Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحه ۱-۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۳۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۷/۱۸

جداسازی و شناسایی یک سویه باکتری شیمیولیتواتوتروف اختیاری اکسیدکننده آهن و گوگرد از چشمه‌های اردبیل

نیما سلامیان: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، nima_salamian@yahoo.com*
غلامحسین ابراهیمی‌پور: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، g-ebrahimi@cc.sbu.ac.ir
سید مهدی قاسمی: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، smghasemi1985@gmail.com
جواد فخاری: مربی میکروبیولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، Javad_fakhari@yahoo.com

چکیده

مقدمه: استخراج فلزات از معادن سولفیدی با استفاده از روش‌های رایج فیزیکی شیمیایی، علاوه بر آسیب به محیط زیست، بسیار هزینه‌بر است. کاربرد عناصر زیستی موجود در طبیعت، نظیر باکتری‌ها، در حذف گوگرد از سنگ‌های معدنی و استخلاص کم هزینه‌تر فلزات، سال‌هاست با عنوان فرآیند فروشویی زیستی مورد توجه محققان قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: برای انجام این تحقیق، نمونه‌برداری از چشمه‌های اسیدی آب معدنی استان اردبیل انجام شد. نمونه‌ها در محیط حاوی عناصر گوگردی و آهن‌دار غنی شدند و باکتری‌ها پس از کشت‌های متوالی در محیط جامد خالص‌سازی شدند. برای شناسایی باکتری جداسازی شده از روش‌های رایج ریخت شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و روش فیلوژنتیکی 16S rDNA استفاده شد.

نتایج: طبق بررسی‌های انجام شده، باکتری جداشده، یک باسیل گرم مثبت اسپوردار با دمای بهینه رشد ۲۵ درجه سانتیگراد و اسیدیته بهینه ۴ است و طبق تحلیل فیلوژنتیکی، یک سویه جدید از باکتری *Bacillus firmus* با ۹۹ درصد تشابه بوده است که قادر به اکسیداسیون ترکیبات گوناگون گوگردی (نظیر: تیوسولفات پنج درصد، گوگرد عنصری سه درصد، سولفیت سدیم سه درصد) و آهن‌دار (پیریت ۳ درصد، پیروتیت ۳ درصد، سولفات آهنII ۴/۵ درصد و پودر آهن ۲ درصد) است. همچنین، این باکتری مس نامحلول سنگ معدن سرچشمه (۵ درصد) را به سولفات مس تبدیل می‌کند و رنگ محیط را به آبی مایل به سبز تغییر می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به دما و اسیدیته بهینه، و فعالیت‌های اکسیداسیون گوگرد و آهن این باکتری، می‌توان از آن در حضور باکتری‌های لیتوتروف دیگر به شکل مجموعه‌ای (کنسرسیوم) در فرآیندهای فروشویی زیستی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: فروشویی زیستی، باکتری‌های شیمیولیتوتروف، چشمه‌های گوگردی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استفاده از سوخت‌های فسیلی به منظور حرارت دهی و گوگرد زدایی از سنگ‌های معدنی، سبب پدید آمدن گازهای گلخانه‌ای و نیز گازهای SO_x می‌شود که این مورد اخیر باعث به‌وجود آمدن باران‌های اسیدی می‌شود. استفاده از عناصر زیستی موجود در طبیعت، نظیر باکتری‌ها به منظور حذف گوگرد از سنگ‌های معادن سولفیدی، علاوه بر کاهش هزینه‌های استخراج، مشکلات زیست- محیطی استفاده از سوخت‌های فسیلی را به دنبال نخواهد داشت (۱).

به طور کلی، استخراج فلزات از منابع کم عیار شامل دو مرحله است: اولین مرحله آن «فروشویی»[1] است. در این مرحله محلول لیچ کننده (فروشویه) که ممکن است اسید، باز، نمک و یا باکتری باشد، فلز موجود در سنگ معدن را به شکل محلول و یا رسوب در آورده، از باطله جدا می‌نماید. مرحله بعد، جداسازی فلز حل یا ته‌نشین شده است که با کمک حلال‌های آلی و یا رسوب دهی جانشینی و یا الکترولیز انجام می‌شود (۲). فروشویی اسیدی فرآیندی است که در آن برای انحلال فلز موجود در سنگ معدن، از اثرگذاری اسید بر سنگ معدن استفاده می‌شود، اما این روش سرعت بسیار پایینی دارد و در فرآوری کنسانتره‌های معدنی سولفیدی، کالکوپیریت و بازیابی فلزات گرانبها کارآیی و توانایی لازم را ندارد. این محدودیت‌ها باعث شده است که مقبولیت فروشویی اسیدی کاهش پیدا کند. از طرف دیگر، صنایع متالورژی امروزه با مشکلات بسیاری مواجه است که عبارتند از: ۱) کاهش منابع غنی سنگ معدنی در سطح زمین که باعث روی آوردن معدن‌کاران به منابع فقیر شده است؛ ۲) وجود منابع نسبتاً فقیر در اعماق زمین که استخراج این سنگ‌ها با تکنولوژی فعلی مقرون به صرفه نیست؛ ۳) وجود دور ریزهای منابع غنی قبلی که حاوی مقادیری از فلزات بوده، بازیابی این مقادیر کم فلز از این دور ریزها به روش کلاسیک مقرون به صرفه نیست؛ ۴) مصرف انرژی زیاد، به خصوص در متالورژی حرارتی و ۵) آلوده کردن محیط زیست (۳ و ۴).

کاهش کارآیی فروشویی اسیدی و مشکلات و مسایل ذکر شده در بالا، موجب شد که صاحبان صنایع به «فروشویی زیستی»[2] به عنوان روشی جایگزین که با طبیعت همراهی و هماهنگی کامل دارد، توجه بیشتری مبذول نمایند. از جمله مزایای فروشویی زیستی استخراج فلزات از معادن با عیار پایین است. از آنجایی که به علت مصرف انرژی و نیروی انسانی کمتر هزینه‌های روش فروشویی زیستی، نسبت به روش‌های رایج فیزیکی و شیمیایی کمتر است، در نتیجه فعالیت بر روی این منابع کم عیار توجیه اقتصادی پیدا می‌کند. از طرفی، به دلیل این‌که می‌توان روش فروشویی زیستی را به شکل درجا[3] نیز اعمال نمود، می‌توان منابع زیر زمینی و دور از دسترس را نیز بهره برداری کرد. بازیابی فلزات از ضایعات صنعتی، یکی دیگر از مزیت‌های این روش است که بدین ترتیب هم فلزات سنگین از پساب‌ها حذف می‌شوند و آلودگی محیطی کمتری پدید می‌آورند و هم منبع ثانویه‌ای برای فلزات خام ایجاد می‌شود (۵ و ۶).

باکتری‌های اصلی در فروشویی زیستی سولفیدی، ویژگی‌های فیزیولوژیک مشترکی دارند. همه باکتری‌های شیمیولیتواتوتروف، اسید دوست هستند و قادرند آهن و سولفور را اکسید کنند. این باکتری‌ها بیشتر سولفوریک‌اسید و آهن فریک تولید می‌کنند که برای واکنش‌های فروشویی زیستی مورد نیاز هستند. این

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌ها دارای یک سری ویژگی‌های عمومی هستند که آن‌ها را نسبت به نقشی که در حل کردن معدن دارند، مناسب می‌سازد (۷). یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌هایی که در فرآیند فروشویی زیستی یافت و مطالعه شده، باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* است (۸).

ایران از کشورهای دارای معادن بزرگ سولفوره است. از طرفی، وجود چشمه‌های آب معدنی گوگردی اکوسیستم مناسبی برای دستیابی به باکتری‌های شیمیولیتوتروف بومی اکسیدکننده گوگرد و آهن در کشور است.

هدف از انجام تحقیق حاضر، دستیابی به باکتری شیمیولیتوتروف مزوفیلی است که از ذخایر زیست محیطی ایران جداسازی و شناسایی شده باشد و بتواند به شکل مجموعه ای (کنسرسیوم) با سایر باکتری‌ها با طیف دمایی مختلف در فرآیندهای بیولوژیک استخراج معادن استفاده شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از دریاچه‌های آب معدنی گوگرد و آهن‌دار قوتورسویی و شابیل در استان اردبیل انجام شد. دمای مظهر چشمه حدود ۵۰ درجه سانتیگراد و دارای اسیدیته برابر ۳ است. به منظور جداسازی باکتری‌های مزوفیل، نمونه‌ها از آب مناطق پایین دست چشمه (با دمای حدود ۳۰ درجه سانتیگراد و اسیدیته برابر ۳/۵) برداشت و با استفاده از بطری‌های استریل به آزمایشگاه منتقل شد.

محیط‌های کشت

در این پژوهش، از هشت محیط پایه معدنی برای جداسازی و بررسی رشد اتوتروفی سویه جدا شده استفاده شد. ترکیب این محیط‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- محیط‌های پایه معدنی استفاده شده در این پژوهش (بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)

محیط کشت	شماره ۱	شماره ۲	شماره ۳	شماره ۴	شماره ۵	شماره ۶	شماره ۷	شماره ۸	شماره ۹
$(NH_4)_2SO_4$	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳
$MgSO_4$	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
$Ca(NO_3)_2$	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
KCl	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
$Na_2S_2O_3$	۵					۵			
FeS_2			۳						
FeS				۳					
Na_2SO_3					۳				
$FeSO_4$	۴/۵	۴/۵							
پودر آهن							۲		
گوگرد عنصری								۳	
کنسانتره سنگ مس									۵
آب مقطر(میلی‌لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین، به منظور بررسی رشد هتروتروفی از محیط پپتون- عصاره مخمر براث که حاوی ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و سه گرم در لیتر پپتون بود، استفاده شد.

جداسازی و خالص‌سازی باکتری

به منظور جداسازی باکتری(های) مورد نظر، پس از آوردن نمونه‌ها به آزمایشگاه، مقداری از رسوبات و نمونه‌های آب پس از مخلوط شدن، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط پایه معدنی شمارهٔ ۱ ریخته و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت همزنی ۱۲۰ rpm قرار داده شد. پس از گذشت سه هفته و بررسی میکروسکوپی رشد باکتری‌ها، از این ارلن‌ها به میزان پنج میلی‌لیتر به درون ارلن‌های واجد محیط کشت تازه تلقیح شد. پس از یک هفته، از ارلن‌های سری دو باز هم به همین نحو کشت مجدد تهیه شد. به‌طور همزمان، با این عمل، از ارلن‌های سری یک و دو با استفاده از سانتریفوژ با دور ۸۰۰۰rpm به مدت دو دقیقه رسوب تهیه و با استفاده از لوپ بر روی محیط کشت جامد برده شد و این عمل کشت بر روی محیط‌های جامد (محیط پایه معدنی شماره ۱ محتوی آگار) و مایع چندین بار دیگر تکرار شد. به منظور نگهداری سویه جدا شده، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون مورد نظر در ویال‌های استریل ریخته و سپس یک میلی‌لیتر از محیط کشت پایه معدنی شماره ۱ استریل و ۰/۲ میلی‌لیتر DMSO[۴] استریل به آن اضافه شد و سریعاً به داخل فریزر ۲۰- درجهٔ سانتیگراد منتقل شد.

شناسایی باکتری

خصوصیات ظاهری باکتری از لحاظ رنگ کلونی و شکل باکتری در محیط کشت پایه معدنی شماره ۱ بررسی شد. نوع واکنش گرم، رنگ‌آمیزی اسپور و آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلفی نظیر بررسی آنزیم‌های کاتالاز، اکسیداز و اوره‌آز، احیای نیترات، بررسی حرکت و تولید ایندول و سولفید هیدروژن در محیط SIM، بررسی تجزیه گلوکز، ساکارز و لاکتوز و همچنین، تولید دی اکسید کربن و سولفید هیدروژن در محیط TSI و آزمایش MR/VP مطابق با روش‌های استاندارد شناسایی باکتری‌ها انجام شد (۹).

به منظور شناسایی دقیق باکتری ایزوله شده، علاوه بر روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، از روش توالی‌یابی 16S rDNA نیز استفاده شد. استخراج DNA ژنومی و آهن‌زدایی با استفاده از کیت High pure PCRProduct محصول شرکت Roche آلمان انجام شد.

در این پژوهش، از یک جفت پرایمر عمومی که توانایی تکثیر 16S rDNA بیشتر یوباکتری‌ها را دارند، استفاده شد. توالی پرایمرهای رفت (Fd1) و برگشت (rD1) که محصولی در حدود ۱۶۰۰ جفت باز می‌دهد، به شرح زیر است (۱۰):

fd_1: 5′- AGA GTT TGA TCC TGG CTC -3′
rD_1: 5′- TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3′

مخلوط PCR (۲۵ میکرولیتر) حاوی یک میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول) و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمراز Taq (۵ u/µL) است. حجم نهایی مخلوط با استفاده از آب دیونیزه دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR با دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه آغاز شد و در ۳۰ سیکل با برنامه دمایی به شکل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، چسبیدن در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه،

www.SID.ir

Archive of SID

پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و پلیمریزاسیون نهایی در همین دما به مدت ۱۰ دقیقه به پایان رسید. محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید و بافر TAE(1x) الکتروفورز شد و توسط دستگاه ترانس‌لومیناتور با تابش اشعه ماورای بنفش مشاهده شد. به منظور تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA، محصول خالص PCR به شرکت تکاپوزیست ارسال شد (۱۱).

تعیین اسیدیته بهینه رشد باکتری

برای تعیین اسیدیته بهینه برای رشد باکتری، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت معدنی شمارهٔ ۱ استریل ریخته شد. پس از تلقیح باکتری (به میزان ۳ میلی‌لیتر با کدورت دو مک فارلند معادل تقریبا ۶۰۰×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر)، اسیدیته محیط‌ها با سولفوریک‌اسید ۱۰ نرمال بر روی ۲، ۳، ۴ و ۵ تنظیم شد. سپس ارلن‌ها در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. هر سه روز یک بار، سه میلی‌لیتر نمونه از هر کدام از ارلن‌ها برداشته شد و پس از سانتریفیوژ شدن، مایع رویی دور ریخته شد و با افزودن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به رسوبات، تا روز تعیین غلظت پروتئین کل در فریزر نگهداری شدند.

تعیین دمای بهینه رشد باکتری

برای تعیین بهترین دما برای رشد باکتری، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت معدنی شمارهٔ یک استریل ریخته شد (اسیدیته ۴). ارلن‌ها پس از تلقیح باکتری (به میزان سه میلی‌لیتر با کدورت دو مک فارلند معادل تقریبا ۶۰۰×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر)، در شیکر انکوباتورهایی با دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. هر سه روز یک بار، سه میلی‌لیتر نمونه از هر کدام از ارلن‌ها برداشته شد و پس از سانتریفیوژ شدن، مایع رویی دور ریخته شد و با افزودن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به رسوبات، تا روز تعیین غلظت پروتئین کل در فریزر نگهداری شدند.

سنجش پروتئین کل

در این مطالعه، با تعیین مقدار پروتئین کل، میزان رشد باکتری اندازه‌گیری شد. برای این منظور یک میلی‌لیتر از نمونه، در داخل میکروتیوب به مدت دو دقیقه در ۸۰۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی حاصل یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از بهم زدن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH اضافه و به‌هم زده شد. سپس، لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن ماری) ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً تخریب شوند. اندازه‌گیری پروتئین به روش لاری[5] انجام شد. در این روش، از دو معرف استفاده شد:

۱) معرف مس: شامل یک میلی‌لیتر محلول الف (۰/۱ گرم سولفات مس در ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم پتاسیم تارتارات ۱ درصد) و محلول ب (۵۰ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲ درصد)؛ ۲) معرف فولین: شامل یک حجم معرف فولین و دو حجم آب مقطر.

رنگ آمیزی به این ترتیب انجام شد که به هر یک از لوله‌های حاوی سلول‌های لیز شده و همچنین، یک لوله شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر ۰/۳ مولار NaOH، به تدریج و با تکان دادن، ۵ میلی‌لیتر معرف مس اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی، ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه و سریع به‌هم زده شد و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در نهایت، لوله‌ها به مدت دو دقیقه در ۸۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند تا بقایای سلولی ته نشین شوند و جذب نوری محلول در ۶۲۳ نانومتر

www.SID.ir

Archive of SID

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار پروتئین موجود در هر نمونه با استفاده از منحنی خطی استاندارد حاصل از سرم آلبومین گاوی محاسبه شد (۱۲).

بررسی رشد اتوتروفی باکتری بر روی منابع گوگردی و آهن‌دار

برای بررسی رشد اتوتروفی باکتری روی سولفات آهن ($FeSO_4$)، پیریت(FeS_2)، سولفید آهن(FeS)، سولفیت سدیم (Na_2SO_3)، تیوسولفات سدیم ($Na_2S_2O_3$)، پودر آهن، گوگرد عنصری و سنگ معدن سرچشمه (که حاوی کالکوپیریت ($CuFeS_2$) است) به عنوان تنها منبع انرژی و الکترون، به ترتیب از محیط کشت پایه معدنی شمارهٔ ۲ تا ۸ استفاده شد. باکتری را در شرایط استریل تلقیح کرده، یک محیط کشت فاقد باکتری نیز به عنوان شاهد تهیه شد و هر دو پس از تنظیم اسیدیته بر روی هم‌زن در شیکر انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. هر روز میزان رشد باکتری‌ها با ایجاد کدورت در محیط و با اندازه‌گیری اسیدیته محیط در مقایسه با شاهد به مدت ۱۵ روز بررسی شد.

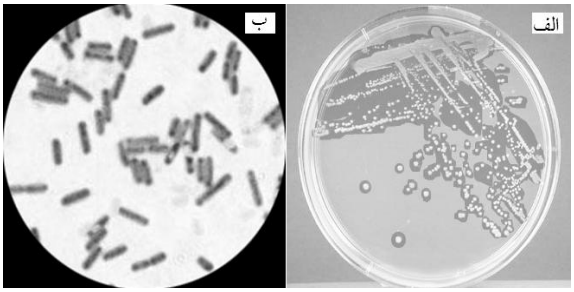
بررسی رشد هتروتروفی باکتری

برای انجام این آزمایش از دو محیط کشت پپتون- عصاره مخمر آگار و پپتون- عصاره مخمر براث استفاده شد. پس از تهیه و اتوکلاو کردن هر دو محیط، اسیدیته محیط‌ها بر روی ۴ تنظیم شد. سپس باکتری در شرایط استریل به محیط‌های کشت تلقیح شد. برای محیط کشت پپتون- عصاره مخمر براث یک شاهد (محیط کشت بدون باکتری) نیز تهیه شد. محیط‌های کشت و شاهد همزمان در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. هر روز میزان رشد باکتری با ایجاد کدورت در محیط کشت مایع و مقایسه با شاهد، و بررسی تشکیل کلنی در محیط جامد به مدت ۱۵روز بررسی شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه اکسیدکننده آهن و گوگرد

چشمه‌های آب معدنی قوتورسویی و شابیل در استان اردبیل، به علت وجود رسوبات گوگردی و آهن‌دار در دهانه چشمه، از محل‌های مناسب برای جداسازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف مزوفیل و ترموفیل هستند. در این پژوهش، از این چشمه‌ها به منظور نمونه‌برداری استفاده شد. نمونه‌ها پس از مراجعه به آزمایشگاه طی چند کشت متوالی در محیط پایه معدنی شماره ۱ شامل عناصر مورد نیاز برای رشد باکتری و تیوسولفات سدیم و سولفات فریک به عنوان منابع انرژی و الکترون، غنی‌سازی شده و سپس بر روی محیط کشت جامد پایه معدنی شماره ۶ که علاوه بر عناصر مورد نیاز برای رشد، دارای پنج درصد تیوسولفات سدیم به عنوان منبع انرژی و الکترون نیز بود، یک سویه (سویه NS) باسیلوس شیمیولیتوتروف اختیاری از چشمه قوتورسویی جداسازی و خالص‌سازی شد (شکل ۱).



شکل ۱- الف) باکتری خالص شده در محیط حاوی تیوسولفات سدیم. هاله ایجاد شده ناشی از تجزیه تیوسولفات سدیم توسط باکتری است. ب) تصویر میکروسکوپ نوری از باسیل گرم مثبت اسپورزا (سویه NS)

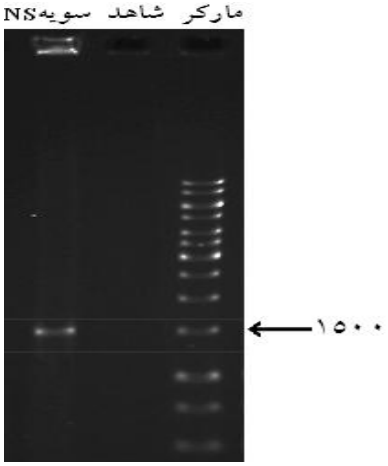
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه جدا شده از چشمه قوتورسویی

آزمایش‌های شناسایی	سویه NS
شکل	باسیل
واکنش گرم	مثبت
رنگ‌آمیزی اسپور	مثبت
حرکت	مثبت
اکسیداز	مثبت
کاتالاز	مثبت
رشد اتوتروفی	مثبت
رشد هتروتروفی	مثبت
اسیدیته بهینه	۴
دمای بهینه	۲۵ درجه
احیای نیترات به نیتریت	منفی
اوره آز	مثبت
آزمایش VP	مثبت
آزمایش MR	منفی
آزمایش TSI	منفی
تولید اندول	منفی
تولید H_2S	منفی

پس از انجام PCR و تعیین توالی ژن 16S rDNA، توالی‌های به دست آمده هم‌تراز[۶] و با میکروارگانیسم‌های موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه شد (شکل ۲). نتایج حاصل از BLAST مشخص کرد که این باکتری، سویه‌ای از *Bacillus firmus* است، زیرا توالی به دست آمده دارای شباهت ۹۹ درصد به ژن 16S rDNA باکتری *Bacillus firmus* سویه IAM12464 است. شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR با طول ۱۶۰۰ جفت باز را بر روی ژل آگاروز نشان می‌دهد.



شکل ۳- باند 16S rDNA حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد

5′GTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAG
AGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCC
GCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTANGGCCGCAAGGC
TGANN-TCAAAGGAATTGANGGGGGCC3′

شکل ۲- توالی ژن 16S rDNA سویه جداسازی شده

تعیین اسیدیته و دمای بهینه رشد باکتری

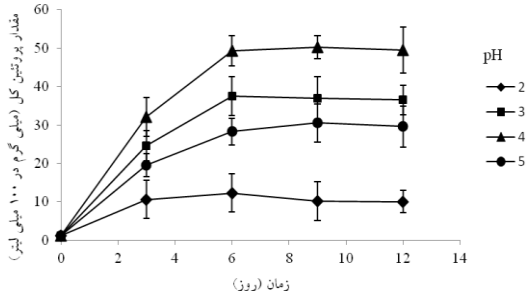
به طور کلی، باکتری‌های شیمیولیتوتروف اسیدوفیل در اسیدیته بین ۱ تا ۶ و دمای بین ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد رشد می‌کنند. *Acdthobacllus* ها معمولاً اسیدیته بین ۲ تا ۳ و درجه حرارت ۲۵ تا ۴۰ درجه سانتیگراد و *solfolubus* ها معمولاً در اسیدیته بین ۲ تا ۳ و درجه حرارت بین ۵۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد بیشترین رشد را دارند (۱۳ و ۱۴). باکتری *Methylobacterium*

www.SID.ir

Archive of SID

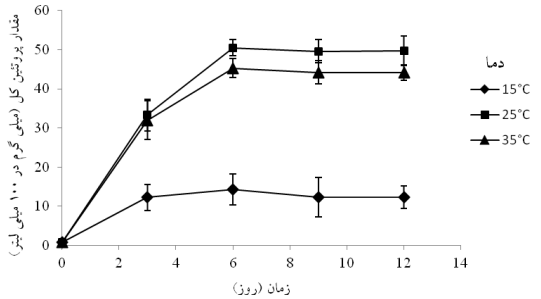
جداسازی شده توسط بخششی بیش‌ترین رشد را در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و اسیدیته ۳ داشته است (۱۵).

در این پژوهش، به منظور استفاده صنعتی باکتری جداسازی شده در آینده، دسترسی به اسیدیته بهینه و دمای رشد سویه **NS** بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی در شکل ۳ و ۴ نمایش داده شده است. با توجه به میزان پروتئین کل تولید شده توسط باکتری در طی ۱۲ روز، به نظر می رسد اسیدیته بهینه آن ۴ بوده باشد. با توجه به شکل ۳ مشاهده می‌شود که در اسیدیته ۲ کمترین میزان رشد وجود دارد. همچنین، میزان تولید پروتئین در ۶ روز اول به حداکثر می‌رسد که برابر با ۴۹/۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر است (شکل ۳).



شکل ۳- تعیین اسیدیته بهینه رشد باکتری به روش پروتئین سنجی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در محیط کشت پایه معدنی شماره ۱

دمای بهینه سویه NS با توجه به میزان پروتئین کل تولید شده در طی ۱۲ روز، ۲۵ درجه سانتیگراد تعیین شد. با توجه به شکل ۴ مشاهده می‌شود که در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد، کم‌ترین میزان رشد وجود دارد. همچنین، میزان تولید پروتئین در ۶ روز اول به حداکثر می‌رسد که برابر با ۵۰/۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر است. این باکتری توانایی رشد مناسب در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نیز نشان می‌دهد، به طوری‌که در ۶ روز اول میزان پروتئین کل به‌دست آمده از آن برابر ۴۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر است (شکل ۴).



شکل ۴- تعیین دمای بهینه رشد باکتری به روش پروتئین سنجی در اسیدیته۴ و در محیط کشت پایه معدنی‌شماره ۱.

بررسی رشد اتوتوتروفی و هتروتروفی باکتری

میکروارگانیسم‌ها کربن مورد نیاز خود برای رشد را از ترکیبات آلی یا دی اکسید کربن موجود در اتمسفر به دست می‌آورند. باکتری‌های هتروتروف کربن را از ترکیبات آلی و باکتری‌های اتوتروف کربن را از منبع دی‌اکسید کربن موجود در اتمسفر در طی چرخه کلوین به دست می‌آورند (۱۶). منبع اصلی الکترون و انرژی در باکتری‌های لیتوتروف، مواد معدنی است، اما گروهی از باکتری‌های هتروتروف اختیاری نیز یافت شده‌اند که علاوه بر توانایی رشد در محیط‌های هتروتروفی، قابلیت رشد در محیط‌های اتوتروفی و اکسیداسیون گوگرد عنصری (۱۷)، تیوسولفات (۱۸)، و آهن (۱۹) را نیز دارا هستند. برای تشخیص اتوتروف یا هتروتروف بودن باکتری جداسازی شده، آزمایش رشد باکتری در محیط‌های پایه معدنی و محیط هتروتروفی پپتون- عصاره مخمر براث و پپتون- عصاره مخمر آگار انجام شد. نتایج نشان داد که این باکتری قادر به رشد در تمامی محیط‌های پایه معدنی و محیط هتروتروفی بوده است و کلونی‌های سفید ستاره‌ای شکل در محیط واجد آگار پدید می‌آورد. باکتری‌های اکسید کننده آهن نظیر *leptospirillum*

www.SID.ir

Archive of SID

ferrooxidans، اکثر *Acidithiobacillus* ها و برخی از *solfolubus* ها این توانایی را دارند که در چنین شرایطی آهن فرو را به آهن فریک اکسیده نموده، محیط را به رنگ نارنجی و قهوه‌ای در آورند (۲۰). باکتری جداشده در این پژوهش نیز واجد این توانایی است و با اکسیده کردن آهن فرو در سولفات آهن II و نیز پودر آهن، پیریت و FeS تولید آهن فریک نموده ، رسوباتی قهوه‌ای در ظرف برجا می‌گذارد. همچنین، توانایی اکسیده کردن گوگرد عنصری، تیوسولفات سدیم و سولفیت سدیم توسط باکتری جداشده در این پژوهش بررسی شد که باکتری مذکور با مصرف گوگرد اسید تولید می‌نماید و اسیدیته محیط را کاهش می‌دهد. کاهش اسیدیته در محیط حاوی تیوسولفات موجب تغییر رنگ محیط به شیری می‌گردد. مصرف گوگرد عنصری در مدت زمان طولانی‌تری انجام می‌شود و سبب انحلال گوگرد در محیط می‌شود.

ایجاد کدورت، کاهش اسیدیته و تغییر رنگ محیط در نتیجه رشد و اکسیداسیون آهن و گوگرد موجود در محیط کشت توسط باکتری، از علایم فعالیت و تکثیر سویه NS بود. بنابراین، سویه NS یک باکتری شیمیولیتوتروف اختیاری است که هم به شکل اتوتروفی و هم به شکل هتروتروفی رشد می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌ها در صنایع، بویژه صنایع استخراج فلزات، کاربرد گسترده‌ای یافته است. به علت استخراج مداوم از معادن و کمبود ذخایر فلزی موجود در این معادن، صنایع به دنبال یافتن فرآیندهایی هستند تا از معادنی با عیار پایین نیز استفاده کنند. هم‌اکنون، فروشویی زیستی از کاربردی‌ترین این فرآیندهاست که به علت مزایای فراوانی که از نظر اقتصادی، فنی و زیست- محیطی دارد، به آن توجه و جایگزین فرآیندهای معمول و رایج فیزیکی و شیمیایی شده است (۵). باکتری‌های شیمیولیتوتروفی، نظیر: *Acidithiobacillus*، *solfolubus* و *leptospirillum* از بهترین گونه‌های مورد استفاده در فرآیند فروشویی هستند (۱۳ و ۱۴). به منظور استفاده از ذخایر زیستی بومی ایران، اقداماتی در جهت جداسازی باکتری‌های شیمیولیتوتروف با بهینه دمایی مختلف انجام شد. باکتری جداسازی شده توسط بخششی یک *Methylobacterium* با بهینه دمای ۵۰ درجه سانتگیراد و اسیدیته بهینه ۳ است (۱۵). برای آن‌که بتوان گستره دمایی متنوعی را تحت پوشش قرار داد، در این پژوهش باکتری شیمیولیتوتروف اختیاری با دمای بهینه ۲۵ درجه سانتگیراد و اسیدیته ۴ جداسازی شد. باکتری جدا شده در این پژوهش توانایی بالایی در اکسیداسیون ترکیبات گوگردی و آهن‌دار از خود نشان داد. همچنین، در محیط معدنی حاوی نمونه مس سرچشمه رشد کرد و مس را از حالت نامحلول به سولفات مس محلول تبدیل نمود و رنگ محیط را به آبی مایل به سبز تغییر داد. بنابراین، از سویه NS می‌توان در حضور باکتری‌های لیتوتروف دیگر به شکل مجموعه‌ای (کنسرسیوم) در فرآیند فروشویی زیستی استفاده کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) Watling H.R.The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides A review. *Hydrometallurgy* 2006; 84(1): 81-108.

(2) Torma A.E. Role of *Thiobacillus ferroxidans* in hydrometalorgical processes. *Adv. Biochem. Eng* 1997; 6: 1-37.

(3) Abraitis P.K, Pattrick R.A.D, Kelsall G.H, Vaughan, D.J. Acid leaching and dissolution of major sulphide ore minerals: processes and galvanic effects in complex systems. *Mineral. Mag 2004*; 68(2): 343-51.

(4) Gharabaghi M, Irannajad M, Noaparast M. A review of the beneficiation of calcareous phosphate ores using organic acid leaching. *Hydrometallurgy* 2010; 103: 96-107.

(5) Rawlings D.E. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Micribiol* 2002; 56: 65-91.

(6) Pradhan N, Nathsarma K.C, SrinivasaRao K, Sukla L.B, Mishra B.K. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering* 2008; 21(5): 355–65.

(7) Murr L.E, Torma A.E, Brierley J.A. *Metallurgical applications of the bacterial leaching and related microbiological phenomena*. New York. USA: Academic Press; 1978.

(8) Rohwerder T, Sand W. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium spp. Microbiology* 2003; 149(Pt 7): 1699-1709.

(9) Slepecky R.A, Hemphill H.E. *The Prokaryotes*, 3rd Ed.. New York: Springer; 2006.

(10) Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173: 697–703.

(11) 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. *J Bacteriol.* 1996; 62: 1323-28.

(12) Lowry O.H, Rosenbrough N.J, Farr A.L, Rendall R.J. Protein measurement with the Folin phenol Reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-75.

(13) Das A,Mishara A.K, Roy P. Inhibition of thiosulfate and tetrathionate oxidation by ferrous iron in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS-Microbiol. Lett* 1993; 112 (1): 67-71.

(14) Kargi, F, Robinson J.M. Microbial desulfurization of coal by thermophilic microorganism, *Sulfolobus acidocaldarius*. *Appl. Environ. Microb* 1982; 44: 878-83.

(15) Bakhsheshi R. Isolation and Identification of chemolithotroph acidophilic bacteria of Qotoursou spring in Ardebil province [Dissertation]. Tehran: Shahid Beheshty Univ.; 2006.

(16) Vogler K.G. Studies on metabolism of autotrophic bacteria. *J. Gen. physiol* 1942; 26(1): 103–17.

(17) Yang Z, Stoven K, Haneklaus S, Singh B, Scung E. Elemental sulfur oxidation by *thiobacillus spp.* and aerobic heterotrophic sulfur-oxidizing bacteria. *Pedosphere* 2010; 20*:* 71-9.

(18) Nakagawa S. *Sulfurihydrogenibium yellowstonense sp. nov*., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park, and emended descriptions of the genus *Sulfurihydrogenibium*, *Sulfurihydrogenibium subterraneum* and *Sulfurihydrogenibium azorense*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; 55: 2263-68.

(19) Bacelar-Nicolau P, Barrie Johvson D. Leaching of pyrite by acidiphilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol* 1999; 65(2): 585-90.

(20) Silverman M P, Ehrlich H L. Microbial formation and degradation of minerals. *Adv. Appl. Microbiol* 1964, 6: 153-206.

1-Leaching
2-Bioleaching
3-*In situ*
4-Dimethyl sulfoxide
5-Lowry
6-alignment

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and characterization of a Facultative chemolithotrophic sulphur and iron oxidizing bacterium from Ardabil acidic springs

Nima Salamian*
MSc of Microbiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Nima_salamian@yahoo.com
Gholamhossein Ebrahimipour
Associate Professor of Microbiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, G-Ebrahimi@cc.sbu.ac.ir
Seyed Mahdi Ghasemi
PhD student of Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, smghasemi1985@gmail.com
Javad Fakhari
Lecturer of Microbiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Javad_fakhari@yahoo.com

Abstract

Introduction: Since metal extraction from sulfide ores by physicochemical methods is expensive and also detrimental to the environment, microorganisms, mainly bacteria are being increasingly used for desulfurization of sulfide minerals. Microbial leaching or bioleaching is an inexpensive and environmentally friendly technology for metal recovery.

Materials and Methods: In the present study, to isolate iron and sulfur-oxidizing bacteria which are active in bioleaching process, spring water samples were collected and enriched by iron and sulfur-containing media. In order to identify the isolated bacteria, several morphological, physiological, biochemical and 16S rDNA phylogenetical methods were implemented.

Results: After several sub-cultures, a gram-positive spore-forming rod (NS strain) was isolated and then characterized. Sequence analysis of 16S rDNA revealed that the isolated strain was closely related to *Bacillus firmus* strain IAM 12464 (99%), that was capable to oxidize several sulphur and iron component such as: thiosulfate 5%, elemental sulphur 3%, sodium sulphate 3%, pyrite 3%, pyrrhotite 3%, ferrous sulphate 4.5% and Iron powder 2%. Also, this isolate could dissolve copper of SARCHESHME ore to copper sulphate and change the colour of medium to blue-green. The optimal growth of the isolate was observed at 25°C and pH 4.

Discussion and Conclusion: Due to the optimum pH and temperature, and the iron and sulphur oxidizing activity of this isolate, this bacterium together with a consortium of lithotrophic bacteria could be used in bioleaching processes.

Key words: Bioleaching, Chemolithotrophic bacteria, Sulphurous springs.

* Corresponding Author

www.SID.ir