

مطالعه تأثیر اندازه ذره‌ها بر رفتار ته‌نشینی زیستی هماتیت توسط باسیلوس لیچنیفورمیس

مرضیه صادقی‌زاده، سید محمدرفوف حسینی*⁺، علی احمدی عامله

دانشکده مهندسی معدن، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده: در این پژوهش، فلوکولاسیون زیستی هماتیت‌های ریز دانه در دو اندازه گوناگون با استفاده از سلول‌های باسیلوس لیچنیفورمیس و فراورده‌های متابولیک آن بررسی شد. طبق نتیجه‌ها در بهترین حالت، بیش از ۹۹ درصد هماتیت ریزدانه ($d_{50}=37\mu m$) و خیلی ریزدانه ($d_{50}=17\mu m$) به ترتیب در pHهای ۵ و ۷ با استفاده از سلول‌های باکتریایی ته‌نشین شد. مقایسه نتیجه‌های به دست آمده مشخص کرد که ته‌نشینی ذره‌های هماتیت خیلی ریزدانه نسبت به آزمایش شاهد % ۳۳ و ذره‌های هماتیت ریزدانه، % ۱۸ بهبود یافت. همچنین، آزمایش‌های جذب بیوفلوکولانت‌ها نشان داد که نتیجه‌های ته‌نشینی از مقدارهای جذب پیروی می‌کنند، به طوری که در pHهای اسیدی، جذب سلول، پروتئین و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی بر هماتیت ریزدانه و در pH خنثی و بازی، جذب بر هماتیت خیلی ریزدانه، بیشتر است. بنابراین، همین پدیده باعث افزایش ته‌نشینی هماتیت خیلی ریزدانه در حد هماتیت ریزدانه و حتی بالاتر در pHهای خنثی و بازی شده است.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس لیچنیفورمیس؛ بیوفلوکولاسیون؛ هماتیت؛ پلی‌ساکارید؛ پروتئین.

KEYWORDS: *Bacillus licheniformis; Bioflocculation; Hematite; Polysaccharide; Protein.*

مقدمه

بار سطحی می‌تواند مثبت، منفی یا خنثی باشد. اگر سطح ذره‌ها، دارای بار مثبت باشد و یون‌ها یا عامل‌های شیمیایی دارای بار منفی در اطراف آن وجود داشته باشد، سطح ذره‌ها در اثر نیروی الکتروستاتیک به یون‌ها یا عامل‌های شیمیایی متصل شده و موجب کوگولاسیون یا فلوکولاسیون ذره‌ها می‌شود [۴]. فلوکولانت‌ها زنجیره‌های پلیمری هستند که بار سطحی ذره‌های معلق را کم یا خنثی کرده و ته‌نشینی آن‌ها را بهبود می‌دهند. در فلوکولاسیون، ابتدا نمک‌های غیر آلی موجب کم شدن بار سطحی ذره‌ها شده، سپس مولکول‌های پلیمری مانند پل مابین ذره‌ها عمل کرده و با اتصال ذره‌ها به هم، سرعت ته‌نشینی ذره‌های کانی را افزایش می‌دهند. فلوکولانت‌های پلیمری رایج دارای عیب‌هایی

فلوکولاسیون انتخابی و فلوکولاسیون کاتیونی معکوس، روش‌های مناسب برای خالص‌سازی هماتیت، از ترکیب‌های همراه می‌باشند [۱]. ذره‌های ریز (نرمه‌ها) هماتیت، در تیکتر به عنوان باطله، همراه با گانگ به سد باطله می‌رود و در نتیجه باعث کاهش راندمان می‌شود. در فلوکولاسیون انتخابی هماتیت، با افزودن فلوکولانت به دوغاب، موجب اتصال ذره‌های ریز هماتیت به هم و ته‌نشینی سریع آن و ازسوی دیگر معلق ماندن کانی‌های ناخواسته، و سرانجام پرعیار سازی هماتیت می‌شود. این روش بر پایه شیمی سطح ذره‌ها و شیمی آب می‌باشد [۲، ۳]. سطح هر کانی در محیط آبی، بار الکتریکی مشخصی دارد. pH محیط نقش مهمی در بار سطحی کانی‌ها بازی می‌کند. در یک pH مشخص،

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: r.hosseini@cc.iut.ac.ir

استفاده شده و میزان ته‌نشینی هماتیت و جذب بیوسورفکتانت‌ها در هردو فراکسیون ابعادی مقایسه شده است.

بخش تجربی

مواد معدنی و باکتری

نمونه هماتیت مورد استفاده در این آزمایش، از شرکت توما واقع در اصفهان خریداری شد. نمونه توسط پراش پرتو ایکس (XRD) و آنالیز فلورسانس پرتو ایکس (XRF) مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۱ و جدول ۱). پیک‌های اصلی که در شکل ۱ مشخص شده‌اند، مربوط به هماتیت با کد PDF ۰۱-۰۸۶-۲۳۶۸ و کوارتز با کد PDF ۰۱-۰۸۶-۱۵۶۰ می‌باشند.

مطابق آنالیز XRF که در جدول ۱ نشان داده شده است، کانی اصلی نمونه، هماتیت و با خلوص حدود ۸۰٪ بود. نمونه زیر سرد ۴۰۰ مش، جدا شده و با نام "ریزدانه" مورد استفاده قرار گرفت. سپس، ۱۵۰ g نمونه زیر ۴۰۰ مش با دستگاه پودرکن لب - تکنیک به مدت پنج دقیقه خرد شد و "خیلی ریزدانه" نامیده شد. باکتری *باسیلوس لیچنیفورمیس* ۱۳۲۰ PTCC به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

به منظور تعیین سطح ویژه ذره‌های هماتیت از روش BET بر اساس جذب گاز نیتروژن استفاده شد. بر این اساس، سطح ویژه ذره‌ها برای هماتیت ریزدانه، $8/871 \text{ m}^2/\text{g}$ و برای هماتیت خیلی ریزدانه، $13/838 \text{ m}^2/\text{g}$ به دست آمد. همچنین، آنالیز تعیین توزیع دانه‌بندی با استفاده از آنالیز لیزری DLS نشان داد که برای هماتیت ریزدانه، $d_{50} = 3/7 \mu\text{m}$ و برای هماتیت خیلی ریزدانه، $d_{50} = 1/7 \mu\text{m}$ می‌باشند. نمودارهای توزیع دانه‌بندی هر دو نمونه هماتیت در شکل ۲ نشان داده شده‌اند.

کشت و رشد میکروب

در ابتدا، ۹۰ mL محیط کشت بذر (شامل پیتون، ۵ g/L؛ عصاره گوشت، ۳ g/L؛ MnCl_2 ، ۱۰ mg/L؛ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۰۰ mg/L) در ارلن‌های ۵۰۰ mL آماده و استریل شد [۵]. پس از تلقیح باکتری به محیط کشت یاد شده، ارلن‌ها در شیکر-انکوباتور ژال تجهیز مدل (JTSL20) دور ۱۵۰ rpm و دمای 35°C قرار داده شدند. پس از ۲۴h، ۱۰ mL از محیط کشت به دست آمده به ۹۰ mL محیط کشت استریل تازه (شامل ۵۰ g/L گلوکز؛ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۱۲/۸ g/L؛ KH_2PO_4 ،

همچون نبود بازدهی کافی، آلودگی زیست محیطی و خطرهایی برای سلامتی انسان می‌باشند [۵، ۶]. یک روش جایگزین مناسب، استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان اصلاح کننده سطح کانی می‌باشد که میزان هزینه‌ها و مشکل‌های زیست محیطی را کمینه کند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده می‌توانند شامل انواع قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها باشند. استفاده از باکتری‌ها برای فرآوری کانه‌های آهن در چندین کار گزارش شده است.

به‌عنوان نمونه، میسر^(۱) و همکاران در سال ۱۹۹۳ میلادی [۷] از باکتری *Mycobacterium phlei* برای شناورسازی هماتیت استفاده کردند. افزون بر این، اشنایدر^(۲) و همکاران در سال ۱۹۹۴ میلادی [۸] نشان دادند که سلول‌ها و محتویات سلولی مخمر *Candida parapsilosis* می‌توانند به اندازه نشاسته ذرت و پلی‌آکریل‌آمید در افزایش ته‌نشینی ذره‌های هماتیت مؤثر باشند. همچنین، دئو و ناتاراجان^(۳) [۹] قابلیت سلول‌های *Paenibacillus polymyxa* را در بیوفلوکولاسیون و بیوفلوکولاسیون انتخابی کوارتز، هماتیت، کروندوم و کائولینیت برای جدایش انتخابی کانی‌های رسی از اکسیدهای آهن بررسی نمودند. در پژوهشی دیگر [۱۰]، از سلول‌های *Rhodococcus erythropolis* به‌عنوان کلکتور هماتیت، برای جدایش هماتیت از آپاتیت، کائولینیت و سیلیس استفاده شد. به‌کارگیری *Rhodococcus opacus* برای جدایش هماتیت از سیلیس از دیگر کارهای انجام شده در این زمینه است [۱۱]. همچنین، بیوفلوکولاسیون کائولینیت، توسط باکتری *Bacillus licheniformis* و *Bacillus firmus* مورد مطالعه قرار گرفت [۱۲] و در مطالعه‌های اخیر، سلول‌های *Bacillus subtilis* و متابولیت آن در جدایش مؤثر هماتیت از کائولینیت [۱۳] و همچنین تولید بیوسورفکتانت [۱۴] به‌کار گرفته شد. همچنین، نشان داده شد که اتصال این باکتری به ذره‌های زغال‌سنگ، مستقل از pH بوده و تحت تاثیر نیروی جاذبه اسید - باز انجام می‌شود و بنابراین، می‌تواند به‌عنوان یک بیوفلوکولانت خوب برای زغال‌سنگ استفاده شود [۱۵].

سرانجام، با توجه به این‌که تاکنون پژوهشی در زمینه تأثیر اندازه ذره‌ها بر ته‌نشینی زیستی کانی‌ها از جمله هماتیت صورت نگرفته است، در کار حاضر، از باکتری *B. licheniformis* و فرآورده‌های متابولیکی آن، برای مقایسه فلوکولاسیون هماتیت ریزدانه ($d_{50} = 3/7 \mu\text{m}$) و خیلی ریزدانه ($d_{50} = 1/7 \mu\text{m}$)

(۱) M. Misra

(۳) N. Deo and K. A. Natarajan

(۲) I. A. H. Schneider

جدول ۱- نتیجه آنالیز XRF نمونه هماتیت.

ترکیب	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	L.O.I
درصد	۸۱	۱۰/۷	۰/۷	۱/۹	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۳/۶

در یخچال نگهداری شد و سپس با سانتریفیوژ، رسوب پلی‌ساکارید از محیط‌کشت جداسازی شد [۱۶]. سرانجام دو رسوب به‌دست‌آمده، در ۱۰۰ mL آب مقطر حل شدند تا به غلظتی همانند آن‌چه در متابولیت اولیه بوده برسند.

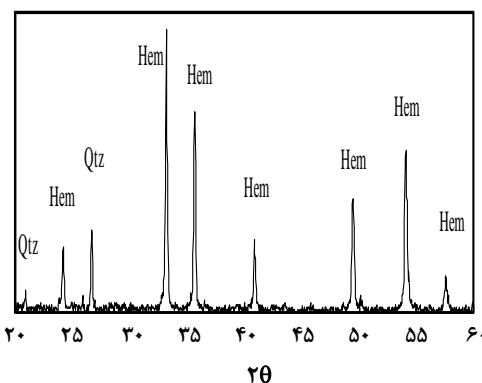
آزمایش‌های ته‌نشینی

آزمایش‌های ته‌نشینی دو نمونه هماتیت، نخست به صورت شاهد و بدون استفاده از هیچ عاملی انجام گرفت. در آزمایش‌های شاهد، ۸۰ mL آب به ۲ g یا ۵ g از هماتیت مورد نظر اضافه شد. پس از ۵ min همزنی توسط مگنت، pH سوسپانسیون تنظیم شد. برای تغییر pH سوسپانسیون، سود ۱M یا سولفوریک اسید ۳M افزوده شد. بعد از آماده‌سازی و تنظیم pH مورد نظر، سوسپانسیون در یک استوانه مدرج، به حجم ۱۰۰ mL رسانده و به مدت ۵ min در ۱۰ بار سروته شد. پس از ۳ min که سوسپانسیون به‌حالت سکون باقی ماند؛ ۹۰ mL مایع رویی رسوب با سرنگ برداشته شده و ذره‌های ته‌نشین شده باقیمانده، خشک و توزین شدند.

برای آزمایش ته‌نشینی با سلول‌ها، ۲۰ mL از سوسپانسیون سلول‌های باکتری به‌تدریج، در مرحله همزنی به سوسپانسیون هماتیت افزوده شده تا به غلظت $10^8 \times 3/6$ cell/mL رسید. مرحله‌های بعدی، همانند آزمایش شاهد انجام شد. به‌همین صورت برای آزمایش ته‌نشینی با متابولیت، پروتئین و پلی‌ساکارید، ۲۰ mL از هر کدام از این عامل‌ها در مرحله همزنی، مانند آن‌چه در مورد سلول بیان شد به سوسپانسیون کانی افزوده شد و مرحله‌های همانند حالت شاهد انجام گرفت.

آزمایش‌های جذب

برای انجام آزمایش جذب، ۱ g از هماتیت مورد نظر، به ۵۰ mL محلول پروتئین، پلی‌ساکارید و سوسپانسیون سلول باکتریایی، افزوده شد. pH سوسپانسیون مورد نظر بین ۲ تا ۹ تنظیم، و به مدت ۱۵ min در دمای ۳۵ °C همزنی شد. از سوسپانسیون، پیش از افزودن هماتیت و پس از همزنی نمونه‌گیری شده و اختلاف غلظت سلول، پروتئین و پلی‌ساکارید پیش و پس از همزنی به‌عنوان مقدار جذب شده به‌دست آمد. غلظت پروتئین با استفاده



شکل ۱- نتیجه آنالیز XRD نمونه هماتیت.

۳ g/L NaCl، ۰/۵ g/L NH₄Cl، ۰/۱ g/L MgSO₄، ۰/۲۴ g/L CaCl₂، ۰/۱۱ g/L) افزوده و به مدت ۴ روز در شیکر - آنکوباتور با شرایط قبل قرار گرفت [۱۶]. pH اولیه در نمونه‌های تلقیح شده حدود ۶ تا ۷ بود که پس از طی دوره کشت در محیط گلوکز به حدود ۵/۸ رسید.

جداسازی سلول‌ها

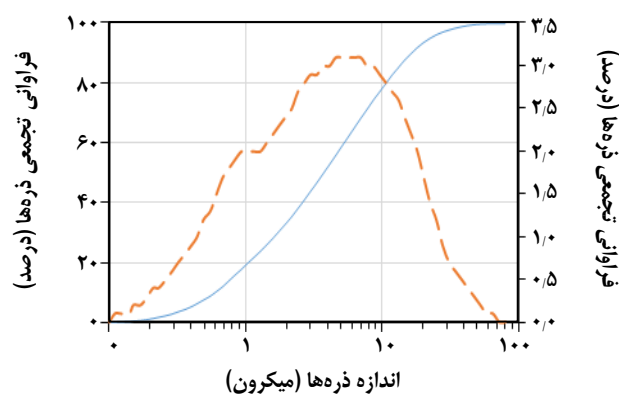
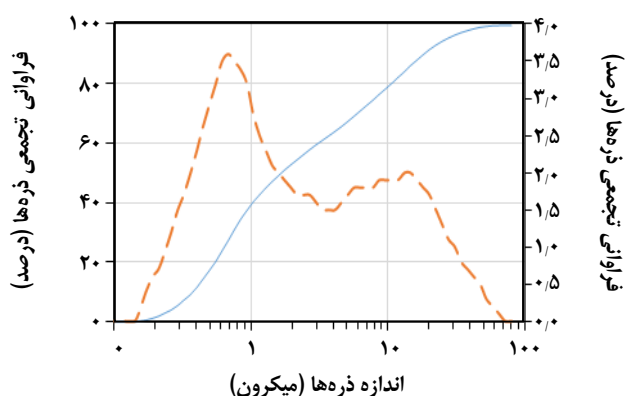
محیط‌کشت پس از ۴ روز رشد سلول‌های باکتری، در سانتریفیوژ هتیج یونیورسال مدل ۳۲۰R با دور ۵۰۰۰ rpm، به مدت ۱۰ min و دمای ۴ °C قرار داده شد و پس از سه بار شستشوی باکتری با آب مقطر دوبار یون‌زدایی شده، سلول‌ها از متابولیت جدا شدند.

آماده‌سازی متابولیت، پروتئین و پلی‌ساکارید

متابولیت جداشده از سلول، دارای پروتئین و پلی‌ساکارید آزاد شده از سلول باکتریایی بود. برای استخراج پروتئین، ۶۰ g آمونیوم سولفات در ارنل دارای متابولیت به آرامی حل شده و در دمای ۴ °C، به مدت ۲۴ h ساعت نگهداری شد تا پروتئین رسوب کند. پس از آن، با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min و دمای ۴ °C، پروتئین از محلول جدا شد [۱۴]. برای ترسیب پلی‌ساکارید از محیط کشت، اتانول سرد با نسبت ۲:۱ به ارنل محتوی متابولیت افزوده شد و به مدت ۲۴ h در دمای ۴ °C

جدول ۲- متغیرها و سطح‌های مورد استفاده در طرح آزمایشی.

متغیرها		A	B	C	D
		فلوکولانت	pH	جامد	اندازه
سطح‌های	۱	شاهد	۲	۲g	$d_{50}=37 \mu m$
	۲	سلول	۳	۵g	$d_{50}=17 \mu m$
	۳	متابولیت	۵		
	۴	پروتئین	۷		
	۵	پلی ساکارید	۹		



شکل ۲- نمودارهای توزیع دانه‌بندی (الف) هماتیت ریزدانه و (ب) هماتیت فوق ریزدانه. خط‌چین: نمودار فراوانی، خط ممتد: نمودار فراوانی تجمعی.

پلی ساکارید را به‌دست آورده و به‌عنوان میزان جذب بر هر مترمربع هماتیت بیان شد.

طراحی آزمایش

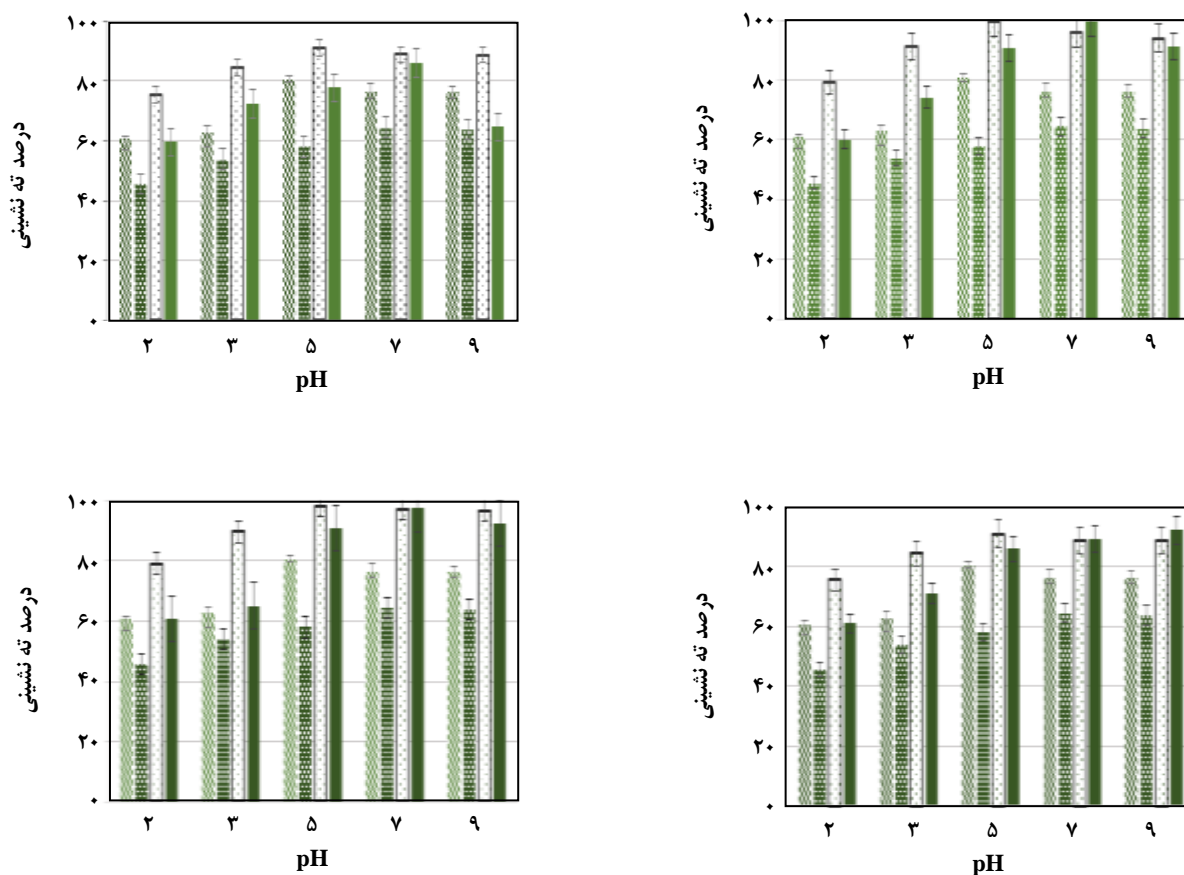
برای بررسی آزمایش‌های بیوفلوکولاسیون، از طرح آزمایشی فاکتوریل کامل استفاده شد. پارامترهای مورد بررسی شامل نوع بیوسورفکتانت، pH، درصد جامد و اندازه ذره‌های هماتیت بودند، که در جدول ۲ نشان‌داده شده‌اند. همه آزمایش‌ها دوبار تکرار و نتیجه‌های آن‌ها توسط نرم افزار Design Expert نسخه هفت تحلیل شدند.

نتیجه‌ها و بحث

آزمایش ته‌نشینی

میزان ته‌نشینی هماتیت ریزدانه و خیلی ریزدانه در شکل ۳ نشان داده شده است. مطابق این شکل میزان ته‌نشینی هماتیت ریزدانه شاهد، بین ۶۰/۷۲ تا ۷۶/۲۵٪ به‌دست آمد.

از روش بردفورد [۱۸] اندازه‌گیری شد. ۵۰ μL از نمونه گرفته شده با بافر ۰/۰۱ M کلرید سدیم به حجم ۱ mL رسانده شد. سپس با افزودن ۲ mL محلول بردفورد و همزنی کامل، غلظت پروتئین محلول توسط UV-Vis اسپکتروفوتومتر مدل Unico 2100 در طول موج ۵۹۵ nm به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری میزان جذب سلول‌ها بر سطح هماتیت، از لیز کردن سلول‌ها و اندازه‌گیری پروتئین درون سلولی استفاده شد. نمونه سلول باکتریایی با بافر PBS (شامل نمک‌های فسفات و ۱۰ mM ایمیدازول) به‌حجم ۱۰ mL رسیده و با استفاده از اولتراسونیک (به مدت ۲۴۰ s، پالس ۵s) لیز شده، سرانجام ۱۰۰ μL از آن نمونه گیری و با روش بردفورد غلظت‌سنجی شد. غلظت پلی‌ساکارید با استفاده از روش فنول سولفوریک‌اسید [۱۹] به‌دست آمد. ۲۵ μl از نمونه پلی‌ساکارید پیش و پس از همزنی برداشته و با بافر ۰/۰۱ M سدیم کلرید به حجم ۱ mL رسانیده، سپس ۱ mL فنول و ۵ mL سولفوریک‌اسید را به ترتیب به محلول افزوده شد و به‌خوبی همزده شد؛ پس از ۳۰ min قرارگرفتن در حالت سکون، در طول موج ۴۹۰ nm غلظت



شکل ۳- ته‌نشینی سوسپانسیون هماتیت با ۲ درصد جامد (الف سلول، ب) متابولیت، (ج) پروتئین، (د) پلی ساکارید.
(■) شاهد-ریزدانه، (▨) شاهد-فوق ریزدانه، (▩) ریزدانه، (□) فوق ریزدانه.

یا حذف می‌شود [۲۰]. این امر باعث تقویت نیروهای جاذبه مانند نیروهای لاندن-واندروالس، کشش سطحی بین ذره‌ها و تسریع ته‌نشینی می‌شود. در حالت شاهد خیلی ریزدانه، مطابق شکل ۳ میزان ته‌نشینی بین ۴۵/۶ در pH ۲ تا ۶۴/۴۵ در pH ۷ بود. هاسلون^(۱) [۴، ۲] و کوزمولسکی^(۲) [۲۲، ۲۱] میزان PZC هماتیت خیلی ریزدانه را در حدود pH ۷ اعلام کردند. طبق شکل ۳، بیش‌ترین مقدار ته‌نشینی هماتیت فوق ریزدانه در pH ۷ به دست آمد که نتیجه‌های مطالعه‌های یاد شده را تأیید می‌کند. همچنین، دیده می‌شود که به تقریب در تمامی pHها برای آزمایش‌های شاهد و بیوفلوکولانت، میزان ته‌نشینی هماتیت خیلی ریزدانه به‌طور کلی کمتر از هماتیت ریزدانه می‌باشد، که دلیل این مشاهده، سرعت ته‌نشینی کمتر ذره‌های خیلی ریزدانه بعلاوه وزن پایین‌تر و پراکندگی بیش‌تر آنهاست.

همچنانکه مشخص است، میزان ته‌نشینی هماتیت ریزدانه با افزایش pH بهبود یافته و بالاترین میزان ته‌نشینی در pH ۵ دیده شد. دلیل این افزایش می‌تواند مربوط به بار سطحی هماتیت ریزدانه باشد، زیرا نقطه بار صفر (PZC) هماتیت در حدود pH ۵/۵ می‌باشد [۹، ۱۳، ۲۰]. بار سطحی ذره‌های معلق در محلول، با توجه به pH محیط می‌تواند مثبت یا منفی باشد. ذره‌های با بار مشابه یکدیگر را دفع می‌کنند؛ این نیروی دافعه از نزدیک شدن ذره‌ها به یکدیگر جلوگیری می‌کند و موجب معلق ماندن ذره‌ها می‌شود، که این امر در فرایند ته‌نشینی تولید مشکل می‌کند. در حالت شاهد و بدون افزودن فلوکولانت، کوگولاسیون طبیعی بیش‌تر در PZC کانی رخ می‌دهد، زیرا بار الکتریکی سطحی ذره‌ها در این نقطه خنثی شده و در نتیجه، نیروی دافعه کاسته

(۱) Haselhuhn

(۲) Kosmulski

سطح کانی منفی می‌شود؛ از طرفی حضور گروه‌های دارای بار منفی متابولیت، ایجاد نیروی دافعه بین کانی و متابولیت کرده و موجب می‌شود میزان ته‌نشینی نسبت به شاهد، تفاوت چشمگیری نداشته باشد.

هنگامی که از پروتئین‌های به‌دست آمده از متابولیت‌ها، برای ته‌نشینی هماتیت استفاده شد، مشابه مابقی فلوکولانت‌ها، ته‌نشینی بهبود یافت. پروتئین‌ها دارای گروه‌های آمین و کربوکسیل هستند [۱۳]. همان‌گونه که پیش‌تر گفته شد آمین‌ها تا بازه‌ی pH خنثی دارای بار مثبت هستند. کربوکسیل‌ها نیز معمولاً دارای بار منفی و در بازه‌ی اسیدی بدون بار می‌باشند [۲۳]. بنابراین، در محیط اسیدی، نیروی دافعه بین بارهای همنام هماتیت و گروه‌های آمینی موجب کاهش ته‌نشینی با پروتئین می‌شود. در شکل ۳ (ج) هماتیت ریزدانه در pH بازه‌ی خنثی، نسبت به آزمایش شاهد، حدود ۱۲-۱۰٪ افزایش ته‌نشینی داشت، در حالی‌که شیب افزایش ته‌نشینی در pH زیر ۵ بیش‌تر بود و از ۵ pH به بعد، این روند افزایشی با شیب ملایم‌تری صورت گرفته است. می‌توان گفت حضور هماتیت با بار منفی در مجاورت گروه عاملی آمین با بار مثبت موجب بهبود نسبی جذب و ته‌نشینی تا ۹ pH برابر شده است. میزان ته‌نشینی هماتیت فوق ریزدانه با پروتئین در بازه‌ی خنثی ۲۲-۲۰٪ نسبت به آزمایش شاهد، افزایش را نشان داد. نتیجه‌های جذب پروتئین که در شکل ۴ (ب) آمده نیز این تفاوت را نشان می‌دهد. مقدار جذب پروتئین بر هماتیت خیلی ریزدانه ۰/۲۵ mg/g بالاتر از هماتیت ریزدانه در pH برابر بوده است؛ لیکن، با در نظر گرفتن سطح ویژه ذره‌ها، دیده می‌شود که میزان پروتئین جذب شده در واحد سطح، توسط ذره‌های خیلی ریزدانه کم‌تر است. به‌نظر می‌رسد که در نتیجه جذب بالاتر پروتئین، میزان ته‌نشینی بیش‌تری نیز برای هماتیت فوق ریزدانه دیده شده است.

ته‌نشینی با پلی ساکاریدهای بیرون سلولی همانند سلول‌های باکتریایی بازدهی بالایی را داشت. پلی ساکاریدها آب‌دوست هستند و جذب آن‌ها بر سطح هماتیت، موجب افزایش آب‌دوستی هماتیت و بازداشت آن در سوسپانسیون می‌شود. افزون بر این، پلی ساکارید دارای گروه‌های عاملی کربوکسیل، فسفریل و هیدروکسیل می‌باشند، بنابراین در بازه‌ی وسیعی از pH دارای بار منفی می‌باشد [۱۳] که می‌تواند در اثر نیروی الکتروستاتیک جذب سطح مثبت هماتیت، به‌ویژه در بازه‌ی اسیدی شده و موجب فلوکوله کردن ذره‌های ریز آن شود؛ به‌طوری‌که در ۳ pH

در شکل (۳ الف) میزان ته‌نشینی دو نوع هماتیت با سلول‌های باکتریایی نشان داده شده است؛ بیشینه ته‌نشینی هماتیت ریزدانه با سلول‌ها، ۹۹/۴٪ و در ۵ pH دیده شده که با افزایش pH به تدریج کاهش یافت. ته‌نشینی ریزدانه با سلول‌ها، نسبت به حالت شاهد ۱۹٪ بهبود داشت. نقطه بار صفر سلول‌های باکتریایی بین ۲-۴ pH می‌باشد، و در pH های بالاتر از این، دیواره سلول دارای بار منفی می‌شود. بنظر می‌رسد پیوند الکتروستاتیک بین ذره‌های هماتیت هیدراته (با بار مثبت) و سلول‌ها (با بار منفی)، موجب افزایش ته‌نشینی شده است. در pH بالاتر از ۵/۵ قاعدتاً با افزایش تدریجی دافعه الکتروستاتیک می‌بایست موجب کاهش جذب سلول‌ها و ته‌نشینی شود، با این وجود اختلاف چشمگیری بین ته‌نشینی در ۹ pH نسبت به ۵ pH دیده نشد. این امر می‌تواند بخاطر وجود پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب بین ذره‌های کانی و سطح سلول‌ها در pH های بالاتر باشد. ته‌نشینی هماتیت خیلی ریزدانه با سلول در ۷ pH با ته‌نشینی ریزدانه در ۵ pH به تقریب برابر است. زیرا همان‌گونه که گفته شد، به نظر می‌رسد PZC ذره‌های ریزدانه و خیلی ریزدانه باهم متفاوت هستند. در شکل ۴ (الف) جذب سلول‌ها بر هماتیت خیلی ریزدانه تا ۷ pH روند افزایشی دارد، درحالی‌که جذب سلول بر ذره‌های ریزدانه در ۵ pH به بیشینه مقدار خود می‌رسد. همچنین، همواره وزن سلول جذب شده در واحد سطح هماتیت ریزدانه بیش‌تر از خیلی ریزدانه است.

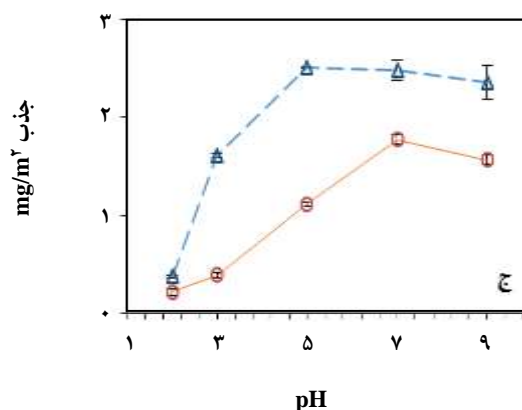
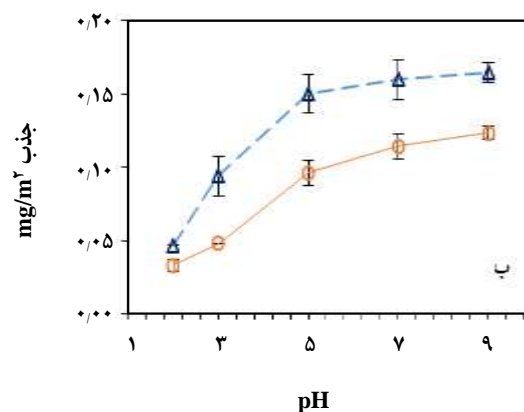
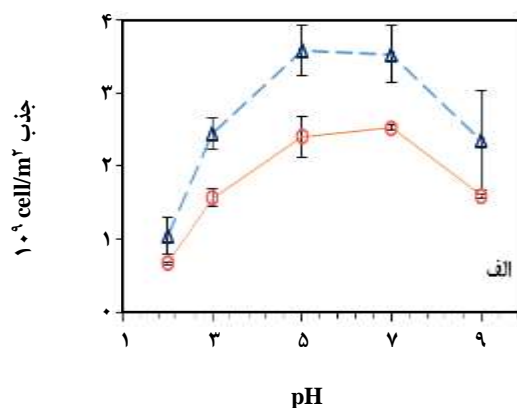
شکل ۳ (ب) ته‌نشینی دو نمونه هماتیت را با متابولیت نسبت به شاهد مقایسه کرده است. همانند ته‌نشینی با سلول، در این حالت نیز در همه pH ها، ته‌نشینی نسبت به حالت شاهد، افزایش یافته است. برای هماتیت ریزدانه، این افزایش در ۲-۵ pH چشمگیر بود. علت این مشاهده را شاید بتوان این‌گونه توجیه کرد که متابولیت، دارای گروه‌های عاملی کربوکسیل با PZC (۲-۶ pH)، فسفولیپید (۲/۴-۷/۲ pH)، فسفودیستر (۳/۲-۳/۵ pH)، هیدروکسیل (۹-۱۰ pH) و گروه آمین (۹-۱۱ pH) هستند که گروه‌های عاملی فسفریل و کربوکسیل متابولیت در pH های بالاتر از PZC خود، جذب ذره‌های هماتیت هیدراته (با بار مثبت) شده‌اند [۲۳، ۹].

به‌نظر می‌رسد نیروی جاذبه الکتروستاتیک بین ذره‌های هماتیت و گروه‌های عاملی دارای بار منفی، نقش اصلی را در ته‌نشینی با متابولیت ایفا می‌کند. با استفاده از متابولیت‌ها به عنوان بیوفلکولانت، بهترین ته‌نشینی در pH های ۵ و ۷ به‌ترتیب برای نمونه ریزدانه و فوق ریزدانه رخ داد، که نسبت به حالت شاهد در همین شرایط، حدود ۱۰٪ ارتقا داشت. در pH های بالاتر از PZC،

ته‌نشینی هماتیت ریزدانه حدود ۲۷٪ بالاتر از آزمایش شاهد بود و در pH ۵ بالاترین فلوکولاسیون هماتیت ریزدانه (در حدود ۹۸٪) دیده شد. نتیجه‌های ته‌نشینی هماتیت خیلی ریزدانه نیز با پلی ساکارید حاکی از آن است که پلی ساکارید تأثیر بیشتری بر فلوکوله شدن ذره‌ها در این اندازه داشته است. در شکل ۳ (د) در pH برابر ۷ هماتیت خیلی ریزدانه حدود ۳۳٪ نسبت به حالت شاهد بهبود فلوکولاسیون داشته است. همینطور، ته‌نشینی هماتیت ریزدانه در pH برابر ۵ تقریباً ۱۸٪ افزایش داشته است. از طرفی، نتیجه‌های جذب پلی ساکاریدها بر سطح هماتیت که در شکل ۴ (ج) آمده است، بیانگر این است که میزان جذب پلی ساکارید بر هماتیت خیلی ریزدانه در بازه‌ی خنثی به بیش‌ترین مقدار خود رسیده است. همچنین، برای هماتیت ریزدانه، بیشینه جذب در pH برابر ۵ بوده است. در صورت محاسبه جذب پلی‌ساکارید بر واحد وزن جاذب، جذب پلی‌ساکارید بر هر گرم هماتیت خیلی ریزدانه، در بهترین حالت، ۲/۴ mg/g بیش‌تر از هماتیت ریزدانه بوده است. همچنین، نتیجه‌های جذب، غلظت پلی ساکارید و پروتئین به‌دست آمده از متابولیت را مشخص می‌کند. میزان غلظت پلی ساکارید و پروتئین تولید شده توسط سلول‌های باکتریایی به ترتیب ۲/۴ mg/mL و ۷۲ µg/mL می‌باشد. بنابراین، یک علت دیگر تأثیر بالاتر پلی ساکارید بر ته‌نشینی هماتیت نسبت به پروتئین، تولید بیش‌تر و غلظت بالاتر پلی ساکارید خارج سلولی نسبت به دیگر متابولیت‌ها، از جمله پروتئین می‌باشد. در نتیجه، می‌توان گفت که ته‌نشینی هماتیت توسط متابولیت که در شکل ۳ (الف) دیده شد، بیش‌تر تحت تأثیر پلی ساکاریدهای محلول بوده است.

بررسی طرح آزمایشی

در این پژوهش با تغییر مقدار هماتیت، تأثیر نسبت فلوکولانت‌ها به جامد، بر میزان ته‌نشینی آزمایش شد. افزایش نسبت فلوکولانت به جامد، ممکن است موجب بهبود فلوکولاسیون شود. در اینجا به منظور بررسی این موضوع، میزان درصد جامد از ۲g به ۵g گرم افزایش یافت. از سویی تأثیر pH (در بازه‌ی اسیدی تا بازی) و اثر اندازه ذره‌های هماتیت بر ته‌نشینی آن بررسی شد. برای آنالیز تأثیر پارامترهای pH، بیوسورفکتانت، درصد جامد، اندازه ذره‌ها بر ته‌نشینی هماتیت، از روش طراحی آزمایش فاکتوریل کامل با ۵۰ آزمایش (دوبار تکرار) استفاده شد. نتیجه‌های آنالیز واریانس (ANOVA) در جدول ۳ آمده است. مقدار p-value کمتر از ۵٪ نشان می‌دهد که مدل با سطح اطمینان ۹۵٪



شکل ۴- نمودار جذب (الف) سلول، (ب) پروتئین و (ج) پلی ساکارید بر سطح هماتیت ○ خیلی ریزدانه و Δ ریزدانه.

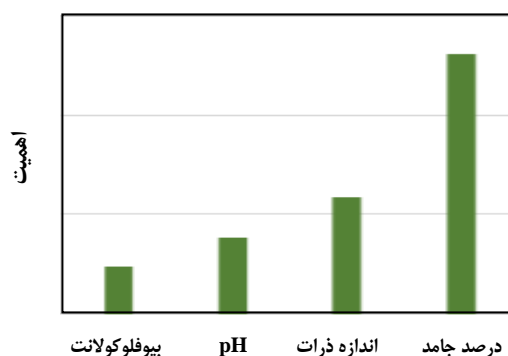
جدول ۳- نتیجه‌های آنالیز طراحی آزمایش به روش فاکتوریل کامل.

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	متوسط مربعات	آماره F	آماره p
مدل	۳۶۵۶۷/۳۹	۲۲	۱۶۶۲/۱۵	۴۴/۲۹	۰/۰۰۰۱<
A - بیوفلوکولانت	۷۰۴۴/۵۷	۴	۱۷۶۱/۱۴	۴۶/۹۳	۰/۰۰۰۱<
pH - B	۱۱۵۶۱/۰۵	۴	۲۸۹۰/۲۶	۷۷/۰۲	۰/۰۰۰۱<
C - درصد جامد	۹۸۰۷/۰۷	۱	۹۸۰۷/۰۷	۲۶۱/۳۳	۰/۰۰۰۱<
D - اندازه ذرات	۴۴۲۸/۵۴	۱	۴۴۲۸/۵۴	۱۱۸/۰۱	۰/۰۰۰۱<
AC	۲۰۸۳/۱۲	۴	۵۲۰/۷۸	۱۳/۸۸	۰/۰۰۰۱<
AD	۴۶۰/۶۶	۴	۱۱۵/۱۷	۳/۰۷	۰/۰۱۷۸<
BD	۱۱۸۲/۳۷	۴	۲۹۵/۵۹	۷/۸۸	۰/۰۰۰۱<
باقیمانده	۶۶۴۲/۴۵	۱۷۷	۳۷/۵۳	-	-
مجموع	۴۳۲۰۹/۸۴	۱۹۹	-	-	-

(AC) (۱۳/۸۸) و pH - اندازه ذرها (BD) (۷/۸۸) بالاترین مقدار را داشتند. مقدار R-Squared به تقریب ۰/۸۵ به دست آمد که هر چه این مقدار به یک نزدیکتر باشد نشان دهنده انطباق خوب نتیجه‌های آزمایشی به مقدارهای محاسبه شده است. Adequate Precision مقدار سیگنال به نویز را مشخص می‌کند و باید از ۴ بیش‌تر باشد. این‌جا مقدار آن ۳۰/۵۰ می‌باشد که به اندازه کافی بزرگ است. شکل ۵ اهمیت پارامترهای اصلی را نشان می‌دهد، که طبق نمودار، درصد وزن و اندازه ذرها به ترتیب بالاترین تأثیر را بر تنشینی داشتند. همچنین، شکل ۶ (الف) نمودار تأثیر متقابل بیوفلوکولانت - اندازه ذرها را برای ۲ درصد جامد و ۷ pH نشان می‌دهد. طبق نمودار هنگامی که در محیط خنثی از پروتئین و پلی ساکارید به عنوان بیوفلوکولانت استفاده شود، اندازه ذره تأثیر بارزی بر روی تنشینی ندارد. شکل ۶ ب نمودار تأثیر متقابل pH و اندازه ذرها را در حضور پلی ساکارید به عنوان بیوفلوکولانت نشان می‌دهد. همچنان‌که در شکل مشخص است، این تأثیر متقابل بارز است و درحالی که در pH برابر ۵ تغییر در اندازه ذره، بیش‌ترین تغییر را ایجاد نموده، در pH برابر ۳، اندازه ذرها تأثیر بارزی بر فلوکولاسیون با پلی ساکارید نداشت.

نتیجه گیری

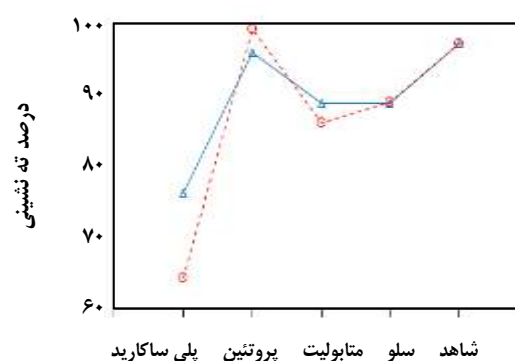
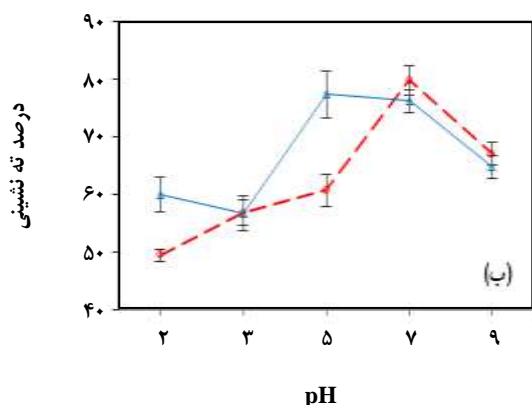
در این مطالعه، از باکتری *Bacillus licheniformis* و فراورده‌های متابولیکی آن برای بیوفلوکولاسیون هماتیت‌های



شکل ۵ - نمودار اهمیت پارامترهای اصلی بر تنشینی هماتیت.

بارز است. مطابق نتیجه‌های جدول ۳ همه پارامترهای اصلی با سطح اطمینان ۹۵٪ بارز هستند. بر اساس مقدارهای F-value، درصد جامد (۲۶۱/۳۳)، اندازه ذرها (۱۱۸/۰۱) و pH (۷۷/۰۲) پارامترهایی بودند که به ترتیب بیش‌ترین تأثیر را بر تنشینی هماتیت داشتند. همان‌گونه که گفته شد با کاهش درصد جامد، نسبت فلوکولانت به جامد بیشتر شده و تنشینی بیش‌تر می‌شود. همچنین، افزایش اندازه ذرها، موجب افزایش تنشینی می‌شود. و افزایش pH از بازه‌ی خنثی به طرف بازی نتیجه‌های بهتر فلوکولاسیون را به دنبال دارد.

از میان تأثیرهای متقابل دوتایی، فقط AC، AD و BD بارز هستند و مقدار F-value تأثیر متقابل بیوسورفکتانت - درصد جامد



شکل ۶ - نمودار تاثیر متقابل (الف) بیوفلوکولانت- اندازه ذرات در pH ۷ و ۲% جامد و (ب) pH و اندازه ذرات در پلی ساکارید و ۵% جامد (○ فوق ریزدانه، Δ ریزدانه).

درصد جامد، بهبود چشمگیری در ته‌نشینی هماتیت به دست می‌آید. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش، سلول‌های باکتریایی و متابولیت‌های به دست آمده از این باکتری می‌توانند در تیکنرها، برای فلوکولاسیون نرمه‌های هماتیت استفاده شود. همچنین بیوفلوکولانت‌های به دست آمده، مانند فلوکولانت‌های شیمیایی، مخاطرات زیست محیطی به دنبال ندارد.

ریزدانه استفاده شد. میزان جذب و ته‌نشینی دو اندازه $d_{50}=1.7 \mu m$ (خیلی ریزدانه) با یکدیگر مقایسه شدند. مشاهده شد که pH و اندازه ذره‌های هماتیت برهمکنش بارزی برهم داشته و ته‌نشینی هماتیت خیلی ریزدانه در pH ۷ با ته‌نشینی هماتیت ریز دانه در pH برابر ۵ با به‌کارگیری انواع بیوفلوکولانت‌ها برابری می‌کند. همچنین، میزان جذب پلی ساکارید، پروتئین و سلول بر هر گرم هماتیت خیلی ریزدانه در pH برابر ۷، نسبت به هماتیت ریزدانه در pH برابر ۵ بیش‌تر بود. همچنین، نشان داده شد که با کاهش

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۰

مراجع

- [1] Somasundaran P., Das K.K., Yu X., *Selective Flocculation, Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **1**(4): 530-534 (1996).
- [2] Haselhuhn H.J., *Dispersant Adsorption and Effects on Settling behavior of Iron Ore, Minerals & Metallurgical Processing*, **30**(3): 188-189 (2013).
- [3] Weissenborn P.K., Warren L.J., Dunn J.G., *Optimisation of Selective Flocculation of Ultrafine Iron Ore, International Journal of Mineral Processing*, **42**(3): 191-213 (1994).
- [4] Haselhuhn H.J., "The Dispersion and Selective Flocculation of Hematite Ore", Michigan Technological University (2015).
- [5] Shih I.L., Van Y.T., Yeh L.C., Lin H.G., Chang Y.N., *Production of a Bbiopolymer Flocculant from Bacillus Licheniformis and Its Flocculation Properties. Bioresource Technology*, **78**(3): 267-272 (2001).

- [6] Zakeri A., Pazouki M., Vossoughi M., [Use of Response Surface Methodology Analysis for Xanthan Biopolymer Production by Xanthomonas campestris: Focus on Agitation Rate, Carbon Source, and Temperature](#). *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **36**(1): 173-183 (2017).
- [7] Misra M., Chen S., Smith R.W., Raichur A.M., [Mycobacterium Phlei as a Flotation Collector for Hematite](#). *Minerals and Metallurgical Processing*, **10**: 170-170 (1993).
- [8] Schneider I.A.H., Misra M., Smith R.W., [Bioflocculation of Hematite Suspensions with Products from Yeast Cell Rupture](#), *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, **2**(4): 248-252 (1994).
- [9] Deo N., Natarajan K.A., [Studies on interaction of Paenibacillus polymyxa with iron ore minerals in relation to beneficiation](#). *International Journal of Mineral Processing*, **55**(1): 41-60 (1998).
- [10] Yang H., Tang Q., Wang C., Zhang J., [Flocculation and Flotation Response of Rhodococcus Erythropolis to Pure Minerals in Hematite Ores](#), *Minerals Engineering*, **45**: 67-72 (2013).
- [11] De Mesquita L., Lins F., Torem M., [Interaction of a Hydrophobic Bacterium Strain in a Hematite–Quartz Flotation System](#), *International Journal of Mineral Processing*, **71**(1-4): 31-44 (2003).
- [12] Natarajan K.A., [Production and Characterization of Bioflocculants for Mineral Processing Applications](#), *International Journal of Mineral Processing*, **137**: 15-25 (2015).
- [13] Poorni S., Natarajan K.A., [Flocculation behaviour of Hematite–Kaolinite Suspensions in Presence of Extracellular Bacterial Proteins and Polysaccharides](#), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **114**: 186-192 (2014).
- [۱۴] امانی، حسین؛ شاهمیرزایی، فرزانه، بهینه سازی تولید سورفکتین با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis* NLIM 0110 درون راکتور زیستی لرزان. *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، ۶۸: ۱۰۳ تا ۱۰۹ (۱۳۹۲).
- [15] Vijayalakshmi S.P., Raichur A.M., [The utility of Bacillus Subtilis as a Bioflocculant for Fine Coal](#), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **29**(4): 265-275 (2003).
- [16] Karthiga K., Natarajan K.A., [Production and Characterization of Bioflocculants for Mineral Processing Applications](#), *International Journal of Mineral Processing*, **137**: 15-25 (2015).
- [17] Manivasagan P., Kang K.H., Kim D.G., Kim S.K., [Production of Polysaccharide-Based Bioflocculant for the Synthesis of Silver Nanoparticles by Streptomyces sp](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **77**: 159-167 (2015).
- [18] Bradford M.M., [A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding](#), *Analytical Biochemistry*, **72**(1): 248-254 (1976).
- [19] Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.T., Smith F., [Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances](#), *Analytical Chemistry*, **28**(3): 350-356 (1956).

- [20] Kemppainen K., Suopajarvi T., Laitinen O., Ämmälä A., Liimatainen H., Illikainen M., [Flocculation of Fine Hematite and Quartz Suspensions with Anionic Cellulose Nanofibers](#), *Chemical Engineering Science*, **148**: 256-266 (2016).
- [21] Kosmulski M., “[Surface Charging and Points of Zero Charge](#)”. Vol. 145, CRC Press (2009).
- [22] Kosmulski M., [Compilation of PZC and IEP of Sparingly Soluble Metal Oxides and Hydroxides from Literature](#), *Advances in Colloid and Interface Science*, **152**(1-2): 14-25 (2009).
- [23] Omoike, A., Chorover J., [Adsorption to Goethite of Extracellular Polymeric Substances from Bacillus Subtilis](#), *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**(4): 827-838 (2006).