نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۶، ص. ۱۰۹۲-۱۰۸۳

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 4, Sept.-Oct. 2017, p. 1083-1092

بررسی جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آهن و گوگرد در خاک معدن مس میدوک شهربابک

مهدی حسن شاهیان[1*] – سمیه قربانی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۰۷

چکیده

یکی از شاخص‌های مهم در ارتباط با صنعت، اقتصاد و محیط زیست دستیابی به بیشترین باز یابی با حداقل هزینه و کمترین میزان آلودگی است. امروزه استفاده از میکروارگانیزم‌های کمولیتوتروف مزوفیل در استخراج فلزاتی چون مس، اورانیوم، طلا، کبالت و مولیبدن معروف به پدیده استخراج بیولوژی در سنگهای کم عیار معمول شده است. هدف از انجام این تحقیق شمارش دو دسته مهم از باکتری‌های اکسید کننده آهن وگوگرد در مناطق مختلف معدن میدوک شهربابک در استان کرمان می باشد. برای دستیابی به این هدف از هفت نقطه مختلف معدن میدوک نمونه‌های خاک جمع آوری شد. تعداد باکتری‌های اتوتروف اکسید کننده آهن و گوگرد با تهیه سریال رقت از نمونه‌ها و کشت در محیط نه کی حاوی آهن و گوگرد عنصری بترتیب انجام شد. باکتری‌های هتروتروف نیز با کشت در محیط نوترینت براث شمارش شدند. تعداد حداکثر احتمالی باکتری‌های اتوتروف و هتروتروف نیز با کشت رقت‌های اعشاری از نمونه‌ها در محیط اختصاصی درون میکروپلیت‌های ۲۴ خانه انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان باکتری‌های هتروتروف مربوط به YP نمونه خاک زرد رنگ نزدیک به تشتک PLS و کمترین تراکم باکتری‌های هتروتروف در نمونهOP پد اکسیدی بود. بالاترین تراکم اکسیدکننده‌های آهن مربوط به نمونه OP پد اکسیدی بود و کمترین تراکم نیز مرتبط به YP نمونه خاک زرد رنگ نزدیک به تشتک PLS بود. تنوع نسبتا پایینی در نمونه‌های معدن در خصوص اکسیدکننده‌های آهن وجود داشت. بالاترین تراکم اکسید کننده های گوگرد مربوط بهYP خاکهای زرد رنگ اطراف تشتک PLS بود وکمترین تراکم باکتری‌های اکسید کننده گوگرد مربوط به OP پد اکسیدی معدن بود. تنوع مناسبی از انواع اکسیدکننده‌های گوگرد در معدن میدوک در مقایسه با اکسیدکننده‌های آهن وجود دارد. با بکارگیری نتایج حاصله از این تحقیق و باکتری‌های اتوتروف بدست آمده می توان جهت افزایش فرایندهای بیولیچینگ در معدن میدوک بهره برد.

واژه‌های کلیدی: اتوتروف، بیولیچینگ، تراکم آهن و گوگرد، معدن میدوک

مقدمه

نیاز روزافزون به مواد اولیه، کاهش ذخایر معدنی با عیار بالا، ضرورت مصرف بهینه انرژی و رعایت دقیق معیارهای زیست محیطی بروز تحولاتی در عرصه فراوری مواد معدنی و استخراج فلزات را به دنبال داشته است. این امر سبب بروز مشکلات جدی در تولید فلزات شده است چون ذخیرهٔ بسیاری از منابع معدنی فلزی با عیار بالا به سرعت در حال تمام شدن است و آنچه باقی مانده است کانی‌های مخلوط یا کانی‌های با عیار پایین فلز و همچنین باطله‌های سنگ معدن است که امروزه مورد توجه زیادی قرارگرفته است. توجه به بازیابی مواد از ضایعات جانبی صنایع مختلف و جلوگیری از به هدر رفتن منابع اولیه در فرایندهای مختلف معدنی و متالوژی، محور دیگر این تحولات است. امروزه حجم عظیم مواد زاید، به عنوان منبعی برای تأمین مواد صنعتی مطرح است. فرایندهای مؤثر جذبی برای بازیافت یون‌های فلزی از پساب فرایندهای مختلف صنعتی حاصل تلاش‌های علمی و صنعتی در این رابطه است (۶).

امروزه جهت گیری و رویکرد صنعت مس به سوی روش‌های هیدرومتالوژی از جمله زیست فروشویی است. این امر با توجه به هزینه‌های سنگین مواد اولیه و آلودگی‌های زیست محیطی اهمیت خاصی دارد. تحولات و پیشرفت‌های هیدرومتالوژی ناشی از سازگاری بیشتر این روش با محیط زیست و مصرف کمتر انرژی است که گسترش آن مرهون کشف، ساخت حلال‌ها و کاربرد ریز جانداران می باشد. آمار و اطلاعات نیز نشان می دهد که فرایندهای هیدرومتالوژی در سال‌های اخیر افزایش چشمگیری داشته است به طوری که سهم

۱- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
(* نویسنده مسئول: Email: mshahi@uk.ac.ir)
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران

DOI: 10.22067/jsw.v31i4.53663

تولید مس به کمک هیدرومتالوژی از ۱۵ درصد در سال ۱۹۹۸ به ۳۰ درصد در سال ۲۰۱۳ رسیده است (۸).

زیست فروشویی فرایندی است که بوسیله آن میکروب ها با افزایش انحلال پذیری فلزات در کانسنگ ها کم عیار منجر به افزایش استخراج فلزات می شوند. زیست فروشویی نوعی جداسازی پاک می باشد بدین معنی که در مقایسه با دیگر فرایندهای جداسازی آلودگی بسیار کمتری را به وجود می آورد. امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌های شیمولیتوتروف مزوفیل دراستخراج فلزاتی چون مس، اورانیوم، طلا، کبالت و مولیبدن در کشورهایی مانند استرالیا، کانادا، شیلی، امریکا، چین و پرو در سنگهای کم عیار معمول شده است. خاک‌های دارای پتانسیل سولفاتی، غنی از پیریت (FeS2) می‌باشند. پیریت یکی از سولفیدهای معدنی رایج در سطح زمین می باشد. زمانی که پیریت در معرض هوا قرار می گیرد به اسید سولفوریک اکسید می شود و خاک‌های سولفاتی شکل می‌گیرند. زیست توده میکروبی خاک نیروی محرکه کلیدی در پشت همه تحولات گوگرد است و باکتری‌ها از شرکت کنندگان اصلی در چرخه کربن، گوگرد، نیتروژن و فسفر می باشند (۱۱).

آهن یکی از عناصر فراوان بر روی زمین است و به طور گسترده برای استفاده‌های متعدد شناخته شده می باشد. آهن فرو به آسانی به آهن فریک اکسید می شود و به عنوان یک دهنده الکترون می تواند استفاده شود. استفاده از آهن به عنوان دهنده الکترون فقط در تنفس هوازی اتفاق می افتد. به هر حال تحت شرایط هوازی و در صورتی که pH محیط پایین باشد آهن فرو خودبه خود به آهن فریک اکسید می‌شود. بنابراین باکتری‌هایی که به شدت اسید دوست هستند قادر به استفاده از آهن به عنوان دهنده الکترون می باشند در حالی که این امکان برای باکتری‌هایی که در pH خنثی فعالیت دارند میسر نمی‌شود (۱۲).

گوگرد در مقیاس وسیعی در طبیعت پراکنده است. این عنصر یکی از ۳ عنصری است که به فراوانی در ساختمان پوسته زمین شرکت می نماید. گوگرد در طبیعت به فرم آزاد و ترکیب وجود دارد. هرگاه گوگرد به فرم ترکیب با سایر عناصر باشد، به یکی از اشکال آلی یا غیر آلی مشاهده خواهد شد. سولفیدها و سولفاتها احتمالا مهمترین ترکیبات غیر آلی می باشند که تحت تاثیر تغییرات بیولوژی توسط باکتری ها قرار می گیرند (۱۳) .

باکتری‌های اکسید کننده گوگرد مانند تیوباسیلوس تیوپاروس[1] و تیوباسیلوس تیواکسیدانس۲ و باکتری‌های اکسید کننده آهن مانند اسیدوتیوباسیلیوس فرواکسیدانس۳ در خاک‌های سولفاتی جداسازی و مورد بررسی قرار گرفته اند. این گروه از باکتری ها گرم منفی، هوازی، کمولیتوتروف ومزوفیل هستند. این باکتری‌ها انرژی مورد نیاز برای رشد خود را از اکسیداسیون ترکیبات گوگردی به دست می آورند (۲).

مهمترین باکتری صنعتی مزوفیل از جنس اسیدوتیوباسیلوس فرواکسیدانس می باشد، که به نام اختصاری Tf نامیده می شود. این باکتری اولین بار در سال ۱۹۴۷ توسط Colmer و Hinkle از معدن زغال سنگ جداسازی شد. این باکتری نه تنها توانایی اکسید کردن آهن فرو را دارد بلکه می تواند ترکیبات گوگردی را نیز اکسید کند و در دمای ۲۵ تا ۳۵ درجه رشد می کند (۳).

هدف از انجام این تحقیق شناسایی و بررسی کمیت این دو دسته مهم از باکتری‌های اکسید کننده آهن وگوگرد در مناطق مختلف معدن میدوک شهربابک در استان کرمان می باشد که می‌توان راه حل جامعی از جهت استفاده از آن‌ها بعنوان سویه های بومی در روش بیولیچینگ بهره گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری و آماده سازی خاک معدن

در این تحقیق از ۸ منطقه مختلف معدن میدوک نمونه برداری خاک صورت گرفت. در هنگام نمونه برداری سعی شد که نمونه ها خشک باشند و با آب باران مخلوط نشده باشند. ابتدا سطح خاک را کمی کنار زده شد و سپس نمونه برداری از عمق ۱۰ سانتی متری خاک انجام شد. بعد از نمونه برداری، نمونه ها با الک (۲ میلی متر) غربال شدند در جدول (۱) مکان های مختلف نمونه برداری همراه با نام اختصاری که به آنها داده شده آمده است.

محیط کشت های مورد استفاده

به منظور شمارش باکتری های اتوتروف اکسید کننده آهن و گوگرد در این تحقیق از محیط کشت 9K حاوی آهن و گوگرد به ترتیب استفاده گردید. این محیط کشت بصورت دو محلول جداگانه تهیه گردید و پس از اتوکلاو با هم مخلوط شدند. ترکیبات این محیط کشت در یک لیتر عبارتند از: محلول (A) شامل: (NH4)2SO4 ۳ گرم، KCL ۰/۱ گرم، K2HPO4 ۰/۵ گرم، MgSO4.7H2O ۰/۵ گرم، Ca(NO3)2 ۰/۰۱ گرم، آب مقطر ۷۰۰ میلی لیتر و محلول (B) شامل: FeSO4.7H2O ۴۴ گرم، H2SO4(1N) ۱۰ میلی لیتر، آب مقطر ۲۹۰ میلی لیتر بود. برای تهیه محیط کشت 9K گوگردی محلول (B) بجای آهن دارای گوگرد عنصری به میزان ۳۰ گرم بر لیتر بود. برای شمارش باکتری های هتروتروف از محیط کشت نوترینت آگار طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید (۱) .

1- Acidithiobacillus thioparus
2- Thiobacillus thiooxidans
3- Acidithiobacillus ferrooxidans

جدول ۱- مکان های مختلف نمونه برداری خاک معدن
Table 1- Different Soil Sampling Zone of Mine

اسم نمونه (Sample name)	مکانهای نمونه برداری (Sampling location)
SP	PAD سولفوری (Sulfuric PAD)
OP	PAD اکسیدی (Oxidic PAD)
BP	سد رسوب گیر (Sedimentation Barrier)
PLS	تشتک هیپ (Hipe Pound)
YP	خاک زرد نزدیک تشتک PLS (Yellow Soil near to PLS pound)
SM	دامپ اکسیدی (Oxidic Dump)
DS	دامپ سولفوری (Sulfuric Dump)

شمارش باکتری‌های اتوتروف اکسید کننده آهن و گوگرد به روش لام نئوبار

محیط کشت 9K آهنی وگوگردی بصورت جداگانه تهیه شد و با اسید سولفوریک ۱ نرمال اسیدیته در۲ تنظیم گردید. سپس در ۷ ارلن ۲۵۰ سی سی محیط کشت 9K آهنی حاوی آهن ریخته و در ۷ ارلن ۲۵۰ میلی لیتر دیگر محیط کشت 9K گوگردی ریخته و از هر نمونه خاک میزان ۱۰ گرم به ارلن ها اضافه شد. ارلن ها داخل انکوباتور شیکرداردر دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با دور ۱۶۰Rpm قرار گرفتند و بعد از گذشت پنج روز با استفاده از سمپلر مقداری نمونه از ارلن ها روی لام نئوبار ریخته شد و بعد از قرار دادن لامل بر روی آن لام را زیر میکروسکوپ قرار داده وشمارش باکتری‌های زنده متحرک انجام شد (۴).

شمارش باکتری‌های اتوتروف اکسید کننده آهن و گوگرد به روش شمارش حداکثر تعداد احتمالی

میزان ۱۰ گرم خاک داخل ۱۰۰ میلی لیتر محیط 9K آهنی و ۱۰ گرم خاک دیگر داخل ۱۰۰ میلی لیتر محیط 9K گوگردی ریخته و به مدت ۱ ساعت شیک گردیدند، سپس از هر کدام یک میلی لیتر به لوله های حاوی ۹ میلی لیتر بافر فسفات ریخته و تا رقت ۴-۱۰ رقت سازی انجام شد. میزان۱۷۰۰ میکرولیتر از محیط 9K براث (9K براث آهنی و گوگردی بطور جداگانه) داخل میکروپلیت ۲۴ خانه (هر چاهک میکروپلییت ۲۰۰۰ میکرولیتر ظرفیت دارد) و میزان ۲۰۰ میکرولیتر هم از رقتهای ۲-۱۰ ،۳-۱۰، ۴-۱۰ به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جهت جلوگیری از تبخیر محیط در طی انکوباسیون اطراف میکروپلیت با پارافیلم بسته شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد داخل انکوباتور گذاشته بعد از ۷ روز نتایج MPN۱ خوانده شد. شاخص مثبت برای باکتری های اتوتروف اکسید کننده آهن مشاهده رسوب نارنجی رنگ در محیط 9k آهنی و برای برای باکتری های اتوتروف اکسید کننده گوگرد مشاهده کدورت در محیط 9k گوگردی بود (۵).

شمارش باکتری‌های هتروتروف به روش سری رقت

به منظور بدست آوردن نسبت باکتری های اتوتروف به هتروتروف این کار انجام شد. بطوریکه ابتدا ۱۰ گرم نمونه خاک در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات استریل با pH= ۷ محلول گردید و۱ میلی لیتر از آن را به ۹ میلی لیتر بافر فسفات استریل با pH =۷ اضافه گردید تا رقت های مورد نظر ساخته شوند. سپس از رقتهای۱-۱۰،۲-۱۰،۳-۱۰،۴-۱۰،۵-۱۰،۶-۱۰ به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت سفره ای انجام شد. پلیت ها و داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا کلونی تشکیل شود و شمارش انجام گردید (۷).

شمارش باکتری های هتروتروف به روش MPN

میزان ۱۰ گرم از نمونه خاک را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات استریل با pH =۷ ریخته و مخلوط گردید سپس ۱ میلی لیتر از آن را درون ۹ میلی لیتر بافر فسفات ریخته و تا رقت ۴-۱۰ عمل رقت سازی صورت گرفت. درون هر چاهک میکروپلیت میزان ۱۷۰۰ میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث اضافه شد و به هر چاهک میزان۲۰۰ میکرولیتر از رقت های ۲-۱۰ ،۳-۱۰، ۴-۱۰ اضافه شد. میکروپلیت ها با پارافیلم بسته شدند و به مدت ۷۲ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از گذشت زمان انکوباسیون با در نظر گرفتن کدورت بعنوان شاخص مثبت در شمارش MPN نتایج حاصله ثبت گردیدند (۱۴).

تجزیه و تحلیل شاخص های تنوع زیستی در نمونه ها

جهت بررسی تنوع زیستی جمعیت میکروبی در نمونه های خاک معدن اطلاعات بدست آمده از شمارش کلیه گروه های میکروبی در

1- Most Probable Number

نرم افزار PAST[1] وارد و شاخص های تنوع زیستی محاسبه شد. در ادامه هر یک از این شاخص‌ها بطور جزیی توضیح داده می شود.

غالبیت[2] (D): این شاخص از عدد صفر تا یک متغیر است. حالت صفر بدین معنی است که همه جنس‌های میکروبی به اندازه یکسان وجود دارند و در حالت ۱ یک گروه میکروبی به کل جامعه میکروبی غالب است.

تنوع[3] (H) : این شاخص بازگو کننده تنوع در جوامع میکروبی است و از عدد صفر تا ۱۰ متغیر است. عدد صفر به معنی وجود تنها یک گروه میکروبی (عدم تنوع) در جامعه است. بنابراین هر چه این عدد بزرگتر باشد گستردگی گروه‌های میکروبی در جامعه میکروبی بیشتر است.

همسانی[4] (1-D) : این شاخص باقیمانده کل جامعه میکروبی بجز گروه‌های غالب در آن است. منظور از این شاخص نشان دادن این واقعیت است که مابقی جامعه از فراوانی یکسانی نسبت به هم برخوردارند. بنابراین نباید این طور تلقی شود که جوامع شبیه هم هستند. لغت همسانی فقط به دارا بودن فراوانی همسان گروه‌های میکروبی در جمعیت اشاره دارد. بنابراین هر چه این عدد بزرگتر باشد غالبیت کمتری در جوامع میکروبی وجود دارد (Willner (۱۵).

نتایج

میزان عناصر در خاک های مورد بررسی

غلظت دو عنصر آهن و گوگرد توسط ازمایشگاه مکانیک خاک در نمونه های مورد مطالعه محاسبه گردید که در جدول ۲ آمده است. همانطور که در این جدول دیده می شود بالاترین میزان گوگرد مربوط به نمونه خاک YP و بالاترین میزان آهن مربوط به نمونه خاک SM می باشد.

کمیت باکتری های اتوتروف اکسید کننده آهن در خاک معدن

باکتری‌های اکسید کننده آهن در نمونه‌های مختلف معدن با روش کشت در محیط اختصاصی 9K حاوی آهن بعنوان منبع انرژی شمارش گردیدند. نتایج حاصله در جدول (۳) آمده است. با توجه به آنچه که در جدول (۳) مشاهده می گردد، بالاترین شمارش جمعیت اکسید کننده‌های آهن مربوط به نقطه تشتک هیپ (PLS) می باشد. البته در بقیه نقاط معدن نیز تراکم مناسبی از اکسید کننده‌های آهن دیده می شود. اما کمترین تراکم باکتری‌های اکسید کننده آهن مربوط به دامپ اکسیدی (SM) می باشد. با استفاده از محیط 9K حاوی آهن بعنوان منبع انرژی و رسوب زرد رنگ بعنوان شاخص مثبت کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های اکسید کننده آهن در نمونه‌های خاک معدن تعین گردید. نتایج حاصله در جدول (۳) آمده است. همانطور که در این جدول گزارش گردیده است، بالاترین شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌های اکسید کننده آهن مربوط به نمونه OP (پد اکسیدی) با ارزش ۱۰۸ × ۷/۱ می باشد. کمترین تراکم نیز مرتبط با نمونه YP (خاک زرد نزدیک به تشتک PLS) با ارزش ۱۰۷ × ۳/۳ می باشد.

شمارش باکتری های اتوتروف اکسید کننده گوگرد در خاک معدن

اتوتروف‌های اکسید کننده گوگرد در نمونه‌های مختلف معدن با روش کشت در محیط اختصاصی 9K حاوی گوگرد عنصری بعنوان منبع انرژی شمارش گردیدند. نتایج حاصله در جدول (۴) آمده است. با توجه به آنچه که در جدول (۴) مشاهده می گردد، بالاترین تراکم اکسید کننده‌های گوگرد مربوط به نقطه YP (خاک زرد نزدیک به تشتک PLS) معدن می باشد. البته در بقیه نقاط معدن نیز تراکم مناسبی از اکسید کننده‌های گوگرد دیده می شود. اما کمترین تراکم باکتری‌های اکسید کننده گوگرد مربوط به نقطه OP (پد اکسیدی) معدن می باشد. با استفاده از محیط 9K حاوی گوگرد بعنوان منبع انرژی و ایجاد کدورت بعنوان شاخص مثبت تراکم باکتری‌های اکسید کننده گوگرد در نمونه‌های خاک معدن مشخص شد. نتایج حاصله در جدول (۴) آمده است. همانطور که در این جدول ملاحظه می شود، بالاترین کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های اکسید کننده گوگرد مربوط به نمونه YP (خاک زرد نزدیک به تشتک PLS) با ارزش ۱۰۹ × ۸/۲ می باشد. کمترین تراکم نیز مرتبط با نمونه OP (پد اکسیدی) با ارزش ۱۰۷ × ۹/۳ در هر گرم خاک می باشد.

تعداد باکتری‌های هتروتروف در نمونه‌های خاک معدن

کلیه نمونه‌های خاک جمع آوری شده از لحاظ جمعیت باکتری‌های هتروتروف با روش سریال رقت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله در جدول (۵) نشان داده شده است. همانطور که در این جدول آمده است، بیشترین میزان باکتری های هتروتروف مربوط به نمونه YP (خاک زرد نزدیک به تشتک PLS) و کمترین تراکم باکتری‌های هتروتروف در نمونه SP (پد سولفوری) می باشد. بالاترین کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های هتروتروف مربوط به نمونه YP (خاک زرد نزدیک به تشتک PLS) با ارزش ۱۰۶ × ۳/۳ و کمترین آن مربوط به نمونه OP (پد اکسیدی) با ارزش ۱۰۵ × ۱ می باشد.

1- Paleontological Statistics Software
2- Dominance
3- Shannon
4- Simpson

جدول ۲- میزان اهن و گوگرد در مکان های مختلف نمونه برداری خاک معدن

Table 2- The concentration of Iron and sulfur at different Soil Sampling Zone of Mine

مکانهای نمونه برداری (Sampling location)	اسم نمونه (Sample name)	میزان گوگرد (mg/Kg soil)	میزان آهن (mg/Kg soil)	pH
PADسولفوری (Sulfuric PAD)	SP	48	43	5.8
PADاکسیدی	OP	24	53	4.8
سد رسوب گیر (Sedimentation Barrier)	BP	62	28	6.6
تشتک هیپ (Hipe Pound)	PLS	39	68	4.2
خاک زرد نزدیک تشتک PLS (Yellow Soil near to PLS pound)	YP	89	18	4.6
دامپ اکسیدی (Oxidic Dump)	SM	55	12	3.9
دامپ سولفوری (Sulfuric Dump)	DS	41	32	4.5

جدول ۳- باکتری‌های اکسید کننده آهن در نمونه های خاک معدن (CFU/g)

Table 3- The quantity of Iron oxidizing bacteria in soil mine samples

منطقه نمونه برداری Sampling zone	کمیت حداکثر احتمالی Most Probable Number	شمارش با روش لام نئوبار Enumeration with Neobar Lam
YP	3.3 × 107	6 × 106
SM	8.7 × 107	1.7 × 106
SP	6.6 × 107	2.6 × 106
PLS	5.1 × 108	4.6 × 107
DS	1.1 × 108	1.4 × 107
OP	7.1 × 108	3.1 × 107
BP	3.5 × 107	6.5 × 106

جدول ٤- باکتری‌های اکسید کننده گوگرد در نمونه های خاک معدن

Table 4- The quantity of sulfur oxidizing bacteria in soil mine samples

منطقه نمونه برداری Sampling Zone	کمیت حداکثر احتمالی (Most Probable Number)	شمارش با روش لام نئوبار (Enumeration with Neobar Lam)
WM	2 × 109	2.4 × 108
YP	8.2 × 109	2.9 × 108
SM	8.4 × 108	3.9 × 107
SP	1.1 × 108	1 × 107
PLS	8.3 × 108	1.8 × 108
DS	4.3 × 108	4 × 107
OP	9.3 × 107	2.8 × 106
BP	4.6 × 109	2 × 108

جدول ٥- کمیت هتروتروف ها در خاک معدن

Table 5- The quantity of heterotrophic bacteria in soil mine samples

منطقه نمونه برداری (Sampling Zone)	کمیت حداکثر احتمالی (Most Probable Number)	کمیت هتروتروف ها با روش سریال رقت (Enumeration with Neobar Lam)
WM	3 × 106	3.5 × 105
YP	3.3 × 106	9× 105
SM	2.9 × 105	3 × 104
SP	1.1 × 106	1 × 104
PLS	3.5 × 105	6× 104
DS	2 × 105	5× 104
OP	1 × 105	4× 104
BP	2× 105	2 × 104

شاخص‌های تنوع زیستی اتوتروف ها و هتروتروف‌های خاک معدن

تعدادی از شاخص‌های مهم تنوع زیستی جوامع میکروبی اتوتروف و هتروتروف برای نمونه های خاک معدن با استفاده از نرم افزار PAST محاسبه شد. نتایج بدست آمده در جدول (۶) نشان داده شده است. همانطور که در این جدول دیده می شود، تنوع پایینی از باکتری‌های هتروتروف در نقاط مختلف معدن میدوک وجود دارد و غالبیت گروه‌های میکروبی هتروتروف کم است. در خصوص اتوتروف های اکسید کننده آهن این جدول نشان می دهد که یکسانی جنس-های میکروبی اتوتروف اکسید کننده آهن و غالبیت پایین یک جنس در جمعیت میکروبی اتوتروف معدن مشهود است. در مورد اتوتروف های اکسید کننده گوگرد شاخص تنوع بیانگر این است که تنوع نسبتا بالایی (H= ۳/۸۳) در نمونه‌های معدن در خصوص اکسید کننده‌های گوگرد وجود دارد. در واقع بالاترین میزان تنوع در سه گروه باکتری مطالعه شده در معدن میدوک در تحقیق حاضر مربوط به اتوتروف های اکسید کننده گوگرد می باشد.

جدول ٦- نتایج حاصل از شاخص‌های تنوع زیستی برای باکتری‌های اتوتروف و هتروتروف

Table 6- The results of biodiversity indexes for autotrophic and heterotrophic bacteria

شاخص تنوع Diversity Index	اتوتروف های اکسید کننده گوگرد Sulfur-oxidizing autotroph	اتوتروف های اکسید کننده آهن Iron-oxidizing autotroph	باکتری های هتروتروف Heterotrophic bacteria
غالبیت (Dominance)	0.1488	0.1405	0.1796
تنوع (Diversity Shannon, H)	3.83	2.02	1.75
همسانی (Identity Simpson, 1-D)	0.8512	0.8595	0.8204

بحث و نتیجه گیری

امروزه با توجه به ذخایر رو به کاهش معادن معدنی بسیاری از کشورهای جهان حرکت به سمت استفاده از کانسنگ های کم عیار را آغاز کرده اند، تا با استفاده از روش های مختلف هیدرومتالوژی کارایی استخراج فلزات را افزایش دهند. یکی از مهمترین روش های هیدرومتالوژی که در دهه های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است روش فروشویی زیستی یا بیولیچینگ می باشد. جهت دستیابی به یک بیولیچینگ موثر و کارا در یک معدن بایستی شرایط مختلفی را در نظر گرفت. یکی از مهمترین این شرایط توجه به وضعیت میکروب های بومی آن معدن و امکان سنجی استفاده از آنها در فرایند بیولیچینگ می باشد. زیرا چنانچه از میکروب های بومی یک اکوسیستم در فرایند های افزایش استخراج فلزات استفاده شود بدلیل سازگاری و تطابق این میکروب ها با محیط معدن کارایی روش استخراج به میزان قابل توجهی بالا خواهد رفت و امکان شکست فرایند به حداقل می رسد (۱ و ۱۰).

این دو گروه از باکتری ها از مهترین میکروارگانیسم های موثر در فرایند بیولیچینگ هستند و لذا درک مناسبی از نحوه پراکنش آنها در نقاط مختلف معدن می تواند به انتخاب بهتر روش های بیولیچینگ در آینده کمک شایانی نماید.

جهت دستیابی به این هدف از نقاط مهم معدن میدوک که هم اکنون فرایند استحصال فلزات (مس و آهن) از خاک های این مناطق با روش های پیرومتالوژی صورت می گیرد صورت گرفت. و شمارش باکتری های اتوتروف اکسید کننده گوگرد و آنها هریک در محیط اختصاصی مربوط به خود انجام شد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بالاترین تراکم اکسید کننده‌های آهن مربوط به نقاط تشتک هیپ و پد اکسیدی می باشد. این نتیجه در خصوص باکتری های اکسید کننده آهن تایید کننده این واقعیت است که حضور اکسیژن و اسیدیته پایین (pH برابر با ۴ بود) در این دو نقطه تاثیر بسیار زیادی بر روی افزایش تراکم این باکتری ها در این مناطق داشته است. زیرا اکسید کننده های آهن از لحاظ فیزیولوژیکی نیازمند محیط هوازی و pH پایین می باشند و این شرایط در این دو نقطه از خاک معدن نشبت به نقاط دیگر معدن بیشتر فراهم است.

در خصوص باکتری های اکسید کننده گوگرد ما به این نتیجه رسیدیم که تراکم بالایی از این باکتری ها در خاک زرد نزدیک به تشتک هیپ وجود دارد. بطوریکه با هر دو روش شمارش (لام نئوبار و MPN) این منطقه واجد بالاترین شمارش بود. این نتیجه تا حدودی قابل انتظار می باشد. زیرا بالا بودن میزان عنصر گوگرد و از طرفی پایین بودن اسیدیته محیط (pH برابر ۴) در این نقطه می تواند شرایطی انتخابی برای افزایش اکسید کننده های گوگرد فراهم نماید.

باکتری های هتروتروف در معادن از اهمیت چندانی برخوردار نیستند. هر چند اخیرا بحث بیولیچینگ هتروتروفی نیز مطرح شده است و دانشمندان امید دارند که شاید بتوان در اینده از باکتری های هتروتروف برای اهداف افزایش استخراج کانسنگ های کم عیار استفاده کرد ولی تا به امروز پیشرفت چندانی در این زمینه صورت نگرفته است (۶) .

نتایج حاصل از تعیین باکتری های هتروتروف در معدن میدوک نشان داد که خاک زرد نزدیک به تشتک هیپ بالاترین میزان را دارد و با توجه به اینکه همین خاک از نظر اتوتروف های اکسید کننده گوگرد دارای بالاترین بود ممکن است یک رابطه سینرژیسمی بین این دو گروه از باکتری ها در این نقطه وجود داشته باشد. هر چند که در این تحقیق ازمایشی برای اثبات این فرضیه و وجود این رابطه انجام نگردید.

ویلنر و همکاران (۱۵) در طی یک بررسی با استفاده از روش رقت پی در پی (لام نئوبار) بر روی تراکم باکتری های اتوتروف و اسیدوفیل در معدن مس در شیلی نشان دادند که جمعیت میکروبی اتوتروف وابسته به میزان تراکم فلزات و مقدار اسیدیته نمونه های آزمایش شده است به طوری که میزان اتوتروف ها در نقاط با تراکم بالای فلزات یا اسیدیته بالا بیشتر است در حالی که تعداد باکتری های هتروتروف اسیدوفیل در محل اسیدی معدن بسیار بیشتر است (۱۵). نانسی و همکاران (۱۰) در طی یک بررسی با استفاده از روش MPN بر روی تراکم باکتری های اتوتروف در معدن سنگ آهن در برزیل نشان دادند که فراوانترین باکتری ها در جمعیت میکروبی مورد مطالعه مربوط به باکتری های هوازی اجباری اسیدوفیل در هیپ های لیچینگ نسبت به دامپ ها می باشد (۹) و همکاران نیز با روش MPN به بررسی تراکم باکتری های اتوتروف در آب های زیر زمینی پرداختند و مشخص شد که بیشترین مقدار MPN برای باکتری های اکسیدکننده سولفات می باشد (۹). در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری های اتوتروف اکسید کننده آهن و گوگرد از تراکم مناسبی در خاک معدن میدوک شهربابک برخوردار هستند. در این بین تراکم و تنوع باکتری های اتوتروف اکسید کننده گوگرد بیشتر از اکسید کننده های آهن بود.

چنانچه کمیت باکتری های اکسید کننده اهن و گوگرد در یک معدن مشخص گردد، می توان با تقویت این باکتری ها در مکان‌هایی که تراکم بالایی دارند از انها برای روش زیست فروشویی استفاده کرد. زیرا این دو گروه از باکتری ها از مهمترین باکتری هایی مورد استفاده در روش زیست فروشویی هستند. بطور مثال یکی از روش های زیست فروشویی اضافه کردن باکتری خارجی به جمعیت باکتری درونی در خاک است. اما روش دیگر تقویت جمعیت باکتری درونی می باشد. حال اگر قبل از انجام این روش ها تعیین کمیت باکتری ها صورت گیرد می توان بهترین روش را برای زیست فروشویی انتخاب کرد.

با بکارگیری نتایج حاصل از این تحقیق در فرایندهای بیولیچینگ این معدن می توان روش کارایی برای استحصال کانسنگ های کم عیار این معدن بدست آورد. از طرفی با جداسازی، شناسایی و انتخاب بهترین سویه های اتوتروف اکسید کننده می توان از سویه های بومی برای اهداف بیولیچینگ در این معدن بهره جست.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق تایید کرد که باکتری های اکسید کننده آهن و گوگرد از تراکم و تنوع مطلوبی در خاک معدن میدوک شهربابک برخوردار هستند و چناچه رش های غنی سازی جداسازی برای کشت خالص این باکتری ها انجام شود می توان سویه های بسیار موثر بومی برای فرایندهای فروشویی زیستی جهت استحصال مس از سنگ های کم عیار بدست آورد و میزان تولید مس در این معدن را با روش های کم هزینه افزایش داد. هر چند این امر نیازمند تحقیقات بیشتر در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معدن مس میدوک شهربابک و دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است. در اینجا از این دو نهاد قدردانی می شود. همچنین نویسندگان از خانم مهندس لونا ابراهیمی مشاور صنعتی این تحقیق نیز کمال تشکر را دارند.

منابع

1- Auld R.R., Myre M., Mykytczuk N.C., Leduc L.G. and Merritt T.J. 2013. Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques, Journal of Microbiological Methods, 93(2): 108-115.
2- Behera B.C., Patra M., Dutta S.K. and Thatoi H.N. 2014. Isolation and characterization of sulphur oxidising bacteria from mangrove soil of mahanadi river delta and their sulphur oxidising ability, Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2(1): 1-5.
3- Bosecker K. 1997. Bioleaching metal solubilization by microorganisms, FEMS Microbiology Reviews, 54: 591-604.
4- Errico G. 2006. Identification and characterization of a novel bacterial sulfite oxidase with No Heme binding domain from Deinococcus radiodurans, Journal of Bacteriology, 87: 694-701.
5- Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation Microbiology, 156(3): 609-643.

6- Hallberg K.B. 2010. New perspectives in acid mine drainage microbiology Hydrometallurgy, Hydrometallurgy, 104 (3): 448-453.
7- Hirotomo O.H.B.A. and Naoto O.W.A. 2005. Isolation and Identification of sulfur-oxidizing bacteria from the Buried layer containing Reduced sulfur compounds of a paddy field on sado Island, Bulletin Agriculture, 58(1): 55-61.
8- Jiang C., Ying L., Yanyang L., Xu G. and Shuang-Jiang L. 2009. Isolation and characterization of ferrous-and sulfur-oxidizing bacteria from Tengchong solfataric region, China Journal of Environmental Sciences, 21(9): 1247-1252.
9- Karsten A., Breuker A., Blazejak A., Bosecker K., Kock D. and Wright T.L. 2007. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumpsand heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria, Hydrometallurgy, 104 (3): 342–350
10- Nancy C., Ying L., Yanyang L., Xu G. and Shuang-Jiang L. 2009. Isolation and characterization of ferrous-and sulfur-oxidizing bacteria from Tengchong solfataric region, Journal of Environmental Sciences, 21(9): 1247-1252.
11- Parvathi A., Krishna K., Jose J., Joseph N. and Nair S. 2009. Biochemical and molecular characterization of Bacillus pumilus isolated from coastal environment in Cochin, India. Brazilian Journal of Microbiology, 40(2): 269-275.
12- Rawlings E. 2005. Characteristics and adaptability of iron-and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates, Microbial cell factories, 4: 13-21.
13- Valente T. M. and Gomes C. L. 2009. Occurrence, properties and pollution potential of environmental minerals in acid mine drainage, Science of the Total Environment, 407(3): 1135-1152.
14- Vardanyan N.S. 2014. New sulphur oxidizing bacteria isolated from bioleaching pulp and copper concentrates universal, Journal of Microbiology Research, 2(2): 27-31.
15- Willner J. and Fornalczyk A. 2013. Extraction of metals from electronic waste by bacterial leaching, Environment Protection Engineering, 39(1): 197-208.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 4, Sept.-Oct. 2017, p. 1083-1092

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۶، ص. ۱۰۹۲-۱۰۸۳

Study the Population of Iron and Sulfur Oxidizing Bacteria in the Soil of Miduk Cooper Mine in Shahrebabk

M. Hassanshahian[1]*- S. Ghorbani[2]

Received: 30-04-2016
Accepted: 28-06-2017

Introduction: One of the most important indicators in relation to industry, economy and environment is to achieve the most recovery with the least cost and minimum pollution. Today, the use of chemolithotrophic microorganisms is common for extraction of some metals such as cooper, uranium, gold, cobalt and molybdenum in bioleaching process of low-grade rocks. Attention to the bioleaching of heavy metals such as copper, nickel, cobalt, zinc, and molybdenum has been increased in recent years because of its application to low-grade ores. The variety of microbes identified as being capable of growth in situations that simulate bio-mining commercial processes is rapidly growing. This is partly because of an increase in the number of environments being screened for such organisms, partly because of an increase in the variety of minerals being tested, and most importantly because of new techniques available to screen for the presence of organisms. The aim of the present research was to study the quantity of two important autotrophic bacteria, iron and sulfur oxidizing bacteria, in different regions of Miduk mine in Shahrbabak, Kerman province.

Materials and Methods The soil samples were collected from different locations of Miduk cooper mine such as: Sulfuric Pool Acid Discharge (PAD), Oxidic PAD, Sulfuric damp, Pool Leaching Sulfuric (PLS)and leaching hip. Top layer of mine soil (about 1 cm) was removed. In each site, soil samples were collected from five different spots. The quantity of iron and sulfur oxidizing bacteria were measured by culture of serial dilutions of samples in 9K medium with Iron and sulfur as electron sources, respectively. The 9K medium was used for enrichment of iron and sulfur oxidizing bacteria in collected mine samples. These two important groups of bacteria have autotrophic growth but the energy sources for these two bacteria are different. Iron oxidizing bacteria use ferrous ion in form of $FeSO_4$ but sulfur oxidizing bacteria use inorganic sulfur and sulfur compounds as a source of energy and obtain the carbon from the reduction of the CO_2 of the atmosphere in autotrophic growth. Heterotrophic bacteria were quantified by culture in nutrient broth medium. Most probable number (MPN) method was used to enumeration the autotrophic and heterotrophic bacteria by culture of samples in 24 well microplates with specific medium. The positive index for enumeration iron and sulfur oxidizing bacteria in these experiments were red color and turbidity, respectively. The microplates were incubated for 21 days for autotrophic bacteria and 7 days for heterotrophic bacteria.

Results and Discussion: The results of this research showed that the highest quantity of heterotrophic bacteria related to soil near to PLS and the lowest quantity belonged to sulfuric PAD. Iron oxidizing bacteria had the highest density on oxidizing Pad (OP) and the lowest density of these bacteria found in soil near to PLS. The diversity of iron oxidizing bacteria was low in the mine. The lowest quantity of sulfur oxidizing bacteria related to oxidizing PAD. Although appropriate diversity of sulfur oxidizing bacteria in compare to iron oxidizing bacteria was observed in the Miduk mine. These results about quantity of iron oxidizing bacteria confirmed this truth that the presence of oxygen and also low acidity in oxidizing Pad (OP) has major effect on the distribution and quantity of iron oxidizing bacteria. Because, the optimum condition for growth of iron oxidizing bacteria is low acidity and abundance of oxygen that these two factors provided in oxidic Pad (OP).

The quantity of sulfur oxidizing bacteria was high in yellow soil near to PLS. These results obtained by enumeration with MPN and Newbar lam methods. This result can be interpreted as the high concentration of sulfur element in this region has a selection force to prevalent the sulfur oxidizing bacteria in compare to iron oxidizing bacteria in this region. Because, when the sulfur is high, the bacteria that can use this element as their only energy source for fixation of CO_2 is dramatically increased.

Conclusions: In the present research, the quantity and distribution of iron and sulfur oxidizing bacteria of Miduk cooper mine were studied. Based on the results, iron and sulfur oxidizing bacteria had the highest density on oxidizing Pad (OP) and in yellow soil near to PLS, respectively. Although sulfur oxidizing bacteria had an

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
(*-Corresponding Author Email: mshahi@uk.ac.ir)
2- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran

appropriate diversity compared to iron oxidizing bacteria in Miduk mine. However, the results obtained in this study confirmed that the sufficient quantity of iron and sulfur oxidizing bacteria were present in this mine. Then, the soil bacteria of this mine can be used to enhance the bioleaching process in Miduk mine.

Keywords: Bioleaching, Iron, Oxidizing bacteria, Sulfur