

تولید کنسرسیوم میکروبی با استفاده از جهش‌زایی القایی ناشی از پرتو، جهت استخراج

بهبتر در روش بیولیچینگ از کانسنگ‌های فلزی

INC29-1105

محمدعلی شفائی^{۱*}، بهنام مزرعه آقابزرگی^۱، محمد اسلامی کلانتری^۱، سید محمد مشتاقیون^۲

۱. دانشکده فیزیک، دانشگاه یزد، یزد-ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد-ایران

چکیده:

در معادن مس بعد از جداسازی اکسید مس به کمک عملیات لیچینگ از سنگ معدن آن، معمولاً ضایعات باقیمانده دارای غلظت کم سولفور مس است که صرفه اقتصادی برای جداسازی آن وجود ندارد. به کمک عملیات فراوری بیولیچینگ می‌توان این باقیمانده مس را از پسماندها جداسازی نمود. باکتری‌های موجود بیولیچینگ به‌شدت به محیط رشدی وابسته هستند و با تغییرات غلظت آرسنیک، اسیدیته و آلودگی نفتی جمعیت فعالشان کاهش پیدا می‌کند و حتی جمعیت باکتری با افزایش غلظت آرسنیک و یا آلودگی نفتی به نزدیک صفر هم می‌رسد. از طرفی باکتری‌های مورد استفاده در هر منطقه معدنی مختص همان محل است. به‌منظور سازگاری با محیط‌های معدنی جدید نیاز به صرف هزینه و چندین ماه زمان است. در این تحقیق از طریق جهش‌زایی پرتوی نسلی از باکتری لیچینگ را تولید کرده‌ایم که علاوه بر مقاوم بودن به تغییرات اسیدیته، سمیت آرسنیک و آلودگی نفتی، قدرت سازگاری بالایی نیز دارد. به‌گونه‌ای که در محیط‌های رشدی جدید و یا شرایط مکانی جدید به‌سرعت سازگار شده و زمان این سازگاری، حتی کمتر از چند روز است. حاصل این پروژه منجر به ثبت اختراع با کد شناسه C22B 3/18; CO2F 1/38; C22B 11/00 شده است.

کلیدواژه‌ها: باکتری، بیولیچینگ، آرسنیک، اسیدیته، جهش‌زایی، ضایعات، معدن

Production of microbial consortium using radiation induced mutagenesis for better extraction in bioleaching method from metal ores

M.A.Shafaei^{1*}, B.M. Aghabozorgi¹, M. Eslami-Kalantari¹; S. M. Moshtaghioun²;

Physics Department, Yazd University, Yazd, Iran.

Biology Department, Yazd University, Yazd, Iran

Abstract:

After separating copper oxide from its ore using a leaching operation, the remaining waste in copper mines typically has a low concentration of copper sulfur, which is not economically separated. This copper residue can be separated from waste using the bioleaching process. Bioleaching bacteria are highly dependent on their growth environment, and changes in arsenic concentration, acidity, and oil pollution reduce their active population, and with an increase in arsenic concentration or oil pollution, the bacterial population approaches zero. However, the bacteria used in each mining area are unique to that location. It is necessary to spend money and several months of time in order to adapt to new mining environments. In this study, we used radiation mutagenesis to create a generation of leaching bacteria that is not only resistant to changes in acidity, arsenic toxicity, and oil pollution, but also highly adaptable. In such a way that it quickly adapts to new growth environments or new location conditions, with adaptation taking only a few days. This project resulted in the issuance of a patent with the identification code C22B 3/18; CO2F 1/38; C22B 11/00.

Keywords: Bacteria, Bioleaching, Arsenic, Acidity, Mutagenesis, Waste, Mining

۱. مقدمه

دستیابی به این کنسرسیوم میکروبی در قالب دو پایان‌نامه کارشناسی ارشد و تحقیقات موازی آن محقق شده است [۱،۲]. لازم به ذکر است که تنها سازگار کردن باکتری لیچینگ یک معدن به معدن دیگر یک پروژه وقت‌گیر و چندماهه در میان پروژه‌های فراوری معدنی است که طی آن به تدریج تغییر شرایط محیط پایه به محیط جدید صورت می‌گیرد. درحالی‌که باکتری لیچینگ تولیدی ما در بعضی از موارد در کمتر از یک روز به توانایی تولید و تکثیر در محیط جدید می‌رسد. در روش معمول بیولیچینگ که در اکثر مراکز فراوری مس متداول است، نخست حوضچه‌های بزرگ که ظرفیت گنجایش چند ده تن کانسنگ را دارند، پر می‌کنند. این کانسنگ‌ها شامل: سولفور مس با غلظت بالا، مس با عیار کم یا باطله‌های معدنی می‌باشند. مرحله بعد محلولی که شامل باکتری و مواد متناسب با رشد آن است بر روی کانی‌های داخل حوضچه پاشیده می‌شود. در یک فرآیند زمانی معین (حوالی یک ماه) شروع به برداشت مس آزاد شده از درون حوضچه می‌کنند. مس آزاد شده از سولفور مس و یا کانی کم‌عیار مس به مرحله بعد (مشهور به مرحله 1 PLS) منتقل می‌شود. این مرحله با افزودن مواد آلی نظیر نفت جهت جدا شدن مس از محلول و رسیدن به غلظت مناسب برای الکترولیز کردن انجام می‌شود، و در نهایت توسط فرآیند الکترولیز ورقه‌های مس تهیه می‌گردد. به‌طور معمول فرآیند PLS باعث از بین رفتن باکتری و یا کاهش قدرت عمل آن‌ها در آزادسازی مس از کانی‌ها می‌شود، لذا از این محلول باقی‌مانده نمی‌توان دوباره در بیولیچینگ‌های بعدی استفاده کرد. در نتیجه برای حوضچه بعدی باید باکتری‌های ذخیره موجود در آزمایشگاه معدن را دوباره تکثیر و برای فرآیند بیولیچینگ بعدی آماده کرد [۳-۶].

۲. روش کار

در این تحقیق از باکتری‌هایی که در معادن مس کرمان^۱ استفاده می‌شده است، به‌عنوان باکتری‌های اولیه و یا شاهد استفاده شده است. از این باکتری‌ها (اولیه)، با استفاده از جهش‌زایی القایی ناشی از پرتو نسل جدیدی از باکتری‌ها به وجود آورده و عملکرد باکتری‌های نسل جدید در شرایط مختلف نسبت به باکتری‌های اولیه مقایسه شده است. جهت پرتودهی از دو نوع پرتو فرابنفش و پرتوگاما استفاده شده است. در نهایت با استفاده از فرآیند جهش‌زایی پرتویی از طریق پرتودهی چشمه پرتوزای ^{137}Cs با فعالیت ۳/۹ میکروکوری [۱۰] و انتخاب مصنوعی، نسلی از باکتری لیچینگ را تولید کرده‌ایم که در محیط‌های رشدی جدید و یا شرایط مکانی جدید به سرعت سازگار شده و زمان این سازگاری، حتی کمتر از چند روز است. حاصل این تحقیق و تحقیقات بعدی منجر به ثبت اختراع تحت عنوان؛ کنسرسیوم میکروبی مقاوم و قدرتمند با استفاده از جهش‌زایی القایی ناشی از پرتو، جهت استخراج به روش بیولیچینگ از کانسنگ‌های فلزی، به شماره و تاریخ ثبت اختراع ۱۰۳۰۷۰، ۱۳۹۹/۰۹/۸ شده است. با توجه به مطالعات انجام گرفته و مراجع [۱۰، ۱۱، ۱۲] پرتو گاما برای ایجاد جهش انتخاب شد.

"از این به بعد، باکتری‌های اولیه باکتری شاهد و باکتری نسل جدید به وجود آمده باکتری‌های تولیدشده نامیده می‌شوند."

آزمایش‌هایی که بر روی باکتری‌های تولیدی انجام شده و در نهایت با باکتری‌های شاهد مقایسه شده‌اند به ترتیب زیر است:

✓ بررسی سرعت رشد و تکثیر جمعیتی

✓ بررسی تأثیر تغییرات دمایی بر رشد جمعیتی

برای تعیین جمعیت باکتری‌ها از میکروسکوپ نوری و لام نئوبار استفاده شد. یک شبکه کامل در لام نئوبار شامل ۹ مربع است که هر کدام ۱ میلی‌متر مربع است، ناحیه شمارش مرکزی لام شامل ۲۵ مربع بزرگ است و هر مربع بزرگ دارای ۱۶ مربع کوچک‌تر است. لام و لامل را چنان دقیق و ماهرانه ساخته‌اند به‌طوری‌که وقتی لامل روی لام قرار می‌گیرد دقیقاً

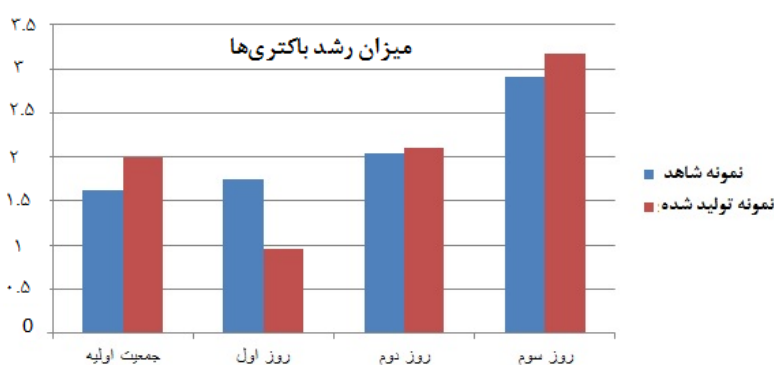
¹ Pregnant Leach Solution (PLS).

ارتفاع لام تا لامل ۰.۱ میلی‌متر می‌شود. بنابراین حجم واقع در مربع بزرگ برابر است با ۰.۰۰۰۴ میلی‌متر مکعب که برای شمارش به‌صورت تصادفی تعداد باکتری‌ها در ۶ خانه مورد شمارش قرار گرفت. ابتدا در ۶ ارلن به میزان یکسان (۱۵ CC) باکتری کشت داده شد، سپس سه عدد از ارلن‌ها برای جهش و بقیه برای شاهد انتخاب شدند. قبل از پرتودهی غلظت باکتری‌ها در نمونه‌ها محاسبه شد که به‌صورت انتخابی ارلن‌های ۳ و ۶ انتخاب شدند. غلظت باکتری‌ها به ترتیب در ارلن‌های ۳ و ۶ برابر $10^6 \times 16,88 \text{ N/ml}$ و $10^6 \times 11,88 \text{ N/ml}$ بودند. پرتودهی باکتری‌ها در مدت معین و در فاصله بهینه انجام شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها مورد شمارش قرار گرفتند تا میزان مرگ‌ومیر باکتری‌های پرتوتابی شده به دست آید.

۳. نتایج

۳.۱. بررسی سرعت رشد و تکثیر جمعیتی

برای بررسی سرعت رشد و تکثیر باکتری، نخست جمعیت سه نمونه از باکتری‌های شاهد شمارش شد و این شمارش تا سه روز بعد ادامه یافت. در شکل ۱ نمودار میله‌ای رشد جمعیت‌های شمارش‌شده در هر روز و وضعیت میزان رشد جمعیتی آن‌ها (شاهد و تولیدشده) را نشان داده شده است، همان‌طور که در شکل نشان داده‌شده محور عمودی جمعیت باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر ($10^7 \times$ شمارش) و محور افقی روزهای شمارش باکتری را نشان می‌دهد. باکتری‌ها به ترتیب در روز اول ۷، روز دوم ۱۷ و در روز سوم ۴۳ درصد رشد داشته‌اند.



شکل ۱. رشد جمعیتی باکتری‌های شاهد و تولید شده

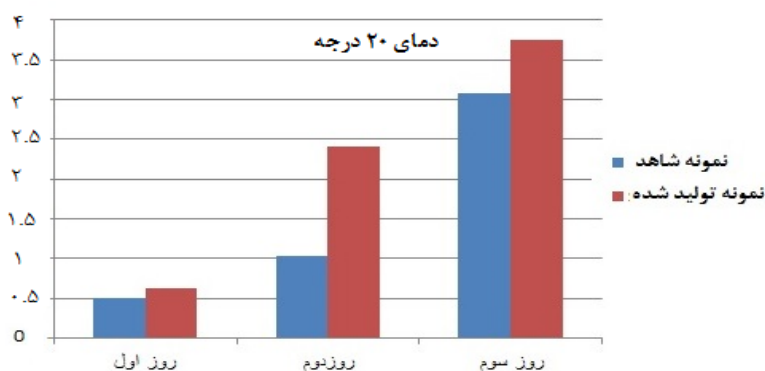
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در روز اول باکتری‌های تولیدشده هنگامی که در محیط کشت قرار داده شده‌اند "به واسطه استرس فیزیکی ناشی از پرتوتابی" با کاهش شدید جمعیتی مواجه هستیم ولی به‌سرعت خودشان را با شرایط جدید انطباق داده و سریعاً به رشد جمعیتی خودشان ادامه داده‌اند. در روز دوم افزایش دو برابری جمعیت مشاهده می‌شود و این خود یکی دیگر از مزایایی این باکتری‌ها است که قدرت انطباق خیلی زیادی در محیط‌های جدید از خودشان نشان می‌دهند.

۳.۲. تأثیر تغییرات دمایی بر رشد جمعیتی باکتری‌های تولیدی و شاهد

دمای مناسب برای رشد باکتری‌های بیولیچینگ حوالی ۴۰ درجه سانتی‌گراد است، برای اینکه باکتری‌ها بتوانند در دمای پایین عملیات بیولیچینگ را انجام دهند آن‌ها را با کاهش دمای تدریجی با شرایط دمای پایین سازگار می‌کنند. در این تحقیق باکتری‌ها در سه دمای مختلف قرار گرفته و وضعیت رشد جمعیتی آن‌ها بررسی شد. در شکل‌های ۲ تا ۴ وضعیت آهنگ رشد باکتری‌های تولیدی با باکتری‌های شاهد در دماهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد مقایسه شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود در هر دو گروه باکتری‌ها قدرت انطباق با دما را دارند. علت افزایش رشد باکتری‌ها در روزهای دوم و سوم نسبت به باکتری تولیدشده در دمای ۴۰ درجه منطبق بودن دما و محیط کشت بر اساس سازگار بودن با باکتری اولیه یا شاهد است.

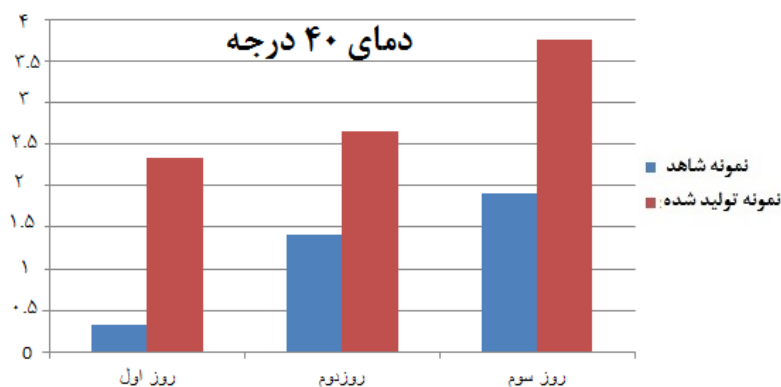
همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، باکتری تولیدشده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به رشد خود ادامه داده است، کاهش جمعیتی‌شان در روز سوم می‌تواند در اثر کمبود غذا در آن جمعیت بالا باشد. اما در نمونه شاهد در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نخست افت جمعیتی مشاهده می‌شود، که به‌مرور زمان ولی با سرعت کم جمعیتشان افزایش می‌یابد.



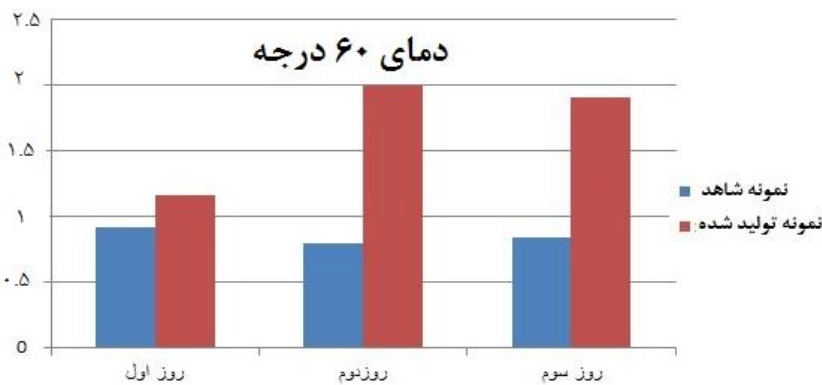
شکل ۲. رشد جمعیتی باکتری‌های شاهد و تولید شده در دمای ۲۰ درجه



شکل ۳. رشد جمعیتی باکتری‌های شاهد و تولید شده در دمای ۲۵ درجه



شکل ۴. رشد جمعیتی باکتری‌های شاهد و تولید شده در دمای ۴۰ درجه



شکل ۵. رشد جمعیتی باکتری‌های شاهد و تولید شده در دمای ۶۰ درجه

۴. پیشنهاد

مزیت مهم باکتری‌های تولیدشده قدرت انطباق یا سازگاری با محیط‌های جدید است. این قدرت انطباق یا سازگاری با محیط جدید را در کمتر از چند روز به دست می‌آورند، در صورتی که باکتری‌های شاهد جهت سازگاری به محیط و شرایط جدید حداقل یک ماه و یا بیشتر زمان نیاز دارند. باکتری‌های تولیدشده تحمل بالایی در مقایسه با باکتری‌های شاهد نسبت به تغییرات دمایی داشتند. تحقیق و بررسی‌های بعدی در مورد تحمل‌پذیری باکتری‌ها نسبت به تغییرات اسیدیته و سمیت آرسنیک بوده است، و در نهایت علاوه بر این در مورد قدرت بازبایی مس از سولفور مس برای باکتری‌های تولیدشده که دارای رشد جمعیتی بالاتر نسبت به باکتری شاهد هم تحقیقاتی انجام شده است.

مراجع

- [1] Z. Tamizhi ; M.A. Shafaei and S.M. Moshtaghiuon; Comparing the effect of ultraviolet and gamma rays on the bioleaching process.; Iran Nuclear Conference, Iran Nuclear Association, Yazd University, 2013 (In Persian)
- [2] B.Mezrae Agha Bozurgi; M. A. Shafai; M. Islami Kalantari; S. M. Mushtaqyoun; Isolation of microbial consortium for bioleaching with the help of gamma ray mutagenesis; Yazd University; February, 2019(In Persian)
- [3] R. Kirkoudi; H.R. Dehghan; H. Naderi; S. M. Qadirnjad,; Column bioleaching of low-grade ore from Midok copper mine with the aim of industrial development; The first international conference on new findings in biotechnology, COI article code BIOTECH01_110, 2016. (In Persian)
- [4] M.R. Samadzadeh Yazdi; M. Abdulahi; S. M. Mousavi; A. Khudadadi; Investigation of bioleaching of chalcopryrite concentrate from field copper ore using thermophilic bacteria Acidianus brierli in a vibrating container, Journal of Separation Sciences and Engineering, Volume 6, Vol. 2, pp. 31-44, 2013.(In Persian)
- [5] H. Rafii Kirkoudi; R. Dehghan; H. Naderi; L. Ebrahimi; Bioleaching of low-grade sulfide ore from Midok copper mine using native mesophilic bacteria; The first international conference on new findings in biotechnology, COI code of article BIOTECH01_103, 2016.(In Persian)
- [6] A. Ahmadi; M. Shafii; Z. Manafi; M. Ranjbar; Optimization of bioleaching of copper from chalcopryrite concentrate using mixed culture of temperate thermophilic bacteria; Journal of Separation Sciences and Engineering, Volume 2, Vol. 1, pp. 23-35, 2019.(In Persian)
- [7] Samadadeh yazdi M. R.; Abdollay, M.; Mousavi, M.; Khodadai A.; “Comparison of copper dissolution in chalcopryrite concentrate bioleaching with acidianus brierleyi in different initial ph values”, Journal of mining and environment, 11(3), 753-764 (No: 22729), 2020.
- [8] R. Dehghan.; M. Dianati,; The effects of Pb-Zn flotation reagents on the bioleaching process by mesophilic bacteria, International Journal of Mineral Processing 143, 80-86, 2015.
- [9] K. R. Tindall, J. Stein, and F. Hutchinson.; Changes in dna base sequence induced by gamma-ray mutagenesis of lambda phage and prophage. Volume 118, pages 551–560. Genetics Soc America, 1988.
- [10] Z. Tamizhi; M.A. Shafaei; S.M. Moshtaghiuon; Comparison of the effect of ultraviolet and gamma rays on arsenic tolerance in the bioleaching process, Journal of Radiation Measurement and Safety, Volume 5, Number 4, Page 1-6, Fall 2016.(In Persian)
- [11] H. R .Shahmohammadi, E. Asgarani, Hiroaki Terato, Hiroshi Ide, and OSAMU Yamamoto. Effects of 60 co gamma-rays, ultraviolet light, and mitomycin c on halobacterium salinarium and thiobacillus intermedius. Volume 38, pages 37–43. OUP, 1997.