مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره هفتم، صفحه ۶۱-۵۵

بهینه سازی باکتری *اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس* در دماهای پایین جهت انجام فرآیند بیولیچینگ

سارا محسنی[۱]، مریم کارخانه[۱]، سامان حسینخانی[۲]، شایسته سپهر[۱]، علی عظیمی[۳]

۱- دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی
۳- شرکت ملی صنایع مس ایران

نویسنده مسؤول: سارا محسنی، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی. s_a_2@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۹/۱ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: بیولیچینگ فرآیندی است که در آن به کمک باکتری ها فلزاتی مانند مس، طلا و روی را از سنگ معدن های با عیار پایین استخراج می شود. باکتری های اسیدوفیل و کمولیتوتروف موجود در معادن قادرند فلزات را توسط فرآیند بیولیچینگ از سنگ معدن های سولفیدی استخراج کنند. از جمله باکتری های مهم *اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس* می باشد که در دمای۳۵-۲۵ درجه سانتی گراد در فرآیند بیولیچینگ رشد بهینه دارد و در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی گراد رشد مطلوبی ندارد. هدف از این مطالعه سازگار کردن باکتری در دماهای پایین تر است تا بتوان فرآیند بیولیچینگ را در تمام فصول سال منجمله در فصل های سرد به کار برد.

روش بررسی: باکتری *At.ferrooxidans* از محلول زیر هیپ معدن مس سرچشمه جداسازی و در محیط های TK و 9K در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. سپس جهت سازگار نمودن باکتری در دماهای پایین به تدریج در دماهای ۲۵، ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ٤ درجه سانتیگراد غنی سازی شد. همچنین میزان رشد باکتری و غلظت آهن فریک با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. غلظت مس در دماهای فوق بررسی و ارزیابی قرار گرفت. جهت تایید رشد باکتری در دمای ٤ درجه سانتیگراد، پروتئین های خارج سلولی پس از شش روز با کمک روش بردفورد اندازه گیری شد. DNA باکتری استخراج و ژن ناحیه SrDNA ١٦ به روش PCR تکثیر و تعیین توالی شد.

یافته ها: باکتری *At.ferrooxidans* در دماهای مورد آزمایش رشدی لگاریتمی داشته و این توانایی را دارد تا با اکسایش آهن فرو به آهن فریک، فرآیند بیولیچینگ را انجام و مس (II) را به فرم محلول آزاد کند. با توجه به نتایج مشاهده گردید که باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و پس از گذشت حدود ۱۸ روز بیشترین رشد را داشته و با کاهش دما از میزان رشد آن کاسته می شود. نتایج حاصل از مقایسه میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی سویه برتر با سویه‌های مرتبط نشان داد که باکتری مورد نظر *Acidithiobacillus ferrooxidans* می‌باشد و سویه AL نام‌گذاری شد.

نتیجه‌گیری: باکتری *At.ferrooxidans* قادر است خود را در دماهای پایین سازگار نماید و فرآیند بیولیچینگ را انجام دهد. بنابراین بر طبق نتایج حاصل، فرآیند بیولیچینگ و اکسایش آهن در دماهای پایین امکان پذیر است و می توان فلزات با ارزشی مانند طلا و مس را در شرایط سرمای محیط استخراج نمود.

واژه‌های کلیدی: *At.ferrooxidans*، بیولیچینگ، سازگار کردن، مس

www.SID.ir

مقدمه

با شروع قرن بیست ویکم فرآیند بیولیچینگ جایگاه مهمی در میان تکنولوژی‌های رایج در معدن را به خود اختصاص داده است. بیولیچینگ به‌عنوان تسریع در یک فرآیند محیطی تلقی می‌شود که در آن به‌کمک میکروارگانیسم‌ها، سولفیدهای معدنی اکسید شده و فلزات با ارزشی مانند نیکل، مس، طلا وکبالت استخراج می‌شوند. فناوری بیولیچینگ به‌دلیل سادگی و نیاز کم‌تر به سرمایه‌گذاری مالی، روشی مناسب جهت استخراج فلزات در کشورهای در حال توسعه تلقی می‌شود. توسعه این روش در دنیا به‌حدی بوده‌است که امروزه در امریکا بیش از ۲۰٪ درصد مس استخراج شده به روش میکروبی می‌باشد. در بسیاری از کشورهای دیگر از جمله شیلی، استرالیا، آفریقای جنوبی، کانادا، چین، پرو و دیگر مناطق از این فرآیند برای بازیابی فلزات اصلی و گران‌بها استفاده می‌شود (۱).

At.ferrooxidans از جمله باکتریهایی است که در این فرآیند دخالت دارد و این توانایی را دارد که یونهای آهن فروس را در محلول مورد نظر اکسید و ترکیبات گوگردی را احیا کند (۲و۳). این باکتری در گروه باکتریهای مزوفیل قرار دارد و دارای رشدی بهینه در بازه دمایی ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتی گراد می باشد. اما قادر است خود را در یک بازه دمایی وسیع آداپته کند و فرآیند بیولیچینگ را انجام دهد (۴). یکی از انواع روشهای بیولیچینگ، هیپ بیولیچنگ می باشد که در آن مواد معدنی سولفیدی خرد و انباشته شده و در یک توده مهندسی شده قرار گرفته، سپس محلول اسیدی لیچینگ از بالای هیپ برروی آن اسپری شده و از ناحیه زیر هیپ هوادهی می‌شود. باکتریهای اکسیدکننده آهن و گوگرد که در محلول اسیدی لیچینگ وجود دارند، مواد معدنی خرد شده را کاتالیز می کنند. سپس فلز استخراج شده به صورت محلول در پایین هیپ جمع آوری می‌شود. استفاده از هیپ بیولیچینگ جهت بازیافت فلزات از مواد معدنی کم عیار، روشی ارزان و اقتصادی محسوب می‌شود. اما در محیط های سرد مانند ارتفاعات و فصول سرد سال، دمای پایین یک عامل محدودکننده به شمار می‌آید (۵). بنابراین استفاده از باکتریهای سازگار شده در شرایط سرما جهت استخراج فلرات، اقتصادی است. هدف از این مطالعه، جدا سازی باکتریهای *At.ferrooxidans* از محلول زیر هیپ به تدریج در دماهای ۲۵، ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد و غنی‌سازی و سازگاری آنها می باشد.

روش بررسی

گردآوری نمونه و شرایط رشد: باکتری بومی *At.ferrooxidans* از محلول زیر هیپ معدن مس سرچشمه کرمان در سال ۱۳۸۷ جداسازی شد. معدن مس سرچشمه در ۱۶۰ کیلومتری جنوب غربی کرمان قرار دارد و یکی از مراکز بزرگ تولیدکننده مس ایران می باشد. نمونه ها در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشتهای TK $(NH_4)_2SO_4$ ،K_2HPO_4 ،$MgSO_4.7H_2O$ از هر کدام به میزان ۰/۴ گرم بر لیتر و $FeSO_4.7H_2O$ به میزان۳۳/۴ گرم بر لیتر،pH=1.8 و 9K (هر لیتر حاوی ۳ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۱ گرم KCl، ۰/۵ گرم K_2HPO_4، ۰/۵ گرم $MgSO4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم $Ca(NO_3)_2$ و ۴۴/۸ گرم $FeSO_4.7H_2O$،pH=2.2) با تلقیح ۱۰٪ کشت و در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰rpm به مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری شدند. سولفات آهن (II) به جهت اکسید شدن توسط حرارت توسط فیلتر استریل و به محیط ها اضافه گردید. در واقع این کار بدین منظور انجام شد تا به باکتریها فرصت داده شود از نظر تعداد بر سایر باکتریهای موجود در محلول زیر هیپ برتری یابند. لازم به ذکر است که محیط کشت TK به محیط کشت Tuvinen و Kelly اطلاق می‌شود(۶-۸).

بهینه سازی و سازگار پذیری باکتری *At.ferrooxidans* به درجه حرات های پایین: باکتری *At.ferrooxidans* ابتدا در محیط کشتهای TK و 9K در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰ rpm غنی سازی شد. سپس به میزان ۵×۱۰^{۷} سلول بر میلی لیتر در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت TK تلقیح و در شیکر انکوباتورهای ۲۵، ۲۲ و ۱۸ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰ rpm انکوبه شد. جهت بهینه سازی در دماهای ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد، پس از دوبار تجدید کشت در محیط کشت TK، باکتریها در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت 9K تلقیح و در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ rpm قرار داده شدند(۵). جهت اطمینان از زنده بودن باکتری ها در دماهای فوق، میزان رشد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. همچنین به منظور بررسی اکسایش آهن فرو (II)، غلظت آهن فریک پس از ۵ روز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج

Archive of SID
www.SID.ir

۳۰۰ نانومتر به کمک منحنی استاندارد سنجش شد (۹). جهت بررسی انجام فرآیند بیولیچینگ، به میزان ۱ گرم مس (I) در انتهای فاز رشد لگاریتمی به محیط کشتها اضافه گردید. سپس غلظت مس (II) توسط پروتکل مس و معرف Neocuprion اندازه گیری شد. در این روش به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی مس حدود ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۵ میلی لیتر اسید نیتریک اضافه و تا تشکیل محلول بی رنگ جوشانده شد. سپس ۵۰ میلی لیتر از محلول مورد نظر به یک قیف جداکننده ۱۲۵ میلی لیتر منتقل شد. ۵ میلی لیتر محلول هیدروکسیل آمین هیدروکلراید اضافه و pH محلول توسط سود بر روی ۴ تنظیم گردید. به میزان ۱۰ میلی لیتر معرف Neocuprion و ۱۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شدند. محلول کلروفرم حاوی کمپلکس مس و معرف Neocuprion می باشد. پس از تشکیل دو لایه جداکننده، محلول پایینی حاوی کلروفرم به داخل بشر ۲۵ میلی لیتر منتقل و توسط متیل الکل رقیق گردید. سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۷ نانومتر اندازه گیری و میزان غلظت مس توسط منحنی استاندارد مس تعیین شد (۱۰).

استخراج DNA: جهت استخراج DNA و تکثیر توسط PCR، ابتدا باکتریها در محیط کشت TK کشت داده شدند و پس از رسیدن به تعداد ۲×۱۰^{۹} سلول در میلی لیتر، توسط دستگاه سانتریفوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. سپس به منظور آهن زدایی باکتریها، دو بار با محلول EDTA ۱٪ شسته شدند. به رسوب حاصل به مقدار ۱ میلی لیتر محلول set buffer (سوکروز ۲۰٪، ۵۰mM EDTA، Tris HCl ۵۰ mM ، pH: ۷/۴) اضافه گردید. بعد از ۲۰ دقیقه قرار دادن روی یخ، ۳۵ میکرولیتر لیزوزیم ۵ mg/ml اضافه شد و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه برروی یخ قرار گرفتند. در مرحله بعد، ۹ میکرولیتر SDS اضافه و در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۱ mg/ml و یک ساعت سازگار شدن در دمای اتاق، ۵۰ میلی لیتر استات آمونیم ۵/۷ M اضافه می‌شود. نمونه ها با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و در اتانول سرد مطلق در دمای ۲۰- به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته شدند. بعد از سانتریفوژ، رسوب DNA حاصل روی ژل آگارز ۱٪ برای بررسی کیفیت آن الکتروفورز گردید (۱۱).

واکنش PCR: ژن‌های ناحیه 16SrRNA توسط دستگاه PCR با استفاده از دو پرایمر G1-F و L1-R تکثیر شد.

G1-F(5'-GAAGTCGTAACAAGG-3')
L1-R(5'-CAAGGCATCCACCGT-3')

هر واکنش PCR شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۵ میکرولیتر بافر X PCR ۱۰، ۱ میکرولیتر پرایمرهای G1-F و L1-R ۱۰ mM، ۲/۱ میکرولیتر از $MgCl_2$ ۵۰ mM، ۱میکرولیتر از dNTP۰/۴ mM و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر است. دستورالعمل دمایی به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای چسبیدن ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه به تعداد ۳۵ چرخه انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ و بافر TAE الکتروفورز گردید. توالی نوکلئوتیدی حاصل از باند DNA، توسط شرکت ژن فن آوران (Microgen, Korea) توالی یابی گردید (۱۲).

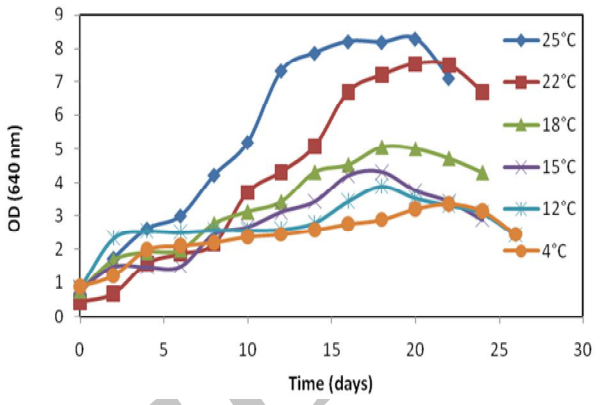
یافته ها

ارزیابی رشد باکتری *At.ferrooxidans* در درجه حراتهای پایین: پس از غربالگری توسط محیط کشت های جامد TK و 9K و همچنین رنگ آمیزی باکتریها مشخص شد که محلول زیر هیپ حاوی باکتریهای *Leptospirillum ferrooxidans*،*At.ferrooxidans*، *At.thiooxidans* می باشد. باکتری *L.ferrooxidans* قادر به رشد در محیط حاوی یون بی سولفیت نمی باشد و همچنین باکتری *At.thiooxidans* فقط در محیط کشت حاوی گوگرد و اکسیداسیون آن به عنوان تنها منبع انرژی می تواند رشد نماید. بنابراین جهت جداسازی باکتری *At.ferrooxidan*، باکتریها در محیط کشت حاوی یون بی سولفیت و محیط کشت های TK و 9K که فاقد گوگرد است، کشت داده شدند. لازم به ذکر است که*At.ferrooxidans* فقط از یون آهن و اکسایش آن به عنوان منبع انرژی استفاده می کند و قادر به رشد در محیط کشت های حاوی قند نیست(۱۴ و ۱۵).

باکتری *At.ferrooxidans* در دماهای ۲۵، ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد رشدی لگاریتمی دارد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود باکتریها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد رشد بهتری نسبت به دماهای ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴

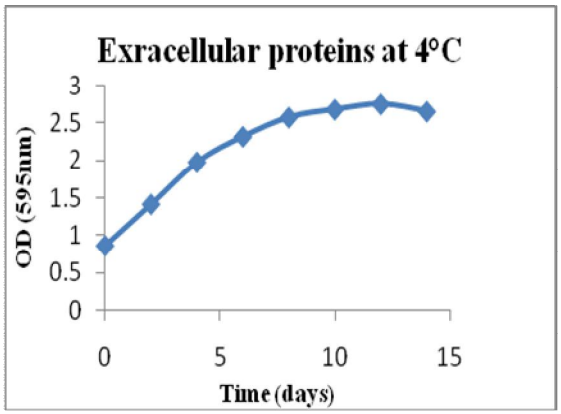
www.SID.ir
Archive of SID

درجه سانتی گراد دارند. اگرچه این باکتریها در دماهای پائین نیز رشد می‌کنند ولی میزان رشد آنها با کاهش دما کاسته می‌شود.



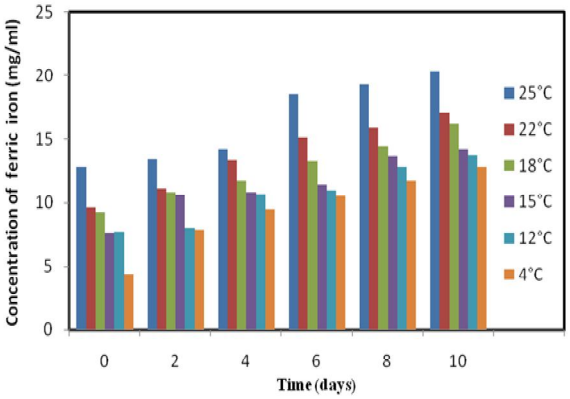
شکل۱. منحنی رشد باکتری *At.ferrooxidans* در دماهای ۲۵،۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد

جهت تأیید رشد باکتری *At.ferrooxidans* در دمای ۴ درجه سانتی گراد، پروتئین های خارج سلولی با کمک روش برادفورد و پس از شش روز اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود افزایش پروتئین های خارج سلولی نشان دهنده رشد این باکتری در دمای ۴ درجه سانتی گراد است. بنابراین باکتری *At.ferrooxidans* قابلیت سازگار شدن در دمای پائین‌تر را دارد.



شکل۲. منحنی اندازه گیری پروتئین های خارج سلولی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به روش برادفورد

اندزه گیری میزان غلظت آهن فریک در درجه حراتهای پایین: به منظور بررسی توانایی باکتری *At.ferrooxidans* جهت اکسایش آهن در دماهای پایین، غلظت آهن فریک توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۰۰ نانومتر به کمک منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می شود، *At.ferrooxidans* قادر است در دماهای ۲۵، ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد آهن فرو را به آهن فریک اکسید کند.



شکل۳. نمودار اندازه گیری غلظت آهن فریک (Fe^{3+}) در دماهای۲۵،۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد

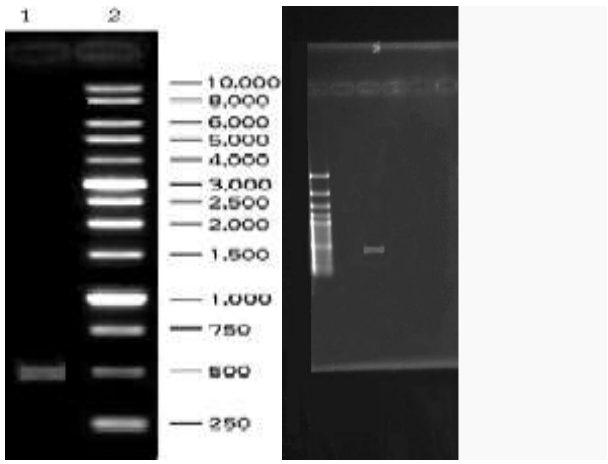
اندازه گیری غلظت یون مس (II) در دماهای پایین: جهت اطمینان حاصل کردن از انجام فرآیند بیولیچینگ و اکسایش مس (I) به مس (II) توسط آهن فریک، غلظت مس (II) توسط پروتکل مس و معرف Neocuprion در دماهای فوق اندازه گیری شد. با توجه به نتایجی که در جدول ۱ آورده شده است، *At.ferrooxidans* این توانایی را دارد که فرآیند بیولیچینگ را در دماهای پایین انجام دهد. بنابراین این باکتری می تواند خود را در دماهای پایین سازگار کند و فرآیند بیولیچینگ غیر مستقیم را انجام دهد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، جهت تأیید این فرآیند غلظت مس در روز اول و دوم پس از اضافه کردن مس به محیط کشت ها در انتهای فاز لگاریتمی توسط پروتکل مس اندازه گیری شد.

www.SID.ir
Archive of SID

جدول۱. اندازه گیری غلظت مس (II) با استفاده از معرف Neocuprion در دماهای ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد

غلظت مس (II) بر حسب میکروگرم		
روز دوم	روز اول	دما
۱۲۸/۷۳	۱۰۸/۳	°C۲۲
۱۰۲/۹۲	۹۰/۱۲	°C۱۸
۹۹/۴۸	۶۵/۶۱	°C۱۵
۷۰/۶۶	۲۶/۵۸	°C۱۲
۲۰/۸	۴/۸۶	°C۴

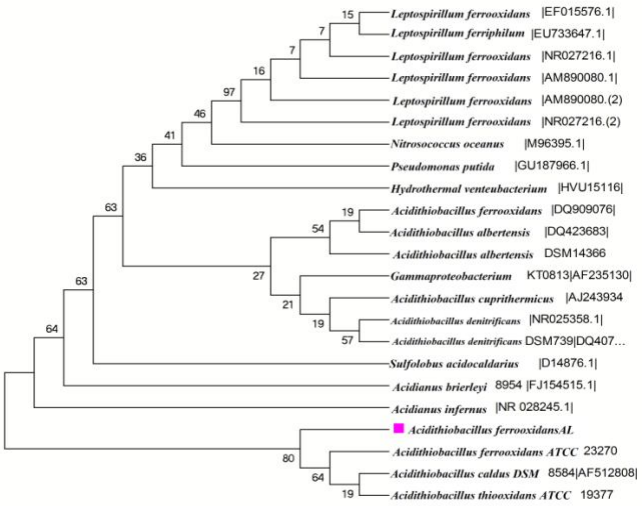
شناسایی گونه باکتری جداسازی شده و سویه برتر به روش ژنتیکی: به منظور شناسایی گونه باکتری و سویه برتر، DNA باکتری استخراج و توسط دستگاه PCR، ژن‌های ناحیه 16SrDNA تکثیر شد و برای تایید دستیابی به باند 16SrDNA باکتری مورد نظر، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد تا قطعه DNA تکثیر شده مشاهده گردد.



شکل۴. الکتروفورز برروی ژل آگارز و مشاهده باند تکثیر شده DNA از قطعه 16srDNA باکتری *At.ferrooxidans*

جهت بررسی خصوصیت فیلوژنتیکی باکتری‌های جداسازی شده و تعیین گونه باکتریایی، توالی حاصل از تکثیر ناحیه 16SrRNA توسط دستگاه PCR، تعیین توالی و با توالی‌های موجود در بانک ژنی مرکز ملی بیوتکنولوژی(Blast (NCBI شد و میزان شباهت ترادف نوکلئوتیدی با سویه‌های ثبت شده در این بانک ژنی بدست آمد.

نتایج حاصل از مقایسه میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی سویه برتر با سویه‌های مرتبط نشان داد که باکتری مورد نظر *Acidithiobacillus ferrooxidans* می‌باشد و سویه AL نام‌گذاری شد. هم‌چنین درخت فیلوژنی پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی سویه *Acidithiobacillus ferrooxidans Al* و مقایسه آن با گونه‌های نزدیک، با استفاده از نرم‌افزار Mega version4 ترسیم گردید. با مشاهده درخت فیلوژنی رسم شده می‌توان نتیجه گرفت که سویه *Acidithiobacillus Al ferrooxidans* در موقعیتی بسیار نزدیک به گونه‌های *Acidithiobacillus ferrooxidans*، *Acidithiobacillus caldus* و *Acidithiobacillus thiooxidans* قرار گرفته است.



شکل۵. درخت فیلوژنتیکی تعیین توالی نوکلئوتیدی سویه *Al Acidithiobacillus ferrooxidans* و مقایسه آن با گونه‌های نزدیک

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بر طبق بررسی های انجام شده، *At.ferrooxidans* جداسازی شده از محلول زیر هیپ معدن مس سرچشمه بهترین رشد را در دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد دارد. همچنین همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد هم رشد خوبی داشت و توانست ۹۰٪ آهن فروس موجود در محیط کشت را اکسید کند. با توجه به نتایج، *At.ferrooxidans* قادر است در دماهای ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد هم رشد کند و آهن فروس را به آهن فریک تبدیل کند. بنابراین *At.ferrooxidans* می‌تواند خود را به تدریج در دماهای پایین آداپته کند. در این بررسی، ابتدا باکتریها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد کشت داده و بعد از چند سیکل مناسب، در دماهای ۲۲، ۱۸، ۱۵، ۱۲ و ۴ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. در واقع با این روش دوره رشد فاز لگاریتمی کاهش می‌یابد. سویه های سایکروتولرانت *At.ferrooxidans* قادرند فرآیند بیولیچینگ را در مناطق سردسیر و فصول سرد سال انجام دهند. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که دمای پایین عامل محدود کننده فعالیت های بیولوژیکی نبوده و در فصول سرد سال و مناطق قطبی این گونه فعالیت ها مشاهده می‌شود (۵ و ۱۳ و۱۶). رشد باکتریهای اسیدوفیل اکسیدکننده آهن توسط آهونن و توینن در سال ۱۹۹۸ در دماهای ۴۶، ۳۷، ۲۸، ۱۹، ۱۶، ۱۳، ۱۰، ۷ و ۴ درجه سانتی گراد بررسی شد. آنها نشان دادند که باکتری ها در تمام دماها به جز دمای ۴۶ درجه سانتی گراد رشد خوبی دارند. همچنین آنها گزارش کردند که کشت باکتریها در دمای ۱۹ درجه سانتیگراد و سپس گرمخانه گذاری آن ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد سبب کاهش زمان تکثیر از ۷۲ ساعت به ۵۶ ساعت می شود (۳). داپسون و همکاران در سال ۲۰۰۷ دو سویه SS3 و T7 باکتری *At.ferrooxidans* را از مناطق صنعتی Norilsk واقع در شمال غربی سیبری که قادر به انجام بیولیچینگ و اکسایش آهن در دمای ۵ درجه سانتی گراد بودند را شناسایی کردند (۴).

نتیجه گیری

باکتری *At.ferrooxidans* جداسازی شده بومی ایران از محلول زیر هیپ قادر است خود را در دماهای پایین سازگار کند و فرآیند بیولیچینگ را انجام دهد. بنابراین برطبق نتایج حاصل، پروسه بیولیچینگ و اکسایش آهن در دماهای پایین امکان پذیر است و می توان فلزات با ارزشی مانند طلا و مس را در شرایط سرمای محیط استخراج نمود (۶). این نتایج و تحقیقات پیشین به طور واضح نشان می دهد که هوای سرد مناطق سردسیر و کوهستانی، بازدارنده فعالیت میکروبی جهت پروسه بیولیچینگ نمی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از شرکت صنایع ملی مس ایران به جهت حمایت مالی از این طرح تشکر می‌گردد. همچنین از همکاری مسئولین و اساتید محترم دانشگاه الزهرا، دانشگاه تربیت مدرس و سرکار خانم فلاحی کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه الزهرا قدردانی می‌شود.

References

1- Acevedo F. Present and future of bioleaching in developing countries. Electro. J. Biotech. 2002; 5: 196-199.
2- Harvey P I, Crundwell F K, Growth of Thiobacillus ferrooxidans: a Novel Experimental Design for Bath Growth and Bacterial Leaching Studies. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63: 2586-2592.
3- Olson G J, Brierley J A, Brierley C L. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: application of microbial processes by the minerals industries. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003; 63: 249-257.
4- Ahonen L, Tuovinen O H. Microbiological Oxidation of Ferrous Iron at Low Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 55: 312-316.
5- Dopson M, Halinen A K, Rahunen N, Ozkaya B, Sahinkaya E, Kaksonen A H, Lindstrom E B, Puhakka A. Mineral and Iron Oxidation at Low Temperatures by Pure and Mixed Cultures of Acidophilic Microorganisms. Biothecnol & Bioengeen. 2007; 97: 1205-1215.
6- Kupka D, Rzhepishevska O I, Dopson M, Lindstrom E B, Karnachuk O V, Tuovinen O H. Bacterial Oxidation of Ferrous Iron at Low Temperatures. Biothecnol & Bioengeen. 2007; 97: 1470-1477.
7- Zepeda V, Galleguillos F, Castillo D, Lastra M, Demergasso C. Bacterial activity at low temperature in cultures derived from a low-grade copper sulphide bioleaching heap at the Escondida Mine, Chile. Advanced Materials Research. 2007; 543-546.
8- Novo M T M, Silva A C, Moreto R, Cabral C P, Costacurta A, Garcia O, Ottoboni L M M. Thiobacillus ferrooxidans response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. J. Antonie. Van. Leeuwenhoek., 2000; 77: 187-195.
9- Basaran A H. Tuovinen O H. An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of pyrite and ferrous ion oxidation by Thiobacillus ferrooxidans. Appl Microbiol Biotachnol. 1986; 24: 338-341.

Archive of SID
www.SID.ir

10- Deshmukh R, In-house Manual for Analytical Methods. India. Nitrex Chemicals India Limited.
11- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatif T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
12- Pizzaro J, Jedlicki E, Orellana O, Romero J, Espejo R T. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. Ibid., 1996; 62: 1323-1328.
13- Chattopadhyay K M. Machanism of bacterial adaptation to low temperature. J. Biosil. 2006; 31: 157-165.
14- Sugio. T, et al. 1994. Sensivity of Iron-Oxidizing Bacteria, Thiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferrooxidans, to Bisulfite Ion. Appl. Environ. Microbiol. 60: 722-725.
15- Dew. W. D, et al. 2000. Bioleaching of base metal sulphide concentrates: A comparison of high and low temperature bioleaching. J. South African Ins. Mining and Metallurgy. 409-413.
16- Rodriguez Y, Balleste A, Blazquez M L, Gonzalez F, Munoz J A. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. Hydrometallurgy. 2003;71: 47-56.

Archive of SID

www.SID.ir