

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

نیماسلامیان: 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 استخراج 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 ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و روش فیلوژنتیکی 16S rDNA استفاده شد.

نتایج: طبق بررسی‌های انجام شده، باکتری جداسازی شده، 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، پروتیت ۳ درصد، سولفات آهن II 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 شیمیولیتواتوتروف، چشمه‌های گوگردی

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 به وجود 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»^۱ 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 معدن کاران 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»^۲ 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 توجه اقتصادی پیدا می‌کند. از طرفی، به دلیل این که می‌توان روش فروشویی زیستی را به شکل درجا^۳ 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 سولفوریک اسید و آهن فریک تولید می‌کنند که برای واکنش‌های فروشویی زیستی مورد نیاز هستند. این

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از دریاچه‌های آب معدنی گوگرد و آهن دار قوتورسویی و شایل 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.

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 سولفور است. از طرفی، وجود چشمه‌های آب معدنی گوگردی اکوسیستم مناسبی برای دستیابی به باکتری‌های شیمیولیتواتروف بومی اکسیدکننده گوگرد و آهن در کشور است.

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

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

شماره ۹	شماره ۸	شماره ۷	شماره ۶	شماره ۵	شماره ۴	شماره ۳	شماره ۲	شماره ۱	محیط کشت
۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	(NH ₄) ₂ SO ₄
۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	MgSO ₄
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	Ca(NO ₃) ₂
۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	KCl
			۵					۵	Na ₂ S ₂ O ₅
						۳			FeS ₂
					۳				FeS
				۳					Na ₂ SO ₃
							۴/۵	۴/۵	FeSO ₄
		۲							پودر آهن
	۳								گوگرد عنصری
۵									کنسانتره سنگ مس
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	آب مقطر (میلی‌لیتر)

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 دی‌اکسید 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 rDNA 16S 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):

fd1: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC -3'
rD1: 5'- TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3'

مخلوط PCR (۲۵ میکرولیتر) حاوی یک میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl₂، 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،

همچنین، به منظور بررسی رشد هتروتروفی از محیط پیتون-عصاره مخمر برات که حاوی ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و سه گرم در لیتر پیتون 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 شماره 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 ۸۰۰۰ rpm 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 سوبه 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- درجه 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، رنگ آمیزی اسپور و آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلفی نظیر بررسی آنزیم‌های

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 80000 rpm سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی حاصل یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از بهم زدن، $0/5$ میلی‌لیتر محلول $0/3$ مولار NaOH اضافه و به هم زده شد. سپس، لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن ماری) 60°C درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً تخریب شوند. اندازه‌گیری پروتئین به روش لاری^۵ انجام شد. در این روش، از دو معرف استفاده شد:

۱) معرف مس: شامل یک میلی‌لیتر محلول الف (۱/۱) 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 $0/5$ میلی‌لیتر $0/3$ مولار NaOH، به تدریج و با تکان دادن، ۵ میلی‌لیتر معرف مس اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی، $0/5$ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه و سریع به هم زده شد و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در نهایت، لوله‌ها به مدت دو دقیقه در 80000 rpm سانتریفیوژ شدند تا بقایای سلولی ته نشین شوند و جذب نوری محلول در 623 nm نانومتر

پلیمریزاسیون در 72°C 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 ترانس لومیناتور 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 اسیدیتته بهینه رشد باکتری

برای تعیین اسیدیتته بهینه برای رشد باکتری، در ارلن‌های 250 میلی‌لیتری، 100 میلی‌لیتر محیط کشت معدنی شماره ۱ استریل ریخته شد. پس از تلقیح باکتری (به میزان ۳ میلی‌لیتر با کدورت دو مک فارلند معادل تقریباً $10^6 \times 600$ سلول در میلی‌لیتر)، اسیدیتته محیط‌ها با سولفوریک اسید 10 نرمال بر روی ۲، ۳، ۴ و ۵ تنظیم شد. سپس ارلن‌ها در شیکر انکوباتور با دمای 25°C 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.

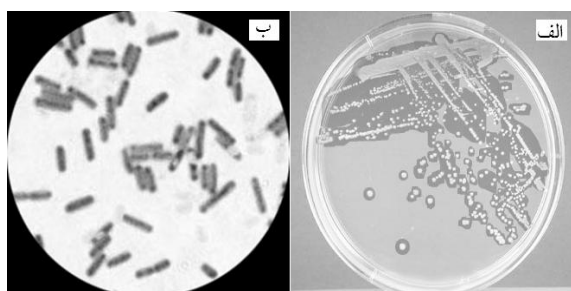
تعیین دمای بهینه رشد باکتری

برای تعیین بهترین دما برای رشد باکتری، در ارلن‌های 250 میلی‌لیتری، 100 میلی‌لیتر محیط کشت معدنی شماره ۱ یک استریل ریخته شد (اسیدیتته ۴). ارلن‌ها پس از تلقیح باکتری (به میزان سه میلی‌لیتر با کدورت دو مک فارلند معادل تقریباً $10^6 \times 600$ سلول در میلی‌لیتر)، در شیکر انکوباتورهای 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

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)

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

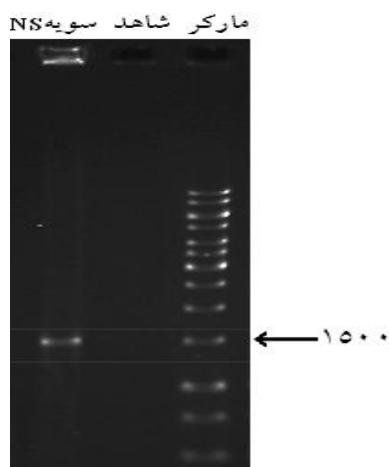
بررسی رشد اتوتروفی باکتری بر روی منابع گوگردی و آهن‌دار

برای بررسی رشد اتوتروفی باکتری روی سولفات آهن (FeSO_4)، پیریت (FeS_2)، سولفید آهن (FeS)، سولفیت سدیم (Na_2SO_3)، تیوسولفات سدیم ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)، 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 شماره 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 مقیاسه با شاهد به مدت ۱۵ روز بررسی شد.

بررسی رشد هتروتروفی باکتری

برای انجام این آزمایش از دو محیط کشت پیتون-عصاره مخمر آگار و پیتون-عصاره مخمر برات 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 پیتون-عصاره مخمر برات 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 مقیاسه با شاهد، و بررسی تشکیل کلنی در محیط جامد به مدت ۱۵ روز بررسی شد.

میکروارگانیزم‌های 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 rDNA 16S حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد

جدول ۲- خصوصیات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و

بیوشیمیایی سویه جدا شده از چشمه قوتورسویی

آزمایش‌های شناسایی	سویه NS
شکل	باسیل
واکنش گرم	مثبت
رنگ آمیزی اسپور	مثبت
حرکت	مثبت
اکسیداز	مثبت
کاتالاز	مثبت
رشد اتوتروفي	مثبت
رشد هتروتروفي	مثبت
اسیدیته بهینه	۴
دمای بهینه	۲۵ درجه
احیای نترات به نیتريت	منفی
اوره آز	مثبت
آزمایش VP	مثبت
آزمایش MR	منفی
آزمایش TSI	منفی
تولید اندول	منفی
تولید H ₂ S	منفی

پس از انجام PCR و تعیین توالی ژن 16S rDNA،

توالی‌های به دست آمده هم‌تراز^۶ و با

5'GTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAG
AGAAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCCAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCC
GCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTANGGCCGCAAGGC
TGANN-TCAAAGGAATTGANGGGGGCC3'

شکل ۲- توالی ژن 16S rDNA سویه جدا سازی شده

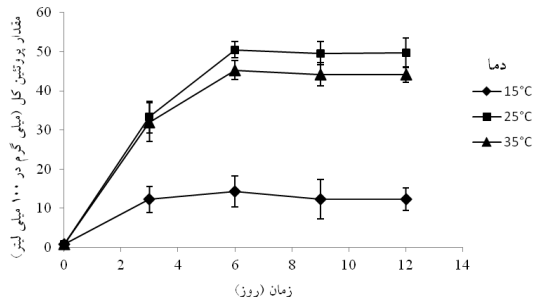
اسیدیته بین ۲ تا ۳ و درجه حرارت ۲۵ تا ۴۰ درجه سانتیگراد و *solfolubus* ها معمولاً در اسیدیته بین ۲ تا ۳ و درجه حرارت بین ۵۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد بیشترین رشد را دارند (۱۳ و ۱۴). باکتری *Methylobacterium*

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

اول میزان پروتئین کل به دست آمده از آن برابر ۴۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر است (شکل ۴).

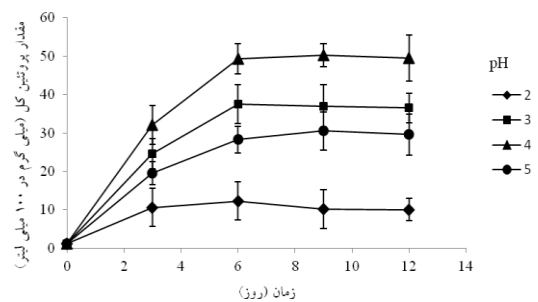


شکل ۴- تعیین دمای بهینه رشد باکتری به روش پروتئین سنجی در اسیدیته ۴ و در محیط کشت پایه معدنی شماره ۱.

بررسی رشد اتوتوتروفی و هتروتروفی باکتری

میکروارگانیسم‌ها کربن مورد نیاز خود برای رشد را از ترکیبات آلی یا دی‌اکسید 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 کلونین 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 پیتون-عصاره مخمر برات و پیتون-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 اکسیدکننده آهن نظیر *leptospirillum*

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 می‌رسد 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 طوری که در ۶ روز

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 سانتیگراد و اسیدیته بهینه ۳ است (۱۵). برای آن که بتوان گستره دمایی متنوعی را تحت پوشش قرار داد، در این پژوهش باکتری شیمیولیتوتروف اختیاری با دمای بهینه ۲۵ درجه سانتیگراد و اسیدیته ۴ جداسازی شد. باکتری جدا شده در این پژوهش توانایی بالایی در اکسیداسیون ترکیبات گوگردی و آهن دار 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 (کنرسیوم) در فرآیند فروشویی زیستی استفاده کرد.

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 جدا شده 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 جدا شده 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 طولانی تری 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 نتیجه گیری

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

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 ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. *Adv. Biochem. Eng* 1997; 6: 1-37.
- (3) Abratis P.K, Patrick 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. Microbiol* 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 Johnson 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

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