جداسازی، تخلیص، شناسایی و سازش باکتریهای مزوفیل معدن مس سرچشمه

مجید طهمورسی، حسن سالاری* و عیسی کامکار

کرمان، مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی

تاریخ دریافت ۸٤/۵/۲۵ تاریخ پذیرش:۸۵/۱۰/۲۷

چکیده

بمنظور جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی مؤثر در فرآیند استخراج بیولوژیکی سولفیدهای کم عیار مس، ۲٤ نمونه آب، خاک و لجن از نقاط مختلف معدن مس سرچشمه کرمان جمع آوری و کشت وتکثیر شد. رشد باکتری در ۷ نمونه مشاهده شد که باکتریها پس از جداسازی و خالص سازی بر اساس آزمایشهای افتراقی و مورفولوژیکی شناسایی شدند. همه باکتریهای جدا شده، باسیلهای گرم منفی می باشند که قادر به اکسیداسیون پیریت، گوگرد عنصری، تیوسولفات، سولفید مس و آهن فرو می باشند. این اکسیداسیونها عمدتاً با تغییرات pH و رنگ محیط کشتها همراه است. باکتریهای تخلیص شده هم از لحاظ موفولوژیک و آزمایش افتراقی ویژگیهای باکتری *Thiobacillus ferrooxidans* را دارند. در کشتهای متوالی، سازش این باکتری به غلظتهای بالای مس نیز انجام شد. باکتری سازش یافته گونه ای جهش یافته از باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس بومی می باشد که در محیط مناسب طی ۲٤ تا ٤۸ ساعت کاملاً رشد کرده و قادر به تحمل مس محلول تا حد ۱۵۲٦۹ میلی گرم در لیتر است.

واژه های کلیدی: تیوباسیلوس فرواکسیدانس، معدن مس سرچشمه، تخلیص، جداسازی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳٤۲-٦۲۲٦٦۱۱-۱۳، پست الکترونیک: h_salari57@yahoo.com

مقدمه

محیطهای طبیعی زیست میکروارگانیزمها حاکی از وفور مواد تغذیه ای لازم جهت فعالیت آنها در این محیطهاست. تغذیه کمولیتوتروفی بعضی از میکروارگانیزمها حضور آنها را در محیطهای واجد مواد معدنی لازم برای فعالیت تأئید می کند. چون اساس فعالیت کمولیتوتروفی میکروارگانیزمها، انجام واکنشهای اکسیداسیون و احیا بر روی مواد معدنی موجود در محیط است، از اینرو احتمال حضور میکروارگانیزمهای کمولیتوتروفی که قادر به اکسیداسیون و احیائ مواد معدنی بویژه سولفیدها باشند در محیطهای معدنی دارای ذخایر زیاد سولفیدی دور از انتظار نیست. زه آبهای معدن مس سرچشمه که دارای حجم زیادی از سولفیدهای مس و آهن می باشد می تواند زیستگاه مناسبی برای باکتریهای اکسید کننده این سولفیدها باشد. از آنجا که گونه های مختلفی از باکتریها قادر به فعالیت در این زیستگاهها بوده و از طرفی روش استخراج میکروبی ذخایر معدنی که به اختصار بیولیچینگ نامیده می شود توسط باکتریهای کمولیتوتروف اکسیده کننده سولفیدهای مس انجام می شود و همواره بهترین گونه های مورد استفاده در این تکنولوژی گونه های طبیعی یافت شده در این محیطها می باشند ، ضرورت تخلیص و جداسازی این گونه جهت استفاده در این تکنولوژی لازم بنظر می رسد. همچنین استخراج بیولوژیکی از جمله روشهایی است که بواسطه مزایای متعدد، در سالهای اخیر در صنایع استخراج فلزات اهمیت ویژه ای پیدا کرده است (۱۰). بازیافت فلزات از خاکهای سولفیدی آنها بر اساس فعالیت باکتریهای کمولیتوتروف گوگردی انجام می شود که سولفیدهای نامحلول را به سولفات محلول تبدیل می کنند (۳). عوامل اصلی مؤثر در این فناوری عبارتند از آب،

Archive of SID
www.SID.ir

هوا و میکروارگانیزمها که به آسانی در طبیعت یافت می شوند. یافتن انواعی از میکروارگانیزمها که دارای قابلیت بالاتری در اکسیداسیون سولفیدهای فلزی می باشند می تواند در نیل به اهداف اقتصادی این تکنولوژی مؤثر باشد. با توجه به وفور معادن کم عیار فلزات در ایران و لزوم بررسی تکنولوژیهای نو در استخراج فلزات، تخلیص میکروارگانیزمهای مؤثر در این فرآیند در قالب یک طرح تحقیقاتی ملی بررسی و از نمونه های آب و لجن معدن مس سرچشمه جدا شد.

مواد و روشها

بمنظور جداسازی و شناسایی گونه های باکتری بومی معدن مس سرچشمه، ابتدا ۲٤ نمونه آب، خاک و لجن از مناطق مختلف این معدن، در ظروف شیشه ای درب دار قرار داده شده در اسید سولفوکرومیک بمدت ۲٤ ساعت جمع آوری شد. دمای کلیه نمونه ها تقریباً ۲۰ درجه سانتی گراد و pH آنها بین ۵ تا ٦ بود. نظر به اینکه pH اولیه نمونه های جمع آوری شده از مناطق مختلف معدنی بین ۵ تا ٦ بوده و احتمال حضور باکتری در این اسیدیته می باشد و از آنجا که مؤلفین قصد داشتند کمترین تغییری را در pH محیط در آزمایشهای افتراقی اعمال کنند تا این تغییر منجر به رشد باکتریهای دیگر نشود و از طرفی شرایط طبیعی زیست باکتری نیز اعمال شود لذا در آزمایشهای افتراقی pH کمتر از ۵ منظور شد گر چه حداکثر فعالیت باکتری در pH های بین ۲ تا ٤ است، و جداسازی باکتری در کشتهای جامد عمدتاً با استفاده از pH کمتر از ۲ انجام شد. هر نمونه پس از انتقال به آزمایشگاه، بر روی ۲ محیط کشت مایع با ترکیب ذکر شده در جدول شماره ۱ کشت شد.

جدول ۱: ترکیبات محیطهای غنی سازی شده ۱ و ۲

محیط غنی سازی شماره ۱			
محلول ۱		محلول ۲	
$(NH_4)_2SO_4$	3g	$FeSO_4.7H_2O$	44.22g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5g	H_2SO_4 10N	1CC
K_2HPO_4	0.5 g	pH	1.5
KCl	0.1g	D.W	500 ml
$Ca(NO_3)_2$	0.01g		
D.W	500 ml		
محیط غنی سازی شماره ۲			
محلول ۱		محلول ۲	
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g	$FeSO_4.7H_2O$	167g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5g	H_2SO_4 10N	50CC
K_2HPO_4	0.5g	pH	1.5
H_2SO_4 1N	5cc	D.W	100 ml
D.W	1000 ml		

محلولهای غنی شده محیط شماره ۱ (جدول ۱) با یکدیگر مخلوط و بمیزان ۱۰۰ میلی لیتر در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد (٦). ۱۰ گرم از نمونه های خاک و ۱۰ میلی لیتری از نمونه های آب به هر ارلن اضافه شد و بمدت ۳ هفته در شرایط ۳۰ درجه سانتی گراد و rpm180 در انکوباتور قرار گرفت. محلولهای محیط غنی سازی شماره ۲ (جدول ۱) به نسبت ۱ قسمت از محلول ۲ و ٤ از محلول ۱ مخلوط و مطابق روش قبل عمل شد (۱٦).

۱ – تهیه کشت خالص: بمنظور تهیه کشت خالص باکتری جداسازی شده، از محیط کشت جامد (جدول ۲) استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: ترکیب محیط کشت جامد

محلول شماره ۱		محلول شماره ۲		محلول شماره ۳	
$(NH_4)_2SO_4$	0.5g	H_2SO_4 1N	5050ml	Agar	10g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5g	$FeSO_4.7H_2O$	167g	D.W	1000 ml
K_2HPO_4	0.5 g	D.W	1000 ml		
H_2SO_4 1N	5ml				
D.W	500 ml				

محلولهای شماره ۱ – ۳ این محیط بترتیب با نسبتهای ۲:۱:۲ در درجه حرارت ٤٥ درجه سانتی گراد با یکدیگر مخلوط وpH نهایی محیط در حد ۲ تنظیم شد. از محیط کشت آماده شده ۲۰ میلی لیتر در هر پتری دیش ریخته و پس از سرد شدن از نمونه های رشد یافته در محیط کشت مایع، رقتهای ۰/۱ و۰/۰۱ تهیه و بر روی محیط کشت جامد کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شد. برای جلوگیری از فعالیت احتمالی قارچهای ساپروفیت از آگار نوبل استفاده شد، و اسید شویی آن نیز بمنظور حذف مواد آلی موجود انجام گرفت. جهت کاهش کشش سطحی اسپور قارچ در محیط کشت جامد به محلول شماره ۱ تریتون X-100 با غلظت ۰/۰۵ درصد اضافه شد.

بمنظور کم کردن تعداد اسپورهای قارچ در سوسپانسیون میکروبی رقتهای 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه و کشت در محیط غنی شده ۲ انجام شد. بمیزان ۰/۵ گرم در لیتر سیکلوهگزیمید به محلول غنی شده شماره ۲ بعنوان قارچ کش قوی اضافه شد.

شناسایی باکتریها: بمنظور شناسایی دقیق باسیلهای جداسازی شده آزمایشهای افتراقی شامل: اکسیداسیون پیریت، گوگرد عنصری، تیوسولفات، سولفید مس و آهن فرو، و در مورد سایر باکتریهای (۱۱) ۷ نمونه جداسازی شده از مکانهای مختلف معدن مس سرچشمه علاوه بر آزمایش های افتراقی فوق الذکر آزمایش کوولیت نیز با تغییرات در محیط کشت انجام شد. جهت بررسی اکسیداسیون پیریت از سنگ معدن سولفوره با عیار۳/٦٤ درصد آهن استفاده شد که از الک ۱۵۰ مش عبور و ذراتی به اندازه تقریبی ۱۲۵ میکرون تهیه و به ترکیبات جدول ۳ اضافه شد. سپس از سوسپانسیون باکتریایی حاصل از محیط غنی سازی ۲ به این محیط تلقیح و بمدت ۲۱ روز در شیکر با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و 180 rpm قرار گرفت.

جدول ۳: ترکیبات محیط کشت جهت بررسی اکسیداسیون پیریت

$(NH_4)_2SO_4$	3 g
KCl	0.1 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
$Cu(NO_3)_2$	0.01 g
pH	5

در اکسیداسیون گوگرد عنصری مجموعه مواد جدول ٤ به غیر از گوگرد را به حجم یک لیتر رسانده سپس در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری یک گرم گوگرد و ۱۰ میلی لیتر از محیط مایع ساخته شده (جدول ٤) به آن اضافه و سوسپانسیون باکتریایی حاصل از محیط غنی سازی ۲ به آن تلقیح شد. نمونه ها بمدت ۲۱ روز در شیکر ۳۰ درجه سانتی گراد و 180 rpm قرار گرفتند.

جدول ٤: ترکیبات محیط کشت جهت بررسی اکسیداسیون گوگرد عنصری

$(NH_4)_2SO_4$	0.2 g
$CaCl_2$	0.25 g
K_2HPO_4	3 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
S	10g
$FeSO_4.7H_2O$	5mg
pH	5

در اکسیداسیون تیوسولفات، سوسپانسیون باکتریایی محیط غنی سازی ۲ به ترکیبات جدول ۵ اضافه و نمونه ها بمدت

Archive of SID
www.SID.ir

۲۱ روز در شیکر ۳۰ درجه سانتی گراد و 180 rpm قرار داده شد.

جدول ٥: ترکیبات محیط کشت جهت بررسی اکسیداسیون تیوسولفات

$(NH_4)_2SO_4$	3 g
$CaCl_2$	0.25g
K_2HPO_4	3 g
$MgSO_4 .7H_2O$	0.5 g
$Na_2S_2O_3 .5 H_2O$	0.5 g
pH	4.4

در اکسیداسیون سولفید معدنی محیط کشت پایه 9k با ترکیبات جدول ٦ را ساخته و ۰/۱ درصد وزنی – حجمی سولفید مس با عیار ۰/۱۸ درصد به آن اضافه و نمونه ها بمدت ۲۱ روز در شیکر ۳۰ درجه سانتی گراد و 180 rpm قرار گرفت.

جدول ٦: ترکیبات محیط کشت باکتری جهت بررسی اکسیداسیون سولفید مس

$FeSO_4$	0.01 g
$CaCl_2$	0.1 g
K_2HPO_4	0.4 g
$MgSO_4. 7H_2O$	0.5 g
$Na_2S_2O_3 .5 H_2O$	5 g
pH	4.4

۲ – سازش دهی باکتریها: بمنظور سازش دهی باکتریهای جداشده، از محیط کشت 9k بدون سولفات آهن با کانسنگ سولفیدی مس استفاده شد. به محیط کشت مقادیر ۱، ٥، ۱۰، ۱٥، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ٥۰، ٦۰، ۷۰ و ۸۰ درصد وزنی– حجمی کانسنگ سولفیدی با عیار ۰/۱۸ درصد مس اضافه شد. باکتری جداسازی شده از محیط حاوی ۱ درصد کانسنگ سولفیدی تلقیح شده در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و 180 rpmبعد از گذشت دو هفته به ظرف حاوی ٥ درصد وزنی – حجمی کانسنگ سولفیدی انتقال و بمدت ۲ هفته در انکوباتور نگهداری شد. هر دو هفته یکبار باکتری به محیط جدید حاوی درصد بالاتر کانسنگ سولفیدی انتقال یافت و کار سازش دهی باکتریهای جدا شده تا ۸۰ درصد وزنی – حجمی کانسنگ سولفیدی ادامه پیدا کرد. بمنظور بررسی میزان مقاومت این باکتری به مقادیر متفاوت مس محلول محیط پروکاریوت (١٦) با pH=۱/۸ تهیه و سپس سولفات مس تهیه شده بمیزان ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤، ۰/٥، ۰/٦، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ درصد وزنی – حجمی به محیط اضافه گردید و بمیزان مساوی سوسپانسیون باکتری تلقیح شد. نمونه ها بمدت ٢٤ ساعت در شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و 180 rpm قرار داده شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمایشهای انجام شده در مراحل اولیه کار نشان می دهد که گونه غالب موجود در معدن مس سرچشمه گونه تیوباسیلوس فرواکسیدانس می باشد که با توجه به فعالیت تغذیه ای این باکتری و استفاده از سولفیدهای مس بعنوان منبع تأمین انرژی دور از انتظار نیست. در ۷ نمونه از نمونه های مختلف جمع آوری شده از نقاط مختلف معدن و کشت شده بر روی محیط غنی شده شماره ۲ تغییر رنگ مشاهده شد. پس از گذشت ۳ هفته از کشت نمونه های جمع آوری شده فقط ۷ عدد از نمونه ها از سبز به قهوه ای مایل به قرمز تغییر یافت و رسوب زردرنگ $Fe(OH)_3$ نیز در داخل نمونه ها مشاهده شد. تهیه اسمیر از نمونه های رشد یافته و رنگ آمیزی گرم هر یک از ۷ نمونه رشد یافته باسیلهای ریز گرم منفی را نشان داد.

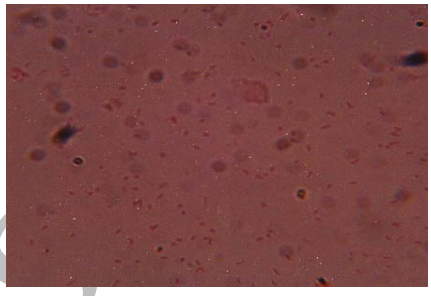
نتایج کشت خالص نمونه های رشد یافته در کشتهای متوالی پس از گذشت یک ماه کلونیهای ریز قهوه ای رنگ (شکل ۱) را در سطح پتریها نشان داد در اینحالت رنگ محیط کشت نیز زرد بود.

شکل ۱: کلنی باکتری ×۱۰۰ *Thiobacillus sp* تخلیص شده بر روی محیط جامد

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه اسمیر و رنگ آمیزی گرم انجام شده از کشتهای خالص نمونه های رشد یافته، باسیلهای ریز گرم منفی (شکل ۲) را با قارچ ساپروفیتی جدا شده از آن نشان داد این قارچ در pH اسیدی بخوبی رشد می کند بهمین دلیل هنگام ظاهر شدن کلونی باکتریایی، سطح محیط کشت از کنیدی قارچ نیز پوشیده بود و برداشت باکتری را غیر ممکن می ساخت.



شکل ۲: *Thioacillus ferrooxidans* ×۱۰۰۰

در مراحل اولیه تهیه کشت خالص باکتری قارچ نیز در محیط یافت شد که بمنظور تخلیص کامل باکتری و مزاحمت قارچ در کشتهای بعدی سیکلوهگزیمید استفاده و کشت خالص باکتری حاصل شد. سیکلوهگزیمید بعنوان یک قارچ کش مناسب تشخیص داده شد زیرا پس از ۳ بار کشت متوالی بر روی محیط کشت شماره ۲ حاوی سیکلوهگزیمید ۰/۵ درصد و انتقال به محیط کشت فاقد سیکلوهگزیمید مذکور، باکتری از قارچ جدا شد.

شناسایی باکتریها و آزمایش های افتراقی: از آنجا که جداسازی باکتریها و عمدتاً نتایج کیفی حاصل از کشتهای باکتریایی مورد نظر بوده و به عامل کمی قابل اندازه گیری دیگری جز pH در مراحل جداسازی و شناسایی کمتر توجه شد، لذا نتایج کمی که بتوان نمودار تهیه کرد وجود ندارد و بیشتر نتایج بصورت تغیرات رنگ و حضور یا عدم حضور کلونی باکتریایی است. جدول ۷ در واقع نتایج کمی و کیفی حاصل از آزمایشهای افتراقی است که با استفاده از آن شناسایی و سازش دهی انجام می شده بطورکلی صرفاً هدف جداسازی باکتری سازش پذیر به فعالیت در این مناطق معدنی با چشم انداز استفاده صنعتی در استخراج بیولوژیکی بوده است، که خوشبختانه نتایج لازم حاصل شد.

جدول ۷: نتایج کمی و کیفی آزمایش های افتراقی

	وضعیت رشد	pH اولیه	pH نهایی	رنگ
Pyrite	+	5	1.8	زرد مایل به سبز
CuS	+	5	2	زردرنگ
S	+	5	1.8	-------
Fe^{2+}	+	5	1.8	زرد مایل به سبز
$S_2O_3^{2-}$	+	4.4	2	بی رنگ

در آزمایشهای افتراقی زمان نیز ۲۱ روز انتخاب شد که در واقع نشان دهنده حداکثر نتیجه کیفی لازم از این آزمایشهاست در صورتیکه اگر زمان کمتر منظور می گردید احتمالاً نتایج کیفی و تغییر رنگ محیطها بطور کامل قابل تفکیک و بررسی نبود ضمن آنکه در مرحله سازش دهی باکتری بعد از عمل سازش با غلظتهای مختلف مس و احتمالاً جهش باکتریایی و سازگاری به فعالیت بر روی غلظتهای زیاد خاک مس، مرحله رشد باکتری سازش یافته بر روی یک محیط جامد دارای غلظت زیاد مس حداکثر ٤٨ ساعت به رشد کامل رسید. این مسئله نشان دهنده سازگاری باکتری به بهترین وجه انجام شده است بطوریکه پس از سازگار شدن حداکثر در مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت رشد می کند. پس از تخلیص باکتریهای رشد یافته، جهت شناسایی گونه باکتریایی آزمایشهای افتراقی بترتیب شامل اکسیداسیون پیریت، گوگرد عنصری، تیوسولفات و سولفید مس در کشتهای مختلف که بعضی از ترکیبات آنها تغییر کرده بود انجام شد و نتایج حاصل از آن نشان داد که در اکسیداسیون پیریت بعد از گذشت ۲۱ روز رنگ محیط از سیاه به زرد مایل به سبز تغییر کرد و pH محیط از ۵ به ۱/۸ کاهش یافت که نشان دهنده اکسیداسیون پیریت توسط این باکتری است (۱۵).

معادله ۱ $$FeS_2 + 3.5O_2 + H_2O \rightarrow Fe^{2+} + 2H^+ + 2SO_4{}^{2-}$$

Archive of SID

www.SID.ir

معادله ۲ $2Fe^{2+} + 0.5O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Fe^{3+} + H_2O$

در بررسی نتایج حاصل از اکسیداسیون گوگرد عنصری توسط باکتری جدا شده نیز تغییر pH محیط از ۵ به ۱/۸ را نشان داد که در محیط کشت خالص باکتری تعداد زیادی باکتری در این آزمایش دیده شد(۵ و ۱۵).

معادله ۳ $S^0 + \frac{3}{2}O_2 + H_2O \rightarrow 2H^+ + SO_4{}^{2-}$

همچنین در اکسیداسیون تیوسولفات رسوبات ریز سفید رنگی مشاهده شد که نشان دهنده مصرف تیوسولفات و تولید سولفیت و سولفات در داخل ظروف مشاهده شده است(٤).

در آزمایش بررسی اکسیداسیون سولفید معدنی بعد از گذشت ۲۱ روز از کشت باکتری تخلیص شده رنگ محیط به زرد تغییر کرد و pH به ۲ تقلیل یافت که نشان دهنده تبدیل سولفید مس به سولفات است(۲، ۷).

معادله ٤ $2Cu_2S + O_2 + 4H^+ \rightarrow 2CuS + 2Cu^{2+} + 2H_2O$

معادله ۵ $CuS + 0.5O_2 + 2H^+ \rightarrow Cu^{2+} + H_2O + S^0$

با توجه به بررسیهای بعمل آمده از رنگ آمیزی گرم و انجام آزمایشهای افتراقی و منابع موجود، رشد و تکثیر باکتریهای مزوفیل تیوباسیلوس فرواکسیدانس و تیوباسیلوس تیواکسیدانس را می توان انتظار داشت. اکسیداسیون گوگرد عنصری و تیوسولفات بوسیله هر دو باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس و تیوباسیلوس تیواکسیدانس انجام می شود که عدم توانایی اکسیداسیون آهن فرو توسط باکتری تیوباسیلوس تیواکسیدانس (٤) و همچنین عدم فعالیت باکتری تیوباسیلوس تیواکسیدانس در اکسیداسیون سولفید مس(۷) بطور قطع حضور و وفور باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس را در همه نمونه های تخلیص شده نشان می دهد. میزان سازگاری زیاد و رشد مناسب این باکتری در pH اسیدی استفاده از آن را در استخراج بیولوژیکی فلزاتی چون آهن(۹) ، روی(۱۲)، مولیبدن(١٤)، طلا(۱۳) و مس(۱۷) امکان پذیر کرده است بطوریکه بر اساس منابع موجود (۸) میزان مس استخراج شده توسط این باکتری در جهان در سال ۲۰۰۰ بمیزان ۱۳۲٤۳/۷ هزار تن بوده است. بطوریکه با بهینه سازی سیستم و ایجاد شرایط مناسب همچنان این مقدار در جهان رو به افزایش است.

از آنجا که غلظت زیاد سولفیدهای مس از فعالیت باکتری جلوگیری می کند و از طرفی بر اساس آزمایشهای سازش دهی، گونه ای از این باکتری فعالیت کرده و همچنین این گونه فعال میزان مس محلول را تا ۱۵۲٦۹ میلی گرم در لیتر تحمل کرده است می توان نتیجه گرفت که باکتری رشد یافته در آخرین مرحله آزمایش سازش دهی، در واقع شکل جهش یافته ای از باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس بومی معدن مس سرچشمه است که قابلیت رشد سریعی در غلظتهای بالای مس دارد بطوریکه در محیط غنی شده ۲ قادر است طی ٢٤ تا ٤٨ ساعت کاملاً رشد نماید و رنگ محیط را تغییر دهد. قابلیت سازش این باکتری بمقادیر بالای مس استفاده از آن را در پدیده استخراج میکروبی مس از کانسنگهای سولفیدی با عیارهای بالا امکان پذیر می کند که این پدیده خود می تواند یک طرح تحقیقاتی جهت بهینه سازی استخراج مس در واحدهای صنعتی از کانسنگهای سولفیدی با عیار بالا باشد. همان طور که بررسی میزان مقاومت باکتریهای جداسازی شده به مس محلول نشان می دهد این باکتری می تواند تا ۱۵۲٦۹ میلی گرم در لیتر مس محلول را در محیط تحمل کند اما به مقادیر بالاتر از آن حساس است. انواع عادی تیوباسیلوس فرواکسیدانس معمولا تا ٦٤ میلی گرم در لیتر مس محلول را تحمل می کنند (۱) بهمین دلیل گفته می شود که استفاده از باکتریها در صنعت استخراج بیولوژیکی در خاکهای معدنی کم عیار امکان پذیر است. از طرفی با بررسیهای بیشتر امکان یافت باکتریهایی که قادر به تحمل مس بیشتر ازحد ۱۵۲٦۹ میلی گرم در لیتر نیز وجود دارد که در این صورت اوج شکوفایی استخراج بیولوژیکی فلزات خواهد

Archive of SID

www.SID.ir

بود ضمن آنکه با پیشرفت این صنعت آلاینده محیطی دی اکسید گوگرد که امروزه در این معادن مسئله ساز است به کمترین مقدار خود خواهد رسید و شکوفایی زیست محیطی را نیز بدنبال خواهد داشت. بنابراین با توجه به لزوم استخراج فلزات با عیارهای بالا، استفاده از باکتری موتان یافته در سیستمهای بیولوژیکی استخراج این فلزات توصیه می شود.

منابع

۱. وقار،ر. اولیازاده، م. وقار، م. (۱۳۷۹). فناوری میکروبی در متالورژی. انتشارات دانشگاه صنایع و معادن. ۳۷۲ صفحه.

2. Balaz, P., Kupka, D., Bastl, Z., Achimovicova, M. (1996). Hydrometallurgy. 42: 237 – 244.

3. Bosecker, K. (1997). Bioleaching, metal solubilization by microorganisms. FMES Microbiology Reviews. 20: 591 - -604.

4. Brock, D, T. (1979). Biology of microorganisms. Thired edition .Prentice- Hall: 447.

5. Chen, Y., Lin, J. (2001). Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of pH. Chemosphere. 44: 1093 – 1102.

6. Clark, R., Erlich, T., Henry, J. (1998). Copper removal from industrial waste by bioleaching. Journal of Industerial Microbiology. 213 – 218.

7. Donati, E., Curutchet, G. Pogliani, C., Tedesco, P. (1995). Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Process Biochemistry. 31: 129 – 134.

8. Fernando, A. (2002). Present and future of bioleaching in developing countries. Electronic journal of biotechnology. 5: 196-199.

9. Komnitsas, K. Xenidis, A. Adam, K. (1995). Oxidation of pyrite and arsenopyrite in sulphidic soils in Lavrion. Minerals Engineering.8: 1443 – 1454.

10. Krebs, W., Brombacher, C., Bosshard, P., Bachofen, R., Brandl, H. (1997). Microbial recovery of metals from solids. FEMS Microbiology Reviews. 20: 605 – 617.

11. Kreig, N. R., Holt, J, G. (1984). Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Williams and Wilkins Publishing Co.

12. Lizama, M. Suzuki, I. (1989). Bacterial leaching of a sulphide ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Hydrometallurgy. 22: 301 – 310.

13. Petre, A, S. (2001). Influence of bacterial culture selection on the operation of a plant treating refractory gold ore. Miner Process. 62: 217 – 229.

14. Promano, P. Blazques, M, L. Ballester, A. Alguacil, F. (2001). Reactivity of a molybbenite concentrates against chemical or bacterial attack. Minerals Engineering. 14: 987 – 996.

15. Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P., Schippers, A. (2001). Biochemistry of bacterial leaching-direct versus indirect bioleaching. Hydrometallurgy. 59: 159 – 175.

16. Starr, M, P., Hein, S. (1981). The Prokaryots, the Genera *Thiobacillus*. 1: 1023 – 1036.

17. Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. Hydrometallurgy. 59: 177- 185.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از اساتید محترم، سرکار خانم دکتر نسرین معظمی ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، دکتر سعید میردامادی، دکتر محمد کرمی نژاد، دکتر احمدرضا شاهوردی، مهندس سعید سلیمانی، مهندس مریم قطبی و مهندس آرمیتا فرهمند بواسطه همکاری و زحمات بی دریغشان تشکر و قدردانی می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation, Purification, Identification and Adaptation of the Mesophilic Bacteria in Sarcheshmeh Copper Mine

Tahmooresi M., Salari H.*, and Kamkar E.

International center for science, high technology and environmental science, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

In order to isolate and identify endemic bacteria which affect in bioleaching process on low grade copper sulphide, twenty four samples of water, soil and sludge were collected from various sites of Sarcheshmeh copper mine. These samples were cultured. Bacteria growth was observed on seven samples. Isolation and purification stages were implemented on these samples. Then bacteria were identified using morphological and diffrentional experiments. The total isolated bacteria of seven samples were gram negative *Bacilli* which were able to oxide the pyrite, elementary sulphur, tiosulphat, copper sulphide and ferrous iron. These oxidations were mainly accompanied by changes on pH and culture medium color. The purified bacteria had the same characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* bacterium from the point of view of morphological characteristics and differentional experiments. The adaptation of this bacterium to the high concentration of copper was performed on consequently cultures. The adaptated bacterium was a mutated species of endemic *T. ferrooxidans* which was completely grown on propitiate medium for 24 – 48 hours and was able to tolerate the solute copper up to 15269 ppm.

Keywords*: Thiobacillus ferrooxidans,* Sarcheshmeh copper mine. Purification and Isolation

Archive of SID

www.SID.ir