# ارزیابی عملکرد باکتریهای اکسید کننده گوگردی جدا سازی شده از خاک معدن مس و شناسایی مولکولی آنها بر اساس توالی 16S rRNA

مهدی صادقی پور مروی[۱]، احمد علی پوربابایی[۱*]، حسینعلی علیخانی[۱]، احمد حیدری[۱] و زهرا منافی[۲]

[۱] کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم و مهندسی خاک

[۲] کرمان، سرچشمه، شرکت ملی صنایع مس ایران، مجتمع مس سرچشمه، آزمایشگاه هیدرومتالورژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۱

ONLINE FIRST

## چکیده

یکی از راهکارهای افزایش راندمان عملیات فروشویی فلزات از کانیهای سولفیدی موجود در معادن فلزی، استفاده از گونه‌های کارآمد باکتریهای اکسید کننده گوگردی می‌باشد. بنابرین هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتریهای اکسید کننده گوگرد از خاکهای معدن مس سرچشمه کرمان و بررسی عملکرد آنها در اکسایش گوگرد بوده است. بعد از غنی‌سازی نمونه‌ها خالص‌سازی گردیدند و سپس جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و روشهای فیلوژنیک شناسایی شدند. بر اساس نتایج، ۳ سویه اکسید کننده گوگرد متعلق به جنسهای *Acidithiobacillus sp* و *Sulfobacillus sp*، جداسازی و شناسایی شدند. از این میان، سویه ۱۸۴ با ۹۵ درصد شباهت به *Acidithiobacillus ferridurans*، به علت سرعت رشد بالاتر (تغییر ۲ واحد pH و ۳۸۵ mg S/L در طی ۲ هفته) در محیط پایه معدنی حاوی گوگرد به عنوان سویه برتر انتخاب شد که می‌تواند به عنوان سویه‌ای کاربردی در فروشویی زیستی فلز مس مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی**: خاک، باکتری اکسید کننده گوگرد، *Thiobacillus*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۲۲۳۱۷۸۷، پست الکترونیکی: pourbabaei@ut.ac.ir

## مقدمه

گوگرد دهمین عنصر موجود در پوسته زمین است که در ساختار اسید آمینه به صورت گروه سولفیدریل و پل دی سولفیدی، در اقیانوسها به صورت سولفات، در جو زمین به صورت گاز اکسید گوگرد و در سنگ و خاک به صورت کانی سولفیدی وجود دارد (۷ و ۱۲). روشهای مرسوم استخراج فلزات از معادن فلزی، مبتنی بر اعمال شرایط دمایی بالا در کوره‌های ویژه می‌باشد که با اعمال تیمارهای مخصوص در نهایت منجر به استخراج فلزات از کان سنگ فلزی می‌گردد. این روشها به هیدرومتالوژی معروف هستند و از گذشته تا کنون برای استخراج فلزات گرانبها مورد استفاده قرار می‌گرفتند. محصول نهایی این روش استخراج فلزات، به عنوان ضایعات حاصل از استخراج فلزات، غلظت کمی از فلزات را دارد و در اصطلاح کم عیار می‌باشد. از آنجایی که با روش مرسوم استخراج فلزات، نمی‌توان فلز موجود در آنها را استخراج نمود، از روشهای موسوم به فروشویی زیستی برای استخراج فلز از کانسنگ کم عیار استفاده می‌شود تا به استخراج فلز از کانسنگ کم عیار، منجر گردد. از طرفی روشهای مرسوم استخراج فلزات، اثرات زیست محیطی منفی به دنبال دارد و معادن صنعتی استخراج فلزات، همواره به دنبال راههای دوستدار محیط زیست به عنوان جایگزین روشهای مرسوم استخراج فلزات هستند که فروشویی زیستی فلزات، یکی از این گزینه‌هاست. بدین منظور، برای غنی‌سازی هر چه بیشتر جمعیت میکروبی به منظور استفاده در فروشویی زیستی

Archive of SID

www.SID.ir

فلز مس از کانسنگ کم عیار مس، به شناسایی باکتریهای اکسید کننده گوگرد در معدن مس سرچشمه کرمان اقدام گردید. باکتریهای بومی موجود در محیط، ضمن توان رقابت پذیری بالایی که دارند امکان سازگاری با شرایط اقلیمی محیط را بیشتر از گونه‌های غیر بومی دارند و از این جهت، بیشتر مورد توجه هستند (۱۹). سینتیک واکنش اکسایش گوگرد، پایین است و از طرفی، عملکرد باکتریهای اکسید کننده گوگرد نیز متفاوت می‌باشد، یعنی برخی تند رشد بوده و توانایی اکسیدکنندگی بالایی دارند و برخی کند رشد بوده و توانایی اکسید کنندگی پایینی دارند (۱۵ و ۱۷). به طور کلی، توانایی اکسیدکنندگی گوگرد در سویه-های گرما دوست و اسید دوست بیشتر از سویه‌های خنثی-دوست معتدل دوست است (۱۸). این توانایی متفاوت آنها در اکسیدکنندگی گوگرد، به ژنهای موجود در ژنوم این میکروارگانیسم‌ها ارتباط دارد (۴۳ و ۴۶). جنسهای مختلفی از قبیل *Acidithiobacillus sp*، *Starkey sp*، *Acidiphilium sp*، *Acidianus sp* و *Sulfolobus sp* توانایی اکسید کنندگی گوگرد را دارند. بر این مبنا، هدف از این پژوهش، ارزیابی عملکرد سویه‌های مختلف اکسیدکننده گوگرد در معدن مس سرچشمه بود. بدین منظور، به جداسازی و شناسایی باکتریهای اکسیدکننده گوگرد از معدن مس سرچشمه، اقدام گردید تا از نتایج آن، برای اهداف صنعتی مانند فروشویی زیستی فلز مس استفاده گردد.

## مواد و روشها

**نمونه‌برداری**: به منظور جداسازی و شناسایی باکتریهای اکسید کننده گوگرد، نمونه‌برداری از خاک محدوده معدن مس سرچشمه واقع در استان کرمان، انجام گردید. بدین منظور، ۲۲ نمونه خاک در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آزمایشهای شیمیایی شامل، اسیدیته و شوری توسط دستگاه پ‌هاش سنج و ای سی سنج مدل یونیکم، انجام شدند. غنی‌سازی نمونه‌ها بر روی محیط پایه معدنی 9k که گوگرد به عنوان تنها منبع انرژی به آن اضافه شده بود، انجام گردید (۲۹). محیط پایه معدنی (گرم در لیتر) شامل $Ca(NO_3)_2$ ،۰/۵ $MgSO_4.7H_2O$ ،۰/۱ KCl ،۰/۵ $K_2HPO_4$ ۰/۰۱، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۰۱ و ۳ $(NH_4)_2SO_4$ به همراه ۱ گرم در لیتر گوگرد بود. شرایط اسیدیته محیط کشت، ۱/۵ تا ۷/۵ و دمای محیط کشت ۲۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد تعیین شد تا شرایط برای جداسازی باکتریهای اسید دوست و خنثی دوست (۱۴) و همچنین معتدل دوست و گرمادوست معتدل مهیا گردد (۳۸).

**جداسازی**: یک گرم از نمونه خاک با ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت 9k حاوی ۱ گرم گوگرد در لیتر، در داخل ارلن ۲۰۰ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد در همزن با دور rpm ۱۲۰ گرماگذاری شدند. سپس ۲۰۰ مایکرولیتر از این محلول، مجدد در شرایط مشابه، به محیط کشت جدید منتقل و گرماگذاری انجام شد. این عمل، برای هر نمونه، ۵ بار تکرار شد و در نهایت، محیطهایی که رشد میکروبی آن بر اساس کدورت ایجاد شده، قابل تشخیص بود، به منظور جداسازی سویه خالص اکسید کننده گوگرد، انتخاب گردید.

**خالص‌سازی**: به منظور خالص سازی سویه‌های اکسید کننده گوگرد، رقتهای متوالی تا $10^{-6}$ تهیه و به محیط کشت آگار 9k، منتقل شد و به روش ریختن در پلیت و با استفاده از میله U شکل در پلیت، به طور یکسان پخش گردید. پلیتها به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شده و بعد از این مدت، کلنیهای رشد کرده، به روش خطی، کشت داده شدند و سپس خالص‌سازی سویه‌ها انجام گردید. به منظور اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها، ۵ مرحله تجدید کشت انجام شد (۴۱).

**انتخاب سویه برتر**: به منظور ارزیابی توانایی اکسایش گوگرد، جدایه‌های خالص‌سازی شده در مرحله قبل، به

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت مایع پایه معدنی 9k، منتقل گردیدند و بر مبنای تغییر اسیدیته و سولفات محیط، ارزیابی شدند. در این مرحله، بهترین جدایه از نظر توانایی اسیدی کردن محیط و همچنین تولید سولفات، انتخاب گردید.

**بررسی تغییرات pH و سولفات توسط جدایه‌ها**: به منظور بررسی تغییرات pH و سولفات توسط جدایه‌های مورد آزمایش، تیمارهای دمایی ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ و همچنین تیمارهای اسیدیته ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵ و ۷/۵ در محیط کشت پایه معدنی 9k، اعمال گردید.

**استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز**: شناسایی مولکولی سویه‌های مورد نظر با استفاده از ماکر 16S rRNA انجام شد. بدین منظور ابتدا زیست توده از سویه‌ها تهیه شد و سپس با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت کیاژن مطابق دستورالعمل شرکت مذکور، به استخراج DNA اقدام گردید. سنجش کیفی DNA، با الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد و سنجش کمی DNA، با استفاده از نانودراپ و با محاسبه نسبت ۲۶۰/۲۸۰ nm انجام شد. PCR و تکثیر ژن مربوطه با استفاده از پرایمرهای (5´-27f AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) و (5´-1492r AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3´) انجام گردید و تأیید آن به وسیله الکتروفورز انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۵۰ مایکرولیتر انجام گردید که ۵ مایکرولیتر بافر 1X PCR، ۵ مایکرولیتر بافر $MgCl_2$ با غلظت برابر ۲ میلی مولار، ۴ مایکرو لیتر dNTP با غلظت ۱۰۰ مایکرو مولار، ۲/۵ مایکرو لیتر از هر پرایمر رفت و برگشت با غلظت ۰/۵ مایکرو مولار، ۱ مایکرو لیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز ۰/۰۲ U/µl، ۱مایکرو لیتر DNA و ۲۹ مایکرو لیتر آب مقطر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به شرح زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت ۵۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۲ دقیقه و پس از اتمام این ۳۰ چرخه، برای سنتز نهایی، مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد. در مرحله بعد، محصول PCR، با استفاده از کیت فرمنتاز و مطابق دستورالعمل شرکت مذکور، کلون گردید و با استفاده از دستگاه سکوئنسر، توالی‌یابی شد.

**آنالیز داده‌ها**: نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.01 (Technelysium Pty Ltd) ویرایش گردید و با استفاده از نرم‌افزار BLASTn با توالیهای معتبر ثبت شده در پایگاه ژنی NCBI مقایسه شد و نزدیک‌ترین سویه بر اساس مشابهت در توالی ژن 16S rRNA شناسایی گردید. تحلیل تبارزایی سویه‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد (۵۰). رسم درخت تبارزایی با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و با استفاده از نرم افراز MEGA6 انجام گردید (۲۲).

## نتایج

**آنالیز شیمیایی**: جدول ۱، اسیدیته و هدایت الکتریکی نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. میانگین اسیدیته نمونه‌ها ۴/۵۶ و هدایت الکتریکی آنها ۲/۷۵ دسی زیمنس بر متر بود. بدین ترتیب، نمونه‌های مورد آزمایش، اسیدی بوده و نسبتاً شور بودند.

**توانایی اکسایش گوگرد**: در مرحله غنی‌سازی، از محیطهای کشت که به وسیله نمونه‌ها تلقیح شده بودند و کدورت ایجاد کرده بودند، ۳ سویه با توانایی اکسایش گوگرد خالص‌سازی شد. جدول ۲، توانایی آنها در شرایط یکسان محیط (اسیدیته ۷، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ۱۲۰ rpm)، از نظر تغییر اسیدیته و تولید سولفات نشان می‌دهد. شماره سویه‌ها (۱۴۸، ۱۵۵ و ۱۸۴) نشان دهنده مراحل مختلف جدا سازی و خالص سازی آنها از نمونه های خاک بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اسیدیته و هدایت الکتریکی خاکهای مورد بررسی

| پارامترها | نمونه‌ها | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | میانگین |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S۱ | S۲ | S۳ | S۴ | S۵ | S۶ | S۷ | S۸ | S۹ | S۱۰ | S۱۱ | S۱۲ | S۱۳ | S۱۴ | S۱۵ | S۱۶ | S۱۷ | S۱۸ | S۱۹ | S۲۰ | S۲۱ | S۲۲ | |
| pH | ۴/۵۶ | ۴/۵۳ | ۴/۳۱ | ۴/۴۳ | ۴/۶۹ | ۴/۶۹ | ۴/۵۹ | ۵/۰۱ | ۴/۵۱ | ۴/۶۰ | ۴/۵۲ | ۴/۴۰ | ۴/۵۶ | ۴/۴۶ | ۴/۵۶ | ۴/۵۸ | ۴/۵۶ | ۴/۵۷ | ۴/۵۴ | ۴/۵۶ | ۴/۵۶ | ۴/۵۶ | ۴/۵۶ |
| EC(dS/m) | ۲/۷۵ | ۲/۷۶ | ۲/۷۶ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ | ۲/۷۷ | ۲/۷۱ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ | ۲/۷۱ | ۲/۷۴ | ۲/۷۳ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ | ۲/۶۹ | ۲/۷۵ | ۲/۷۴ | ۲/۸۱ | ۲/۷۵ | ۲/۷۵ |

S۱: نمونه شماره ۱ EC: هدایت الکتریکی

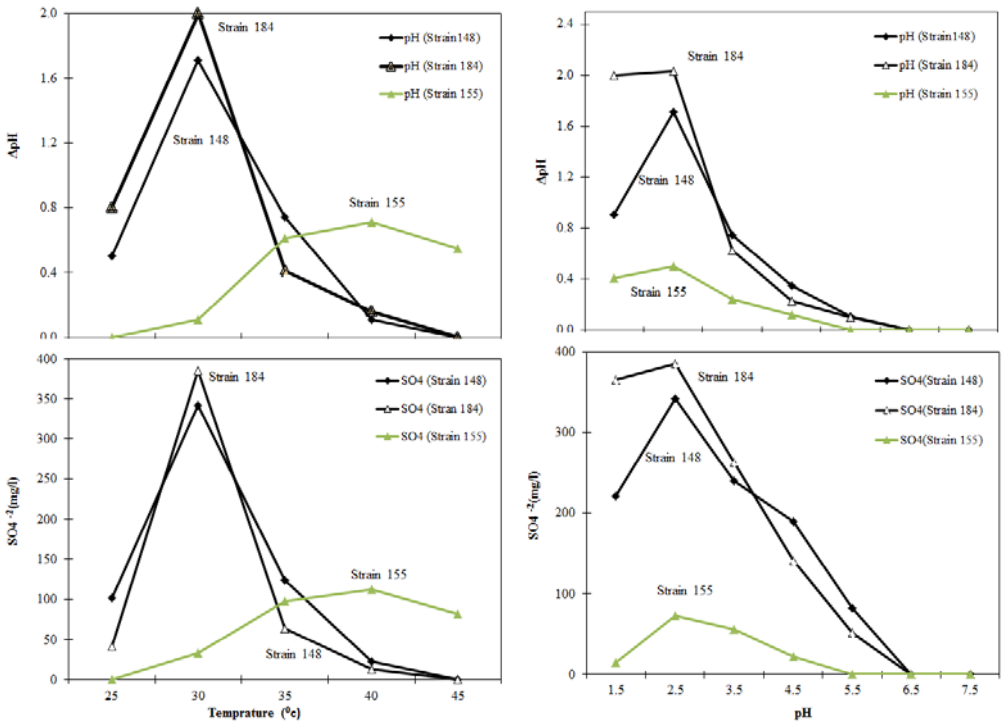
جدول ۲ نشان می‌دهد، از میان سویه‌های مورد بررسی، سویه ۱۸۴ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد و سویه‌های ۱۴۸ و ۱۵۵ گرچه قادر به رشد در روی محیط کشت بودند ولی در شرایط دمایی و اسیدیته موجود (درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد و اسیدیته ۷/۵) توانایی کمتری برای اکسایش گوگرد نشان دادند که در مرحله بعدی آزمایش، شرایط بهینه دما و اسیدیته آنها برای رشد و اکسایش گوگرد، تعیین گردید.

**بررسی بیشترین تغییرات pH و سولفات**: در مرحله بعد، برای اینکه حداکثر توان اکسایش سویه‌ها تعیین گردد، شرایط بهینه رشد آنها به وسیله اعمال تیمارهای مختلف دمایی و اسیدیته طی مدت ۲ هفته، تعیین گردید.

جدول ۲- توانایی سویه‌ها برای تغییر اسیدیته و تولید سولفات در شرایط محیطی یکسان (اسیدیته ۲/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ rpm)

| سویه | تغییرات pH | تغییرات سولفات(mg S/l) |
|---|---|---|
| *۱۴۸ | ۱/۷۰ | ۳۴۲ |
| ۱۸۴ | ۲/۰۰ | ۳۸۵ |
| ۱۵۵ | ۰/۱۱ | ۳۳ |

*: شماره سویه‌ها (۱۴۸، ۱۵۵ و ۱۸۴)، نشان دهنده مراحل مختلف جداسازی و خالص سازی آنها از نمونه‌های خاک بود.

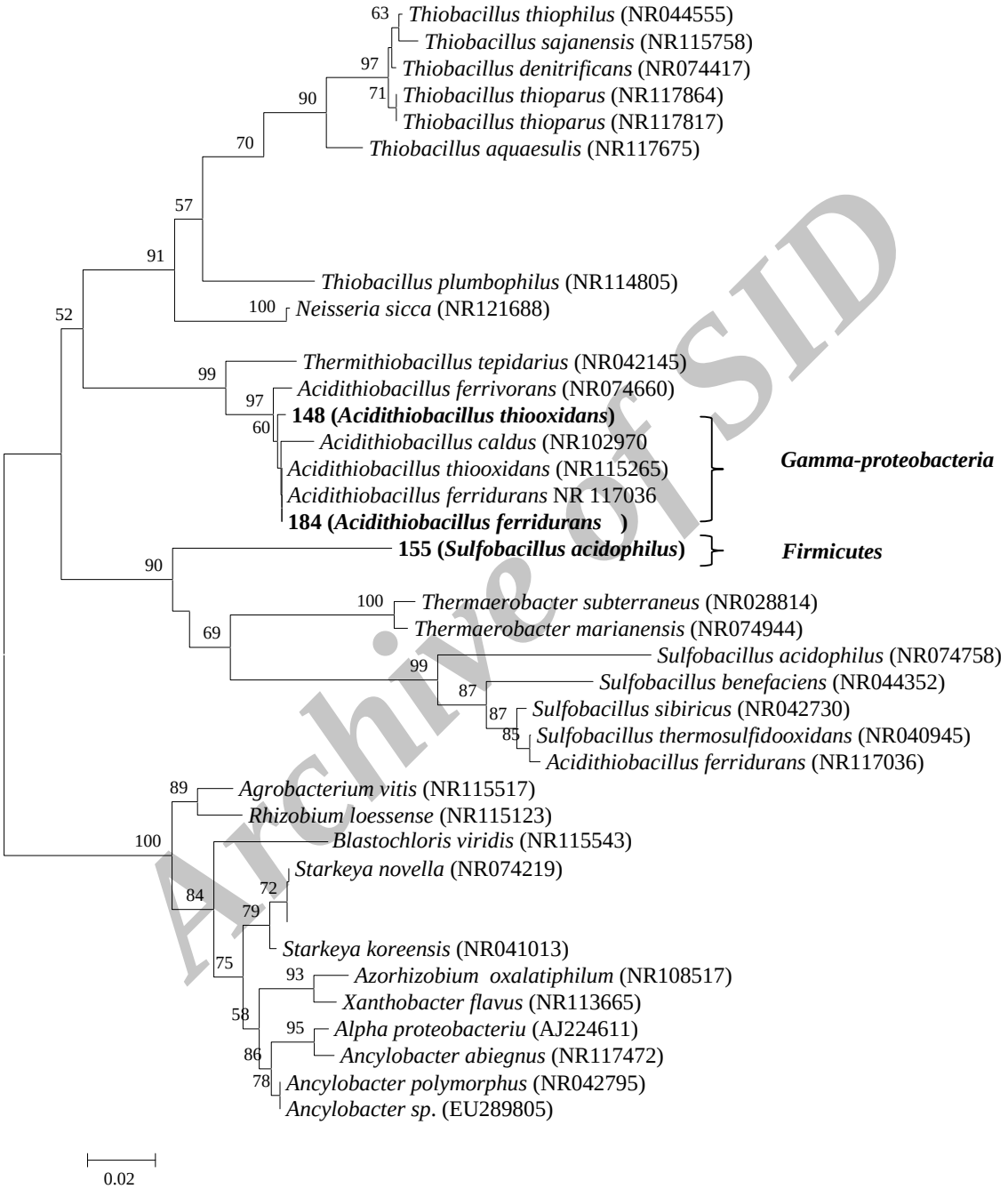



(ب) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (الف) در اسیدیته ۲/۵

شکل ۱- تغییرات pH و سولفات برای جدایه‌های مورد آزمایش بعد از ۲ هفته در محیط کشت 9k، در pH و درجه حرارت ثابت

www.SID.ir

شکل ۱ تغییرات pH و سولفات برای جدایه‌های مورد آزمایش بعد از ۲ هفته در محیط کشت 9k، در pH و درجه حرارت ثابت را نشان می‌دهد.




شکل ۲- درخت تبارزایی سویه‌های اکسید کننده گوگرد بر اساس روش Neighbor-Joining منتج از آنالیز توالیهای ژن 16S rRNA . عدد نشان داده شده در گرهها، نشان دهنده bootstrap ۱۰۰۰ می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج شکل ۱ (الف)، در شرایطی که اسیدیته محیط کشت ۲/۵ باشد، سویه های مورد بررسی از نظر دمای بهینه رشد، به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول، شامل ۲ سویه ۱۸۴ و ۱۴۸ بود که مزوفیل بودند و دمای بهینه رشد آنها ۳۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. گروه دوم شامل سویه ۱۵۵ بود که در گروه ترموفیل معتدل جای گرفت و دمای بهینه رشد آن، ۴۰ درجه سانتی گراد تعیین شد. همچنین از شکل ۲ (ب) چنین بر می‌آید که سویه‌های مورد بررسی از نظر اسیدیته بهینه رشد، در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، همگی اسید دوست بودند و در اسیدیته ۲/۵ بیشترین رشد را نشان دادند. بدین ترتیب ۲ سویه ۱۴۸ و ۱۸۴ مزوفیل و اسید دوست بودند و سویه ۱۵۵ نیز ترموفیل معتدل و اسید دوست بود.

شکل ۱ (الف و ب) نشان داد، سویه ۱۸۴ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را در شرایط مزوفیل و ترموفیل معتدل نشان داد. به طوری که اکسایش گوگرد در شرایط مزوفیل همواره بیشتر از شرایط ترموفیل بود. شکل ۱ (الف) نشان داد در اسیدیته ۲/۵، بیشترین توانایی تغییر اسیدیته محیط، ۲ واحد بود که توسط سویه ۱۸۴ به دست آمد و کمترین توانایی اکسایش گوگرد نیز به وسیله سویه ۱۵۵ به دست آمد که ۰/۷ بود که این روند در تولید سولفات نیز مشاهده شد. به طوری که بیشترین و کمترین تولید سولفات ۳۸۵ و ۳۳ میلی گرم گوگرد در لیتر به دست آمد که به ترتیب مربوط به سویه‌های ۱۸۴ و ۱۵۵ بود. دامنه تغییرات اسیدیته در پژوهش حاضر حدود ۲ است که این نتیجه، با سایر تحقیقات همخوانی داشت (۵۲). شکل ۱ (ب) نیز نشان داد در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ۳ سویه مورد بررسی همگی اسید دوست بودند و اسیدیته بهینه آنها ۲/۵ به دست آمد. در این شرایط، بیشترین و کمترین تغییرات اسیدیته به ترتیب به سویه‌های ۱۸۴ و ۱۵۵ تعلق داشت و بیشترین و کمترین تغییرات سولفات نیز به همین سویه مربوط بود. جدول ۳ دما و اسیدیته (بهینه و رشدی) سویه را نشان می‌دهد. این نتایج با نتایج پژوهش قبلی همخوانی نشان داد (۳۹).

جدول ۳- دما و اسیدیته (بهینه و رشدی) سویه

| سویه | دمای بهینه | دمای رشد | اسیدیته بهینه | اسیدیته رشد |
|---|---|---|---|---|
| ۱۴۸ | ۳۰ | ۱۰-۴۵ | ۲/۵ | ۱/۵-۶/۵ |
| ۱۸۴ | ۳۰ | ۱۰-۴۵ | ۲/۵ | ۱/۵-۶/۵ |
| ۱۵۵ | ۴۰ | ۲۰-۶۰ | ۲/۵ | ۱/۵-۵/۵ |

**شناسایی بر اساس توالی 16S rRNA**: نتایج تعیین توالی ژن 16S rRNA سویه‌های مورد نظر و مقایسه شباهت آنها با داده‌های معتبر ثبت شده در پایگاه NCBI، در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- مقایسه میزان شباهت ژن 16S rRNA سویه‌های مورد آزمایش با سویه‌های استاندارد

| نام سویه | شماره دستیابی | درصد شباهت | سویه استاندارد با بیشترین میزان شباهت | تاکسونومی |
|---|---|---|---|---|
| ۱۴۸ | KR020047 | ۹۴/۶ | *Acidithiobacillus thiooxidans NR 115265* | Bacteria; Proteobacteria; **Gammaproteobacteria**; Acidithiobacillales, Acidithiobacillaceae, Acidithiobacillus; |
| ۱۸۴ | KR020046 | ۹۵/۰ | *Acidithiobacillus ferridurans NR 117036* | Bacteria; Proteobacteria; **Gammaproteobacteria**; Acidithiobacillales; Acidithiobacillaceae; Acidithiobacillus |
| ۱۵۵ | KR020045 | ۹۴/۶ | *Sulfobacillus acidophilus NR 074758* | Bacteria; **Firmicutes**; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales incertae sedis; Clostridiales Family XVII. Incertae Sedis; Sulfobacillus; Sulfobacillus acidophilus |

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج مشاهده شده در جدول ۴، سویه ۱۴۸، ۱۸۴ و ۱۵۵ به ترتیب *Acidithiobacillus thiooxidans*، *Acidithiobacillus ferridurans* و *Sulfobacillus acidophilus* شناسایی شدند. دو سویه ۱۴۸ و ۱۸۴ به گاماپروتئوباکتریا تعلق داشتند ولی سویه ۱۵۵ به *Firmicutes* تعلق داشت.

**آنالیز فیلوژنیک**: شکل ۲، درخت تبارزایی سویه‌های اکسید کننده گوگرد بر اساس روش Nighbor-Joining منتج از آنالیز توالیهای ژن 16S rRNA را نشان می‌دهد.

بر اساس شکل ۲، جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه قرار گرفتند. ۲ سویه ۱۴۸ و ۱۸۴ در یک گروه monocladetic قرار دارند و سویه ۱۵۵ در گروه جداگانه قرار گرفت.

## بحث

همان طور که در مقدمه ذکر شد، استفاده از باکتریهای اکسیدکننده گوگرد در فروشویی زیستی فلزات موجود در کانیهای سولفیدی، ضمن به کارگیری کانسنگهای کم عیار در استخراج فلزات، هزینه کمتری در بردارد و اثرات زیست محیطی منفی روشهای مرسوم استخراج فلزات را نیز در بر ندارد و کاربرد فروشویی زیستی، در آینده، روبه فزونی خواهد گذاشت (۱، ۲، ۱۱، ۳۱، ۳۷ و ۴۲).

نتایج آنالیزها نشان داد، که از ۳ سویه مورد بررسی، ۲ سویه *Acidithiobacillus sp.* و ۱ سویه دیگر *Sulfobacillus sp.* بود که در تحقیقات قبلی نیز (۱۱، ۳۷ و ۴۲) این باکتریها در محیط معدن گزارش شده بودند. در طی فرآیند زیستی اکسایش گوگرد، محصولات متنوعی تولید می‌گردد ولی در هر حال محصول نهایی سولفات می‌باشد (۳) که از این ترکیب در کنار شاخص تغییر اسیدیته، می‌توان در ارزیابی توان اکسایش گوگرد استفاده کرد. در این پژوهش نیز از توانایی تغییر اسیدیته و تولید سولفات برای ارزیابی توانایی اکسایش گوگرد توسط باکتریها، استفاده گردید که این پارامترها، شاخص خوبی برای سنجش توانایی اکسایش گوگرد، مورد ارزیابی قرار گرفتند (۶).

از میان ۳ سویه شناسایی شده، سویه ۱۸۴ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد. سویه ۱۸۴، با ۹۵ درصد شباهت به گونه *Acidithiobacillus ferridurans* تعلق داشت. باکتریهای اکسید کننده گوگرد که خنثی دوست و قلیا دوست هستند بیشتر در کلاس بتا پروتئوباکتریا قرار دارند و شناخته شده‌ترین جنسهای باکتریهای اکسید کننده گوگرد هستند (۲۷). اما سویه ۱۸۴ در کلاس گاماپروتئوباکتریا قرار داشت. این باکتری گرم منفی، شکل straight rods اسیددوست، مزوفیل، بی‌هوازی اختیاری و شیمیولیتوتروف اجباری است که علاوه بر توانایی اکسایش گوگرد، توانایی اکسایش آهن را نیز داشت. این نتایج با سایر تحقیقات (۲۰) همخوانی داشت. باید در نظر داشت ۳ گونه *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferridurans* و *Acidithiobacillus ferrivorans* بسیاری از خصوصیات فیزیولوژیک یکسانی دارند ولی برخی خصوصیات فنوتیپی (از قبیل تحرک) متفاوت نیز دارند (۲۰ و ۴۹). *Acidithiobacillus thiooxidans* جنس اسیدی تیوباسیلوس با توجه به نقشی که در فرآیند اکسایش گوگرد دارد از نظر اقتصادی در صنعت بسیار مهم است. رشد کند و مشکل بودن رشد برروی محیطهای جامد که از مشخصات این باکتریهاست ضرورت جداسازی، شناسایی و به کار گیری گونه های جدید با کارآیی بالاتر را نشان می دهد ( ۵ و ۸). این جدایه، گرم منفی، مزوفیل، شیمیولیتوتروف، اسیدی دوست بود که با نتایج تحقیقات قبلی (۳۹) همخوانی داشت. *Sulfobacillus acidophilus* باکتری ترموفیل معتدل، هوازی، گرم مثبت، اسید دوست و rod شکل، کلنی گرد، عدم توانایی رشد در حضور شناساگر بود. این نتایج با تحقیق قبلی همخوانی داشت (۲۴). این جدایه، از گوگرد عنصری و پیریت به عنوان تنها منبع انرژی و از سوبسترای آلی از قبیل گلوکز و گلوتامات

Archive of SID

www.SID.ir

به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند. این نتایج با سایر تحقیقات قبلی (۱۳) همخوانی داشت. خصوصیات فیزیولوژیک و شناسایی توالیهای DNA نشان داد که این باکتری، گونه جدیدی از *Sulfobacillus sp* بود.

نتایج تحقیقی نشان داد که نرخ اکسایش گوگرد بعد از ۲ هفته به حد ثابتی می‌رسد (۲۰ و ۲۱) که این نتیجه نیز با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. در یک پژوهش، باکتریهای اکسید کننده گوگرد، اسیدیته محیط را طی دو هفته تا ۸ واحد کاهش دادند و مقدار تولید سولفات تا ۲۰ میلی گرم گوگرد بر گرم گزارش شد (۴۰). همچنین در گزارشی دیگر، بین ۱۰ تا ۴۰ میلی گرم گوگرد بر کیلوگرم خاک، طی مدت ۱۰ هفته تولید گردید (۴۴). بر اساس نتایج این پژوهش تغییرات سولفات و اسیدیته، کمتر از نتایج گزارشات قبلی بود که می‌تواند به دلیل تفاوت در توانایی اکسایش گوگرد توسط باکتریها باشد. نتایج تحقیقی (۲۰ و ۴۷) نشان داد که اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس در دمای کمتر از ۳۰ درجه سانتی گراد و اسیدیته بالای ۰/۷ توانایی اکسایش گوگرد را داشت که این نتایج با نتایج این پژوهش همخوانی داشت. در یک تحقیق (۳۵)، دمای بهینه رشد سولفوباسیلوس را ۵۵ درجه سانتی گراد گزارش کردند. گرچه بیشتر تمرکز مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مزوفیل *Thiobacillus* بوده است ولی در مورد گونه های ترموفیل آن نیز مطالعاتی انجام شده است (۲۷، ۲۸ و ۳۴).

هر ۳ سویه مورد بررسی اسید دوست بودند ولی دو سویه ۱۴۸ و ۱۸۴ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد رشد بهینه داشتند و مزوفیل بودند، ولی سویه ۱۵۵ در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد رشد مطلوب داشت و ترموفیل معتدل بود که با نتایج تحقیق قبلی (۳۰) همخوانی نشان داد. همچنین در تحقیق حاضر، هر ۳ سویه مورد بررسی، اسید دوست و توانایی تحمل اسیدیته کم را داشتند ولی سویه ۱۸۴ توانایی تحمل اسیدیته کمتری را نشان داد. این نتایج با نتایج پژوهش قبلی همخوانی نشان داد (۲۰). نتایج پژوهش حاضر در مورد *Sulfobacillus acidophilus* با نتایج تحقیق قبلی همخوانی نشان داد.

علت تفاوت در توانایی اکسایش گوگرد در میان سویه‌های مختلف به تفاوت در عملکرد ژنهای اکسایش گوگرد و آهن (از قبیل *sox* – اکسید کننده گوگرد- *iro* – اکسید کننده آهن- و *rus*) مربوط است (۲۰ و ۴۴). به طوری که تنوع ژنی نیز موجب تنوع آنزیمی در فرآیند اکسایش گوگرد می‌شود (۲۵، ۳۳ و ۴۸). به عنوان مثال، *A. ferrooxidans* و *A. ferrivorans* ژن تثبیت کننده نیتروژن (نیتروژناز) را دارند که بقیه ندارند (۲۰). در *Acidithiobacillus ferridurans* برخی ژنها اختصاصی هستند مثل ژن *iro* که کدکننده iron oxidase می‌باشد و در دو سویه دیگر (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *Sulfobacillus acidophilus*) وجود ندارد و برخی ژنها عمومی است مثل ژن *rusB* که کدکننده iso-rusticyanin می‌باشد و در دو سویه دیگر نیز وجود دارند (۴۹). از دیگر دلایل تفاوت در عملکرد باکتریهای اکسیدکننده گوگرد، مربوط به تنوع ژنی اپرون sox است (۴۵). به طوری که آلفا پروتئوباکتریا، اپرون کامل sox (sulfur oxidizing) را دارند ولی بتا و گاما پروتئوباکتریا، اپرون sox را به طور ناقص دارند، یعنی ژنهای کد کننده سولفور دهیدروژناز را ندارند و به جای آن سیستم احیای برگشتی سولفات را دارند (۱۵). در *Sulfobacillus* ژنهای اختصاصی Calvin–Benson–Bassham (cbb) نقش دارند (۹). در این پژوهش، سویه ۱۴۸ و ۱۸۴ (*Acidithiobacillus spp.*) متعلق به گاما پروتئوباکتریا بودند ولی سویه ۱۵۵ (*Sulfobacillus sp.*) متعلق به *Firmicutes* بود که این خود یکی دیگر از دلایل تفاوت عملکرد این سویه‌ها بود.

علت اینکه باکتریهای اکسید کننده گوگرد در دماهای مختلف، عملکرد متفاوتی دارند نیز به سیستم آنزیمی آنها مربوط می شود. به عنوان مثال، آنزیم cytochrome *c* که از

Archive of SID

www.SID.ir

طریق مسیر TOMES، در اکسایش گوگرد دخالت دارد توسط بخشی از اپرون sox به نام soxAX انجام می‌گیرد (۱۰ و ۲۶) که این آنزیم در مزوفیلهای اکسید کننده گوگرد، به دمای بالا حساس بوده و فعالیت خود را در دمای بالا از دست می‌دهد (۳۲ و ۳۶). *Sulfobacillus acidophilus* که در گروه ترموفیلهای معتدل قرار دارد آنزیمهای مقاوم به دمای بالا دارند که در اصطلاح ترمو آنزیم (thermozymes) نامیده می‌شوند به طوری که در این دما قادر به فعالیت و رشد هستند (۲۳ و ۵۱).

با توجه به این نتایج و در نظر گرفتن اینکه عملکرد سویه‌های ۱۴۸ و ۱۸۴ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در سطح مطلوبی قرار داشت، برای عملیات فروشویی زیستی فلز مس از کانسنگ سولفیدی آن، در شرایط اسیدی، پیشنهاد می‌گردد و استفاده از سویه ۱۵۵، برای شرایط اسیدی و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، پیشنهاد می‌گردد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، سویه ۱۸۴ بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد که آنالیز مولکولی نشان داد این سویه به *Acidithiobacillus ferridurans* تعلق دارد.

با توجه به اینکه شباهت سه سویه شناسایی شده در این پژوهش با سویه‌های استاندارد، کمتر از ۹۹ درصد بود احتمالاً سویه‌های جدیدی هستند که بومی ایران می‌باشند و تحقیق در مورد ثبت این گونه‌های جدید نیازمند آنالیز دقیق‌تر آنها می‌باشد. فاکتورهای مختلفی از قبیل تعداد جمعیت میکروبی، تنوع جمعیت میکروبی، شرایط اقلیمی (از قبیل درجه حرارت، هوادهی، پتانسیل آب در خاک)، سطح ویژه گوگرد در تماس با محیط، اندازه ذرات، فراوانی باکتریهای هترتروف موجود در محیط و فراوانی سوبسترای ترکیبات آلی و معدنی در اکسایش گوگرد دخیل هستند (۴ و ۱۶).

## نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، بر اساس نتایج شناسایی مولکولی و آزمایشات انجام شده، ۳ سویه اکسید کننده گوگرد شناسایی گردید که ۲ سویه آن (۱۴۸، ۱۸۴) مزوفیل و اسید دوست بودند (به ترتیب *Acidithiobacillus thiooxidans* و *Acidithiobacillus ferridurans*). در حالی که سویه دیگر (۱۵۵)، ترموفیل معتدل و اسید دوست بود (*Sulfobacillus acidophilus*). از میان این ۳ سویه، سویه ۱۸۴، بیشترین توانایی اکسایش گوگرد را نشان داد که می‌تواند در فروشویی زیستی مس مورد استفاده قرار گیرد.

## سپاسگزاری

این پژوهش، با حمایت مالی شرکت ملی صنایع مس ایران (مجتمع مس سرچشمه، امور تحقیق و توسعه) انجام شد که بدین وسیله، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

۱- شیرسلیمانیان، م. ص.، اعتمادی فر، ز و امتیازی، گ. ۱۳۹۳. گوگردزدایی از تیوفن توسط باکتری *Pseudomonas stutzeri SEE-*. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۷(۱). ۲۰۵-۲۱۹.

۲- نقوی، ه.، سام، ع و سالاری، ح. ۱۳۹۴. امکان سنجی پیریت زدایی از زغالسنگ با استفاده از بیوفلوتاسیون. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۸(۳). ۴۳۰-۴۳۷.

3- Alam, M., Pyne, P., Mazumdar, A., Peketi, A. and Ghosh, W. 2013. Kinetic enrichment of 34S during proteobacterial thiosulfate oxidation and the conserved role of soxB in SS bond breaking. Applied and Environmental Microbiology. 79(14): 4455-4464.

4- Attoe, O. and Olson, R. 1966. Factors affecting rate of oxidation in soils of elemental sulfur and that added in rock phosphate-sulfur fusions. Soil Science. 101(4): 317-325.

5- Babana, A. H., Samaké, F. and Maïga, K. 2011. Characterization of some agricultural soils: Presence and activity of Tilemsi rock phosphate-solubilizing *Thiobacilli*. British Microbiology Research Journal. 1: 1-9.

Archive of SID

www.SID.ir

6- Bardsley, C. and Lancaster, J. 1960. Determination of reserve sulfur and soluble sulfates in soils. Soil Science Society of America Journal. 24 (4): 265-268.

7- Benson, S. W. 1978. Thermochemistry and kinetics of sulfur-containing molecules and radicals. Chemical Reviews. 78 (1): 23-43.

8- Brito, E. M., Piñón-Castillo, H. A., Guyoneaud, R., Caretta, C. A., Gutiérrez-Corona, J. F., Duran, R., Reyna-López, G. E., Nevárez-Moorillón, G. V., Fahy, A. and Goñi-Urriza, M. 2013. Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. Applied Microbiology and Biotechnology. 97 (1): 369-378.

9- Caldwell, P. E., MacLean, M. R. and Norris, P. R. 2007. Ribulose bisphosphate carboxylase activity and a Calvin cycle gene cluster in *Sulfobacillus* species. Microbiology. 153 (7): 2231-2240.

10- Dambe, T., Quentmeier, A., Rother, D., Friedrich, C. and Scheidig, A. J. 2005. Structure of the cytochrome complex soxXA of Paracoccus pantotrophus, a heme enzyme initiating chemotrophic sulfur oxidation. Journal of Structural Biology. 152 (3): 229-234.

11- Demergasso, C. S., Castillo, D. and Casamayor, E. O. 2005. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. Hydrometallurgy 80 (4): 241-253.

12- Eriksen, J. 2009. Soil sulfur cycling in temperate agricultural systems. Advances in Agronomy. 102: 55-89.

13- Dufresne, S., Bousquet, J., Boissinot, M. and Guay, R. 1996. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 46: 1056-1064.

14- Garrity, G. M., Bell, J. A. and Lilburn, T. 2005. *Acidithiobacillales* ord. nov. Springer. 60-63.

15- Georgievskii, V., Annenkov, B. N. and Samokhin, V. 2013. Mineral nutrition of animals. Studies in the Agricultural and Food Sciences. Elsevier. 591.

16- Germida, J. and Janzen, H. 1993. Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. Fertilizer Research. 35 (1-2): 101-114.

17- Ghosh, W. and Dam, B. 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. FEMS Microbiology Reviews. 33 (6): 999-1043.

18- Hallberg, K. B. and Lindström, E. B. 1994. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. Microbiology. 140 (12): 3451-3456.

19- Havlin, J., Beaton, J. D., Tisdale, S. L. and Nelson, W. L. 2005. Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey, USA. 515: 202-205.

20- Hedrich, S. and Johnson, D. B. 2013a. Acidithiobacillus ferridurans sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur-and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic *gammaproteobacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 63 (11): 4018-4025.

21- Hedrich, S. and Johnson, D. B. 2013b. Aerobic and anaerobic oxidation of hydrogen by acidophilic bacteria. FEMS Microbiology Letters. 349 (1): 40-45.

22- Hiraishi, A., Nagashima, K. V., Matsuura, K., Shimadaa, K., Takaichi, S., Wakao, N. and Katayama, Y. 1998. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 48 (4): 1389-1398.

23- Jaenicke, R. 1981. Enzymes under extremes of physical conditions. Annual Review of Biophysics and Bioengineering. 10 (1): 1-67.

24- Johnson, D. B., Okibe, N. and Hallberg, K. B. 2005. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. Journal of Microbiological Methods. 60: 299-313.

25- Kappler, U. 2011. Bacterial sulfite-oxidizing enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 1807 (1): 1-10.

26- Kappler, U., Aguey-Zinsou, K-F., Hanson, G. R., Bernhardt, P. V. and McEwan, A. G. 2004. Cytochrome c551 from Starkeya novella characterization, spectroscopic properties, and phylogeny of a diheme protein of the soxAX family. Journal of Biological Chemistry. 279 (8): 6252-6260.

Archive of SID

www.SID.ir

27- Kelly, D. P., McDonald, I. R. and Wood, A. P. 2000. Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the alpha-subclass of the Proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50 (5): 1797-1802.

28- Kelly, D. P. and Wood, A. P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50 (2): 511-516.

29- Le Roux, N., Wakerley, D. and Hunt, S. D. 1977. Thermophilic thiobacillus-type bacteria from Icelandic thermal areas. Journal of General Microbiology. 100 (1): 197-201.

30- Leduc, L., Trevors, J. and Ferroni, G. 1993. Thermal characterization of different isolates of Thiobacillus ferrooxidans. FEMS Microbiology Letters. 108 (2): 189-193.

31- Liu, J-y., Xiu, X-X. and Cai, P. 2009. Study of formation of jarosite mediated by *Thiobacillus ferrooxidans* in 9K medium. Procedia Earth and Planetary Science. 1 (1): 706-712.

32- Lyric, R. M. and Suzuki, I. 1970. Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. I. Survey of enzymes and properties of sulfite: cytochrome c oxidoreductase. Canadian Journal of Biochemistry. 48 (3): 334-343.

33- Masau, R. J. Y., Oh, J. K. and Suzuki, I. 2001. Mechanism of oxidation of inorganic sulfur compounds by thiosulfate-grown Thiobacillus thiooxidans. Canadian Journal of Microbiology. 47 (4): 348-358.

34- McDonald, I. R., Kelly, D. P., Murrell, J. C. and Wood, A. P. 1996. Taxonomic relationships of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rDNA sequencing. Archives of Microbiology. 166 (6): 394-398.

35- Melamud, V., Pivovarova, T., Tourova, T., Kolganova, T., Osipov, G., Lysenko, A., Kondrat'eva, T. and Karavaiko, G. 2003. *Sulfobacillus sibiricus sp*. nov., a new moderately thermophilic bacterium. Microbiology. 72 (5): 605-612.

36- Middaugh, C. and MacElroy, R. 1976. The Effect of Temperature on Ribose-5-phosphate Isomerase from a Mesophile, *Thiobacillus thioparus*, and a Thermophile, Bacillus caldolyticus. Journal of Biochemistry. 79 (6): 1331-1344.

37- Mulligan, C. N., Kamali, M. and Gibbs, B. F. 2004. Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials. 110 ( 1): 77-84.

38- Nemati, M. and Harrison, S. 2000. A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron. Minerals Engineering. 13 (1): 19-24.

39- Nurmi, P. 2009. Oxidation and control of iron in bioleaching solutions. Tampereen teknillinen yliopisto. Julkaisu-Tampere University of Technology. Publication. 840.

40- Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T. and Satoh, H. 2007. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. Applied and Environmental Microbiology. 73 (3): 971-980.

41- Øvreås, L., Torsvik, V. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. Microbial Ecology. 36 (3-4): 303-315.

42- Plumb, J., McSweeney, N. and Franzmann, P. 2008. Growth and activity of pure and mixed bioleaching strains on low grade chalcopyrite ore. Minerals Engineering. 21 (1): 93-99.

43- Pronk, J., Meulenberg, R., Hazeu, W., Bos, P. and Kuenen, J. 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic *thiobacilli*. FEMS Microbiol Rev. 75: 293-306.

44- Riffaldi, R., Saviozzi, A., Cardelli, R., Cipolli, S. and Levi-Minzi, R. 2006. Sulphur mineralization kinetics as influenced by soil properties. Biology and Fertility of Soils. 43(2): 209-214.

45- Rzhepishevska, O. 2008. Physiology and Genetics of *Acidithiobacillus* species: Applications for Biomining. Umea university, Sweden. 1-73.

46- Salazar, C. N., Acosta, M., Galleguillos, P. A., Shmaryahu, A., Quatrini, R., Holmes, D. S. and Demergasso, C. S. 2013. Analysis of gene expression in response to copper stress in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain D2, isolated from a copper bioleaching operation. In: Advanced Materials Research. Trans Tech Publ. 825: 157-161.

47- Schrenk, M. O., Edwards, K. J., Goodman, R. M., Hamers, R. J. and Banfield, J. F. 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for

Archive of SID

www.SID.ir

generation of acid mine drainage. Science. 279 (5356): 1519-1522.

48- Suzuki, I. 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. Canadian Journal of Microbiology. 45 (2): 97-105.

49- Talla, E., Hedrich, S., Mangenot, S., Ji, B., Johnson, D. B., Barbe, V. and Bonnefoy, V. 2014. Insights into the pathways of iron-and sulfur-oxidation, and biofilm formation from the chemolithotrophic acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* CF27. Research in Microbiology. 165 (9): 753-760.

50- Thompson, J. D., Gibson, T. and Higgins, D. G. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics. 2 (3):1-22.

51- Vieille, C., Burdette, D. S. and Zeikus, J. G. 1996. Thermozymes. Biotechnology Annual Review. 2: 1-83.

52- White, C., Shaman, A. K. and Gadd, G. M. 1998. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. Nature Biotechnology. 16 (6): 572-575.

Archive of SID

# Operational evaluation of sulfur oxidizing bacteria yield isolated from copper mine soil and their molecular identification based on 16S rRNA sequence

**Sadeghi Pour Marvi M.[1], Pourbabaee A.A.[1], Alikhani H.A.[1], Haidari A.[1] and Manafi Z.[2]**

**[1] Soil Science Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Karaj, I.R. of Iran**

**[2] Hydromettalorgy Lab., Sarcheshmeh Copper Complex, National Iranian Copper Industries Co, Sarcheshmeh, I.R. of Iran**

## Abstract

One ways to increase the operational efficiency of leaching metals from sulfide minerals is using efficient species of sulfur oxidizing bacteria in metal mining. Thus, the aim of this study was to isolate and identify sulfur oxidizing bacteria from soils of Sarcheshmeh copper mine (Kerman, south of Iran) and to survey their operation in sulfur oxidation. After enrichment, samples were purified and then isolates were identified based on their morphological characteristics and phylogenic techniques. Subsequently, three sulfur-oxidizing strains which belonged to *Acidithiobacillus sp* and *Sulfobacillus sp* were isolated and identified. Of these three, strain 184, with 95% similarity to *Acidithiobacillus ferridurans* was selected as the superior strain due to higher growth rate (change of 2 value pH and 385 mg S/L during 2 weeks) in the synthetic mineral medium containing sulfur which can now be used as an applicable strain in bioleaching of copper metal.

**Key words**: Soil, Sulfur Oxidizing Bacteria, *Thiobacillus*

www.SID.ir