Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی

زمستان 1388 ،دوره یکم، شماره سوم، صفحه 47 - 41

تولید کلونی از باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* بومی ایران در نوعی محیط کشت جامد اصلاح شده و بررسی قابلیت آن در بیولیچینگ مس

مریم کارخانه[*1]، **سارا محسنی**[1]، **شایسته سپهر**[1]، **سامان حسینخانی**[2]، **عبد الرزاق مرزبان**[3]، **علی عظیمی**[4]

1- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)

2- گروه بیوشیمی ، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

3- گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

4- شرکت ملی صنایع مس ایران

* نویسنده مسؤول: دکتر مریم کارخانه، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)،
maryam_karkhane@yahoo.com

دریافت: 88/11/13 پذیرش: 88/12/19

چکیده

زمینه و هدف: *Acidithiobacillus ferrooxidans* از مهمترین باکتری های دخیل در بیولیچینگ و استحصال فلزات از کانسنگ های آنها می باشد. خالص سازی میکروارگانیسم ها به طور معمول بروی محیط های کشت جامد و با تولید کلونی تک صورت می گیرد. باکتری *At. ferrooxidans* بروی محیط های کشت جامد معمولی غیر قابل کشت است. با توجه به کند رشد بودن این باکتری و اهمیت اقتصادی آن، انتخاب محیط هایی که برای کشت و خالص سازی آن استفاده می شود بسیار حائز اهمیت است.

روش بررسی: در این مطالعه برای خالص سازی *At. ferrooxidans* بومی ایران، از معدن مس سرچشمه نمونه گیری انجام شد و از محیط های کشت مایع و جامد سنتزی برای کشت و خالص سازی آن استفاده شد. بعد از خالص سازی این باکتری توسط کلونی تک، DNA متعلق به این سویه از *At. ferrooxidans* استخراج و ژن 16SrDNA موجود در آن توسط PCR بررسی گردید. محصول PCR تعیین توالی شد.

یافته ها: محیط های کشت مایع حاوی سولفات آهن هفت آبه و محیط کشت جامد 9k اصلاح شده، به ترتیب بهترین محیط های کشت مایع و جامد برای کشت و خالص سازی این سویه از باکتری بودند. بررسی فیلوژنتیکی این باکتری با استفاده از تعیین توالی ژن 16SrDNA و مقایسه آن با میکروارگانیسم های موجود در بانک ژنی ، شباهت این سویه خالص شده را به *At. ferrooxidans* نشان داد، که شناسایی نسبی این باکتری توسط روش های کلاسیک و تست های بیوشیمیایی را تائید کرد.

نتیجه گیری: باکتری *At. ferrooxidans* در حضور آهن به عنوان منبع انرژی، رشد بیشتری نسبت به سولفور از خود نشان می دهد. علاوه بر آن، این باکتری بروی محیط های کشت جامد 9k اصلاح شده تولید کلونی های قابل شمارش و زیادی می کند که برای خالص سازی این باکتری گامی اساسی است. نتایج این مطالعه نشان می دهد که باکتری *At. ferrooxidans* بروی محیط های کشت جامد حاوی آگارز و آگار شسته شده بهتر از محیط های جامد حاوی آگار رشد می کند.

واژه های کلیدی: بیولیچینگ، *At. ferrooxidans*، 9k اصلاح شده

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در طبیعت محیط هایی وجود دارند که به شدت اسیدی هستند. این محیط ها جمعیت باکتریایی خاص خود را دارند. گاهی این شرایط اسیدی به کمک فعالیت های انسانی می آید تا بتواند از محیط خود بهتر استفاده کند. بیولیچینگ از جمله این فرایند ها می باشد که در آن تبدیل فلزات در شکل نامحلول به شکل محلول به وسیله اکسیداسیون بیولوژیکی توسط میکروارگانیسم ها انجام می گیرد (1). بیواکسیداسیون سنگ های سولفیدی برای استحصال مس در کشورهای اسپانیا، سودان، آلمان، چین و دیگر مناطق مورد بهره برداری قرار گرفته است (2). از آن جایی که به کار گیری روش های معمولی استخراج فلزات در مورد کانسنگ های کم عیار، اقتصادی و مقرون به صرفه نیست، استفاده از روش های جایگزین دیگر مانند بیولیچینگ ضروری تلقی می گردد (3). فلزاتی که بیولیچینگ در استخراج آنها استفاده می شوند متعدد هستند که از جمله طلا، مس، نقره، اورانیوم، روی، کبالت و نیکل را می توان نام برد. با در نظر گرفتن اینکه میکروارگانیسم ها در این پروسه نقش دارند، بیولیچینگ مضرات کمتری را برای محیط زیست در بر دارد، انرژی کمتری مصرف کرده و در استخراج فلز از سنگ های کم عیار به صرفه تر از روش شیمیایی معمولی است (1). در این پروسه میکروارگانیسم های مختلفی دخیل هستند که در سه بازه دمایی به فعالیت می پردازند: مزوفیل ها که به طور معمول باکتری های گرم منفی مانند ***Acidithiobacillus ferrooxidans*** و ***Leptospirillum ferrooxidans*** را شامل می شوند، ترموفیل های میانه که اغلب باکتری های گرم مثبت و تشکیل دهنده اسپور را شامل می شود و ترموفیل های شدید که شامل آرکی ها، *اسیدیانوس* ها و سویه های *سولفولوبوس* می باشد (4). لیچینگ فلزات معدنی به عنوان پروسه ای است که در آن پروتون ها و یون های فریک مسئول واکنش لیچینگ هستند. نقش میکروارگانیسم ها تولید مواد شیمیایی مورد نیاز لیچینگ و تولید فضایی است که واکنش لیچینگ در آن اتفاق می افتد. میکروارگانیسم ها یک لایه اگزوپلی ساکاریدی تشکیل می دهند. این لایه اگزوپلی ساکاریدی به عنوان محیط واکنش تلقی می شود و در مقایسه با توده محلول، واکنش اکسیداسیون زیستی با سرعت و بازدهی بیشتری در آن انجام می شود. به طور کلی دو نوع مکانیسم لیچینگ وجود دارد، مکانیسم تیوسولفات که برای اکسیداسیون سولفیدهای فلزی غیر محلول اسیدی مثل پیریت پیشنهاد می شود و مکانیسم پلی سولفید که برای سولفیدهای فلزی اسیدی محلول مثل کالکوپیریت پیشنهاد می شود. در مکانیسم تیوسولفات، حل شدن از طریق حمله یون فریک روی سولفید فلزی غیر محلول است که تیوسولفات مهمترین و عمده ترین حد واسط و سولفات محصول نهایی عمده است. با استفاده از پیریت به عنوان یک مثال می توان واکنش لیچینگ با مکانیسم تیوسولفات را به صورت زیر نمایش داد.

$$FeS_2 + 6Fe^{+3} + 3H_2O \longrightarrow S_2O_3^{-2} + 7Fe^{+2} + 6H^+$$

$$S_2O_3^{-2} + 8\,Fe^{+3} + 5H_2O \longrightarrow 2\,SO_4^{-2} + 8Fe^{+3} + 10H^+$$

در مکانیسم پلی سولفید، حل شدن سولفید فلزی محلول در اسید از طریق حمله یون فریک و پروتون ها است که سولفور عنصری به عنوان محصول حدواسط عمده است. این سولفور عنصری پایدار است اما می تواند به سولفات توسط میکروارگانیسم های اکسید کننده سولفور اکسید شود که واکنش 5 از زیر نشاندهنده این تبدیل است.

$$MS + Fe^{+3} + H^+ \longrightarrow M^+ + 0.5H_2S_n + Fe^{+2}\ (n \geq 2)$$

$$0.5\,H_2S_n + Fe^{+3} \longrightarrow 0.125\,S_8 + Fe^{+2} + H^+$$

$$0.125\,S_8 + 1.5\,O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{microbes}} SO_4^{-2} + 2H^+$$

آهن فروس تولید شده توسط واکنش 1 به 4 می تواند دوباره توسط میکروارگانیسم هایی مثل ***At. ferrooxidans*** یا دیگر میکروارگانیسم ها دوباره به یون فریک اکسید شود.

$$2Fe^{+2} + 0.5O_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{microbes}} 2Fe^{+3} + H_2O$$

نقش میکروارگانیسم ها در حل شدن سولفیدهای فلزی این است که اسید سولفوریک را برای حمله پروتونی فراهم آورده و آهن را در حالت فریک برای اکسیداسیون مواد معدنی نگه می دارد (1). از میان میکروارگانیسم های دخیل در فرایند بیولیچینگ، ***At. ferrooxidans*** مهمترین میکروارگانیسم است که باکتری گرم منفی، میله ای شکل، هوازی، کمولیتوتروف اجباری، به شدت اسیدوفیل و کند رشد است (1و 5 و 6). به طور کلی محیط های خالص سازی میکروارگانیسم ها جهت استفاده از آنها جهت کاربرد های زیست فناوری ضروری است. خالص سازی میکروارگانیسم ها به طور معمول با جداسازی آنها توسط کلونی تک امکان پذیر

www.SID.ir

Archive of SID

است (7). پرورش اسیدوفیل ها در محیط های کشت مایع به ندرت مشکل به نظر می رسد اما گزارشات زیادی مبنی بر مشکلات رشد ایزوله ها بر روی محیط کشت جامد وجود دارد (8). در این مطالعه، محیط های مایع و جامد مختلفی برای خالص سازی *At. ferrooxidans* و تولید کلونی تک از آن مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور نمونه گیری از محلول زیر هیپ (تپه) از معدن مس سرچشمه انجام شدو مطالعات غربالگری و خالص سازی گسترده ای بر روی آن صورت گرفت. در این مطالعه سعی بر این است که برخی دلایل شکست و عدم رشد و تولید کلونی بروی محیط کشت جامد توسط باکتری های کمولیتوتروف اجباری بیان شود. بدیهی است که محیط های کشت معرفی شده می تواند راهگشایی برای پژوهشگرانی باشد که برروی این باکتری و در زمینه بیولیچینگ مشغول به فعالیت هستند. قابل ذکر است که این مطالعه اولین گزارش از جداسازی باکتری *At. ferrooxidans* بومی ایران برروی محیط کشت جامد و تولید کلونی تک از آن است.

روش بررسی

گرد آوری نمونه: نمونه گیری از محلول زیر هیپ یا PLS (Pregnant leaching solution) از معدن مس سرچشمه واقع در کرمان به منظور جداسازی باکتری *At. ferrooxidans* بومی ایران انجام شد. قابل ذکر است که محلول زیر هیپ، سبز رنگ و دارای pH به شدت اسیدی و زیر یک است.

محیط های مایع و جامد مورد استفاده: در ابتدا به میزان 10٪ (v/v) از محلول زیر هیپ در ارلن مایر های 250ml حاوی 90ml محیط کشت تلقیح صورت گرفت. محیط های تلقیح شده در شیکر انکوباتور با دور 150rpm و دمای 30 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در این مطالعه محیط های کشت مختلفی مورد استفاده قرار گرفت که به شرح هر کدام از آنها در جدول 1 پرداخته می شود. pH این محیط های 9k (9)، TK (۱۰)، تیوسولفات سدیم (11) و سولفور با اسید سولفوریک 10 نرمال روی 2/5 (12)، 1/8، 3 (13) و 2/5 به ترتیب تنظیم شد. منبع انرژی این محیط های کشت مایع یا سولفات آهن هفت آبه و یا مواد مشتق گوگردی است که محلول اسیدی حاوی این منابع انرژی توسط فیلتر 0/45 میکرون به بقیه نمک های استریل شده اضافه می شود. گوگرد عنصری نیز به مدت نیم ساعت در فور با دمای 120 درجه سانتیگراد استریل می شود. بعد از کشت های مکرر در محیط های کشت مایع به منظور غربالگیری اولیه، از این محیط ها برروی محیط های کشت جامد مختلف در سریال رقت های مختلف، تلقیح هم به صورت خطی و هم به صورت چمنی صورت گرفت. محیط های کشت جامد مورد استفاده شامل 9k- آگار حاوی نمک های محیط کشت 9k و 3g آگار، TK- آگار حاوی نمک های پایه محیط TK و 3g آگار و تیوسولفات سدیم- آگار حاوی نمک های پایه محیط تیوسولفات سدیم و 3g آگار، Washed Agarose Yeast Extract یا WAYE (8) که شامل دو محلول A و B است (محلول A حاوی 0/2g عصاره مخمر و 100 میلی لیتر نمک های پایه محیط 9k است که حجم آن با آب مقطر به ۷۵۰ml رسانده می شود، محلول B دارای حجم کلی 250ml است که حاوی 7g آگارز شسته شده با آب مقطر می باشد. در نهایت بعد از استریل کردن جداگانه این محلول ها 5ml محلول سولفات آهن هفت آبه 500mM با pH:2 به محیط کشت اضافه می گردد)، 9k- آگار شسته شده (شامل نمک های محیط 9k می باشد، علاوه بر آن 8g آگار این محیط سه بار در آب مقطر استریل و هر بار به مدت 10 دقیقه شستشو داده می شود و به صورت محلولی جداگانه از نمک های پایه اتوکلاو می گردد.)،FeTSB (شامل محیط TSB، 12g سولفات آهن هفت آبه و 4/5 آگارز می باشد)، 9k اصلاح شده (7) شامل سه محلول جداگانه A، B و C می باشد، (محلول A حاوی ۷۰ml نمک های پایه محیط 9k با غلظت 10 برابر می باشد که با آب مقطر حجم آن به 600ml رسانده می شود، محلول B حاوی 22g سولفات آهن هفت آبه با حجم نهایی 150ml می باشد، محلول C حاوی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- محیط های کشت مایع مورد استفاده و اجزای تشکیل دهنده آن

نمک های محیط کشت (g/l)	محیط کشت 9k	محیط کشت TK	محیط کشت تیوسولفات سدیم	محیط کشت سولفور
$(NH_4)_2SO_4$	3	0/4	0/4	-
$MgSO_4.7H_2O$	0/5	0/4	0/5	0/25
K_2HPO_4	0/5	0/1	3	0/25
KCl	0/1	-	-	-
$Ca(NO_3)_2$	0/01	-	-	0/01
$FeSo_4.7H_2O$	44/25	24/6	0/01	-
$Na_2S_2O_3$	-	-	5	-
$CaCl_2$	-	-	0/25	-
Elemental sulfur	-	-	-	10
آب مقطر	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

6g آگارز در حجم نهایی 250ml می باشد) می باشند. pH این محیط ها با اسید سولفوریک 10 نرمال روی 2 تنظیم شد(جدول1).

استخراج DNA: کلونی های تک تولید شده بروی محیط ۹k اصلاح شده و دیگر محیط ها در محیط های کشت مایع ۹k و TK تلقیح شد و جهت لیز باکتری ها از این محیط ها استفاده شد. مقداری از مایع رویی این محیط ها به چند لوله آزمایش منتقل و با دور بالا سانتریفوژ شد. بعد از آهن زدایی باکتری ها با EDTA 1٪ و شستشو با آب مقطر برای از بین رفتن EDTA، به رسوب، ۱ml محلول.set buffer (سوکروز 20٪، EDTA 50mM، Tris HCl 50mM، pH: 4/7) اضافه شد. بعد از 20 دقیقه قرار دادن روی یخ، 35 میکرولیتر لیزوزیم 5mg/ml اضافه شد. بعد از ورتکس و 30 دقیقه قرار دادن مجدد، 9 میکرولیتر محلول SDS 25٪ اضافه نموده و نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می شود. بعد از اضافه کردن 50 میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۱mg/ml و یک ساعت انکوبه شدن در دمای اتاق، 0/5ml استات آمونیوم 7/5M اضافه می شود. نمونه ها به مدت 5 دقیقه با دور 12000rpm در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفوژ می شوند. مایع رویی جدا شده و دو برابر حجم آن، ایزوپروپانل سرد به آن اضافه می شود. نمونه ها به مدت 30 دقیقه در فریزر 20- درجه سانتیگراد گذاشته می شود و بعد با شرایط بالا سانتریفوژ می شوند. رسوب DNA حاصل روی ژل آگارز 1٪ برای بررسی کیفیت آن الکتروفورز می شود.

واکنش PCR: ژن های ناحیه 16SrDNA توسط دستگاه PCR به کمک دو پرایمر جلویی G_1- F و عقبی L_1- R (14) تکثیر شد.

G_1- F (5′- GAAGTCGTAACAAGG- 3′)

L_1- R (5′- CAAGGCATCCACCGT- 3′)

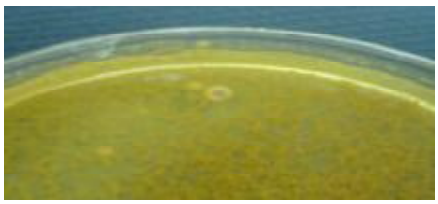
هر واکنش PCR شامل 1 میکرولیتر الگو، 5 میکرولیتر X10PCR Buffer، 1 میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای جلویی و عقبی 10mM، 1/2 میکرولیتر از $MgCl_2$50mM، 1 میکرولیتر از dNTP0/4mM و 0/2 میکرولیتر از Taq DNA Polymerase 1/۲۵u/µl در حجم نهایی 50 میکرولیتر می باشد. پروتکل دمایی به صورت دناتوراسیون در دمای 94 درجه به مدت 45 ثانیه، دمای چسبیدن 58 درجه به مدت 60 ثانیه و در نهایت پلیمریزاسیون در دمای 72 درجه و به تعداد 35 سیکل انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز 1٪ حاوی اتیدیم بروماید (سیناژن) و بافر TAE1X الکتروفورز گردید. محصول PCR توسط شرکت ژن فن آوران (Microgen, korea) تعیین توالی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

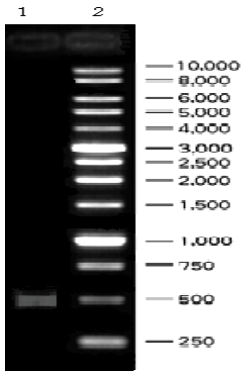
یافته ها

بعد از حدود 14 روز بر روی محیط های کشت جامد کلونی هایی مشاهده شد (جدول 2). با توجه به نتایج به دست آمده محیط کشت 9k اصلاح شده تولید کلونی های قابل شمارش و زیادی می کند که این محیط کشت جامد را به صورت یک محیط کشت بهینه برای این باکتری قرار می دهد. کلونی های ایجاد شده در این محیط دارای مرکزی قهوه ای با هاله ای زرد رنگ هستند و قطر کلونی ها از یک تا سه میلیمتر متغیر است (شکل 1).



شکل 1- کلونی تک ایجاد شده بروی محیط کشت جامد 9k اصلاح شده

این نتایج تائید می کند که باکتری *At. ferrooxidans* برروی محیط های کشت حاوی آگارز بهتر از محیط های کشت حاوی آگار رشد می کند(شکل1 و جدول2). نتایج استخراج DNA و PCR ژن 16SrDNA و بررسی آن با میکروارگانیسم های موجود در بانک ژنی، مشخص کرد که این سویه، *Acidithiobacillus ferrooxidans* بوده که ژن 16SrDNA دارای شباهت 100٪ به ژن 16SrDNA باکتری *At. ferrooxidans* سویه ATCC 23270 می باشد. الکتروفورز محصول PCR ژن 16SrDNA بروی ژل آگارز در شکل 2 مشاهده می گردد.



شکل 2- الکتروفورز روی ژل آگارز. ستون 1: محصول PCR. ستون 2: مارکر وزنی DNA.

جدول 2- ویژگی های کلونی های ایجاد شده بروی محیط های کشت جامد

مشخصات کلونی	احتمال آلودگی و خشک شدن محیط	قطر کلونی (mm)	تعداد کلونی های ایجاد شده	محیط کشت جامد
کلونی های نا منظم و نارنجی رنگ با مرکزی تیره تر	0/40	1	1 - 3	محیط کشت 9k- آگار
کلونی های نامنظم و نارنجی رنگ با مرکزی تیره تر	0/40	1	1 - 3	محیط کشت TK- آگار
-	0/70	-	0	محیط کشت تیوسولفات- آگار
کلونی های زرد رنگ و نا منظم	0/80	1 - 5	3 - 11	WAYE
کلونی های زرد رنگ و نا منظم	0/40	1 - 3	3 - 10	محیط کشت 9k با آگار شسته شده
کلونی های قهوه ای تیره و دایره ای شکل	0/80	1 - 5	3 - 10	FeTSB
کلونی های با مرکز قهوه ای و هاله ای زرد رنگ	0/40	1 - 3	10 – 110	محیط کشت 9k اصلاح شده

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

باکتری *At. ferrooxidans* روی محیط کشت مایع به خصوص محیط های کشت حاوی آهن به عنوان منبع انرژی به خوبی رشد می کند (15) اما در محیط های کشت جامد معمولی رشد نمی کند یا رشد بسیار کمی دارد (16 و 8). خیلی از فرمول های طراحی شده برای محیط کشت جامد جهت کشت، جداسازی و شمارش *At. ferrooxidans* و دیگر میکروارگانیسم های اسیدوفیل رضایت بخش نبوده است. موفقیت های کم و نتایج غیر قابل تکرار در تلاش برای کشت *At. ferrooxidans* و دیگر میکروارگانیسم های کمولیتوتروف روی محیط کشت جامد می تواند به چند دلیل باشد (7 و 8). چون هم *At. ferrooxidans* و هم *Leptospirillum ferrooxidans* به راحتی روی محیط های کشت مایع دارای آهن رشد می کنند محتمل به نظر می رسد رشد ضعیف یا عدم رشد آنها روی محیط های کشت جامد به دلیل حضور برخی مواد ممانعت کننده باشد. یکی از فاکتورهای دخیل در این امر، نوع ماده تشکیل دهنده ژل است که می تواند با تجزیه جزئی و ترکیب با برخی فاکتور ها باعث نقص در چرخه غذایی باکتری شود. آگار یک پلی ساراید تشکیل دهنده ژل است که هنگام انکوباسیون محیط های کشت جامد در شرایط اسیدی به طور پیوسته ای به مونوساکاریدها و کربوهیدرات های محلول هیدرولیز می شود که این مواد حاصل از هیدرولیز، بازدارنده رشد باکتری های شیمیولیتوتروف اجباری و آنزیم های اکسید کننده آهن است (8 و 17). شستن آگار قبل از استفاده در محیط کشت باعث کاهش درصد این مواد می گردد. علاوه بر آن در طی آماده سازی محیط های کشت جامد اسیدی لازم است که محلول آگار به صورت جداگانه ای از محلول های اسیدی استریل شود و به محیط کشت در حالیکه داغ نیست و دمای زیر 50 درجه سانتیگراد دارد اضافه شود. میزان کربوهیدرات های محلول در محیط کشت جامد اسیدی با تغییر نوع ماده تشکیل دهنده ژل و با تغییر دمای انکوباسیون تغییر می کند. استفاده از آگارز، سیلیکاژل و ژلریت در این محیط ها در مقایسه با آگار با موفقیت بیشتری همراه بوده است (7 و 8). آگارز یک مشتق از آگار می باشد که در این پژوهش به همراه غلظت بهینه ای از مواد پایه نمکی باعث شد تولید کلونی در محیط 9k اصلاح شده بعد از 14 روز (18) قابل توجه باشد. تهیه سریال رقت، تولید کلونی های مورد نظر بیشتری را حاصل می کند. تهیه سریال رقت از محیط های غنی سازی می تواند با حذف میکروارگانیسم های دیگر، باعث تولید کلونی های بیشتری از میکروارگانیسم های غالب آن محیط شود(15). بررسی حاصل از این پژوهش، علاوه بر اینکه نتایج حاصل از گزارشات داس و همکارانش در سال 1989 و جانسون در سال 1995 را تائید می کند، تاثیر استفاده از آگارز در محیط کشت جامد در ایجاد کلونی تک از باکتری های کمولیتوتروف که توسط لی و همکارانش در سال 2007 انجام شده است را نیز تائید می کند. پژوهش انجام شده، اولین گزارش تولید کلونی تک از باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* در ایران بوده با اشاره به اینکه در دنیا نیز گزارشات کمی در این زمینه انجام شده است (7، 8 و 18). تولید کلونی برای این باکتری مهم اقتصادی می تواند باعث موفقیت های چشم گیر در زمینه زیست فناوری بیولیچینگ باشد.

نتیجه گیری

باکتری *At. ferrooxidans* جداشده بومی ایران روی محیط های کشت مایع به خوبی رشد می کند. این باکتری بروی محیط های کشت جامد حاوی آگارز و آگار شسته شده بهتر از محیط های کشت جامد حاوی آگار رشد می کند. علت این امر می تواند به دلیل وجود ناخالصی های احتمالی مانند مونوساکارید ها و الیگوساکاریدها در آگار باشد که این مواد بازدارنده آنزیم های اکسید کننده آهن می باشد. همچنین انکوبه کردن این محیط های دارای pH اسیدی در دماهای مناسب رشد باکتری باعث هیدرولیز شدن آگار می گردد که درصد این مواد بازدارنده را افزایش می دهد. علاوه بر آن تهیه سریال رقت از محیط های کشت مایع در جداسازی باکتری به صورت کلونی تک در روی محیط کشت جامد کمک کننده بوده و نتایج خوبی در رقت 10^{-2} حاصل شده است. کلونی های باکتری *At. ferrooxidans* جدا شده بروی محیط های کشت حاوی آگارز دارای مرکزی قهوه ای و هاله ای زرد رنگ می باشند .

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدر دانی

مطالعه انجام شده، قسمتی از طرح پژوهشی مصوب شرکت صنایع ملی مس ایران می باشد و از لحاظ مالی توسط این شرکت حمایت شده است.

References

1- Rawlings DE. *Characteristics and adaptability of iron- and sulfur- oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates*. Microbiology cell factories. 2005; 4:13.

2- Olsen GJ, Brierley JA, Brierly CL. *Bioleaching review part B: progress in bioleaching application of microbial processes by the minerals industries*. Appl Microbiol Biotechnol. 2003; 63: 249 – 257.

3- Manafi Z, Bageri SA, Oliazadeh M, Watling H, Yaghobi Moghaddam M. *Column bioleaching of fine particle size fraction of Sarcheshmeh low grade ore*. Journal of microbial biotechnology. 2009; 1 (1): 41 - 47.

4- Peng H, Yang Y, Li X, Qiu G, Liu X, Huang J, Hu Y. *Structure analysis of 16SrDNA sequences from strains of Acidithiobacillus ferrooxidans. Biochemistry and molecular biology*. 2006; 2(39): 178 - 182.

5- E Scobar B, Bustos K, Morales G, Salazar O. *Rapid and specific detection of Acidithiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferrooxidans by PCR*. Hydrometallurgy. 2008; 92: 102 - 106.

6- Wakai S, Yamamoto K, Kanao T, Sugio T, Kamimura K. *Discrimination a mong the three Acidithiobacillus species, A. ferrooxidans, A. thiooxidans and A. caldus, based on restriction fragment length polymorphism analysis of the 16s- 23s rDNA intergenic spacer region*. Scientific reports of the faculty of agriculture. 2006; 95: 7 - 11.

7- Das A, Bhattacharyya S, Banerjee PC. *Purification of Thiobacillus ferrooxidans cultures by single colony isolation and influences of agarose on the colony morphology*. Journal of microbiological methods. 1989; 10: 281 - 287.

8- Johnson DB. *Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. Journal of microbiological methods*. 1995; 23: 205 - 218.

9- Sandstorm A, Shchukareu A, Paul J. *Xps characterization of chalcopyrite chemically and bio-leached at high and low redox potential*. Minerals engineering, 2005; 505 - 515.

10- Nemati M, Harrison STL, Hansford GS, Webb C. *Biological oxidation of ferrous sulphate by Thiobacillus ferrooxidans: a review on the kinetic aspects*. Biochemical engineering journal. 1998; 1: 171 - 190.

11- Petri R, Podgorsek L, F. Imhoff J. *Phylogeny and distribution of the sox B gene among thiosulfate–oxidizing bacteria*. FEMS microbiology letters. 2001; 197: 171 - 178.

12- Braddock JF, Luong Hu, Brown EJ. *Growth kinitics of Thiobacillus ferrooxidans isolated from arsenic mine drainage*. Applied and environmental microbiology. 1984; 1: 48 - 55.

13- Yang Y, Qian L, Shi W, Peng H, Qiu G. *Isolation and characterization of aciophilic bacterium from Gaofang mine in China*. Transactions of nonferrous metals society of China. 2008; 18: 1253 – 1257.

14- Raheb J, Khoshroo H, Azimi A, Nasernejad B, Sanati MH, Naghdi S, Arabnejad M. *Isolation and characterization of a new Acidithiobacillus ferrooxidans from Aliabad copper mine in Yazd using 16s- 23s spacer gene nucleotide sequencing method*. Journal of science, islamic Republic of Iranian, 2007; 18 (3): 209 - 213.

15- Rawlings DE, Johnson DB. Biomining. Springer-verlag Berlin Heidellberg. 2007; 241 - 245.

16- Sanghamitra M, Kanata R. *Growth and development Thiobacillus ferrooxidans for engineering applications. Thiobacillus ferrooxidans for engineering applications*. 1994; 851 - 869.

17- Johnson DB, Mcginness SA. *A highly effiecient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic iron- oxidizing acidophilic bacteria*. Jounal of microbial Methods. 1991; 13: 113 - 122.

18- Liu J, Xie X, Xiao S, Wang X, Zhao W, Tian Z. *Isolation of Leptospirillum ferriphilium by single-layered solid medium*. J. Cent. South Univ. Technol; 2007; 14: 467 - 473.

www.SID.ir