

Investigation of effective factors in the biooxidation of iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Abstract

As industrial activities grow, concerns about the gradual depletion of easily processable metal reserves and the exploitation of these resources have increased. Consequently, the development of environmentally friendly technologies capable of extracting metals from complex and refractory sources has gained significant importance. Biohydrometallurgy is recognized as a green and sustainable technology that relies on iron-oxidizing microorganisms to facilitate metal dissolution. These microorganisms contribute to the leaching process through the production of ferric iron, which act as an effective and low-cost oxidizing agent. In this study, the individual and interactive effects of the operational parameters, pulp density, time, and bacterial inoculum, on ferric iron production in the copper bioleaching from the Kal-e-Kafi ore using uranium-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 were investigated. The experiments were designed using a central composite design within the framework of response surface methodology. The results indicated that increasing the time from 2 to 21 days led to a decrease in ferric concentration from 1695.86mg/L to 135.36mg/L. Similarly, an increase in pulp density from 5% to 15% resulted in a reduction of ferric production from 1590.86mg/L to 838.34mg/L. On the other hand, when the bacterial inoculum was increased from 5% to 14.7%, there were increases in ferric production from 520.89mg/L to 1269mg/L. The proposed statistical model demonstrated satisfactory predictive performance, with a P-value=0.0022 and $R^2=0.93$. The key innovation of this research is the combination of efficient bacterial strains with a central composite design to model and simultaneously analyze the influences of the most important operational factors for ferric iron production. The statistically efficient method of this work has been effective in reducing trial and error to a considerable extent for optimizing operational factors to move forward with innovations in the aspect of native bacterial strains for bioleaching on a larger scale.

Keywords

Bioleaching, Biooxidation, Chemolithotrophic bacteria, Experimental design, Iron

Introduction

Iron is one of the most abundant elements in the earth's crust and plays a vital role in many biological activities. Although various oxidation states have been proposed for iron, the ferrous and ferric states are the most common. The iron cycle is one of the most important biogeochemical cycles, and microorganisms play a key role in the transition between various oxidation states of iron. Iron-oxidizing microorganisms are not only key players in the biogeochemical cycles of iron but also play important roles in the cycles of other metals and in bioindustrial mining-related activities (1). The biologically catalyzed oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} is of particular significance in hydrometallurgical processes, as under low pH conditions (below 2), this reaction proceeds through the activity of iron-oxidizing bacteria at rates several orders of magnitude higher than abiotic oxidation under ambient temperature and pressure (2). Sulfide ores are the most abundant source of copper, with chalcopyrite accounting for about 70% of global copper reserves. Due to the high emissions of polluting gases, especially sulfur dioxide, as well as the high investment costs, efforts have been intensified to develop alternative hydrometallurgical processes to conventional methods.

Chalcopyrite bioleaching is a new technology for the economic extraction of copper from low-grade and complex ores, with low investment and operating costs and environmental benefits. Bioleaching relies on the activity of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms to regenerate reactive agents such as ferric iron and acid during the leaching process (3, 4). The ability of acidophiles to grow at low pH and tolerate high acid concentrations is of industrial significance. One reason is their involvement in the iron cycle, which relies on the interconversion of iron ions between their two oxidation states (Fe^{2+} and Fe^{3+}). The iron cycle primarily occurs in acidic environments, where ferrous iron acts as an electron donor under aerobic conditions, allowing acidophilic bacteria to derive energy. Ferric iron is relatively insoluble at neutral pH, whereas its solubility increases in acidic solutions, facilitating continuous cycling and metal solubilisation (5). *Acidithiobacillus ferrooxidans*, an acidophilic and chemolithotrophic bacterium, is one of the most important microorganisms used in biohydrometallurgy, capable of oxidizing ferrous iron. This bacterium plays a pivotal role in bioleaching of refractory metal sulfides like chalcopyrite by producing ferric ions as a strong oxidant and regenerating it, turning the process into a green and economical method for extracting copper, gold, and other metals from low-grade ores (6, 7). Results by researchers indicate that resistance to uranium in leaching microorganisms is often very low, and uranium-containing leach solutions slow down or inhibit iron biooxidation in these microorganisms. Therefore, selecting the appropriate type of microbes in microbial leaching operations is of utmost importance (8). The Kal-e-Kafi copper mine is located in the Anarak mining area in Isfahan province. Three types of mineralizations are identifiable in this mine: 1- Copper mineralization, 2- Copper-nickel-cobalt-uranium mineralization, 3- Copper-nickel-cobalt-arsenic mineralization (9). Accordingly, the aim of the present study is to optimize ferric iron production as a key oxidizing agent in the bioleaching of copper from the Kal-e-Kafi mine ore using uranium-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3. The present study, emphasizing the importance of iron ion in the bioleaching, was conducted by optimizing the effective parameters (leaching duration, initial bacterial inoculum and pulp density).

Materials and methods

A mesophilic chemolithotroph, uranium-resistant bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3, was used in this study that belongs to biological resource of Nuclear Science and Technology Research Institute of Iran (in press). The liquid APH medium was used for the growth of the target bacterium and for the bioleaching environment (10). The ore sample, with a grade of $\text{Cu} = 4786$ ppm, was obtained from the Kal-e-Kafi mine and was prepared for use by crushing to a particle size of $d_{80} = 100 \mu\text{m}$ (9, 11).

Three parameters, pulp density, duration of the bioleaching process, and bacterial inoculation were evaluated for their individual and interactive effects on ferric iron production by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 using Response Surface Methodology (RSM) based a Central Composite Design (CCD). In the CCD, the variables were set at five levels: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, and $+\alpha$. Using this design, 17 experiments were planned. All experiments were conducted in 150 mL of APH medium at 30°C in a shaking incubator at 150 rpm under aerobic conditions. Ferric and total iron concentrations were determined by sampling from the flasks at the end of each experiment (12, 13).

To determine ferric iron (Fe^{3+}) in the culture medium, 100 μL of the samples was added to 3 mL of 10% sulfosalicylic acid. Sulfosalicylic acid forms a purple complex with ferric ions present in the medium. The absorbance of the solution was then measured at 500 nm using a spectrophotometer, based on a standard calibration curve. For the measurement of total iron in the culture medium, 3 mL of 10% sulfosalicylic acid and 3 mL of 25% ammonia were added to 100 μL of the samples. Sulfosalicylic acid initially reacts with ferric ions to form a purple complex. Upon increasing the pH by adding ammonia, sulfosalicylic acid reacts with all iron ions present in the medium, forming a yellow complex. The absorbance of the solution was measured at 425 nm using a spectrophotometer according to the standard calibration curve (14).

Discussion of Results & Conclusions

The results showed that the ferric iron produced by the bacterium decreased from 1695.86 mg/L to 135.36 mg/l as the bioleaching duration increased from 2 to 21 days. The prolonged bioleaching time also decreased ferric iron concentration because of microbial growth dynamics and inhibitory effects (17). The decrease in concentration of ferric iron during prolonged bioleaching time is not solely related to microbial growth dynamics but also to the consumption of ferric iron as an oxidant in leaching reactions and its removal from solution through precipitation as secondary minerals such as jarosite (3). With an increase in the initial bacterial inoculum from %5 to %14.7, the ferric iron concentration increased from 520.89 mg/L to 1269 mg/L, and then decreased to 1122.33 mg/L with further increases in inoculum size. Ferric iron production increased with initial inoculation up to an optimal level and declined after that time, likely due to competition for limited nutrients and oxygen (11,16). Furthermore, the results indicated that increasing the pulp density from %5 to %15 led to a decrease in ferric iron production from 1590.86 mg/L to 838.34 mg/L. Increasing pulp density reduced ferric iron generation due to mass transfer limitations and microbial inhibition, consistent with previous bioleaching experiments (11,14,15). The use of central composite design enabled efficient identification of key and interaction effects, highlighting the importance of balanced process optimization. The p- and F-values of the proposed model were 0.0022 and 11.08, respectively, confirming the model's validity. Moreover, the R^2 value was 0.93, indicating that the proposed model can reliably predict the experimental data. Finally, the results show that ferric iron production by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 is strongly influenced by operational conditions. The application of Central Composite Design within the Response Surface Methodology framework enabled the simultaneous identification and quantification of main and interactive effects of operational variables while substantially reducing the number of experiments and associated costs. These findings underscore that effective ferric iron production requires achieving an optimal balance between operational and biological conditions of the system. Overall, the results of this study not only provide valuable scientific insights into the behavior of the native uranium-resistant bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 but also serve as a robust foundation for designing and optimizing large-scale bioleaching processes, thereby enhancing the efficiency of industrial applications reliant on biological iron oxidation by indigenous strains.

بررسی فاکتورهای موثر در اکسیداسیون زیستی آهن توسط/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس

چکیده

هم‌زمان با رشد فعالیت‌های صنعتی، نگرانی‌ها درباره کاهش تدریجی ذخایر فلزی با قابلیت فرآوری آسان و بهره‌برداری از این منابع افزایش یافته است. از این رو، توسعه فناوری‌های زیست‌سازگار که قادر به استخراج فلزات از منابع پیچیده و مقاوم هستند، اهمیت قابل توجهی پیدا کرده است. هیدرومتالورژی زیستی به عنوان یک فناوری سبز و پایدار شناخته می‌شود که برای تسهیل انحلال فلزات بر میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده آهن متکی است. این میکروارگانیسم‌ها از طریق تولید یون‌های آهن فریک، که به عنوان یک عامل اکسیدکننده مؤثر و کم‌هزینه عمل می‌کنند، در فرایند فروشویی نقش دارند. در پژوهش حاضر، اثرات منفرد و برهم‌کنشی پارامترهای عملیاتی شامل پالپ دانسیته، زمان فرایند و میزان تلقیح اولیه باکتری بر تولید آهن فریک در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ کال کافی، توسط باکتری مقاوم به اورانیوم/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3 مورد بررسی قرار گرفت. طراحی آزمایش‌ها با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی در چارچوب روش رویه پاسخ انجام شد. نتایج نشان داد که افزایش زمان از ۲ تا ۲۱ روز موجب کاهش غلظت آهن فریک از ۱۶۹۵/۸۶ mg/l به ۱۳۵/۳۶ mg/l می‌شود. به طور مشابه، افزایش پالپ دانسیته از ۵٪ به ۱۵٪ باعث کاهش میزان تولید آهن فریک از ۱۵۹۰/۸۶ mg/l به ۸۳۸/۳۴ mg/l گردید. از سوی دیگر، با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتری از ۵٪ به ۱۴/۷٪، مقدار تولید آهن فریک از ۵۲۰/۸۹ mg/l به ۱۲۶۹ mg/l افزایش یافت. مدل آماری پیشنهادی عملکرد پیش‌بینی‌کننده رضایت‌بخشی از خود نشان داد، بطوریکه مقدار $P=0.0022$ و $R^2=0.93$ به دست آمد. نوآوری اصلی این پژوهش در ترکیب به کارگیری سویه‌های باکتریایی کارآمد با روش طراحی مرکب مرکزی به منظور مدل‌سازی و تحلیل هم‌زمان اثر مهم‌ترین عوامل عملیاتی مؤثر بر تولید آهن فریک نهفته است. روش آماری کارآمد به کاررفته در این تحقیق، با کاهش قابل توجه وابستگی به آزمون و خطا در بهینه‌سازی پارامترهای عملیاتی، زمینه را برای توسعه و پیشبرد فرایندهای فروشویی زیستی مبتنی بر سویه‌های بومی را در مقیاس‌های بزرگ‌تر فراهم کرده است.

واژگان کلیدی: اکسیداسیون زیستی، آهن، باکتری کمولیتروف، فروشویی زیستی، طراحی آزمایش

مقدمه

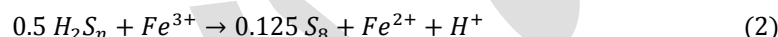
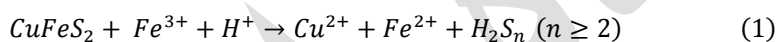
آهن یکی از فراوان‌ترین عناصر موجود در پوسته زمین است و نقش حیاتی در بسیاری از فعالیت‌های زیستی ایفا می‌کند. اگرچه حالت‌های اکسیداسیونی مختلفی برای آهن پیشنهاد شده‌اند، اما دو حالت فرو^۱ و فریک^۲ شایع‌ترین آن‌ها محسوب می‌شوند. تغییر در عدد اکسایش آهن تحت تاثیر شرایط محیطی از قبیل، pH، میزان اکسیژن و پتانسیل اکسید-احیاء قرار دارد. چرخه آهن یکی از مهم‌ترین چرخه‌های بیوژئوشیمیایی است و میکروارگانیسم‌ها نقش بسیار کلیدی در جابجایی بین حالت‌های اکسیداسیون مختلف آهن دارند. در میان انواع اکسیدکنندگان، بیشترین مطالعه را باکتری‌های اکسیدکننده آهن به خود اختصاص دادند. اکثر این باکتری‌ها به شاخه‌ی پروتئوباکتیریا، بزرگترین شاخه باکتریایی، تعلق دارند. اکسیدکنندگان آهن نه تنها بازیکنان کلیدی و مهم در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی آهن محسوب می‌شوند، بلکه در چرخه‌ی سایر عناصر و فعالیت‌های زیست صنعتی مرتبط با معدن نیز از اهمیت زیادی برخوردارند (۱). اکسیداسیون زیست کاتالیزشده‌ی فرو به فریک در فرایندهای بیوهیدرومتالورژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا در pH پایین (کمتر از ۲)، این فرایند با استفاده از باکتری‌های اکسیدکننده‌ی آهن با سرعتی چندین مرتبه بیشتر از اکسیداسیون غیرزیستی در دما و فشار معمولی انجام می‌شود (۲). آهن فریک نقش بسیار مهمی در فرایندهای فروشویی

¹ Fe²⁺

² Fe³⁺

زیستی کانسنگ‌های سولفیدی ایفا می‌کند. کانسنگ‌های سولفیدی فراوان‌ترین منبع تأمین مس به‌شمار می‌روند که در این میان، کالکوپیریت حدود ۷۰٪ از ذخایر جهانی مس را تشکیل می‌دهد. به‌طور معمول، کانسارهای پرعیار از طریق فلوتاسیون و به‌دنبال آن ذوب کنسانتره فرآوری می‌شوند. با این حال به دلیل انتشار زیاد گازهای آلاینده، به ویژه دی‌اکسید گوگرد^۳ و همچنین هزینه‌های بالای سرمایه‌گذاری، تلاش‌ها در زمینه توسعه‌ی جایگزینی فرآیندهای بیوهیدرومتالورژیکی به‌جای روش‌های مرسوم شدت یافته‌اند. کالکوپیریت فراوان‌ترین و مقاوم‌ترین کانی سولفیدی مس در جهان به‌شمار می‌رود. فروشویی زیستی کالکوپیریت یک فناوری نوین جهت استحصال اقتصادی مس از کانسارهای کم‌عیار و پیچیده، با هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی کم و مزایای زیست محیطی به‌شمار می‌رود. فروشویی زیستی وابسته به عملکرد میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده‌ی آهن و گوگرد برای تولید عوامل واکنش‌گر مانند آهن فریک و اسید در طول فروشویی می‌باشد (۳، ۴).

آهن فریک نقش بسیار مهمی در بیولیچینگ کالکوپیریت ایفا می‌کند. بیولیچینگ کالکوپیریت شامل چندین مرحله است که با انحلال سولفیدهای معدنی توسط پروتون‌ها و آهن فریک موجود در محیط بیولیچینگ آغاز می‌شود. سپس فلزات به‌صورت یونی آزاد شده و گاز هیدروژن سولفید تولید می‌شود. هیدروژن سولفید تولید شده با اکسایش توسط یون آهن فریک اکسید شده و متعاقباً به پلی‌سولفیدها تجزیه و دایمریزه می‌شود. نتیجه‌ی فعالیت‌های ترکیبی پروتون‌ها و آهن فریک، تشکیل گوگرد عنصری به عنوان واسطه‌ی اصلی است. واکنش‌های این مکانیسم به صورت زیر بیان می‌شود (۴):



گوگرد عنصری تولید شده در واکنش ۲ نسبتاً پایدار است، اما ممکن است توسط میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده گوگرد (مانند /اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس^۴ یا /اسیدی تیوباسیلوس کالدوس^۵) به اسید سولفوریک اکسید شود و همچنین آهن فرو تولید شده در واکنش‌های ۱ و ۲ نیز ممکن است مجدداً توسط میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده آهن مانند /اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس^۶ یا باکتری‌های جنس لپتوسپیریلوم^۷ یا سولفوباسیلوس^۷ به آهن فریک اکسید شود. در نتیجه نقش میکروارگانیسم‌ها در فرآیند انحلال سولفیدهای فلزی، تأمین اسید سولفوریک برای حمله‌ی پروتونی و حفظ آهن در حالت اکسید شده فریک برای حمله‌ی اکسیداتیو (اکسایشی) به کانی می‌باشد. این نکته که اسیدوفیلها توانایی رشد در pH پایین و تحمل غلظت بالای اسید را داشته باشند، از دیدگاه صنعتی حائز اهمیت می‌باشد. یکی از دلایل آن، مشارکت آنها در چرخه آهن است که به تبدیل متقابل یون‌های آهن بین دو حالت اکسیداسیون فرو و فریک متکی است. چرخه آهن در درجه اول در محیط‌های اسیدی رخ می‌دهد، جاییکه آهن دو ظرفیتی به عنوان دهنده الکترون در شرایط هوای عمل می‌کند و به باکتری‌های اسیددوست اجازه می‌دهد انرژی کسب کنند. آهن سه ظرفیتی در pH خنثی نسبتاً نامحلول است، در حالیکه حلالیت آن در محلول‌های اسیدی افزایش می‌یابد و چرخه مداوم و انحلال فلز را تسهیل می‌کند (۴، ۵).

باکتری /اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس، باکتری اسید دوست و کمولیتوتروف، یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در هیدرومتالورژی زیستی است که قادر به اکسیداسیون آهن دوظرفیتی ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) و چندین ترکیب گوگردی از قبیل، گوگرد عنصری در محیط‌های اسیدی (pH بهینه ی ۲/۵) می‌باشد. این باکتری از طریق تولید یون‌های فریک به عنوان اکسیدکننده قوی و بازتولیدکننده آن، نقش محوری در بیولیچینگ سولفیدهای فلزی مقاوم مانند کالکوپیریت (CuFeS_2) ایفا می‌کند، که این فرآیند را

³ SO₂

⁴ Acidithiobacillus thiooxidans

⁵ Acidithiobacillus caldus

⁶ Leptospirillum

⁷ Sulfobacillus

به روشی سبز و اقتصادی برای استخراج مس، طلا و سایر فلزات از کنسارهای کم‌عیار تبدیل کرده است. این باکتری، گسترده‌ترین میکروارگانیسم مطالعه شده و پر استفاده‌ترین میکروارگانیسم در صنعت فروشویی زیستی است (۶، ۷). امروزه ثابت شده است که دانسیته جمعیت میکروبی و مقاومت آنها به فلزات در فرایندهای فروشویی زیستی از اهمیت بالایی برخوردار است. تحقیقات نشان داده است که استراتژی مقاومت باکتری‌ها به اسید و فلزات سنگین برای پروسه‌های فروشویی میکروبی بسیار با اهمیت می‌باشد، جاییکه فلزات محلول به طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کنند (۱۵). نتایج توسط محققان نشان داده است که اغلب مقاومت در میکروارگانیسم‌های فروشویی نسبت به اورانیوم بسیار کم می‌باشد و محلول‌های فروشویی دارای اورانیوم، اکسیداسیون زیستی آهن فرو را در این میکروارگانیسم‌ها کند و یا مهار می‌کنند (۸). بنابراین انتخاب نوع مناسب میکروبیها در عملیات فروشویی میکروبی بیش از حد اهمیت دارد.

معدن مس کال‌کافی در منطقه معدنی انارک در استان اصفهان واقع شده است. منطقه‌بندی مشخصی از کنسارها در ناحیه انارک وجود دارد و از غرب به شرق سه نوع کانه‌زایی مرتبط با ولکانیک ائوسن قابل تشخیص است: ۱- کانه‌زایی مس ۲- کانه‌زایی مس-نیکل-کبالت-اورانیوم ۳- مس-نیکل-کبالت-آرسنیک (۹). بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر، بهینه‌سازی تولید یون آهن فریک به‌عنوان عامل اکسیدکننده کلیدی در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ معدن کال‌کافی، توسط باکتری مقاوم به اورانیوم /اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3^۸ است. در این مطالعه، برای نخستین بار اثرات اصلی و برهم‌کنشی پالپ دانسیته، زمان فرایند و میزان تلقیح باکتری به‌صورت کمی با بهره‌گیری از روش طراحی مرکب مرکزی در چارچوب روش رویه پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نوآوری اصلی این پژوهش در تلفیق استفاده از یک سویه مقاوم به اورانیوم در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ معدن کال‌کافی با رویکرد پیشرفته طراحی آزمایش و تحلیل آماری دقیق نهفته است که امکان شناسایی شرایط بهینه واقعی و کاهش آزمون‌وخطا را فراهم می‌کند. نتایج این مطالعه می‌تواند مبنای علمی معتبری برای توسعه و مقیاس‌پذیری فرایندهای زیستی استخراج مبتنی بر اکسیداسیون زیستی آهن فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

باکتری و سنگ معدن

باکتری مورد استفاده در این پژوهش، یک باکتری مقاوم به اورانیوم به نام /اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3، جدا شده از معدن گچین بندرعباس می‌باشد که متعلق به ذخایر زیستی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای ایران است (In press). کانسنگ مس حاوی اورانیوم، از معدن کال‌کافی با عیار حدود $Cu = 4786 \text{ ppm}$ تهیه شده و خردایش آن با اندازه ذرات $d_{80} = 100$ میکرومتر آماده گردید. طول و عرض محدوده جغرافیایی محدوده کال‌کافی $10^{\circ} 54'$ تا $54^{\circ} 54'$ شرقی و $33^{\circ} 30'$ تا $33^{\circ} 30'$ شمالی در منطقه معدنی انارک در استان اصفهان می‌باشد (۱۱).

محیط‌های کشت باکتری

از محیط کشت مایع APH و محیط کشت جامد SM medium جهت کشت باکتری موردنظر استفاده شد (۱۰، ۱۶). محیط کشت مایع APH در یک لیتر حاوی ۲ گرم آمونیوم سولفات، ۵/۵ گرم دی پتاسیم فسفات، ۵/۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۱/۱ گرم پتاسیم کلرید، ۱/۰۱ گرم کلسیم نیترات و ۲۰ گرم نمک سولفات آهن ۷ آبه می‌باشد و pH نهایی این محیط توسط اسید سولفوریک بر روی ۱/۸ تنظیم گردید (۱۰). باکتری با مقدار تلقیح اولیه ۲۰٪ به شکل هوازی در شیکر انکوباتور $30^{\circ}C$ با دور ۱۵۰ rpm (شرایط بهینه رشد) در این محیط کشت داده شد.

^۸ *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3

محیط کشت جامد SM medium استفاده شده دارای **محلول ۱**: ۳۵ ml از محلول 10x Modified 9K (حاوی: ۵۰ g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۱/۶۶ g/l KCl، ۸/۴۴ g/l K_2HPO_4 ، ۸/۳۴ g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۲۴ g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) که ۲۶۵ ml آب مقطر اضافه گردید (pH محلول برابر با ۲/۵) و **محلول ۲**: ۱۱ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در ۷۵ ml آب مقطر (pH برابر با ۲/۵) و **محلول ۳**: ۲ گرم آگارز در ۱۲۵ ml آب مقطر (۱۶)، می باشد. پلیت های کشت باکتری در محیط SM در انکوباتور 30°C گرماگذاری می گردید.

بررسی پارامترهای موثر در اکسیداسیون زیستی آهن جهت آزمایشات فروشویی زیستی توسط طراحی آزمایش

سه پارامتر میزان دانسیته پالپ (استریل شده)، تعداد روزهای انجام فرایند فروشویی زیستی و میزان تلقیح باکتری به روش رویه پاسخ^۹ و از طریق طراحی مرکب مرکزی^{۱۰}، به منظور بررسی اثرات منفرد و تعاملی شان بر میزان آهن فریک تولید شده در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ معدن کال کافی توسط /سیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3، مورد ارزیابی و بهینه سازی قرار گرفتند. در طراحی مرکب مرکزی، متغیرهای مستقل در ۵ سطح 0 ، -1 ، 1 ، $+\alpha$ - بررسی گردید. سطوح مختلف پارامترهای طراحی آزمایش در **جدول ۱** نشان داده شده است. در طی این بررسی ۱۷ عدد آزمایش طراحی شد که مشخصات هر آزمایش در **جدول ۲** مشاهده می گردد. تمام آزمایشات در ارلن های ۲۵۰ ml با حجم های ۱۵۰ ml از محیط کشت APH انجام و در دمای 30°C در شیکرانکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و تحت شرایط هوازی گرماگذاری شدند. میزان آهن فریک تولیدی و همچنین میزان آهن کل با نمونه برداری از مایع رویی محیط فروشویی در ارلن های مربوط در روز پایانی هر آزمایش اندازه گیری شد (**۱۲**).

^۹ Response Surface Methodology (RSM)

^{۱۰} Central Composite Design (CCD)

جدول ۱- متغیرهای طراحی مرکب مرکزی و سطوح کد شده‌ی مربوط به آن‌ها
Table1- Variables and the corresponding coded levels in the central composite design

Parameters	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Pulp density (%)	5	7.03	10	12.97	15
Bacterial inoculum (%)	5	8.04	12.5	16.96	20
time	2	5.85	11.5	17.15	21

جدول ۲- مقادیر متغیرهای آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش رویه پاسخ
Table2- Experimental levels of central composite design variables in RSM

RUN	A Time (Day)	B Inoculation (%)	C Pulp Density (%)
1	17.15	8.04	12.97
2	5.85	8.04	12.97
3	17.15	16.96	12.97
4	5.85	16.96	12.97
5	11.50	12.50	15.00
6	5.85	8.04	7.03
7	11.50	12.50	5.00
8	11.50	12.50	10.00
9	17.15	16.96	7.03
10	17.15	8.04	7.03
11	11.50	12.50	10.00
12	21.00	12.50	10.00
13	11.50	5.00	10.00
14	11.50	20.00	10.00
15	2.00	12.50	10.00
16	5.85	16.96	7.03
17	11.50	12.50	10.00

سنجش آهن

جهت سنجش میزان آهن فریک محیط‌کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط فروشویی زیستی به ۳ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۱۰٪ اضافه شد. اسید سولفوسالسیلیک با یون‌های آهن فریک محیط تشکیل کمپلکس ارغوانی رنگ می‌دهد. سپس جذب محلول با توجه به منحنی استاندارد در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد (شکل - A).

جهت اندازه‌گیری میزان آهن کل در نمونه‌ها، ۳ میلی‌لیتر از اسید سولفوسالسیلیک ۱۰٪ و سپس ۳ میلی‌لیتر از آمونیاک ۲۵٪ به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط اضافه شد. اسید سولفوسالسیلیک با یون‌های آهن فریک ترکیب شده و کمپلکس ارغوانی رنگی ایجاد می‌کند. با افزایش pH محیط به دلیل افزودن آمونیاک، اسید سولفوسالسیلیک با تمام یون‌های آهن موجود در محیط واکنش داده و کمپلکس زرد رنگی تشکیل می‌دهد. در نهایت، جذب محلول با استفاده از منحنی استاندارد در طول موج ۴۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (شکل-۱(B) (۱۴).



A



B

شکل ۱- تصاویر بالن حجمی‌های ۵۰ ml از آزمایش سنجش آهن براساس تغییرات جذب نوری (A) سنجش آهن فریک (B) سنجش آهن کل

Figure 1- Pictures of volumetric flasks (50ml) in iron determination test based on optical absorbance changes (A) Ferric iron determination (B) Total iron determination

نتایج

در جدول-۳ مشخصات کمی مربوط به هر ۱۷ آزمایش طراحی‌شده بر اساس سه متغیر مستقل طراحی مرکب مرکزی و همچنین میزان آهن فریک تولیدی مربوط به هر ۱۷ آزمایش مشاهده می‌گردد. به منظور ارزیابی میزان تطابق مدل پیشنهادی نرم

افزار با رابطه‌ی معنادار آماری موجود بین متغیرهای مستقل و متغیر پاسخ از تحلیل واریانس^{۱۱} استفاده شد (جدول-۴). روش رویه پاسخ یک مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی می‌باشد که ارتباط میان چندین متغیر مستقل و یک یا چندین متغیر وابسته (متغیر پاسخ) را توصیف می‌کند. روش رویه پاسخ، نتایج تجربی بدست‌آمده از طراحی آزمایش را توسط مدل‌های ریاضی مناسب سازی می‌کند و اعتبار مدل براساس روش‌های آماری بدست می‌آید. طراحی آزمایش به‌ویژه برای بهبود کارایی فرآیندها قابل استفاده است. هدف اصلی طراحی آزمایش، دخالت دادن همزمان تمام پارامترهای مهم در یک مجموعه از آزمایشات طراحی شده و ادغام نتایج از طریق یک مدل ریاضی می‌باشد. پس از آن از این مدل می‌توان برای بهینه‌سازی، پیش‌بینی یا تفسیر استفاده کرد. این امر منجر به بهبود عملکرد فرآیند، کاهش تعداد متغیرها در فرآیند با در نظر گرفتن تنها مهمترین آن‌ها و همچنین کاهش هزینه‌ی عملیات و زمان آزمایش می‌شود (۱۲). به طور کلی، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ و مقدار F بزرگ در جدول تحلیل واریانس نشان‌دهنده تاثیر بیشتر متغیرها با سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به ترتیب برابر با ۰/۰۲۲ و ۱۱/۰۸ می‌باشد که دلالت بر صحت مدل پیشنهادی دارد. همچنین مقدار R^2 برابر با ۰/۹۳ می‌باشد که این مقدار نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی به‌خوبی قادر است مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند. نتایج جدول-۴ نشان می‌دهد که هر سه متغیر تعداد روزهای انجام فرایند فروشویی زیستی، میزان تلقیح اولیه باکتری و میزان پالپ دانسیته از لحاظ آماری ($p\text{-value} < 0/05$) بر میزان آهن فریک تولید شده توسط باکتری بسیار تاثیرگذار هستند.

جدول ۳- مقادیر متغیرها و پاسخهای آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش رویه پاسخ
Table3- Experimental variables and responses in the central composite design of RSM

RUN	A Time (Day)	B Inoculation (%)	C Pulp Density (%)	غلظت آهن فریک (ppm)
1	17.15	8.04	12.97	202
2	5.85	8.04	12.97	679
3	17.15	16.96	12.97	650
4	5.85	16.96	12.97	1141.5
5	11.50	12.50	15.00	924.5
6	5.85	8.04	7.03	1285.5
7	11.50	12.50	5.00	1676
8	11.50	12.50	10.00	1213.5
9	17.15	16.96	7.03	982.5
10	17.15	8.04	7.03	679
11	11.50	12.50	10.00	982.5
12	21.00	12.50	10.00	245.5
13	11.50	5.00	10.00	635.5
14	11.50	20.00	10.00	1228
15	2.00	12.50	10.00	1806
16	5.85	16.96	7.03	1517
17	11.50	12.50	10.00	1459

مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به صورت زیر تعریف شده است:

¹¹ Analysis of variance (ANOVA)

$$\text{Fe}^{3+} = -1691.22699 + 256.18806 * \text{Time} + 688.56736 * \text{Inoculation} - 134.27012 * \text{Pulp Density} - 44.27908 * \text{Time} * \text{Inoculation} + 1.28396 * \text{Time} * \text{Pulp Density} + 3.54025 * \text{Inoculation} * \text{Pulp Density} - 3.31297 * \text{Time}^2 - 27.48621 * \text{Inoculation}^2 + 1.78258 * \text{Time} * \text{Inoculation}^2$$

جدول ۴- تحلیل واریانس مدل پیشنهادی
Table4- ANOVA of the proposed model

References	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	3225634	9	358403.8	11.08	0.0022
A-Time	1217580	1	1217580	37.66	0.0005
B-Inoculation	436643.7	1	436643.7	13.50	0.0079
C-Pulp Density	683559.3	1	683559.3	21.14	0.0025
AB	413.2813	1	413.2813	0.01	0.9132
AC	3719.531	1	3719.531	0.12	0.7444
BC	17625.03	1	17625.03	0.55	0.4843
A^2	138022.9	1	138022.9	4.27	0.0777
B^2	238449.8	1	238449.8	7.37	0.0300
AB^2	132882.5	1	132882.5	4.11	0.0822

نتایج نشان دادند میزان آهن کل محیط کشت برابر با ۴۰۸۹/۵ mg/l می باشد که در نقطه مرکزی، میزان آهن فریک تولید شده توسط باکتری با افزایش زمان از ۲ تا ۲۱ روز، از مقدار ۱۶۹۵/۸۶ mg/l به ۱۳۵/۳۶ mg/l کاهش می یابد (شکل ۲). علت این کاهش را می توان به مصرف پیوسته آهن فریک، به عنوان اکسیدکننده اصلی برای انحلال مس در طول فروشویی زیستی دانست. با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتری در محیط از ۵٪ تا ۱۴/۷٪، میزان آهن فریک تولیدی از ۵۲۰/۸۹ mg/l به ۱۲۶۹ mg/l افزایش می یابد و سپس با افزایش بیشتر میزان تلقیح اولیه باکتری، میزان آهن فریک تولید شده به ۱۱۲۲/۳۳ mg/l تقلیل می یابد. دلایل احتمالی برای این کاهش را می توان به یک مجموعه از فاکتورهای فیزیولوژیکی منفی نسبت داد. این فاکتورها شامل رقابت بین سلولی، اتمام موادمغذی ضروری و انباشتگی متابولیت های سمی می باشند که منجر به مهار احتمالی فعالیت های متابولیکی - میکروبی و در نتیجه کاهش کارایی موثر تولید زیستی آهن فریک در حین فروشویی زیستی می شوند. همچنین نتایج نشان دادند که با افزایش میزان پالپ دانسیته مورد استفاده از ۵٪ تا ۱۵٪، میزان آهن فریک تولید شده از ۱۵۹۰/۸۶ به ۸۳۸/۳۴ کاهش می یابد. دانسیته پالپ های بالا ممکن است چندین فاکتور مهاری را بر روند فرایند فروشویی زیستی اعمال کنند. این فاکتورهای مهاری شامل محدودیت دسترسی به موادمغذی، CO₂ و O₂ و همچنین محدودیت انتقال جرمی می باشند که می توانند بر فعالیت میکروبی و کاهش تولید زیستی آهن فریک تاثیر منفی بگذارند (شکل ۲). در اشکال ۳ تا ۵، رویه های سه بعدی پاسخ ها که ناشی از برهمکنش سه متغیر، تعداد روزهای انجام فرایند فروشویی زیستی، میزان تلقیح اولیه باکتری و میزان پالپ دانسیته مورد استفاده هستند، نشان داده شده اند.

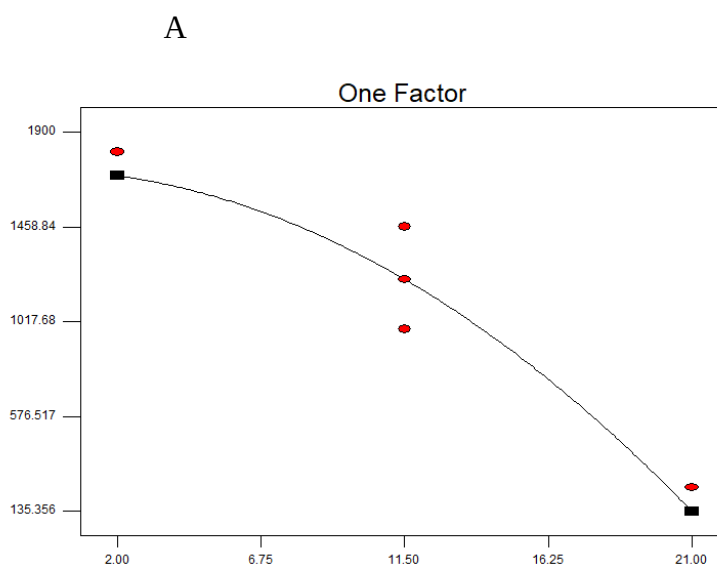
Design-Expert® Software

Fe3+(mg/l)

◆ Design Points

X1 = A: Time(Day)

Actual Factors
 B: Inoculation(%) = 12.50
 C: Pulp Density(%) = 10.00



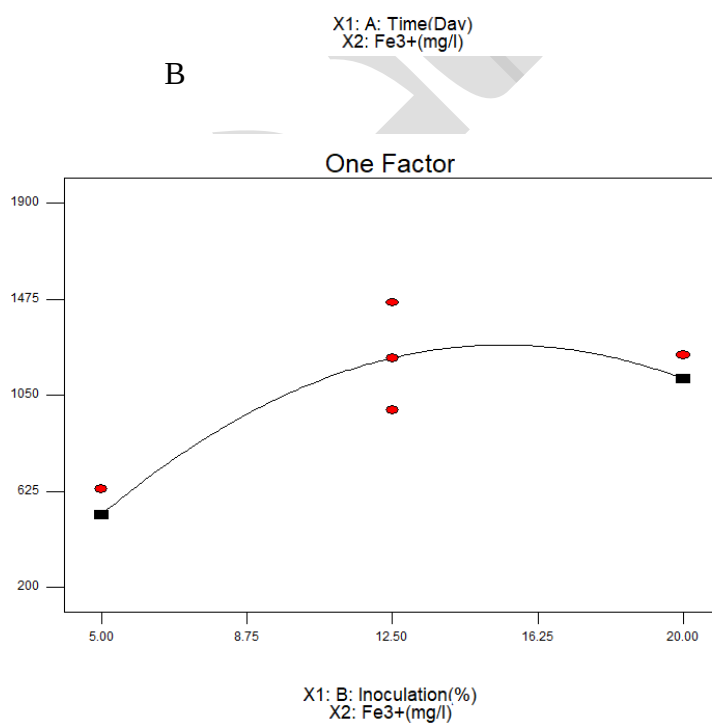
Design-Expert® Software

Fe3+(mg/l)

◆ Design Points

X1 = B: Inoculation(%)

Actual Factors
 A: Time(Day) = 11.50
 C: Pulp Density(%) = 10.00



C

Design-Expert® Software

Fe3+(mg/l)

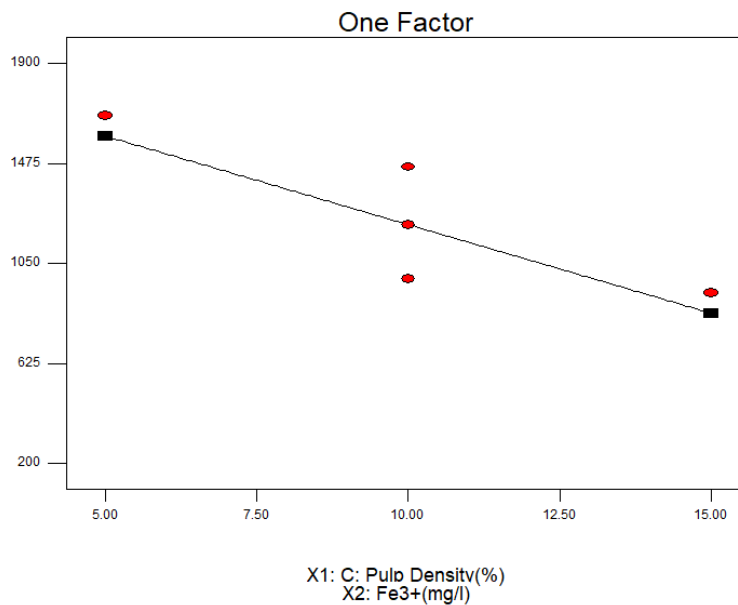
◆ Design Points

X1 = C: Pulp Density(%)

Actual Factors

A: Time(Day) = 11.50

B: Inoculation(%) = 12.50

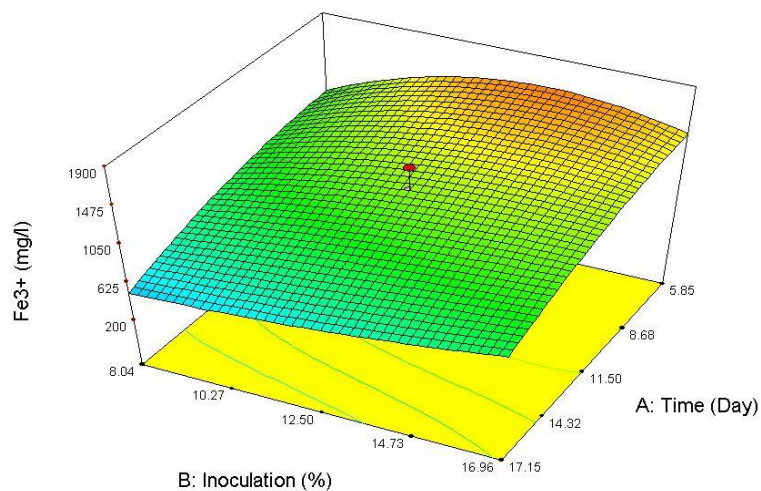


شکل ۲- نمودارهای تأثیر زمان (A)، میزان تلقیح اولیه باکتری (B) و میزان پالپ دانسیته (C) به طور جداگانه بر اکسیداسیون زیستی آهن توسط/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3

Figure 2- Diagrams of time (A), initial bacterial inoculum (B) and pulp density (C) effect on the iron biooxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3

در بحث کفایت مدل، نمودار [شکل ۶](#) انحراف داده‌های تجربی از داده‌های پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. بنابراین، با توجه به نزدیکی داده‌های تجربی به خط ترسیم‌شده، می‌توان نتیجه گرفت که معادله ارائه شده، به‌خوبی میزان آهن فریک تولید شده توسط باکتری/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3 را توصیف می‌کند.

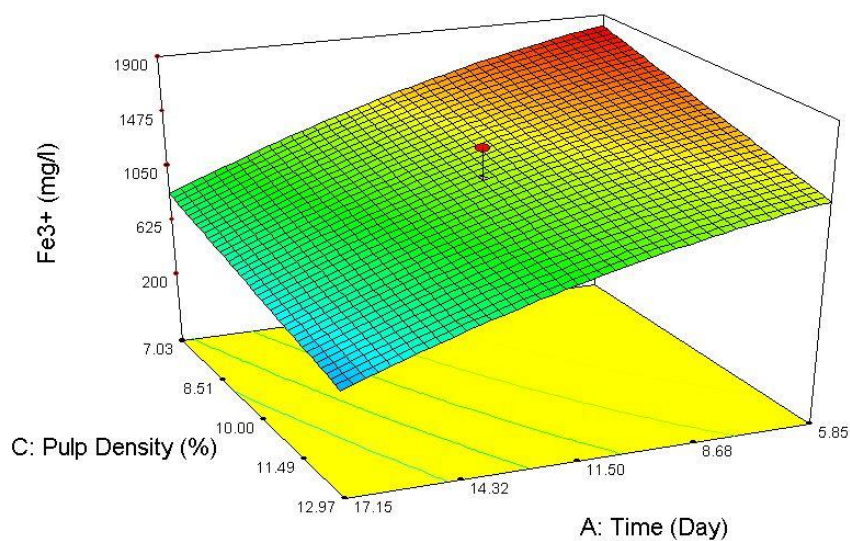
Design-Expert® Software
 Fe3+ (mg/l)
 1806
 202
 X1 = A: Time (Day)
 X2 = B: Inoculation (%)
 Actual Factor
 C: Pulp Density (%) = 10.00



شکل ۳- رویه سه بعدی برهمکنش تعداد روزهای انجام فروشویی زیستی و میزان تلقیح اولیه باکتری بر مقدار آهن فریک تولید شده توسط /سیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3.

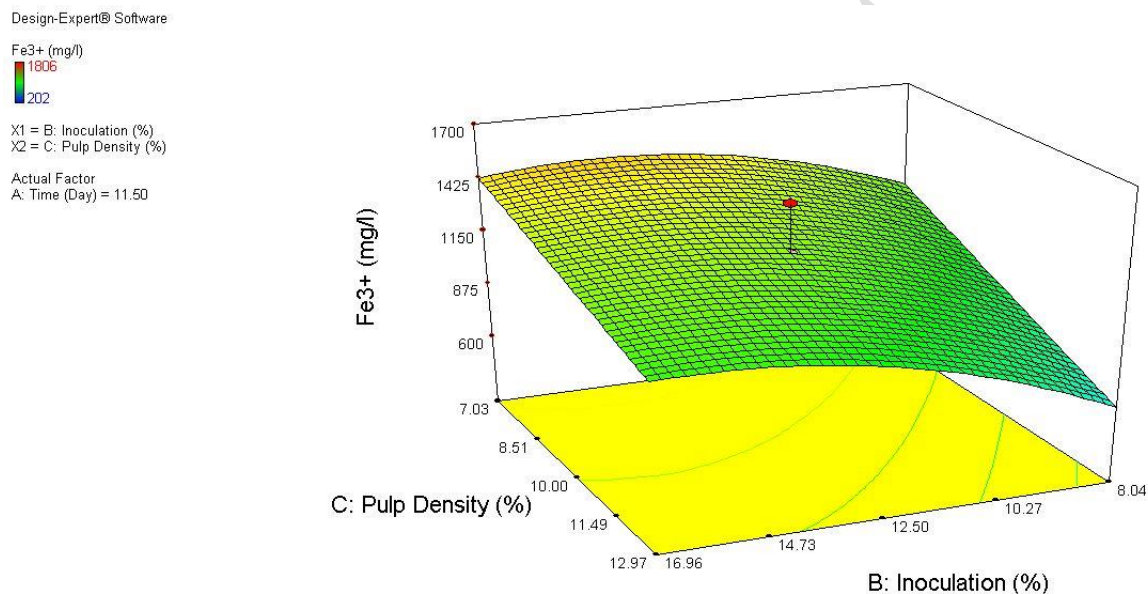
Figure 3- Three-dimensional surface of interaction of bioleaching duration and initial bacterial inoculum on the amount of ferric iron produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3.

Design-Expert® Software
 Fe3+ (mg/l)
 1806
 202
 X1 = A: Time (Day)
 X2 = C: Pulp Density (%)
 Actual Factor
 B: Inoculation (%) = 12.50



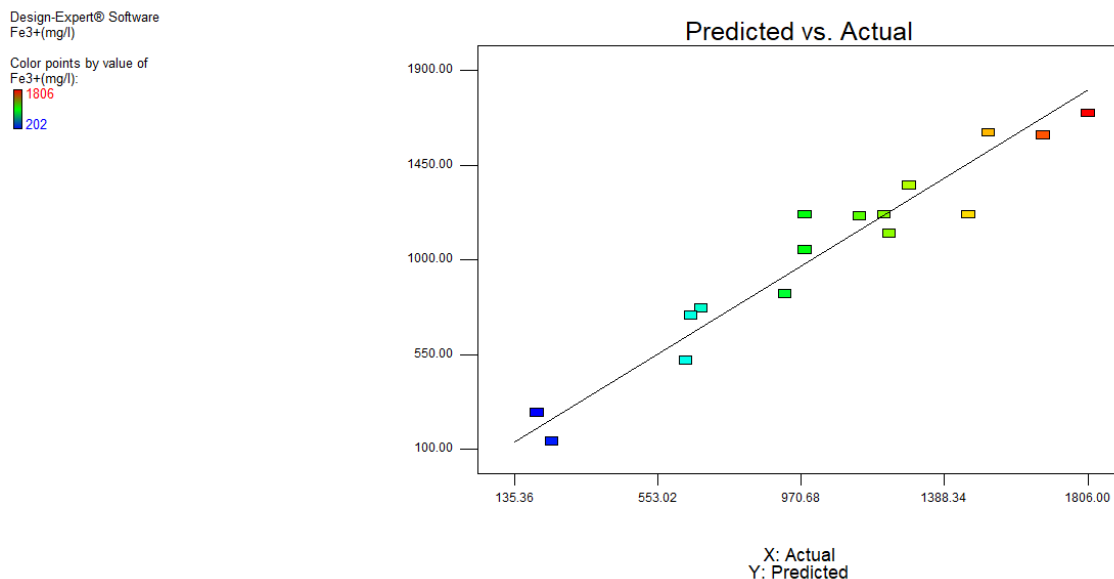
شکل ۴- رویه سه بعدی برهمکنش تعداد روزهای انجام فروشویی زیستی و میزان پالپ دانسیته مورد استفاده بر مقدار آهن فریک تولید شده توسط /اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3.

Figure 4- Three-dimensional surface of interaction of bioleaching duration and pulp density on the amount of ferric iron produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3.



شکل ۵- رویه سه بعدی برهمکنش میزان پالپ دانسیته و میزان تلقیح اولیه باکتری بر مقدار آهن فریک تولید شده توسط /اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3.

Figure 5- Three-dimensional surface of interaction of pulp density and initial bacterial inoculum on the amount of ferric iron produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3.



شکل ۶- مقایسه مقادیر تجربی و مقادیر پیش بینی شده به منظور ارزیابی کفایت مدل

Figure 6-Comparing experimental values and predicted values to assess the adequacy of the model

بحث و نتیجه گیری

اکسیداسیون آهن فرو (Fe^{2+}) به آهن فریک (Fe^{3+}) در حضور اکسیژن، مکانیسم اصلی مورد استفاده توسط میکروارگانیسم‌های فروشویی زیستی برای انحلال فلزات می‌باشد. آهن فرو در pH پایین نسبتاً پایدار است و اکسیداسیون غیرزیستی به شدت آهسته می‌باشد. بنابراین حضور میکروب‌های مسئول فروشویی زیستی در محیط‌های اسیدی، برای فرآیند اکسیداسیون آهن ضروری می‌باشد و از آنجایی که فعالیت میکروب‌ها از میزان اکسیداسیون آهن و گوگرد اندازه گیری می‌شود، هر پارامتری که روی باکتری‌ها و فعالیتشان اثر بگذارد، به صورت غیر مستقیم بر میزان اکسیداسیون فرو و در نتیجه میزان فریک موجود در محلول فروشویی نیز اثرگذار خواهد بود. یون Fe^{2+} منبع اصلی انرژی برای اغلب میکروارگانیسم‌های فروشویی کمولیتوتروف محسوب می‌شود و جمعیت باکتریایی به مقدار آهن فرو اکسید شده بستگی دارد. در یک برآورد تقریبی، برای تولید یک گرم زیست توده به صد گرم اکسیداسیون آهن فرو نیاز است (۱۷-۱۹).

نتایج این پژوهش نشان داد که پالپ دانسیته یکی از پارامترهای کلیدی است که به‌طور معناداری بر میزان تولید یون آهن فریک توسط/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3 تأثیر دارد، به‌طوری‌که افزایش پالپ دانسیته از ۵٪ به ۱۵٪ باعث کاهش قابل توجه آهن فریک تولیدی شد. این یافته با نتایج گزارش شده در مطالعات پیشین در زمینه بیولیچینگ فلزات هم‌راستا است، به‌گونه‌ای که بررسی اثر پالپ دانسیته بر استخراج فلزات نشان داده است با افزایش محتوای جامدات در محیط واکنش، کارایی استخراج کاهش می‌یابد که دلیل آن کاهش در دسترس پذیری اکسیژن و محدودیت در انتقال جرم به سطح ذرات است و همچنین

صدمات سلول باکتری بر اثر سایش فیزیکی ذرات بر سلول‌های باکتری می‌باشد (۲۰، ۲۱). همچنین ثابت شده است که در فرایند فروشویی زیستی، افزایش چگالی پالپ باعث افزایش مواد سمی در محیط فروشویی و مهار رشد میکروبی می‌شود. بنابراین، فرایند استخراج فلز در چگالی پالپ کمتر، اغلب به بهترین شکل انجام می‌شود (۱۷). به طور مشابه، اولوبامبی^{۱۲} و همکاران در مطالعه پیرامون بیولیچینگ چندین فلز نشان دادند که افزایش پالپ دانسیته از ۲/۵٪ به مقادیر بالاتر برای آهن و روی منجر به کاهش درصد استخراج می‌شود که این پدیده نیز به اثرات منفی بالارفتن مقاومت هیدرودینامیکی و کاهش فعالیت باکتری در محیط مرتبط است (۲۲). این تقارن در الگوی تأثیر پالپ دانسیته نشان می‌دهد که کاهش آهن فریک با افزایش درصد جامدات، نه تنها مختص به شرایط این پژوهش بلکه یک روند عمومی در سیستم‌های بیولوژیکی اکسیداسیون آهن است.

مقدار اکسیداسیون، به دلیل چندین عامل، از یک سویه میکروبی به سویه دیگر متفاوت است. تحقیقات نشان داده است که چگالی مایع تلقیح میکروارگانیسم، یکی از عوامل کنترل کننده در سینتیک فروشویی زیستی می‌باشد. جمعیت میکروبی انبوه ممکن است راندمان فروشویی زیستی را افزایش دهد، اما چندین عامل محدود کننده، مانند کمبود CO₂ و منبع مواد مغذی می‌تواند منجر به محدود شدن جمعیت میکروبی شوند. بنابراین برای دستیابی به حداکثر راندمان فروشویی زیستی، باید یک چگالی مایع تلقیح بهینه تامین شود (۱۷). در مورد میزان تلقیح باکتری و زمان فرایند نیز نتایج حاضر نشان‌دهنده وجود یک سطح بهینه هستند؛ افزایش تلقیح اولیه تا ۱۴/۷٪ منجر به افزایش تولید آهن فریک شد، اما تلقیح بیشتر از این مقدار موجب افت تولید گردید. این الگو با داده‌های منتشرشده در ارتباط با نقش مقدار تلقیح اولیه و فعالیت بیولیچینگ مطابقت دارد، جاییکه استفاده از تلقیح مناسب باعث افزایش مقدار اکسیداسیون و کاهش فاز تأخیر رشد می‌گردد، در حالیکه تلقیح‌های بیش‌ازحد می‌تواند باعث رقابت بیش‌ازحد برای منابع محدود، از جمله اکسیژن و مواد مغذی، گردیده و افت کارایی را به دنبال داشته باشد (۲۳). هوانگ^{۱۳} و همکاران در مطالعه‌ای که تأثیر میزان تلقیح/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس بر سینتیک اکسیداسیون یون‌های آهن را بررسی کردند گزارش کردند که افزایش میزان تلقیح می‌تواند سرعت اکسیداسیون آهن فرو را تسریع کند، اما این اثر به صورت غیرخطی بوده و نیازمند بهینه‌سازی است (۲۳).

در پژوهش حاضر نتایج نشان داد که زمان انجام فرایند فروشویی زیستی تأثیر معنی‌داری بر میزان آهن فریک تولیدی دارد، به گونه‌ای که با افزایش زمان از ۲ تا ۲۱ روز، میزان آهن فریک به طور قابل توجهی کاهش یافت. این الگو همسو با یافته‌های مطالعات قبلی است که در فرایندهای بیولیچینگ مشاهده شده است؛ برای مثال، در بررسی بیولیچینگ فلزات مشاهده گردید که غلظت آهن فریک پس از چند روز به طور قابل توجهی تغییر می‌کند و به تدریج کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تغییرات دینامیک رشد باکتری و انباشته شدن ترکیبات سمی (مثلاً تجمع یون‌های فلزی خاص یا مواد آلی) در محیط باشد، امری که رفتار/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس را در مراحل پیشرفته بیولیچینگ تحت شرایط محدودکننده نشان می‌دهد (۱۷، ۲۱). علاوه بر این، مصرف آهن فریک به عنوان اکسیدکننده در واکنش‌های بیولیچینگ و همچنین رسوب آن به صورت فازهای معدنی ثانویه، به ویژه جاروسیت^{۱۴}، نقش مهمی در این کاهش ایفا می‌کند. یون‌های آهن فریک تولیدشده توسط/اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس در واکنش با کانی‌های سولفیدی مصرف می‌شوند و در شرایط محیطی خاص، ممکن است به صورت ترکیبات نامحلول آهن مانند جاروسیت رسوب کنند. این پدیده در مطالعات متعدد بیولیچینگ آهن و فلزات پایه گزارش شده و به عنوان یکی از عوامل محدودکننده مهم در مراحل پیشرفته فرایند شناخته می‌شود (۳). این نتایج مشابه مشاهدات قبلی در بیولیچینگ چندین فلز است و نیاز به تعادل دقیق بین مدت عملیات و فاکتورهای محیطی را تأکید می‌کند.

¹² Olubambi

¹³ Huang

¹⁴ Jarosite

نتایج برهمکنش ها نیز نشان داد که با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتری در محیط از ۵٪ تا ۱۴/۷٪، میزان آهن فریک تولیدی در مدت زمان کمتر (۲ روز) افزایش می یابد، سپس با افزایش بیشتر میزان تلقیح اولیه باکتری، میزان آهن فریک تولید شده تقلیل می یابد (شکل ۳). همانطور که ذکر شد، دلایل احتمالی برای این کاهش را می توان به یک مجموعه از فاکتورهای فیزیولوژیکی منفی نسبت داد. این فاکتورها شامل رقابت بین سلولی، اتمام موادمغذی ضروری و انباشتگی متابولیت های سمی می باشند که منجر به مهار احتمالی فعالیت های متابولیکی - میکروبی و در نتیجه کاهش کارایی موثر تولید زیستی آهن فریک در حین فروشویی زیستی می شوند. این اثر در مدت زمان ۲ روز که آهن فریک، به عنوان اکسیدکننده اصلی برای انحلال مس در طول فروشویی زیستی هنوز استفاده نشده نسبت به زمان های بیشتر واضح تر دیده می شود. همانطور که در شکل ۴ هم دیده می شود، میزان آهن فریک تولید شده با افزایش میزان پالپ دانسیته مورد استفاده کاهش می یابد. نتایج در شکل ۴ نشان می دهد، این اثر مهاری در مدت زمان های بیشتر، افزایش می یابد. همچنین این اثر مهاری دانسیته پالپ بالا در میزان تلقیح اولیه کمتر باکتری نیز بیشتر دیده می شود (شکل ۵). همانطور که ذکر گردید، دانسیته پالپ های بالا ممکن است چندین فاکتور مهاری را بر روند فرایند فروشویی زیستی اعمال کنند، اما با گذشت زمان و افزایش غلظت مواد سمی در محیط فروشویی و مهار رشد میکروبی بیشتر این اثر مهاری بیشتر است. به کارگیری روش طراحی مرکب مرکزی در چارچوب روش رویه پاسخ این امکان را فراهم ساخت تا ضمن کاهش تعداد آزمایش ها و هزینه های اجرایی، اثرات اصلی و برهم کنشی متغیرها به طور هم زمان شناسایی و تعیین گردد. این یافته ها بیانگر آن است که تولید مؤثر آهن فریک مستلزم ایجاد تعادل مناسب میان شرایط عملیاتی و زیستی سیستم است. در مجموع، نتایج این مطالعه علاوه بر ارائه بینش علمی در خصوص رفتار زیستی جدایه جدید مقاوم به اورانیوم /سیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس سویه THA3، می تواند به عنوان مبنایی کارآمد برای طراحی، بهینه سازی فرایندهای فروشویی زیستی و بهبود کارایی کاربردهای صنعتی مبتنی بر اکسیداسیون زیستی آهن توسط سویه های بومی ایران فراهم آورد.

References

- (۱) Singh VK, Singh AL, Singh R, Kumar A. Iron oxidizing bacteria: insights on diversity, mechanism of iron oxidation and role in management of metal pollution. *Environmental Sustainability*. 2018;1(3):221-31. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0024-0>
- (۲) Kaksonen AH, Morris C, Rea S, Li J, Wylie J, Usher KM, et al. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: part I—effect of pH on process performance. *Hydrometallurgy*. 2014;147:255-63. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.04.016>
- (۳) van Hille RP, van Zyl AW, Spurr NRL, Harrison STL. Investigating heap bioleaching: Effect of feed iron concentration on bioleaching performance. *Minerals Engineering*. 2010;23(6):518-25. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2010.01.011>
- (۴) Peng T-j, Zhou D, Liu X-d, Yu R-l, Jiang T, Gu G-h, et al. Enrichment of ferric iron on mineral surface during bioleaching of chalcopyrite. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2016;26(2):544-50. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(16\)64143-2](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(16)64143-2)
- (۵) Mishra D, Rhee Y-H. Microbial leaching of metals from solid industrial wastes. *J Microbiol*. 2014;52:1-7. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3532-3>
- (۶) Olson G, Brierley J, Brierley C. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied microbiology biotechnology*. 2003;63:249-57. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1404-6>
- (۷) Erüst C, Akcil A, Gahan CS, Tuncuk A, Deveci H. Biohydrometallurgy of secondary metal resources: a potential alternative approach for metal recovery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013;88(12):2115-32. <https://doi.org/10.1002/jctb.4164>

- (۸) Tuovinen OH, Kelly DP. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. Arch Mikrobiol. 1974;95(2):153-64. <https://doi.org/10.1007/BF02451757>
- (۹) Bagheri H, Moore F, Alderton D. Cu–Ni–Co–As (U) mineralization in the Anarak area of central Iran. Journal of Asian Earth Sciences. 2007;29(5-6):651-65. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2006.03.011>
- (۱۰) Bomberg M, Mäkinen J, Salo M, Kinnunen P. High Diversity in Iron Cycling Microbial Communities in Acidic, Iron-Rich Water of the Pyhäsalmi Mine, Finland. Geofluids. 2019; Article 7401304. <https://doi.org/10.1155/2019/7401304>
- (۱۱) خشنودی خ، ضیاءپور س. کانی شناسی و ژئوشیمی اورانیوم، توریم و عناصر نادر خاکی در کانسنگ درونزاد مس-مولیبدن کانسار کال کافی، منطقه انارک. یافته های نوین زمین شناسی کاربردی. ۱۴۰۴؛ ۲۰۹:۳۷-۲۶. <https://doi.org/10.22084/nfag.2024.28935.1603>
- (۱۲) Witek-Krowiak A, Chojnacka K, Podstawczyk D, Dawiec A, Bubala K. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. Bioresource technology. 2014;160:150-60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.021>
- (۱۳) Yilmeh M, Jafari SM. Applications of response surface methodology in the food industry processes. Food and bioprocess technology. 2017;10(3):413-33. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2>
- (۱۴) Karamanev D, Nikolov L, Mamartarkova V. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. Minerals Engineering. 2002;15(5):341-6. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(02\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(02)00026-2)
- (۱۵) Navarro CA, von Bernath D, Jerez CA. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. Biol Res. 2013;46(4):363-71. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400008>
- (۱۶) Yates JR, Holmes DS. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology. 1987;169(5):1861-70. <https://doi.org/10.1128/jb.169.5.1861-1870.1987>
- (۱۷) Sajjad W, Zheng G, Din G, Ma X, Rafiq M, Xu W. Metals extraction from sulfide ores with microorganisms: the bioleaching technology and recent developments. Transactions of the Indian institute of metals. 2019;72:559-79. <https://doi.org/10.1007/s12666-018-1516-4>
- (۱۸) Nkuna R, Ijoma GN, Matambo TS, Chimwani N. Accessing metals from low-grade ores and the environmental impact considerations: A review of the perspectives of conventional versus bioleaching strategies. Minerals. 2022;12(5):506. <https://doi.org/10.3390/min12050506>
- (۱۹) Jones S, Santini JM. Mechanisms of bioleaching: Iron and sulfur oxidation by acidophilic microorganisms. Essays in Biochemistry. 2023;67(4):685-99. <https://doi.org/10.1042/EBC20220257>
- (۲۰) Shaikh Shafikh M, Ahmed AA, Ahmed SA. Impact of pulp density on extraction of metals, by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Pseudomonas fluorescens* from bauxite ore. Journal of Pure Applied Microbiology. 2018;12(3):1647-54. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.3.72>
- (۲۱) Abdollahy M, Shojasadati SA, Zare Tavakoli H, Valivand A. Bioleaching of low grade uranium ore of saghand mine. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE). 2011;30(4):71-9. <https://doi.org/10.30492/ijcce.2011.6092>
- (۲۲) Rouchalova D, Rouchalova K, Janakova I, Cablik V, Janstova S. Bioleaching of iron, copper, lead, and zinc from the sludge mining sediment at different particle sizes, pH, and pulp density using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Minerals. 2020;10(11):1013. <https://doi.org/10.3390/min10111013>
- (۲۳) Huang H, Geng K, Wang C, Wu X, Wei CJIJoER, Health P. Impact of fulvic acid and *Acidithiobacillus Ferrooxidan* inoculum amount on the formation of secondary iron minerals. International Journal of Environmental Research Public Health. 2023;20(6):4736. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064736>