مجله سنجش و ایمنی پرتو، جلد ۵، شمارهٔ ٤، پاییز ۱۳۹٦

مقایسه تأثیر پرتوهای فرابنفش و گاما در تحمل آرسنیک در فرآیند فروشویی‌زیستی

زهرا تمیزی[۱]، محمدعلی شفائی[۱*] و سیدمحمد مشتاقیون[۲]

[۱] گروه فیزیک هسته‌ای، دانشکده فیزیک، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
[۲] گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
[*] یزد، دانشگاه یزد، دانشکده فیزیک، کدپستی: ۵۷٤۱-۰۸۹۱۹
پست الکترونیکی: mashafaei@yazd.ac.ir

چکیده

از جمله عواملی که باعث کاهش نرخ رشد و مرگ احتمالی باکتری‌های فرآیند فروشویی‌زیستی می‌شود ایجاد سمیت در فرآیند آزادسازی فلز از سنگ معدن است. یکی از دلایل به‌وجود آمدن این سمیت، حضور عنصر آرسنیک در سنگ معدن است. در این تحقیق برای بهبود فرآیند فروشویی‌زیستی از روش جهش‌زایی به‌وسیله طیف الکترومغناطیسی و هسته‌ای استفاده شده است. برای ایجاد جهش از این طیف، پرتو فرابنفش با طول موج ۲۵۳ نانومتر و انرژی ۳ eV و برای پرتو گاما، چشمه ^{137}Cs با انرژی ۰/٦٦۲ MeV انتخاب شده‌اند. پس از پرتودهی در زمان‌های مختلف به بررسی تأثیر این پرتوها بر مرگ و میر باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس پرداخته شد و بعد از آن بر روی باکتری‌های جدید، آرسنیک با غلظت‌های معین اضافه گردید. در ادامه با دسته‌بندی باکتری‌های جهش‌یافته‌ای که به‌وسیله پرتوهای گاما و فرابنفش در زمان‌های متفاوت پرتودهی شده بودند، مقاومت آن‌ها در مقابل سمیت آرسنیک در غلظت‌های مختلف بررسی شد و با ثابت نگه‌داشتن شرایط رشد برای باکتری‌ها شاهد و جهش‌یافته، این نتایج به‌دست آمد که در ۳ دقیقه پرتودهی گاما و ۱۲۰ دقیقه پرتودهی فرابنفش نه تنها مقاومت آن‌ها درمقابل آرسنیک تقریباً ۱۰ برابر باکتری‌های شاهد شد، بلکه به‌طور متوسط، افزایش رشد در تعداد باکتری‌ها به میزان ۲۰ و ٤۵ درصد نسبت به نمونه شاهد، به‌ترتیب برای پرتودهی فرابنفش و گاما مشاهده شد.

کلیدواژگان: پرتو فرابنفش، پرتوگاما، فروشویی‌زیستی، جهش‌زایی، باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس، آرسنیک.

۱. مقدمه

بعضی از موجودات ذره‌بینی قادرند یون‌های فلزات سنگین را از محلول‌ها به‌ویژه محلول‌های رقیق جذب سطوح خارجی خود کرده و بدین‌ترتیب این یون‌های فلزی را از محلول جدا کنند. این روش برای جداسازی فلزات از پساب‌های صنعتی و یا محلول‌های حاصل از فرآیندهای هیدرومتالورژی کاربرد فراوان دارد. اکسید کردن و انحلال میکروبی سنگ‌های معدن به‌ویژه سنگ‌های سولفوری کم‌عیار مهم‌ترین جنبه کاربرد میکروارگانیسم‌ها به‌منظور افزایش بازدهی حل شدن می‌باشد [۱]. یکی از اشکالات عمده استخراج فلز از سنگ معدن به روش فروشویی‌زیستی، وجود آرسنیک در سنگ معدن است

که باعث ایجاد سمیت در این فرآیند می‌شود. آرسنیک یک فلز سنگین و سمی بسیار خطرناک است که به صورت طبیعی در پوسته‌ی زمین وجود دارد. آرسنیک به صورت طبیعی در چهار ظرفیت ۵+، ۳+، صفر و ۳- یافت می‌شود. بیش‌ترین فراوانی مربوط به آرسنیک As (V) یا آرسنات و As (III) یا آرسنیت است که آرسنیت نسبت به آرسنات سمیت بیش‌تری دارد. در فرآیند فروشویی‌زیستی، از میکروارگانیسم‌هایی مانند تیوباسیلوس فرواکسیدانس[1]، تیوباسیلوس تیواکسیدانس[2] و لپتوسپریلیم فرواکسیدانس[3] استفاده می‌شود که انرژی مورد نیاز خود را از اکسایش Fe^{2+} به Fe^{3+} یا از اکسایش عنصر گوگرد و احیای ترکیبات سولفور به سولفات به‌دست می‌آورند. واکنش اکسایش و کاهش آرسنیک به‌طور طبیعی اما با سرعت بسیار آهسته رخ می‌دهد و برای بیش‌تر میکروارگانیسم‌ها از جمله تیوباسیلوس فرواکسیدانس سمی است و باعث کاهش نرخ رشد و مرگ احتمالی آن می‌شود. طبق تحقیقات، نشان داده شده است که ۱۰ ppm آرسنیک تأثیری بر باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس ندارد و این باکتری می‌تواند به رشد خود ادامه دهد [۲]. برای بهبود فرآیند فروشویی‌زیستی از روشی به نام جهش‌زایی استفاده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که از روش جهش‌زایی با استفاده از پرتوهای مناسب می‌توان برای رسیدن به باکتری‌هایی با پتانسیل بیش‌تر به منظور استخراج فلز از سنگ معدن بهره برد. جهش ناشی از پرتو فرابنفش از ساده‌ترین و مؤثرترین روش‌های جهش‌زایی ژنتیکی است که می‌تواند فعالیت زیستی و توانمندی فرآیند فروشویی‌زیستی را بهبود بخشد [۱]. در پژوهشی کاودیل[4] به بررسی تأثیر آرسنیک As (V) و As (III) با غلظت‌های متفاوت بر روی باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس پرداخته و بر اساس آن منحنی نرخ رشد باکتری به‌دست آمده است [۲]. ژوهای[5] و همکاران تأثیر فروشویی‌زیستی طلا را به‌وسیله باکتری‌های فلور معادن قبل و بعد از جهش مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش برای جهش‌زایی از پرتو فرابنفش، مافوق صوت و مایکروویو استفاده شده است. سپس اثر اکسایش این باکتری بر روی نمونه سنگ معدن امتحان شده است [۳].

۲. روش کار

باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس به‌طور گسترده قابلیت مطالعه برای فرآیند فروشویی‌زیستی را دارد که برای انجام این پژوهش انتخاب و سویه ۱٦٤٧ از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. این میکروارگانیسم‌ها برای استحصال فلزات از کانه‌های[6] سولفیدی به طور نسبی نیازهای غذایی پیچیده‌ای ندارند و تنها به مواد معدنی اندکی نیاز دارند که آن‌ها را از محیط و موادی که تحت فروشویی‌زیستی قرار می‌گیرند تأمین می‌کنند. در شرایط آزمایشگاهی برای رشد این باکتری‌ها نیاز به محیط کشت مناسب است تا باکتری‌ها بتوانند از مواد موجود در محیط تغذیه و به رشد خود ادامه دهند. یکی از محیط کشت‌های مناسب برای رشد این باکتری‌ها، K ۹ نام دارد [۵،٤،۲]. برای ساختن ۱۰۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت به نسبت‌های مشخص از ترکیبات این محیط برداشته و به ۷۵ میلی‌لیترآب مقطر اضافه شد (ارلن ۱). سولفات آهن نیز به میزان ٤/٤۲ گرم به ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید (ارلن۲). هر دو ارلن به مدت ۱۵ دقیقه جداگانه در دمای ۱۲۱ سانتی‌گراد اتوکلاو شده و محتوی ارلن ۲ به ارلن ۱ اضافه شد [٦]. برای تنظیم pH (حدود ۲) محیط کشت از سولفوریک

[1] *Thiobacillus ferrooxidans (TF)*
[2] *Thiobacillus thiooxdans (TT)*
[3] *Leptospirillum ferrooxidans (LF)*
[4] Mandi Caudill
[5] Xie Xuehui
[6] Ore

اسید استفاده شد. به منظور کشت باکتری به نسبت ۱۰ درصد از محیط کشت، سوسپانسیون باکتری تیوباسیلوس فرواکسیدانس درون آن تلقیح گردید. پس از حدود ٦ روز باکتری‌ها به رشد کامل خود می‌رسند که در این زمان مورد استفاده قرار گرفتند. شمارش ابتدایی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد که غلظت باکتری‌ها در حدود $۳/۱۲\times۱۰^{۸}$ در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

در ابتدا برای به‌دست آوردن تأثیر آرسنیک بر باکتری اصلی، به حجم یکسان از باکتری‌ها برداشته و در ارلن‌های ۲۵ میلی‌لیتری تقسیم کرده و نمک آرسنیک با غلظت‌های ۵۰، ٦۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ (برحسب ppm) به آن‌ها اضافه شد و پس از گذشت سه روز شمارش باکتری‌ها انجام شد که در غلظت ۱۰۰ ppm کاهش حجم ۸۰ درصدی باکتری‌ها مشاهده شد. بعد از آن اثر پرتوها بر روی باکتری بررسی شد. برای پرتودهی فرابنفش از لامپ فرابنفش با توان ۳۰ وات و طول موج ۲۵۳ نانومتر و انرژی ۳ eV استفاده شد [۷،۳].

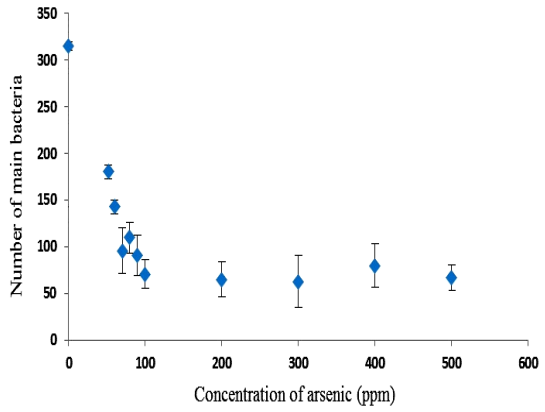
برای پرتو گاما از بین چشمه‌های در دسترس، ^{۱۳۷}Cs با تک پرتو گاما به انرژی ۰/٦٦۲ MeV و نیمه عمر ۳۰ سال و فعالیت ۳/۹۲ میکروکوری انتخاب شد. سپس نمونه‌های سوسپانسیون باکتری در شرایط استریل در زمان‌های صفر(شاهد)، ۱۰، ۳۰، ٦۰و ۱۲۰ دقیقه مورد پرتودهی با پرتوفرابنفش قرار گرفتند [۸،۷] و پس از گذشت ٢٤ ساعت از پرتودهی باکتری‌ها شمارش شدند.

در ادامه تحقیق، باکتری‌ها در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ٦۰، ۱۲۰، ۱۸۰و ٢٤۰ ثانیه تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند و شمارش باکتری‌ها، همانند روش پرتودهی فرابنفش انجام شد و سپس ۱۰۰ ppm نمک آرسنیک به همه نمونه‌های پرتودهی شده اضافه شد و پس از گذشت سه روز باکتری‌ها مورد شمارش قرار گرفتند.

۳. نتایج

در شکل ۱ تغییرات تعداد باکتری اصلی با اضافه کردن غلظت‌های مختلف آرسنیک نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، جمعیت باکتری‌ها با افزایش اولیه آرسنیک (تا ۱۰۰ ppm بر میلی‌لیتر) کاهش قابل توجه‌ای دارد و پس از آن با افزایش سمیت آرسنیک، جمعیت باکتری‌ها به تدریج کاهش می‌یابند.

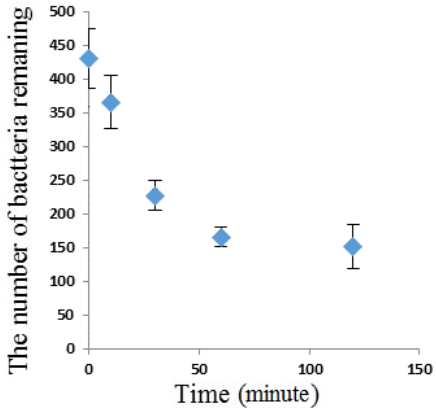
در شکل ۱ پس از اضافه کردن ۵۰ ppm آرسنیک، ٤۳ درصد کاهش جمعیت نسبت به نمونه کنترل اتفاق افتاده است و در غلظت‌های ۱۰۰ ppm کاهش جمعیت ۸۰ درصد و در حجم‌های بیش‌تر، کاهش جمعیت با شیب ملایم‌تری مشاهده می‌شود.



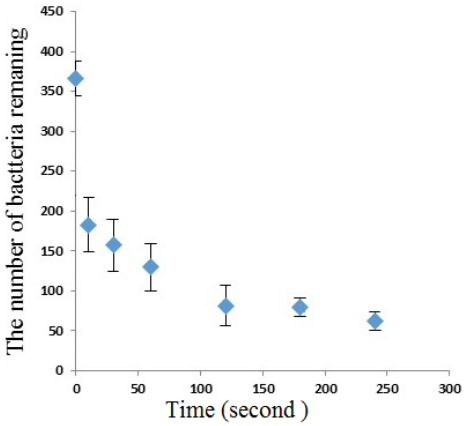
شکل (۱): تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر روی باکتری اصلی.

در شکل ۲-الف تغییرات تعداد باکتری‌ها در اثر پرتو فرابنفش و در شکل ۲-ب تغییرات تعداد باکتری در اثر پرتو گاما نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل‌های ۲-الف و ۲-ب مشاهده می‌شود، همانند تأثیر سمیت آرسنیک، در پرتودهی، ابتدا کاهش شدید جمعیت باکتری‌ها و با ادامه پرتودهی جمعیت باکتری‌ها کاهش تقریباً نمائی دارند. همان‌طور که در شکل‌های ۲ (الف و ب) نشان داده شده، تعداد

باکتری‌ها در اثر پرتودهی با افزایش زمان به تدریج کاهش یافته است. در شکل۲-الف پس از گذشت ۱۰ دقیقه پرتودهی تعداد باکتری‌ها نسبت به حالت کنترل تغییر چندانی نداشته است ولی در زمان ۱۲۰ دقیقه تعداد باکتری‌ها ۸۰ درصد کاهش یافته است. در شکل ۲-ب همان‌گونه که مشاهده می‌شود، برای پرتودهی گاما طی گذشت ۱۰ ثانیه تعداد باکتری‌ها نسبت به حالت کنترل با کاهش ۵۰ درصد روبه‌رو شده‌اند و در زمان‌های بعد کاهش تعداد باکتری با شیب ملایم‌تری دیده شد که در آخرین بررسی در زمان ٤ دقیقه (۲٤۰ ثانیه) کاهش ۸۵ درصدی را نشان می‌دهد.

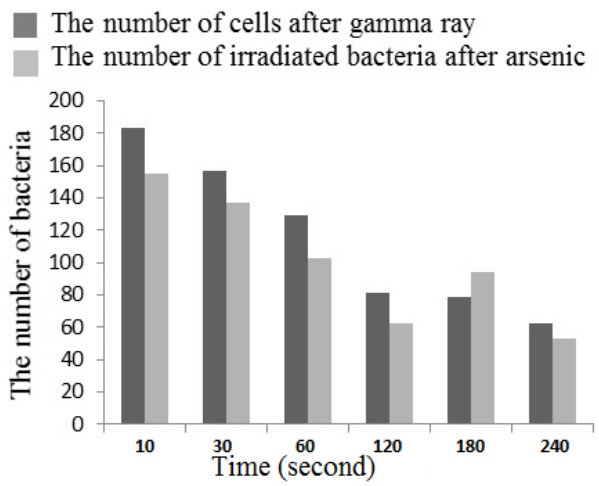


(الف)

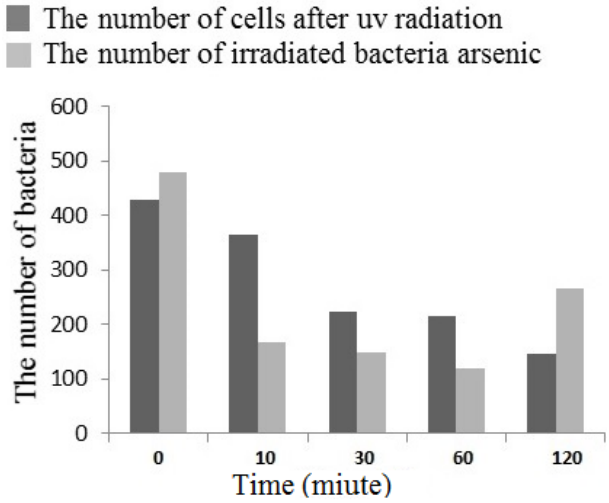


(ب)

شکل (۲): اثر پرتو بر روی مرگ و میر باکتری‌های تیوباسیلوس الف) پرتو فرابنفش(برحسب دقیقه)، ب) پرتو گاما (برحسب ثانیه).



(الف)



(ب)

شکل (۳): مقایسه تغییرات تعداد باکتری در اثر پرتو و اضافه کردن ۱۰۰ ppm آرسنیک، با پرتودهی، الف) گاما ب) فرابنفش.

در شکل ۳-الف در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ٦۰، ۱۲۰و ۲٤۰ ثانیه تعداد باکتری‌ها بعد از افزودن آرسنیک، نسبت به پس از پرتودهی، کاهش نامحسوسی داشته است و به نظر می‌رسد این زمان‌های پرتودهی شده تا حدودی مقاومت باکتری را نسبت به آرسنیک بالا برده است و در باکتری‌هایی که ۳ دقیقه پرتو-دهی شدند بعد از اضافه کردن آرسنیک، افزایش جمعیت باکتری دیده شد. در شکل ۳-ب پس از گذشت ۱۰ دقیقه پرتودهی و اضافه کردن ۱۰۰ ppm آرسنیک، حدود ۷۰ درصد

کاهش تعداد باکتری‌ها اتفاق افتاده است و می‌توان گفت در اثر این زمان پرتودهی، در باکتری تغییر خاصی رخ نداده است. در زمان‌های ۳۰ و ٦۰ دقیقه نیز کاهش تعداد باکتری کمتر از ۸۰ درصد مشاهده شد که نشان می‌دهد در یکسری از باکتری‌ها جهش اتفاق افتاده که نسبت به آرسنیک مقاوم هستند اما هنوز کاهش تعداد باکتری دیده می‌شود. ۱۲۰ دقیقه بعد از پرتودهی فرابنفش، کاهش ۸۰ درصدی و بعد از اضافه کردن ppm ۱۰۰ آرسنیک افزایش محسوس تعداد باکتری مشاهده شد.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

در شکل ۱ داده‌ها نشان‌دهنده این است که باکتری‌ها در حجم ppm ۱۰۰ آرسنیک، افت شدید جمعیت را داشته‌اند و باکتری‌های باقیمانده قابلیت تحمل این میزان سمیت را داشته و قادر به ادامه فعالیت خود هستند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در شکل ۲ پرتو فرابنفش با انرژی eV ۳ با گذشت زمان ۱۲۰ دقیقه و پرتو گاما با انرژی MeV ۰/٦٦۲ با گذشت زمان ۳ دقیقه تقریباً باعث کاهش ۸۰ درصدی تعداد باکتری‌ها شدند. علاوه بر اثر مرگ و میر، در باکتری‌های باقیمانده احتمال اینکه جهش‌هایی اتفاق افتاده باشد نیز هست، که می‌تواند در بهبود و یا عدم کارائی باکتری‌ها مؤثر باشد. هدف این تحقیق، به‌دست آوردن باکتری‌های جهش یافته‌ای است که پس از اضافه کردن آرسنیک با حجم معین به محیط، رشد آن‌ها همانند باکتری‌های شاهد و یا بیش‌تر از آن باشد. این هدف با پرتودهی باکتری‌ها به مدت ۳ دقیقه با پرتو گاما و ۱۲۰ دقیقه با پرتو فرابنفش و تا افزایش ۱۰ برابری حجم آرسنیک برآورده شد. حتی افزایش جمعیت باکتری‌ها به میزان ٪۲۰ (برای پرتو فرابنفش) و ٪٤٥ (برای پرتو گاما) در نسل جدید باکتری‌ها در حضور آرسنیک نیز مشاهده شد.

پیشنهادهای دیگری که می‌توان برای ادامه این تحقیق داد، الف- انجام فرآیند فروشویی زیستی با استفاده از باکتری‌ها جهش‌یافته حاصل از پرتودهی و مقایسه عملکرد آن‌ها با باکتری‌های استفاده شده درمعادن است. ب- در پرتودهی در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه پرتو فرابنفش و ٤ دقیقه پرتو گاما، جمعیت باکتری‌ها بالای ۸۰ درصد کاهش می‌یابند،. درنتیجه می‌توان روی جهش‌زائی وتغییر ژن باکتری‌های باقیمانده هم تحقیقاتی انجام شود.

۵. مراجع

[۱] وقار، محمد رضا. اولیازاده، منوچهر. وقار و رامز. فناوری میکروبی در متالورژی، انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، دانشگاه صنایع و معادن ایران. چاپ اول (۱۳۷۹).

[2] M. Caudill. The Effects of Arsenic on *Thiobacillus ferrooxidans* (2003) Thesis (MSc, Columbia University, Earth and Environmental Engineering Department, Columbia).

[3] X. Xie. Bioleaching of Arsenic-Rich Gold Concentrates by Bacterial Flora before and after Mutation. BioMed Research International, Vol. 2013 (2013) Article ID 969135, 10 pages.

[4] P.I. Harvey and F.K. Crundwell. The Effect of As(III) on the Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* in an Electrolytic Cell under Controlled Redox Potentials. Minerals Engineering, 9 (1996) 1059–1068.

[5] A. Jensen and C. Webb. Ferrous Sulphate Oxidation Using *Thiobacillus ferrooxidans* a Review. Process Biochemistry, 3(3) (1995) 225–236.

[6] R. West, G. Stephens and J. Cilliers. Zeta Potential of Silver Absorbing *Thiobacillus ferrooxidans*. Mineral Engineering, 12(6) (2005) 189–194.

[7] C. Meng, X. Shi, H. Lin, J. Chen, Y. Guo. UV Induced Mutations in *Acidianus brierleyi* Growing in a Continuous Stirred Tank Reactor Generated a Strain with Improved Bioleaching Capabilities. Enzyme and Microbial Technology, 40 (2007) 1136–1140.

[8] K. Takatsugi, K. Sasaki and T. Hirajima. Mechanism of the Enhancement of Bioleaching of Copper from Enargite by Thermophilic Iron Oxidizing Archaea with the Concomitant Precipitation of Arsenic. Hydrometallurgy, 109 (2011) 90–96.