Isolation and Application of Thiobacillus Ferooxidans in Removal of Heavy Metals

Naghavi, N., and Emtiazi, G.

Biology Dept., College of Science, Isfahan University

Abstract

Distribution and growth of Thiobacillus ferrooxidans in some areas in Iran (Segzi mineral water and Muteh's gold mine), and the growth of this organism were investigated. When sulfur was used as the sole source of energy, a decrease in pH after one month was observed.

In the medium B, which contained ferrous iron as the sole energy source, growth was indicated by ferric iron deposition, in contrast to control medium . In this medium, almost no pH change was shown after one month. When the primary pH was lowered, the spontaneous chemical oxidation of iron was reduced. The growth in solid media was indicated by production of deposits on clonies of bacteria. Liquid media was sterilized by filtration. The microscopic morphology of bacteria was studied after solubilization of deposits by diluted hydrochloric acid or EDTA.

Thiobacillus ferrooxidans is highly distributed in Segzi mineral water and Muteh's gold mine, but direct culture of stream water, municipal waste water and textile manufacturing effluent were negative. This organism is also able to extract 50% of Nikel from ore. Therefore, this organism can be used for heavy metal removal from activated sludge.

جداسازی تیوباسیلوس فرواکسیدانس و کاربرد آن در حذف فلزات سنگین

نفیسه نقوی* گیتی امتیازی**

چکیده

در این تحقیق گستردگی تیوباسیلوس فرواکسیدانس در برخی نواحی و حضور احتمالی این میکروارگانیسم (در آب معدنی سگزی و معدن طلای موته) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج رشد این میکروارگانیسم در محیط‌های کشت مطالعه شد. در صورت وجود گوگرد احیاء به عنوان تنها منبع انرژی، کاهش شدید pH بعد از رشد یک‌ماهه مشاهده گردید. در محیط کشت B که در آن از آهن فرو به عنوان تنها منبع انرژی استفاده شده بود، رشد میکروارگانیسم با ایجاد رسوبات آهن فریک نسبت به کشت شاهد مشخص گردید. در این محیط کشت، کاهش ناچیز pH بعد از رشد یک‌ماهه ایجاد شد. در صورت پایین بودن pH اولیه، اکسیداسیون شیمیایی و خود به خودی آهن به میزان زیادی کاهش می‌یافت. برای تأیید حضور تیوباسیلوس فرواکسیدانس، از محیط‌های مایع، در محیط کشت جامد آگارز کشت انجام گردید و رشد باکتری با ایجاد رسوبات در امتداد خطوط تلقیح مشخص شد. استریلیزاسیون محیط‌های واجد آهن فرو، جهت جلوگیری از اکسید شدن آهن در فشار اتوکلاو، با استفاده از فلیتراسیون انجام گردید و محیط‌های جامد، بدون استریلیزاسیون مورد استفاده قرار گرفتند. در مطالعات میکروسکوپی نوری و با انحلال رسوبات در اسید کلریدریک رقیق یا EDTA رقیق، شکل ظاهری باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. این میکروارگانیسم به صورت فراوان در آب معدنی سگزی و معدن طلای موته وجود دارد، ولی کشت مستقیم از آب رودخانه، پساب شهری و پساب کارخانه نساجی روی محیط کشت جامد فاقد این میکروارگانیسم بود. میزان استخراج نیکل از سنگ معدن در حضور تیوباسیلوس فرواکسیدانس به میزان ۵۰٪ در طی ۴ تا ۶ روز هوادهی می‌باشد. بنابراین، این میکروارگانیسم می‌تواند در حذف فلزات سنگین از لجن فعال مؤثر باشد.

مقدمه

تصفیه فاضلاب معمولاً موجب ایجاد مقادیر زیادی لجن دفعی می‌شود که مشکلات زیست محیطی به وجود می‌آورد و به علت وجود فلزات سمی بالاتر از سطح استاندارد، نمی‌توان از آن به عنوان کود کشاورزی استفاده کرد [۲]. این فلزات، به وسیله گیاهان جذب شده، وارد چرخه غذایی می‌شوند و بنابراین باید از لجن حذف گردند. برای حذف فلزات از لجن، روش‌های مختلفی به کار می‌رود [۳]:

حذف شیمیایی:

شامل اسیدی کردن لجن یا استفاده از برخی مواد شیمیایی مانند اگزالیک اسید یا آهن فریک است. اگزالیک اسید، آهن را به میزان زیادی محلول کرده، از لجن حذف می‌کند و آهن فریک نیز موجب اکسید و محلول شدن برخی فلزات (به

* - دانشگاه اصفهان - دانشکده علوم - گروه زیست شناسی

** - دانشگاه اصفهان - دانشکده علوم - گروه زیست شناسی

خصوص در pH پایین) می‌شود.

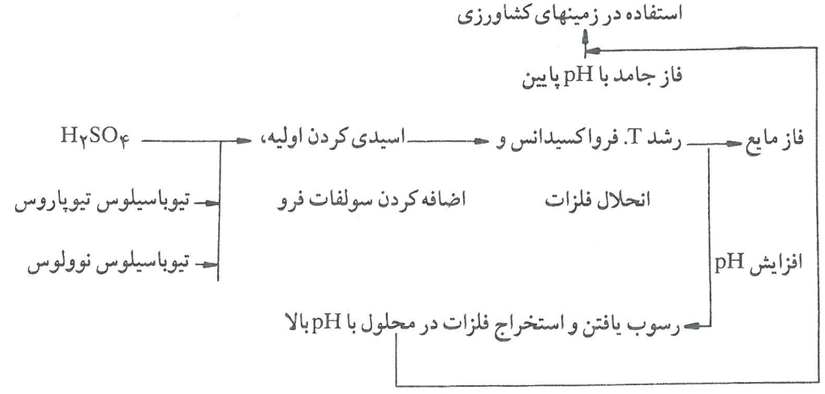
اما حذف شیمیایی دارای مشکلاتی است. به عنوان مثال استفاده از اسید موجب بالا رفتن هزینه تصفیه پساب می‌شود و استفاده زیاد از آهن نیز موجب هیدروفوبیک شدن خاک و اختلال در نفوذ آب و هوا می‌گردد [۳].

حذف با استفاده از فروشویی بیولوژیکی[1]:

در این روش از میکروارگانیسم‌ها برای حذف فلزات استفاده می‌شود. بیشتر دانشمندان، گونه‌های تیوباسیلوس اسیدوفیل کلاسیک را پیشنهاد می‌کنند که محدوده pH آنها کمتر از ۴ می‌باشد [۲]. برای به کارگیری این گونه‌ها ابتدا باید لجن اسیدی شود و همچنین برای تیوباسیلوس فرواکسیدانس[2]، سولفات فرو نیز به لجن اضافه می‌شود. استفاده از این مواد شیمیایی موجب افزایش هزینه این روش نیز می‌شود [۲]. اما نتایج اخیر نشان می‌دهد که می‌توان به جای اسیدی کردن اولیه، از مخلوطی از گونه‌های نوتروفیل تیوباسیلوس تولید کننده اسید مانند تیوباسیلوس نوولوس[3] به صورت همیاری استفاده کرد [۳].

پس از انحلال فلزات، با روش‌های جداسازی جامد از مایع، فاز مایع جدا می‌شود. سپس با بالا بردن pH، فلزات رسوب یافته از محلول جدا می‌شوند. pH اسیدی جامداتی که در ابتدا از فاز مایع جدا شده‌اند نیز باید قبل از استفاده در زمینه‌های کشاورزی به حد خنثی برسد که می‌توان از محلولی که فلزات در pH بالا از آن جدا شده‌اند برای این منظور استفاده کرد. همچنین در صورتی که جداسازی فلزات از لجن به طور انتخابی انجام گیرد، می‌توان آنها را مجدداً به صنعت بازگرداند [۳]. شمای کلی مراحل اکسیداسیون و انحلال بیولوژیک فلزات از لجن فعال در زیر نمایش داده شده است.

1- Bioleaching
2- Thiobacillus Ferooxidans
3- T. novellus



جدول ۱- مقایسه برخی روشهای شیمیایی و بیولوژیکی در حذف فلزات سنگین از لجن فعال

تیمار	فواید	نقایص
اسیدی کردن	انحلال و حذف فلزات	افزایش هزینه تصفیه پساب
اضافه کردن آهن	حذف فلزات سمی سنگین	ایجاد خاصیت آب‌گریزی، آلودگی ثانویه
اگزالیک اسید	انحلال آهن	خروج مواد غذایی دیگر
	افزایش استحکام لجن	
باکتری‌ها و قارچهای فعال	حذف فلزات سنگین‌سمی، ذخیره‌نیتروژن و فسفر، حذف میکروارگانیسم‌های پاتوژن	

جدول ۱ با مقایسه روش‌های مورد استفاده برای حذف فلزات سنگین از لجن فعال، اهمیت استفاده از میکروارگانیسم‌ها را برای این منظور نشان می‌دهد.

مواد و روشها

در این مطالعه، باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس که در استخراج فلزات و صنعت تصفیه پساب دارای اهمیت است، از برخی مناطق کشور جداسازی شده و کاربرد آن در استخراج برخی فلزات سنگین مورد مطالعه قرار گرفته است.

نمونه‌ها

نمونه‌ها از محل‌هایی که احتمال وجود این میکروارگانیسم‌ها در آنها وجود داشته باشد تهیه گردید. نمونه‌های آب و خاک از معدن استخراج طلای موته و چشمه آب معدنی سگزی مورد آزمایش قرار گرفت. برای تلقیح نمونه‌های خاک، سوسپانسیون ۷gr/۱۰۰ml از خاک تهیه شد و ۷-۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به ۱۰۰ml محیط کشت مایع تلقیح شد. برای هر کدام از کشت‌های نمونه یک شاهد حاوی محیط کشت و بدون نمونه در نظر گرفته شد تا تغییرات نمونه با شاهد مقایسه شود.

پس از رشد به مدت ۱ ماه در دمای ۳۵°C که در محیط A با ایجاد کدورت و کاهش pH و در محیط‌های B و C با ایجاد رسوبات نارنجی رنگ و با حالت زنگ‌زدگی در کشت نمونه نسبت به شاهد تشخیص داده می‌شد (رسوبات هیدروکسید فریک) از سوسپانسیون شاهد و نمونه به طور جداگانه در محیط‌های جامد کشت داده شد.

محیط‌های کشت مایع

سه نوع محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. محیط واجد گوگرد کلوئیدی به عنوان منبع انرژی (محیط A)، محیط واجد آهن فرو به عنوان منبع انرژی و pH=۲/۷ (محیط B) و محیط کشت واجد آهن فرو به عنوان منبع انرژی و pH=۲ (محیط C).

ترکیبات محیط A شامل ۱۰g/L S، ۳g/L K_2HPO_4، ۰/۳g/L $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵g/L $MgSO_4$، ۰/۲۵g/L $CaCl_2$، ۰/۰۲g/L $FeCl_3$ و pH=۴/۸-۵.

در این محیط کشت، گونه‌های جنس تیوباسیلوس که قادر به اکسیداسیون گوگرد به عنوان تنها منبع انرژی باشند مانند تیوباسیلوس فرواکسیدانس و تیوباسیلوس تیواکسیدانس رشد می‌کنند. ترکیبات محیط B شامل دو محلول بود. محلول اول حاوی ۷H۲O. ۲FeSO۴٪ که با H_2SO_4 نرمال به pH=۲/۷ رسید و محلول دوم حاوی $(NH_4)_2SO_4$ ۰/۰۸g/L٪، KH_2PO_4 ۰/۰۴g/L و $MgSO_4$ ۰/۰۰۸g/L بود. ترکیبات محیط C نیز مانند محیط B اضافه شد، اما pH محلول اول تا ۱/۸ پایین آورده شد [۴].

استریلیزاسیون

محیط A با حرارت مرطوب اتوکلاو استریل گردید. اما محیط‌های B و C به سه صورت تهیه شدند. در حالت اول، هیچکدام از محلول‌ها استریل نشد. در حالت دوم، استریلیزاسیون هر دو محلول به طور جداگانه در حرارت مرطوب اتوکلاو انجام گردید و در حالت سوم، محلول اول با استفاده از فیلتراسیون و محلول دوم در اتوکلاو استریل گردید.

به علت این که در فشار اتوکلاو، آهن فرواکسید شده، رسوبات فریک در محلول ایجاد می‌شد و در صورت استریل نکردن محلول‌ها، تغییر رنگ در شاهد نیز مشاهده می‌گردید، از روش سوم برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت استفاده گردید.

محیط کشت جامد

محیط B با استفاده از ژل آگارز، به میزان ۸ گرم در لیتر، به صورت جامد و بدون استریلیزاسیون تهیه گردید. به علت این که آگار ممکن است برای میکروارگانیسم‌های اتوتروف سمی باشد و در مطالعات قبلی، رشد تیوباسیلوس فرواکسیدانس در محیط کشت آگاردار منفی گزارش شده بود [۵]، در این مطالعه از ژل آگارز برای تهیه محیط کشت جامد استفاده گردید که اثر منفی روی رشد این میکروارگانیسم نداشت.

جدول ۲- تغییر رنگ در محیط‌های کشت B و C بعد از رشد یک‌ماهه در pH=۲/۷

نمونه	تغییر رنگ در کشت نمونه	تغییر رنگ در کشت شاهد
آب معدنی سگزی	+	±
طلای موته	+	±

جدول ۳- تغییر رنگ در محیط‌های کشت B و C بعد از رشد یک‌ماهه در pH=۲

نمونه	تغییر رنگ در کشت نمونه	تغییر رنگ در کشت شاهد
آب معدنی سگزی	+	-
طلای موته	+	-

جدول ۴- تغییر pH در محیط‌های کشت B و C بعد از رشد یک‌ماهه در pH=۲/۷

نمونه	کاهش pH نمونه	کاهش pH شاهد
آب معدنی سگزی	۰/۳	۰/۳
طلای موته	۰/۳	۰/۳۵

جدول ۵- تغییر pH در محیط‌های کشت B و C بعد از رشد یک‌ماهه در pH=۲

نمونه	کاهش pH نمونه	کاهش pH شاهد
آب معدنی سگزی	۰/۱	۰/۱
طلای موته	۰/۱	۰/۱

نتایج

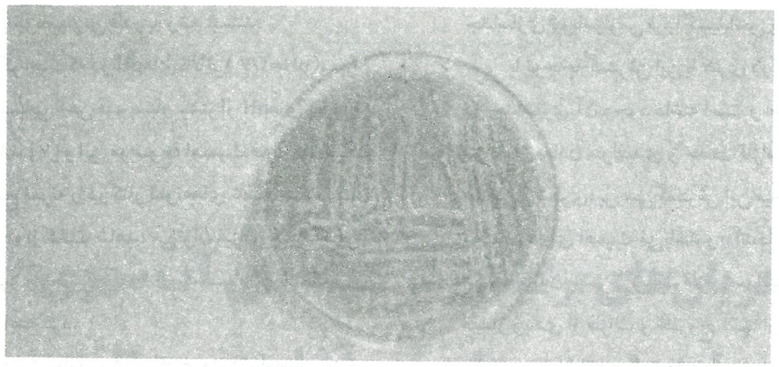
- **ایجاد رسوبات هیدروکسید فریک در محیط مایع:** نتایج ایجاد تغییر رنگ در دو نمونه خاک آب معدنی سگزی و طلای موته بعد از رشد یک‌ماه همراه با هوادهی در جداول ۲ و ۳ آورده شده است.

- **تغییرات pH:** pH اولیه هرکدام از نمونه‌های خاک و آب اندازه گیری شد و در همه نمونه‌ها حدود ۶ بود. پس از کشت، در محیط کشت A کاهش شدید pH مشاهده شد، به طوری که بعد از یک ماه pH به حدود ۲/۵ کاهش پیدا کرد.

در محیط‌های کشت B و C، تغییرات pH اندازه گیری شد و کاهش ناچیزی در pH مشاهده گردید. نتایج بعد از رشد یک‌ماهه همراه با هوادهی در جداول ۴ و ۵ آورده شده است.

- **رشد در محیط کشت جامد:** از هر کدام از نمونه‌ها و شاهدها، کشت در محیط جامد در دمای ۳۵°C تهیه گردید. نتایج رشد با ایجاد رسوبات هیدروکسیدفریک در امتداد خطوط تلقیح مشخص شد (شکل ۱). رشد منفی در نیمه محیط کشت که از شاهد در آن کشت داده شده بود مشاهده گردید و در نیمه‌ای که نمونه در آن کشت داده شده بود، رشد میکروارگانیسم مشاهده شد. این نتایج، موفقیت روش فیلتراسیون برای استریل کردن محیط کشت را نشان می‌دهد.

- **بررسی میکروسکوپی:** در مشاهده مستقیم، تشخیص باکتری‌ها در رسوبات به سختی انجام می‌شد. بنابراین برای تجزیه رسوب، تیمارهایی به کار گرفته شد. محلول رقیق هیدروکلریک اسید و EDTA به اسمیر تهیه شده اضافه گردید و سپس رنگ‌آمیزی انجام گرفت.



شکل ۱- مورفولوژی کلنی تیوباسیلوس فرواکسیدانس در محیط C

جدول ۶- استخراج نیکل و کبالت از سنگ معدن

	درصد نیکل آزاد شده	درصد کبالت آزاد شده
نمونه شاهد	٪۳۰	٪۴۰
نمونه + تیوباسیلوس فرواکسیدانس	٪۸۰	٪۷۰

کوکوباسیل‌های بسیار کوچک دوتایی و تکی که هاله‌هایی در اطراف آنها وجود داشت مشاهده می‌شد. مواد اطراف سلول‌های باکتریایی، احتمالاً رسوبات محلول نشده آهن می‌باشند.

- **استخراج عناصر:** نتایج حاصل از استخراج عناصر توسط این میکروارگانیسم‌ها در جدول ۶ نشان داده شده است.

- **بررسی رشد میکروارگانیسم‌های دیگر در محیط کشت جامد:** آلودگی ناشی از مواد اولیه محیط کشت مشاهده نگردید و از میکروارگانیسم‌های هوا نیز، نوعی قارچ با ظاهر پرزی و رنگ سفید قادر به رشد بر روی این محیط کشت بود.

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که تیوباسیلوس فرواکسیدانس قادر به زندگی در pH=۱-۶ می‌باشد می‌توان این میکروارگانیسم را در محیط‌های مختلف واجد گوگرد یا آهن جستجو کرد [۶].

در این مطالعه نمونه‌هایی از دو ناحیه که احتمال وجود این باکتری در آنها وجود داشت تهیه گردید. همچنین در نمونه‌هایی از آب رودخانه و پساب شهری این باکتری مشاهده نشد.

در دو محیط حاوی گوگرد احیا و آهن فرو رشد این میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت. در محیط اول، کاهش شدید pH پس از رشد میکروارگانیسم‌ها مشاهده گردید که نتیجه اکسیداسیون گوگرد به وسیله تیوباسیلوس فرواکسیدانس و سایر گونه‌های احتمالی جنس تیوباسیلوس می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که علیرغم مطالعات قبلی، در محیطی که در آن گوگرد وجود داشته باشد، نمی‌توان مطمئن بود که تیوباسیلوس فرواکسیدانس جداسازی شده است، زیرا سایر گونه‌های جنس تیوباسیلوس نیز می‌توانند با اکسیداسیون گوگرد به عنوان منبع انرژی رشد نمایند و بنابراین از محیط دوم برای جداسازی این میکروارگانیسم استفاده شد.

در محیط دوم که از جنس تیوباسیلوس، فقط تیوباسیلوس فرواکسیدانس قادر به رشد می‌باشد، کاهش pH ناچیزی مشاهد شد اما رسوبات هیدروکسید فریک به میزان زیاد در محیط ایجاد گردید که نشانه رشد تیوباسیلوس فرواکسیدانس می‌باشد. در این محیط، به علت عدم وجود گوگرد (منبع انرژی)، سایر

گونه‌های جنس تیوباسیلوس قادر به رشد نیستند.

لازم به تذکر است که در pHهای بالاتر (pH=۲/۷)، میزان اکسیداسیون شیمیایی آهن فرو بسیار بیشتر از pHهای پایین‌تر (pH=۲) می‌باشد [۷] و این موضوع، اهمیت قرار دادن یک شاهد بدون تلقیح نمونه را در کنار نمونه‌های تلقیح شده نشان می‌دهد. با استفاده از کشت شاهد، می‌توان میزان اکسیداسیون شیمیایی آهن فرو را تخمین زد و اکسیداسیون در کشت‌های نمونه را با آن مقایسه کرد.

در محیط کشت جامد، رشد باکتری‌ها با ایجاد رسوبات در امتداد خطوط تلقیح مشاهده گردید که در مشاهدات میکروسکوپی نیز رسوبات احتمالی در اطراف جسم باکتری قابل تشخیص بود. استفاده از ژل آگارز برای تهیه این محیط کشت موجب رفع سمیت احتمالی آگار برای این باکتری شد.

به علت این که در محیط کشت مورد استفاده، سایر میکروارگانیسم‌ها به ندرت قادر به رشد هستند و به علت عدم وجود گوگرد در این محیط، رشد سایر گونه‌های جنس تیوباسیلوس نیز متوقف می‌شود، استفاده از این روش برای جداسازی تیوباسیلوس فرواکسیدانس پیشنهاد می‌شود.

با توجه به گسترش این باکتری در کشور ما و مشکلاتی که در جداسازی آن وجود داشته است و اهمیت آن در استخراج فلزات از معادن سولفیدی و حذف فلزات سمی از پساب‌های صنعتی و شهری، بررسی گسترش این میکروارگانیسم در نواحی مختلف دارای اهمیت می‌باشد و با انتخاب گونه‌هایی که قادر به اکسیداسیون بیشتر ترکیبات فلزی سولفیدی و محلول نمودن مقدار زیادی از فلزات و خروج آنها از لجن فعال فاضلاب باشند، می‌توان از این گونه‌ها به طور صنعتی استفاده کرد.

لازم به تذکر است که این باکتری با تولید H_2SO_4 می‌تواند در لوله‌های آهنی و سیمانی، خوردگی ایجاد کند [۸ و ۹] ولی چون باکتری شدیداً اتوتروف و هوازی می‌باشد اهمیت کمتری در خوردگی نسبت به باکتری‌های احیاکننده سولفات دارد. کشت مستقیم آن در فاضلاب شهری و آب رودخانه نشانه عدم وجود این میکروارگانیسم به تعداد فراوان در این نمونه‌ها می‌باشد، در حالی که در نمونه آب معدنی سگزی حتی با کشت مستقیم، باکتری‌های زیادی دیده شده است.

منابع و مراجع

1- Holt, J. G., Kricg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, T. (1994). " *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* ", 9th Edition. John Wiley. U.S.A. 433-447, 451.

2- Starasser, H., Brunner, H., and Schinner, F. (1995). " *Leaching of Iron and Heavy Metals from Anaerobically - Digested Sewage Sludge* ", J. Industrial Microbiol., 14: 281-287.

3- Blais, J.F., Auclair, J.C., and Tyagi, R.D. (1992). " *Cooperation Between Two Thiobacillus Strains for Heavy Metal Removal from Municipal Sludge* ", Can. J. Microbiol., 38:181-187.

4- Madigan, M.T., Martinco, J.M., and Parker, J. (1997). " *Biology of Microorganisms* ", 8th Edition, 163-169, 494-496, 575-580.

5- Atlas, R.M., and Barta, R. (1998). " *Microbial Ecology, Fundamentals and Applications* ", 4th Edition, New york, J.M.D. Ltd, 600-605.

6- Harvey, P.I., and Crundwell, F.K. (1997). " *Growth of Thiobacillus Ferrooxidans* ", A Novel Experiment for Batch Growth and Bacterial Leaching Studies, Appl. Environ. Microbiol., 63: 2586-2592.

7- Garcia, O., Bgham, J.M., and Tuoviner, O.H. (1995). " *Oxidation of Heavy Metals by Thiobacillus Ferrooxidans and Thiobacillus Thiooxidans* ", Can. J. Microbiol., 41:508-514.

8- Lawrence, J.R., Kwong, Y. T.Y., and Swerhone, G.D.W. (1997). " *Clonization and Weathering of Natural Sulfide Mineral Assemblages by Thiobacillus Ferrooxidans* ", Can. J. Microbiol., 43: 178-188.

9- Olsson, G.L. (1995). " *Microbial Corrosion by Thiobacillus Ferrooxidans* ", J. Industrial Microbiol., 14: 420-423.