بررسی تأثیر کشت‌های مخلوط باکتری های میانه دوست(مزوفیل) بر فروشویی زیستی (انحلال میکروبی) کانسنگ‌های سولفیدی مس با تنوع کانی شناختی

محمد فرشیدی
کارشناسی ارشد
دانشکده فنی و مهندسی، بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

سید عباس شجاع الساداتی
استاد
دانشکده فنی و مهندسی، بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

محمد مهدی صفاری
مربی
دانشکده علوم پایه، بخش زمین شناسی،
گروه زمین شناسی اقتصادی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

در این تحقیق، تأثیر نسبت جمعیت هریک از سویه‌ها درکشت‌های مخلوط سه عضوی از ۵ ریز سازواره میانه دوست بر فروشویی زیستی مس از دونوع سنگ معدن سولفیدی بررسی شد. این ریزسازواره‌ها شامل سویه‌های *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۱٤۷۷ *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹٤٦۵، *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۹۲۷، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* DSM ۲۷۰۵ و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM ٦۲۲ بود. کشت‌های مخلوط سه عضوی شامل ۹ گروه با نسبت‌های مختلف جمعیتی از *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس*، *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* و یکی از سویه‌های *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* بود. همچنین درهر گروه، تأثیرغلظت نمک سولفات آهن(II) موجود درمحیط کشت ریزسازواره‌ها برمیزان فروشویی مس بررسی شد. بیشترین میزان فروشویی مس از یک سنگ معدن کم عیار با کشت مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹٤٦۵، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* و*تیوباسیلوس تیواکسیدانس* بانسبت جمعیت به ترتیب ۱ :۳ : ۵ درغلظت ۲۰ گرم برلیترسولفات آهن(II) به دست آمد. بیشترین میزان فروشویی مس ازیک سنگ معدن کالکوپیریت نیز با همین کشت مخلوط و کشت مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۱٤۷۷، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* و*تیوباسیلوس تیواکسیدانس*، با نسبت جمعیت به ترتیب ۱ :۳ : ۵ و غلظت ۲۰ گرم برلیتر سولفات آهن(II) در هر دو کشت حاصل شد. با استفاده ازکشت‌های بالا، بیشترین میزان فروشویی مس از سنگ معدن کم عیار، ۲٦ درصد درمدت ۱۷ روز و از سنگ معدن کالکوپیریت، ۲٦ درصد در مدت ۲۷ روز بود؛ که درمقایسه با نمونه‌های بدون مایه تلقیح به ترتیب ۱۲ و ٤٦ درصد افزایش نشان داد.

کلمات کلیدی

فروشویی زیستی (انحلال میکروبی)، کشت مخلوط، سنگ معدن سولفیدی مس، *تیوباسیلوس فرواکسیدانس*، باکتری‌های مزوفیل

Investigation of the Effects of Mixed Cultures of Mesophile Bacteria on the Bioleaching of Sulfidic Copper Ores with Different Mineralogy

S.A. Shojaosadati
Professor
Faculty of Engineering, Department of Chemical engineering, Biotechnology Group, Tarbiat Modarres University

M. Farshidy
M.Sc.
Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Biotechnology Group, Tarbiat Modarres University

M. M. Saffari
Research Assistance
Faculty of Science,Department of Geology,
Economic Geology Group Tarbiat Modarres University

Abstract

In this research the effect of population ratio in three-membered mixed cultures consisting of 5 different strains on the bioleaching of sulfidic copper ores was evaluated. Three strains were Leptospirillum ferrooxidans DSM2705, Thiobacillus thiooxidans DSM622 and Thiobacillus ferrooxidans DSM11477, Thiobacillus ferrooxidans DSM9465 and Thiobacillus ferrooxidans DSM1927. Each group contains L.f, T.t and one of the T.f strains in 9 different population ratios. Also the role of ferrous ion concentration in related microbial medium on bioleaching rate was investigated. It was found that type of microorganism, population ratio and ferrous ion concentration influence the bioleaching rate. For a low grade copper ore the highest copper recovery was obtained by using a mixed culture of L.f, T.t, and T.f DSM9465 with the population ratio of 3:5:1 in a medium containing 20 g/L ferrous sulfate. In other experiments, the best results for bioleaching of a chalcopyrite ore was obtained with the same mixed culture and a mixed culture containing L.f, T.t and T.f DSM11477 with population ratio of 3:5:1, in medium containing 20 g/L ferrous sulfate.The best result for bioleaching of low grade copper ore was 26% during 17 days while for chalcopyrite ore was 26% during 27 days, which show an increase of 12% and 46% respectively.

Key words

Bioleaching, Mixed culture, Sulfidic copper ore, Thiobacillus ferrooxidans, Mesophile bacteria

مقدمه

کشت‌های مخلوط[1] برای تهیه غذاهای تخمیری به ویژه فرآورده‌های لبنی، تصفیه زیستی فاضلاب، سالم‌سازی زیستی خاک‌های آلوده و فروشویی زیستی به کار می‌روند [۱ و۲] .

در اغلب مطالعات انجام شده در فروشویی زیستی، کشت‌های مخلوط، کارایی بهتری نسبت به کشت‌های خالص از خود نشان داده‌اند [۳ تا ۸،۱۶] . اعتقاد براین است که سه ریزسازواره مهم فروشویی زیستی یعنی تیوباسیلوس فرواکسیدانس[2]، تیوباسیلوس تیواکسیدانس[3] و لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس[4] در یک همزیستی مفید، تأثیر یکدیگر را در عمل فروشویی تقویت می‌کنند، بنابراین رابطه آنها به صورت همکاری متقابل[5] است [۵،۷،۹].

تاکنون بیشتر مطالعاتی که درفروشویی زیستی بر روی کشت‌های مخلوط انجام شده با استفاده از مایه تلقیح[6] طبیعی بوده است. برای تهیه این مایه تلقیح سنگ معدن به یک محیط کشت تعریف شده افزوده شده و گرماگذاری[7] انجام شده است. کشت حاصله همراه یا بدون مرحله غنی‌سازی به عنوان مایه تلقیح به کار رفته است [۶،۸،۱۰ تا ۱۳].

در این تحقیق تأثیر فراوانی گونه‌های باکتری در مایه تلقیح بر میزان فروشویی زیستی مس مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور، کشت‌های مخلوط سه گونه‌ای از باکتری‌های تیوباسیلوس فرواکسیدانس، تیوباسیلوس تیواکسیدانس و لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس با نسبت‌های جمعیتی متفاوت به محیط کشت حاوی سنگ معدن تلقیح و میزان فروشویی مس اندازه‌گیری شد. این آزمایش‌ها با سه سویه مختلف باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس بر روی دو نوع سنگ معدن انجام و نتایج حاصله با یگدیگر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

ریزسازواره‌ها

ریزسازواره‌های تیوباسیلوس فرواکسیدانس سویه‌های DSM ۱۱۴۷۷، DSM۹۴۶۵ و DSM ۱۹۲۷، لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس DSM ۲۷۰۵ و تیوباسیلوس تیواکسیدانس DSM۶۲۲ از مجموعه (کلکسیون) میکروبی آلمان (DSMZ) خریداری شد. بر اساس دستورالعمل از هر سویه در محیط کشت اختصاصی کشتهای مجدد تهیه شد [۱۴].

کشت‌های مخلوط

کشت‌های مخلوط شامل کشت‌های سه عضوی از لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس DSM ۲۷۰۵، تیوباسیلوس تیواکسیدانس DSM۶۲۲ و یکی از سویه‌های تیوباسیلوس فرواکسیدانس با نسبت‌های متفاوت جمعیت بود.

طراحی آزمایش

در این تحقیق برای طراحی آزمایش‌های تاثیر حضور و جمعیت هرگونه باکتریایی و نیز تاثیر غلظت آهن موجود در محیط کشت میکروب برفرآیند فروشویی مس از روش تاگوچی[8] [۱۵] استفاده شد. عوامل[9] در نظر گرفته شده عبارتند از جمعیت هر یک از سویه‌های *تیوباسیلوس فرواکسیدانس*، *تیوباسیلوس تیواکسیدانس*، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس*، و غلظت نمک سولفات آهن در محیط کشت. برای هر عامل، ۳ سطح[10] در نظر گرفته شد. بنابراین هر طراحی با ۴ عامل در۳ سطح انجام شد که با روش تاگوچی، با آرایه L۹ به معنای انجام ۹ آزمایش نتیجه گردید (جدول۱). نسبت جمعیت گونه‌های ریزسازواره به یکدیگر، به عنوان سطوح عوامل جمعیت در نظر گرفته شد. فاصله این سطوح با توجه به محدودیت‌های کشت میکروبی، از جمله حداکثر جمعیت قابل دسترس از هر ریزسازواره و کاهش خطای شمارش انتخاب شد. سطوح غلظت آهن به صورت کم، متوسط و زیاد به ترتیب متناظر با محیط‌های کشت مشهور موسوم به 0K ، 0.9K و9K انتخاب شد[۹]. بنابر این به طور کلی برای هر سویه *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* یک آرایه L۹ به صورت جدول(۲) حاصل گردید.

علاوه بر آن برای مقایسه عملکرد کشت‌های مخلوط با کشت منفرد، کشت‌های خالص از هر سه سویه باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس، هر کدام در ۳ غلظت زیاد، متوسط و کم از سولفات آهن (جمعاً ۹ ارلن) در نظر گرفته شد. در نهایت برای مقایسه نتایج فروشویی انجام شده توسط ریزسازواره‌ها با نتایج فروشویی غیر زیستی، ۶ نمونه شاهد شامل ۳ نمونه بدون تلقیح میکروبی و ۳ نمونه سترون[11] در ۳ غلظت سولفات آهن در نظر گرفته شد.

جدول (۱) آرایه تاگوچیL۹ برای طراحی آزمایش با ٤ عامل در ۳ سطح.

آزمایش‌ها	سطح‌ها			
	عامل ۱	عامل ۲	عامل۳	عامل ۴
آزمایش ۱	۱	۱	۱	۱
آزمایش ۲	۱	۲	۲	۲
آزمایش ۳	۱	۳	۳	۳
آزمایش ۴	۲	۱	۲	۳
آزمایش ۵	۲	۲	۳	۱
آزمایش ۶	۲	۳	۱	۲
آزمایش ۷	۳	۱	۳	۲
آزمایش ۸	۳	۲	۱	۳
آزمایش ۹	۳	۳	۲	۱

جدول (۲) آرایه L۹ برمبنای نسبت جمعیت ریزسازوارها وغلظت آهن (برای هر سویه *تیوباسیلوس فرواکسیدانس*).

آزمایش ها	نسبت جمعیت ها			غلظت آهن
	تیوباسیلوس فرواکسیدانس	*لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس*	*تیوباسیلوس تیواکسیدانس*	
آزمایش ۱	۱	۱	۱	کم
آزمایش ۲	۱	۲	۳	متوسط
آزمایش ۳	۱	۳	۵	زیاد
آزمایش ۴	۵	۱	۳	زیاد
آزمایش ۵	۵	۲	۵	کم
آزمایش ۶	۵	۳	۱	متوسط
آزمایش ۷	۱۰	۱	۵	متوسط
آزمایش ۸	۱۰	۲	۱	زیاد
آزمایش ۹	۱۰	۳	۳	کم

مایه تلقیح

تلقیح از کشت‌های تازه ریز سازواره انجام شد. برای تنظیم نسبت جمعیت باکتری‌ها ابتدا جمعیت هر ریزسازواره در کشت خالص با روش لام توما[12] شمارش گردید. از آنجا که باکتری *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* کمترین "جمعیت حداکثر"- ۳×۱۰^{۷} ریز سازواره در سانتیمتر مکعب ـ را در بین ۵ ریز سازواره داشت، حداکثر جمعیت آن به عنوان مبنا ـ بیشترین سطح (سطح) در ستون عامل جمعیت *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* در آرایه تاگوچی ـ انتخاب شد. بنابراین جمعیت در سطح ۱ برای این باکتری برابر با ۱×۱۰^{۷} ریز سازواره در سانتیمتر مکعب بود. کشت‌های سایر سویه‌ها تا رسیدن به این جمعیت رقیق گردید برای رقیق سازی از اسیدسولفوریک رقیق سترون با pH = ۲ استفاده شد. بنابر این جمعیت تمام سویه‌ها ۱×۱۰^{۷} ریز سازواره در سانتیمتر مکعب بود. سپس براساس سطح جمعیت هر ریزسازواره در آرایه تاگوچی (نسبت جمعیت‌های هر سویه) حجم کل ۶ میلی لیتر از مجموع ۳ سویه برای تهیه مایه تلقیح برداشته شد (جدول ۳). برای تلقیح به کشت‌های منفرد، ۶ میلی لیتر از کشت‌های خالص با جمعیت تنظیم شده برداشته شد. به ارلن های شرایط بدون تلقیح ۶ میلی لیتر آب مقطر سترون و به ارلن‌های شرایط سترون ۶ میلی لیتر محلول ۰/۵ درصد حجمی فرمالین در اتانل افزوده شد.

جدول (۳) حجم بذر تلقیح شده از هر سویه برای کشت مخلوط باجمعیت $۱۰^{۷}$ ریزسازواره درسانتی متر مکعب.

آزمایش ها	حجم مایه تلقیح (سانتیمتر مکعب)				غلظت سولفات آهنII (گرم در لیتر)
	تیوباسیلوس فرواکسیدانس	*لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس*	*تیوباسیلوس تیواکسیدانس*	(جمع)	
آزمایش ۱	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۲/۰۰۰	۶/۰۰۰	۰
آزمایش ۲	۱/۰۰۰	۲/۰۰۰	۳/۰۰۰	۶/۰۰۰	۲
آزمایش ۳	۰/۶۶۷	۲/۰۰۰	۳/۳۳۳	۶/۰۰۰	۲۰
آزمایش ۴	۳/۳۳۳	۰/۶۶۷	۲/۰۰۰	۶/۰۰۰	۲۰
آزمایش ۵	۲/۵۰۰	۱/۰۰۰	۲/۵۰۰	۶/۰۰۰	۰
آزمایش ۶	۳/۳۳۳	۲/۰۰۰	۰/۶۶۷	۶/۰۰۰	۲
آزمایش ۷	۳/۷۵۰	۰/۳۷۵	۱/۸۷۵	۶/۰۰۰	۲
آزمایش ۸	۴/۶۱۵	۰/۹۲۳	۰/۴۶۲	۶/۰۰۰	۲۰
آزمایش ۹	۳/۷۵۰	۱/۱۲۵	۱/۱۲۵	۶/۰۰۰	۰

محیط کشت

از آنجا که شرایط محیط کشت اختصاصی باکتری‌ها اندکی با یکدیگر متفاوت بود، برای کشت‌های مخلوط یک محیط کشت میانگین با سه غلظت متفاوت آهن به صورت زیر تعریف گردید:

محلول نمک‌های پایه(گرم بر لیتر): $(NH_4)_2SO_4$ ؛۰/۵، $MgSO_4,7H_2O$ ؛۰/۵۲، $CaCl_2,2H_2O$ ؛۰/۴۷، K_2HPO_4 ؛ ۰/۱ ، KH_2PO_4 ؛۰/۰۲۷، $MgCl_2,6H_2O$ ؛ ۰/۰۵۳ . pH این محلول با افزودن اسید سولفوریک ۵ نرمال برابر با ۲/۰ تنظیم شد.

محلول عناصر کم مقدار[13] (میلی گرم بر لیتر): $MnCl_2,2H_2O$ ؛ ۶۲، $ZnCl_2$ ؛ ۶۸ ، $CuCl_2,6H_2O$ ؛ ۶، H_3BO_3 ؛ ۳۱، Na_2MoO_4 ؛ ۱۰ ، $CuCl_2,2H_2O$ ؛ ۶۷ .

محلول سولفات آهن: محلول نمک $FeSO_4,7H_2O$ با غلظت‌های ۴۰۰ و۴۰ گرم در لیتر. pH این محلول‌ها با افزودن اسید سولفوریک ۵ نرمال برابر با ۲/۰ تنظیم شد.

۹۵ میلی لیتر ازمحلول نمک‌های پایه اتوکلاو شد. سپس به هر ارلن ۵ میلی لیتر محلول سولفات آهن(به غیراز ارلن‌های حاوی محیط کشت0K) و ۰/۱ میلی لیتر محلول عناصر کم مقدار از طریق صافی[14] سترون(۰/۲ میکرومتر) افزوده شد.

سنگ معدن

در این تحقیق از دونوع سنگ معدن مس سرچشمه کرمان استفاده شد. آنالیز عنصری این دو سنگ معدن با روش XRF

در جدول ۴ داده شده است. سنگ معدن تا اندازه ۴۰۰- مش (۳۸ میکرو متر) آسیاب و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. به هر ارلن حاوی محیط کشت سترون ۵ گرم از سنگ معدن سترون شده اضافه شد.

جدول (٤) آنالیزعنصری دونوع سنگ معدن به کار برده شده.

عنصر / سنگ معدن	مس	آهن	گوگرد	روی	سرب	سیلیسیم	ارسنیک	آلومینیم	نیکل	مولیبدن	پتاسیم	کلسیم
کم عیار	۰/۴۳۸	۵/۲۱	۲/۴۷	۰/۰۳	ناچیز	۲۳/۸۶	ناچیز	۱۰/۸۸	ناچیز	۰/۰۱	۳/۳۲	۰/۲۴
کالکوپیریت	۰/۵۶۰	۵/۱۱	۲/۷۹	ناچیز	ناچیز	۲۳/۶۰	ناچیز	۱۱/۹۳	ناچیز	ناچیز	۲/۴۰	۰/۳۶

اندازه‌گیری‌ها

برای اندازه‌گیری pH از pH متر Metrohm 691 استفاده شد. الکترود pH قبل و بعد از قرار گرفتن در هر ارلن با محلول ساولون در اتانل ٪۷۰ (۱ حجم ساولون در ۳۰ حجم محلول اتانل ٪۷۰) سترون و سپس برای جلوگیری از ورود محلول سترون کننده به درون محیط کشت ـ با آب مقطر سترون شستشو گردید [۱۶]. برای تنظیم pH از اسید سولفوریک ۵ نرمال استفاده شد. روش شمارش با لام توما بعنوان دقیق‌ترین و سریع ترین روش قابل دسترس به کار رفت. در هر نمونه تعداد کل ریزسازواره‌های معلق در فاز مایع شمارش شد. میزان کل مس و آهن آزاد شده در محیط کشت با روش جذب اتمی[۱۵] با دستگاه PHILIPS PU9100X اندازه‌گیری شد.

پیش از نمونه‌گیری، میزان آب تبخیر شده با روش وزنی اندازه‌گیری و جبران شد.

نتایج و بحث

تغییرات pH

در نمونه‌های حاوی سنگ معدن کم عیار تغییرات pH در کشت‌های مخلوط و خالص مشابه بود (شکل۱). در این کشت‌ها pH ابتدا به حدود۲/۵ افزایش و سپس به آرامی به مقادیر کمتر از ۱/۵ کاهش یافت. افزایش pH به علت ساز و کار فروشویی اسیدسولفوریک بر روی سولفیدهای فلزی و کاهش آن به خاطر تنظیم مجدد و نیز فعالیت باکتری‌های تیوباسیلوس فرواکسیدانس وتیوباسیلوس تیواکسیدانس و نتیجتاً تولید اسید سولفوریک می‌باشد. به همین علت روند کاهش pH در نمونه‌های بدون باکتری رخ نداد.

در مقایسه با سنگ معدن کم عیار، افزایش pH در محیط‌های حاوی سنگ معدن کالکوپیریت شدت بیشتری داشت. با توجه به بالاتر بودن محتوی گوگرد و بنابراین سولفیدهای فلزی دراین سنگ معدن، افزایش بیشتر pH در نتیجه ساز و کار فروشویی اسیدسولفوریک می باشد.

با گذشت زمان وکم شدن میزان فروشویی، میزان افزایش pH کمتر می شود.

تغییرات جمعیت ریزسازواره‌ها در محیط مایع

با شمارش مستقیم ریزسازواره ها، نمودار تغییرات جمعیت کل آنها برحسب زمان ترسیم شد(شکل۲). منحنی جمعیت در کشت‌های مخلوط برابر با مجموع جمعیت‌های سه نوع ریزسازواره موجود در هر کشت است. بطورکلی الگوی حاکم بر رشد ریزسازواره‌های مخلوط در فروشویی مس، معادله رشد مونود است[۱۶و۱۷].

بر روی سنگ معدن کم عیار، کشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۱۴۷۷ و کشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۹۲۷ در غلظت کم و متوسط آهن، پس از گذشت ۱۰ روز به فاز مرگ وارد شدند اما کشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس* فرواکسیدانس DSM ۹۴۶۵ ، کشت‌های خالص وکشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۹۲۷ در غلظت زیاد آهن تا روز هفدهم ـ پایان آزمایش ـ در مرحله فاز سکون بودند. این پدیده نشان می‌دهد که تنها *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹۴۶۵ در کشت‌های مخلوط به راحتی قادر به رشد بر روی این سنگ معدن

است و در کشت‌های مخلوط دو سویه دیگر *تیوباسیلوس* رقابت بین گونه‌ها توانایی کشت مخلوط را برای بقا بر روی سنگ معدن کم عیار کاهش می‌دهد. همچنین وابستگی شدید میزان رشد *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۹۲۷ به غلظت آهن در محیط کشت در کشت مخلوط روشن می‌شود.

در نمونه‌های حاوی سنگ معدن کالکوپیریت، ریزسازواره‌ها با سرعت کمتری نسبت به سنگ معدن کم عیار رشد کردند. از آنجا که میزان فلزات سنگین ـ به عنوان ممانعت کننده از رشد ـ دراین دو نوع سنگ معدن تقریباً یکسان بود، علت این پدیده بافت مقاوم ترسنگ معدن کالکوپیریت در مقابل تأثیر باکتری‌ها است. در اینجا، کشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۱۴۷۷ یک فاز تأخیر داشتند، اغلب کشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM۱۹۲۷ جمعیت کمی داشتند و تنها کشت‌های مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM۹۴۶۵ به راحتی رشدکرده و جمعیت زیادی داشتند. درکشت‌های خالص نیز تنها *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM۹۴۶۵ در۳ غلظت متفاوت از آهن جمعیت زیادی داشت. این نتایج بیانگر مصرف آسان‌تر سنگ معدن کالکوپیریت توسط باکتری *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM۹۴۶۵ بود.

بنابراین در بین کشت‌های مخلوط، کشت‌های حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM۹۴۶۵ بیشترین سازگاری را نسبت به هر دو نوع سنگ معدن دارا بودند.

تغییرات غلظت آهن(کل)

در محیط سنگ معدن کم عیار، نمونه‌های تلقیح شده با غلظت کم و متوسط آهن، یک افزایش تدریجی در میزان آهن محلول وجود داشت (شکل۳) که علت آن فروشویی زیستی همراه با فروشویی شیمیایی بود. صعود منحنی‌های غلظت آهن همزمان با افزایش نمایی جمعیت ریزسازواره‌ها و عدم صعود آنها در نمونه‌های بدون تلقیح، این پدیده را نشان می‌دهد. درکشت‌های مخلوط با غلظت آهن زیاد، میزان آهن محلول ابتدا افزایش، سپس کاهش و دوباره افزایش یافت. افزایش غلظت آهن محلول، نشان‌دهندهٔ انحلال آهن از سنگ معدن به درون محیط کشت با ساز و کار شیمیایی و میکروبی، و کاهش آن نشان‌دهندهٔ رسوب یافتن آهن به صورت جاروزیت[۱۶] ($AFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ که در آن A، یون آمونیوم و یا یک کاتیون فلزی یک ظرفیتی است) ـ احتمالاً از نوع پتاسیم ـ است. در کشت‌های خالص که تمام جمعیت میکروبی آنها را گونه‌های *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* تشکیل می‌داد، یک رفتار نوسانی مشاهده شد که علت آن انحلال و رسوب یافتن سریع‌تر آهن بود. نمونه‌های بدون باکتری این رفتار نوسانی را با دامنه کوچک‌تری تکرار کردند که نشان‌دهندهٔ تنها انحلال شیمیایی و ترسیب است. در این نمونه‌ها غلظت آهن در پایان آزمایش کمتر از میزان آغازین است که به علت ترسیب آهن و عدم جایگزین شدن آن به طور کامل می‌باشد.

در محیط سنگ معدن کالکوپیریت، در تمام نمونه‌های تلقیح شده یک افزایش تدریجی در میزان آهن محلول درسطوح سه گانه غلظت آهن مشاهده شد. نمونه‌های تلقیح نشده این روند را با شیب ملایم‌تری تکرار کردند. در این محیط رفتار نوسانی محیط سنگ معدن کم عیار مشاهده نشد که دلیل آن ممکن است به محتوی کمتر فلزات یک ظرفیتی تشکیل‌دهندهٔ جاروزیت ـ به ویژه پتاسیم ـ درسنگ معدن کالکوپیریت مربوط باشد.

تغییرات غلظت مس

در محیط سنگ معدن کم عیار، نمودارهای فروشویی مس در نمونه‌های تلقیح شده ـ فروشویی زیستی ـ با نمودارهای فروشویی در نمونه‌های تلقیح نشده ـ فروشویی غیرزیستی ـ شباهت زیادی دارند(شکل۴). این پدیده نشان‌دهندهٔ نقش ناچیز ریزسازواره‌ها در فرایند فروشویی این سنگ معدن است که علت آن دسترسی آسان یون فریک و اسید سولفوریک به کانی‌های درون بافت سنگ معدن و رقابت آنها با ساز و کار میکروبی است. بیشترین میزان فروشویی مس از سنگ معدن کم عیار۲۶ درصد بود که باکشت مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹۴۶۵، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* DSM ۲۷۰۵ و*تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM۶۲۲ با نسبت جمعیت به ترتیب ۱: ۳: ۵ در غلظت زیاد آهن درمدت ۱۷روز حاصل شد. این میزان در مقایسه با نمونه‌های بدون تلقیح ۱۲ درصد بیشتر است.

درمحیط سنگ معدن کالکوپیریت، تفاوت در میزان فروشویی بین نمونه‌های شاهد و حاوی باکتری قابل توجه بود. علت این پدیده ساز و کار فروشویی مستقیم میکروبی و یا تخریب شبکه کانی‌های موجود توسط ریزسازواره‌هاست. بیشترین میزان فروشویی مس از این سنگ معدن نیز با کشت مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹۴۶۵، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* DSM ۲۷۰۵ و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM۶۲۲ با نسبت جمعیت به ترتیب۱: ۳: ۵ در غلظت زیاد آهن حاصل گردید که برابر با ۲۶ درصد درمدت۲۷ روز بود. این میزان درمقایسه با نمونه‌های بدون باکتری، ۴۶ درصد افزایش را نشان میدهد. پس از آن کشت مخلوط حاوی *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۱۴۷۷، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* ۲۷۰۵ DSM و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM۶۲۲ با نسبت جمعیت و غلظت آهن مشابه قرار داشت که ۲۵ درصد فروشویی مس را حاصل کرد. با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات انجام شده در گروه، سینتیک واکنش فروشویی نمونه‌های معدنی مس از روابطی مشابه بامعادله مونود پیروی می‌کند[۱۶و۱۷].

همانطوریکه در شکل ۴ (ا تا ث) ملاحظه می‌شود، کشت‌های مخلوط نسبت به کشت خالص برتری دارند. این مزیت خصوصاً پس از انحلال مواد معدنی (که به آسانی در روزهای اول بصورت محلول در می‌آیند) آشکار می‌شود. زمانیکه میکروارگانیسم‌ها درگیر انحلال‌سازی سنگ معدنی سخت نظیر کالکوپیریت می‌شوند. حضور سویه‌های مختلف در کنار هم اثر تقویتی دارند (۵ و ۷ و ۹). بطوریکه در کشت خالص پس از ۱۵ روز به حالت ثابت می رسد، در حالیکه برای کشت مخلوط با شیب کندتری نسبت به دوران ۱۵ روز اول فروشویی ادامه می‌یابد.

تحلیل تاگوچی

از روش تاگوچی برای پیش بینی سطوح بهینه جمعیت ریزسازواره‌ها و غلظت آهن و نیز پیش‌بینی میزان فروشویی مس حاصل از کاربرد این سطوح بهینه استفاده شد. نتایج به دست آمده در جدول (۵) داده شده است. بررسی این داده‌ها نشان می‌دهد که کاربرد سطوح پیش‌بینی شده در این روش، فروشویی مس را در بیشترین میزان، تنها حدود ۶ درصد افزایش خواهد داد. این میزان کم، ناشی از نزدیک بودن مقادیر فروشویی مس درآزمایش‌های ۹ گانه - آرایه L۹ - کشت مخلوط است.

جدول (۵) مقادیر پیش‌بینی شده توسط روش تاگوچی برای نسبت‌های جمعیت، غلظت آهن و بیشترین میزان فروشویی مس در مقایسه با مقادیر تجربی فروشویی مس .

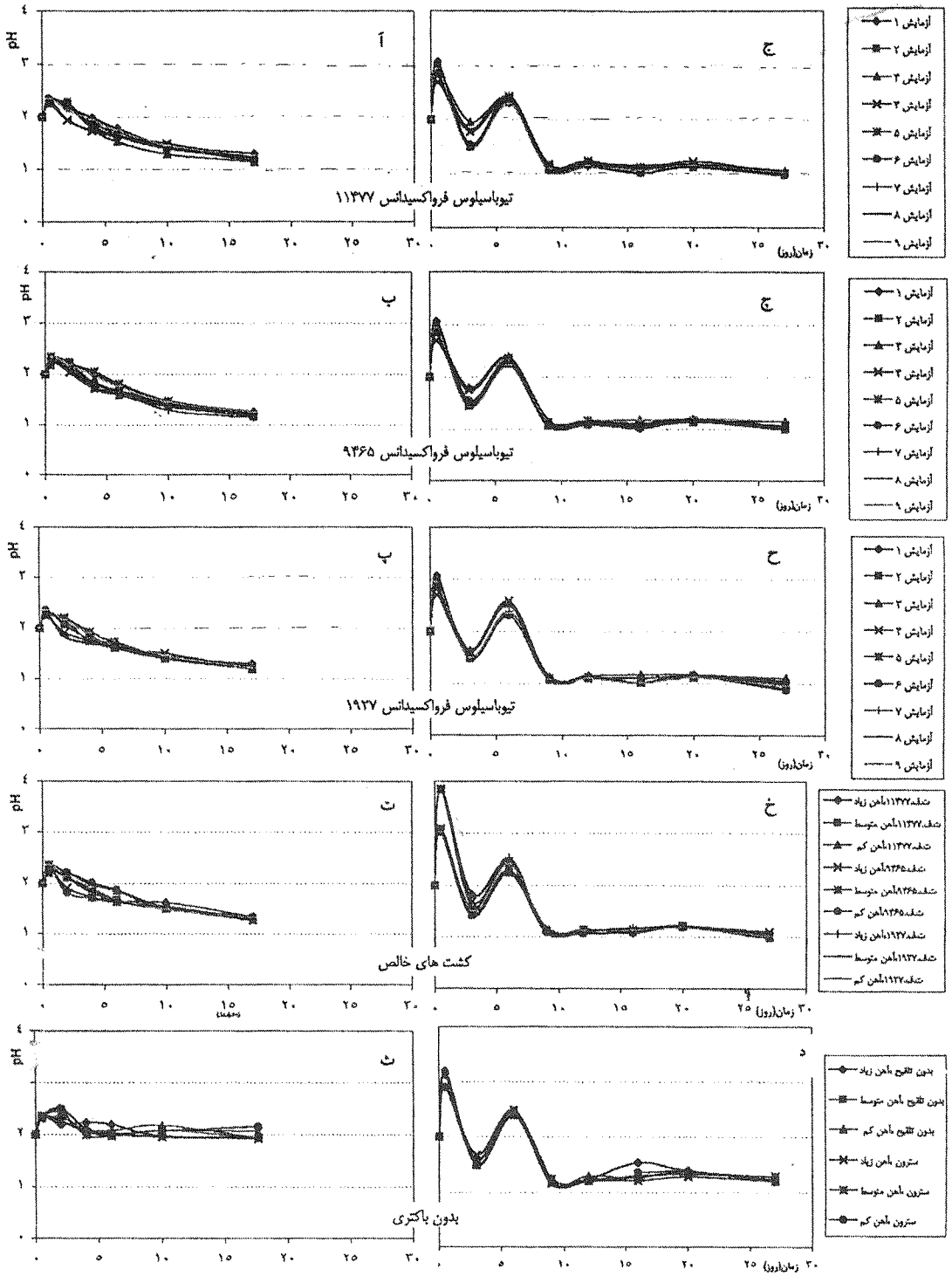
خاک	سویه *تیوباسیلوس فرواکسیدانس*	نسبت بهینه پیش بینی شده جمعیت ها			غلظت بهینه پیش بینی شده آهن	غلظت پیش بینی شده مس(میلی گرم درلیتر)	بیشترین غلظت تجربی مس (میلی گرم درلیتر)
		تیوباسیلوس فرواکسیدانس	*لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس*	*تیوباسیلوس تیواکسیدانس*			
کم عیار	۱۱۴۷۷	۱۰	۳	۵	زیاد	۵۳/۲	۵۳
	۹۴۶۵	۱	۳	۱	زیاد	۵۶/۳	۵۵
	۱۹۲۷	۱۰	۱	۳	زیاد	۵۳/۴	۵۲
کالکوپیریت	۱۱۴۷۷	۱	۲	۳	زیاد	۷۳/۵	۷۱
	۹۴۶۵	۵	۳	۵	زیاد	۷۳/۷	۷۳
	۱۹۲۷	۵	۱	۱	متوسط	۶۸/۱	۶۴

نتیجه گیری

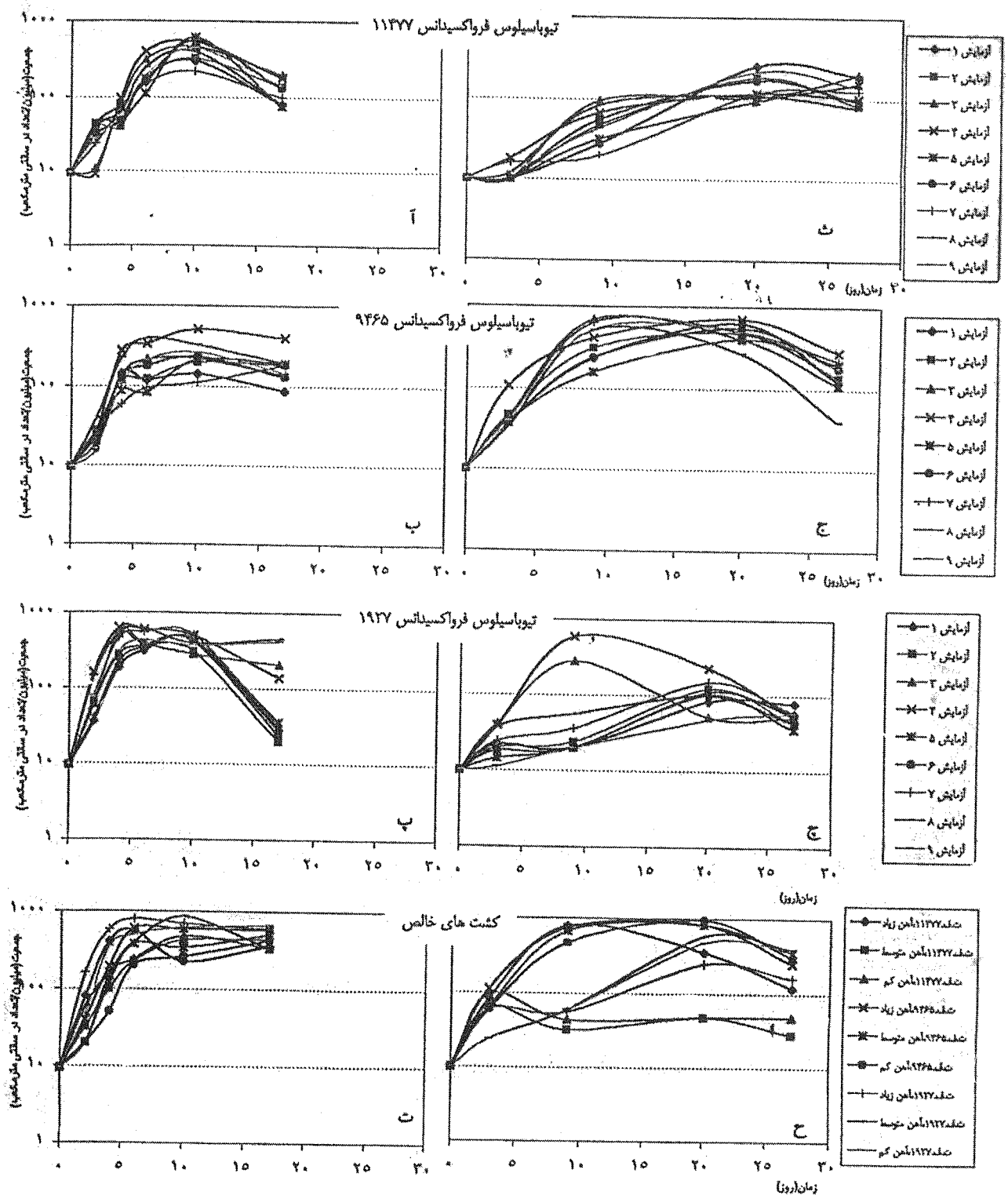
۱ـ بیشترین میزان فروشویی مس از سنگ معدن کم عیار با کشت مخلوط۳ باکتری *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹۴۶۵، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* ۲۷۰۵ DSM و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM۶۲۲ با نسبت جمعیت به ترتیب۱: ۳: ۵ در غلظت ۲۰ گرم بر لیتر سولفات آهن(II) به دست آمد.

۲ـ بیشترین میزان فروشویی مس از سنگ معدن کالکوپیریت باکشت مخلوط *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۹۴۶۵، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* ۲۷۰۵ DSM و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM۶۲۲ و نیزکشت مخلوط *تیوباسیلوس فرواکسیدانس* DSM ۱۱۴۷۷ ، *لپتوسپیریلیوم فرواکسیدانس* ۲۷۰۵ DSM و *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* DSM۶۲۲ با نسبت جمعیت به ترتیب۱ :۳ :۵ در غلظت ۲۰ گرم بر لیتر سولفات آهن(II) حاصل شد.

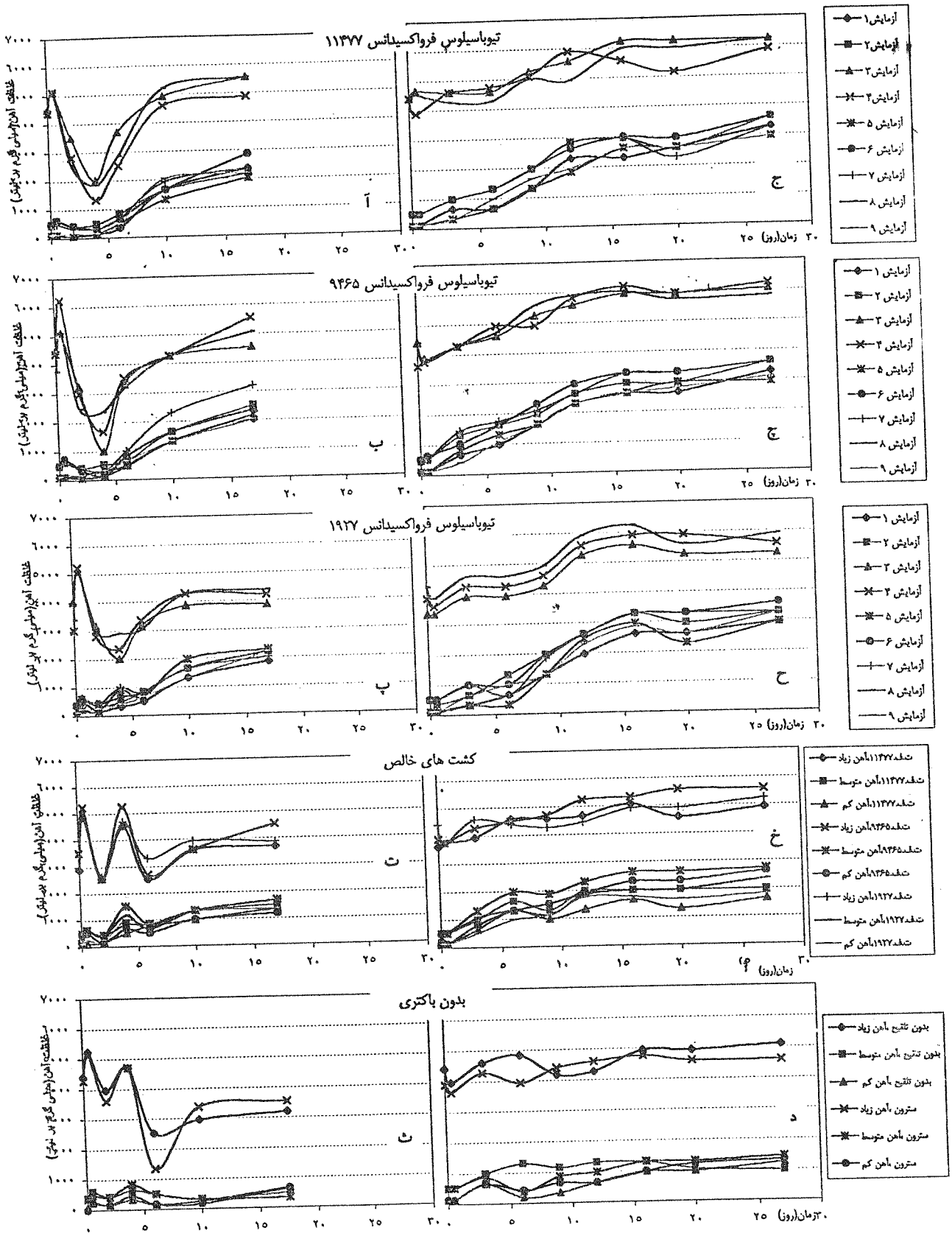
۳ـ با استفاده ازکشت‌های بالا، بیشترین میزان فروشویی مس از سنگ معدن کم عیار برابر با ۲۶ درصد در مدت ۱۷روز و ازسنگ معدن کالکوپیریت ۲۶درصد در مدت ۲۷روز به دست آمد؛ که درمقایسه بانمونه‌های بدون باکتری به ترتیب ۱۲ و ۴۶ درصد افزایش نشان می‌دهد.



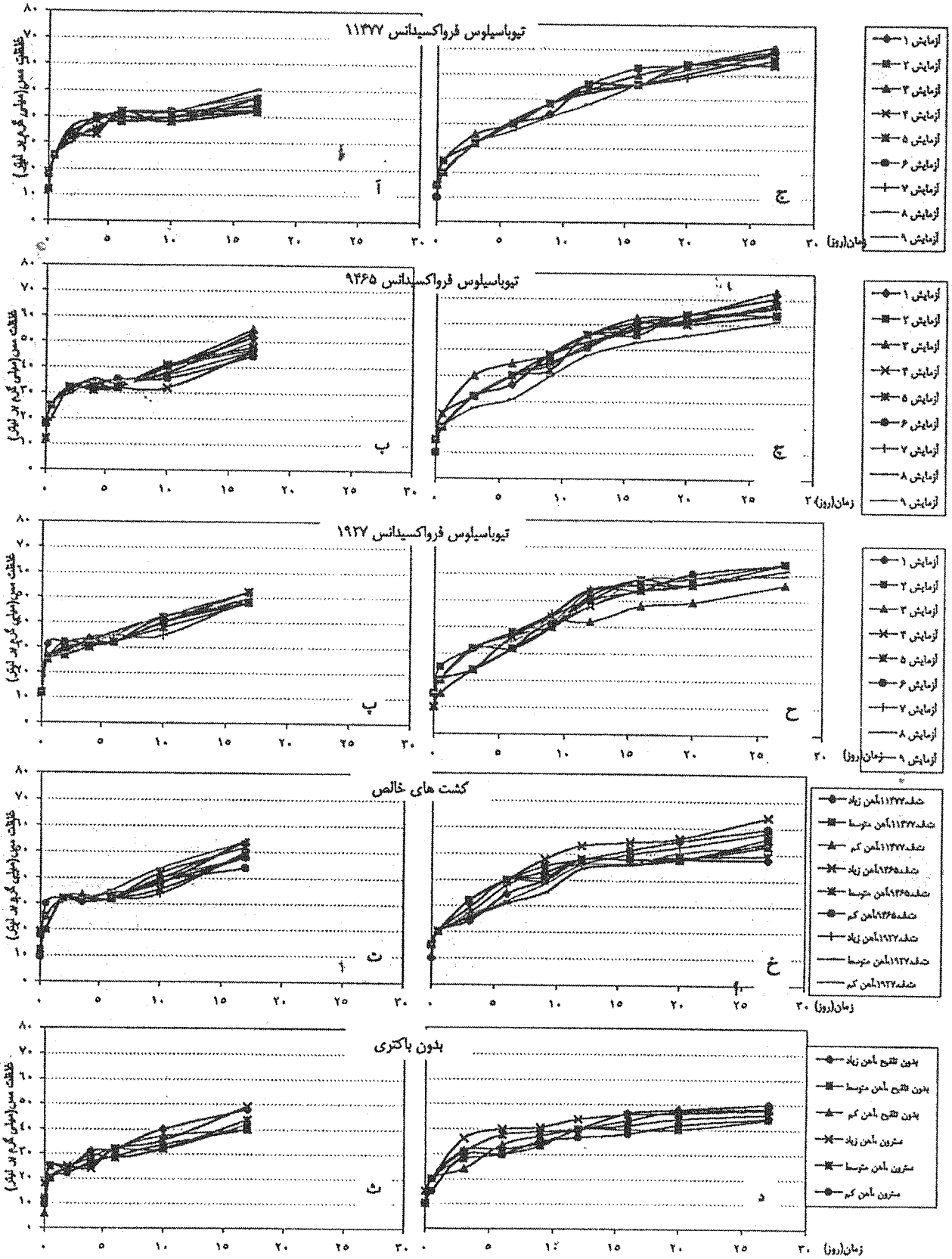
شکل (۱) تغییرات pH برای نمونه کم عیار(" آ " تا " ث ") و کالکوپیریت (" ج " تا " د ") درکشت های مخلوط، خالص و نمونه‌های بدون باکتری در خلال فروشویی.



شکل (۲) تغییرات جمعیت کل ریزسازواره‌ها برای نمونه کم عیار(" آ " تا " ت ") و کالکوپیریت (" ث " تا " ح ") درکشت‌های مخلوط، خالص و نمونه‌های بدون باکتری در خلال فروشویی.



شکل (۳) تغییرات غلظت آهن برای نمونه کم عیار(" آ " تا " ث ") و کالکوپیریت (" ج " تا " د ") درکشت‌های مخلوط، خالص و نمونه‌های بدون باکتری در خلال فروشویی.



شکل (٤) تغییرات غلظت مس برای خاک کم عیار(" آ " تا " ث ") و کالکوپیریت (" ج " تا " د ") درکشت‌های مخلوط، خالص و نمونه‌های بدون باکتری در خلال فروشویی.

زیرنویس‌ها

1- Mixed Culture
2- *Thiobacillus ferrooxidans*
3- *Thiobacillus thiooxidans*
4- *Leptospirillum ferrooxidans*
5- Mutualism
6- Inoculum
7- Incubation
8- G. Taguchi
9- Factors
10- Level
11- Sterile
12- Thoma
13- Trace elements
14- Filter
15- Atomic Absorption
16- Jarosite

مراجع

[1] A. T. Bull, Mixed culture and mixed substrate systems, In: M. Moo-Young, (Ed.), Comprehensive Biotechnology, Vol. 1, Pergamon Press, Britain, (1985).

[2] K. J. Edwards, P. L. Bond, G. K. Druschel, M. M. McGuire, R. J. Hamers and J. F. Banfield,Geochemical and biological aspects of sulfide mineral dissolution: lessons from Iron Mountain, California. Chemical Geology, Vol. 169, 383-397 (2000).

[3] D. E. Rawlings, (Ed.), Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes, Springer-Verlag,Berlin, (1997).

[4] M. N. Hughes and R. K. Poople, Metals and Microorganisms, Chapman and Hall, USA, (1989).

[5] D. E. Rawlings, H. Tributsch and G. S. Hansford, Reasons why *'Leptospirillum'*-like species processes for the biooxidation of pyrite and related ores, Microbiology, Vol. 145, 5-13 (1999).

[6] C. Brombacher and R.Bachofen, Microbial metal recovery from industrial waste, Paper presented at the Recovery, Recycling and Re-integration congress, Switzerland, (1999).

[7] F. B. Brunet, P. Hugues, T. Cabral, P.Cezac, J. L. Garcia and D. Morin, The mutual effect of mixed *Thiobacilli* and *Leptospirilli* populations on pyrite bioleaching, Vol. 11, No.2, 195-205 (1998).

[8] F. Veglio, F. Beolchini, A. Gasbarro, L. Toro, S. Ubaldini and C. Abbruzzese, Batch and semi-continuous tests in bioleaching of magniferous minerals by heterotrophic mixed microorganisms, International Journal of Mineral Processing, Vol. 50, 255-273 (1997).

[9] G. Rossi, Biohydrometallurgy, McGraw-Hill, Hamburg, (1990).

[10] F. Battaglia, D. Morin and P. Olliver, Dissolution of cobaltiferrous pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus Thiooxidans*: factors influencing bacterial leaching efficiency, Journal of Biotechnology, Vol. 32, 11-16 (1994).

[11] K. A. Malatt, Bacterial oxidation of pure arsenopyrite by a mixed culture, In: R. Amils and A. Ballester, (Eds.), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, part A: bioleaching, microbiology, Elsevier, Netherlands, 411-421 (1999).

[12] D. E. Rawlings, N. J. Coram, M. N. Gardner and S. M. Deane *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. In: R. Amils and A. Ballester, (Eds.), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, part A: bioleaching, microbiology, Elsevier, Netherlands, 777-786 (1999).

[13] B. M. Goebel and E. Stackebrandt, Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, No. 5, 1614-1621 (1994).

[14] http://www.dsmz.de/dsmzhome.htm

[15] K. R. Roy, A Primer on the Taguchi Method, Van Nostrand Reinhold, New York, (1990).

[۱۶] زیلویی، حمید؛ جداسازی و شناسایی باکتری‌های مزوفیل مؤثر در فرایند فروشویی زیستی سنگ‌های سولفیدی و بررسی پارامترهای سینتیکی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، با راهنمایی دکتر سیدعباس شجاع السادات، ۱۳۸۰.

[۱۷] خالقی پور، لیلا؛ تعیین سینتیک و مدلسازی فروشویی باکتریایی سنگ‌های سولفیدی کم عیار مس، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، با راهنمایی دکتر سیدعباس شجاع السادات، ۱۳۸۰ .