинабековну** (специальность по автореферату - 03.02.03 - микробиология), которая имеет труды, близкие к проблеме исследования:

1. Yessentayeva K., Reinhard A., Berzhanova R., Mukasheva T., Urich T., Mikolasch A. Bacterial crude oil and polyaromatic hydrocarbon degraders from Kazakh oil fields as barley growth support. Applied Microbiology and Biotechnology. 2024. Т. 108. № 1. С. 189.

2. Yesentaeva K., Zhunizhan A., Berzhanova R., Mikolash A., Mukasheva T. Screening of bioemulsifier-producing drugs to exclude mucus-forming and hydrocarbon destructors. BIO Web of Conferences. 2024. Т. 100. С. 02011.

3. Nurzhanova A., Muratova A., Berzhanova R., Pidlisnyuk V., Nurmagambetova A., Mamirova A. Rhizosphere microorganisms: increasing phytotechnology productivity and efficiency – a review. Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан. 2022. Т. 3. № 343. С. 34-58.

8. Заключение:

Все вышеизложенное позволяет сделать заключение, что диссертационная работа **Бекебаевой Мадины Омирхановны «Микробоценозы золотоносных месторождений Казахстана и повышение эффективности технологии выщелачивания руд микробиологическим методом»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология и 03.02.03 – микробиология выполненная под руководством д.б.н., профессора, член-корр НАНКР **Дженбаева Б.М.** и д.б.н., профессора **Канаева А.Т.** является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости,

достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа соответствует требованиям п. Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением НАК ПКР.

9. Эксперт диссертационного совета, рассмотрев представленные документы, рекомендует диссертационному совету Д 03.24.693 при Институте биологии Национальной академии наук Кыргызской Республики и соучредителе Исык-кульском государственном университете им. К. Тыныстанова принять к защите диссертацию **Бекебаевой Мадины Омирхановны** на тему: «**Микробоценозы золотоносных месторождений Казахстана и повышение эффективности технологии выщелачивания руд микробиологическим методом**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности по специальностям 03.02.08 – экология и 03.02.03 – микробиология .

Эксперт диссертационного совета,
д.б.н., профессор

Т.Д. Доолоткелдиева

Подпись эксперта диссертационного совета заверяю
Ученый секретарь
диссертационного совета Д 03.24.693
кандидат биологических наук
23.02.25 г.



К. Д. Бавланкулова