J. of Nucl Sci. and Tech.
77, 2016, 9-17

مجله‌ی علوم و فنون هسته‌ای
۷۷، ۱۳۹۵، ۹-۱۷

پایش عملکرد باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* مورد استفاده در فروشویی زیستی اورانیم پس از نگه‌داری در دماهای پایین

فائزه فاطمی*، سمانه جهانی، محمدعلی فیروززارع
پژوهشکده‌ی چرخه‌ی سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۸۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران ـ ایران

چکیده: گونه‌های جنس *اسیدیتیو باسیلوس (Acidithiobacillus)* در فرایند فروشویی زیستی فلزهای مختلف از جمله اورانیم، مس، نیکل استفاده می‌شود. هدف از این بررسی، تدوین روش مناسب برای نگه‌داری باکتری‌های بومی جداسازی شده دخیل در فروشویی زیستی اورانیم با امکانات قابل دسترس است. در این پژوهش، باکتری‌های دخیل در فروشویی زیستی اورانیم موجود در آزمایشگاه بیولیچینگ سازمان انرژی اتمی ایران پس از کشت و اطمینان از خالص بودن، در دماهای ۴ و ۸۰°C- نگه‌داری شدند. آن‌گاه، بعد از گذشت ۶ ماه از زمان نگه‌داری، باکتری‌ها از نظر تغییر pH، Eh، رشد و ویژگی‌های بیوشیمیایی بررسی، و با زمان قبل از نگه‌داری مقایسه شدند. نتایج به دست آمده از این پژوهش حاکی از آن است که نگه‌داری باکتری‌ها در این مدت و در این دماها، هیچ‌گونه اثری بر روی ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها نگذاشته است. به علاوه، منحنی‌های به دست آمده از روندهای تغییر pH، Eh و رشد باکتری‌های مورد نظر، تغییر معنی‌داری در زمان قبل و بعد از نگه‌داری نشان ندادند. این نتیجه بیان‌کننده‌ی آن است که نگه‌داری باکتری‌های بومی در دماهای ۴ و ۸۰°C-، عملکرد مؤثر آنها را حفظ می‌کند و باکتری‌ها پس از ۶ ماه توانایی استفاده‌ی مؤثر در فرایند فروشویی زیستی را هم‌چنان دارند.

کلیدواژه‌ها: ***اسیدیتیو باسیلوس، فروشویی زیستی، نگه‌داری، اورانیم، فعالیت باکتری***

Following up of the Function of *Acidithiodabacillus Ferrooxidans* and *Acidithiobacillus Thiooxidans* Involved in Uranium Bioleaching After Preservation at Low Temperatures

F. Fatemi*, S. Jahani, M.A. Firooz-e-Zare
Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 11365-8486, Tehran – Iran

Abstract: *Acidithiobacillus* species is used in bioleaching process of metals such as uranium, copper, nickel. The purpose of this study was to develop an effective protocol using facilities available for preservation of isolated native bacteria involved in uranium bioleaching. In this study, the bacteria involved in uranium bioleaching AEOI Laboratory were cultured, purified and stored at 4 and -80°C. Then, variation of pH, Eh, growth and biochemical characteristics were examined after 6 months of storage and compared with the bacteria before using the preservation methods. The results indicated that the preservation of the bacteria within 6 months at selective temperatures did not have any effect on the biochemical characteristics of the bacteria. In addition, no significant changes were observed in the variation of pH, Eh and growth of bacteria, before and after the preservations. The results suggested that 6 months preservations of native bacteria at 4 and -80°C, had no effect on the ability of bacteria in bioleaching process.

Keywords: ***Acidithiodabacillus, Bioleaching, Preservation, Uranium, Bacterial Function***

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۹/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۳/۳۰

*email: ffatemi@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در بیواکسیداسیون مواد معدنی، آنهایی هستند که مسئول تولید آهن فریک و اسیدسولفوریک مورد نیاز برای واکنش‌های فروشویی زیستی هستند. این باکتری-های شیمیولیتوتروف، اکسیدکننده‌ی آهن و گوگرد هستند و بدون توجه به نوع فرایند یا دمای به کار گرفته شده، ویژگی‌های مشترکی دارند که آنها را به طور ویژه برای نقش‌شان در انحلال مواد معدنی، مناسب می‌سازند. این دسته از باکتری‌ها با تثبیت CO_2 اتمسفر رشد می‌کنند. به علاوه، انرژی خود را از الکترون-دهنده‌های آهن فِرو یا ترکیب‌های گوگردی غیرمعدنی احیا شده (برخی با استفاده از هر دو) به دست می‌آورند و از الکترون-پذیرنده‌ی اکسیژن استفاده می‌کنند. هم‌چنین، اسیددوست بوده و به طور قابل‌توجهی به محدوده‌ی وسیعی از یون‌های فلزی مقاوم هستند [۱].

مهم‌ترین باکتری‌های دخیل در فروشویی زیستی اورانیم، باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس*، *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* و *لپتوسپریلوم فرواکسیدانس* هستند [۲]. حفظ عملکرد و قابلیت اُکسایش این باکتری‌ها در فرایند فروشویی زیستی مهم و ضروری است که به این منظور باکتری‌ها باید در شرایط مناسب نگه‌داری شوند. به علاوه، تکنیک‌های نگه‌داری میکروارگانیسم‌ها مانند پلی محسوب می‌شوند که ارتباط بین نسل‌های قدیم و جدید دانشمندان را از طریق نگه‌داری و توزیع سویه‌های میکروبی، امکان‌پذیر، و از این نظر، ادامه‌ی روند پژوهش دانشمندان گذشته را بر روی سویه‌های میکروبی ممکن می‌سازند. براساس پژوهش‌ها و مطالعات انجام شده در زمینه‌ی نگه‌داری میکروارگانیسم‌ها، چندین روش برای نگه‌داری آنها وجود دارد که شامل کشت‌های دوباره‌ی متوالی[۱] و نگه‌داری در دمای اتاق[۲]، کشت‌های مجدد متوالی و نگه‌داری در یخچال یا اتاق‌های خنک، نگه‌داری در روغن‌های معدنی[۳]، روش انجماد خشک[۴] و انجماد[۵] (نیتروژن مایع و دمای $-80^\circ C$) هستند [۳]. لازم به توضیح است که در روش انجماد خشک، باکتری‌ها در شرایط خلأ به صورت پودر درمی‌آیند و در آمپول‌های مخصوص نگه‌داری می‌شوند در حالی که در روش انجماد، باکتری‌ها در محیط کشت مایع با استفاده از یک ماده‌ی محافظ در دمای پایین نگه‌داری می‌شوند [۳].

باکتری‌های موجود در آزمایشگاه فراوری میکروبی سازمان انرژی اتمی شامل باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* جدا شده از مناطق بومی ایران هستند. باکتری‌های مذکور با چگالی پالپ‌های مختلف (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵٪) از پودر سنگ معدن اورانیم ساغند یزد سازگار شده‌اند و از آن‌جا که دارای قابلیت خوبی در فرایند فروشویی زیستی اورانیم هستند، از ارزش زیادی برخوردارند. با توجه به صرف زمان و هزینه‌ی طولانی در جداسازی این میکروارگانیسم‌ها، تدوین روش نگه‌داری علمی و قابل دسترس که باعث عدم کاهش بازده‌ی مؤثر آن‌ها شود، بسیار ضروری است. هم‌چنین عدم تحقق این مهم، پژوهش‌های مؤثر در بهینه‌سازی فرایند را دچار چالش می‌کند.

مطالعات انجام شده در رابطه با روش‌های نگه‌داری این باکتری‌ها بیان می‌کنند که از میان ۵ روش متداول نگه‌داری میکروارگانیسم‌ها که در بالا بیان شد، این باکتری‌ها قابلیت خشک شدن انجمادی[۶] را ندارند [۴]، در نتیجه از این روش نمی‌توان برای نگه‌داری آنها استفاده کرد. هم‌چنین، با توجه به ویژگی‌های بیولوژیکی باکتری‌های موردنظر و نیاز به نگه‌داری این میکروارگانیسم‌ها در مدت زمان طولانی، نگه‌داری آن‌ها در دمای اتاق از لحاظ علمی قابل انجام نیست [۳]. در نتیجه، با توجه به امکانات موجود، در این پژوهش، میکروارگانیسم‌ها در دمای ۴ و $-80^\circ C$ نگه‌داری، و سپس بررسی شده‌اند. هم‌چنین، به منظور دست‌یابی و انتخاب بهترین روش موجود، نتایج به دست آمده در دو روش منتخب، از نظر آماری و به صورت کاملاً علمی مقایسه شده‌اند.

۲. مواد و روش‌ها

در این پروژه، ویژگی‌های بیوشیمیایی، رشد، تغییر pH و Eh دو گونه از مهم‌ترین باکتری‌های سازگار شده با ۱۲/۵٪ پودرسنگ معدن اورانیم، در شرایط مختلف نگه‌داری و پس از گذشت ۶ ماه، بررسی شدند. این دو باکتری، از چشمه‌های گوگردی رامسر جدا و با روش‌های بیولوژیکی شناسایی شدند. *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* شناسایی شده، گرم منفی، مزوفیل و اسیددوست، و جزء گاما پروتئوباکتری‌ها هستند [۵].

۱.۲ کشت باکتری‌ها

به منظور نگه‌داری باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس*، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت مایع اختصاصی خود کشت داده شدند. برای کشت باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* از محیط کشت اختصاصی 9k شامل: $(NH_4)_2SO_4$ ۳g، K_2HPO_4 ۰٫۵g، $MgSO_4.7H_2O$ ۰٫۵g و KCl ۰٫۱ g، $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ ۰٫۰۱g و $FeSO_4.7H_2O$ ۴۴٫۷g در 1l آب مقطر استفاده شد [۶]. محیط کشت مورد استفاده برای باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس*، از نوع استارکی[۷] شامل: $(NH_4)_2SO_4$ ۳g، KH_2PO_4 ۳g، $MgSO_4.7H_2O$ ۰٫۵g و $CaCl_2.2H_2O$ ۰٫۲۵ g و ۱۰ g گوگرد در 1l آب مقطر است [۷]. پس از آماده‌سازی محیط‌های کشت، pH آنها با اسید سولفوریک ۱۰ نرمال بر روی ۲ تنظیم شد. سپس، به میزان ۱۰٪ از مایه‌ی تلقیح به آنها افزوده، و در دور هم‌زن ۱۸۰rpm و دمای ۳۰°C گرماگذاری شدند. پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع(غلظت سلولی 1.5×10^8)، به منظور اطمینان از خالص بودن باکتری‌ها، خالص‌سازی با استفاده از محیط کشت جامد مخصوص هر باکتری انجام شد.

۲.۲ بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها

پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی، باکتری‌ها از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی بررسی شدند. تست‌های بیوشیمیایی که برای آن‌ها در نظر گرفته شد شامل اکسیداز، کاتالاز، مصرف سیترات، تولید سولفید هیدروژن، هیدرولیز نشاسته، اوره آز، MR و VP هستند [۸].

۳.۲ بررسی عملکرد و رشد باکتری‌ها

در این مرحله از پژوهش، باکتری‌ها از نظر رشد، تغییر pH و Eh بررسی شدند. محیط کشت مایع اختصاصی هر باکتری آماده‌سازی شد. به میزان ۹۰ml از محیط کشت در داخل ارلن-های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱۰ml از باکتری موردنظر به صورت مایه‌ی تلقیح به آنها افزوده و در انکوباتور دارای لرزاننده با دور هم‌زن ۱۸۰ rpm و دمای ۳۰°C گرماگذاری شد. در توالی های ۲۴h، شمارش جمعیت باکتری‌ها با لام نئوبار بررسی و ثبت شد. هم‌چنین، میزان تغییر pH و Eh نیز در توالی‌های ۲۴h با دستگاه pHسنج و Ehسنج (Metrohm826) اندازه‌گیری و ثبت شد. در نهایت، با توجه به اعداد به دست آمده، منحنی رشد و تغییر pH و Eh این باکتری‌ها رسم شد [۹].

۴.۲ نگه‌داری باکتری‌ها

با توجه به مطالعات انجام شده و امکانات در دسترس، و هم‌چنین به منظور مقایسه دو روش نگه‌داری، باکتری‌ها در دمای ۴ و ۸۰°C- نگه‌داری شدند. به این صورت که باکتری‌ها داخل محیط کشت مایع در دمای ۴°C قرار گرفتند [۳]. برای نگه‌داری باکتری‌ها در دمای ۸۰°C-، از ۲۵٪ گلیسیرین به صورت عامل محافظت‌کننده در مقابل سرما استفاده شد. باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* در محیط کشت 9k و باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در محیط استارکی در دمای ۳۰°C و دور هم‌زن ۱۸۰rpm به مدت ۴۸h گرماگذاری، و در انتهای مراحل رشد لگاریتمی که با توجه به منحنی رشد رسم شده برای باکتری‌ها به دست آمده بود، برداشته شدند. آن‌گاه به منظور جداسازی ذرات رسوب آهن و گوگرد، با دور ۱۸۰rpm سانتریفیوژ، و از کاغذ صافی عبور داده شدند. بعد از فیلتراسیون، سلول‌ها دوباره با دور ۱۰۰۰rpm به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شدند. در ادامه، سلول‌ها برداشته، و با آب مقطری که pH آن روی ۲ تنظیم شده بود دوبار شسته شدند. به نسبت ۲۵٪، گلیسیرین استریل به سوسپانسیون حاوی باکتری افزوده، و با هم ترکیب شد. سپس، در داخل لوله‌های مخصوص ۵ میلی‌لیتری مقاوم در برابر سرما توزیع شدند. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۳۵ min در دمای ۴°C (یخچال)، سپس به مدت ۳۰ تا ۳۵ min در دمای ۲۰°C- (فریزر)، و نهایتاً در دمای ۸۰°C- (فریزر) ذخیره شدند [۳].

پس از گذشت ۶ ماه از نگه‌داری باکتری‌ها در دمای ۸۰- و ۴°C، باکتری‌های موردنظر، بررسی شدند. به این صورت که باکتری‌ها احیا شدند، و عملکرد آن‌ها با زمان قبل از نگه‌داری، با انجام تمامی این آزمایش‌ها مقایسه شدند.

۵.۲ احیای باکتری‌های منجمد

برای انجام فرایند احیا، ابتدا نمونه‌های منجمد در حمام آب ۳۷°C قرار داده شدند. بعد از ذوب شدن کامل، از نمونه‌ها با

استفاده از فیلدوپلاتین استریل در زیر هود میکروبیولوژی مقداری برداشته، و به محیط کشت تازه افزوده شد. سپس، این محیط کشت در دمای ۳۰°C و دور همزن ۱۸۰rpm گرماگذاری شد.

۶.۲ مقایسه‌ی باکتری‌ها

بعد از رشد کامل باکتری‌ها در محیط‌های کشت اختصاصی خود، برای تمام باکتری‌ها تست‌های بیوشیمی تکرار، و منحنی رشد و تغییر pH و Eh آنها رسم شد. در نهایت، نتایج به دست آمده از این تست‌ها با نتایج به دست آمده در ۶ ماه قبل (زمان قبل از نگه‌داری) مقایسه شد.

۷.۲ آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها به منظور اطمینان از نتایج، ۳ بار تکرار شدند. تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست ANOVA تعیین شد. با استفاده از این نرم‌افزار، P-value و نیز میانگین (SE) داده‌ها محاسبه، و P<۰/۰۵ مبنای تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳ کشت باکتری‌ها

بعد از گذشت ۴۸h از انکوباسیون، نشانه‌های رشد باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس*، به وضوح قابل مشاهده بود. هم‌چنین باکتری‌ها پس از گذشت ۶ الی ۷d بر روی محیط کشت جامد رشد کردند و کلنی‌های خالص از باکتری‌های موردنظر به دست آمد.

۲.۳ بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی

نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C- در جدول ۱ قابل مشاهده است. تست‌های بیوشیمیایی باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* در زمان قبل از نگه‌داری نشان داد که این باکتری، کاتالاز منفی و اکسیداز مثبت است. هم‌چنین، این باکتری قادر به تجزیه‌ی نشاسته، تولید سولفید هیدروژن و مصرف سیترات است. در مورد باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس*، مشخص شد که این باکتری کاتالاز منفی، اکسیداز مثبت و قادر به تولید سولفید هیدروژن است. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از تست‌های بیوشیمیایی هر دو باکتری در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-، حاکی از آن است که هیچ‌گونه تغییری در ویژگی‌های بیوشیمیایی این باکتری‌ها بعد از نگه‌داری به مدت ۶ ماه مشاهده نشده است (جدول ۱). نتایج به دست آمده از این تست‌ها تأییدی بر یافته‌های زِنگ در سال ۲۰۱۰ است که یکی از بهترین روش‌های نگه‌داری طولانی‌مدت با حفظ ویژگی‌های باکتری‌ها را نگه‌داری در دمای ۸۰°C- و نگه‌داری کوتاه‌مدت در یخچال (۴°C) گزارش کرده است [۱۰]. به علاوه، مازو در سال ۱۹۷۰ بیان کرد که دماهای پایین (۷۲- تا ۸۰°C-) بهترین شرایط برای نگه‌داری باکتری‌ها هستند، زیرا در این دماها، سرعت واکنش‌های آنزیمی، در نتیجه‌ی کم شدن حرکت مولکول‌ها کاهش می‌یابد، و بنابراین آسیب سلولی حاصل از تشکیل بلورها محدود خواهد شد [۱۱].

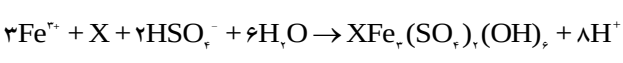
جدول ۱. بررسی ویژگی‌های باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-

تست‌های بیوشیمیایی	باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* قبل از نگه‌داری	باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-	باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* قبل از نگه‌داری	باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-
کاتالاز	-	-	-	-
اکسیداز	+	+	+	+
مصرف سیترات	+	+	-	-
تولید سولفید هیدروژن	+	+	+	+
تجزیه‌ی نشاسته	+	+	-	-
اوره آز	-	-	-	-
MR	+	+	-	-

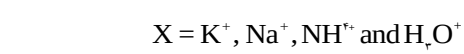
VP + − + +

۳.۳ بررسی تغییر pH در زمان قبل و بعد از نگه‌داری باکتری‌ها

نمودار حاصل از تغییر pH باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* (شکل ۱) نشان می‌دهد که در روز اول، میزان pH از ۲ به ۲٫۳ افزایش یافته است، در صورتی‌که باکتری با تولید اسید باعث می‌شود این روند به صورت کاهشی ادامه یابد. افزایش ابتدایی pH را می‌توان درگیر با واکنش‌هایی دانست که در حضور آهن رخ می‌دهند و مصرف‌کننده‌ی اسید هستند. کاهش pH را به دو عامل عمده نسبت داده‌اند؛ اولی رشد باکتری و تولید اسید سولفوریک از آن (اُکسایش سولفور و آهن)، و دومی رسوب تشکیل شده به صورت ژاروسیت که طبق واکنش زیر با کاهش pH همراه است [۱۲، ۱۳]:



$$3Fe^{3+} + X + 2HSO_4^- + 6H_2O \rightarrow XFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 8H^+$$



$$X = K^+, Na^+, NH^{4+} \text{ and } H_3O^+$$

نمودار حاصل از تغییر pH در زمان قبل از نگه‌داری باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* نشان می‌دهد که روند تغییر pH به دلیل اسید حاصل از باکتری به صورت کاهشی است (شکل ۲). این تفاوت در تغییر pH دوباکتری به عملکرد آنها مرتبط است، و به این صورت توجیه می‌شود که باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* دارای قابلیت اُکسایش آهن و گوگرد است، در صورتی‌که باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* فقط توانایی اُکسایش گوگرد را دارد [۱۴]. به طور کلی می‌توان گفت که کاهش pH، نشان‌دهنده‌ی عملکرد و فعالیت این باکتری‌ها است. نتایج حاصل از مقایسه‌ی تغییر pH توسط باکتری‌ها، ۶ ماه بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C- نشان می‌دهد که هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در روند این پارامتر مشاهده نشده است (P=۰٫۰۷).

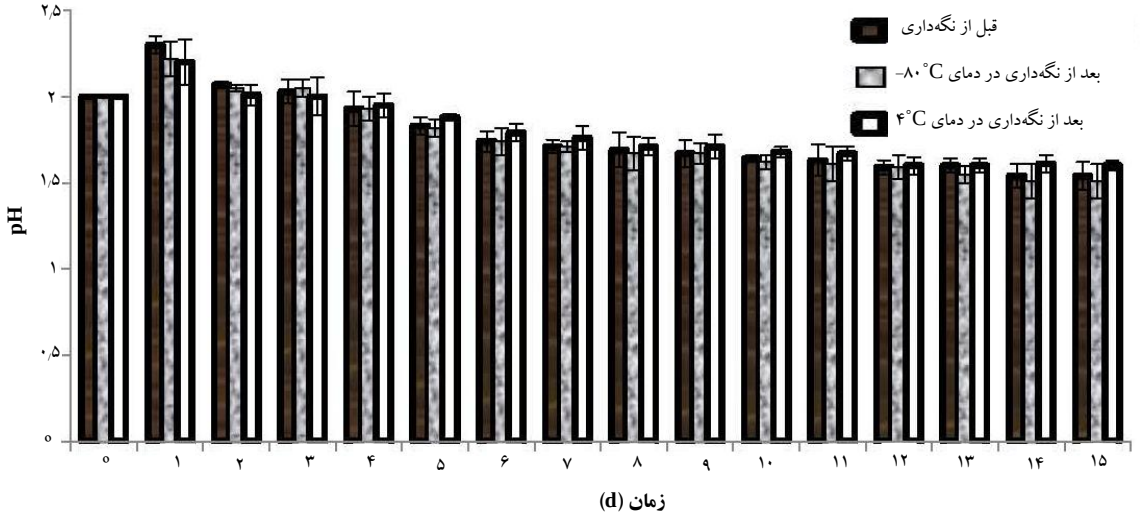
۴.۳ بررسی تغییر Eh در زمان قبل و بعد از نگه‌داری باکتری‌ها

شکل ۳ نشان‌دهنده‌ی تغییر Eh محیط کشت در حضور باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* است. همان‌گونه که از شکل ۳ قابل مشاهده است، Eh محیط کشت در زمان قبل از نگه‌داری، در طی ۱۰d از ۳۲۳ mV به بیش‌ترین مقدار خود معادل ۶۹۶ mV، افزایش یافته است. تغییر Eh محیط کشت در حضور باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی تغییر Eh این باکتری نشان داد که پس از گذشت ۹d از انکوباسیون، میزان Eh از ۳۳۴ mV به ۴۶۷ mV افزایش یافته است. این افزایش، در مقایسه با باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* ناچیز است که به عدم توانایی این باکتری در اُکسایش آهن مربوط می‌شود. لازم به یادآوری است که افزایش مقدار Eh، ناشی از فعالیت باکتری در اُکسایش آهن است. باکتری‌های دخیل در فرایند فروشویی زیستی، باعث اکسید شدن آهن فرو، و تبدیل آن به آهن فریک می‌شوند [۱۴]. با توجه به این که یون فریک تشکیل شده از اُکسایش یون فرو در باکتری، مهم‌ترین عامل استخراج اورانیم در فرایند فروشویی زیستی است، بنابراین افزایش Eh در استخراج اورانیوم دارای نقش تعیین‌کننده‌ای است، و حفظ توانایی اُکسایش باکتری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱۵]. مقایسه‌ی نتایج حاصل از تغییر Eh در زمان‌های قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C- نشان می‌دهد که پس از گذشت زمان ۶ ماه از نگه‌داری باکتری‌ها، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در Eh (قابلیت اُکسایش) باکتری‌ها مشاهده نشده است، که نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر نگه‌داری باکتری‌ها بر عملکرد آنها است (P=۰٫۰۶). وو و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در طی پژوهشی بر روش مؤثر نگه‌داری باکتری‌های جنس *اسیدیتیو باسیلوس*، نشان دادند که نگه‌داری باکتری‌ها در دمای پایین توسط یک عامل محافظت‌کننده در برابر سرما (گلیسرول)، بر روی قابلیت اُکسایش باکتری‌ها اثری نگذاشته است که نتایج آنها مشابه با نتایج به دست آمده در این پژوهش است [۳].

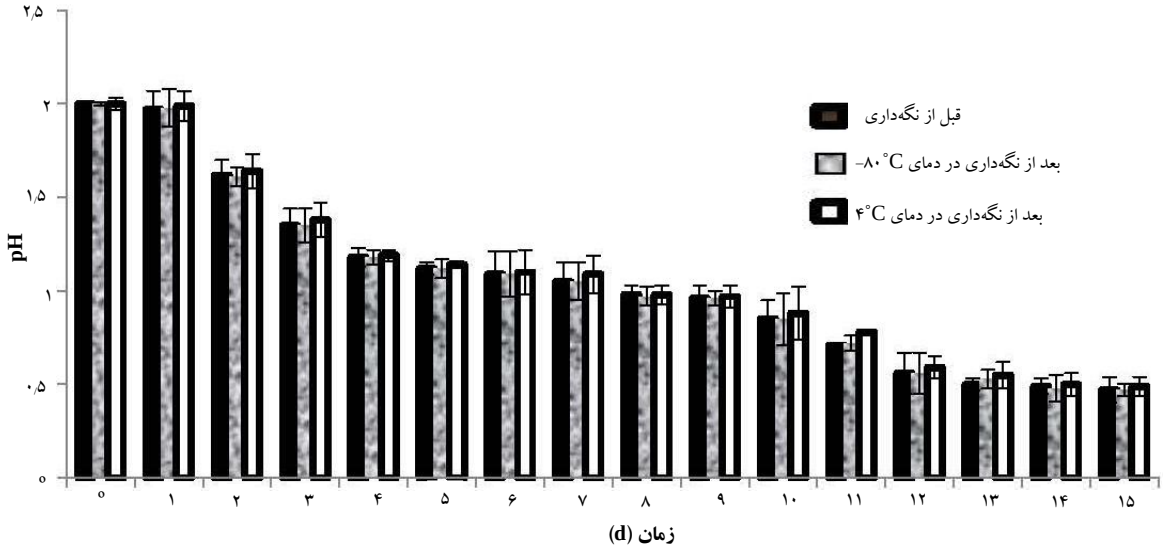
۵.۳ بررسی رشد باکتری‌ها در زمان قبل و بعد از نگه‌داری

بررسی منحنی رشد باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری به مدت ۶ ماه در دماهای ۴ و ۸۰°C- در شکل‌های ۵ و ۶ قابل مشاهده است. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که نگه‌داری بر روی رشد باکتری‌ها اثری ندارد و تغییر معنی‌داری در رشد آنها مشاهده نمی‌شود (P=۰٫۰۷). نتایج پژوهش‌های وو و همکارانش تأییدی بر نتایج به دست آمده در این پژوهش است. یافته‌های آنها نشان داد که با توجه به عدم تغییر در سرعت و قابلیت رشد این دسته از باکتری‌ها، روش مناسب و مؤثر برای نگه‌داری باکتری‌های دخیل در فروشویی زیستی، نگه‌داری در

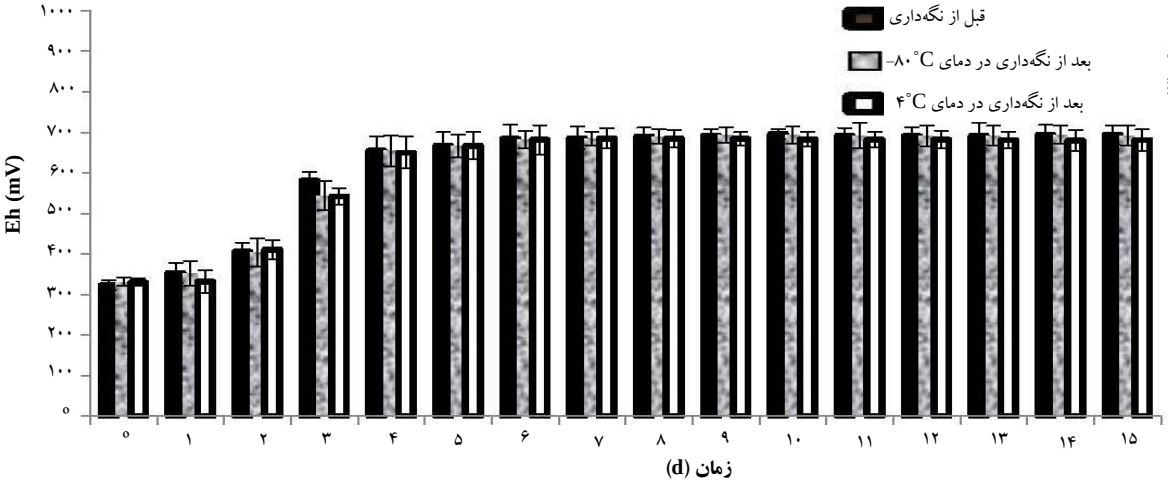
دماهای پایین با استفاده از ماده‌ی محافظت‌کننده در برابر سرما یعنی گلیسرول است [۳].



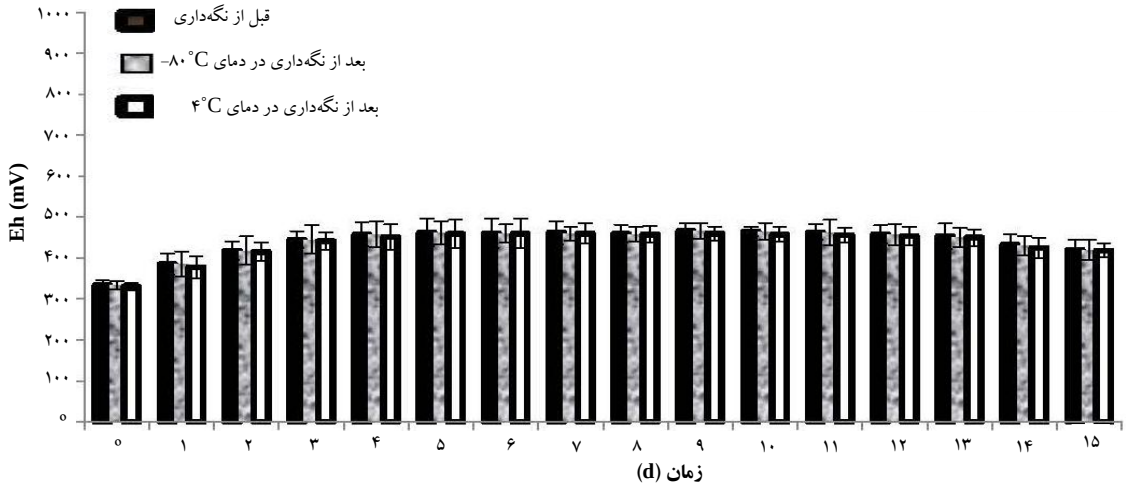
شکل ۱. تغییر pH در حضور باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-.



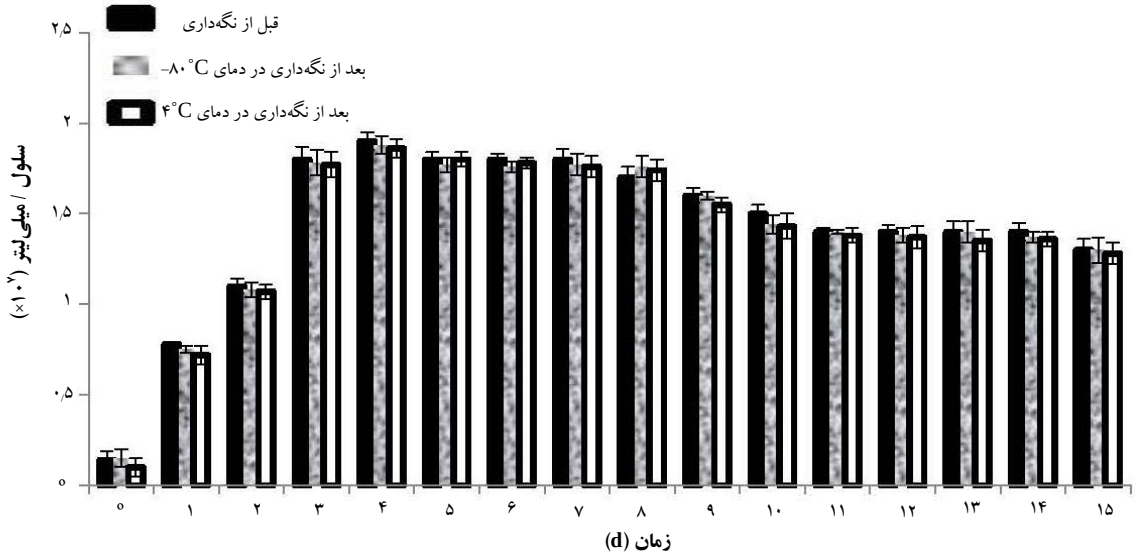
شکل ۲. تغییر pH در حضور باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-.



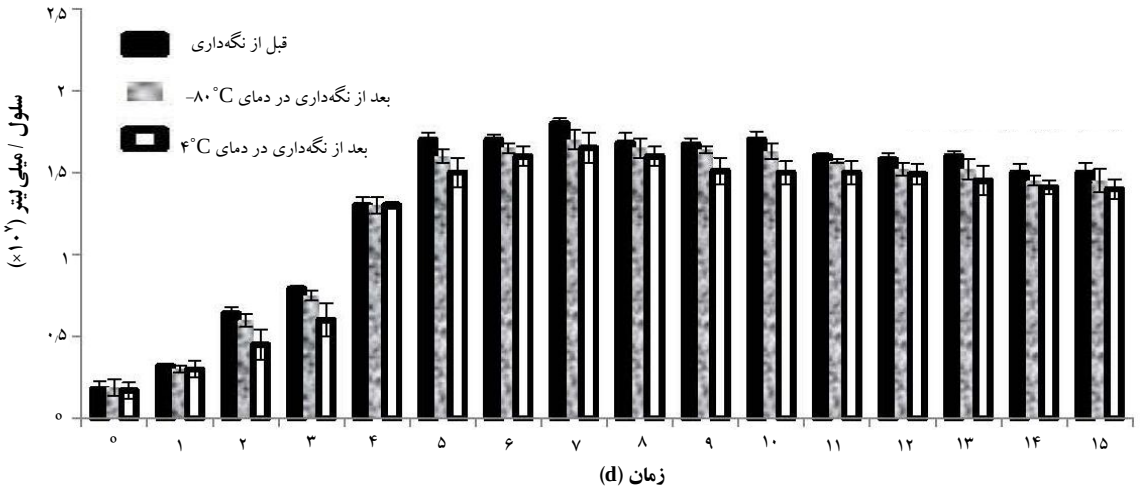
شکل ۳. تغییر Eh برحسب میلی‌ولت در حضور باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-.



شکل ٤. تغییر Eh برحسب میلی‌ولت در حضور باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-.



شکل ۵. رشد باکتری *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-.



شکل ٦. رشد باکتری *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* در زمان قبل و بعد از نگه‌داری در دماهای ۴ و ۸۰°C-.

به طور کلی می‌توان گفت که روش‌های انتخابی برای نگه‌داری میکروارگانیسم‌های موردنظر، روشی علمی، مناسب و مؤثر بوده است. زدنک بیان کرد که پایین آوردن دما تا نقطه‌ای که میکروارگانیسم یخ بزند، یکی از روش‌های مناسب نگه‌داری است که در این روش، طول عمر میکروارگانیسم، به ماده‌ی محافظت‌کننده در برابر سرما، طول مدت سرد کردن، دمای نگه‌داری و دفعات گرم و ذوب کردن دوباره‌ی نمونه بستگی دارد. اگر شرایط مناسب فراهم شود، تمامی میکروارگانیسم‌ها حیات خود را در طی این روش و بعد از آن حفظ خواهند کرد. در اکثر موارد، قرار دادن کشت‌های در حال رشد درون فریزر با دمای ۲۰- یا ۸۰°C-، نتایج موفقیت‌آمیزی به همراه داشته است. اگرچه، دمای نگه‌داری در اغلب موارد، به تشکیل دوباره‌ی بلورها و افزایش بلور یخ منجر می‌شود، اما طول مدت نگه‌داری به مدت ۸ تا ۱۰y را می‌توان از این روش انتظار داشت [۴].

٤. نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش بیان می‌کنند که نگه‌داری باکتری‌های *اسیدیتیو باسیلوس فرواکسیدانس* و *اسیدیتیو باسیلوس تیواکسیدانس* بومی جدا شده، که در فروشویی زیستی اورانیم دخیل هستند، به مدت ۶ ماه در دمای ۴ و ۸۰°C-، تأثیری بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، تغییر pH، Eh و رشد باکتری‌ها نداشته است. در نتیجه این باکتری‌ها پس از ۶ ماه نیز توانایی استفاده مؤثر در فرایند فروشویی زیستی را دارند.

پی‌نوشت‌ها

1. Passage
2. Preservation in Room Temperature
3. Mineral Oils
4. Lyophilization-Freeze Drying
5. Freezing
6. Lyophilisation
7. Starkey

مراجع

[1] D.E. Rawlings, Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates, *Microb. Cell Fact.* **10** (2005) 1475-2859.

[2] E.R. Donati, W. Sand, Microbial Processing of Metal Sulfides, *Wolfgang* (Eds.), Springer, (2007) 151-168.

[3] X.L. Wu, X-H Xin, Y. Jiang, R. Liang, P. Yuan, C. Fang, Liquid-nitrogen cryopreservation of three kinds ofautotrophic bioleaching bacteria, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **18** (2008) 1386-1391.

[4] H. Zdenek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, *Cryobiology* **46** (2003) 205–229.

[5] S. Jahani, Isolation and characterization of microorganisms involving uranium bioleaching from sulfur springs of Ramsar, M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Qom branch, (2013).

[6] P. Chen, L. Yan, Q. Wang, Y. Li, H. Li, Surface alteration of realgar (As4S4) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Int. microbiol.* **15** (2012) 9-15.

[7] S.A. Waksman, Microorganisms concerned in oxidation of sulfur in the soil, *J. Bacteriol.* **7** (1992) 605-608.

[8] P.H. Clarke, S.T. Cowan, Biochemical Methods for Bacteriology, J. Gen. Microbiol. **6** (1952) 187-197.

[9] C. Jiang, Y. Liu, X Guo, Sh. Liu, Isolation and characterization of ferrous- and sulfur-oxidizing bacteria from Tengchong solfataric region, China, *J. Environ. Sci.* **21** (2009) 1247–1252.

[10] W. Zeng, H. Zhou, Y. Liu, Preservation of moderately thermophilic culture by freeze drying andfrozen preservation way and effect on subsequent bioleaching of chalcopyrite,

[11] P.C. Mazur, Cryobiology: the freezing of biological systems, *Science* **168** (1970) 939–949.

[12] F. Kaibin, L. Hai, L. Deqiang, J. Wufei, Z. Ping, Comparsion of bioleaching of copper sulphides by *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Environ. Geochem. Health* **13** (2014) 664-672.

[13] C. Gomez, M.L. Blazquez, A. Ballester. Bioleaching of a Spanish complex sulfide ore bulk concentrate, *Miner. Eng.* **12** (1998) 93-106.

Trans. Nonferrous Met. Soc. China **20** (2010) 882-887.

[14] S. Haragobinda, P. Ashish, J.K. Dong, L. Seoung-Won, Comparison of Bioleaching of Metals from Spent Petroleum Catalyst Using *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Int. J. Chem. Nucl. Metall. Mater. Eng.* **7** (2013) 499-503.

[15] A. Akcil, H. Ciftci, H. Deveci, Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyretic chalcopyrite concentrate, *Miner. Eng.* **20** (2007) 310-318.