فروشویی میکروبی طلای موته توسط سویه گرمادوست معتدل جدا شده از چشمه قطور سویی

احمدرضا شاهوردی
استادیار گروه بیوتکنولوژی - دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی تهران
منوچهر اولیا زاده
دانشیار گروه مهندسی معدن - دانشکده فنی - دانشگاه تهران
مجتبی طباطبائی یزدی
دانشیار گروه بیوتکنولوژی - دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی تهران
سیدعلی سیدباقری
کارشناس هیدرومتالورژی مجتمع مس سرچشمه

(تاریخ دریافت ۷۷/۳/۳۰، تاریخ تصویب ۷۸/۹/۱۳)

چکیده

طی این مطالعه یک سویه میکروبی گرمادوست از چشمه قطور سویی در دامنه کوه سبلان جدا گردید. مطالعات میکروبیولوژیک نشان داد این سویه یک میکروب گرم مثبت رشته‌ای با اسپور انتهایی می‌باشد که قادر به اکسیداسیون پیریت و گوگرد عنصری است. رشد این باکتری در شرایط هتروتروفی و اتوتروفی مطلق کند بوده لذا جهت تسریع رشد این جاندار روی منابع معدنی افزودن عصاره مخمر ضروری می‌باشد. این سویه در pH معادل ۲ و دمای ۵۰°C فعالیت قابل ملاحظه‌ای در تجزیه پیریت حاوی طلا داشته که نتیجتاً باعث افزایش میزان بازیابی طلا می‌گردد.میزان بازیابی طلا بعد از ۴ روز از حدود ۷۰ درصد به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد. این میزان اگرچه تا روز ۹ برای درصد جامد ۷/۵ تغییر قابل ملاحظه‌ای ندارد ولی برای درصدهای جامد ۱/۵ تا ۶ درصد از کنستانتره از ۸۵ تا ۹۵ درصد تغییر می‌نماید.

واژه های کلیدی : طلا، بیولیچینگ

مقدمه

فروشویی میکروبی[1]

معمولاً جهت استخراج فلزات با ارزش از سنگهای معدنی با عیار پایین، از فن‌آوری فروشویی میکروبی استفاده می‌شود. در فروشویی میکروبی، سنگهای معدنی را با میکروارگانیسمهای ویژه‌ای تیمار می‌کنند، بعد از چند روز فلز مربوطه محلول شده و از سنگ و یا تغلیظ شده آن خارج می‌شود، سپس با بکارگیری روشهای معمول براحتی می‌توان آن را استخراج نمود.

بعضی از میکروارگانیسمهای ترکیبات فلزی نامحلول را به نمکهای محلول در آب تبدیل می‌کنند. به کمک فرآیندهای فروشویی میکروبی می‌توان از سنگهای معدنی که ارزش زیادی ندارند و عملاً بی‌مصرف هستند، استفاده مفید کرد و یا از باقیمانده‌های صنعتی دارای فلز، به کمک فرآیندهای فروشویی میکروبی، فلزات را استخراج نمود. امروز از فن‌آوری فروشویی میکروبی به طور موثر جهت بازیافت مس، اورانیوم و فلزات گرانبها نظیر طلا استفاده میگردد(۱). میکروارگانیسمهایی که در فرآیند فروشویی میکروبی کاربرد دارند، همگی هوازی بوده واز اکسیژن به عنوان عامل اکسیدکننده و پذیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند. میکروبهای مهم در فروشویی باکتریی عمدتاً گونه‌های شیمیولیتوتروف بوده و قادرند اکسیداسیون ترکیبات آهن فرو، گوگرد عنصری ، یونهای دارای گوگرد ، کانیهای دارای آهن و یا سولفیدهای فلزی را تسریع نمایند.

این باکتریها الکترونهای آزاد شده از اکسیداسیون را از طریق زنجیر تنفسی (به کمک انواع سیتوکرومها و پروتئین‌های آهن و گوگرددار) به اکسیژن منتقل نموده و آب تشکیل می‌شود. در جریان انتقال الکترون در زنجیر تنفسی، انرژی لازم جهت رشد، تکثیر و بقای

1 - Microbial Leaching

سلولها تولید می‌گردد [۱]. مهمترین باکتریی که در فرآیند فروشویی میکروبی استفاده می‌شود، تیوباسیلوس فرواکسیدانس (*Thiobacillus ferrooxidans*) است علاوه بر آن از میکروارگانیسمهای دیگر نظیر تیوباسیلوس تیواکسیدانس (*Thiobacillus thiooxidans*) لپتوسپیریلوم فرواکسیدانس (*Leptosprillium ferrooxidans*)، سولفوباسیلوس (*Sulfobacillus*)، تعدادی سویه‌های ترموفیل معتدل ، گونه‌هایی از جنسهای سولفولوبوس (Sulfolobus) و اسیدیانوس (Acidianus) می‌توان نام برد [۴،۱]. میکروارگانیسمهای شیمیولیتوتروف، ترکیبات فلزی را از طریق واکنشهای اکسیداسیون به سولفاتهای فلزی محلول در آب تبدیل می‌کنند. این واکنش‌ها یا بصورت مستقیم توسط خود باکتری یا بطور غیر مستقیم از طریق عوامل اکسیدکننده بوجود آمده از واکنش مستقیم مانند یون آهن سه ظرفیتی انجام می‌پذیرد. به واکنش نوع دوم که یک واکنش شیمایی است واکنش غیرمستقیم اطلاق می‌گردد.

به علت ترکیب پیچیده مواد تمایز بین مکانیسمهای فروشویی مستقیم و غیر مستقیم آسان نیست و همیشه مخلوطی از این دو مسیر اکسیداسیون در فروشویی میکروبی دخالت دارد.

امروزه میکروارگانیسمها بسته به دمای لازم برای رشد آنان به سه گروه تقسیم می‌گردند. گروه اول مابین ۲۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد رشد نموده و آنان را مزوفیل گویند. دمای بهینه برای میکروارگانیسمهای گرمادوست معتدل و گرمادوست مطلق به ترتیب ۴۰°c و۷۰°c می‌باشد. افزایش درجه حرارت ۷۰°c طبیعاً باعث افزایش سرعت واکنشهای تجزیه مواد معدنی گشته ولی در مقابل امروز به دلیلی نیاز به انرژی بیشتر صرفه اقتصادی ندارد. هم اکنون توجه دانشمندان جهت انجام فرآیندهای فروشویی معدنی به میکروارگانیسمهای گرمادوست معتدل جلب شده است. افزایش خودبخودی درجه حرارت ظروف فروشویی میکروبی مخصوص در مناطق گرمسیر تا حدود ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتیگراد زمینه مطلوبی جهت بکارگیری این دسته از میکروارگاینسمها در صنایع معدنی فراهم می‌سازد [۷].

باکتریهای گرمادوست معتدل همگی گرم مثبت بوده و قدرت استفاده از ترکیبات ساده آلی و معدنی را دارند. تنها یک گونه از این باکتریها به اسم جنس و گونه خوانده می‌شود و آن (*Sulfobacillus thermosulfidoxidans*) نام دارد. این باکتری از توده‌های حاوی کانسنگ مس، روی، پیریت توسط Karavaiko در سال ۱۹۷۶ بعنوان باکتری تیوباسیلوس جدا شد، با مطالعات بیشتر مشخص گردید که این باکتری دارای اختلاف زیادی با تیوباسیوس است [۱].

این باکتری قادر است از آهن فرو، گوگرد، کانیهای سولفیدی مثل پیریت، کالکوپیریت، آرسنوپیریت، اسفالریت، آنتی‌مونیت و غیره به عنوان منبع انرژی استفاده نماید. تحقیق حاضر برای نخستین بار به منظور جداسازی سویه گرمادوست معتدل از طبیعت ایران و ارزیابی فعالیت آن در رهاسازی بیولوژیک طلای معدن موته به انجام رسیده است.

روش‌ها و مواد

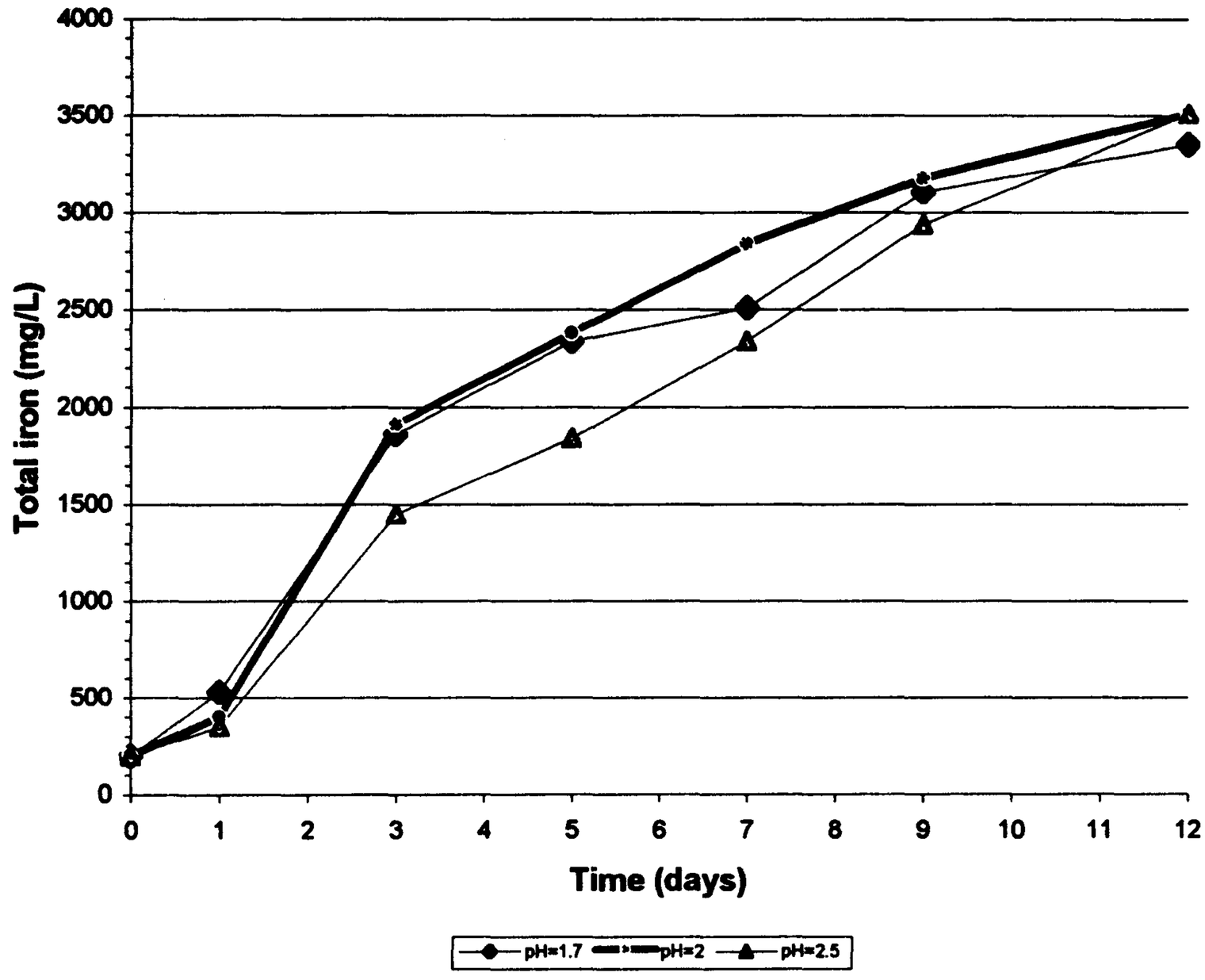
جهت جداسازی باکتری گرمادوست از نقاط طبیعی ایران مکانهای متعددی همچون چشمه آبگرم لاریجان، شفا، سلیمانی و جوش محلات، شابیل و قطور سویی مشکین شهر درنظر گرفته شد. جهت جداسازی میکروارگانیسم از محیط پایه به همراه گوگرد استفاده گردید که ترکیب این محیط کشت بر حسب گرم در لیتر سولفات آمونیوم ۳، کلریدپتاسیم ۰/۱ ، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵ ، سولفات منیزیم آب‌دار ۰/۵ ، نیترات کلسیم ۰/۰۱ و گوگرد ۱۰ می‌باشد. فعالیت سویه جداشده در محیط های کشت مختلف شامل محیط کشت پایه به همراه عصاره مخمر ۲ ٪ درصد و پیریت ۱/۵ درصد وزنی حجمی و محیط های کشت Leathen با ترکیب سولفات آمونیوم ۰/۰۵ ، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵ ، سولفات منیزیم آب‌دار۰/۵، کلرید پتاسیم ۰/۰۵ ، نیترات کلسیم ۰/۰۱ گرم در لیتر و محیط کشت HP با ترکیب سولفات آمونیوم ۰/۴ ، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۱ و سولفات منیزیم ۰/۴ گرم در لیتر به همراه ۱/۵ درصد وزنی کنستانتره پیریت با دانه‌بندی ۴۵ میکرومتر انجام پذیرفت.

جدول ۱: ترکیب اجزاکنستانتره پیریت موته بر حسب درصد وزنی [۸].

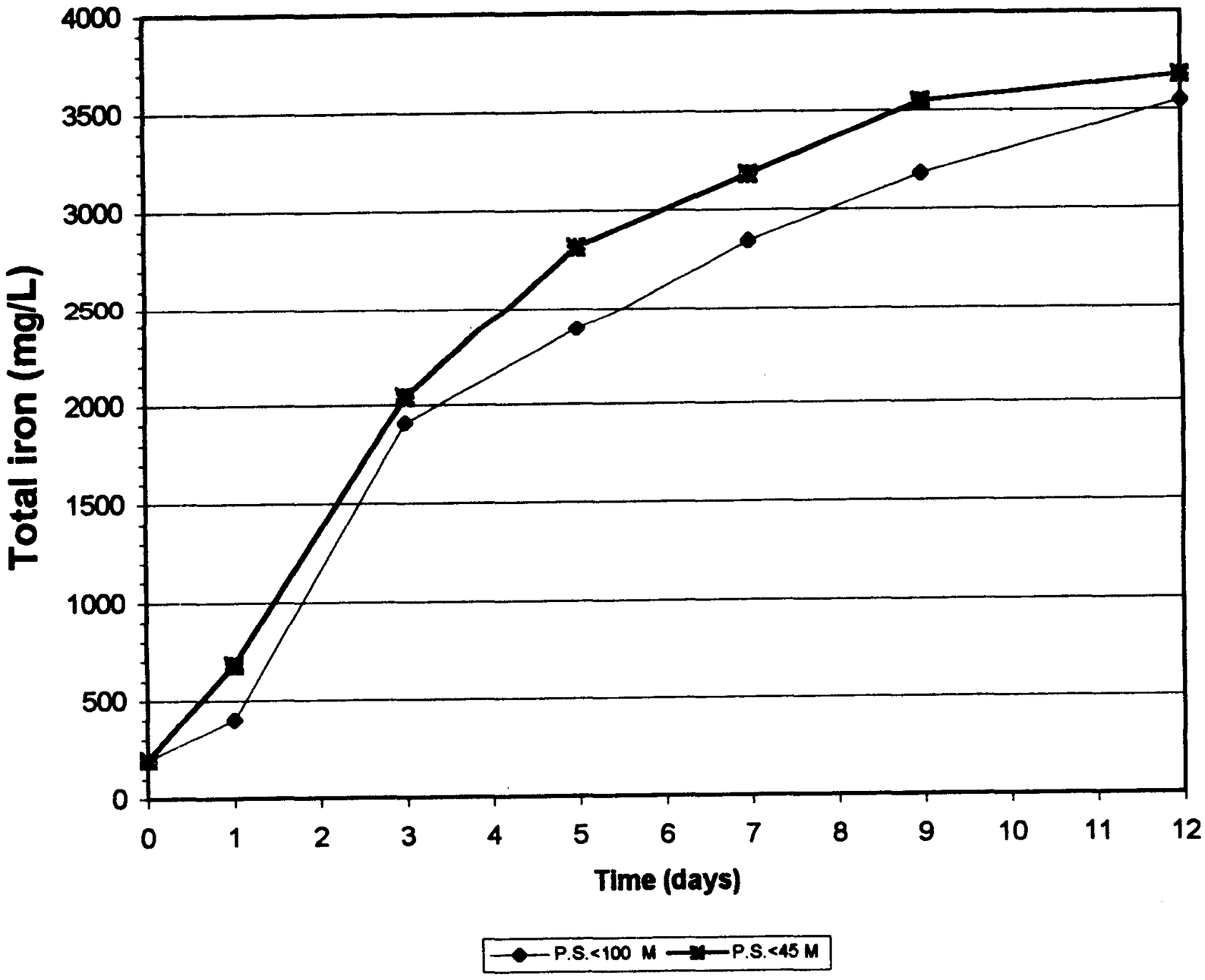
ترکیب	پیریت	گوگردپیریتی	آهن‌پیریتی	آهن‌غیرپیریتی	طلاپی‌پی‌ام
میزان	۷۸	۴۱/۴	۳۶/۱	۱/۶	۳۵

مابقی اجزا شامل عمداً سیلیس و مقادیر ناچیزی از فلزات سدیم، منیزیم، آلومینیوم، پتاسیم، کلسیم و مس می‌باشد.

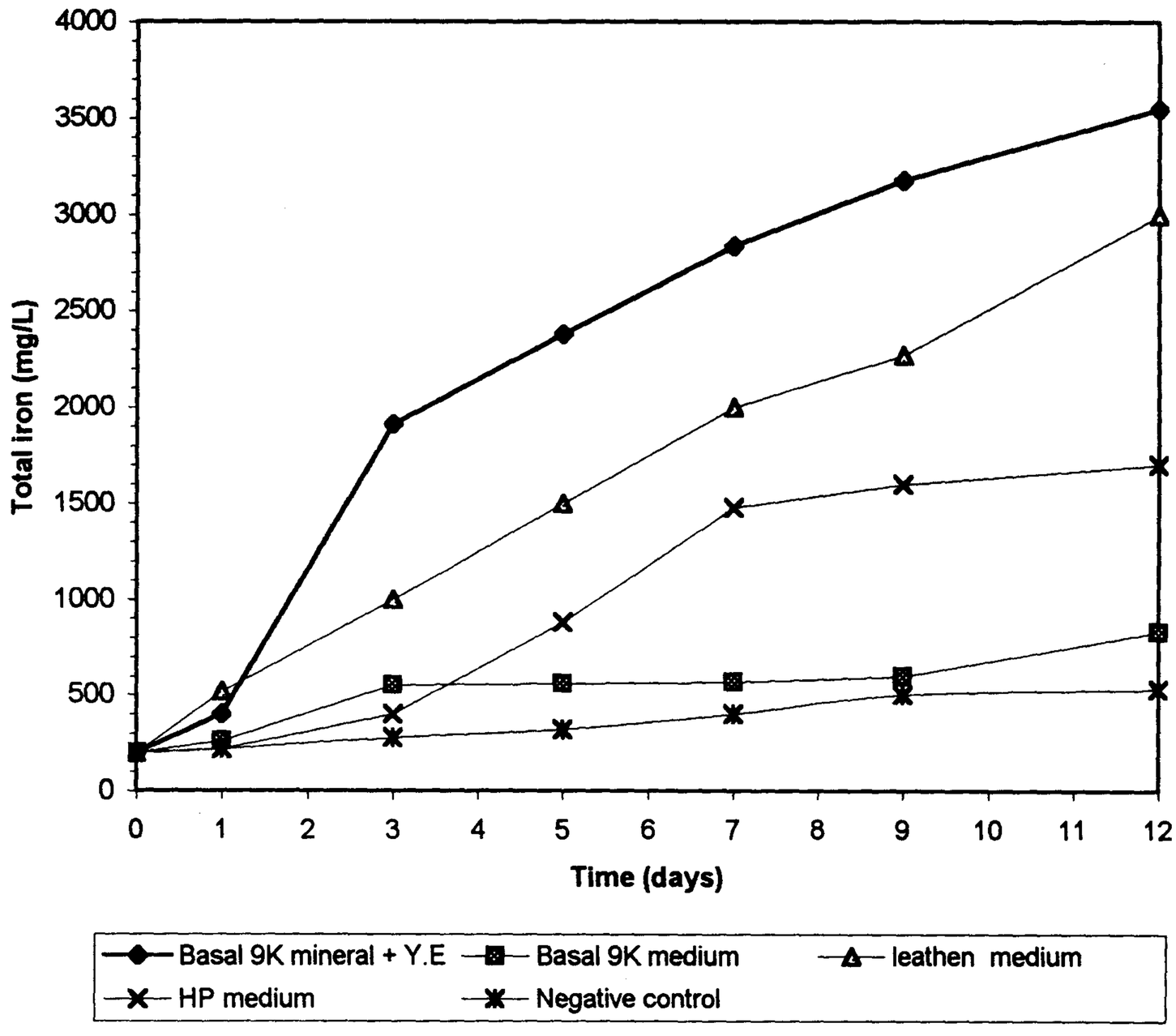
بعد از بهینه‌سازی اولیه محیط کشت و شرایط، باکتری در محیط کشت پایه 9K به همراه عصاره مخمر در حضور مقادیر ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶، ۷/۵ درصد از کنستانتره مورد مطالعه قرار گرفت. نحوه مطالعه اندازه‌گیری آهن تام آزاد شده از واکنش اکسیداسیون بیولوژیک پیریت به روش تیتراسیون با دی‌کرومات پتاسیم بود [۳]. منحنی رشد این میکروارگانیسم‌ها نیز با پروتئین سنجی



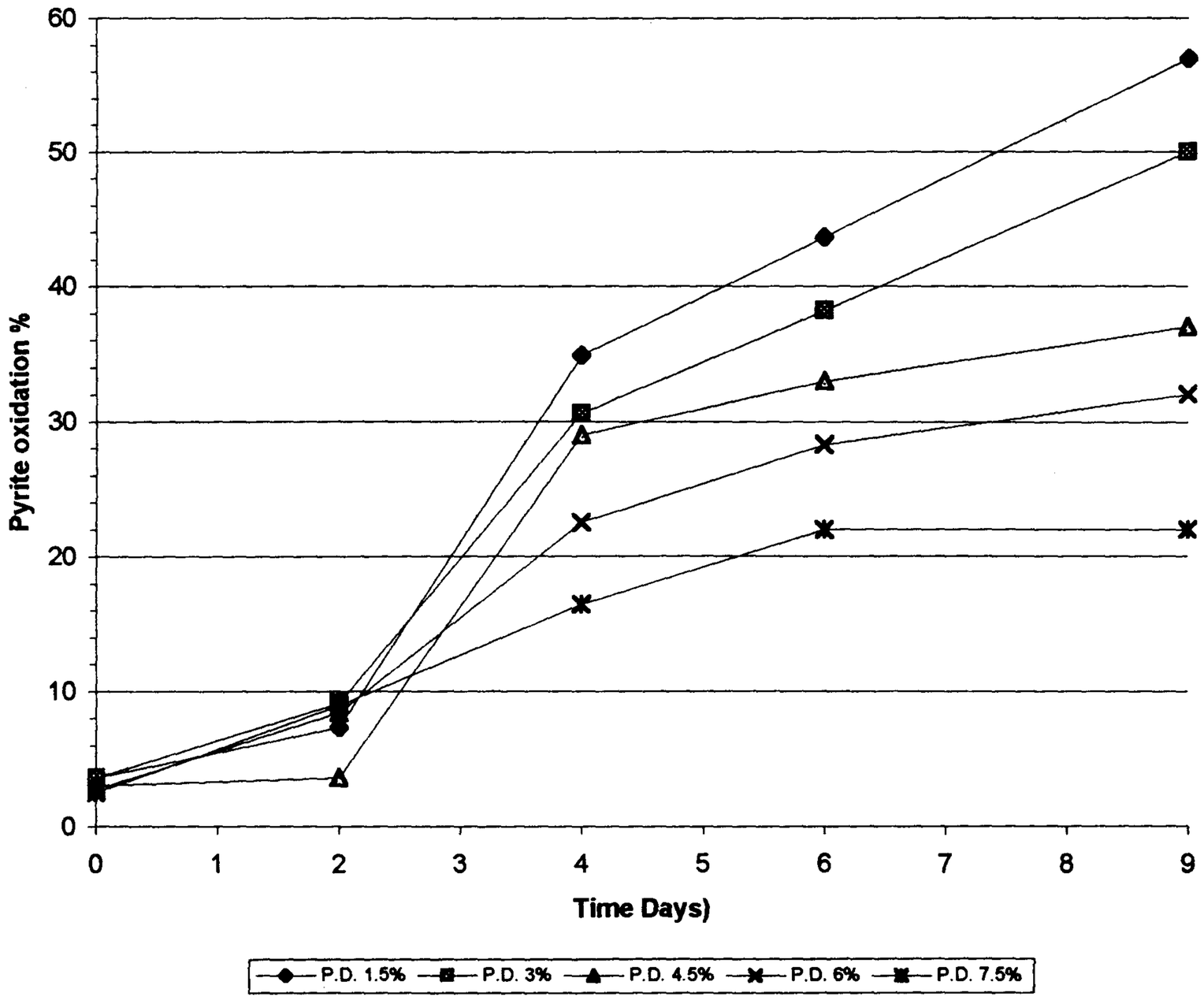
شکل ۱ : منحنی آهن تام حاصل از تجزیه پیریت توسط باکتری سویه TSB در سه pH اولیه ۱/۷ ، ۲، ۲/۵.



شکل ۲ : منحنی آهن تام حاصل از تجزیه پیریت توسط باکتری سویه TSB و تاثیر دو اندازه ذره زیر ۵۰ و ۱۰۰ میکرون.



شکل ۳ : منحنی تولید آهن تام در نتیجه اکسیداسیون پیریت توسط سویه TSB و تاثیر نوع محیط کشت.



شکل ۴ : میزان پیریت تجزیه شده توسط سویه TSB در حضور مقادیر مختلف پیریت.

به‌روش برادفورد بر حسب میزان پروتئین سلولی در واحد زمان ترسیم گردید [۵].

نتایج

جداسازی و تعیین خصوصیات

از بین چشمه‌های آبگرم مورد مطالعه تنها از چشمه که در مشکین‌شهر و در دامنه کوه سبلان واقع می‌باشد و در لهجه محلی، بدلیل خاصیت درمانی دملها و ضایعات پوستی به قطور سویی (قطور یعنی دانه های پوستی و سو یعنی آب ، آبی که باعث درمان دانه‌های پوستی می‌شود) معروف است یک باکتری گرمادوست معتدل جداشد. دمای چشمه ۴۵ درجه سانتیگراد و pH اندازه‌گیری شده با کاغذ اندیکاتور مرک، ۴/۵ بود. بهمراه آب خروجی از زمین مقدار زیادی گاز سولفید هیدروژن نیز متصاعد می‌شود، بطوریکه از چند صد متری مانده به چشمه بوی شدید H_2S به مشام می‌رسد. این منطقه دارای ذخایر عظیمی از گوگرد می‌باشد و تپه‌های اطراف چشمه، همگی دارای گوگرد می‌باشند. بستر و کناره‌های مسیر آب چشمه کاملا" زرد است که ناشی از رسوب گوگرد موجود در آب می‌باشد. بعد از جداسازی این باکتری در محیط کشت حاوی گوگرد این باکتری سویه TSB نام‌گذاری شد.

این باکتری قادر است آهن، گوگرد عنصری و پیریت را بخوبی اکسید نماید. رشد بهینه در شرایط میکسوتروفی صورت گرفته و این باکتری در شرایط اتوتروفی و هتروتروفی رشد قابل ملاحظه‌ای ندارد. در بررسی مرفولوژیک باکتری سویه TSB از باکتری رشد کرده روی محیط حاوی گوگرد گسترشهای میکروبی تهیه شد که پس از تثبیت نمودن و رنگ آمیزی اسپورمالاشیت گرین ، شکل باکتری با میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. باکتریهای میله‌ای شکل، بصورت تک‌تک و یا زنجیره‌های دوتایی بوده و بعضی از آنها نیز اسپور تشکیل داده بودند، اسپور باکتری انتهایی می‌باشد و پس از تشکیل سبب تورم انتهایی سلول باکتری می‌گردد.

شکل این باکتری هنگام رشد روی پیریت در مقایسه با رشد در منابع دیگر متفاوت بوده به نحوی که در این حالت باکتری بصورت زنجیره‌های دو یا چندتایی می‌باشد و اندازه سلولهای باکتری نیز کمی بزرگتر است. این باکتری رنگ گرم را به خود جذب نموده و گرم مثبت می‌باشد.

فروشویی با باکتری گرمادوست معتدل جدا شده (سویه TSB)

pH بهینه - همانطور که در شکل (۱) ملاحظه می‌شود، از سه pH اولیه انتخابی، فعالیت باکتری در pH=۲ بیشتر می‌باشد.

دمای بهینه - برای تعیین بهترین دما برای تجزیه پیریت، از سه دمای ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد استفاده شد. در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، باکتری دارای رشد کمی روی پیریت بود و میزان پیریت تجزیه شده کمتر از دمای ۵۰ درجه سانتیگراد می‌باشد و همچنین در ۶۰ درجه سانتیگراد فعالیت کمتری از باکتری مشاهده گردید، بنابراین دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بعنوان دمای بهینه برای تجزیه پیریت انتخاب گردید. این نتایج بر اساس اندازه‌گیری میزان آهن تام تولید شده بعد از ۱۲ روز می‌باشد(جدول ۲).

جدول ۲ : میزان آهن تام تولید شده بعد از ۱۲ روز حاصل از تجزیه پیریت توسط سویه TSB در دمای ۴۰ و ۵۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد.

میزان آهن تام و نهایی (mg/l)	دما
۱۴۰۰	۴۰
۳۴۲۰	۵۰
۶۰۰	۶۰

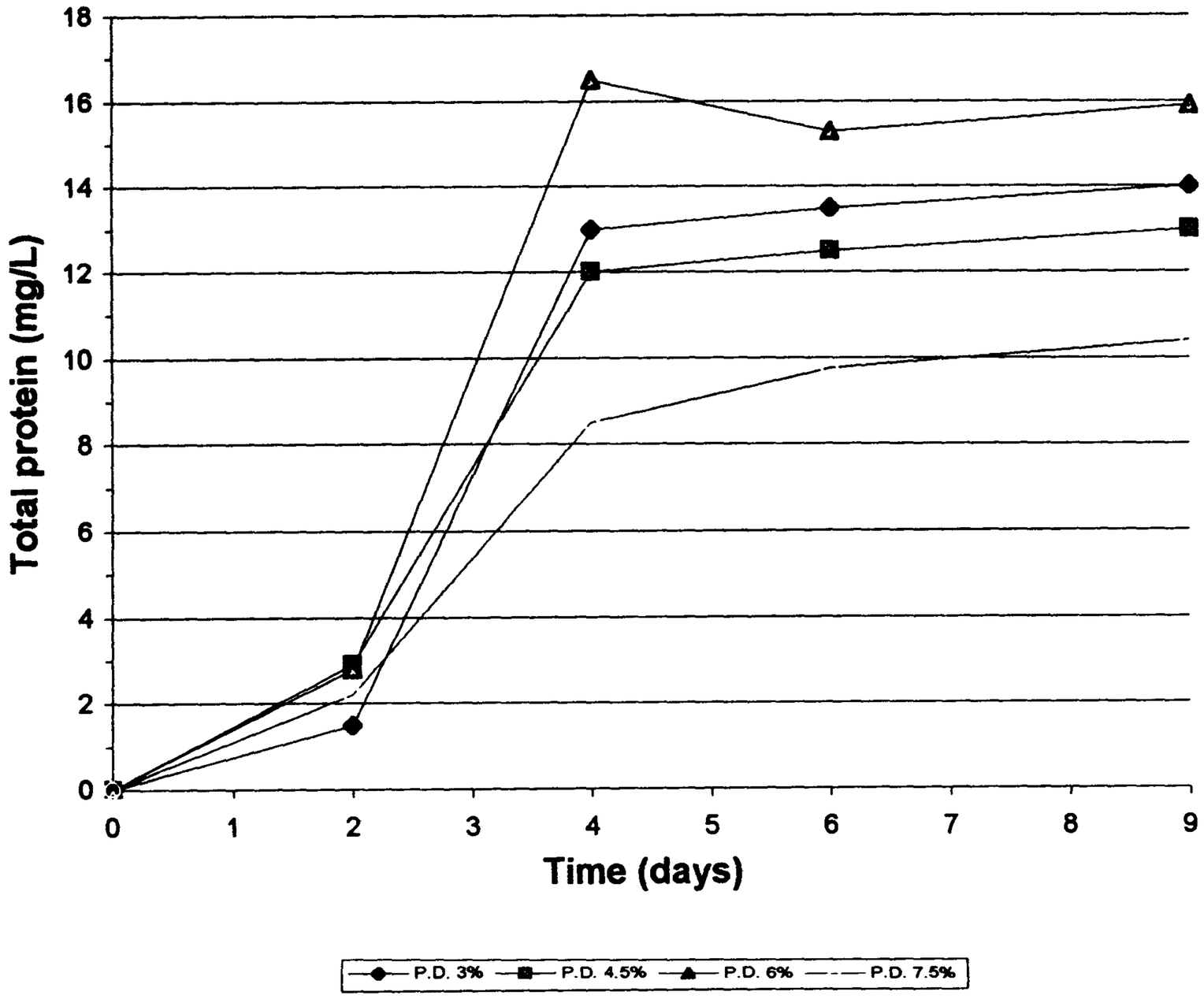
تاثیر اندازه ذره پیریت - از دو اندازه ذره پیریت زیر ۵۰ و ۱۰۰ میکرون استفاده شد. این مقایسه در شکل (۲) نشان داده شده است. با ریزتر شدن ذرات پیریت فعالیت باکتری افزایش یافته است.

محیط کشت مناسب - از چهار محیط کشت انتخاب شده (شکل ۳). بهترین آنها محیط پایه 9k غنی شده با عصاره مخمر بود. محیط Leathen و High Phosphate نیز با ۰/۰۲ ٪ عصاره مخمر غنی شده بودند، محیط پایه 9K که برای رشد اتوتروفی باکتری در نظر گرفته شد فاقد عصاره مخمر بود.

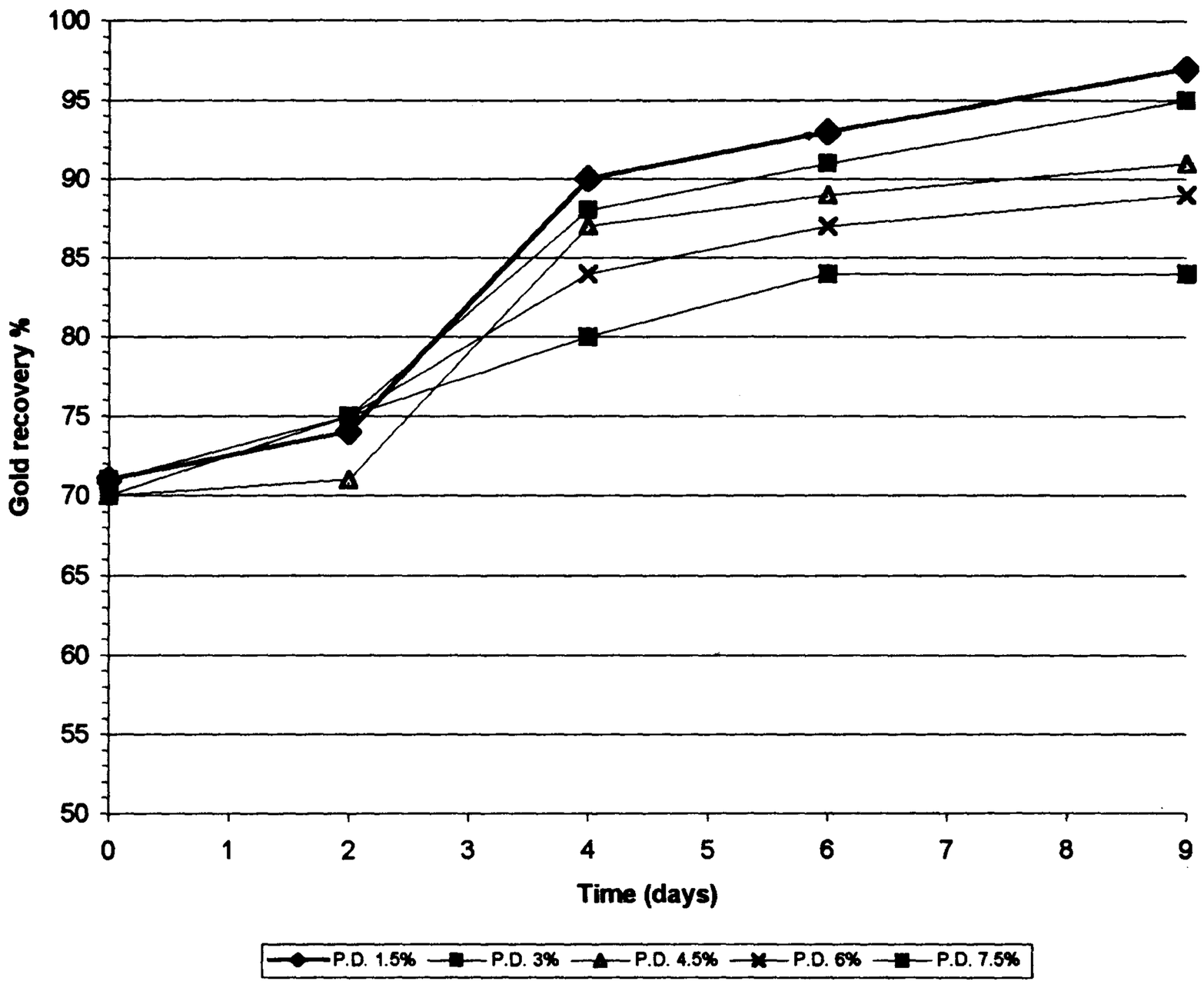
کشت سویه TSB در حضور مقادیر افزایشی پیریت

با استفاده از شرایط بهینه بدست آمده نتایج حاصل از فعالیت باکتری در اکسیداسیون مقادیر افزایشی پیریت بدین صورت است که تا روز دوم باکتری فعالیت زیادی از خود نشان نمی‌دهد (شکل ۴) از روز دوم تا چهارم تجزیه پیریت شتاب زیادی بخود می‌گیرد که این حالت با منحنی رشد باکتری (شکل ۵) مطابقت دارد و در ادامه، تجزیه پیریت روند ثابتی بخود می‌گیرد. با توجه به این منحنی ملاحظه می‌گردد که زمان مناسب برای تهیه بذر تلقیح، کشت چهار روزه باکتری می‌باشد.

در این حالت، بیشترین مقدار پیریت حذف شده بیش از ۵۵٪ بوده که بعد از ۹ روز گرماگذاری صورت گرفته است (شکل ۴).



شکل ۵ : منحنی رشد باکتری سویه TSB در حضور مقادیر مختلف پیریت.



شکل ۶: میزان طلای بازیابی شده از کنستانتره پیریت معدن طلای موته [$P.S < 45\mu$ m] توسط سویه TSB در درصدهای متفاوت از آن.

جدول ۳: میزان نهایی pH ، سولفات و آهن تام درمحیط کشت باکتری سویه TSB و در حضور مقادیر مختلف پیریت.

pHنهایی	درصد تجزیه پیریت	سولفات نهایی(g/l)	آهن تام نهایی (g/l)	میزان پیریت (٪)
۱/۳	۵۷	۵	۳/۱۸	۱/۵
۱/۲۷	۵۰	۶	۵/۴۶	۳
۱/۱۷	۳۷	۹	۴/۲	۴/۵
۱/۱۵	۳۲	۹/۵	۷/۰۳	۶
۱/۲۷	۲۲	۶/۲۵	۶/۰۳	۷/۵

در منحنی رشد باکتریها ملاحظه می‌شود که با افزودن مقدار پیریت بعنوان منبع انرژی تا مدتی رشد باکتری نیز افزایش می‌یابد و از آن به بعد با افزایش پیریت رشد کاهش می‌یابد.

با مصرف پیریت توسط باکتری سویه pH,TSB محیط کاهش یافته و غلظت یون سولفات و آهن تام افزایش مـی‌یابد . در جـدول (۳) میزان نهایی pH ، سولفات و آهن تام پس از مدت ۱۲ روز آورده شده است.

بازیابی طلا

با توجه به منحنی آزاد شدن بیولوژیک طلا ازکنستانتره پیریت معدن موته (اطلاعات نشان داده نشده است) میزان طلای بازیابی شده با سیانور در طول ۹ روز تیمار میکروبی محاسبه گردید. منحنی شماره ۶ این مقادیر را در درصدهای مختلف کنستانتره نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌گردد میزان بازیابی طلا بعد از ۴ روز به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد . این میزان اگرچه تا روز ۹ برای درصد جامد ۷/۵ تغییر قابل ملاحظه‌ای ندارد ولی برای درصدهای جامد ۱/۵ تا ۶ درصد از کنستانتره او ۸۵ تا ۹۵ درصد تعییر می‌نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از جناب آقای مهندس اشرف سمنانی قائم مقام محترم معاونت طرح و برنامه وزارت معادن و فلزات و مجری طرح فرآوری میکروبی طلا (فاز اول) به خاطر مساعدت‌های مالی، ریاست محترم مرکز فرآوری مواد معدنی ایران به خاطر تسهیلات اجرایی و جناب آقای مهندس دربیدی کارشناس محترم طلای موته تقدیر و سپاسگزاری می‌گردد.

مراجع

1 - Barret, J., Hughes, M. N., Karavaiko, G. I. and Spenser, P. A. (1993). *Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Minerals.* Ellis Horwood Limited, New York.

2 - Bosecker, K.(1987). *Microbial Leaching,* P. 661 - 683. In prave, P., Fundamentals of biotechnology . VCH publishers Germany.

3 - Jefferg, G. H., Bassett, J., Mendhans, J. and Denny, R. C. (1980). *Vogel's text book of quantitative chemical analysis,* PP. 376 - 377.

4 - Kavavaido, G. I. (1997). "Mikrobial aspect of biohydrometallxrgy." *J. of Mining and Metallurgy*, Vol. 33, No. 1B, PP. 51 - 8.

5 - Lowenstein, J. M. (1981). *Methods in enzymology,* Vol. 72, Part D,P. 297. Academic press New York.

6 - Norris, P. R. and Barr, D. B. (1985). "Growth and iron oxidation by acidophilic moderate thermophiles." *FEMS microbial.lett.,* Vol. 28, PP. 221 - 224.

7 - Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (1971). *Methods in microbeology,* Academic press.

۸ - دربیدی، م. "کانه‌آرایی سنگهای طلای موته." پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، بهمن (۱۳۷۳).

واژه نامه :

1 - Microbial Leaching — فروشویی میکروبی