جداسازی و غنی سازی انتخابی باکتری های اکسیدکننده گوگرد از خاکهای اطراف معدن منگنز شهر قم

احمدعلی پوربابایی*[۱],الهه شجاعی منش[۱], سیدسهیل آقایی[۱]

۱) گروه زیست شناسی, دانشکده علوم پایه,"دانشگاه آزاد اسلامی, واحد قم", ایران * Ahmadalipb@gmail.com

چکیده

باکتری های اکسید کننده گوگرد در گروه های فیزیولوژیک متفاوتی قراردارند. جنس *Thiobacillus* یکی از مهمترین اکسیدکنندگان گوگرد است که امروزه در صنایع مختلف به صورت خالص یا همراه با سایر اکسید کننده ها کار برد دارد. نظربااینکه پتانسیل و تنوع این باکتری ها در اقلیم های مختلف متفاوت می باشد, هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری اکسید کننده گوگرد از خاک های اطراف معدن منگنز قم و تعیین شرایط بهینه رشد و اکسیداسیون تیوسولفات سدیم بوده است. در این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی گونه مزوفیل واسیددوست *PASH1* ,۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف اطراف معدن منگنز در پاکت های پلی اتیلن جمع آوری گردید و در محیط های غنی شده اختصاصی مایع M789 و M701 تلقیح و در انکوباتور شیکردار با rpm برابر ۱۵۰ و در دمای $30^{\circ}C$ گرماگذاری گردید. از ۲۰ سویه باسیل گرم منفی جدا شده تنها یک جدایه *PASH1* توانایی اکسیداسیون تیوسولفات سدیم را به ترکیبات احیا شده معدنی گوگردی نشان داد. سپس 10ml ازمحیط کشت را به محیط های غنی شده انتخابی (ATMI, S2, 9K, M752) مایع گرماگذاری شد. سپس در گرمخنه شیکردار (150rpm) در $30^{\circ}C$ گرماگذاری شدند. طی غنی سازی براساس کاهش pH تا حدود ۳ به میزان 0.1ml با روش اسپرید متد روی محیط ATMI جامد که به عنوان محیط انتخابی تیوباسیلوس می باشد غنی سازی انجام شد. سپس روی محیط های کشت اختصاصی مایع M752, ATMI, S2, 9K که در محدوده pH جدایه توانایی رشد داشتند نگهداری و پس از ۱۰ روز تنها بر روی محیط ATMI توانایی رشد داشت; سپس رشد جدایه روی محیط کشت جامد ATMI بررسی گردید. شناسایی جدایه *PASH1* براساس خصوصیات مرفولوژی کلنی، شکل میکروسکوپی، صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در حد جنس تیوباسیلوس برطبق باکتریولوژی سیستماتیک برجی منوال انجام شد. بهینه سازی شرایط اکسیداسیون تیوسولفات سدیم جهت تعیین شرایط اپتیمم با استفاده از pH متر و دستگاه اسپکتروفتومتری انجام گردید. نتایج نشان داد که تیوسولفات سدیم طی ۱۰ روز روی محیط ATMI در گرمخانه شیکردار با rpm برابر ۲۰۰ و در دمای $30^{\circ}C$ و pH برابر ۴ اکسید می گردد.

کلمات کلیدی:

غربالگری, غنی سازی انتخابی, باکتری های اکسیدکننده گوگرد, معدن منگنز

مقدمه

اعضای جنس تیوباسیلوس های اکسیدکننده گوگرد از مهمترین میکروارگانیسم های مورد استفاده در صنعت بیولچینگ می باشند. *تیوباسیلوس ها* باکتری های گرم منفی, اسید دوست و شیمیولیتوتروف اجباری می باشد که قادر به اکسیداسیون ترکیبات گوگردی احیا شده معدنی به عنوان منبع انرژی می باشد (هاریسون ۱۹۸۴). به علت تغذیه شیمیولیتوتروفی اعضای جنس تیوباسیلوس, حضور آنها را در خاک های اطراف معدن منگنز, برای انجام واکنش های اکسیداسیون و احیا دور از انتظار نیست; در این جداسازی, کاربرد محیط های کشت اختصاصی *Thiobacillus* برای جداسازی و انجام مطالعات بیوشیمیایی و بهینه سازی مورد نیاز می باشد. در این محیط ها حضور یک منبع انرژی (معمولا تیوسولفات سدیم) به عنوان الکترون دهنده و اکسیژن به عنوان الکترون گیرنده از شرایط ضروری رشد می باشد (ویدیالاکشمی ۲۰۰۷ و تانگ ۲۰۰۹). در واقع تیمار هوازی یک روش عمومی بسیار مهم برای جداسازی این باکتری ها است (کلی ۱۹۸۹ و سیلور ۱۹۸۱). تمام اعضای جنس تیوباسیلوس, نیازهای مشابهی به لحاظ نمک های معدنی دارند از جمله فسفات به عنوان تنظیم کننده بافری محیط, NaCl برای تعادل اسمزی, آمونیوم, نیتروژن و کلسیم در محیط کشت این باکتری ها به کار می رود (روپلا ۱۹۷۳ و سیلور ۱۹۸۱). محصول انتهایی که طی فعالیت این باکتری ها حاصل می شود اسید سولفوریک است. عامل اصلی موثر در به دست آوردن بالاترین میزان تولید محصول انتهایی, بهینه سازی شرایط رشد این باکتری می باشد. پس یافتن انواعی از از *Thiobacillus* که دارای قابلیت بالاتری در اکسیداسیون ترکیبات احیا شده معدنی و تحمل شرایط اسیدی را داشته باشند, می تواند در نیل به اهداف اختصاصی این تکنولوژی موثر باشد.

مواد و روش ها

به منظور جداسازی و شناسایی گونه بومی *تیوباسیلوس* ابتدا ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف اطراف معدن منگنز انتخاب و هر نمونه از فاصله 5-15cm سطح خاک توسط بیلچه استریل در پاکت های استریل جمع آوری و برای جلوگیری از کمترین تغییر در شرایط طبیعی رشد این باکتری, بلافاصله در شرایط دمایی $4^{\circ}C$ به آزمایشگاه انتقال داده شد.

جهت غنی سازی, ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ارلن های حاوی 100ml محیط غنی شده M789 و M701 تلقیح گردید.

تلقیح گردید که ترکیبات شیمیایی محیط اختصاصی M789 و M701 تلقیح شد. ترکیبات شیمیایی M789 شامل $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 5.0g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4g/l, KH_2PO_4 4.0g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5g/l,$CaCl_2.2H_2O$ 0.25g/l, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01g/l, در 1000ml آب مقطر می باشد. pH این محیط در دمای 25°C توسط H_2SO_4 حدود ۵ تنظیم شد. ترکیبات شیمیایی محیط M701 شامل

$Na_2S_2O_3.5H_2O$ 5g, $NaHCO_3$ 0.2g, K_2HPO_4 0.1g, NH_4Cl 0.1g, در 1000ml آب مقطر می باشد. pH این محیط توسط Na_2CO3 در ۸ تنظیم شد.

ارلن ها به مدت یک الی دو هفته درگرمخانه شیکردار با دمای 30°C و rpm برابر با ۱۵۰ نگهداری شدند. هر هفته 10ml از محیط های کشت غنی شده اختصاصی مجددا به محیط های کشت تازه مایع M789 و M701 تلقیح گردید. ضمن انتقال به محیط تازه, کاهش pH و جمعیت میکروبی با روش رنگ آمیزی گرم بررسی گردید.

جهت جداسازی و تهیه کشت خالص از جدایه های مورد نظر, با توجه به میزان کاهش pH از محیطهای کشت کاملا انتخابی و اختصاصی تیوباسیلوس های اکسیدکننده گوگرد نظیر M752, 9K, S2 , ATMI استفاده گردید.

محیط کشت اختصاصی ATMI جهت جداسازی *Thiobacillus thiooxidans* می باشد; این محیط حاوی ترکیبات شیمیایی $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 5.0g/l , $(NH_4)_2SO_4$ 3.0g/l, KH_2PO_4 3.0g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5g/l و برموکروزول پورپل در 1000ml آب مقطر می باشد. pH محیط توسط 1N H_2SO_4 در حدود ۴,۴ تنظیم و استریل گردید.

محیط کشت اختصاصی S2 جهت جداسازی *Thiobacillus delicates* و *Thiobscillus intermedius*کاربرد دارد. این محیط حاوی 900 ml از محلول شماره ۱ که شامل NaCl 50.0g/l, $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 5.0 g/l, NH_4Cl 0.4 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1g/l , 2mg/l فنل رد و 900ml آب مقطر و 100ml محلول شماره ۲ شامل Na_2HPO_4 1.5g/l KH_2PO_4 7.9 g/l در 100ml آب مقطر و 10 ml محلول فلزات ضروری(Trace metal) شامل Disodium EDTA 50.0g/l, NaOH 11.0g/l, $ZnSO_4$ 11.0g/l, $CaCl_2.2H_2O$ 7.34g/l, $FeSO_4.7H_2O$ 5.0g/l, $MnCl_2.4H_2O$ 2.5g/l, $CoCl_2$ 0.5g/l, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 0.5g/l,$nCuSO_4.5H_2O$ 0.2g/l, در 10ml آب مقطر می باشد. برای تهیه این محیط ۹۰۰ میلی لیتر از محلول شماره ۱ به همراه ۱۰ میلی لیتر از فلزات ضروری استریل گردید. محلول شماره ۲ بطور جداگانه استریل شد. هردو محلول در شرایط عاری از میکروب با هم مخلوط گردیدند و pH کل توسط 1N Na_2CO_3 در ۵,۳ تنظیم و استریل شد.

محیط کشت اختصاصی 9K تغییر یافته (modified) جهت جداسازی سویه های *Acidithiobacillus ferrooxidance* می باشد که شامل ترکیبات شیمیایی: $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 10.0g/l, KH_2PO_4 1.1g/l, $CaCl_2.2H_2O$ 147mg/l ,$MgSO_4.7H_2O$53mg/l, $(NH_4)_2SO_4$ 132mg/l, در 100ml آب مقطر استریل که pH محیط را توسط 1N H_2SO_4 در ۳ تنظیم و استریل شد .

محیط کشت اختصاصی M752 جهت جداسازی *Thiobacillus acidophilus, Thiobacillus*

albertis: $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 5.0g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 3g/l, 0.25g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4g/l, $CaCl_2.2H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$ 10mg/l. در 100ml آب مقطر میباشد. محیط مذکور H_2SO_4 1N در pH حدود ۴,۵ تنظیم و استریل گردید.

جهت جداسازی و تهیه کشت خالص میزان 10ml سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت ۷ روزه محیط کشت انتخابی و اختصاصی M789 به ارلن های حاوی 100ml محیط های اختصاصی ذکر شده تلقیح گردید. ارلن ها در گرمخانه شیکردار در دمای 30˚C و دور 150rpm به مدت یک هفته قرار داده شدند و هر هفته مجددا به میزان 10ml از محیط های کشت به محیط های کشت مایع های کشت M752, 9K, S2 , ATMI تلقیح و در همان شرایط اولیه گرماگذاری انجام شد. ضمن انتقال به محیط های تازه, میزان کاهش pH و جمعیت با روش رنگ آمیزی گرم بررسی گردید. این روند تا سه مرتبه تکرار گردید. سپس 1ml از هر محیط کشت مرحله قبل به را به سری لوله های ۹ تایی حاوی 9ml آب مقطر استریل تلقیح و درنهایت 0.1ml از هر رقت توسط سمپلر استاندارد و استریل در سطح محیط کشت جامد ATMI حاوی 15g/l آگار نوبل (برای جلوگیری از فعالیت قارچ های ساپروفیت) با روش اسپرید متد کشت انجام شد. لازم به ذکر است که در تمام مراحل نتایج با سویه استاندارد مقایسه شد (ویدیالاکشمی ۲۰۰۷). برای حفظ و نگهداری جدایه مورد نظر, جدایه ها پس از رشد کافی در محیط های کشت اختصاصی ذکر شده, در شیشه های اسید شویی شده استریل حاوی محیط کشت مایع ATMI و در یخچال با دمای 5˚C نگهداری و به فاصله زمانی ۲ ماه, دوباره پاساژ داده شد. (راوچاندرا و همکاران ۲۰۰۷ و کانتاکوت ۲۰۰۴ و نوریس ۱۹۷۸).

شناسایی جدایه مورد نظر

برای شناسایی جدایه مورد نظر, ازروش های مرفولوژیکی, فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده گردید. همچنین در تمام آزمایشات, ارلنی به عنوان شاهد, حاوی محیط کشت مورد نظر و بدون میکروب, همراه با سایر ارلن ها بررسی گردید. اشاره می شود که در تمام آزمایشات ۳ مرتبه تکرار شدند تا نتیجه یکسان مشخص شود. برای این منظور آزمایشهای مختلف به شرح زیر انجام شد.

بررسی ماکروسکوپی کلنی ها:

در این مرحله خصوصیات ظاهری کلنی های رشد یافته روی محیط کشت اختصاصی ATMI, بررسی شد.

بررسی میکروسکوپی جدایه:

در این مرحله از کلنی های جدایه *PASH1* رشد یافته روی محیط کشت اختصاصی ATMI, گستره غلیظی روی لام تهیه و پس از تثبیت به کمک حرارت, به روش

گرم رنگ آمیزی شد. لام های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری دوربین دار مدل Nikon با عدسی ۱۰۰ مشاهده و تصویر برداری گردید.

آزمون های شناسایی جدایه:

در این مرحله از کلنی های کشت ۷ روزه جدایه در سطح محیطATMI, براساس تست های بیوشیمیایی اشاره شده در کتاب راهنمای باکتری شناسی سیستماتیک برگی و کتاب پروکاریوت ها آزمون های شناسایی انجام شد.

بررسی های فیزیولوژیکی

برای مطالعه خصوصیات فیزیولوژیکی جدایه مورد نظر, آزمایشات مختلف از قبیل اکسایش ترکیبات معدنی و آلی, رشد در دماها و pH ها و دورهای مختلف شیکر صورت گرفت و در تمامی اطلاعات با برنامه آماری Spss آنالیز گردید.

رشد میکسوتروفی

برای بررسی رشد میکسوتروفی میکروب های جدا شده از محیط کشت ATMI حاوی ۰,۰۱٪ عصاره مخمر عنوان منبع کربن استفاده شد (پرونک ۱۹۹۰).

میزان 100µl سوسپانسیون جدایه *PASH1* از کشت ۷ روزه رشد یافته در محیط مایع ATMI تهیه و به 100ml از محیط کشت ATMI دارای عصاره مخمر تلقیح و به مدت ۲ هفته در گرمخانه شیکردار با دمای 30˚C و دور 150 rpm نگهداری شدند. در طی این مدت تغییرات pH محیط مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن پس از رنگ آمیزی گرم و به کمک میکروسکوپ نوری, رشد سلولی بررسی شد. جهت اطمینان از رشد یا عدم رشد جدایه, کشت مجدد در محیط ATMI جامد انجام و در گرمخانه دمای 30˚C به مدت ۱۰ روز نگهداری و سپس بررسی از نظر حضور کلنی انجام شد.

بررسی رشد در دماهای مختلف

100µl سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت ۷ روزه جدایه *PASH1* رشد یافت روی محیط جامد ATMI مطابق با کدورت لوله نیم مک فارلند به 100ml محیط مایع ATMI و سپس در دماهای۱۰,۱۵,۲۵, ۳۰,۳۵, ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز در گرمخانه شیکردار با دور 150rpm و دمای 30˚C نگهداری شد و سپس میزان رشد با روش کدورت سنجی اسپکتروفوتومتری در طول موج 540 نانومتر بررسی گردید (هاریسون ۱۹۸۴و بارتون ۱۹۶۸).

رشد در دور های مختلف شیکر

جهت بررسی میزان رشد جدایه *PASH1* در دور های مختلف شیکر ۱۰۰و ۱۵۰و ۲۰۰و ۲۵۰ از ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون میکروبی رشد کرده به ارلن های حاوی 100ml محیط کشت تازه ATMI بر طبق روش سوزوکی (۱۹۹۹) انجام و در دورهای مختلف شیکر به

مدت ۱۰ روز انکوبه شدند. سپس رشد جدایه *PASH1* با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر مطابق روش پنگ (۱۹۹۴) سنجیده شد.

سنجش رشد در pH مختلف

100µl سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از کشت ۷ روزه جدایه *PASH1* رشد یافت روی محیط جامد ATMI مطابق با کدورت لوله نیم مک فارلند به 100ml محیط مایع ATMI و سپس در pH های مختلف ۱, ۲ , ۳, ۴ ,۵و ۶ به مدت ۱۰ روز در گرمخانه شیکردار با دور 150rpm و دمای 30˚C نگهداری شد و میزان رشد با روش کدورت سنجی اسپکتروفوتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی گردید(هاریسون ۱۹۸۴و بارتون ۱۹۶۸).

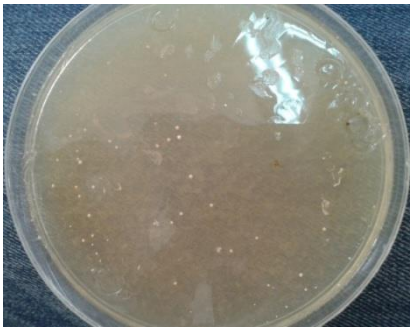
شایان ذکر است که در تمام روش های بهینه سازی برای اطمینان از صحت پاسخ های گرفته شده آزمایشات سه مرتبه تکرار گردیدند و تغییرات کدورت جدایه و pH در طی ۱۰ روز متوالی روی نمودار با روش Exel ترسیم شدند.

اثر شرایط بهینه روی تولید اسیدسولفوریک به عنوان محصول نهایی و میزان رشد جدایه

جهت اندازه گیری میزان تولید اسیدسولفوریک جدایه به عنوان محصول نهایی پس از انجام بهینه سازی شرایط رشد, همان میزان سوسپاسیون با شرایط ذکر شده را به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه شیکردار با دور 200rpm در دمای 30˚C نگهداری و میزان رشد با روش کدورت سنجی توسط اسپکتروفوتومتری در طول موج 540 نانومتر تعیین شد. همچنین سنجش اسیدسولفوریک تولید شده با روش تیتراسیون 0.1N صورت گرفت (لیو و همکاران ۲۰۰۴).

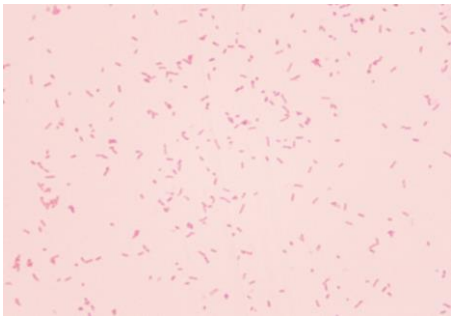
نتایج

نتایج حاصل از آزمایش های انجام شده در مراحل اولیه کار, نشان داد که پس از دو هفته از میان ۱۲۰ نمونه خاک تلقیح شده به محیط های غنی شده , از ۲۰ نمونه ی خاک باسیل های گرم منفی با توانایی مصرف تیوسولفات سدیم و کاهش pH محیط کشت غربالگری شدند. در بررسی های بیشتر به دلیل ضعف در اکسیدکنندگی تنها یک جدایه شامل *PASH1* باقی ماند که توانایی رشد در محیط حاوی تیوسولفات سدیم را داشت. نتایج کشت خالص جدایه رشد یافته در محیط کشت جامد متوالی نشان داده شده در شکل شماره ۱ پس از یک هفته, کلنی هایی ریز سفید مایل به زرد با هاله شفاف, گرد و برجسته را روی پلیت محیط کشت جامد ATMI نشان داد.



شکل ۱. کلنی های تک جدایه *PASH1* رشد یافته روی محیط کشت جامد ATMI بعد از ۲ هفته

پس از رنگ آمیزی گرم, زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد که این باکتری دارای سلولهای میله ای شکل و گرم منفی, بسیار کوتاه و باریک با اندازه 1-2µm, پلی مورف بودند و به صورت تکی و دوتایی مشاهده شدند(شکل شماره ۲).



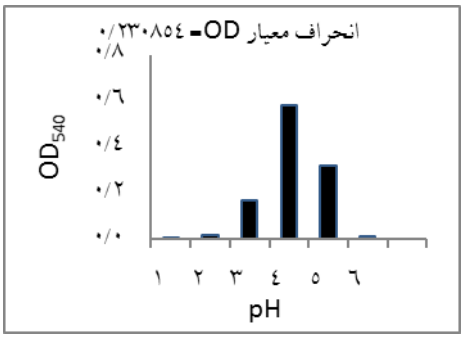
شکل ۲. رنگ آمیزی گرم سلول های *PASH1* از کلنی تک رشد یافته روی محیط ATMI

جدول ۱. نتایج آزمون های انجام شده بر روی جدایه *PASH1*

آزمایش	***PASH1***
محیط کشت	ATMI
کاهش pH	۳
pH محدوده رشد	۳-۵
دنیتریفیکاسیون نیتروژن	NO_2^- عدم تولید
تحرک	+

اثر pH های مختلف در میزان رشد جدایه *PASH1* :

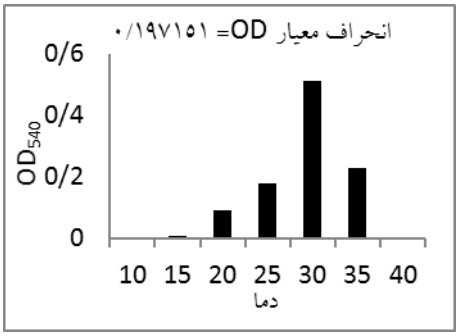
با بررسی رشد *PASH1* در محیط ATMI با pH های مختلف پس از گرماگذاری مشاهده شد که جدایه در pHهای۱ تا ۵ توانایی رشد و کاهش pH را دارد. با اندازه گیری توده سلولی توسط اسپکتروفتومتر اثبات شد که جدایه بالاترین رشد را pH=4 داشت.همچنین جدایه توانایی رشد در pH های ۶و ۷و ۸ را نداشت. نمودار ۲ نتایج حاصل از رشد در pH های مختلف را نشان میدهد.



نمودار۳. بررسی میزان رشد *PASH1* در pH های مختلف در محیط کشت ATMI طی ۱۰ روز گرماگذاری

اثر دماهای مختلف در میزان رشد جدایه *PASH1*:

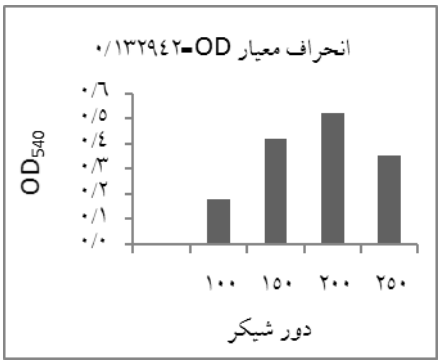
طبق اندازه گیری توده سلولی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر مشاهده شد بالاترین میزان رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بود. منحنی رشد جدایه در در دماهای مختلف درشکل نشان داده شده است(نمودار ۴).



نمودار۴. میزان رشد *PASH1* در دماهای مختلف در محیط کشت ATMI طی ۱۰ روز گرماگذاری

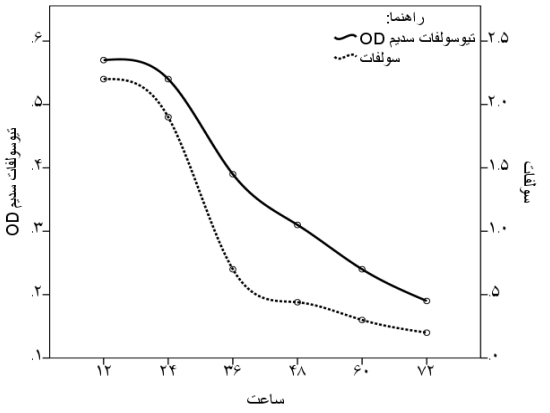
میزان رشد جدایه *PASH1* در دورهای مختلف شیکر

طبق بررسی غلظت سلولی در محیط کشت ATMI با اندازه گیری کدورت رشد مشاهده شد جدایه توانایی رشد در دورهای مختلف شیکر را دارد. در نمودار ۵, بالاترین میزان غلظت رشد این باکتری در 200rpm بود.



نمودار ۵. بررسی میزان رشد جدایه *PASH1* با دستگاه اسپکتروفوتومتری در محیط کشت ATMI در دورهای مختلف شیکر طی ۱۰ روز

به طور کلی هدف از بهینه سازی شرایط رشد, بدست آوردن میزان محصول نهایی (اسیدسولفوریک) طی رشد جدایه *PASH1*محیط رشد سویه میکروبی که نشان دهنده میزان مصرف تیوسولفات سدیم پس از بهینه سازی می باشد. جدایه *PASH1* طی ۱۵ روز توانایی اکسیداسیون کامل تیوسولفات را داشت. در نهایت پس از سازش, میزان اکسیداسیون به ۷۲ ساعت کاهش یافت. طی ۳۶ ساعت اول توانست بالاترین میزان تولید اسید سولفوریک و کاهش pH را نشان دهد. در نمودار ۶ بیشترین میزان تولید اسید سولفوریک پس از ۷۲ ساعت 0.2mM نشان داده است.



نمودار ۶. بررسی میزان تولید SO_4^{2-} در شرایط بهینه در سویه *PASH1* روی محیط در محیط کشت ATMI طی ۱۰ روز

بحث و نتیجه گیری

به علت حضور گوگرد در خاک های اطراف معدن منگنز و نتایج حاصل از آزمایش های انجام شده در مراحل اولیه کار و فعالیت تغذیه ای این باکتری در استفاده از تیوسولفات سدیم به عنوان منبع انرژی, می توان بیان داشت که حضور این باکتری در نمونه ها دور از انتظار نیست.

در بررسی تاثیر درجه حرارت بر میزان رشد و اکسیداسیون جدایه *PASH1* مشاهده شد که این سویه در محدوده حرارتی ۴۰-۱۵ درجه سانتی گراد رشد کرده و در دمای بالاتر و پایین تر قادر به رشد نمی باشد. هاریسون در سال ۱۹۸۴ گزارش داد که حداکثر دمای رشد در تیوباسیلوس تیواکسیدانس ۳۷-۱۰ درجه سانتی گراد است. همچنین سیلور و دیناردو در سال ۱۹۸۱ نیز توانایی اکسیداسیون باکتری *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* را در محدوده ۴۰-۱۰ درجه سانتی گراد گزارش دادند. تی سایی در سال ۲۰۰۳ بالاترین میزان بیولچینگ *اسیدی تیوباسیلوس تیواکسیدانس* را در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گزارش داد. نتایج حاصل از تاثیر pH محیط کشت نشان داد جدایه *PASH1* در محیط کشت اختصاصی ATMI در محدوده pH نزدیک به ۱ رشد می کند, پس می توان نتیجه گرفت جدایه مذکور یک اتوتروف اسید دوست به شمار می آید. پلامپ در سال ۲۰۰۸ بالاترین میزان رشد این باکتری را در طول موج ۵۵۰ در pH=1.5 گزارش داد و راپلا ۱۹۷۳ بالاترین میزان رشد را در طول موج ۵۵۰ پس از ۱۰ روز در محیط اختصاصی ATMI حدود ۰/۳۵ در pH=4 گزارش داد که این pH طی ۱۰ روز تا حدود ۰/۵کاهش یافت. سیلور و دیناردو ۱۹۸۱ نیز توانایی اکسیداسیون در محدوده pH=3-5.5 گزارش کردند. باکتری مشاهدات نشان داد که این باکتری در شرایط سکون نیز به مدت محدود قابلیت رشد را نیز دارد این قضیه را بالکی در سال ۲۰۱۲ به این صورت تشریح کرد که آب منبع مهم اکسیژن می باشد و طی هوادهی میزان رشد افزایش یافت که نشان دهنده هوازی بودن این باکتری می باشد. همچنین سوزوکی و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ بالاترین میزان رشد را در همین محدوده از غلظت آمونیوم گزارش دادند. ناریش کومر و همکاران ۲۰۰۷ طی بررسی میزان رشد این گونه و تولید محصول نهایی (اسید سولفوریک) در pH های ۷,۶,۵,۴,۳ بالاترین میزان توده سولی و تولید محصول نهایی را در pH=4 گزارش داد. تی سایی در سال ۲۰۰۳ در محیط با میزان 24g/l گوگرد, بالاترین وزن خشک سول ها و اسیدسولفوریک را گزارش داد. در بررسی انجام شده در این تحقیق برای بررسی بالاترین میزان اسید سولفوریک تولیدی از محیط دارای 5g/l از تیوسولفات استفاده شد.

با توجه به انجام تست های فنوتیپیک و فیزیولوژیک طی مصرف تیوسولفات و کاهش pH طی رشد و نیز خصوصیات شکلی و میکروسکوپی جدایه *PASH1* , آنها را در جنس تیوباسیلوس قرار دادیم. با توجه به میزان اطلاعات بدست آمده طی سازش دهی و رشد مناسب این باکتری در pH اسیدی, استفاده آن را در صنایع مختلف بخصوص استخراج بیولوژیکی به صورت خالص یا همراه با سایر اکسیدکننده ها و را امکان پذیر می کند.

تشکر و قدردانی:

از زحمات جناب آقای مهندس علی جوادی مسئول آزمایشگاه ارشد میکروبیولوژی و جناب آقای دکتر نادرحقیقی که صمیمانه ما را در این کارتحقیقی همکاری نمودند تقدیر و سپاس به عمل می آوریم. این کار استخراج شده از پایان نامه انجام شده در "دانشگاه آزاد واحد قم" بوده است.

References

1- Adair, F. W., 2001. Membrane-assosiated Sulfur Oxidation by the Autotroph *Thiobacillus thiooxidans*. Journal of Bacteriology. Vol. 92, No. 4, PP. 900-90.

2- Balci, N., Mayer. B., Shanks. W. C., 2012. Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced during abiotic and bacterial oxidation of Sphalerite and elemental sulfur. Geochemia et Cosmochimica Acta. Vol. 77, PP. 335-340.

3- Baker–Austin, C., Dopson, M., 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends in Microbiology. vol. 15, No. 4, PP. 165-170.

4- Barton, L. L., and Shively, J. M., 1968. Thiosulfate utilization by Thiobacillus thiooxidans ATCC 8085. J. Bacteriol. 95:720.

5- Cobley, J. G., cox, J. C., 1983. Energy Conse revation in *acidophillus bacteria*. microbiological. Reviews. Vol. 47. 579-595.

6- Harrison, A. P., 1984. The acidophilic and other acidophilic bacteria that share their habitat. Ann. Rev .Microbiol. Vol. 38, PP. 265-292.

7- Hooper, D. G., Shane, J., Strus. D. C., Kibura, K.H., 2010. Isolathion of Sulfur Reducing and Oxidizing Bacteria Found IN Contaminated Drawall. Int. J. Mol. Sci. vol. 11. 647-655.

8- Johnson, D. B., 2006. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganism. Fems Microbiology miniReview. Vol. 27, PP. 307-309.

9- Kantachote, D., Innuway, W., 2004. Isolation of *Thiobacillus sp*. For use in treatment of rubber sheet wastewater. Songklanakarin j.sci. Technol. Vol. 26, No. 5, PP.649-657.

10- Kelly,D.P., Harrison, A. P., 1989. Genus *Thiobacillus*, sp. 1842-1858.In J.T.Staley, et al Bergeys manual of systematic bacteriology,Vol.3.Williams and Wilkins , USA.

11- Liu, H., Lan, Y. W., 2004. Optimal production of sulfuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. Process Biochemistry. Vol. 39. PP. 1953-1954.

12- Msau, R.J., Suzuki, I., 2001. Mechanism of oxidation of inorganic sulfur compounds by thiosulfate-grown *Thiobacillus thiooxidans*. Can Journal Microbiol. Vol. 47, No. 4, PP.

348-358.

13- Norris, P. R., And Kelly. D. P., 1978. Toxic metals in leaching systems, P. 83-102. In L. E. Murr, A. E. torma, and J. A. Brierley. Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena. Acedemic press, New York.

14- Naresh Kumer. R. Nagendran. R. 2007. Influensce of initial pH on bioleaching of heavy metals from contaminated soil employing indigenous Acidithiobacillus thiooxidans.Chemophere. 66. 1775-1781.

15- Plumb, J. J., Muddle, R., Franzmann, P. D., 2008. Effect of pH on rates of iron and Sulfur oxidation. Minerals Engineering. Vol. 21, PP. 76-82.

16- Ravichandra, P., Mugeraya, G., Rao, A. G., 2007. Isolation of *Thiobacillus sp* from aerobic of distillery and dairy effluent treatment plant and Sulfid oxidation activity at different Concenteration. Journal of enviromental Biology. Vol. 28, No .4, 819-822.

17- Rupela, O. P., Tauro, P., 1973. Isolation and charactrization of *Thiobacillus* from Alkali Soils. Soil Boil Biochem. Vol.5, PP.891-893.

18- Silver, M., Dinardo, O. 1981. Factors Affercting Oxidation of Thiosalts by Thiobacilli. Applied and Enviroment Microbiology. Vol. 41, No. 6, PP. 1301-1305.

19- Suzuki, I., Lee, D., Mackay, L., 1999. Effect of Varios Ions, PH, and Osmotic Pressure on Oxidation of Elemental Sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. Appl Environ Microbial. Vol. 65 , No. 11, PP. 5163-5168.

20- Tang, K., Baskaran, V., Nemati, M., 2009. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbioligy. Biokinetics and their rale in ptroleum and miming industries review. Biochemical Engineering Journal . Vol. 44, PP.73-79.

21- Tsai. L. J., Yu. K. C., Chen. Sh. F., Kung. P. Y., 2003. Effect of temperature on removal of heavy metals from contaminanted river sediments via bioleaching. Water Reaserch. 37. 2449-2457.

22- Taylor, B. F., Hoare. D. S., Hoare, and S. L., 1971. Thiobacillus denitrificans as an obligate chemolithotroph: Isolation and growth studies, Archiv Microbiol. 8: 193-204.

23- Vidyalakshmi, P., sridar . R., 2007. Isolation and characterization Sulphur Oxidizing Bacteria. Journal of culture collections. Vol. 5, PP. 73-77.

24- Wood, A. P., Kelly, D. P., 1988. Isolation and physiological characterization of *Thiobacillus thyasyris sp*. Nov., A novelmarin facultatively autotroph and putative symbiont of Thyasira flexuosa. Arch. Microbiol. Vol. 152. PP. 160- 164.